



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

TATIANNE LEITE NASCIMENTO

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE ACEROLEIRA, POTENCIAL
ANTAGÔNICO FRENTE AO AGENTE DA ANTRACNOSE E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp.**

**RECIFE
2014**



TATIANNE LEITE NASCIMENTO

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE ACEROLEIRA, POTENCIAL
ANTAGÔNICO FRENTE AO AGENTE DA ANTRACNOSE E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Área de Concentração em Micologia Básica e Aplicada, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biologia de Fungos.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta.

Co-orientador: Prof. Dr. Delson Laranjeira.

**RECIFE
2014**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Nascimento, Tatianne Leite

Diversidade de fungos endofíticos de aceroleira, potencial antagônico frente ao agente da antracnose e caracterização molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. / Tatianne Leite Nascimento-Recife: O Autor, 2014.

124 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Cristina Maria de Souza Motta

Coorientador: Delson Laranjeira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2014.

Inclui referências

1. Fungos 2. Aceroleira 3. Antracnose I. Motta, Cristina Maria de Souza (orientadora) II. Laranjeira, Delson (coorient.) III. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-366

TATIANNE LEITE NASCIMENTO

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE ACEROLEIRA, POTENCIAL
ANTAGÔNICO FRENTE AO AGENTE DA ANTRACNOSE E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Área de Concentração em Micologia Básica e Aplicada, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 27/06/2014

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dra. Cristina Maria de Souza Motta (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Janete Magali de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Neiva Tinti de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Patricia Vieira Tiago
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Dartanhã José Soares
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Algodão-PB

MEMBROS SUPLENTEs

Dra. Mariele Porto Carneiro Leão
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Gladstone Alves da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

*Dedico as pessoas mais importantes da
minha vida: minha filha Alice Leite O.
Costa pelo amor incondicional e a minha
mãe Rosa Maria Leite Nascimento pelo
amor e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa e pelo apoio financeiro.

À UFPE, Departamento de Micologia e a Pós-graduação em Biologia de Fungos;

À professora Dra. Cristina Maria Souza Motta, minha orientadora, pelos conhecimentos transmitidos, apoio, compreensão e pela confiança depositada em mim;

Ao professor Dr. Delson Laranjeira pelas orientações;

Às professoras Dra. Neiva Tinti de Oliveira, Dra. Patricia Vieira Tiago, Dra. Janete Magali de Araújo, Dra. Mariele Porto Carneiro Leão, aos professores Dr. Dartanhã José Soares e Dr. Gladstone Alves da Silva, membros da banca examinadora, pela contribuição dada ao trabalho.

À professora Dra. Neiva Tinti de Oliveira pelas orientações na biologia molecular e disposição em ajudar sempre que necessário;

À professora Dra. Patrícia Vieira Tiago pelas orientações e apoio na conclusão desse trabalho, e principalmente pela amizade e carinho;

Às professoras Débora Maria Massa Lima e Maria José dos Santos Fernandes, pela atenção e colaboração na identificação dos fungos;

Aos proprietários do pomar comercial “Acerolândia” por permitir as coletas dos materiais vegetais utilizados neste trabalho;

Ao Nelson Correia de Lima Júnior pela disposição e ajuda, possibilitando a realização das análises filogenéticas;

À amiga Paula Danielli pelas orientações e ajuda nos ensaios de antagonismo;

À Maria Ramos de Lima, pela ajuda, apoio e amizade nas etapas mais críticas desse trabalho, principalmente no apoio técnico durante a minha licença a maternidade;

À Aline B. Cunha pela ajuda técnica e amizade;

À Danielle Karla Silva pela ajuda em algumas análises ecológicas;

Ao Roger Melo pela ajuda na edição das fotos em microscopia;

Ao Jadson Bezerra pela ajuda e por compartilhar conhecimentos sobre os endófitos;

Aos companheiros do Laboratório de Biologia Molecular, em especial Dra. Mariele Porto, Rennan Nascimento e Nelson Lima;

Às amigas do Laboratório de pesquisa da Micoteca URM, Odaci Camilo, Minelli Albuquerque, Roberta Cruz, Cyndy Mary, Julianna Fonseca, Juliana Lima e Aeda Araújo;

A toda equipe da Micoteca URM, em especial a Eliane Barbosa, Rosana, Ana Cristina, Luan Amim e Susana.

Ao Phelipe Oller pela ajuda nas coletas;

A todos os meus familiares, tios, tias, primos e primas pelo apoio e confiança;

Aos meus pais, Rosa Maria Leite Nascimento e José Batista do Nascimento, com todo carinho pelo apoio, amor e confiança. Em especial a minha mãe pelo aconchego, palavras de incentivo nos momentos de angústias e pelo suporte em todos os sentidos que me permitiram chegar aonde cheguei;

Às minhas irmãs Daianne e Ariane pelo otimismo e carinho durante esta etapa de minha vida;

Às amigas-irmãs Heloiza Oliveira, Paula Danielli e Susane Chang por compartilhar comigo das angústias e anseios durante essa caminhada, por me escutarem, aconselhar-me e tornar todas as dificuldades enfrentadas mais fáceis de superar;

Aos amigos Juliana e Rodrigo que mesmo longe me apoiaram nessa caminhada;

Aos demais amigos do Departamento de Micologia e da vida pelos momentos de descontração, apoio, agradável convivência e pelas palavras de apoio e torcida para a conclusão dessa etapa da minha vida;

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta me ajudaram na conclusão dessa pesquisa.

RESUMO

A aceroleira (*Malpighia emarginata*) é uma planta frutífera rústica, resistente e apresenta grande potencial econômico, no entanto sua produtividade pode ser afetada pela antracnose, doença causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. Apesar de seu claro papel como agente causal de doença de plantas, espécies de *Colletotrichum* tem sido frequentemente encontradas associadas a comunidade de fungos endofíticos de plantas tropicais. Diante disso, os objetivos do trabalho foram analisar a estrutura e a composição da comunidade de fungos endofíticos de aceroleira, caracterizar por morfologia e técnicas de biologia molecular isolados de *Colletotrichum* spp. (endófitos e fitopatógenos) e avaliar o potencial antagonístico dos endófitos frente ao agente causal da antracnose. Os endófitos foram isolados de folhas saudáveis de diferentes níveis da copa (ápice e parte inferior) de aceroleiras e os dados obtidos avaliados por análises ecológicas. Os fitopatógenos foram isolados de lesões de folhas com sintomas de antracnose. Os isolados de *Colletotrichum* foram caracterizados pela velocidade de crescimento, micro e macromorfologia, submetidos a extração do DNA, PCR e sequenciamento (ITS e β -tubulina) e analisados por iniciadores ISSR. Os fitopatógenos foram submetidos ao teste de patogenicidade *in vitro*. O antagonismo se deu pela técnica de cultura pareada e disco difusão (extratos brutos/acetato de etila). Foi verificada alta diversidade de endófitos e o método de amostragem foi eficaz para aumentar o número de táxons obtidos. As espécies dominantes foram *Colletotrichum* spp. (inferior da copa) e *Guignardia bidwellii* (ápice da copa). Foram identificadas sete espécies de *Colletotrichum* (*C. karstii*, *C. brasiliense*, *C. gloeosporioides* sensu stricto, *C. theobromicola*, *C. siamense*, *C. fructicola*, *C. cliviae*), sendo alta a variabilidade intra e interespecífica. *Colletotrichum karstii*, *C. siamense*, *C. fructicola* e *C. cliviae* são citados pela primeira vez como patógenos de aceroleira. As espécies endofíticas *Pteronidium* state of *Apiospora camptospora* e *Bipolaris setariae* se destacaram como potencialmente úteis no controle de *C. theobromicola*.

Palavras-chave: *Malpighia emarginata*. ITS. B-tubulina. ISSR. *Colletotrichum*. *Guignardia bidwellii*.

ABSTRACT

The acerola (*Malpighia emarginata*) is a rustic plant, resistant and has great economic potential, though their productivity may be affected by anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. Despite its clear role as the causal agent of plant disease, *Colletotrichum* species has been often found associated with community endophytes of tropical plants. The objectives were to analyze the structure and composition of endophytic fungi *Malpighia emarginata* community, characterize *Colletotrichum* spp. (endophytes and pathogens) by morphology and molecular biology techniques and evaluate the antagonistic potential of endophytes against the causal agent of anthracnose. Endophytes were isolated from healthy leaves of the apex and the lower part of the canopy of *M. emarginata* and the data evaluated by ecological analyzes. The pathogens were isolated from leaves with anthracnose. *Colletotrichum* isolates were characterized by the rate of growth, and micro macromorphology, submitted to DNA extraction, PCR and sequencing (ITS and β -tubulin) and analyzed by ISSR primers. The pathogens were subjected to in vitro pathogenicity test. The antagonism was assessed by the technique of paired culture and disk diffusion (crude extracts / ethyl acetate). High diversity of endophytes was detected; the sampling method was effective in increasing the number of taxa obtained. The dominant species were *Colletotrichum* spp. (lower canopy) and *Guignardia bidwellii* (apex canopy). Seven species of *Colletotrichum* (*C. karstii*, *C. brasiliense*, *C. gloeosporioides* sensu stricto, *C. theobromicola*, *C. siamense*, *C. fructicola* and *C. cliviae*) been identified and these showed high genetic and morphological variability. *Colletotrichum karstii*, *C. siamense*, *C. fructicola* and *C. cliviae* are first mentioned as pathogens *Malpighia emarginata*. Endophytic species *Pteroconium* state of *Apiospora camptospora* and *Bipolaris setariae* stood out as potentially useful in controlling *C. theobromicola*.

Key-words: *Malpighia emarginata*. ITS. B-tubulina. ISSR. *Colletotrichum*. *Guignardia bidwellii*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- QUADRO 1 - Definições do termo endofítico..... 21**
- FIGURA 1 - Lesões de antracnose em folhas (A) e haste de aceroleiras (B)..... 18**
- FIGURA 2 - A colonização de folhas por endofíticos e patógeno. a, Colonização natural das folhas, aumentando ao longo do tempo, por uma comunidade diversificada de endofíticos. b, c, Os resultados dos principais experimentos realizados por Arnold *et al.* (2003) em mudas de cacau axênicas. b, A ação do patógeno nas plantas inoculados com endofíticos resultou em, comparativamente, pouca ocupação nas células da folha pelo patógeno e danos limitados. c, Por outro lado, o patógeno se estabeleceu bem nas folhas controle, livres de endófito, e causou danos graves ou morte da folha..... 35**
- FIGURA 3 - Riqueza média de táxons de fungos endofíticos de folhas do ápice e da parte inferior da copa de aceroleira56**
- FIGURA 4 - Curvas de acumulação de espécies de fungos endofíticos de aceroleira. (▲) indica as curvas acumulação de espécies de fungos endofíticos e (▼) indica as curvas de acumulação de fungos endofíticos estimativas por cada índice (A= Chao 1; B= Chao 2; C =Jackknife 1; D= Jackknife 2)..... 58**
- FIGURA 5 - Reconstrução filogenética de espécies endofíticas (E) e fitopatógenas (F) do gênero *Colletotrichum* isoladas de aceroleira (*Malpighia emarginata*). A árvore foi construída a partir de sequências concenso ITS e TUB2, através do método de máxima parcimônia (MP) e verossimilhança (MV) com 5000 reamostragens de *bootstrap* pela inferência bayesiana (BA) com 1 milhão de gerações. Os valores acima de 50% são mostrados. *Colletotrichum dracaenophilum* foi utilizado como grupo externo. As culturas desse estudo estão destacadas em negrito e as culturas autênticas e ex-tipo estão com um asterisco..... 74**
- FIGURA 6 - Características morfológicas de *Colletotrichum karstii*. A – Aspectos macroscópicos das colônias de diferentes isolados de *C. karstii*, cultivados em meio de cultura BDA (Difco®) e submetidos à temperatura de 20°C sob alternância de 12 horas de luz fluorescente/12 horas de escuro, durante sete dias. B – Estruturas microscópicas: a, b, c – apressórios; d – conídios em ácido láctico, e – conídios em microscopia eletrônica de varredura, f – conídios corados em Azul de Amam..... 77**
- FIGURA 7 - Características morfológicas de *Colletotrichum brasiliense* (E79). A – Aspectos macroscópicos da colônia em: a - sete dias e b – 10 dias de cultivo em meio de cultura BDA (Difco®), à temperatura de 20°C sob alternância de 12 horas de luz fluorescente/12 horas de escuro. B – Conídio em ácido láctico..... 78**
- FIGURA 8 - Características morfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides* (E34). A – Aspectos macroscópicos da colônia em: a - sete dias e b – 10 dias de cultivo em meio de cultura BDA (Difco®), à temperatura de 20°C sob alternância de 12 horas de luz fluorescente/12 horas de escuro. B – Estruturas microscópicas: a, b, c – apressórios; d – esporos em ácido láctico, e, f – conídio e conidióforo em ácido láctico..... 79**

FIGURA 9 - Características morfológicas de *Colletotrichum theobromicola*. A – Aspectos macroscópicos da colônia do isolado E21 em: a - sete dias e b – 10 dias de cultivo em meio de cultura BDA (Difco®), à temperatura de 20°C sob alternância de 12 horas de luz fluorescente/12 horas de escuro. B – Estruturas microscópicas de diferentes isolados: a, b, c, d – apressórios; e – conídios em ácido láctico, f, g – conídio em microscopia eletrônica de varredura..... 80

FIGURA 10 - Características morfológicas de *Colletotrichum siamense*. A – Aspectos macroscópicos das colônias de diferentes isolados de *C. siamense*, cultivados em meio de cultura BDA (Difco®) e submetidos à temperatura de 20°C sob alternância de 12 horas de luz fluorescente/12 horas de escuro, durante sete dias. B – Estruturas microscópicas: a, b – apressórios, c - conídios em ácido láctico..... 81

FIGURA 11 - Características morfológicas de *Colletotrichum fruticola*. A – Aspectos macroscópicos das colônias de diferentes isolados de *C. fruticola*, cultivados em meio de cultura BDA (Difco®) e submetidos à temperatura de 20°C sob alternância de 12 horas de luz fluorescente/12 horas de escuro, durante sete dias. B – Estruturas microscópicas: a, b – apressórios, c - conídios em ácido láctico..... 82

FIGURA 12 - Características morfológicas de *Colletotrichum cliviae*. A – Aspectos macroscópicos das colônias de diferentes isolados de *C. cliviae*, cultivados em meio de cultura BDA (Difco®) e submetidos à temperatura de 20°C sob alternância de 12 horas de luz fluorescente/12 horas de escuro, durante sete dias. B – Estruturas microscópicas: a, b, c – apressórios; d – conídios em ácido láctico, e, f – conídios em microscopia eletrônica de varredura..... 83

FIGURA 13 - Dendrograma de similaridade fenotípica de espécies de *Colletotrichum* endófitas (E) e fitopatógenas (F) de aceroleira, com base no índice de velocidade de crescimento e características morfológicas. Foi utilizado o coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA..... 85

FIGURA 14 - Dendrograma de similaridade de tamanho de fragmentos de DNA obtidos pela amplificação com o iniciador (GACA)₄ de isolados de *Colletotrichum* spp. endofíticos (E) e fitopatogênicos (F) de *Malpighia emarginata*..... 87

FIGURA 15 - Dendrograma de similaridade de tamanho de fragmentos de DNA obtidos pela amplificação com o iniciador M13 de isolados de *Colletotrichum* spp. endofíticos (E) e fitopatogênicos (F) de *Malpighia emarginata*..... 88

FIGURA 16 - Antagonismo em cultura pareada: A – Placa controle do fitopatógeno *Colletotrichum theobromicola* F105/URM 7137; B - Endófito *Pteronidium state of Apiospora camptospora* C1-91 (esquerda) e fitopatógeno (direita); C - Endófito *Phomopsis archeri* C1-40 (esquerda) e fitopatógeno (direita); D - *Khuskia oryzae* C1-42 (esquerda) e fitopatógeno (direita)..... 107

FIGURA 17 - *Pteronidium state of Apiospora camptospora*: A- Colônia; B a D – Esporos..... 109

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Relação de fungos endofíticos considerados dominantes em diferentes plantas hospedeiras taxonomicamente não relacionadas..... 26**
- TABELA 2 - Táxons e frequência relativa de fungos endofíticos de folhas do ápice e da parte inferior da copa de aceroleira (*Malpighia emarginata*) nas coletas 1 (setembro/2010), 2 (janeiro/2011) e 3 (março/2012). FR= frequência relativa; TC = taxa de colonização; A = Ápice e I = Parte inferior da copa da planta..... 52**
- TABELA 3 - Identificação molecular dos isolados obtidos de folhas de *Malpighia emarginata* que não desenvolveram estruturas reprodutivas em meio de cultura..... 53**
- TABELA 4 - Densidade de fungos endofíticos de folhas de aceroleira (*Malpighia emarginata*) nas coletas 1 (setembro/2010), 2 (janeiro/2011) e 3 (março/2012)..... 54**
- TABELA 5 - Índices ecológicos e riqueza de táxons da comunidade de fungos endofíticos de folhas de aceroleira (*Malpighia emarginata*) nas coletas 1 (setembro/2010), 2 (janeiro/2011) e 3 (março/2012) e na amostragem geral entre os níveis da copa da planta..... 55**
- TABELA 6 - Isolados de *Colletotrichum* ssp. procedentes de folhas de aceroleira (*Malpighia emarginata*) e sequências usadas neste estudo para análise filogenética. Os isolados obtidos no presente trabalho estão destacados em negrito..... 69**
- TABELA 7 - Características morfológicas das espécies de *Colletotrichum* associadas à aceroleira (*Malpighia emarginata*)..... 76**
- TABELA 8 - Fungos endofíticos isolados de folhas de aceroleira e testados quanto a capacidade de antagonizar o agente causal da antracnose..... 99**
- TABELA 9 - Patogenicidade *in vitro* de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de aceroleira com sintomas de antracnose (adotada a escala da doença de 0-9, Montri *et al.*, 2009)..... 104**
- TABELA 10 - Porcentagem de inibição igual ou maior que 40% por isolados de fungos endofíticos frente ao fitopatógeno *Colletotrichum theobromicola* aos sete e 15 dias de incubação..... 106**
- TABELA 11 - Média dos halos de inibição (>5mm) produzidos por fungos endofíticos frente ao fitopatógeno *Colletotrichum theobromicola* F105, no teste de cultura pareada aos 15 dias de incubação e no teste de disco difusão dos seus extratos brutos..... 110**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1 Aceroleira.....	16
2.1.1 <i>Origem, características morfológicas e importância econômica.....</i>	<i>16</i>
2.1.2 <i>Propriedades biológicas da acerola e efeitos sobre a saúde.....</i>	<i>19</i>
2.2 Fungos endofíticos.....	20
2.2.1 <i>Dinâmica da interação fungo endofítico-planta hospedeira.....</i>	<i>23</i>
2.2.2 <i>Fatores bióticos e abióticos que influenciam na frequência e composição dos fungos endofíticos.....</i>	<i>24</i>
2.2.3 <i>Benefícios da relação entre fungo endofítico e planta hospedeira.....</i>	<i>28</i>
2.3 Plasticidade ecológica das espécies de fungos endofíticos.....	29
2.4 Produção de compostos antimicrobianos por fungos endofíticos.....	32
2.5 Potencial dos fungos endofíticos no controle de fungos fitopatogênicos.....	34
2.6 Identificação de espécies do gênero <i>Colletotrichum</i>: avanços e desafios.....	39
3 DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO VERTICAL DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>Malpighia emarginata</i> (ACEROLEIRA).....	45
Resumo.....	45
Introdução.....	46
Material e Métodos.....	48
Resultados.....	51
Discussão.....	59
4 IDENTIFICAÇÃO E VARIABILIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES DE <i>Colletotrichum</i> ASSOCIADAS À ACEROLEIRA (<i>Malpighia emarginata</i>).....	63
Resumo.....	63
Introdução.....	64
Material e Métodos.....	66
Resultados.....	73
Discussão.....	89
5 FUNGOS ASSOCIADOS A <i>Malpighia emarginata</i>: <i>Colletotrichum</i> spp. CAUSANDO ANTRACNOSE E POTENCIAL ANTAGÔNICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	95
Resumo.....	95
Introdução.....	96
Material e Métodos.....	98
Resultados e Discussão.....	103
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	112
REFERÊNCIAS	114

1 INTRODUÇÃO

A aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) é uma planta rústica, resistente e apresenta grande potencial econômico, particularmente porque o seu fruto é rico em vitamina C, além de ser fonte de pró-vitamina A, ferro e cálcio. Pode ser consumido ou comercializado *in natura*, e utilizado na preparação de sucos, geléia, licor, xarope, sorvete, caldas e pastas (Venâncio, 2000). O Brasil é um grande produtor, consumidor e exportador de acerola, sendo a região Nordeste a maior produtora, responsável por cerca de 64% da produção nacional que está estimada em 150 mil toneladas ao ano (Mendes *et al.*, 2012).

A produtividade da aceroleira pode ser afetada por uma série de fatores, tanto bióticos, quanto abióticos. Dentre os fatores bióticos, as doenças merecem especial destaque visto a possibilidade das mesmas resultarem em perdas significativas de qualidade e quantidade do produto final. Uma das principais doenças da aceroleira é a antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., e que afeta principalmente as folhas, as quais muitas vezes apresentam perfurações no limbo foliar devido a ruptura dos tecidos afetados (Tavares, 1995; Almeida *et al.*, 2003; Mendes *et al.*, 2012).

Espécies do gênero *Colletotrichum* Corda, são de modo geral, consideradas agentes causais de doenças de plantas, principalmente a antracnose, que pode afetar tanto folhas quanto frutos de várias espécies de plantas (Agrios, 2005). Apesar de seu claro papel como agente causal de doença de plantas, espécies de *Colletotrichum* tem sido frequentemente encontradas associadas a comunidade de fungos endofíticos de plantas tropicais. Um dos exemplos mais marcantes dessa associação foi relatado por Arnold *et al.* (2003) que isolaram *Colletotrichum* spp. em 88,9% das folhas de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.).

Embora o comportamento ecológico das diferentes espécies de fungos endofíticos em associação com a planta hospedeira ainda não seja totalmente claro, vários estudos têm demonstrado ou sugerido que a interação fungo endofítico-planta hospedeira resulta em benefícios para a planta, como por exemplo, diminuição da herbivoria, resistência a fitopatógenos e incremento no desenvolvimento vegetal (Peixoto-Neto *et al.*, 2004). Dessa forma o uso de fungos endofíticos, para o controle biológico de doenças é considerado uma alternativa promissora (Azevedo *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2003; Mejía *et al.*, 2008; Orole e Adejumo, 2009).

Em sistemas convencionais de cultivo, o controle de fitopatógenos é baseado principalmente na utilização de fungicidas químicos que apesar de satisfatórios, resultam muitas vezes em impactos negativos nos mais diferentes compartimentos dos ecossistemas resultando também em danos a

saúde humana, quer seja do aplicador, como também do consumidor (Bettiol e Morandi, 2009). Além disso, a comunidade de fungos endofíticos de *M. emarginata* é praticamente desconhecida.

Diante do exposto objetivou-se, nesse trabalho, analisar a estrutura e a composição da comunidade de fungos endofíticos em folhas de aceroleiras e o potencial destes no controle do agente causal da antracnose da aceroleira, além de verificar a variabilidade genética entre isolados endofíticos e fitopatogênicos de *Colletotrichum* spp.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Aceroleira

2.1.1 Origem, características morfológicas e importância econômica

A aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.), também conhecida como “Cereja das Antilhas” ou “Cereja dos Barbados”, pertence a família Malpighiaceae e é originária da América Central e Norte da América do Sul, sendo conhecida pelo elevado teor de ácido ascórbico (vitamina C) em seu fruto, em torno de 1500 a 4600 mg por 100 g de polpa (Araújo e Minami, 1994).

A classificação botânica da aceroleira tem sido discutida e ainda causa confusão entre pesquisadores, já que as denominações *Malpighia glabra* L., *Malpighia puniceifolia* L. e *Malpighia emarginata* são comumente utilizados para designar a aceroleira. Os nomes *M. glabra* e *M. puniceifolia* são considerados sinônimos e referem-se a uma espécie de pouco interesse agrícola e econômico por apresentar frutos pequenos e insípidos (Asenjo, 1980; Mendes *et al.*, 2012); sendo a designação botânica correta *M. emarginata* adotada pelo Conselho Internacional de Recursos Genéticos Vegetais em 1986 (Nogueira, 1997 *apud* Gomes *et al.*, 2001).

Malpighia emarginata é uma planta de porte arbóreo a arbustivo, de tamanho médio, com 2 a 3 m de altura, com os ramos densos e espalhados. As folhas são glabras de formato oval a elítico-lanceolado, com 2,5 a 7,5 cm de comprimento, opostas, com pecíolo curto, de coloração verde escura e brilhante na face superior e verde pálida na face inferior. As flores apresentam pedúnculo longo e pouco mais de 1 cm de diâmetro, de coloração rosa-esbranquiçada ou lilás claro a vermelha. São dispostas em cachos de 3 a 5 flores nas axilas dos ramos em crescimento (Marino Neto, 1986; Gomes *et al.*, 2001). O fruto da aceroleira é uma baga drupácea que apresenta três sementes, cada uma envolvida por um endocarpo reticulado e trilobado. As sementes são pequenas, não albuminadas e de tamanhos variáveis, proporcionais ao tamanho do fruto e, conseqüentemente, ao do “caroço”. A acerola pode ser oval ou subglobosa, com formato trilobado, com o tamanho que varia de 1 a 2,5 cm de diâmetro e o peso de 3 a 15 g. Os frutos maduros podem apresentar diferentes tonalidades, que vão do amarelo ao vermelho intenso ou roxo (Marino Neto, 1986; Costa *et al.*, 2003). As sementes apresentam baixa porcentagem de germinação, podendo ainda, dependendo do grau de maturação do fruto, levar meses para germinarem, sendo comum a ocorrência de sementes inviáveis. Isso porque dos três óvulos existentes, apenas um ou dois se desenvolvem em decorrência de fatores como a má formação do óvulo, a degeneração do saco embrionário e a falta de fertilização do óvulo, dentre outros (Costa *et al.*, 2003).

A aceroleira, pelo seu potencial industrial tem atraído o interesse dos fruticultores desde que foi introduzida no Brasil. Por causa do seu altíssimo teor de vitamina C e da sua importância na medicina mundial, a fruta está na pauta da exportação brasileira (Freire *et al.*, 2007). No Brasil, a acerola é conhecida há mais de 50 anos. Porém, somente no final dos anos 80 e início dos anos 90 houve um crescimento expressivo e ao mesmo tempo desordenado dos plantios de acerola no Brasil, face à grande demanda do produto apresentada, inicialmente, pelo mercado externo e, posteriormente, pelo próprio mercado interno (Oliveira e Soares Filho, 1998; Mendes *et al.*, 2012). No entanto, devido à falta de planejamento, muitos produtores sofreram grandes prejuízos pela dificuldade de escoamento da produção, associada à carência de infraestrutura adequada ao processamento e conservação pós-colheita dos frutos, altamente perecíveis. A grande desuniformidade na produção anual de frutos por planta, devido ao plantio de mudas obtidas por sementes, tem causado sérias dificuldades para os produtores, gerando perdas na produtividade e na qualidade dos frutos. Em razão disso, a preservação da variabilidade genética da acerola, mediante a constituição de bancos de germoplasma, tem grande importância tanto do ponto de vista da conservação biológica como da aplicação no melhoramento genético (Salla *et al.*, 2002).

A perda de produtividade também está associada aos prejuízos causados por pragas e doenças que acometem a cultura (Ritzinger *et al.*, 2007). De acordo com Ritzinger e Ritzinger (2004), as principais doenças da aceroleira causadas por fungos são: antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*); cercosporiose (*Cercospora* Fresen.); seca descendente de ramos (*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.) e podridão de frutos (*Rhizopus* Ehrenb.).

No Nordeste brasileiro, a antracnose é considerada uma doença de elevada importância econômica (Serra e Silva, 2004; Mendes *et al.*, 2012). Essa doença uma das doenças mais disseminadas na cultura da acerola, podendo afetar tanto mudas quanto plantas adultas. Os frutos atacados são inviáveis para comercialização, causando inúmeros prejuízos econômicos (Mendes *et al.*, 2012). No Brasil, a antracnose em acerola foi relatada por Freire (1995), Urban *et al.* (1996), Generoso *et al.* (2002) e Almeida *et al.* (2003).

A infecção causada por *C. gloeosporioides* é caracterizada pela colonização intracelular ou colonização subcuticular intramural/intraparede. Em ambos os casos, inicialmente os conídios se aderem e germinam na superfície do hospedeiro (planta) produzindo tubos germinativos e então apressórios para a penetração da cutícula. Após a penetração subcuticular intramural, ocorre a formação de cadeias de hifas (micélio) inter e intracelular que colonizam rapidamente o tecido e provocam a sua morte (Perfect *et al.*, 1999). Durante a colonização do hospedeiro, *C. gloeosporioides* exibe como estratégias de nutrição, os modos: biotrófico (nutrientes obtidos de células vivas do hospedeiro) e necrotrófico (nutrientes obtidos de células mortas pelo fungo no

hospedeiro). A antracnose produz lesões nas folhas, frutos e hastes da planta. Nas folhas forma manchas esbranquiçadas circundadas por um halo marrom. Com o envelhecimento, os tecidos das lesões fragmentam-se e caem, deixando perfurações no limbo foliar (Figura 1A). Lesões também podem aparecer nas hastes novas, provocando a morte do broto apical (Figura 1B). Em genótipos suscetíveis provoca grande desfolhamento, a ponto de causar a morte das plântulas. Como principal medida de controle, recomenda-se a seleção e uso de genótipos resistentes. Podem-se utilizar também produtos químicos com as mesmas recomendações para cercosporiose (Ritzinger *et al.* 2007; Mendes *et al.*, 2012).

Figura 1. Lesões de antracnose em folhas (A) e haste de aceroleiras (B).



Fonte: Ritzinger *et al.* (2007).

No Nordeste, em pomares de acerola situados em áreas irrigadas do vale do São Francisco, foram constatados os fungos *Fusarium oxysporum* E.F. Sm. & Swingle, causando seca rápida de toda planta e levando à morte, e *L. theobromae* (= *Botryodiplodia theobromae* Pat.), que reduz o vigor e provoca secamento descendente (Tavares, 1995). Na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão, Silva *et al.* (1997) isolaram da folhagem de acerola e comprovaram a patogenicidade de *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei. No Estado do Ceará, nas áreas fisiográficas do Sertão, Litoral e Serras Úmidas, foi constatada em aceroleira a podridão dos frutos e a podridão seca das hastes causadas, respectivamente, por *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. (= *Rhizopus nigricans* Ehrenb.) e *L. theobromae* (Holanda *et al.*, 1997).

Em levantamento efetuado nos cerrados do Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso foram constatados danos consideráveis causados pelos fungos *Passalora* Fr. (= *Cercosporidium* Earle) e *C. gloeosporioides*, provocando queda de frutos, flores e lesões necróticas profundas; *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link danificando frutos em fase de pré-colheita; *Phomopsis* Sacc. & Roum., causando podridão da casca do tronco e *Cylindrocladium clavatum* Hodges & L.C. May, causando podridão das raízes e lesões no coleto (Urban *et al.*, 1996). Generoso *et al.* (2002), registraram pela primeira vez os fungos *C. gloeosporioides* e *C. cassicola*, na cultura da aceroleira irrigada no município de Junqueirópolis, SP, associados à manchas e queda de folhas.

A área plantada com acerola é de aproximadamente 7200 ha, destacando-se a região Nordeste como a maior produtora, com área cultivada em torno de 3100 ha. Estima-se, atualmente, uma produtividade média de 150 mil toneladas de frutas por ano. O Nordeste participa com aproximadamente 64% desse total (Mendes *et al.*, 2012).

2.1.2 Propriedades biológicas da acerola e efeitos sobre a saúde

O potencial para exploração econômica da acerola é alto, segundo Venâncio (2000), além da geleia, a acerola pode ser consumida de várias outras formas: “*in natura*” ou em suco, licor, xarope, sorvete, caldas, pastas e também vinhos. Pode ainda ser usada na preservação de outros sucos frigorificados ou no enlatamento industrial, uma vez que a vitamina C é um antioxidante natural. Nos Estados Unidos, a acerola também é encontrada na forma de comprimidos vendidos em farmácias; cada comprimido contém 100 mg de vitamina C.

Costa *et al.* (2001) obtiveram sucesso ao utilizaram suco de acerola para a suplementação alimentar de crianças com baixos níveis de vitamina C sérica (0,20-0,80 mg/dL) em creches da Paraíba. O uso do suco de acerola promoveu um aumento significativo nos níveis médios de vitamina C e de hemoglobina após 35 dias de suplementação. Assim, tendo em vista a disponibilidade e o baixo custo deste fruto na região, os autores indicaram a inclusão da acerola em programas de alimentação para populações de alto risco para a anemia.

A vitamina C é um nutriente necessário ao ser humano e as suas funções biológicas estão centradas em propriedades antioxidantes em sistemas biológicos evitando comuns processos degenerativos. Acerola é, portanto, um notável recurso de alimento funcional (Hanamura *et al.*, 2008) e além das grandes quantidades de vitamina C, apresenta β -caroteno e minerais tais como cálcio e fósforo, fibra vegetal e uma pequena quantidade de vitamina B (Motohashi *et al.*, 2004).

Vários estudos demonstraram que os extratos de acerola apresentam interessante atividade biológica e efeitos sobre a saúde. Motohashi *et al.* (2004) e Schreckinger *et al.* (2010) reuniram

inúmeros trabalhos sobre o uso e potenciais usos dos extratos de acerola como: fitoestrógeno, antioxidante para a prevenção de doenças associadas ao envelhecimento, tais como câncer, hipertensão, arteriosclerose e infarto do miocárdio; extratos de polifenol de acerola tem demonstrado capacidade para clarear a pigmentação da pele inibindo a melanogênese, efeito preventivo contra a hiperglicemia no estado pós-prandial. Aceronidin, um novo flavonóide presente na acerola, demonstrou atividade antioxidante inibidora contra α -glucosidase e α -amylase, atividade anti-inflamatória, atividade citotóxica específica a tumores, sugerindo possíveis aplicações para terapia contra o câncer. Além disso, a aceroleira também apresentou atividade antimicrobiana.

Os extratos de folhas e frutos de aceroleira mostraram uma atividade antifúngica muito boa contra três dermatófitos (*Epidermophyton floccosum* (Harz) Langeron & Miloch., *Microsporum canis* E. Bodin ex Guég. e *Trichophyton rubrum* (Castell.) Sabour.), sendo que 75% dos extratos foram ativos e o melhor solvente foi o etanol (Cáceres *et al.*, 1993). Também foi verificada atividade antibacteriana sobre a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis*, mas os extratos foram ineficazes sobre bactérias gram negativas e leveduras (Motohashi *et al.*, 2004).

2.2 Fungos endofíticos

Os fungos são organismos eucarióticos quimio-heterotróficos, amplamente distribuídos na natureza. Estes são extremamente diversos e desempenham inúmeras funções nos ecossistemas, atuando como decompositores da matéria orgânica e na ciclagem de nutrientes, como parasitas e mutualistas. Para se adaptarem aos diversos nichos que ocupam são capazes de produzir inúmeros metabólitos, que podem ser benéficos ou maléficos para o homem (Tortora *et al.*, 2005).

Entre os grupos de fungos associados aos vegetais, os endófitos vêm ganhando destaque nas últimas décadas e a explosão de publicações sobre a temática (de 0,8 documentos na década de 1970 para mais de 200 artigos por ano de 2000 a 2006) demonstra a importância desse grupo (Arnold, 2007). Os motivos para o aumento de trabalhos envolvendo os endófitos são a importância ecológica e biotecnológica do grupo, bem como a simplicidade das técnicas de isolamento que viabilizam a obtenção de micro-organismos (Araújo *et al.*, 2010).

De acordo com Petrini (1991) os endofíticos são “todos os organismos habitando os órgãos de plantas que em algum momento de sua vida, podem colonizar os tecidos internos das plantas sem causar dano aparente ao hospedeiro”. Essa definição é a mais comumente citada, no entanto há inúmeras outras. Os autores Hyde e Soyong (2008) reuniram e detalharam 12 diferentes definições propostas para os endófitos, principalmente fungos.

As informações contidas no Quadro 1 demonstram que a escolha da definição do termo endofítico é crítica, já que as mesmas nem sempre são equivalentes e podem incluir ou excluir um determinado grupo de micro-organismos.

Quadro 1. Definições do termo endofítico.

1	O termo endófito foi introduzido por De Bary e por algum tempo foi aplicado para “qualquer organismo encontrado no interior de tecidos vegetais” (De Bary, 1866)
2	“Mutualistas, os fungos que colonizam os tecidos vivos das partes aéreas de plantas e não causam sintomas de doenças” (Carroll, 1986)
3	“Fungos que formam infecções inaparentes em folhas e caules de plantas saudáveis” (Carroll, 1988)
4	“Fungos como colonizadores de tecidos internos vivos de suas plantas hospedeiras” (Rollinger e Langenheim, 1993)
5	“Todos os organismos habitando os órgãos de plantas que em algum momento de sua vida, podem colonizar os tecidos internos das plantas sem causar dano aparente ao hospedeiro” (Petrini, 1991)
6	“Um grupo que coloniza os tecidos internos vivos de plantas sem causar algum imediato ou evidente efeito negativo” (Hirsch e Braun, 1992)
7	“Endófitos são quaisquer fungos isolados de tecidos internos de plantas assintomáticas” (Cabral <i>et al.</i> , 1993)
8	“Fungos e bactérias que, em todo ou parte de seu ciclo de vida, invadem os tecidos vivos de plantas e causam infecções inaparentes ou assintomáticas totalmente dentro dos tecidos da planta, mas não causam sintomas de doença” (Wilson, 1995)
9	“Estratégia de infecção é considerada como importante na definição do termo endófito” (Wilson, 1995)
10	“O termo endófito deveria ser claramente definido em qualquer estudo” (Brown <i>et al.</i> , 1998)
11	“Endófito verdadeiro – fungos em que a colonização nunca resulta em sintomas visíveis de doença” (Mostert <i>et al.</i> , 2000)
12	“Fungos que colonizam uma planta sem causar sintomas visíveis de doença em nenhum momento específico” (Schulz e Boyle, 2005)

Fonte: Hyde e Soyton (2008).

A primeira definição descrita no Quadro 1 proposta por De Bary em 1866 (*apud* Hyde e Soyton, 2008), abrange todos os fungos que habitam o interior de plantas em situações de infecções sintomáticas ou não. Somente no final do século XX com a intensificação dos estudos sobre endófitos, novas definições foram propostas. Carroll (1986 *apud* Hyde e Soyton, 2008) deixou claro a segregação dos fitopatógenos dos endófitos e mais tarde abrangeu a restrição aos

fungos epifíticos, e excluiu os colonizadores de raízes (Carroll, 1988) (Quadro 1). Entretanto, a maioria das definições subsequentes comportam a inclusão de micro-organismos isolados de raízes, embora os fungos micorrízicos, geralmente, são desconsiderados (Hyde e Soyong, 2008). A definição de Petrini (1991) é uma expansão da definição de Carroll (1986 *apud* Hyde e Soyong, 2008; 1988) (Quadro 1), e suporta a presença de espécies de fungos tipicamente patogênicos no interior da planta na condição de endófito, uma vez que na definição, um organismo para ser endófito deve ser capaz de colonizar, em, pelo menos, algum período de seu ciclo de vida, os tecidos internos da planta sem causar dano aparente ao seu hospedeiro. A inclusão de um grupo como endófito é variável, sendo ainda atrelada ao conceito adotado pelo autor. Azevedo *et al.* (2002), por exemplo, consideraram os fungos micorrízicos e as bactérias que formam nódulos nas raízes de plantas como micro-organismos endofíticos.

Maheshwari (2006) destaca a importância da demonstração das hifas nos tecidos vivos da planta hospedeira para que um fungo possa ser considerado um endófito. A investigação da colonização inter ou intracelular por fungos poderá possibilitar uma melhor compreensão da interação hospedeiro-endofítico. Por exemplo, a colonização intracelular por fungos endofíticos indica uma alta interação entre eles, positivamente selecionados em um evento de co-evolução (García *et al.*, 2012). A análise da presença de fungos endofíticos por meio da microscopia óptica é difundida para avaliar a ocorrência de fungos endofíticos demácios (do inglês *dark septate endophytic fungi* - DSEF) em raízes de plantas. Pereira *et al.* (2011) utilizando raízes tratadas de arroz-silvestre (*Oryza glumaepatula* Steud.) para a observação direta ao microscópio de luz, puderam estabelecer a taxa de colonização de DSEF em duas diferentes áreas na Amazônia, avaliando a presença de hifas melanizadas septadas e de microesclerócios. Com a microscopia de luz e técnicas de microscopia eletrônica de varredura, García *et al.* (2012) observaram fungos endofíticos colonizando os espaços inter e intracelular de folhas da planta medicinal saboneteira (*Sapindus saponaria* L.).

Desde o final do século XX o interesse aumentou e novos aspectos de relevância ecológica e farmacológica envolvendo micro-organismos endofíticos são continuamente descobertos (Araújo *et al.*, 2002; Siqueira *et al.*, 2011). Esses micro-organismos podem ser encontrados no interior de praticamente todas as espécies vegetais, sendo encontrados colonizando: musgos, samambaias, sementes de plantas, plantas tropicais, do ártico, em campos agrícolas e ambientes naturais biologicamente diversos (Arnold, 2007). Considerando que poucas das 300.000 espécies de plantas existentes no Planeta foram analisadas quanto a microbiota endofítica, a oportunidade de encontrar novos micro-organismos e estes serem produtores de compostos úteis para a medicina, agricultura e indústria é grande (Strobel e Daisy, 2003). Com relação a descoberta de novas espécies de fungos

podemos citar: Bussaban *et al.* (2003) que identificaram três novas espécies de *Pyricularia* (*P. kookicola*, *P. longispora* e *P. variabili*) como endófitas de duas espécies de gengibre selvagem, na Tailândia; Zhang *et al.* (2007) que identificaram *Trichoderma taxi* como endófito de *Taxus mairei* de uma reserva natural na China; e Siqueira *et al.* (2008) que identificaram *Corynespora subcylindrica* como endófito de Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.), planta medicinal do Brasil.

2.2.1 Dinâmica da interação fungo endofítico-planta hospedeira

Os componentes da comunidade endofítica se inter-relacionam dentro da planta em um balanço harmônico, cuja composição, forma de colonização e transmissão variam em função do hospedeiro e das condições ambientais (Peixoto-Neto *et al.*, 2002).

Os endófitos podem ser transmitidos de forma vertical e/ou horizontal à planta hospedeira. Na transmissão vertical o fungo, já difundido sistemicamente nos tecidos vegetais, é passado via sementes para os descendentes da planta hospedeira. Essa forma de transmissão é mais comum em gramíneas, cujas características como o pequeno tamanho, morfologia e posição dos meristemas fornecem mais oportunidades para o crescimento sistêmico e subsequente transmissão vertical dos fungos. A transmissão horizontal se dá por meio de esporos de origem assexual e sexual. Esse tipo de transmissão gera colonizações localizadas em alguns tecidos e órgãos vegetais e é sem dúvida a forma mais comum de transmissão e pode ser encontrada em todos os tipos de plantas (Saikkonen *et al.*, 2004). Na transmissão horizontal, os endófitos podem entrar no hospedeiro através da zona radicular, de aberturas naturais, como estômatos presentes nas partes aéreas da planta (Saikkonen *et al.*, 2004; Maheshwari, 2006), de aberturas causadas por animais e pela produção de enzimas facilitando sua penetração (Schulz e Boyle, 2005).

Zabalgogeoazcoa (2008) levantou um paradoxo relacionado à compreensão dos mecanismos da transmissão horizontal de endofíticos: para a transmissão horizontal ocorrer, o inóculo endofítico deve ser produzido e disperso. Mas em um hospedeiro assintomático, onde e quando o inóculo é produzido? De acordo com o autor, no caso de fungos endofíticos que podem ser sapróbios latentes, o inóculo pode ser produzido quando o tecido hospedeiro infectado morre, o que torna a serapilheira uma importante fonte de inóculo de fungos endofítico. Em outras situações, o inóculo pode ser produzido de uma forma discreta em hospedeiros infectados. Além de insetos fitófagos, que podem participar na propagação de micro-organismos endofíticos, já que os esporos de algumas espécies de fungos são resistentes à digestão intestinal e estão presentes em suas fezes.

2.2.2 Fatores bióticos e abióticos que influenciam na frequência e composição dos fungos endofíticos

Entre os fatores bióticos, além da disponibilidade dos esporos, há a interferência do genótipo e fenótipo da planta e interações com outros micro-organismos na planta (Ahlholm *et al.*, 2002). Baynes *et al.* (2012) verificaram que a presença do nematóide fungívoro, *Paraphelenchus acontioides* Taylor & Pillai influenciou a frequência relativa de fungos na comunidade endofítica de *Bromus tectorum* L. Por meio de experimentos em laboratório e casa de vegetação, os autores verificaram que *P. acontioides* preferiu *Fusarium cf. torulosum* a outros fungos endofíticos e que a abundância relativa de *F. cf. torulosum* dentro da comunidade endofítica foi aumentada na presença do nematóide em plantas experimentais. E sugeriram que o nematóide fungívoro estudado, usa plantas vivas para cultivar ou aumentar a abundância relativa de seu fungo de preferência. Outra interação que beneficiou o endofito foi verificada por Estrada *et al.* (2012), quando demonstraram que o fungo endofítico *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg pode ter uma biomassa de 10 a 20 vezes maior quando co-inoculado com o patógeno *Ustilago maydis* (DC.) Corda, em comparação com o crescimento do endofito sozinho na planta.

A especificidade ao hospedeiro é outro fator biótico que pode influenciar na frequência e composição dos fungos endofíticos. Estima-se que existam 1,5 milhão de espécies fúngicas, destas apenas 74 mil são correntemente conhecidas. No entanto, essa escala de diversidade de espécies está em aberta discussão. Arnold *et al.* (2001) ao estudarem a comunidade de fungos endofíticos de nove espécies arbóreas neotropicais representando nove famílias vegetais no Panamá, verificaram que os isolados obtidos apresentaram alta especificidade, uma vez que, das 418 morfoespécies de fungos endofíticos obtidas apenas 140 foram novamente isoladas em outras folhas durante toda a amostragem da pesquisa. Arnold *et al.* (2003) também encontraram alta especificidade dos fungos endofíticos ao hospedeiro, uma vez que, dentre todos os gêneros isolados das folhas de cacaueteiro, *Ouratea lucens* (Kunth) Engler. e *Heisteria concinna* Standl., 65,5% foram restritos a apenas um hospedeiro. Com base nestes e em outros estudos, os autores sugerem que os fungos endofíticos são hiperdiversos nos trópicos e que a estimativa de 1,5 milhão de espécies de fungos pode subestimar a diversidade deste grupo e que um importante fator é a especificidade ao hospedeiro (Arnold *et al.*, 2001).

Huang *et al.* (2008) encontraram variação na comunidade de fungos endofíticos de acordo com o tipo de tecido estudado em um mesmo hospedeiro. Siqueira *et al.* (2011) obtiveram uma maior taxa de colonização nas folhas (50, 4%) que no caule (35, 4%) de Alecrim-pimenta. Concordando com os dados acima, Gond *et al.* (2012) verificaram maior taxa de colonização nas

folhas que no caule da planta *Nyctanthes arbor-tristis* L. e do total de 19 táxons de fungos endofíticos isolados, 18 foram obtidos das folhas e 10 do caule. Chen *et al.* (2011) também verificaram significativa diferença na quantidade de fungos isolados de acordo com o tecido vegetal, em contrapartida, o caule foi o que apresentou maior colonização (50%), seguido das folhas (42,3%) e raiz (7,7%) de *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis.

Os fatores abióticos que podem influenciar na dinâmica do fungo endofítico e planta hospedeira incluem: temperatura e umidade do ambiente, composição do solo e outros. O regime de chuvas, por exemplo, pode influenciar fortemente a dispersão e a germinação dos esporos dos fungos endofíticos (Carroll, 1988). Os resultados obtidos por Arnold *et al.* (2003) indicam que a chuva, orvalho ou névoa favoreceram a entrada do fungo endofítico no interior das folhas ou plântulas de cacau. Estes pesquisadores ainda verificaram que a maior densidade de endófitos encontrada em folhas maduras pode estar associada ao tempo de exposição ao ambiente necessário na transmissão horizontal. Faeth e Fagan (2002) verificaram que a variação do fluxo de nitrogênio pode determinar a produção de alcalóides por fungos endofíticos associados à planta hospedeira. O modelo gráfico apresentado pelos autores prevê que a baixa produção de alcalóides por fungos endofíticos deve persistir em populações quando os nutrientes do solo e herbivoria são baixos. Alternativamente, alta produção de alcalóide por endófitos é favorecida sob aumento da herbivoria e aumento do nitrogênio no solo.

Arnold e Lutzoni (2007) verificaram que a diversidade de endófitos, tanto em níveis individuais quanto em comunidade de plantas aumentou com latitude decrescente (ou seja, a partir dos polos ao equador). Além disso, eles também relataram que os fungos endofíticos isolados dentro de uma zona biogeográfica específica (ou seja, ártico, temperado ou tropical) foram muitas vezes ausentes em outras regiões. Outros estudos em florestas tropicais reforçam a informação de que a diversidade de fungos endofíticos é maior nos trópicos que nas regiões temperadas (Cannon e Simmons, 2002). No entanto, estudos posteriores sugerem cautela antes de considerar que os fungos endofíticos são hiperdiversos em espécies vegetais de ambientes tropicais. Suryanarayanan *et al.* (2003) ao investigarem a micobiota endofítica de 24 árvores de duas florestas tropicais secas (espinhosa e decídua) no sul da Índia, obtiveram uma curva de acumulação de espécies diferente da curva progressiva obtida para uma floresta tropical úmida (Arnold *et al.*, 2001), já que o número de espécies endofíticas só aumentou inicialmente de forma significativa com o número de isolados. Esse estudo e o de Cannon e Simmons (2002), com 12 espécies arbóreas da Guiana, sugeriram que para algumas espécies de ecossistemas tropicais a diversidade de endofítico não é alta.

As espécies de fungos endofíticos mais frequentemente isoladas nos trópicos pertencem ao filo Ascomycota. Espécies de Basidiomycota e Zygomycota também são isoladas como endófitas,

mas representam um menor número (Schulz e Boyle, 2005). Em plantas brasileiras, espécies de *Ascochyta* Lib., *Cladosporium* Link, *Colletotrichum/Glomerella*, *Fusarium* Link., *Guignardia* Viala & Ravaz, *Mucor* P. Micheli ex L., *Nodulisporium* Preuss, *Pestalotia* De Not., *Phomopsis* Sacc. & Roum., *Phyllosticta* Pers., *Rhizopus* Ehrenb. e *Xylaria* Hill ex Schrank são as mais frequentes (Peixoto-Neto *et al.*, 2002). Ainda há o grupo de fungos não esporulantes ou *Mycelia sterilia*, comumente relatados em trabalhos envolvendo fungos endofíticos (Suryanarayanan *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2008).

No levantamento de trabalhos envolvendo fungos endofíticos de plantas tropicais, pode se verificar que essa comunidade tende a ser composta por uma ou poucas espécies dominantes, e geralmente estas são generalistas, ou seja, são encontradas em diferentes plantas hospedeiras taxonomicamente não relacionadas (Tabela 1). Estes táxons generalistas e dominantes podem refletir o sucesso destes em ocupar o interior de tecidos vegetais, interferindo também na diversidade encontrada (Suryanarayanan *et al.*, 2003).

Tabela 1. Relação de fungos endofíticos considerados dominantes em diferentes plantas hospedeiras taxonomicamente não relacionadas.

Gênero/Espécie	Planta	Tecido Vegetal	Local	Autor (es)
<i>Aternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. e <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	<i>Nyctanthes arbor-tristis</i> L.	Folha e caule	Índia	Gond <i>et al.</i> (2012)
<i>Colletotrichum</i> Corda	<i>Theobroma cacao</i> L. e <i>Ouratea lucens</i> (Kunth) Engl.	Folha	Panamá	Arnold <i>et al.</i> (2003)
<i>Colletotrichum</i> e <i>Fusarium</i> Link.	<i>Passiflora edulis</i> f. sp. <i>flavicarpa</i> O. Deg.	Folha, caule e raiz	Brasil	Luz <i>et al.</i> (2006)
<i>C. gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	<i>Lippia sidoides</i> Cham.	Folha e caule	Brasil	Siqueira <i>et al.</i> (2011)
<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Hevea brasiliensis</i> (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.	Folha	Brasil	Déon <i>et al.</i> (2012)
<i>Colletotrichum musae</i> (Berk. & M.A. Curtis) Arx, <i>Cordana musae</i> (Zimm.) Höhn. e <i>Xylaria</i> Hill ex Schrank	<i>Musa acuminata</i> Colla	Folha	Brasil	Pereira <i>et al.</i> (1999)
<i>Colletotrichum</i> , <i>Nodulisporium</i> Preuss, <i>Pestalotiopsis</i> Steyaert e <i>Phomopsis</i> Sacc. & Roum.	Doze espécies de árvores florestais	Folha	Guiana	Cannon e Simmons (2002)
<i>Colletotrichum</i> , <i>Phomopsis</i> e <i>Xylariales</i>	<i>Artemisia lactiflora</i> Wall. ex DC., <i>Artemisia capillaris</i> Thunb., <i>Strophanthus divaricatus</i> (Lour.) Hook. & Arn. e <i>Hoya carnosa</i> (L. f.) R. Br.	Folha, caule, flor/inflorescência, fruto e raiz	China	Huang <i>et al.</i> (2008)

Continuação Tabela 1.

Gênero/Espécie	Planta	Tecido Vegetal	Local	Autor (es)
<i>Davidiella tassiana</i> (De Not.) Crous & U. Braun	<i>Colobanthus quitensis</i> (Kunth) Bartl.	Folha	Antártica	Rosa <i>et al.</i> (2010)
<i>Fusarium</i>	<i>Parthenium hysterophorus</i> L.	Folha	México	Romero <i>et al.</i> (2001)
<i>Fusarium</i> e <i>Phaeoacremonium</i> W. Gams, Crous & M.J. Wingf.	<i>Aquilaria sinensis</i> (Lour.) Spreng.	Caule	China	Cui <i>et al.</i> (2011)
<i>Glomerella</i> (<i>Colletotrichum</i>) e <i>Hypoxyton</i> Adans.	<i>Huperzia serrata</i> (Thunb.) Trevis.	Folha, caule e raiz	China	Chen <i>et al.</i> (2011)

Fonte: O Autor (2013).

O local onde se encontra o vegetal hospedeiro pode influenciar a comunidade de fungos endofíticos. Romero *et al.* (2001) isolaram fungos endófitos de folhas da erva daninha *Parthenium hysterophorus* L. em três locais no Estado de Veracruz, México e em duas épocas no ano de coleta. Os autores verificaram que o local de coleta influenciou no isolamento de espécies, sendo que apenas *Alternariaster helianthi* (Hansf.) E.G. Simmons (= *Alternaria helianthi* Hansf.) foi comum a todos os locais de coleta. Algumas espécies de fungos endofíticos foram específicas para a época de coleta, o que influenciou na riqueza total de espécies obtida ao final da pesquisa, sendo: *A. alternata*, *Penicillium funiculosum* Thon, *Periconia* Tode e “Espécie não identificada 1” obtidas apenas na coleta do mês de junho, enquanto que as espécies *Khuskia oryzae* H.J. Huds. (= *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome), *Curvularia brachyspora* Boedijn, “Levedura 1”, “Levedura 2”, “Espécie não identificada 2, 3, 4, 5 e 6” foram restritas ao mês de novembro. Cui *et al.* (2011) verificaram que *Chaetomium* Kunze e *Pichia* E.C. Hansen foram isolados apenas da planta *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg da província de Hainan e outros nove gêneros foram somente encontrados na província de Yunnan na China. De acordo com Davis e Shaw (2008) a distância geográfica, e não a filogenia do hospedeiro, explica melhor as diferenças entre as comunidades. Os testes de especificidade à região e ao hospedeiro, realizados pelos autores revelaram que a comunidade de endófitos dentro de uma área geográfica é mais semelhante entre si do que em hospedeiros estreitamente relacionados.

Alguns grupos de fungos endofíticos não mostram especificidade ao local, época e espécie de planta. Como foi verificado por Pereira *et al.* (1999) ao estudarem 2400 fragmentos de folhas de bananeiras (*Musa acuminata* Colla) de três localidades do Estado de São Paulo, verificaram que o padrão de distribuição dos fungos endofíticos foi similar nas diferentes localidades. Fungos

generalistas que não mostraram especificidade ao local de coleta também foram relatados por Knapp *et al.* (2012). Estes autores estudaram o grupo dos fungos DSEF em raízes de plantas arbóreas e gramíneas (nativa e invasoras) no semiárido na Húngria. Os autores baseados, também, em estudos anteriores levantaram a hipótese que as plantas do semiárido compartilham membros dominantes comuns da comunidade de DSEF em uma escala global.

Além da interferência na dinâmica da interação micro-organismo endofítico-planta hospedeira exercida pelo tipo de tecido vegetal, época de coleta/condição climática e local de coleta, fatores inerentes a pesquisa, tais como, a metodologia empregada no isolamento, incluindo o esforço amostral, influenciam de forma direta na comunidade endofítica recuperada. Gamboa e Bayman (2001) sugeriram que quanto menores e mais dispersos os fragmentos de planta amostrados, maior a probabilidade de se aproximar dos valores reais de diversidade da comunidade de fungos endofíticos.

Scholtysik *et al.* (2012) analisaram a distribuição vertical da comunidade de fungos endofíticos foliares da planta florestal de grande porte *Fraxinus excelsior* L. na Europa. Os autores verificaram que o nível superior da copa da planta em que as folhas estão mais expostas ao sol exibiu a menor taxa de colonização e riqueza de espécies. Um padrão semelhante foi verificado por Unterseher *et al.* (2007) ao estudarem plantas florestais, também em uma região de clima temperado. Eles verificaram, como uma tendência geral, que os fungos endofíticos estavam presentes em maior número nos níveis da copa com menor exposição solar. No entanto, as diferenças no número de isolados entre as folhas mais expostas ao sol e as folhas na sombra e entre os períodos de coleta (primavera e outono) foram mais evidentes para a planta *Quercus robur* L. quando comparada com as outras espécies de árvores estudadas. Gamboa e Bayman (2001) estudaram a distribuição vertical da comunidade de fungos endofíticos da planta tropical *Guarea guidonia* (L.) Sleumer e obtiveram dados contrários entre um local de coleta e outro. Foi verificado que na área de *El Verde* a diversidade e o número de espécies foram maiores no ápice da copa, enquanto na área de *Las Piedras* foi na parte inferior da copa da planta. Assim, a amostragem deve incluir vários níveis da copa da planta, já que folhas do ápice podem ter uma composição diferente de endofíticos das folhas de ramos basais.

2.2.3 Benefícios da relação entre fungo endofítico e planta hospedeira

Os fungos endofíticos podem estabelecer uma relação simbiótica com o hospedeiro, contribuindo de maneira significativa no processo de adaptação da planta com o meio. Esta interação envolve a produção de compostos que diminuem a herbivoria sobre os tecidos vegetais ou

conferem resistência a fitopatógenos, além da produção de fitoreguladores que podem aumentar o desenvolvimento vegetal (Azevedo *et al.*, 2000; Peixoto-Neto *et al.*, 2004). Certos endofíticos também melhoram a adaptabilidade de seus hospedeiros aumentando sua tolerância aos ambientes com estresse (Azevedo *et al.*, 2002) e solos contaminados por metais pesados (Likar e Regvar, 2009).

O crescimento da planta hospedeira pode ser incrementado pela presença de fungos endofíticos. Luz *et al.* (2006) selecionaram quinze fungos endofíticos capazes de promover o crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. sp. *flavicarpa* O. Deg.), estando entre os melhores EM173 (*Alternaria* sp.), EM155 (*Fusarium* sp.), EM139 (*Curvularia* sp.), EM20 (*Colletotrichum* sp.), EM6 (*Acremonium* sp. Link) e EM151 (*Colletotrichum* sp.). Estes fungos proporcionaram incrementos na biomassa fresca da parte aérea (108, 4%) e da raiz (204, 4%) e biomassa seca da raiz (70, 2%) aos 90 dias após a inoculação. Bae *et al.* (2009) também verificaram um efeito positivo da colonização do fungo endofítico *Trichoderma hamatum* (Bonord.) Bainier, tanto na promoção do crescimento quanto na resposta à seca em cacauero. A colonização por *T. hamatum*, com ou sem exposição a condições de seca, promoveu um aumento da biomassa fresca e peso seco da raiz e teor de água na raiz. As mudas que foram colonizadas murcharam mais lentamente em resposta à seca.

Apesar da complexidade e variabilidade das interações fungos endofíticos-planta hospedeira, características como modo de transmissão e os padrões de infecção e fatores ecológicos (concorrência com outros micro-organismos, estrutura espacial de populações, fatores abióticos e predições da associação de endófito-planta) são susceptíveis de mudanças ao longo dessa interação (Saikkonen *et al.*, 1998).

2.3 Plasticidade ecológica das espécies de fungos endofíticos

Por definição (Quadro 1), os fungos endofíticos se distinguem dos epifíticos (aqueles que vivem na superfície das plantas) e dos fitopatógenos (aqueles que causam doenças nas plantas). As diferenças entre estes grupos são consideradas de significado puramente didático já que a distância de uma condição para outra pode ser muito pequena. O que há, na realidade é um gradiente com interfaces entre endófitos, epifíticos e patógenos (Peixoto-Neto *et al.*, 2002).

Em seu artigo de revisão, Arnold (2007) cita trabalhos em que a comunidade endofítica contém uma variedade de espécies classicamente epifíticas, incluindo *A. alternata*, *C. cladosporioides*, *Epicoccum purpurascens* e os gêneros *Phoma*, *Aureobasidium* e *Chaetomium*. Como possíveis explicações reunidas para esta observação, estão: a colonização subcuticular, mas

não realmente endófito do fungo que pode persistir por meio de métodos típicos de desinfestação superficial ou que os fungos na condição de epifíticos podem estar especialmente propensos a estabelecer colonização como endófitos quando as condições exteriores são inóspitas. Apesar de no interior das folhas ocorrerem mudanças nas condições de temperatura e outros fatores, as superfícies das folhas podem ser consideradas muito mais extremas em termos de estresse abiótico (Arnold, 2007).

O comportamento ecológico das diferentes espécies de fungos endofíticos em associação com a planta hospedeira ainda não é totalmente claro, podendo variar de mutualista ou simbiótico para antagonico ou ligeiramente patogênico (Saikkonen *et al.*, 1998; Schulz e Boyle, 2005; Arnold, 2007), ou ainda ser neutro, como inicialmente foi considerado na década de 70 (Azevedo *et al.*, 2000). Diante do exposto, a categorização de um endófito em um grupo ecológico fixo é uma tarefa muito difícil.

Rodriguez e Redman (2008), discutem sobre a categorização dos fungos endofíticos como patógenos, sapróbios ou mutualistas, apoiando a questão que isolados fúngicos de uma mesma espécie ou gênero podem apresentar uma plasticidade ecológica significativa. No caso, análises de espécies de *Colletotrichum*, gênero frequentemente isolado como endófito de plantas tropicais, indicam que a expressão do comportamento parasita ou mutualista dependem do genótipo da planta hospedeira. Tal hipótese foi exemplificada por estudos que demonstraram que espécies de *Colletotrichum* classificadas como virulentas em algumas plantas (*C. magna* (Jenkins & Winstead) Bhairi, Buckley, Staples do melão; *C. acutatum* J.H. Simmonds e *C. gloesporioides* do morango), em outras hospedeiras (*C. magna* do tomate; *C. acutatum* e *C. gloesporioides* do melão), além de não causarem doenças promoveram a resistência a doenças, aumento de crescimento e/ou tolerância a seca estabelecendo uma relação mutualística com a planta.

Os fungos endofíticos mais isolados no estudo de Romero *et al.* (2001) em folhas de *P. hysterophorus* também são encontrados como fitopatógenos da mesma. Da mesma forma que alguns agentes patogênicos podem ter uma fase latente dentro do tecido do hospedeiro, e alguns sapróbios também podem ser parasitas facultativos, alguns endófitos podem se tornar patogênicos diante da redução dos mecanismos de defesa da planta hospedeira em resposta a algum estresse. Essa informação nos remete a considerar a questão referente aos endófitos como patógenos latentes ou isolados hipovirulentos. A fase latente representa uma condição específica em que o fungo pode desenvolver sintomas ou causar alterações na fisiologia da planta hospedeira. A habilidade dos fungos endofíticos em colonizar os tecidos internos da planta hospedeira garante a ocupação precoce e posse de recursos, antes que a colonização por outros fungos possa ocorrer, além da produção de alcalóides, terpenos e outros, durante a fase simbiótica (Romero *et al.*, 2001).

Há trabalhos que apoiam a possibilidade de que isolados resgatados de tecidos saudáveis, possam ser formas latentes do patógeno. Martins (2005), comparou espécies endofíticas e patogênicas de *Fusarium* através de análises de regiões do espaçador interno transcrito (ITS - *Internal Transcribed Spacer*), análise de restrição do rDNA amplificado (ARDRA - *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) e sequenciamento, e não conseguiu verificar diferenças genéticas entre isolados patogênicos e endofíticos de *Fusarium* sp. Lana *et al.* (2011) com base em análises genéticas (DNA amplificado ao acaso ou RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*) e fisiológicas (patogenicidade e atividade enzimática extracelular) também não conseguiram separar os isolados considerados endofíticos dos patogênicos de *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora (= *Crinipelis perniciosa*) do cacau. Alguns isolados endofíticos apresentaram patogenicidade semelhante à dos isolados obtidos como fitopatógenos, quando inoculados em mudas de cacau. De acordo com os autores, os resultados indicam que os isolados de *M. perniciosa* obtidos de tecidos saudáveis pode ser um patógeno que é capaz de colonizar a planta resistente a doença sem causar sintomas aparentes. Outra questão levantada é que a capacidade de induzir sintomas de doença pode estar sob o controle de alguns genes, o que não poderia ser detectado pela análise molecular realizada (Lana *et al.*, 2011).

Déon *et al.* (2012) verificaram que *C. cassicola* associada a seringueiras (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.) pode evoluir de um comportamento endofítico para um saprofítico ou para um potencialmente patogênico. No ensaio com folhas destacadas, um isolado endofítico teve o mesmo perfil de patogenicidade do isolado patogênico utilizado como referência sugerindo que trata-se de um patógeno latente; outros isolados desenvolveram sintomas tardios, durante o curso da infecção, sugerindo capacidade saprofítica. Os autores verificaram ainda que os isolados endofíticos, assim como o patógeno de referência, apresentaram e expressaram o gene (*Cas1*) que codifica a “cassiocolin”, toxina produzida na fase inicial de infecção no hospedeiro.

Em contrapartida, Azevedo *et al.* (2000) divulgaram em uma revisão a diferenciação genética e morfológica entre isolados de *Guignardia citricarpa*, espécie do agente causal da “mancha preta dos citros”, obtidos de lesões (fitopatógenos) e de isolados dessa mesma espécie, sendo estes procedentes de tecidos saudáveis (endófitos). Espécies do gênero *Guignardia* também puderam ser diferenciadas em patogênicas e endófitas pelo teste do meio de cultura Aveia-Ágar, em que os patógenos são caracterizados pela formação de um halo amarelo (Baldassari *et al.*, 2008). A eficiência deste teste foi comprovada em testes de patogenicidade a campo e análises genéticas (Baldassari *et al.*, 2008; Wickert *et al.*, 2009).

Saikkonen *et al.* (2004) sugerem que a mudança do fenótipo de virulência para avirulência pode ser rápida, na medida que até mesmo uma mutação de um único *locus* pode converter

fenótipos fúngicos de patogenicidade ao de um endófito simbiote não patogênico ou vice-versa. Huang *et al.* (1995) verificaram que mutantes incapazes de expressar o gene *Cap20*, gene relacionado à formação de apressórios por *C. gloeosporioides*, mostraram uma virulência drasticamente diminuída em abacate e tomate. Maciel *et al.* (2010) verificaram que o gene *Cap20* também está presente em outras espécies de *Colletotrichum* e pode estar relacionado a patogenicidade nessas espécies também.

A caracterização genética associada a aspectos fisiológicos, como a produção enzimática, parece contribuir para elucidar a base da patogenia e endofitismo de algumas espécies de fungos. Romão *et al.* (2011) analisaram que *G. citricarpa* (isolado patogênico) produziu quantidades significativamente maiores de amilases, endoglucanases e pectinases, em comparação com *G. mangiferae* (isolado endofítico), sugerindo que estas enzimas podem ser a chave para o desenvolvimento da mancha preta em citrus, sendo a produção de pectinase a principal enzima que diferencia estas espécies de *Guignardia*. Maccheroni Jr. *et al.* (2004) verificaram que o pH do ambiente, fator importante na secreção de enzimas, influenciou de maneira distinta a produção de proteases por isolados endofíticos, fitopatogênicos e entomopatogênicos de diferentes espécies de *Colletotrichum*.

Uma vez que o fungo entra na planta ele pode comportar-se como um endófito ou como um agente patogênico; mas o que regula qual comportamento seguirá ainda é uma questão a ser respondida, já que há uma grande variação de resposta de acordo com o tipo de hospedeiro e a espécie estudada (endófita e/ou patogênica), como verificada nos estudos citados acima.

É importante ressaltar que as espécies endofíticas consideradas patógenas latentes ou potencialmente patogênicas representam uma pequena proporção das espécies que compõem a comunidade de fungos endofíticos. Isto sugere que a penetração nos tecidos de plantas não é um processo particularmente associado a patogênese. Além disso, eles representam um grupo de organismos com um bom potencial para aplicação em melhoramento de plantas e controle de doenças (Zabalgogezcoa, 2008).

2.4 Produção de compostos antimicrobianos por fungos endofíticos

Os endófitos são uma moderna e relativamente inexplorada fonte de diversidade microbiana produtora de metabólitos biologicamente ativos e assim, terapeuticamente úteis e com aplicações na agricultura e indústria (Strobel e Daisy, 2003; Strobel *et al.*, 2004).

Segundo Schulz e Boyle (2005), aproximadamente 80% dos fungos endofíticos produzem compostos biologicamente ativos como: antibacterianos, fungicidas e herbicidas. Entre os exemplos

mais citados que ilustra o interesse pelo potencial dos micro-organismos endofíticos é o da síntese do taxol, substância extraída da árvore *Taxus brevifolia* Nutt., utilizada contra câncer de mama e de útero. O fungo *Taxomyces andreanea*, isolado de *T. brevifolia*, assim como sua hospedeira, é capaz de sintetizar o taxol como forma de proteção do vegetal (Stierle et al., 1993). Estudos recentes verificaram que diferentes gêneros de fungos endofíticos isolados de *Taxus* spp. são produtores de taxol, destacando ainda que processos de fermentação usando estes fungos podem ser um modo alternativo para a produção dessa substância. Entre estes, *C. gloeosporioides* isolado de *Justicia gendarussa* L. (Gangadevi e Muthumary, 2008), *C. cladosporioides* de *Taxus media* Rehder (Zhang et al., 2009a), *Aspergillus niger* var. *taxi* D.P. Zhou, K. Zhao & Ping de *T. cuspidata* Siebold & Zucc. (Zhao et al., 2009) e *A. candidus* Link de *T. media* (Zhang et al., 2009b).

Na literatura são citadas outras substâncias produzidas por endófitos como: Criptocandina A, Criptocina, Pestalosite, Jesterona e Ácido Coletótrico (Strobel, 2003; Strobel et al., 2004). A Criptocandina A é um antifúngico lipopeptídico obtido do fungo endofítico *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* isolado da planta medicinal *Tripterygium wilfordii* Hook. f. nativa da Eurásia. Este composto é ativo contra *Candida albicans* e *Trichophyton* sp., patógenos ao homem e contra fungos fitopatogênicos como *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea*. A Criptocina é um ácido tetrâmico, com atividade antifúngica também obtido a partir de *C. cf. quercina*. A Pestalosite e Jesterona ambos com propriedades antifúngicas e produzidas por fungos do gênero *Pestalotiopsis*, endófito generalista comumente encontrado habitando plantas tropicais (Strobel, 2003; Strobel et al., 2004). O Ácido Coletótrico apresentou forte atividade contra algumas bactérias Gram-positivas e o fitopatógeno *Cochliobolus sativus* (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur (= *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker), obtidos a partir de outro fungo considerado generalista nos trópicos, *C. gloeosporioides* isolado como endofítico de *Artemisia mongolica* (Fisch. ex Besser) Nakai planta chinesa com grande resistência contra herbívoros, fungos e bactérias fitopatogênicas (Zou et al., 2000).

Vários trabalhos investigando o potencial antimicrobiano de fungos endofíticos têm mostrado resultados satisfatórios. Liu et al. (2001) estudaram a atividade antifúngica de fungos endofíticos isolados da planta medicinal chinesa *Artemisia annua* L. sobre os fitopatógenos *Gaeumannomyces graminis*, *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia cerealis*, *Phytophthora capsici*, *C. sativus* e *Gerlachia nivalis*, encontrando isolados com ação inibidora para todos os patógenos avaliados. No isolamento realizado por Gond et al. (2012) nove em cada 16 (56,25%) fungos endofíticos de *N. arbor-tristis* exibiram atividade antifúngica a um ou mais patógenos fúngicos. *Colletotrichum dematium* inibiu 55,87% do crescimento radial do fitopatógeno *C. lunata*. A atividade antibacteriana apresentada pelos isolados *C. dematium* e *Chaetomium globosum* foi

verificada contra *Shigella flexnii*, *Shigella boydii*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella paratyphi*. Já no estudo realizado por Siqueira *et al.* (2011), apenas 7,88% dos fungos endofíticos isolados de diferentes partes da planta medicinal alecrim-pimenta apresentaram atividade no *screening* em meio sólido. Isolados das espécies endofíticas *A. alternata*, *Phomopsis archeri*, *C. gloeosporioides*, *Drechslera dematioidea* e isolados do grupo *Mycelia sterilia* também foram submetidas ao ensaio fermentativo e 90% deles apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus*, 30% contra *Bacillus subtilis* e 10% contra *Klebsiella pneumoniae*.

A habilidade de produzir um metabólito bioativo é variável mesmo para indivíduos de uma mesma espécie ou gênero. Cui *et al.* (2011) verificaram diferenças na habilidade bioativa dos fungos endofíticos, apesar de terem sido isolados a partir da mesma espécie de hospedeiro, e pertencer ao mesmo gênero. *Fusarium solani* (YNAS09) exibiu atividade antimicrobiana contra *B. subtilis*, *S. aureus* e *C. albicans*, mostrando também atividade antitumoral contra a linhagem celular SKOV3. Por outro lado, *F. solani* (HNAS07) não teve nenhuma atividade antimicrobiana ou antitumoral contra a linhagem de célula tumoral humana SKOV3, mas apresentou atividade antitumoral contra outras quatro diferentes linhagens de células tumorais humanas (HepG2, MCF7, HL-60 e 293-T).

Estes resultados confirmam que os fungos endofíticos são um rico bio-recurso para a exploração e descoberta de novos produtos naturais. Além das propriedades antimicrobianas, antitumorais e imunossupressoras (Strobel e Daisy, 2003; Strobel *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2011), as pesquisas indicam que a maioria das comunidades endofíticas contem espécies mutualistas que ajudam as plantas a se adaptarem a diferentes situações de estresse, biótico e abiótico (Zabalgogezcoa, 2008).

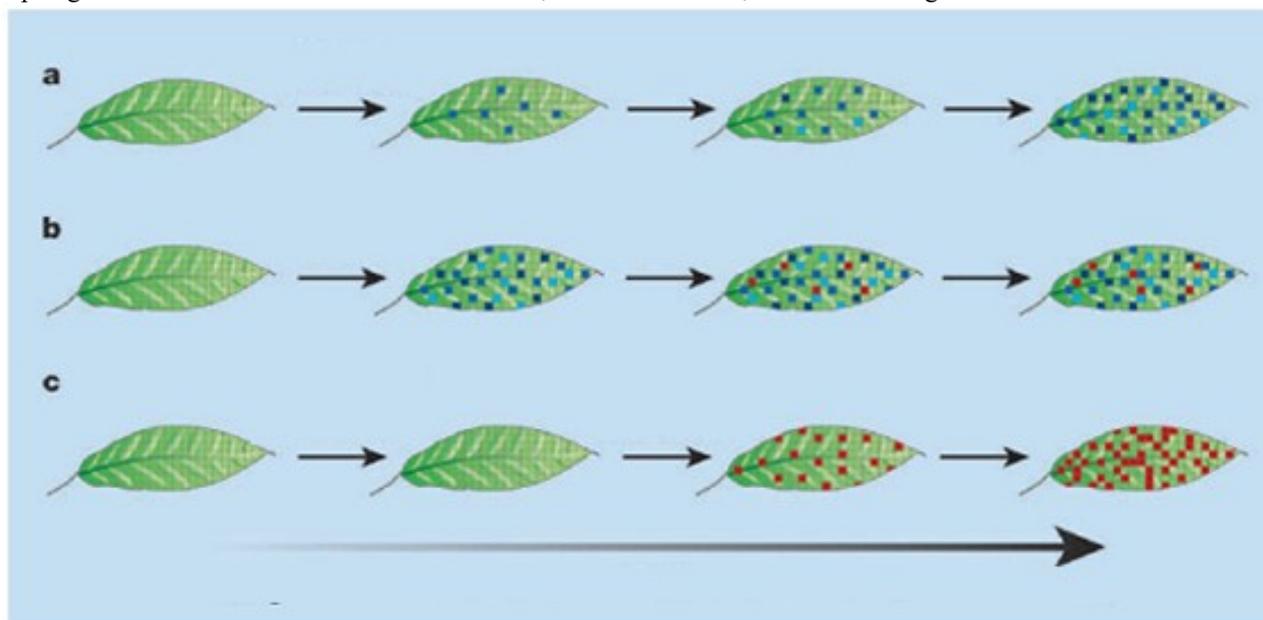
2.5 Potencial dos fungos endofíticos no controle de fungos fitopatogênicos

A aplicação dos fungicidas sintéticos é considerada como uma das abordagens mais baratas e mais comuns para o controle de doenças em plantas, porém, além de seus riscos para a saúde humana, também causam fortes desequilíbrios no ambiente e podem desencadear o desenvolvimento de genótipos resistentes (Liu *et al.*, 2001). Os altos custos ambientais e econômicos devido ao uso de agrotóxicos na agricultura resultam num maior esforço de pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de sistemas de controle de pragas e doenças através de agentes de controle biológico. O controle biológico de doenças é importante por não ser poluente; não ser tóxico; não provocar desequilíbrio biológico; ser duradouro e aproveitar o potencial biótico do meio ambiente (Bettiol e Morandi, 2009).

Nesse contexto, tem aumentado o número de pesquisas buscando agentes potenciais de controle biológico de fungos fitopatogênicos, entre estes agentes encontram-se os micro-organismos endofíticos. Os fungos endofíticos estão ganhando atenção como objeto de pesquisa e aplicações no controle de fitopatógenos, porque muitas plantas associadas aos endofíticos têm mostrado resistência aumentada a doenças. Por exemplo, os fungos endofíticos por habitarem um nicho ecológico semelhante ao ocupado por fitopatógenos, podem, assim, controlá-los por competição por recursos nutricionais e espaço, produção de substâncias antibióticas que inibem o crescimento de patógenos, parasitando os patógenos ou mesmo induzindo a planta a desenvolver resistência à doença (Azevedo *et al.*, 2002; Clay, 2004; Zabalgoeazcoa, 2008).

Entre diversos estudos que verificam os benefícios da relação endófito-hospedeiro, pode-se citar o trabalho de Arnold *et al.* (2003). Os autores ao estudarem a resposta de plantas de cacau axênicas (isentas de micro-organismos) inoculadas com fungos endofíticos do próprio hospedeiro e com o patógeno *Phytophthora* sp., observaram que as plantas inoculadas com os endófitos apresentaram menos necrose e mortalidade das folhas, se comparadas ao controle, inoculados apenas com o patógeno. A vantagem relativa da inoculação do endófito foi maior em folhas mais velhas do que nas folhas mais novas. Em geral, as folhas protegidas com endófitos sofreram menos do que metade do dano visto nas folhas do controle (Figura 2).

Figura 2. A colonização de folhas por endofíticos e patógeno. *a*, Colonização natural das folhas, aumentando ao longo do tempo, por uma comunidade diversificada de endofíticos. *b*, *c*, Os resultados dos principais experimentos realizados por Arnold *et al.* (2003) em mudas de cacau axênicas. *b*, A ação do patógeno nas plantas inoculadas com endofíticos resultou em, comparativamente, pouca ocupação nas células da folha pelo patógeno e danos limitados. *c*, Por outro lado, o patógeno se estabeleceu bem nas folhas controle, livres de endófito, e causou danos graves ou morte da folha.



Arnold et al. (2003) sugerem que a aparente plasticidade e diversidade das interações interespecíficas dos fungos podem contribuir para a defesa antipatogênica eficaz em plantas lenhosas. E que a defesa mediada por fungos endofíticos é suscetível de ser aumentada quando estes são altamente diversificados dentro e entre as folhas, plantas e espécies hospedeiras.

O uso de fungos endofíticos no controle biológico de doenças em plantas é também relatado por Azevedo *et al.* (2002), que destacaram o uso de isolados considerados avirulentos ou hipovirulentos do patógeno, como no caso da murcha do tomate causada por *F. oxysporum* controlada por isolados endofíticos dessa mesma espécie. Estrada *et al.* (2012) demonstraram que mudas de milho inoculadas com o endófito *F. verticillioides* foram mais resistentes ao patógeno *U. maydis*, cuja biomassa foi reduzida de 20 a 60 vezes na presença do endófito. Olore e Adjumo (2009) também verificaram o benefício do inóculo de fungos endofíticos em mudas de milho, sendo que a murcha da planta foi reduzida em até 25% pelo fungo endofítico *Trichoderma koningii*. Estudos *in vitro* demonstraram que este isolado endofítico foi capaz de crescer sobre a colônia dos diferentes agentes patogênicos do milho testados e reduzir o crescimento radial destes de 25 a 75%.

Na literatura há vários trabalhos envolvendo o uso de fungos endofíticos no controle biológico de importantes doenças do cacau. Bailey *et al.* (2008) analisaram o sucesso da colonização, antibiose e micoparasitismo de isolados endofíticos de *Trichoderma* para o controle biológico em cacau. Todos os isolados endofíticos de *Trichoderma* sp. testados foram capazes de colonizar as mudas de *T. cacao*, no entanto não foi verificada relação positiva entre a capacidade de colonização em mudas e a capacidade de antibiose e micoparasitismo *in vitro*. Mejía *et al.* (2008), selecionaram *in vitro* (teste de cultura pareada), em casa de vegetação e em campo fungos endofíticos isolados de tecidos saudáveis de cacau contra patógenos importantes da cultura. Das morfoespécies endofíticas testadas, o maior índice de antagonismo *in vitro* (65%) foi contra o fitopatógeno *Phytophthora palmivora*. O isolado *C. gloeosporioides* 6174 mostrou a mais alta capacidade de colonizar a planta hospedeira em casa de vegetação e nos testes em campo promoveu significativa diminuição da perda de frutos devido a ação de *P. palmivora*. Rubini *et al.* (2005) avaliaram *in vitro* e *in vivo* fungos endofíticos isolados do cacau com capacidade de inibir *Moniliophthora perniciosa* (= *Crinipelis perniciosa*). Entre eles, o isolado *Gliocladium catenulatum* reduziu em 70% a incidência da doença “Vassoura de bruxa” em mudas de cacau.

O pareamento entre antagonista e patógeno é uma técnica simples e rápida, muito útil para a seleção inicial de fungos potencialmente antagonistas, principalmente considerando o grande número de fungos que se pode obter em um isolamento de fungos endofíticos. Mejía *et al.* (2008) descreveram três tipos de atividade antagônica no teste *in vitro*: (1) Antibiose: inibição do crescimento determinada pela presença de uma zona de inibição, (2) competição por substrato:

crescimento excessivo de um organismo em detrimento do outro, e (3) micoparasitismo: o parasitismo direto nas hifas do fungo. O mecanismo mais comum verificado foi o antagonismo simples do tipo 2 por competição de substrato.

A atividade antagônica dos fungos endofíticos isolados da planta medicinal *N. arbor-tristis* foi verificada por Gond *et al.* (2012). Dos 16 fungos endofíticos submetidos ao teste de cultura pareada, nove apresentaram atividade antifúngica contra um ou mais agentes patogênicos fúngicos. Bons resultados, também foram verificados por Nuangmek *et al.* (2008) ao selecionar fungos endofíticos isolados de folhas, pecíolos e pseudocaule de bananeiras com capacidade antagônica contra o fitopatógeno *Colletotrichum musea*, através do teste de cultura pareada. Dois isolados se destacaram, *Cordana* sp. e *Nodulisporum* sp. que inibiram o fitopatógeno devido ao rápido crescimento competitivo e produção de antibiótico e foram capazes de reduzir significativamente a severidade da antracnose nos frutos destacados, demonstrando a possibilidade de usá-los como controladores biológicos da doença.

Liu *et al.* (2001) sugeriram que a resistência a fitopatógenos da planta medicinal *A. annua* pode estar, parcialmente, associada com a presença de micro-organismos endofíticos na planta. Visto isso, um total de 39 fungos endofíticos presentes nessa planta foram testados quanto a produção de substâncias antifúngicas, sendo utilizados no teste de cultura pareada e a capacidade antagônica do líquido fermentado bruto em caldo de Batata e Dextrose (sem extração com solvente). Dos isolados investigados, 21 produziram substâncias inibitórias *in vitro* para todos ou alguns dos fitopatógenos testados. No entanto, os resultados dos testes utilizados (cultura pareada e líquido fermentado bruto) não foram correspondentes.

Na interação fungo endofítico-patógeno, metabólitos tóxicos podem ser secretados no meio de cultura visando inibir o outro micro-organismo competidor. Assim é altamente recomendada a caracterização das substâncias presentes no extrato de fermentação dos fungos endofíticos antagonistas, devido à possibilidade de encontrar novos princípios antifúngicos que podem ser usados para o desenvolvimento de novos fungicidas necessários para o controle de doenças em plantas (Liu *et al.*, 2001).

Extratos líquidos obtidos a partir de culturas de fungos endofíticos capazes de inibir *in vitro* o crescimento de fungos fitopatogênicos foram investigados por Ínacio *et al.* (2006). No experimento, o extrato bruto obtido a partir do líquido fermentado pelo endófito *C. gloeosporioides* isolado de folhas de *Cryptocarya mandioccana* Meisn. foi purificado por fase reversa de HPLC. A atividade antifúngica das duas substâncias obtidas foi avaliada por meio de bioautografia direta sobre placa de cromatografia em camada delgada e apresentaram forte atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Os autores sugerem que o

fungo endofítico *C. gloeosporioides* em *C. mandioccana* pode proteger o hospedeiro através da produção de metabólitos, que podem ser tóxicos ou até letais para os fitopatógenos, e destacam o potencial dos fungos endofítico na produção de metabólitos bioativos.

Ensaio de bioatividade usando extratos brutos, obtidos por diferentes solventes, dos endófitos *Chaetomium cupreum*, *C. globosum*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *Penicillium chrysogenum* e os compostos puros, Rotiorinol de *C. cupreum*, *Chaetoglobosin-C* de *C. globosum* e Trichotoxin A50 de *T. harzianum*, mostraram que os extratos e compostos inibiram o crescimento de *C. gloeosporioides* agente da antracnose em uvas (Soytong *et al.*, 2005). A partir daí, os autores formularam e aplicaram diferentes bioprodutos produzidos com esses extratos e compostos que reduziram significativamente a incidência de doença em folhas, galhos e frutos de uva em todas as variedades, em comparação com o controle químico.

Fungos endofíticos isolados de uma determinada espécie (ex. plantas medicinais e resistentes a patógenos) podem ser utilizados para o controle de doenças em outra espécie de interesse. Rocha *et al.* (2009) verificaram por antagonismo *in vitro* que os fungos endofíticos isolados de folhas de confrei (*Symphytum officinale* L.) inibiram em 46,7% a 50,0% o crescimento micelial do fitopatógeno do feijão *Sclerotinia sclerotiorum*. Os resultados obtidos por Maki (2006) ao testar o antagonismo entre endófitos do cacaueteiro e fitopatógenos de diferentes culturas, indicam que a atividade antagonista dos fungos endofíticos não é, necessariamente, hospedeiro-específica abrindo a possibilidade de testar fungos endofíticos de um determinado hospedeiro contra patógenos de outros hospedeiros, como culturas agrícolas de importância econômica.

Os trabalhos apresentados aqui demonstram que os fungos endofíticos podem beneficiar o hospedeiro por competição ou inibição química dos patógenos ou por ativar os mecanismos de defesa da planta hospedeira e constituem uma fonte promissora de agentes úteis para controle biológico. Estudos como estes, também são de fundamental importância quando se tem como objetivo a seleção de isolados endofíticos para serem utilizadas tanto no biocontrole como para estudos que envolvam processos biotecnológicos (Arnold *et al.* 2003).

2.6. Identificação de espécies do gênero *Colletotrichum*: avanços e desafios

O gênero *Colletotrichum* foi descrito por Corda em 1831, mas primeiramente, foi referido por Tode em 1790 como gênero *Vermicularia*. Este gênero pertence aos "celomicetos" sendo *Glomerella* como teleomórfica (Sutton, 1980). *Colletotrichum* é um dos gêneros de fungos mais importantes economicamente, já que compreende várias espécies que causam antracnose, doença que afeta uma série de culturas agrícolas e plantas ornamentais em todo mundo causando graves

prejuízos especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (Sutton, 1980; Hyde *et al.*, 2009a; Cai *et al.* 2009).

Esse importante gênero de fungo contém mais de 100 espécies aceitas (Cannon *et al.*, 2012). A identificação das espécies dentro do gênero *Colletotrichum* tradicionalmente está baseada em critérios descritivos clássicos tais como forma, tamanho dos conídios e apressórios; presença ou ausência de setas, esclerócios e acérvulos; fase teleomórfica e aspectos da cultura, como cor, textura da colônia e taxa de crescimento; e plantas hospedeiras (Sutton, 1980; Hyde *et al.*, 2009a). A identificação baseada somente nesses critérios é problemática para a diferenciação entre as espécies de *Colletotrichum* devido as mesmas apresentarem grande plasticidade morfológica de acordo com fatores ambientais, condições de incubação como meio de cultura e temperatura; e métodos de preservação (Hyde *et al.*, 2009a; Weir *et al.*, 2012). A identificação precisa das espécies é fundamental para compreender a epidemiologia e para desenvolver um controle eficaz de doenças como a antracnose. A falta de critérios morfológicos confiáveis dentro do gênero *Colletotrichum* tem resultado na identificação duvidosa de isolados, sendo provável que várias espécies descritas neste gênero sejam sinônimas (Sutton, 1980; Cai *et al.*, 2009).

Uma revisão sobre o gênero *Colletotrichum* feita por Hyde *et al.* (2009a) indica que várias espécies podem ter sido erroneamente nomeadas em muitos estudos sobre biotransformação, clínica, patógeno, endófito, sapróbio, molecular e outros aspectos. É essencial que os nomes corretos sejam utilizados no futuro, de modo que as comparações entre estudos possam ser realizadas com segurança.

Para obtenção de uma identificação mais precisa de espécies de *Colletotrichum*, Cai *et al.* (2009) propuseram como abordagem para descrever essas espécies, a combinação de análises filogenéticas multigênicas com caracteres polifásicos reconhecíveis, como morfologia, fisiologia, patogenicidade, características da cultura e metabólitos secundários. Os autores forneceram ainda um conjunto de protocolos e metodologias como um guia para futuros estudos incluindo epitipificação e descrição de novas espécies. Recentemente, outros grupos de pesquisas também publicaram revisões sobre o gênero (Hyde *et al.*, 2009 a, b; Damm *et al.*, 2010; Damm *et al.*, 2012; Weir *et al.*, 2012) contribuindo para o avanço dos estudos de taxonomia e sistemática do gênero. Na revisão de Hyde *et al.* (2009b) os autores forneceram uma visão geral de 66 nomes de espécies de *Colletotrichum* que são de uso comum, e 19 nomes usados recentemente que são considerados duvidosos, incluindo dados gerados através da análise de DNA e sistemática filogenética.

Entre as dificuldades que envolvem a identificação das espécies dentro do gênero, além da variabilidade morfológica, Cai *et al.* (2009) citam a ausência ou as más condições dos espécimes-tipo, impossibilitando que eles possam ser utilizados para comparações em estudos moleculares; e

as muitas sequências gênicas (*Internal Transcribed Spacer Region-ITS* e outras) erradas ou duvidosas depositadas em bancos de dados. Por exemplo, das 343 sequências de ITS depositadas no *GenBank* como *C. gloeosporioides* mais de 86% tiveram considerável divergência evolutiva do espécime-tipo de *C. gloeosporioides* (Cannon *et al.*, 2008), e representam, provavelmente, outras espécies de *Colletotrichum* (Cai *et al.*, 2009). Portanto é necessário reestudar, rever e clarificar o gênero, de modo que a nomenclatura das espécies de *Colletotrichum* sejam no futuro reprodutível e precisa (Hyde *et al.*, 2009a).

Algumas espécies dentro do gênero *Colletotrichum* estão estreitamente relacionadas (morfológica e filogeneticamente) e são agrupadas em complexos (Sutton, 1980; Damm *et al.*, 2010). De acordo com Cannon *et al.* (2012) existem, pelo menos, nove clados neste gênero. Destes clados, se destacaram como mais importantes e bem resolvidos, os complexos de espécies *C. gloeosporioides* com 22 espécies, *C. acutatum* com 29 espécies, *C. boninense* com 17 espécies e *C. truncatum* com 3 espécies. Em todos estes complexos de espécies estão incluídas importantes espécies de fitopatógenos. Além dos nove clados neste gênero, há várias espécies que são isoladas em termos filogenéticos e não se agrupam em nenhum dos complexos de espécies estabelecidos, sendo elas *Colletotrichum coccodes*, *C. trichellum*, e três espécies pouco conhecida, *C. cliviae*, *C. yunnanense* e *C. dracaenophilum*.

Colletotrichum boninense foi recentemente descrito como um complexo de espécies, e inclui as espécies *C. boninense* sensu stricto, *C. hippeastri*, *C. karstii*, *C. annellatum*, *C. beeveri*, *C. brassicicola*, *C. brasiliense*, *C. colombiense*, *C. constrictum*, *C. cymbidiicola*, *C. dacrycarpi*, *C. novae-zelandiae*, *C. oncidii*, *C. parsonsiae*, *C. petchii*, *C. phyllanthi* e *C. torulosum* (Cannon *et al.*, 2012; Damm *et al.*, 2012). A princípio a maioria das espécies no complexo *C. boninense* são específicas de um ou poucos hospedeiros e têm limitada distribuição geográfica, no entanto, isso pode mudar com mais investigações em hospedeiros ainda não estudados. No entanto, *C. karstii* e *C. boninense* sensu stricto já apresentam uma ampla gama de hospedeiros e distribuição geográfica. *Colletotrichum karstii* foi frequentemente obtida como endófito, mas também foi isolada de tecidos de plantas doentes (Damm *et al.*, 2012).

Nos últimos dez anos, *C. boninense* (sentido amplo) tem sido frequentemente identificado como patógeno causando antracnose em fruto e folha, bem como um endófito de uma gama de plantas hospedeiras em todo o mundo, especialmente pertencentes a Amaryllidaceae, Orchidaceae, Proteaceae e Solanaceae (Damm *et al.*, 2012). Os conídios de *C. boninense* sensu lato são semelhantes aos de *C. gloeosporioides*, diferindo apenas ligeiramente em relação comprimento/largura e na presença de uma cicatriz na base dos conídios e por isso têm sido muitas vezes identificado como *Colletotrichum gloeosporioides* (Damm *et al.*, 2012; Weir *et al.*, 2012).

O complexo de espécies de *Colletotrichum gloeosporioides* contém táxons com significativa diversidade biológica, morfológica e genética, mas com similar morfologia de conídios e sequências ITS (Hyde *et al.*, 2009b; Damm *et al.*, 2010). A nomenclatura *Colletotrichum gloeosporioides* está atualmente em comum uso em dois sentidos: 1. Em um sentido amplo, genética e biologicamente; incluindo todas as espécies do complexo (sendo referido em alguns trabalhos como *C. gloeosporioides sensu lato*); 2. Em um sentido estrito (*C. gloeosporioides sensu stricto*) abrangendo apenas os espécimes geneticamente correspondentes ao epítipo selecionado para essa nomenclatura por Cannon *et al.* (2008).

Com base nos resultados de análises filogenéticas multigênica (Weir *et al.*, 2012), 22 espécies mais uma subespécie foram aceitas dentro do complexo *C. gloeosporioides*: *C. asianum*, *C. cordylinicola*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides sensu stricto*, *C. horii*, *C. kahawae* subsp. *kahawae*, *C. musae*, *C. nupharicola*, *C. psidii*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. tropicale*, e *C. xanthorrhoeae*, *C. aenigma*, *C. aeschynomenes*, *C. alatae*, *C. alienum*, *C. aotearoa*, *C. clidemiae*, *C. kahawae* subsp. *ciggaro*, *C. salsolae*, e *C. ti* e *C. queenslandicum*. Os autores afirmam que todas as espécies incluídas no complexo também apresentam estruturas micromorfológicas típicas de *C. gloeosporioides* e caberiam dentro do conceito tradicional morfológico do complexo. No entanto, morfologia por si só pode colocar de forma equivocada um isolado neste complexo, tornando a região ITS particularmente importante para a identificação ao nível de complexo de espécie de *Colletotrichum* (Weir *et al.*, 2012).

Caracteres morfológicos e da cultura foram usados para agrupar 36 isolados de *Colletotrichum* em *C. musae*, *C. gloeosporioides* grupos I, II e III, e *C. truncatum*. A análise molecular com base em sequências de ITS (ITS1 e ITS2) indicou que isolados de *Colletotrichum* formaram quatro clados em paralelo com o agrupamento morfológico inicial. A maioria dos isolados ficou agrupada em três subtipos distintos, que potencialmente representam espécies diferentes. A correlação entre o agrupamento por morfologia e por análise molecular demonstrou as relações genéticas entre os isolados e espécies de *Colletotrichum* e indicou que os dados da região ITS são potencialmente úteis na determinação de espécies (Photita *et al.*, 2005).

Embora a região ITS seja útil no nível de complexo de espécies, esta região não é tão eficiente para diferenciar espécies dentro do complexo *C. gloeosporioides*, resolvendo apenas 10 de 22 espécies aceitas. Por exemplo, isolados de *C. clidemiae*, *C. tropicale*, *C. ti* e alguns isolados de *C. siamense* apresentaram sequências idênticas da região ITS, sendo necessária uma análise multigênica (Weir *et al.*, 2012). Cai *et al.* (2009) estudaram um grupo diversificado de 64 isolados de *C. gloeosporioides sensu lato* e cada isolado teve seis genes sequenciados: ITS, GPDH (glicerol-3-fosfato-desidrogenase), CAL, ACT, CHS e EF1 α (fator de alongamento 1 α). Os autores

concluíram que dentro de *C. gloeosporioides sensu lato*, GPDH, CAL, e ACT são bons candidatos para separar as espécies; enquanto que ITS, CHS, e EF1 α não são. No entanto, devido à facilidade de aquisição e uma extensa biblioteca, a região ITS ainda é útil em alguns casos de reconstrução de relações interespecíficas, embora não seja um marcador ideal para inferir relações infraespecíficas (Cai *et al.*, 2009).

Vários autores têm desenvolvido, baseados em PCR, ferramentas de identificação rápida para distinguir os membros do complexo *C. gloeosporioides* dos membros do complexo *C. acutatum*, já que algumas espécies do complexo *C. acutatum* têm conídios sem as extremidades agudas características e podem ser confundidas com *C. gloeosporioides* (Damm *et al.*, 2012). Iniciadores específicos para *C. gloeosporioides* incluem CgInt - ITS (Mills *et al.*, 1992). No conjunto de dados do artigo de Weir *et al.* (2012), esta sequência do iniciador é encontrada nas espécies *C. gloeosporioides sensu stricto*, *C. fructicola* e *C. siamense*, mas todos os outros táxons que são reconhecidos pelos autores dentro do complexo *C. gloeosporioides* tem uma ou mais bases não correspondentes ao iniciador CgInt.

O estudo realizado por Lima *et al.* (2012) é um exemplo do uso de iniciadores específicos para estudar o gênero *Colletotrichum*. Os autores verificaram a diversidade de isolados endofíticos de *Colletotrichum* sp. da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) utilizando características morfológicas e métodos moleculares. Os iniciadores espécie específicos utilizados foram CaInt/ITS4, CgInt/ITS4 e Col1/ITS4 que amplificam bandas específicas em *C. acutatum*, *C. gloeosporioides sensu lato* e *Colletotrichum boninense*, respectivamente, e analisaram sequências de ITS (ITS1, 5.8S, ITS2). O uso dos iniciadores espécie específico permitiu identificar aproximadamente 70% dos isolados, sem a necessidade de uma extensa análise morfológica. A análise do sequenciamento confirmou os resultados dos iniciadores espécie-específicos e permitiu resolver a identificação de *C. boninense* (LGMF625) e do complexo *C. gloeosporioides*.

A problemática que envolve a identificação de *C. gloeosporioides* baseada somente em características morfológicas pode ser verificada no trabalho de Andrade *et al.* (2007). Dos 29 fungos isolados de diferentes plantas frutíferas identificados como *C. gloeosporioides* com base na morfologia dos conídios e apressórios, apenas quatro isolados de mamão foram confirmados por PCR com o iniciador específico para *C. gloeosporioides*, CgInt, e outros dois isolados apresentaram reação positiva com o iniciador CaInt2, específico para *C. acutatum*. A maioria dos isolados de mamão (23) não reagiu com nenhum dos iniciadores.

Isolados do gênero *Colletotrichum* obtidos como endofítico de folhas de 12 espécies de árvores na Reserva Florestal Iwokrama, Guiana, foram estudados por Lu *et al.* (2004). Através das técnicas moleculares de “*fingerprinting*” de sequências internas simples repetidas (ISSR – *Inter*

Simple Sequence Repeats) e RAPD, sequenciamento da região ITS e caracterização morfológica e da cultura, verificaram que a maioria dos isolados pertenciam a uma das duas espécies, *C. gloeosporioides* e um táxon adicional que é provavelmente *C. boninense*. Pouquíssimos isolados foram geneticamente idênticos, indicando que a reprodução clonal não desempenha um papel proeminente. A não especificidade dos isolados ao hospedeiro pode ser detectada pelos marcadores moleculares ISSR-PCR e RAPD. De acordo com os autores ambos marcadores podem ser considerados como aplicáveis para a análise da população de *Colletotrichum* (Lu *et al.*, 2004).

Antracnose, causada por espécies do gênero *Colletotrichum*, é uma doença que afeta uma série de culturas agrícolas e plantas ornamentais em todo mundo. Esta doença causa graves prejuízos especialmente em plantas frutíferas nas regiões tropicais e subtropicais (Sutton, 1980; Cai *et al.* 2009; Weir *et al.*, 2012; Udayanga *et al.*, 2013). A espécie *C. gloeosporioides* é considerada uma das espécies mais comumente associada com a antracnose em frutas. No entanto, recentes estudos reconhecem que muitos isolados identificados como *C. gloeosporioides* na verdade fazem parte de um complexo de espécies (Cannon *et al.*, 2012; Weir *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2013; Udayanga *et al.*, 2013; Kamei *et al.*, 2014). Estudos associando dados morfológicos e de filogenia tem propiciado o aumento de relatos em que diferentes espécies de *Colletotrichum* estão associadas a antracnose em frutíferas (Bragança, 2013; Udayanga *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2013; Kamei *et al.*, 2014; Schena *et al.*, 2014). No Brasil, Kamei *et al.* (2014), verificaram que quatro espécies de *Colletotrichum* são responsáveis pela antracnose em pinheira e gravioleira em Alagoas: *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. fragariae* e *C. magna*. Até então, *C. gloeosporioides* era considerado o único agente etiológico da antracnose nessas culturas no Brasil.

A variabilidade patogênica em *Colletotrichum* spp. é conhecida em várias plantas hospedeiras (Assis *et al.*, 2001; Almeida e Coêlho, 2007; Andrade *et al.*, 2007; Montri *et al.*, 2009). Assis *et al.* (2001), verificaram diferenças na agressividade entre seis isolados de *C. gloeosporioides* de frutos de mangueira por meio de testes de patogenicidade em frutos destacados, além disso, esses isolados se diferenciaram quanto ao crescimento micelial e esporulação quando diferentes fontes de carbono foram incorporadas ao meio de cultivo. Marcadores moleculares podem ser usados para caracterizar isolados de *Colletotrichum* spp. de alta agressividade em programa de resistência genética, como foi verificado por Almeida e Coêlho (2007). Estudos que buscam conhecer a variabilidade genética de fungos fitopatogênicos são importantes para a melhor compreensão da etiologia das doenças fúngicas e ao desenvolvimento de medidas de controle.

Espécies de *Colletotrichum* que causam doenças em plantas são comumente isolados como endofíticos de plantas saudáveis (Photita *et al.*, 2005). *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum* sp. são comumente isolados como endofíticos a partir de uma série de espécies de

plantas (Pereira *et al.*, 1999; Cannon e Simmons, 2002; Arnold *et al.*, 2003; Luz *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011; Siqueira *et al.*, 2011; Déon *et al.*, 2012). De acordo com Photita *et al.* (2005), quanto mais isolados de *Colletotrichum* de diferentes hospedeiros sejam pesquisadas e sequenciados, uma melhor compreensão do gênero será obtida.

3. DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO VERTICAL DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Malpighia emarginata* (ACEROLEIRA)¹

Resumo

Os fungos endofíticos são considerados altamente diversos e podem promover a espécie hospedeira tolerância a diferentes estresses ambientais. Apesar do aumento de estudos da comunidade endofítica, muitos aspectos ecológicos da interação com a planta hospedeira ainda não é totalmente claro. A aceroleira (*Malpighia emarginata*) é uma planta frutífera resistente de grande potencial econômico para o Brasil. Os objetivos desse trabalho foram estudar a estrutura e composição da comunidade de fungos endofíticos de folhas de aceroleira coletadas em um pomar comercial, no Estado de Pernambuco, Brasil. Além disso foi verificada a influência da amostragem em diferentes níveis da copa da planta na obtenção de isolados endofíticos. Foi obtida uma taxa de colonização de 55,9%. Os isolados fúngicos produtores de estruturas reprodutivas foram identificados em 22 espécies e três gêneros; os fungos não esporulantes foram categorizados em morfoespécies e identificados pelo sequenciamento da região ITS rDNA. As espécies dominantes foram *Colletotrichum* spp. (parte inferior da copa) e *Guignardia bidwellii* (ápice da copa). Os demais táxons apresentaram frequência relativa em torno de 1% ou menor. Houve diferença significativa na frequência de fungos endofíticos entre as coletas realizadas. A amostragem em diferentes níveis da copa não revelou diferença estatística na frequência dos endófitos entre ápice e parte inferior, mas confirmou que estes abrigam uma composição de táxons diferente. As folhas de *M. emarginata* abrigam alta riqueza de fungos endofíticos e o método de amostragem vertical foi eficaz para aumentar o número de táxons obtidos. Este é o primeiro estudo sistemático acerca da comunidade de fungos endofíticos da aceroleira.

Palavras-chave: Malpighiaceae; morfoespécies; *Colletotrichum* spp.; *Guignardia bidwellii*.

¹Trabalho a ser submetido para publicação: Nascimento, T.L., Lima, M. R., Tiago, P.V., Laranjeira, D., Júnior, N.C.L., Souza-Motta, C.M. Diversity and vertical distribution of endophytic fungi of *Malpighia emarginata* (barbados cherry). *Brazilian Journal of Microbiology*.

Introdução

A aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) também conhecida como “cereja das antilhas” ou acerola pertence à família Malpighiaceae. Esta é uma planta de porte arbóreo a arbustivo de tamanho médio, com 2 a 3 metros de altura, com os ramos densos e espalhados (Marino Neto, 1986). Essa planta é originária da América Central e Norte da América do Sul, sendo conhecida pelo elevado teor de ácido ascórbico (vitamina C) em seu fruto (Araújo e Minami, 1994; Mendes *et al.*, 2012). Os extratos de folhas e frutos de aceroleira apresentam propriedade antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica com possíveis aplicações para terapia contra o câncer e atividades antimicrobianas com ação inibitória a fungos dermatófitos e bactérias Gram-positivas (Motohashi *et al.*, 2004; Schreckinger *et al.*, 2010). No Brasil, a área plantada com acerola é de cerca de 7200 ha, destacando-se a região Nordeste do país como a maior produtora, sendo responsável por 64% de uma média de 150 mil toneladas de frutas produzidas por ano (Mendes *et al.*, 2012).

Fungos endofíticos são considerados altamente diversos e podem ser encontrados no interior de praticamente todas as espécies vegetais e têm sido alvo de inúmeros estudos nas últimas décadas (Arnold, 2007). O comportamento ecológico dos fungos endofíticos em associação com a planta hospedeira ainda não é totalmente claro, podendo variar de mutualista ou simbiótico para antagônico ou patogênico (Schulz e Boyle, 2005; Arnold, 2007). Esta interação envolve a produção de compostos que diminuem a herbivoria sobre os tecidos vegetais ou conferem resistência a fitopatógenos, bem como a produção de fitoreguladores que podem aumentar o desenvolvimento vegetal (Azevedo *et al.*, 2000; Peixoto-Neto *et al.*, 2004; Luz *et al.*, 2006) ou a tolerância a solos contaminados por metais pesados (Likar e Regvar, 2009). Além dos benefícios conferidos ao hospedeiro, os endófitos são reconhecidos produtores de metabólitos de interesse econômico na medicina, na agricultura e indústria, além de serem potencialmente úteis como controladores biológicos de doenças em plantas (Strobel e Daisy, 2003; Mejía *et al.*, 2008; Gond *et al.*, 2012; Abo-Elyousr *et al.*, 2014). Todas essas características destacam a importância de se estudar os diversos aspectos ecológicos e biotecnológicos que envolvem os endófitos e seus hospedeiros.

Sabe-se que a diversidade e a frequência dos fungos endofíticos pode variar em função de uma série de fatores bióticos ou abióticos como preferência de hospedeiro, interação com outros micro-organismos presentes na planta, condições ambientais e climáticas; além de fatores metodológicos como esforço amostral e métodos de coleta (Larran *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2001; Ahlholm *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2003; Tejesvi *et al.*, 2005; Davis e Shaw, 2008; Huang *et al.*, 2008; Oki *et al.*, 2009; Cui *et al.*, 2011; Siqueira *et al.*, 2011; Estrada *et al.*, 2012). A comunidade endofítica apresenta variada distribuição vertical na copa da planta hospedeira e uma

amostragem incluindo diferentes níveis da copa pode aumentar a diversidade recuperada (Gamboa e Bayman, 2001; Unterseher *et al.*, 2007; Scholtysik *et al.*, 2012). No entanto, estudos sobre a distribuição vertical e a sua influência na riqueza de espécies obtidas são escassos, principalmente em regiões tropicais.

A comunidade de fungos endofíticos associada a aceroleira ainda não foi explorada e considerando a importância econômica e as propriedades biológicas desta planta, este trabalho teve como objetivos: estudar a estrutura e composição da comunidade de fungos endofíticos de folhas de aceroleira e verificar a influência da amostragem em diferentes níveis da copa da planta na obtenção de isolados endofíticos.

Material e Métodos

Coleta e amostragem

O local de coleta foi o pomar comercial “Acerolândia”, situado no Município de Paudalho, Pernambuco, Brasil (7°55'58,3" S e 35°8'12,8" W, altitude de 70 metros). O clima da região é quente e úmido, com temperatura e precipitação pluvial média anual de 25°C e 1.702,1 mm, respectivamente (Fundação de Desenvolvimento Municipal do Interior de Pernambuco, 1994); o solo é do tipo Podzólico Amarelo álico. O pomar é composto em sua maioria por aceroleiras (*M. emarginata*) com cerca de 20 anos de idade, plantadas com espaçamento de 4 x 5 metros e com uma considerável variabilidade fenotípica com relação à coloração e à morfologia das folhas e dos frutos.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso (bloco = planta) em esquema de parcelas (parcela = nível da copa) subdivididas no tempo (subparcela = coletas). Para a avaliação da densidade de fungos endofíticos, o experimento consistiu de seis tratamentos (2 níveis x 3 coletas) e 114 subparcelas (2 níveis x 3 coletas x 19 plantas).

Foram coletadas quatro folhas completamente expandidas sem lesões ou danos aparentes, sendo duas do ápice e duas da parte inferior da copa (Gamboa e Bayman, 2001). Foram realizadas três coletas, sendo a primeira (coleta 1) no mês de setembro/2010 (final do período chuvoso), a segunda (coleta 2) no mês de janeiro/2011 (período de estiagem) e a terceira (coleta 3) em março/2012 (início do período chuvoso).

As amostras foram armazenadas em sacos plásticos, etiquetadas e conduzidas ao Laboratório de Pesquisas da Coleção de Culturas – Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As amostras foram mantidas a 4°C até o momento do isolamento (aproximadamente 14 horas).

Método de isolamento

Um total de 228 folhas e, assim, 1824 fragmentos foliares (oito de cada folha) foram analisados ao final das coletas. As folhas coletadas foram lavadas em água corrente para a remoção da poeira e outros resíduos e depois submetidas à técnica de desinfestação superficial para eliminação dos micro-organismos epifíticos. A técnica consistiu na imersão, em câmara asséptica, das folhas em etanol 70% por 1 minuto, em hipoclorito de sódio (2-2,5% de cloro ativo) por 4 minutos, em etanol 70% por 30 segundos e lavados três vezes em água destilada esterilizada

(Araújo *et al.*, 2010). Após a desinfestação, foram retirados oito fragmentos de 2,5 x 2,5 mm de cada folha na região mediana próxima a nervura central (Gamboa *et al.*, 2002). Esses fragmentos foliares foram distribuídos sobre o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) acrescido de cloranfenicol (100 µg/mL) contidos em placas de Petri e incubados a 26±2°C por até 30 dias. As observações foram realizadas diariamente e qualquer colônia fúngica presente foi então isolada para posterior identificação. O controle da eficiência de desinfestação foi realizado pela inoculação de 1mL da última água de lavagem em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (Araújo *et al.*, 2010).

Identificação

No processo de identificação foram observadas características macroscópicas (coloração, aspecto e diâmetro das colônias) e microscópicas (microestruturas somáticas e reprodutivas) das colônias axênicas dos fungos endofíticos de acordo com a literatura específica (Ellis, 1971; Sutton, 1980; Domsch *et al.*, 1993; Weir *et al.*, 2012). Como alternativa para a indução da esporulação foram utilizados os meios de culturas: Meio folha (g/L: glicose 5, ágar 16; 500 mL do extrato aquoso das folhas de aceroleira, completar o volume para 1 litro) adaptado de Araújo *et al.* (2010); Ágar água (g/L: ágar 15) Araújo *et al.* (2010); Ágar tomate (suco de tomate livre de condimentos 50 ml, água destilada 50 mL, ágar 1,6 g).

Os isolados que não apresentaram estruturas reprodutivas em meio de cultura foram agrupadas em morfoespécies. Para isto, os isolados foram submetidos às mesmas condições de cultivo (meio de cultura BDA e sete dias de incubação a 26±2°C) para a avaliação das seguintes características das colônias: tamanho, margem, textura da superfície, profundidade de crescimento no meio de cultura, e cor das hifas aéreas e do reverso. Os isolados com duas ou mais características diferentes foram agrupados em morfoespécies separadas (Lacap *et al.*, 2003; Arnold *et al.*, 2007).

Um representante de cada morfoespécie foi submetido a extração do seu DNA genômico pelo método CTAB (Góes-Neto *et al.*, 2005). A região ITS do RNA ribossomal fúngico foi amplificada pelos iniciadores ITS5/ITS4 rDNA (White *et al.*, 1990), seguindo procedimentos padrões [volume de reação de 25 µl: 1x tampão de Taq (20 mM Tris-HCl, pH 8,4, e 50 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl₂, dNTP 0,2 mM, 0,5 mM de cada iniciador, 0,04 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 25 ng de DNA]. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C durante 4 minutos; 40 ciclos de 92°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, e 72°C durante 2 minutos; e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Os produtos da PCR foram purificados utilizando o Kit de Purificação *PureLink* de PCR (Invitrogen®) e sequenciado em ABI-310 *Capilar*

Sequencer (Perkin Elmer, Wellesley Massachusetts, EUA). Os eletroferogramas obtidos após sequenciamento foram analisados e editados no *software Staden Package 2.0* (Staden *et al.*, 1998). As sequências obtidas foram utilizadas para busca das mais similares depositadas no *GenBank*, utilizando a ferramenta *BLASTn*. Para a identificação molecular foram consideradas as sequências depositadas no *GenBank* com alta similaridade (> 97%), sendo estas verificadas quanto a confiabilidade (depósito em coleção de cultura, publicação do trabalho, comparação com espécimes-tipo e etc).

As culturas consideradas representativas dos fungos endofíticos isolados foram depositadas na Coleção Cultura URM (WDCM 604), da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

Análise dos dados

Os termos táxon e/ou táxons foram adotados para designar as diferentes morfoespécies, espécies e gêneros de endófitos identificados neste trabalho.

Para verificar a estrutura da comunidade de fungos endofíticos foram usados os índices de Diversidade de Shannon-Wiener, de Equitabilidade de Pielou e de Dominância Berger-Parker calculados através do programa *Past* versão 2.05 (Hammer *et al.*, 2001). A taxa de colonização foi calculada pela razão entre o número de fragmentos com crescimento fúngico e o número total de fragmentos (Araújo *et al.*, 2010). A riqueza dos endófitos foi analisada pelo número médio de táxons nos níveis da copa por coleta realizada. Também foi estimada a curva de acumulação de espécies para os endófitos de aceroleira (Jackknife1; Jackknife2; Chao1; Chao2), utilizando o programa *Primer 6* (Clarke e Gorley, 2006), conforme Bezerra *et al.* (2013).

A frequência de isolamento foi dada pelo número total de isolados obtidos; e a frequência relativa foi calculada como número de isolados de um táxon dividido pelo número total de isolados obtidos (Photita *et al.*, 2001). Os efeitos do nível da copa amostrado (ápice e parte inferior) e das coletas na frequência absoluta dos isolados foram verificados com a análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey por meio do programa SISVAR (Ferreira, 2011). Antes da análise, os dados foram transformados em raiz quadrada (dados + 1), resultando em uma amostra com distribuição normal.

A frequência dos dois táxons dominantes foi comparada nos diferentes níveis da copa e nas diferentes coletas utilizando o teste de Qui-quadrado (χ^2), com nível de significância de 5% de probabilidade.

Resultados

Taxa de colonização e identificação dos fungos endofíticos de folhas de aceroleira (*Malpighia emarginata*)

Não houve crescimento de colônias de fungos nas placas controle, atestando que o método de desinfestação superficial foi eficaz.

Um mil e dezenove isolados foram obtidos de 1824 fragmentos foliares, resultando em uma taxa de colonização de 55,9%. Dos isolados obtidos, 961 foram categorizados em 69 táxons (Tabela 1). Os isolados não categorizados incluem aqueles que não produziram esporos e não puderam ser distinguidos sem ambiguidade em morfoespécies, sendo estes considerados apenas nos cálculos de frequência e taxa de colonização.

Trinta e cinco por cento dos isolados obtidos produziram estruturas reprodutivas em meio de cultura e puderam ser identificados ao nível de gênero (3) e espécie (22), no entanto, a maioria foi categorizada em morfoespécies (44). Os táxons dominantes foram *Colletotrichum* spp. e *Guignardia bidwellii* com frequência relativa de isolamento de 34,8% e 33,1%, respectivamente. A soma da frequência relativa dos demais táxons foi de 32,2%, sendo que a maioria apresentou um valor inferior a 1%, com exceção das espécies *Phoma tropica* (2,6%), *Phomopsis archeri* (2%), *Cercospora apii* (1,7%), *Corynespora cassicola* (1,4%), *Fusarium oxysporum* (1,4%) e das morfoespécies 1 (4,1%), 9 (1,2%) e 17 (1,1%) (Tabela 2).

Tabela 2. Táxons e frequência relativa de fungos endofíticos de folhas do ápice e da parte inferior da copa de aceroleira (*Malpighia emarginata*) nas coletas 1 (setembro/2010), 2 (janeiro/2011) e 3 (março/2012). FR= frequência relativa; TC = taxa de colonização; A = Ápice e I = Parte inferior da copa da planta.

Táxons	TC %						FR%
	Coleta 1		Coleta 2		Coleta 3		
	A	I	A	I	A	I	
<i>Colletotrichum</i> spp. (URM ¹ 7116)	37	50,8	11,7	20,1	24,4	56,0	34,8
<i>Guignardia bidwellii</i> (Ellis) Viala & Ravaz (URM 7120)	19,7	17,6	55,2	42,2	50,4	23,9	33,1
Morphospecie 1/ <i>Cercospora rodmanii</i> Conway (URM 7134)	11,6	5,5	2,8	0,6	1,5	0,6	4,1
<i>Phoma tropica</i> R. Schneid. & Boerema (URM 7127)	1,2	4	2,1	3,9	2,3	1,9	2,6
<i>Phomopsis archeri</i> B. Sutton (URM 7135)	2,3	4	1,4	2,6	0	0,6	2
<i>Cercospora apii</i> Fresen. (URM 7119)	2,3	0	0	0	1,5	6,3	1,7
<i>Corynespora cassiicola</i> (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei (URM 7121)	1,2	1,5	2,1	1,9	0,8	0,6	1,4
<i>Fusarium oxysporum</i> Schldt. (URM 7128)	0	0	5,5	3,2	0	0	1,4
Morphospecie 9/ <i>Phoma</i> Sacc. (URM 7122)	1,7	0	1,4	4,5	0	0	1,2
Morphospecie 17/ <i>Setophoma</i> Gruyter, Aveskamp & Verkley (URM 7133)	0	0	2,8	3,9	0	0,6	1,1
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	0	0	0,7	5,2	0	0	0,9
<i>Fusarium lateritium</i> Nees	0	0	2,1	1,3	0	2,5	0,9
<i>Pteronidium</i> state of. <i>Apiospora camptospora</i> Penz. & Sacc.	0,6	3,0	0	0	0,8	0	0,8
<i>Acremonium implicatum</i> (J.C. Gilman & E.V. Abbott) W. Gams	0,6	1,0	0	2,6	0	0	0,7
<i>Xylaria</i> sp. Hill ex Schrank	1,2	2,5	0	0	0	0	0,7
<i>Cercospora</i> sp. Fresen.	0	1,0	0	0	2,3	0	0,5
<i>Curvularia brachyspora</i> Boedijn	2,9	0	0	0	0	0	0,5
<i>Talaromyces verruculosus</i> (Peyranel) Samson, N. Yilmaz, Frisvad & Seifert	2,3	0	0	0	0	0	0,4
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	0	0	0,7	0,6	0	0	0,2
<i>Drechslera biseptata</i> (Sacc. & Roum.) M.J. Richardson & E.M. Fraser	1,2	0	0	0	0	0	0,2
<i>Phoma leveillei</i> Boerema & G.J. Bollen	0	0	0	0	0	1,3	0,2
<i>Alternaria tenuissima</i> (Kunze) Wiltshire	0	0	0,7	0	0	0	0,1
<i>Cladosporium oxysporum</i> Berk. & M.A. Curtis	0,6	0	0	0	0	0	0,1
<i>Corynespora smithii</i> (Berk. & Broome) M.B. Ellis	0	0	0,7	0	0	0	0,1
<i>Khuskia oryzae</i> H.J. Huds.	0	0,5	0	0	0	0	0,1
<i>Lecanicillium lecanii</i> (Zimm.) Zare & W. Gams	0	0	0	0,6	0	0	0,1
<i>Nodulisporium gregarium</i> (Berk. & M.A. Curtis) J.A. Mey.	0	0,5	0	0	0	0	0,1
<i>Pseudocochliobolus pallescens</i> Tsuda & Ueyama	0	0	0	0	0,8	0	0,1
Morfoespécies com FR % < 1 %	12,3	7,5	10,4	6,2	15,4	5,6	9

¹URM = Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco. Fonte: O Autor (2014).

Das 44 morfoespécies estudadas, foram obtidas 31 sequências ITS de qualidade. A busca por sequências similares no *GenBank* possibilitou identificar os isolados em 15 espécies e 8 gêneros. Algumas morfoespécies apresentaram similaridade com sequências de fungos denominadas “*Fungal endophyte*” ou “*Uncultured fungus*” e permaneceram sem identificação. As morfoespécies, mais frequentes, 1, 9 e 17 foram identificadas como *Cercospora rodmanii*, *Phoma* sp. e *Setophoma* sp., respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação molecular dos isolados obtidos de folhas de *Malpighia emarginata* que não desenvolveram estruturas reprodutivas em meio de cultura.

Nº de identificação da Morfoespécie	Similaridade entre as sequências* (%)	Sequência por BLAST	Autores	Identificação final
1	99	<i>Cercospora rodmanii</i> /GQ884184	Montenegro-Calderón <i>et al.</i> , 2011	<i>Cercospora rodmanii</i>
2	99	<i>Cercospora capsicigena</i> /KC776165	Yuliarni <i>et al.</i> , 2013	<i>Cercospora capsicigena</i>
4	99	Fungal endophyte/KF435952	Higginbotham <i>et al.</i> , 2013	Não identificado
5	93	Fungal endophyte/ AF413035	Lacap <i>et al.</i> , 2003	Não identificado
6	99	<i>Phoma cucurbitacearum</i> / EU167573	Simon <i>et al.</i> , 2009	<i>Phoma cucurbitacearum</i>
7	98	Uncultured <i>Ochrocladosporium</i> / JX317417	Oliveira, <i>et al</i> 2014	<i>Ochrocladosporium</i> sp.
8	100	Microthyriaceae/KJ469652	Almeida <i>et al.</i> , 2014	Microthyriaceae
9	98	<i>Phoma</i> sp./KF646102	Menkis <i>et al.</i> , 2014	<i>Phoma</i> sp.
10	99	<i>Colletotrichum boninense</i> /JX436792	Douanla-Meli <i>et al.</i> , 2013	<i>Colletotrichum boninense</i>
11	98	<i>Phomopsis</i> sp./JN153070	Abreu <i>et al.</i> , 2012	<i>Phomopsis</i> sp.
13	99	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp./GU017524	Sakayaroj <i>et al.</i> 2010	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.
15	96	<i>Leptospora rubella</i> /JQ936327	Não publicado	<i>Leptospora</i> sp.
16	94	Fungal endophyte/AF413035	Lacap <i>et al.</i> , 2003	Não identificado
17	96	<i>Setophoma chromolaena</i> /KF251244	Quaedvlieg <i>et al.</i> , 2013	<i>Setophoma</i> sp.
18	99	<i>Leptospora rubella</i> /JQ936327	Não publicado	<i>Leptospora rubella</i>
19	98	Fungal endophyte/EF420004	Hoffman and Arnold, 2008	Não identificado
20	99	<i>Edenia gomezpompae</i> /EF565744	González <i>et al.</i> , 2007	<i>Edenia gomezpompae</i>
23	99	<i>Glomerella cingulata</i> /EF423544	Gilbert e Webb, 2007	<i>Glomerella cingulata</i>
25	99	<i>Diaporthe endophytica</i> /KC343069	Gomes <i>et al.</i> , 2013	<i>Diaporthe endophytica</i>
26	98	<i>Periconia byssoides</i> /KC954161	Markovskaja e Kacergius 2013	<i>Periconia byssoides</i>
28	99	Uncultured fungus/GU078648	Lee <i>et al.</i> , 2011	Não identificado
29	99	<i>Colletotrichum</i> sp./EU734583	Rojas <i>et al.</i> , 2010	<i>Colletotrichum</i> sp.
31	99	<i>Cercospora gerberae</i> /KC776160	Yuliarni <i>et al.</i> , 2013	<i>Cercospora gerberae</i>
32	99	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp./GU017524	Sakayaroj <i>et al.</i> 2010	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.
33	99	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> /JQ936128	Não publicado	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
34	99	<i>Diaporthe infecunda</i> /KC343129	Gomes <i>et al.</i> , 2013	<i>Diaporthe infecunda</i>

Continuação Tabela 3.

Nº de identificação da Morfoespécie	Similaridade entre as sequências* (%)	Sequência por BLAST	Autores	Identificação final
35	99	<i>Corynespora cassiicola</i> /FJ852578	Dixon <i>et al.</i> , 2009	<i>Corynespora cassiicola</i>
37	99	<i>Cochliobolus sativus</i> /JQ936099	Não publicado	<i>Cochliobolus sativus</i>
55	99	Fungal endophyte/KF435288	Higginbotham <i>et al.</i> , 2013	Não identificado
70	99	<i>Cercospora zebrina</i> /GU214657	Crous <i>et al.</i> , 2009	<i>Cercospora zebrina</i>
71	99	<i>Cercospora</i> sp./JX143701	Groenewald <i>et al.</i> , 2013	<i>Cercospora</i> sp.

Fonte: O Autor (2014).

* Foram consideradas apenas as sequências com similaridade maior que 97%, sendo estas verificadas quanto a confiabilidade.

Taxa de colonização e frequência de fungos endofíticos nos diferentes níveis da copa e coletas

Nas coletas realizadas foram obtidos 486 fungos endofíticos do ápice e 533 do inferior da copa. A taxa de colonização por coleta foi de 69,7%, 50% e 47,9% para a coleta 1 (ápice 34,2%/inferior 35,5%), coleta 2 (ápice 23,8%/inferior 26,2%) e coleta 3 (ápice 21,9%/inferior 26%), respectivamente.

Não houve interação entre o nível da copa e a coleta com relação à frequência de fungos endofíticos obtidos ($F = 0,18$ e $p = 0,84$). A análise isolada dos fatores demonstrou que não houve diferença entre a frequência de fungos endofíticos nos níveis da copa ($\bar{y} = 169,85$; $F = 1,03$ e $p = 0,32$), contudo houve diferença entre as coletas ($F = 3,67$ e $p = 0,035$), sendo que a coleta 1 diferiu da coleta 3 (Tabela 4).

Tabela 4. Densidade de fungos endofíticos de folhas de aceroleira (*Malpighia emarginata*) nas coletas 1 (setembro/2010), 2 (janeiro/2011) e 3 (março/2012).

Coleta	Frequência \pm desvio padrão
1	11,16 \pm 6,05 a*
2	8,00 \pm 4,07 ab
3	7,66 \pm 4,02 b

Fonte: O Autor (2014).

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados originais, para a análise estatística foram transformados em raiz quadrada (dados + 1).

Diversidade e riqueza da comunidade de fungos endofíticos

Os dados ecológicos (índices de diversidade, equitabilidade e dominância) relacionados à comunidade de fungos endofíticos de *M. emarginata* apresentaram valores próximos entre os diferentes níveis da copa e entre as três coletas realizadas, demonstrando a tendência à estabilidade

da comunidade estudada. Contudo, o ápice quando comparado a parte inferior, apresentou maior diversidade ($H' = 2,28$) e equitabilidade ($J = 0,58$) e, assim, menor índice de dominância ($D = 0,23$). Considerando a análise por coleta, a primeira apresentou a maior diversidade ($H' = 2,16$) e a terceira a menor ($H' = 1,72$). Na coleta 3 também foi verificado o maior índice de dominância ($D = 0,31$) e menor igualdade na distribuição de isolados entre os táxons ($J = 0,52$) da comunidade de fungos endofíticos estudada (Tabela 5).

Tabela 5. Índices ecológicos e riqueza de táxons da comunidade de fungos endofíticos de folhas de aceroleira (*Malpighia emarginata*) nas coletas 1 (setembro/2010), 2 (janeiro/2011) e 3 (março/2012) e na amostragem geral entre os níveis da copa da planta.

	Amostragem por coleta			Amostragem geral (Nível da copa)	
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Ápice	Inferior
Índice de Shannon (H')	2,16	2,06	1,72	2,28	2,06
Equitabilidade Pielou (J)	0,60	0,61	0,52	0,58	0,55
Dominância de Berger-Parker(D)	0,24	0,27	0,31	0,23	0,26
Riqueza absoluta	37	29	28	49	42

Fonte: O autor (2014).

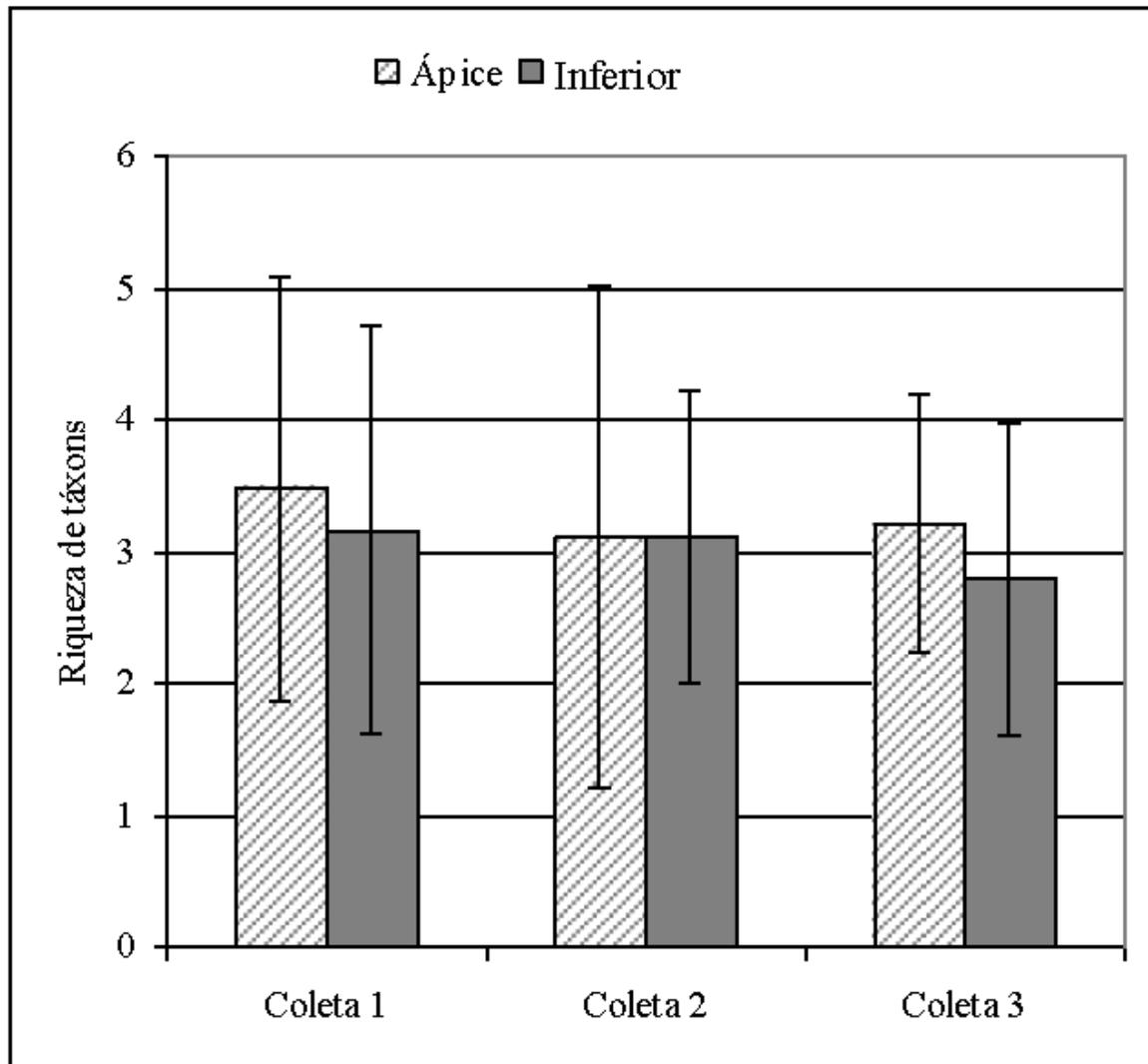
De forma semelhante aos dados ecológicos, foi verificada pouca diferença na riqueza de táxons obtida entre as variáveis analisadas. Na comparação da influência do nível da copa por coleta isoladamente, verificou-se que nas coletas 1 e 3, o ápice apresentou maior número médio de táxons que a parte inferior da copa. Na segunda coleta, o ápice e a parte inferior da copa apresentaram o mesmo valor de riqueza, no entanto, no ápice houve menor uniformidade na distribuição do número de táxons (Figura 3).

Apesar de a riqueza ter sido próxima ou igual entre os níveis da copa, dependendo da coleta realizada a composição taxonômica diferiu, sendo essa diferença mais acentuada quando analisado os táxons de menor abundância (um ou poucos isolados). Do total de táxons encontrados, 39,13% foram exclusivos do ápice da copa, sendo as espécies produtoras de esporos: *Pseudocochliobolus pallescens*, *Alternaria tenuissima*, *Cladosporium oxysporum*, *Corynespora smithii*, *Curvularia brachyspora*, *Drechslera biseptata* e *Penicillium verruculosum*. Já *Khuskia oryzae*, *Lecanicillium lecanii*, *Nodulisporium gregarium*, *Phoma leveillei* e outras espécies não esporulantes foram isoladas apenas da parte inferior da copa, representando 27,54 % do total de táxons.

A variação na composição taxonômica também foi verificada entre as coletas. Considerando apenas os isolados esporulantes em cultura, alguns táxons foram específicos para cada coleta: coleta 1 – *C. oxysporum*, *C. brachyspora*, *D. biseptata*, *K. oryzae*, *N. gregarium*, *P. verruculosum*, *Xylaria*

sp.; coleta 2 – *Alternaria alternata*, *A. tenuissima*, *C. cladosporioides*, *C. smithii*, *Fusarium oxysporum*, *L. lecanii*; coleta 3 – *P. leveillei* e *P. pallescens*.

Figura 3. Riqueza média de táxons de fungos endofíticos de folhas do ápice e da parte inferior da copa de aceroleira.

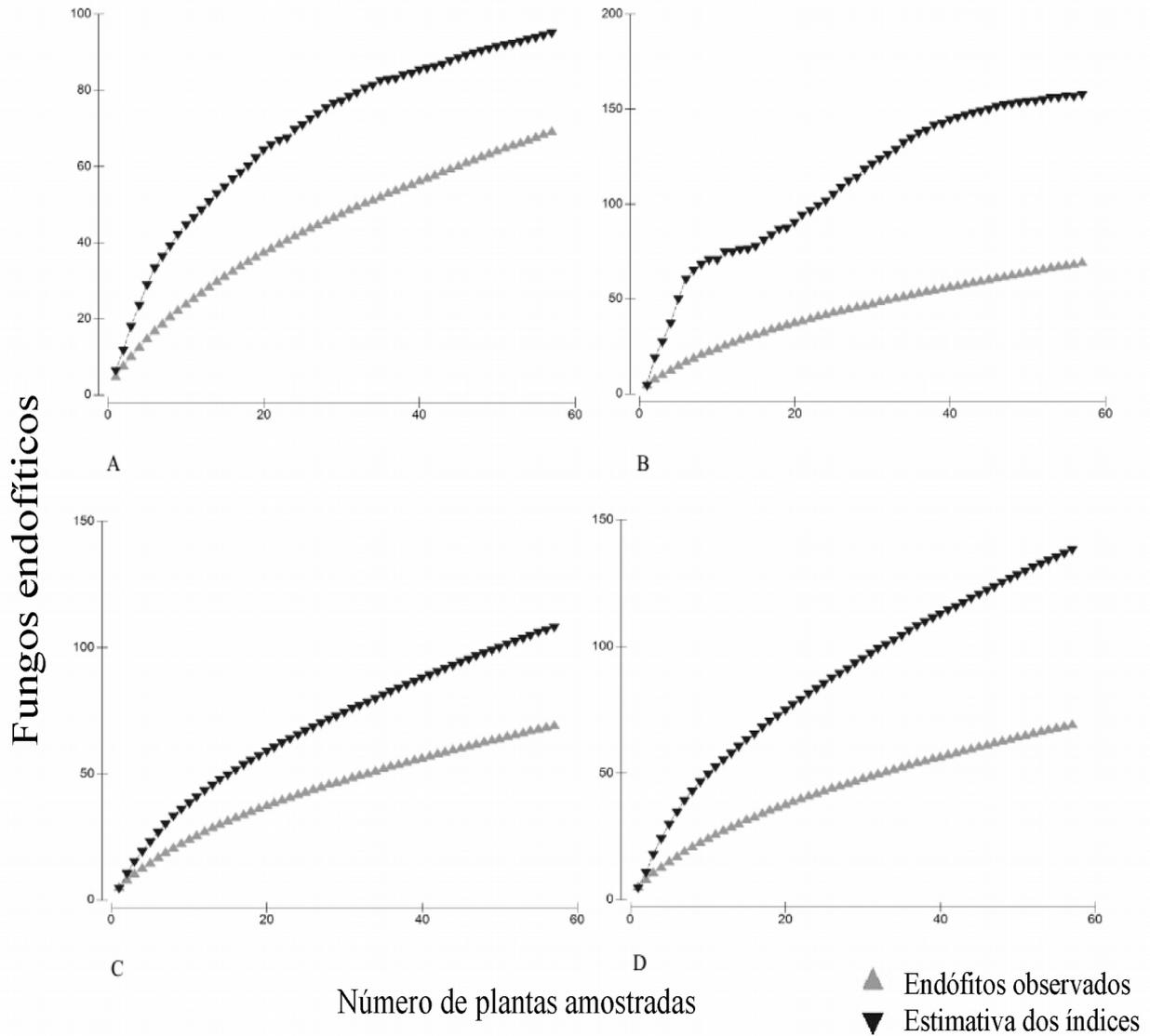


Fonte: O Autor (2014).

Colletotrichum spp. e *G. bidwellii* foram obtidos tanto no ápice quanto na parte inferior da copa e em todas as coletas realizadas. No entanto, a densidade dessas espécies diferiu em cada nível da copa (ápice: $\chi^2 = 12,33 > \chi^2_{0,05;1} = 3,84$; inferior: $\chi^2 = 24,05 > \chi^2_{0,05;1} = 3,84$) e nas coletas 1 ($\chi^2 = 42,68 > \chi^2_{0,05;1} = 3,84$) e 2 ($\chi^2 = 40,36 > \chi^2_{0,05;1} = 3,84$). Na terceira coleta não foi observada diferença na densidade das espécies mais frequentes ($\chi^2 = 1,28 < \chi^2_{0,05;1} = 3,84$). No ápice a espécie dominante foi *G. bidwellii*, enquanto que na parte inferior foi *Colletotrichum* spp. Na coleta 1, *Colletotrichum* spp. apresentou maior número de isolados que *G. bidwellii*, enquanto que na coleta 2 houve o inverso.

As curvas de acumulação de espécies dos fungos endofíticos estudados não atingiram a saturação. Os estimadores de riqueza que foram utilizados estimaram o número de táxons em *M. emarginata* como apresentado na Figura 4.

Figura 4. Curvas de acumulação de espécies de fungos endofíticos de aceroleira. (▲) indica as curvas de acumulação de espécies de fungos endofíticos e (▼) indica as curvas de acumulação de fungos endofíticos estimativas por tipo de índice (A= Chao 1; B= Chao 2; C=Jackknife 1; D= Jackknife 2).



Fonte: O Autor (2014).

Discussão

Taxa de colonização e composição de táxons da comunidade de fungos endofíticos de aceroleira

A taxa de colonização acima de 50% nas folhas de aceroleira (*M. emarginata*) é condizente com outras plantas tropicais em que a obtenção de colônias de fungos endofíticos é alta (Cannon e Simmons, 2002). Outras plantas de interesse agrícola no Brasil como, por exemplo, bananeira (Pereira *et al.*, 1999), cacauzeiro (Rubini *et al.*, 2005) e maracujazeiro-amarelo (Luz *et al.*, 2006) também apresentaram taxas de colonização por fungos endofíticos próximas à verificada neste estudo. No entanto, não há artigos científicos com estudos acerca da comunidade de fungos endofíticos da aceroleira para comparações de dados.

As espécies identificadas pertencem ao filo Ascomycota e estão distribuídas, quase que na totalidade, entre as classes Dothideomycetes e Sordariomycetes. As espécies encontradas nessas classes são frequentemente isoladas como endofíticas tanto em regiões tropicais (Peixoto-Neto *et al.*, 2002; Vega *et al.*, 2010) quanto em regiões temperadas (Unterseher *et al.*, 2007; Scholtysik *et al.*, 2012).

A comunidade de fungos endofíticos de folhas de aceroleira seguiu o mesmo padrão verificado por outros autores em regiões tropicais, onde a comunidade teve poucas espécies abundantes e muitas espécies com poucos indivíduos (Gamboa e Bayman; 2001; Gazis *et al.*, 2011; Déon *et al.*, 2012; Gond *et al.*, 2012; Knapp *et al.*, 2012). Independente do período de coleta e nível da copa amostrado, apenas dois táxons foram dominantes nas folhas estudadas de *M. emarginata*, sendo estas *Colletotrichum* spp. e *G. bidwellii* que juntas somaram 67,8% dos isolados obtidos.

Colletotrichum está entre os gêneros mais generalistas e dominantes de fungos endofíticos em diferentes plantas hospedeiras. No Brasil, entre as plantas investigadas, este gênero foi dominante para: bananeira (*Musa acuminata* Colla) (Pereira *et al.*, 1999), maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. sp. *flavicarpa* O. Deg.) (Luz *et al.*, 2006), alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) (Siqueira *et al.*, 2011) e seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.] (Déon *et al.*, 2012). Em outras localidades, *Colletotrichum* sp. foi dominante em várias espécies de árvores florestais na Guiana (Cannon e Simmons, 2002), cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.) e *Ouratea lucens* (Kunth) Engler no Panamá (Arnold *et al.*, 2003); *Artemisia lactiflora* Wall. ex DC., *Artemisia capillaris* Thunb., *Strophanthus divaricatus* (Lour.) Hook. & Arn. e *Hoya carnosa* (L. f.) R. Br. na China (Huang *et al.*, 2008); café (*Coffea arabica* L.) na Colômbia, Havaí, México e Porto Rico (Vega *et al.*, 2010) entre outros (Gazis *et al.*, 2011). *Guignardia bidwellii* é conhecido como o

agente causal da podridão negra de uva (Wicht et al., 2012.), mas também é endófito de muitas espécies vegetais (Cannon e Simmons, 2002; Peixoto-Neto *et al.*, 2002; Siqueira *et al.*, 2011). O gênero *Guignardia* é um endófito comum de citros e outras plantas frutíferas no Brasil (Azevedo *et al.*, 2000) e frequentemente é obtido de outras plantas tropicais (Costa *et al.*, 2012).

O índice de diversidade de Shannon apresentou valores próximos ao encontrado em outros estudos envolvendo a amostragem em diferentes níveis da copa, tanto em regiões tropicais (Gamboa e Bayman, 2001) quanto temperadas (Scholtysik *et al.*, 2012). Apesar do elevado número de táxons obtidos, os valores de diversidade de Shannon não foram maiores devido à dominância de apenas dois táxons; isso porque este índice considera não apenas o número de táxons observados, mas também a proporção de cada táxon em relação ao total observado (Odum, 1985).

As curvas de acumulação de espécies/táxons mostraram que o esforço de amostragem não foi suficiente para cobrir todos os táxons de fungos endofíticos em *M. emarginata*. Resultados semelhantes foram obtidos em levantamentos tanto de plantas tropicais quanto em plantas de ambientes temperados (ver Gamboa e Bayman, 2001; Arnold *et al.*, 2007; Unterseher *et al.*, 2007; Bezerra *et al.*, 2013; Scholtysik *et al.*, 2012) demonstrando a dificuldade em adequar o esforço amostral em estudos de diversidade endofítica. Vários táxons (principalmente morfoespécies) apresentaram baixa frequência de isolamento, sendo recuperado uma ou duas vezes ao longo da investigação. De acordo com Unterseher *et al.* (2007), um grande número de endófitos, raramente recuperados durante o estudo, resulta numa curva de acumulação de espécies que tende a subir quase linearmente.

Outro aspecto comum ao estudo de fungos endofíticos, também observado no caso de *M. emarginata*, é o isolamento de um grande número de fungos não esporulantes em meio de cultivo. Em alguns estudos, este grupo foi dominante na planta estudada (Cannon e Simmons, 2002; Unterseher *et al.*, 2007; Huang *et al.* 2008; Martín-García *et al.*, 2011).

A análise das sequências ITS permitiu a identificação da maioria das morfoespécies. As três morfoespécies mais frequentes pertencem aos gêneros *Cercospora*, *Phoma* e *Setophoma*, sendo estes comuns em plantas tropicais (Lacap *et al.*, 2003; Gazis *et al.*, 2011). Apesar de útil a análise da sequência ITS não foi suficiente para a definição das espécies dentro de alguns gêneros.

Distribuição vertical da comunidade de fungos endofíticos

Estudos investigando a distribuição endofítica em diferentes níveis da copa são escassos e os resultados conflitantes, principalmente em plantas tropicais (Gamboa e Bayman, 2001) e em regiões temperadas se limitam a árvores florestais de grande porte, com mais de 15 metros de altura

(Unterseher *et al.*, 2007; Scholtysik *et al.*, 2012). Em todos estes estudos os autores indicam que a frequência e a diversidade são maiores na parte inferior da copa (sombra).

As possíveis explicações para este padrão de distribuição na estrutura da comunidade endofítica na copa, concentram-se nos diferentes microclimas e nas características das folhas encontradas em cada nível da copa. As folhas localizadas no alto da copa e que estão expostas a radiação solar direta, oferecem um ambiente mais instável e susceptível ao estresse hídrico em comparação com as condições relativamente estáveis e uniformes encontradas nas folhas da parte inferior da copa, as quais favorecem a colonização por fungos endofíticos (Gamboa e Bayman, 2001; Scholtysik *et al.*, 2012).

Foi observado que a intensidade de exposição à radiação solar modificou a morfologia e a textura das folhas de aceroleira. As folhas coletadas do ápice da copa apresentaram menor tamanho e cutículas mais espessas, enquanto que as folhas da parte inferior, menos expostas ao sol, apresentaram maior tamanho e cutículas mais finas e macias. Modificações semelhantes nas folhas também foram observadas por Scholtysik *et al.* (2012), que inferiram que a textura das folhas de *Fraxinus excelsior* do sub-bosque (na sombra) pode ter favorecido a penetração dos fungos e assim, contribuído para o maior número de fungos recuperados nesse nível da copa. No entanto, para *M. emarginata*, foi verificado que o número de isolados de fungos endofíticos, não diferiu estatisticamente, entre um nível e outro da copa, no entanto o ápice da copa apresentou maior riqueza de táxons. Um padrão similar foi encontrado por Gamboa e Bayman (2001) em *Guarea guidonia*, mas somente em um dos locais de coleta estudado. Martín-García *et al.* (2011) verificaram que variáveis relacionadas à cobertura da copa, como volume de folhas e transparência da copa, não tiveram efeitos significativos sobre a comunidade endofítica.

Houve diferença entre ápice e parte inferior da copa de *M. emarginata* com relação a composição de táxons encontrados. Estes resultados confirmam que os dois níveis extremos da copa da planta constituem microhabitats distintos que favorecem ou selecionam táxons diferentes. As duas espécies mais frequentes nas folhas de *M. emarginata* apresentaram dominância diferente entre os níveis da copa estudados, sendo *G. bidwellii* dominante no ápice e *Colletotrichum* spp. dominante na parte inferior. Essa diferença de composição dos táxons entre os níveis da copa pode ter sido influenciada pelo estado do hospedeiro e pela diferença entre o microclima do topo (maior flutuação de temperatura e umidade) e parte inferior (maior estabilidade na temperatura e umidade) da copa. Provavelmente, *G. bidwellii* está mais adaptada às condições da camada superior da copa e os aspectos relacionados a esse sucesso podem ser explorados em estudos posteriores.

Colletotrichum gloeosporioides é considerado o agente causal da antracnose, doença mais difundida nos pomares aceroleira, capaz de causar danos tanto em folhas e caules, quanto em frutos

(Ritzinger e Ritzinger, 2004; Serra e Silva, 2004; Mendes *et al.*, 2012). Durante a realização das coletas, observou-se que as folhas localizadas na parte inferior da copa apresentavam folhas com sintomas da antracnose, provavelmente devido a maior umidade desse nível da copa. Considerando que *Colletotrichum* spp. apresentou maior frequência na parte inferior da copa, não se pode descartar a possibilidade de uma parte destes isolados serem patógenos latentes, merecendo uma investigação sobre a patogenicidade e diversidade genética desse isolados.

Este estudo contribuiu para o conhecimento da comunidade de fungos endofíticos da aceroleira. Verificaram-se modificações na frequência e na composição taxonômica endofítica com o período de coleta. A amostragem vertical aumentou a riqueza de espécies recuperadas, sendo verificadas diferenças na composição de táxons obtidos do ápice e da parte inferior da copa da planta. A amostragem vertical pode ser aplicada em plantas cultiváveis de pequeno porte, gerando interessantes resultados não apenas considerando os endófitos como uma fonte de diversidade ecológica, mas também porque o uso desse tipo de amostragem aumentou a gama de táxons obtidos, o que é importante para obtenção de isolados que podem ser direcionados para estudos de seleção de fungos de interesse biotecnológico.

4. IDENTIFICAÇÃO E VARIABILIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES DE *Colletotrichum* ASSOCIADAS À ACEROLEIRA (*Malpighia emarginata*)¹

Resumo

Espécies de *Colletotrichum* são comumente conhecidas por serem fitopatógenas, no entanto estas espécies são relatadas como endófitas de inúmeras plantas. Este estudo foi realizado com o objetivo de identificar as espécies de *Colletotrichum* isoladas como endófitas e fitopatógenas de folhas de *M. emarginata*, verificar a variabilidade genética e fenotípica entre os isolados obtidos e diferenciar os mesmos quanto ao hábito ecológico. Para isso foram realizadas análises filogenéticas, caracterização macro e micromorfológica, e amplificação por PCR com marcadores moleculares (GACA)₄ e M13. A análise filogenética consenso das regiões ITS do rDNA e um fragmento do gene β -tubulina (TUB2), associada às análises morfológicas das colônias, resolveram de forma satisfatória a identificação dos isolados de *Colletotrichum* fitopatógenos e/ou endófitos de aceroleira, sendo estas: *C. karstii* e *C. brasiliense* (complexo *C. boninense*), *C. fructicola*, *C. siamense*, *C. gloeosporioides* sensu stricto e *C. theobromicola* (complexo *C. gloeosporioides*) e a espécie *C. cliviae*. *Colletotrichum karstii* foi a espécie mais frequente tanto entre fitopatógenos quanto entre endófitos. O agrupamento dos fungos por características fenotípicas foi útil, principalmente para separar os complexos de espécies *C. gloeosporioides* e *C. boninense*. Os iniciadores ISSR evidenciaram diferenças intra e interespecífica entre os isolados e o padrão de bandas gerado pelo marcador (GACA)₄ separou, grande parte dos isolados, de acordo com o complexo de espécie. No geral, em nenhuma das abordagens adotadas (filogenética, morfológica e por marcadores moleculares) foi possível diferenciar isolados endofíticos de fitopatogênicos.

Palavras-chave: fungos endofíticos, fungos fitopatogênicos, antracnose, marcador molecular ISSR, filogenética.

¹Trabalho a ser submetido para publicação: Nascimento, T.L., Lima, M. R., Cunha, A.O. B., Laranjeira, D., Júnior, N.C.L., Oliveira, N. T., Souza-Motta, C.M. Caracterização molecular e morfológica de espécies de *Colletotrichum* associadas à aceroleira (*Malpighia emarginata*). *Genetics e Molecular Research*..

Introdução

Colletotrichum é um dos gêneros de patógenos de plantas mais comuns e amplamente distribuídos no mundo. Este fungo pode causar antracnose em uma grande variedade de frutas, legumes, cereais, gramíneas e plantas ornamentais em regiões tropicais e temperadas (Sutton, 1980; Cai *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2013). Atualmente esse gênero apresenta mais de 100 espécies aceitas (Cannon *et al.*, 2012). Tradicionalmente a identificação de espécies de *Colletotrichum* está baseada em critérios descritivos clássicos tais como forma, tamanho dos conídios e apressórios; fase teleomórfica e aspectos da cultura, como cor, textura da colônia e taxa de crescimento; e plantas hospedeiras (Sutton, 1980; Hyde *et al.*, 2009a). A identificação baseada somente nesses critérios não é suficiente para a diferenciação entre as espécies de *Colletotrichum*, devido às mesmas apresentarem grande variabilidade genética e consequentemente plasticidade morfológica (Hyde *et al.*, 2009a; Weir *et al.*, 2012).

Com os avanços na sistemática e identificação molecular, recentes estudos vêm demonstrando que um razoável número de espécies de *Colletotrichum* está associado à antracnose em frutíferas (Bragança, 2013; Udayanga *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2013; Kamei *et al.*, 2014; Schena *et al.*, 2014). Kamei *et al.* (2014), verificaram que quatro espécies de *Colletotrichum* são responsáveis pela antracnose em pinheira e gravioleira em Alagoas: *C. gloeosporioides*, *C. boninense*, *C. fragariae* e *C. magna*. Até então, *C. gloeosporioides* era considerado o único agente etiológico da antracnose nessas culturas no Brasil.

A identificação precisa das espécies é fundamental para compreender a epidemiologia e para desenvolver um controle eficaz de doenças causadas por *Colletotrichum* (Sutton, 1980; Cai *et al.*, 2009). Diante disso, Cai *et al.* (2009) propuseram para *Colletotrichum*, a combinação de análises filogenéticas multigênicas com caracteres polifásicos reconhecíveis, como morfologia, fisiologia, patogenicidade, características da cultura e metabólitos secundários. Além disso, forneceram um conjunto de protocolos e metodologias como um guia para futuros estudos incluindo epitipificação e descrição de novas espécies. Recentemente, grupos de pesquisas também publicaram revisões sobre o gênero (Hyde *et al.*, 2009a,b; Damm *et al.*, 2010; Damm *et al.*, 2012; Weir *et al.*, 2012; Cannon *et al.*, 2012) contribuindo para o avanço dos estudos de taxonomia e sistemática do mesmo. Um estudo incluindo quase todas as espécies reconhecidas, revelou pelo menos nove clados neste gênero, além de táxons adicionais que não se agrupam em nenhum dos complexos de espécies estabelecidos. Destes clados, se destacaram como mais importantes e bem resolvidos, os complexos de espécies *C. gloeosporioides* com 22 duas espécies, *C. acutatum* com 29 espécies, *C. boninense* com 17 espécies e *C. truncatum* com 3 espécies (Cannon *et al.*, 2012).

Espécies de *Colletotrichum*, conhecidas por serem fitopatógenas são comumente isoladas como endófitas de plantas saudáveis (Arnold *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2008; Lima *et al.* 2012; Rojas *et al.*, 2010; Siqueira *et al.*, 2011; Álvarez *et al.* 2014 entre outros). Considerando que o comportamento ecológico das diferentes espécies de fungos endofíticos em associação com a planta hospedeira ainda não é totalmente claro, podendo variar de simbiótico para patogênico (Saikkonen *et al.*, 1998; Schulz e Boyle, 2005; Arnold, 2007) estudos para elucidar a base da patogenia e endofitismo de algumas espécies de fungos são necessários. Entre algumas abordagens utilizadas para elucidar tal relação estão análises genéticas (filogenéticas e marcadores moleculares) e aspectos fisiológicos como produção enzimática (Rojas *et al.*, 2010; Lana *et al.*, 2011; Romão *et al.*, 2011).

Este estudo teve como objetivos: identificar as espécies de *Colletotrichum* isoladas como endófitas e fitopatógenas de folhas de *M. emarginata*, verificar a variabilidade genética e fenotípica entre os isolados obtidos e diferenciar os mesmos quanto ao hábito ecológico (endófito e fitopatógeno).

Material e Métodos

Isolados de *Colletotrichum*

O local de coleta do material vegetal, para a obtenção dos isolados, foi o pomar comercial “Acerolândia” em Pernambuco, Nordeste do Brasil (7°55'58,3" S e 35°8'12,8" W, altitude de 70 metros). O pomar é composto em sua maioria por aceroleiras (*M. emarginata*) com cerca de 20 anos de idade, plantadas com espaçamento de 4 x 5 metros e com uma considerável variabilidade fenotípica com relação à coloração e à morfologia das folhas e dos frutos.

Para o isolamento dos fungos endofíticos, as folhas coletadas foram lavadas em água corrente para a remoção da poeira e outros resíduos e depois submetidas à técnica de desinfestação superficial por hipoclorito de sódio de acordo com Araújo *et al.* (2010). Fragmentos foliares de 2,5 x 2,5 mm (Gamboa *et al.*, 2002) foram distribuídos sobre o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) acrescido de cloranfenicol (100 µg/mL) contidos em placas de Petri e incubados a 26±2°C. O controle da eficiência de desinfestação foi realizado pela inoculação de 1mL da última água de lavagem em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (Araújo *et al.*, 2010).

Para o isolamento dos fungos fitopatogênicos, folhas de *M. emarginata* com sintomas típicos de antracnose foram lavadas em água corrente e cortadas em fragmentos a partir da borda da lesão. Esses fragmentos foram submetidos a desinfestação superficial, na seguinte sequência: imersão em álcool 70% por 30 segundos; hipoclorito de sódio a 1,5% por 2 minutos; remoção do excesso de hipoclorito em duas porções consecutivas de água destilada esterilizada (adaptado de Menezes e Assis, 2004). Após a secagem em papel de filtro esterilizado, os referidos fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA acrescido de cloranfenicol (100 µg/mL). As placas inoculadas foram incubadas em temperatura ambiente (26 ± 2°C).

Índice de velocidade de crescimento micelial e caracterização morfológica dos isolados de *Colletotrichum*

Na a avaliação do crescimento micelial, discos de micélio com 4 mm de diâmetro de culturas monospóricas de todos os isolados, foram transferidos para placas de Petri (9 mm) contendo o meio de cultura BDA (Difco®) e submetidos à temperatura de 20°C sob alternância de 12 horas de luz fluorescente/12 horas de escuro (Weie *et al.*, 2012). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com seis repetições. Diariamente foram realizadas medições do diâmetro das colônias, iniciando-se após 24 horas do inóculo durante sete dias. O índice de

velocidade de crescimento micelial (IVCM), foi calculado conforme a fórmula: $IVCM = \sum(D - D_a) / N$, onde D=diâmetro médio atual da colônia; D_a =diâmetro médio da colônia do dia anterior; N=número de dias após a inoculação (Menezes e Assis, 2004).

No sétimo dia de incubação as características macroscópicas foram registradas: cor da colônia (verso e reverso); produção de massa de esporos; tipo de micélio aéreo (textura e abundância); formação de setores e anéis de crescimento. Cerca de 25 conídios foram observados quanto ao tamanho e formato para cada isolado, as lâminas foram montadas em ácido láctico (Damm *et al.*, 2012; Weir *et al.*, 2012). Para produção dos apressórios foi utilizada a técnica de cultura em lâmina de acordo com Cai *et al.* (2009). Após sete ou 14 dias a forma dos apressórios foi registrada.

Um dendrograma fenotípico com base no IVCM e características morfológicas (coloração do verso e reverso, produção de massa de esporos, tipo de micélio aéreo, formato do apressório, formato e tamanho dos conídios) foi construído. Os dados foram introduzidos na forma de variáveis binárias para construção de uma matriz de similaridade, utilizando o coeficiente de Jaccard. A partir da construção da matriz de similaridade foi gerado um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Average*) utilizando o programa *Past* versão 2.05 (Hammer *et al.*, 2001).

Extração do DNA, amplificação e sequenciamento

Os isolados de *Colletotrichum* foram cultivados em Meio Extrato de Malte líquido (g/L: extrato de malte 20; peptona 1; glicose 20) e mantidos estáticos a 25°C por até 96 horas. Em seguida, o micélio foi coletado por filtração a vácuo, lavado com água destilada esterilizada e seco em papel de filtro. A extração do DNA genômico foi realizada seguindo o método CTAB (Góes-Neto *et al.*, 2005).

Para o sequenciamento, foram amplificadas duas regiões do DNA: ITS5/ITS4 rDNA (White *et al.*, 1990), e β -tubulina 2 (TUB2-Bt2a/Bt2b Glass e Donaldson, 1995). As reações de amplificação foram realizadas no termociclador Techne TC-512 em um volume final de 25 μ L [1X tampão de Taq (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,2 mM, 0,5 mM de cada iniciador, Taq DNA polimerase 0,04 U (Invitrogen®) e 25 ng de DNA]. As condições de PCR para a amplificação da região ITS foram: desnaturação inicial a 95°C durante 4 minutos, 40 ciclos de 92°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, e 72°C durante 2 minutos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Para a região TUB2, as condições foram: 95°C durante 4 minutos, 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 45 segundos e depois 72°C

por 7 minutos (Weir *et al.*, 2012). Os produtos de amplificação foram purificados utilizando o kit de Purificação PureLink de PCR (Invitrogen®) e enviados para sequenciamento na Plataforma de Sequenciamento do Laboratório Central (LABCEN), Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em *ABI-310 Capilar Sequencer* (Perkin Elmer, Wellesley Massachusetts, EUA).

O DNA dos isolados também foi amplificado com o iniciador específico para espécies do complexo *C. gloeosporioides* CgInt/ITS4, para identificação preliminar dos isolados. As condições de amplificação foram conforme Maciel *et al.* (2010).

Todos os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% a 3V/cm de distância entre os eletrodos em tampão de corrida TAE 1X (pH 8,0), foi usado o marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas®) e as amostras coradas com *GelRed*®. O gel foi visualizado em transluminador de ultravioleta e fotografado utilizando máquina digital.

Análises filogenéticas

Os eletroferogramas, obtidos após sequenciamento dos isolados de *Colletotrichum* (endófitos e fitopatógenos), foram analisados e editados no *software Staden Package 2.0* (Staden *et al.*, 1998). As sequências obtidas foram utilizadas para busca das mais similares depositadas no *GenBank*, utilizando a ferramenta *BLASTn*. As sequências experimentais da região ITS e TUB2 foram alinhadas e editadas em conjunto com sequências de referência (Cannon *et al.*, 2012; Damm *et al.*, 2012; Weir *et al.*, 2012) utilizando o programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011). Foram utilizadas para a reconstrução filogenética 27 sequências provenientes do *GenBank* (Tabela 6).

A árvore filogenética foi construída através do método de máxima parcimônia (MP) e verossimilhança (MV) com 5000 reamostragens de *bootstrap* utilizando o programa PAUP4 (Swofford, 2002) e pela inferência bayesiana (BA) com um milhão de gerações (Ronquist e Huelsenbeck, 2003).

Tabela 6. Isolados de *Colletotrichum* ssp. procedentes de folhas de aceroleira (*Malpighia emarginata*) e sequências usadas neste estudo para análise filogenética. Os isolados em análise estão destacados em negrito.

Espécies	Isolado/Coleção de cultura	Hospedeiro	Local	Nº de acesso <i>GenBank</i>	
				ITS	TUB2
<i>C. aeshynomenes</i>	ICMP 17673*, ATCC 201874	<i>Aeshynomene virginica</i>	EUA	JX010176	JX010392
<i>C. boninense</i>	CBS 123756, MAFF 306094	<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>sinicum</i>	Japão	JQ005154	JQ005589
	CBS 123755, MAFF 305972*	<i>C. asiaticum</i> var. <i>sinicum</i>	Japão	JQ005153	JQ005588
<i>C. brasiliense</i>	CBS 128528, ICMP 18606	<i>Passiflora edulis</i>	Brasil	JQ005234	JQ005668
	CBS 128501, ICMP 18607	<i>P. edulis</i>	Brasil	JQ005235	JQ005669
	E79/-	<i>Malpighia emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
<i>C. cliviae</i>	CBS125375*	<i>Clivia miniata</i>	China	JX519223	JX519249
	E8A/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	E44/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	F46/-	<i>M. emarginata</i> , antracnose foliar	Brasil		
<i>C. dracaenophilum</i>	CBS118199*	<i>Dracaena</i>	China	JX519222	JX519247
<i>C. fruticola</i>	CBS 238.49*, ICMP 17921	<i>Ficus edulis</i>	Alemanha	JX010181	JX010400
	F12/-	<i>M. emarginata</i> , antracnose foliar	Brasil		
	E46/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	E58/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	E106/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	F18/-	<i>M. emarginata</i> , antracnose foliar	Brasil		
	F49/-	<i>M. emarginata</i> , antracnose foliar	Brasil		
	E123/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	E13/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	E125/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
<i>C. gloeosporioides</i>	ICMP 17821*, CBS 112999, IMI 356878	<i>Citrus sinensis</i>	Itália	JQ005152	JQ005587
	E34/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
<i>C. hippeastri</i>	CBS 125377, CSSK4	<i>Hippeastrum vittatum</i>	China	JQ005230	JQ005664
	CBS 125376*, CSSG1	<i>Hippeastrum vittatum</i>	China	JQ005231	JQ005665
<i>C. karstii</i>	CBS 129833	<i>Musa</i> sp.	México	JQ005175	JQ005609
	CBS 111998, STE-U 2999	<i>Leucospermum</i> sp.	Austrália	JQ005212	JQ005646
<i>C. karstii</i>	CBS 128550, ICMP 17896	<i>Annona cherimola</i>	México	JQ005219	JQ005653

Continuação Tabela 6.

Espécies	Isolado/Coleção de cultura	Hospedeiro	Local	Nº de acesso <i>GenBank</i>	
				ITS	TUB2
	CBS 127597, BRIP 29085a	<i>Diospyros australis</i>	Austrália	JQ005204	JQ005638
	E65/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	E70/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	E33/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	F13/-	<i>M. emarginata</i> , antracnose foliar	Brasil		
	E72/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	F23/-	<i>M. emarginata</i> , antracnose foliar	Brasil		
	E8/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	F38/-	<i>M. emarginata</i> , antracnose foliar	Brasil		
	F16/-	<i>M. emarginata</i> , antracnose foliar	Brasil		
	F14/-	<i>M. emarginata</i> , antracnose foliar	Brasil		
	E9/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	E29/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	E57/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	E155/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	E71/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	E32/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	F22/-	<i>M. emarginata</i> , antracnose foliar	Brasil		
	E7/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	E127/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	F27/-	<i>M. emarginata</i> , antracnose foliar	Brasil		
	F35/-	<i>M. emarginata</i> , antracnose foliar	Brasil		
	F15/-	<i>M. emarginata</i> , antracnose foliar	Brasil		
	F19/-	<i>M. emarginata</i> , antracnose foliar	Brasil		
	F100/-	<i>M. emarginata</i> , antracnose foliar	Brasil		
	F8/-	<i>M. emarginata</i> , antracnose foliar	Brasil		
	F43/-	<i>M. emarginata</i> , antracnose foliar	Brasil		
<i>C. musae</i>	CBS 116870*, ICMP 19119	<i>Musa sp.</i>	USA	JX010146	JX010413
	IMI 52264, ICMP 17817	<i>Musa sapientum</i>	Quênia	JX010142	JX010395
<i>C. nupharicola</i>	CBS 470.96*, ICMP 18187	<i>Nuphar lutea</i> subsp. <i>polysepala</i>	USA	JX010187	JX010398
	CBS 472.96, ICMP 17940	<i>Nymphaea odorata</i>	USA	JX010188	JX010399
<i>C. parsonsiae</i>	CBS 128525, ICMP 18590	<i>Parsonsia capsularis</i>	Nova Zelândia	JQ005233	JQ005667
	CGMCC 3.15126	<i>Bletilla ochracea</i>	China	JX625181	JX625210

Continuação Tabela 6.

Espécies	Isolado/Coleção de cultura	Hospedeiro	Local	Nº de acesso <i>GenBank</i>	
				ITS	TUB2
<i>C. siamense</i>	ICMP 18578*, CBS 130417	<i>Coffea arabica</i>	Tailândia	JX010171	JX010404
	CBS 125378, ICMP 18642	<i>Hymenocallis americana</i>	China	JX010278	JX010410
	F45/-	<i>M. emarginata</i> , antracnose foliar	Brasil		
	F48/-	<i>M. emarginata</i> , antracnose foliar	Brasil		
	E76/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		
	E69/-	<i>M. emarginata</i> , endofito foliar	Brasil		
<i>C. theobromicola</i>	CBS 124945, ICMP 18649	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	JX010294	JX010447
	ICMP 17957, MUCL 42294, CBS 124251	<i>Stylosanthes viscosa</i>	Austrália	JX010289	JX010380
	CBS 142.31, ICMP 17927	<i>Fragaria</i> sp.	USA	JX010286	JX010373
	E21/-	<i>M. emarginata</i> , endófito foliar	Brasil		

*Espécime tipo ou ex-tipo.

Fonte: O Autor (2014).

Polimorfismo por marcadores moleculares ISSR – *Inter Simple Sequence Repeats*

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo tampão de reação 1x (Tris-HCl 20 mM pH 8,4; KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 0,25 mM, Taq DNA polimerase 0,04 U, 0,5 µM do iniciador e 25 ng de DNA. Para o iniciador (GACA)₄ a amplificação ocorreu com a seguinte programação: desnaturação inicial a 93°C por 5 minutos (1 ciclo), 93°C por 20 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos (40 ciclos) e extensão final a 72°C por 6 minutos (1 ciclo). Para o iniciador M13, foi utilizada a seguinte programação: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos (1 ciclo), 94°C por 1 minuto, 45°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 30 segundos (35 ciclos) e extensão final a 72°C por 5 minutos (1 ciclo) de acordo com Tiago *et al.* (2011). Os produtos da amplificação foram corados com *GelRed*® e separados por eletroforese em gel de agarose (1,5%), a 3 V/cm de distância entre os eletrodos em tampão de corrida 1X TAE (pH 8,0), e utilizando um marcador de peso molecular 1Kb (Fermentas®). O gel foi visualizado em transluminador de ultravioleta e fotografado utilizando máquina digital.

Os perfis obtidos com os marcadores moleculares foram analisados pelo programa NTSYSpc 2.1 (*Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs*) segundo Rohlf (2000) e introduzidos na forma de variáveis binárias para construção de uma matriz de similaridade,

Nascimento, Tatianne Leite - Diversidade de fungos endofíticos de aceroleira.....72

utilizando o coeficiente de Jaccard. A partir da construção da matriz de similaridade foi gerado um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA.

Resultados

Identificação molecular e filogenética

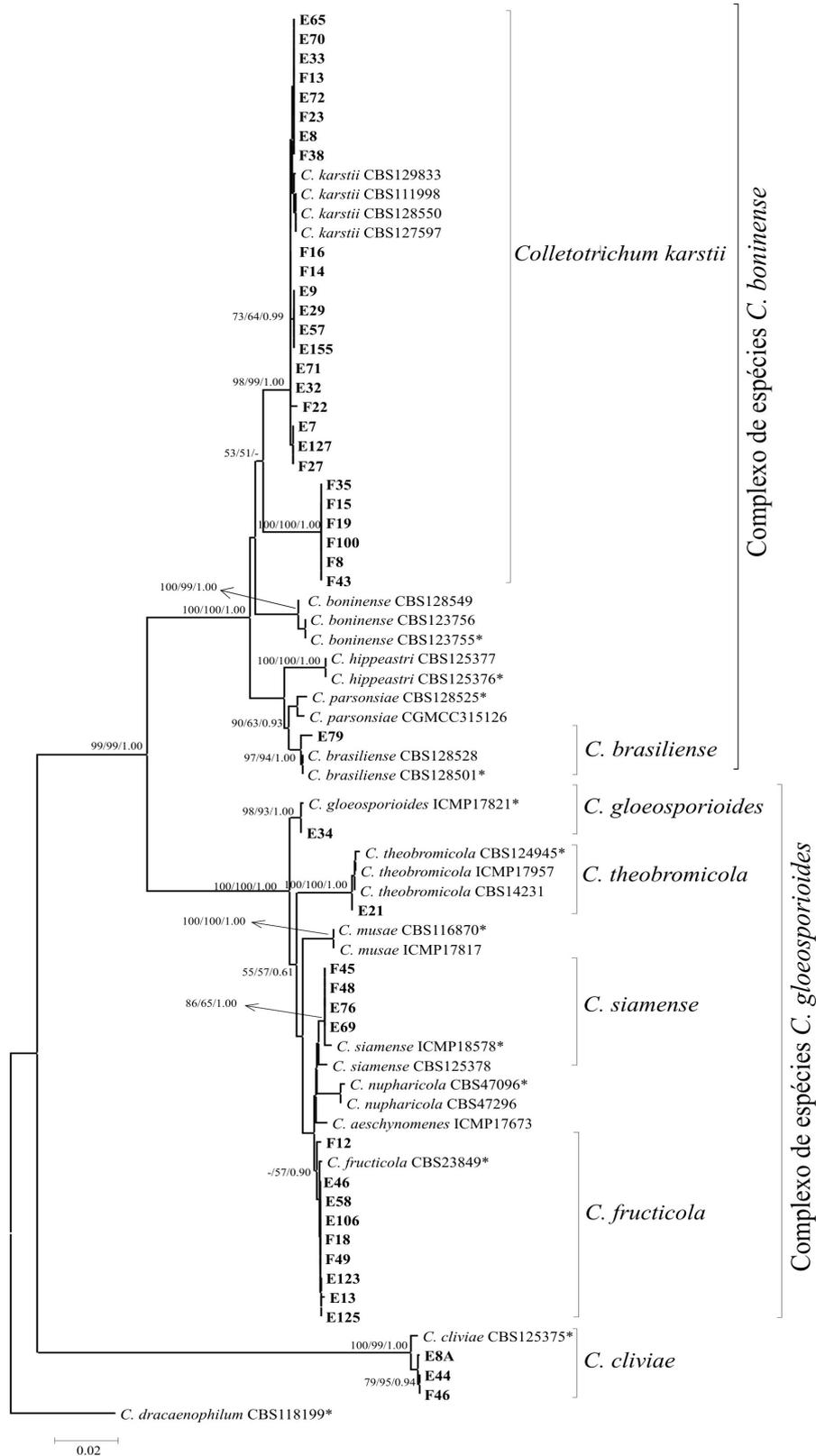
Um total de 45 fungos do gênero *Colletotrichum* foram obtidos de aceroleira (*M. emarginata*), sendo 26 isolados como endófitos (folhas saudáveis) e 19 como fitopatógenos (folhas com lesões).

A reconstrução filogenética realizada com análises de MP, MV e BA para sequências ITS e TUB2 obtidas dos isolados, mostrou basicamente a mesma topologia e, em sua maioria, pouca diferença em valores de *bootstrap*. Os isolados, obtidos como fungos endofíticos e fitopatogênicos de aceroleira, foram agrupados em dois complexos de espécies bem definidos: *C. gloeosporioides* e *C. boninense*, além da espécie *C. cliviae* (Figura 5). Foram formados sete clados que corresponderam às espécies: *C. karstii* e *C. brasiliense* (complexo *C. boninense*), *C. fructicola*, *C. siamense*, *C. gloeosporioides* e *C. theobromicola* (complexo *C. gloeosporioides*) e a espécie *C. cliviae*. Os isolados endofíticos de *Colletotrichum*, foram mais diversos com representantes de todas as espécies resolvidas. Cerca de 68% dos fitopatógenos agruparam-se no clado de *C. karstii*.

No complexo *C. boninense*, o clado *C. karstii* agrupou a maioria dos isolados estudados (26), dentro do qual foram observados dois subagrupamentos principais, ambos com alto suporte estatístico. O primeiro subagrupamento foi formado, principalmente, por isolados endofíticos. Já o segundo, foi composto exclusivamente por fitopatógenos. Ainda no complexo *C. boninense*, o isolado E79 foi o único que se agrupou ao clado de *C. brasiliense* com alto valor de confiança (MP 97; MV 98; BA 1,00).

Dentro do complexo *C. gloeosporioides*, foram formados quatro clados (*C. gloeosporioides*, *C. theobromicola*, *C. siamense* e *C. fructicola*). Agrupamentos com alto suporte estatístico foram verificados para *C. gloeosporioides* sensu stricto (MP 98; MV 93; BA 1,00) e *C. theobromicola* (MP 100; MV 100; BA 1,00), ambos incluíram apenas um isolado cada, sendo estes endofíticos. O grupo de *C. siamense* apresentou baixos valores de *bootstrap* (<50%). No entanto, todos os isolados (F45, F48, E76 e E69) apresentaram-se agrupados com alto suporte estatístico (MP 86; MV 65; BA 1,00) com *C. siamense* ICMP 18578, que é uma sequência de referência para a espécie. Os nove isolados incluídos no grupo de *C. fructicola*, agruparam-se com a sequência de referência (CBS 238.49) com moderado valor de *bootstrap* (MP <50; MV 59; BA 0,9).

Figura 5. Reconstrução filogenética de espécies endofíticas (E) e fitopatógenas (F) do gênero *Colletotrichum* isoladas de aceroleira (*Malpighia emarginata*). A árvore foi construída a partir de sequências concenso ITS e TUB2, através do método de máxima parcimônia (MP) e verossimilhança (MV) com 5000 reamostragens de *bootstrap* pela inferência bayesiana (BA) com 1 milhão de gerações. Os valores acima de 50% são mostrados. *Colletotrichum dracaenophilum* foi utilizado como grupo externo. As culturas desse estudo estão destacadas em negrito e as culturas autênticas e ex-tipo estão com um asterisco.



Fonte: O Autor (2014).

Apenas os isolados E8A, E44 e F46 se agruparam com a sequência de referência de *C. cliviae* CBS 125375 (MP 100; MV 99; BA 1,00).

O iniciador específico para espécies do complexo *C. gloeosporioides* (CgInt/ITS4) foi capaz de separar todos os isolados pertencentes a este complexo, sendo observado um fragmento de DNA de 450 pb. Sendo eficiente, portanto, para separar estes isolados daqueles agrupados no complexo *C. boninense* e na espécie *C. cliviae* em concordância com as análises filogenéticas obtidas.

Crescimento e morfologia

As principais características morfológicas analisadas estão resumidas na Tabela 7. Estes caracteres incluem o IVCN, o tamanho e formato dos conídios, a relação entre comprimento e largura dos conídios, o formato dos apressórios e a aparência da colônia de cada espécie identificada. Algumas destas características podem ser observadas nas Figuras 6 a 12.

Tabela 7. Características morfológicas das espécies de *Colletotrichum* associadas à aceroleira (*Malpighia emarginata*).

Espécies	Conídio				Formato apressório ²	Caracteres da colônia ³	IVCM ⁴ cm/dia
	Formato ¹	Comprimento (C) μm	Largura (L) μm	Relação C/L			
<i>C. karstii</i>	1	13,68 \pm 0,45 (18,9-10,4)	5,7 \pm 0,43 (13,5-5,4)	2,41	1	A	0,74 \pm 0,12 (0,99-0,47)
<i>C. fructicola</i>	2	14,36 \pm 1,99 (19-10,8)	5,3 \pm 0,32 (8,1-2,7)	2,71	2	B	0,88 \pm 0,1 (1,06-0,75)
<i>C. siamense</i>	2	13,63 \pm 0,16 (15,60-13,52)	5,2 \pm 0 (5,2)	2,62	2	C	0,92 \pm 0,13 (1,01-0,83)
<i>C. cliviae</i>	3	16,73 \pm 1,39 (24,3-13,5)	5,34 \pm 0,08 (5,4-2,7)	3,13	2	D	0,97 \pm 0,06 (1,02-0,86)
<i>C. theobromicola</i>	4	14,46 \pm 0,46 (18,2-13)	4,06 \pm 0,66 (5,2-2,6)	3,56	1	E	0,91 \pm 0,01 (0,92-0,90)
<i>C. gloeosporioides</i>	3	14,46 \pm 0,54 (18,9-13,5)	5,72 \pm 0,33 (8,1-5,4)	2,49	1	D	0,97 \pm 0,01 (0,98-0,97)
<i>C. brasiliense</i>	5	13,5 \pm 0,5 (16,2-10,8)	5,72 \pm 0,33 (8,1-5,4)	2,36	Não produziu	F	0,36 \pm 0,03 (0,39-0,34)

¹1- Cilíndrico, subcilíndrico com as extremidades arredondadas, alguns com uma discreta protuberância ou cicatriz 2 - Cilíndrico, subcilíndrico com as extremidades arredondadas, as vezes, com uma extremidade mais afinada; 3 - Cilíndrico com as extremidades arredondadas; 4 - Cilíndrico, subcilíndrico a clavado, as vezes, ligeiramente constricto no centro; 5 - Cilíndrico com as extremidades arredondadas, alguns com uma protuberância ou cicatriz.

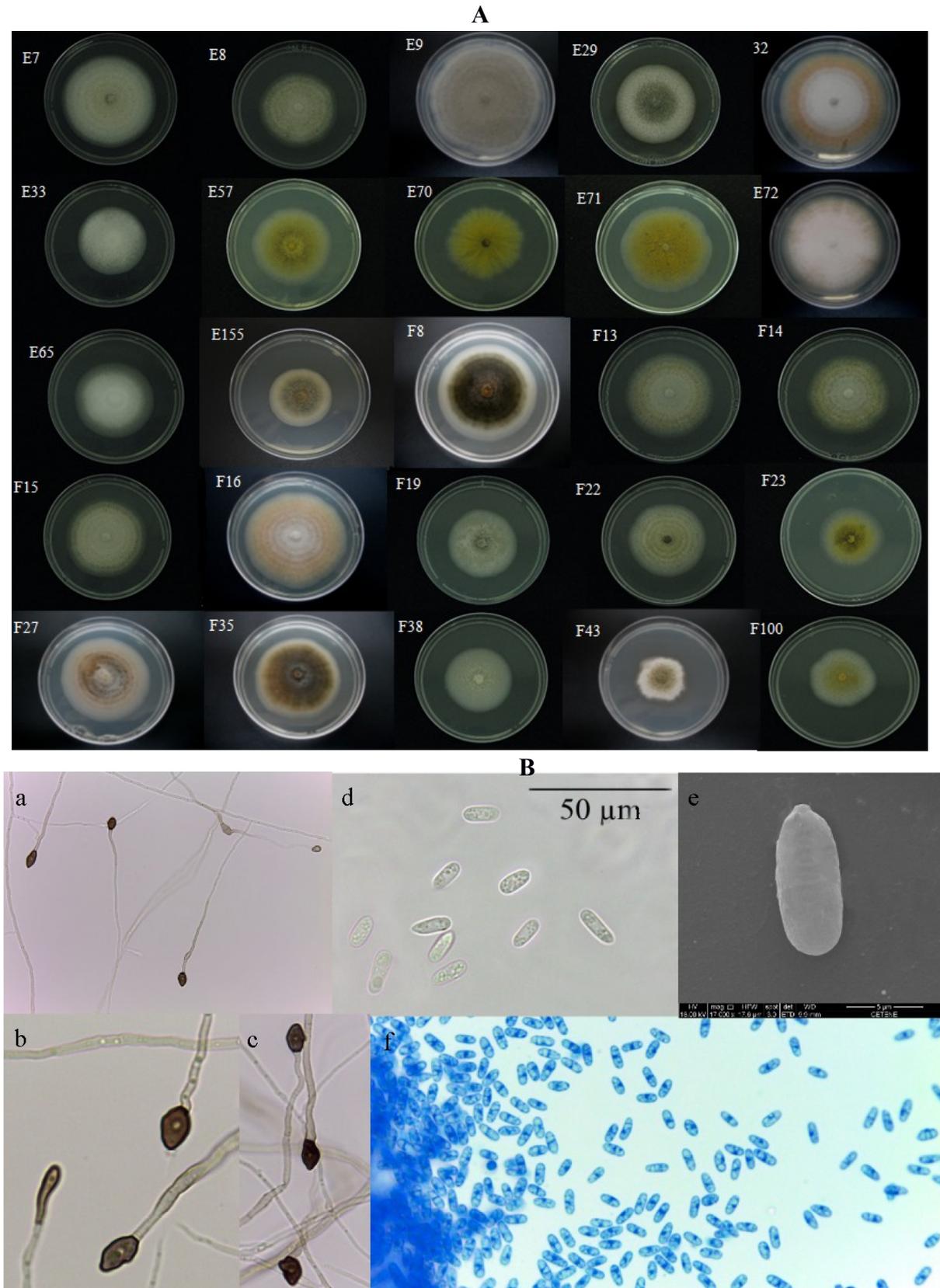
²1 - Ovóide a clavado, liso, fracamente ondulado a ondulado; 2 - Ovóide a clavado, liso a fracamente ondulado.

³A - Cor branca, bege a laranja, cinza ou cinza claro; textura velutínea ou compacta; micélio aéreo abundante ou escasso; anéis de crescimento visíveis em algumas culturas; B - Cor branca, cinza claro a cinza escuro; textura cotonosa a velutínea; micélio aéreo abundante; anéis de crescimento visíveis em algumas culturas; C - Cor branca a cinza claro; textura cotonosa a velutínea; micélio aéreo abundante; D - Cor branca a cinza claro; textura cotonosa a velutínea; micélio aéreo abundante; anéis de crescimento visíveis em algumas culturas; E - Cor cinza claro com borda branca fina; textura cotonosa a velutínea; micélio aéreo abundante; F - Cor branca a laranja; textura compacta; micélio aéreo escasso.

⁴Índice de velocidade de crescimento.

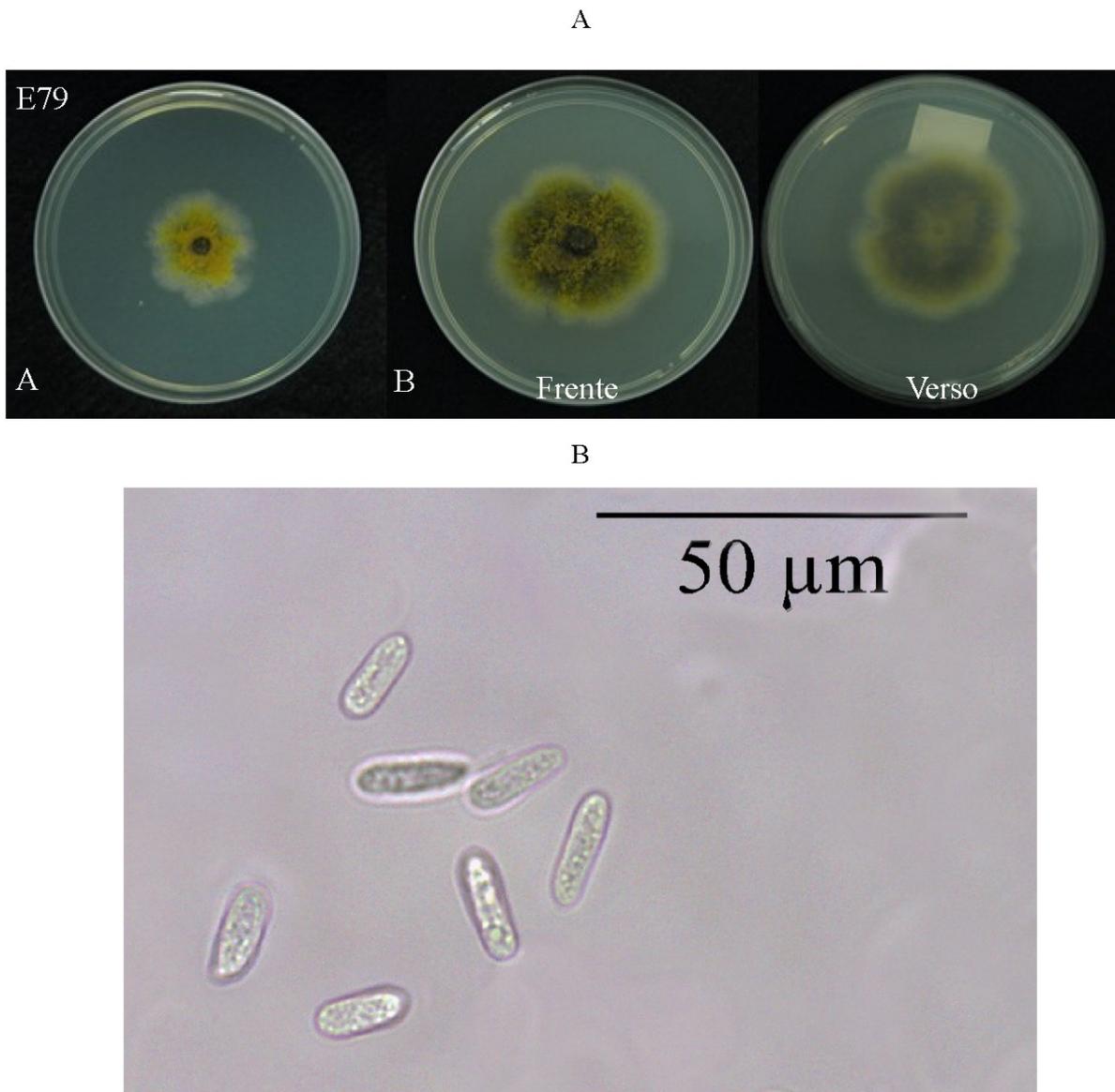
Fonte: O Autor (2014).

Figura 6. Características morfológicas de *Colletotrichum karstii*. A – Aspectos macroscópicos das colônias de diferentes isolados de *C. karstii*, cultivados em meio de cultura BDA (Difco®) e submetidos à temperatura de 20°C sob alternância de 12 horas de luz fluorescente/12 horas de escuro, durante sete dias. B – Estruturas microscópicas: a, b, c – apressórios; d – conídios em ácido láctico, e – conídios em microscopia eletrônica de varredura, f – conídios corados em Azul de Amam.



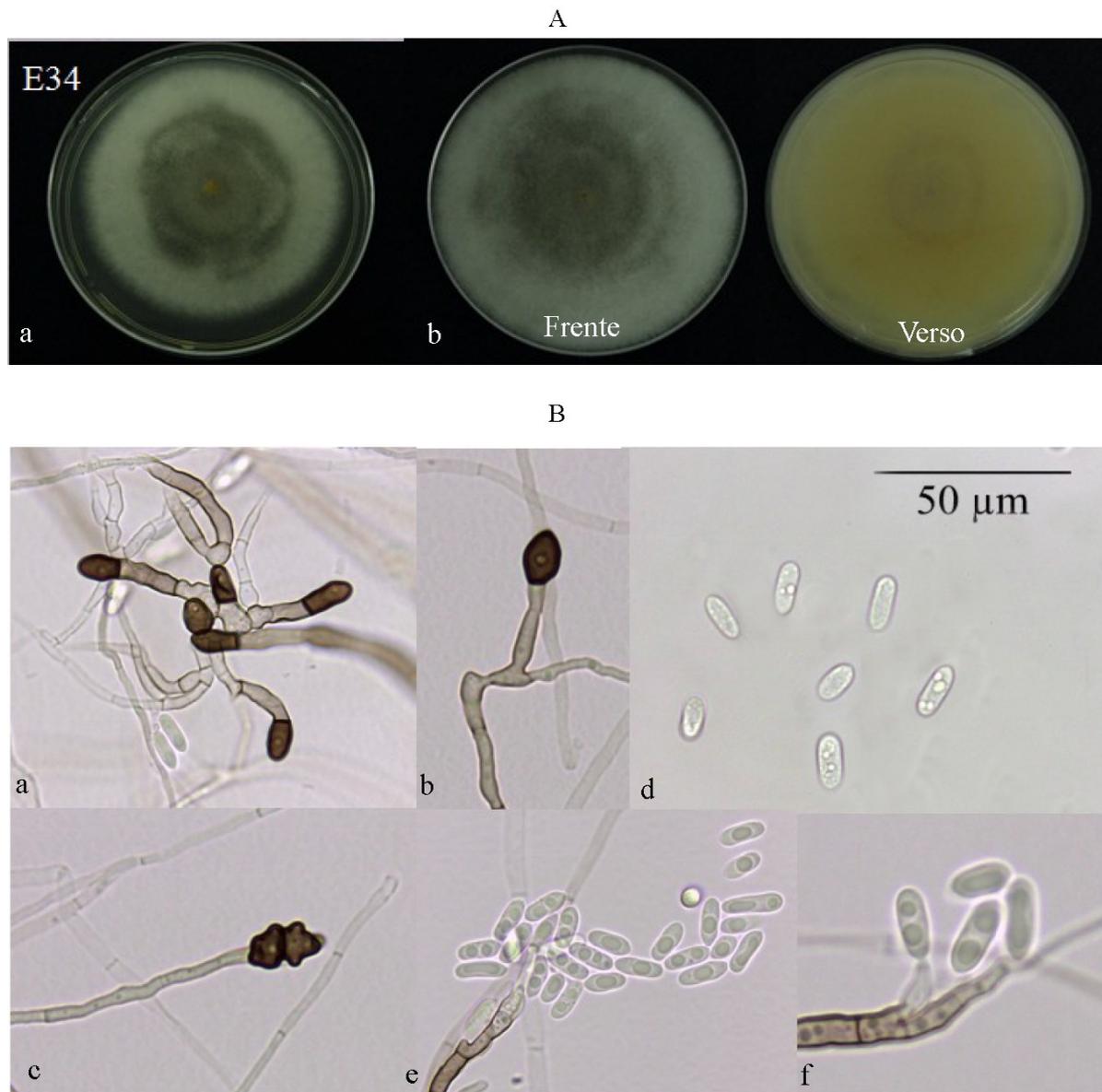
Fonte: O Autor (2014).

Figura 7. Características morfológicas de *Colletotrichum brasiliense* (E79). A – Aspectos macroscópicos da colônia em: a - sete dias e b – 10 dias de cultivo em meio de cultura BDA (Difco®), à temperatura de 20°C sob alternância de 12 horas de luz fluorescente/12 horas de escuro. B – Conídio em ácido láctico.



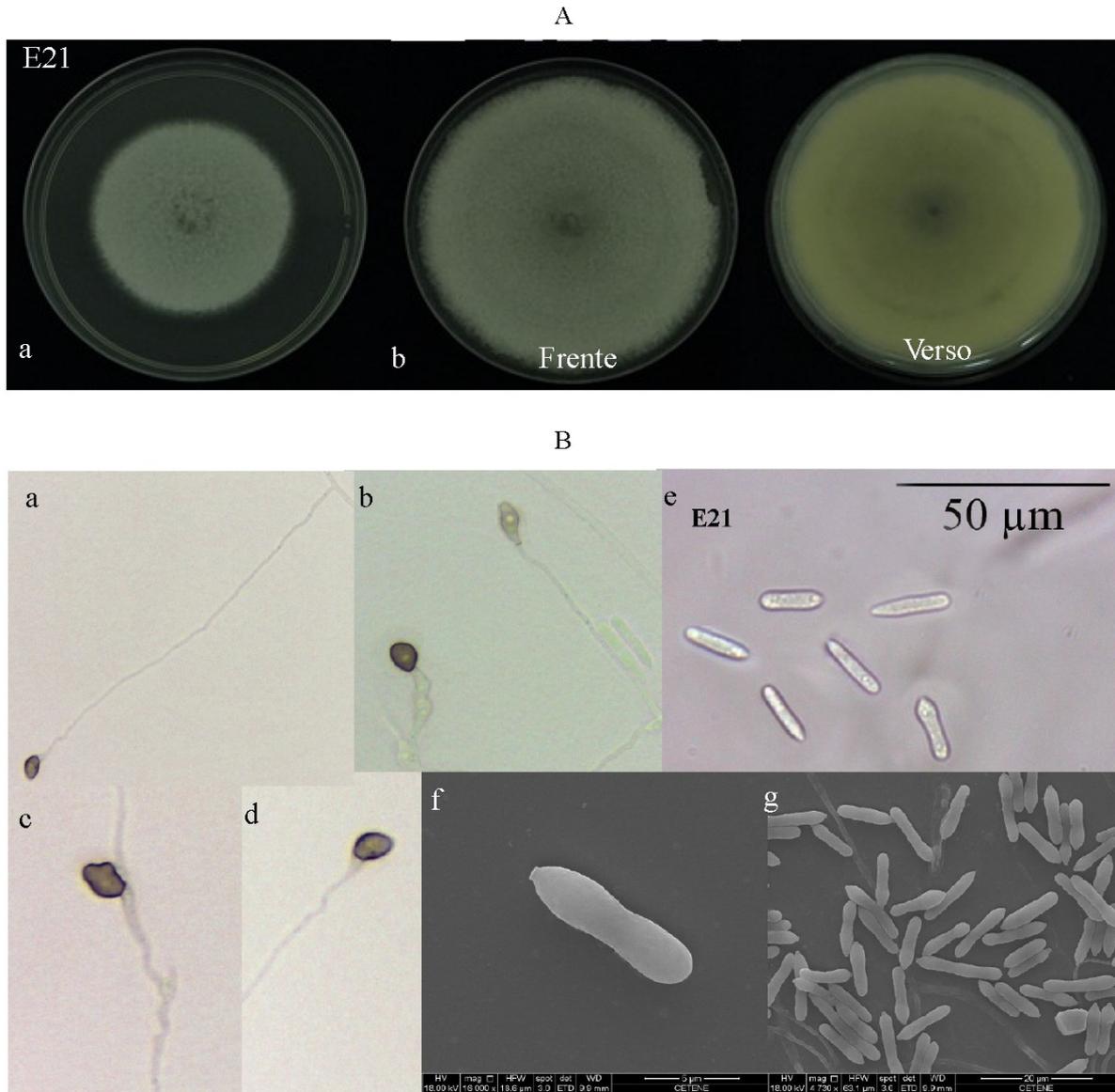
Fonte: O Autor (2014).

Figura 8. Características morfológicas de *Colletotrichum gloeosporioides* (E34). A – Aspectos macroscópicos da colônia em: a - sete dias e b – 10 dias de cultivo em meio de cultura BDA (Difco®), à temperatura de 20°C sob alternância de 12 horas de luz fluorescente/12 horas de escuro. B – Estruturas microscópicas: a, b, c – apressórios; d – esporos em ácido láctico, e, f – conídio e conidióforo em ácido láctico.



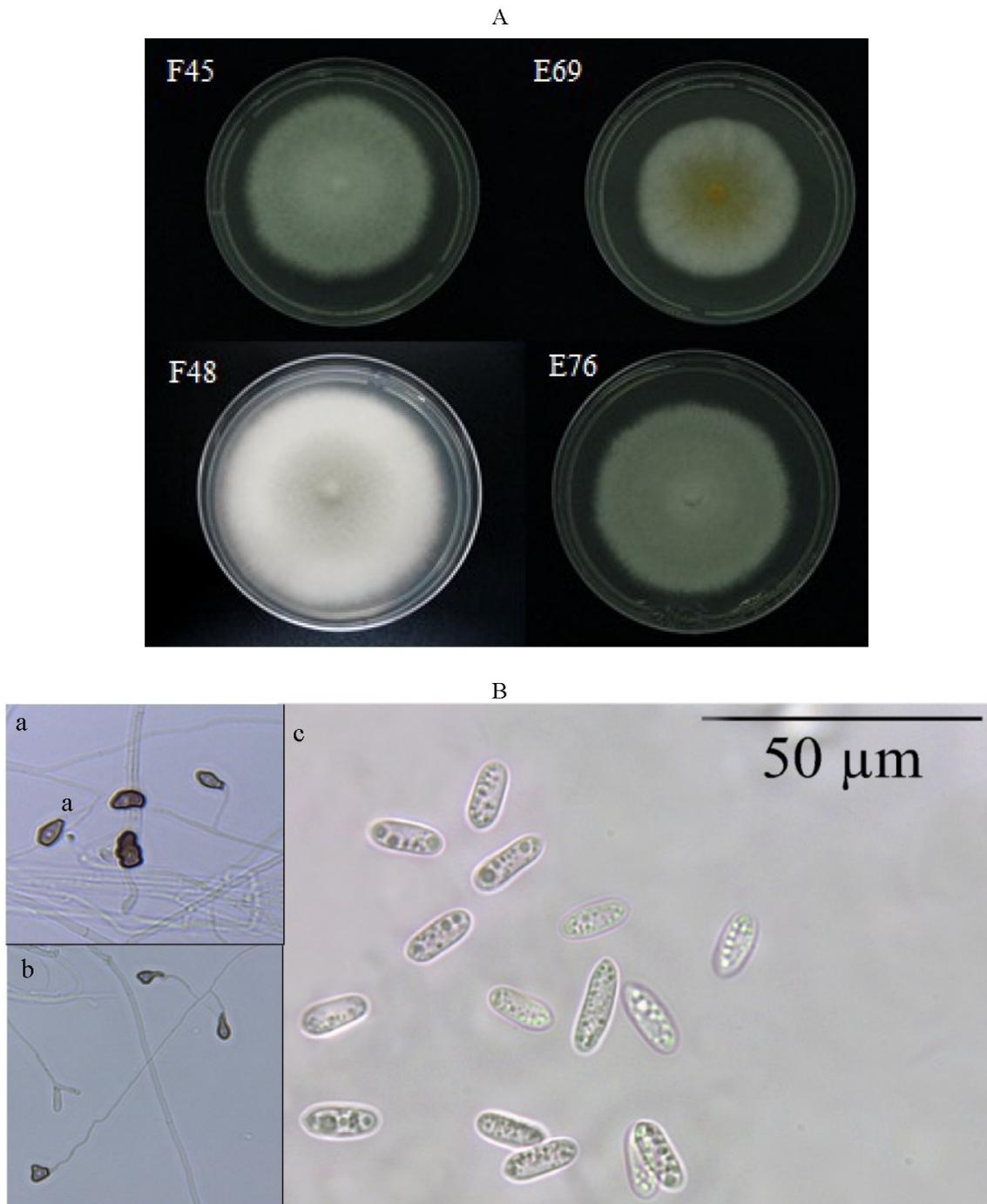
Fonte: O Autor (2014).

Figura 9. Características morfológicas de *Colletotrichum theobomicola*. A – Aspectos macroscópicos da colônia do isolado E21 em: a - sete dias e b – 10 dias de cultivo em meio de cultura BDA (Difco®), à temperatura de 20°C sob alternância de 12 horas de luz fluorescente/12 horas de escuro. B – Estruturas microscópicas de diferentes isolados: a, b, c, d – apressórios; e – conídios em ácido láctico, f, g – conídio em microscopia eletrônica de varredura.



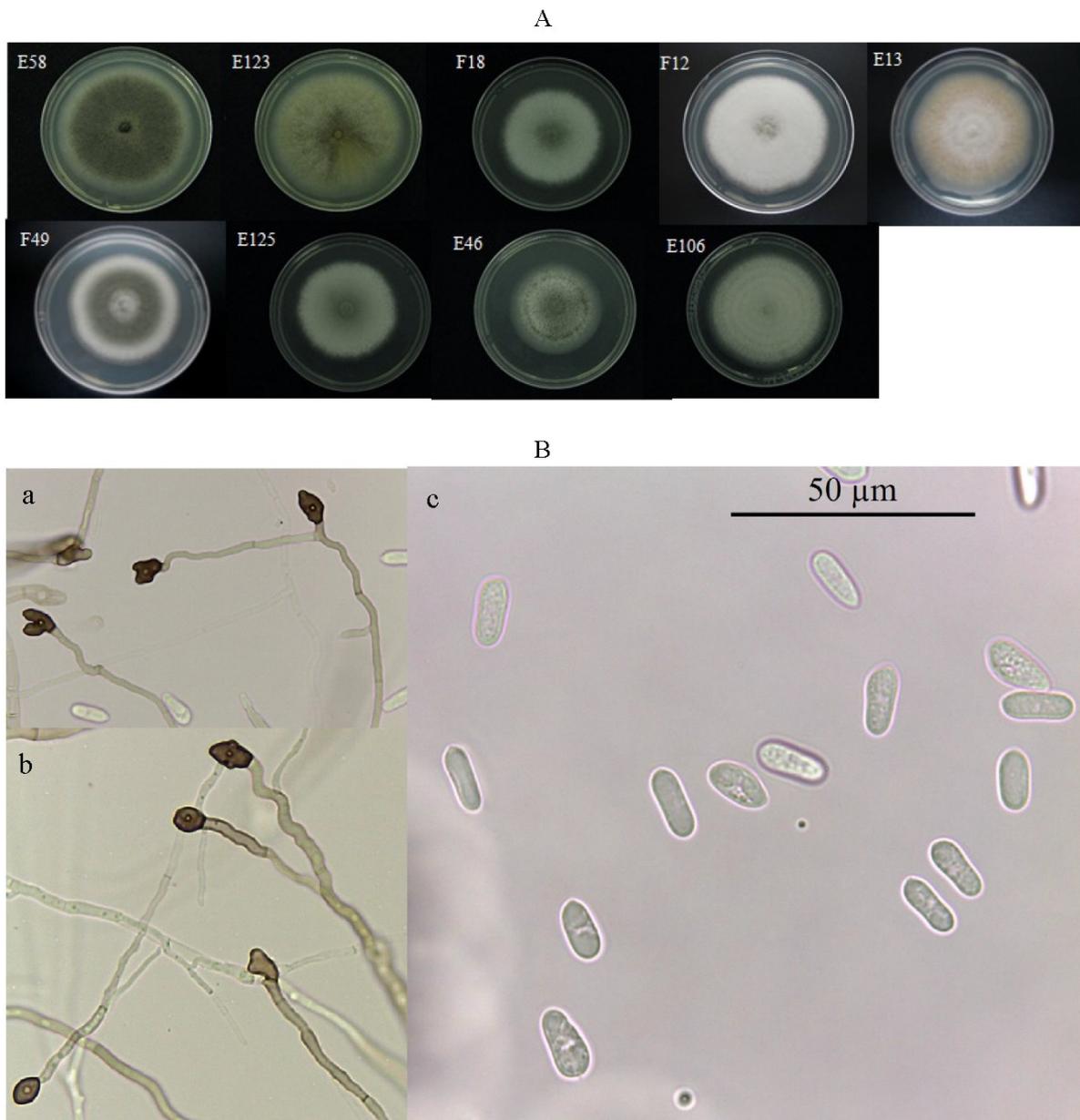
Fonte: O Autor (2014).

Figura 10. Características morfológicas de *Colletotrichum siamemse*. A – Aspectos macroscópicos das colônias de diferentes isolados de *C. siamemse*, cultivados em meio de cultura BDA (Difco®) e submetidos à temperatura de 20°C sob alternância de 12 horas de luz fluorescente/12 horas de escuro, durante sete dias. B – Estruturas microscópicas: a, b – apressórios, c - conídios em ácido láctico.



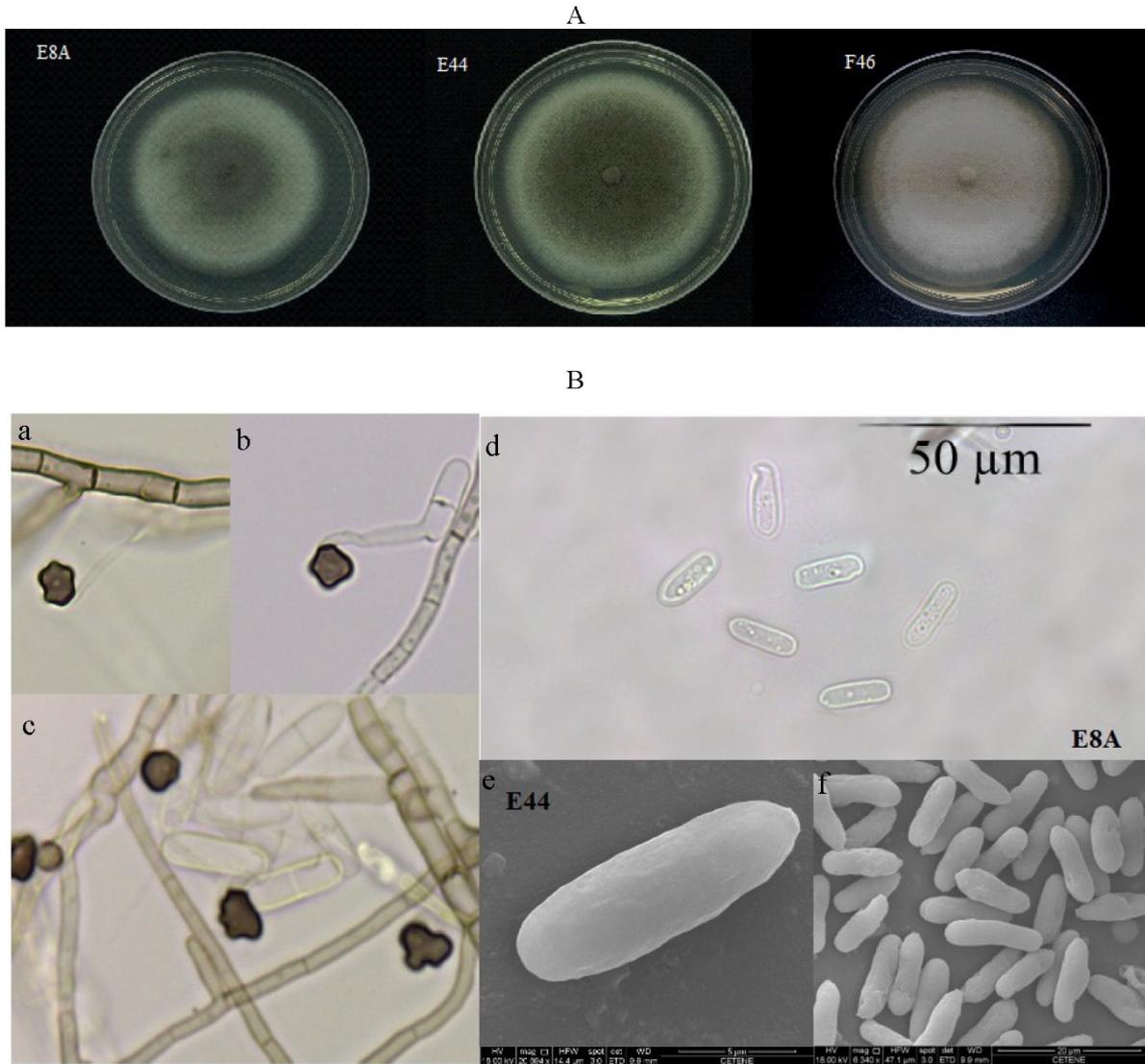
Fonte: O Autor (2014).

Figura 11. Características morfológicas de *Colletotrichum fructicola*. A – Aspectos macroscópicos das colônias de diferentes isolados de *C. fructicola*, cultivados em meio de cultura BDA (Difco®) e submetidos à temperatura de 20°C sob alternância de 12 horas de luz fluorescente/12 horas de escuro, durante sete dias. B – Estruturas microscópicas: a, b – apressórios, c - conídios em ácido láctico.



Fonte: O Autor (2014).

Figura 12. Características morfológicas de *Colletotrichum cliviae*. A – Aspectos macroscópicos das colônias de diferentes isolados de *C. cliviae*, cultivados em meio de cultura BDA (Difco®) e submetidos à temperatura de 20°C sob alternância de 12 horas de luz fluorescente/12 horas de escuro, durante sete dias. B – Estruturas microscópicas: a, b, c – apressórios; d – conídios em ácido láctico, e, f – conídios em microscopia eletrônica de varredura.



Fonte: O Autor (2014).

Os membros do complexo de espécies *C. gloeosporioides* e a espécie *C. cliviae*, apresentaram os maiores IVC (0,88-0,97 cm/dia). Já *C. karstii* e *C. brasiliense*, membros do complexo *C. boninense*, apresentaram os menores IVC. Para o isolado de *C. brasiliense* o lento crescimento (0,36 cm/dia), nas condições ensaiadas, foi uma das características que o diferenciou dos demais isolados (Tabela 7; Figura 7).

Todos os isolados produziram, em geral, conídios retos, cilíndricos a subcilíndricos com as extremidades arredondadas (Figuras 6-12). Verificou-se ainda uma sobreposição considerável nas medidas dos conídios (comprimento e largura) da maioria dos isolados de *Colletotrichum* estudados. No entanto, as espécies do complexo *C. boninense*, se diferenciaram das demais por

apresentarem um tipo de protuberância ou cicatriz em uma das extremidades do conídio, sendo estes relativamente mais curtos e largos, ou seja, com os menores valores da relação comprimento/largura (C/L) que nas demais espécies do presente estudo (Figura 6). Estas características são muito sutis e exigem perícia do taxonomista. Entre as espécies do complexo *C. gloeosporioides*, a que mais se diferenciou, quanto ao formato e tamanho dos conídios, foi *C. theobromicola*, que em sua maioria apresentou conídios longos e estreitos (C/L = 3, 56), subcilíndricos, sendo alguns clavados (Figura 9).

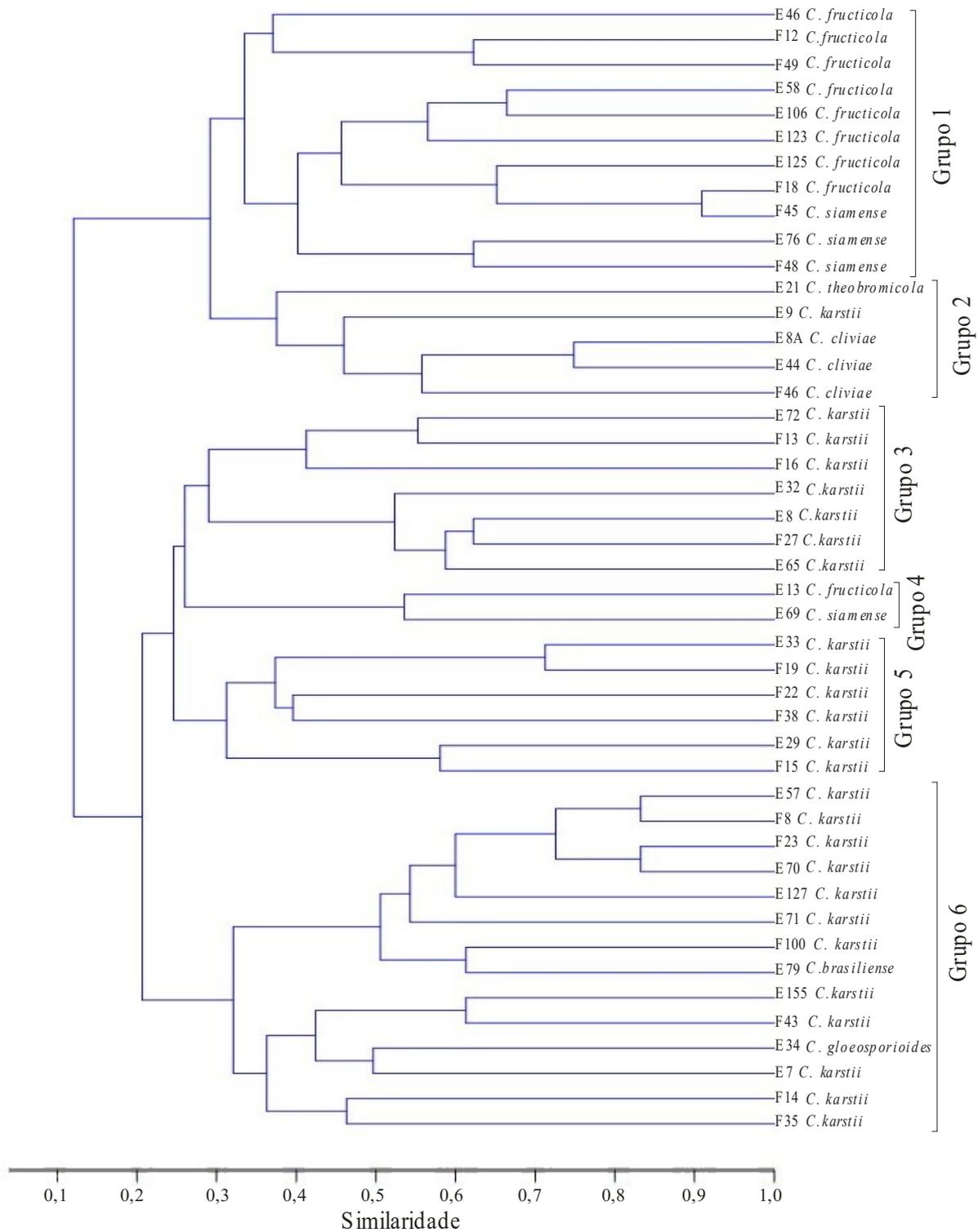
Pelo menos um isolado de cada espécie identificada produziu apressórios, com exceção do isolado da espécie *C. brasiliense*. Em geral, os apressórios apresentaram-se ovoides a clavados, com superfície lisa ou fracamente ondulada.

As características das colônias como coloração (verso e reverso), produção de esporos, presença de anéis de crescimento e textura, foram muito variáveis entre os isolados, inclusive dentro de uma mesma espécie (intraespecífica), dificultando o agrupamento entre eles. Não foi possível fazer correlações seguras entre cor da colônia e a espécie identificada. Os fungos agrupados dentro de *C. karstii* apresentaram as maiores variações nas características da colônia (Figura 6-A).

O dendrograma de similaridade fenotípica construído a partir das características morfológicas, microscópicas e macroscópicas, da colônia evidenciou a formação de seis grupos (Figura 13). No grupo 1, foram agrupados a maioria dos isolados identificados como *C. fructicola* e dos isolados de *C. siamense* (E76, F45 e F48). Apenas *C. fructicola* E13 e *C. siamense* E69 agruparam-se e formaram o grupo 4. No geral, os isolados de *C. fructicola* e *C. siamense* apresentaram várias características em comum como textura e abundância do micélio aéreo, tipo de apressório, além do IVCM, forma e tamanho de conídios similares. O grupo 2 foi formado por representantes de três diferentes espécies (*C. theobromicola*, *C. karstii* e *C. cliviae*). No entanto, os representantes de *C. cliviae* apresentaram conídios mais longos que os demais isolados e formaram um subgrupo a parte com cerca de 65 e 75% de similaridade morfológica. Os isolados de *C. karstii*, ficaram distribuídos entre os demais grupos (3, 5 e 6) que apresentaram baixa similaridade entre si, refletindo a alta variabilidade fenotípica expressa pelos isolados identificados nesta espécie. O grupo 6 foi composto por isolados de *C. karstii*, *C. brasiliense* e *C. gloeosporioides*. Entre outras características em comum, os isolados deste grupo apresentaram valores próximos da relação C/L dos conídios, sendo que o isolado de *C. brasiliense* apresentou IVCM semelhante a alguns isolados de *C. karstii*.

No geral, houve baixa similaridade entre os isolados, mesmo entre subgrupos próximos. Não houve uma separação clara entre os fungos com relação ao hábito ecológico (endófitos e fitopatógenos).

Figura 13. Dendrograma de similaridade fenotípica de espécies de *Colletotrichum* endófitas (E) e fitopatógenas (F) de aceroleira, com base no índice de velocidade de crescimento e características morfológicas. Foi utilizado o coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA.



Fonte: O Autor (2014).

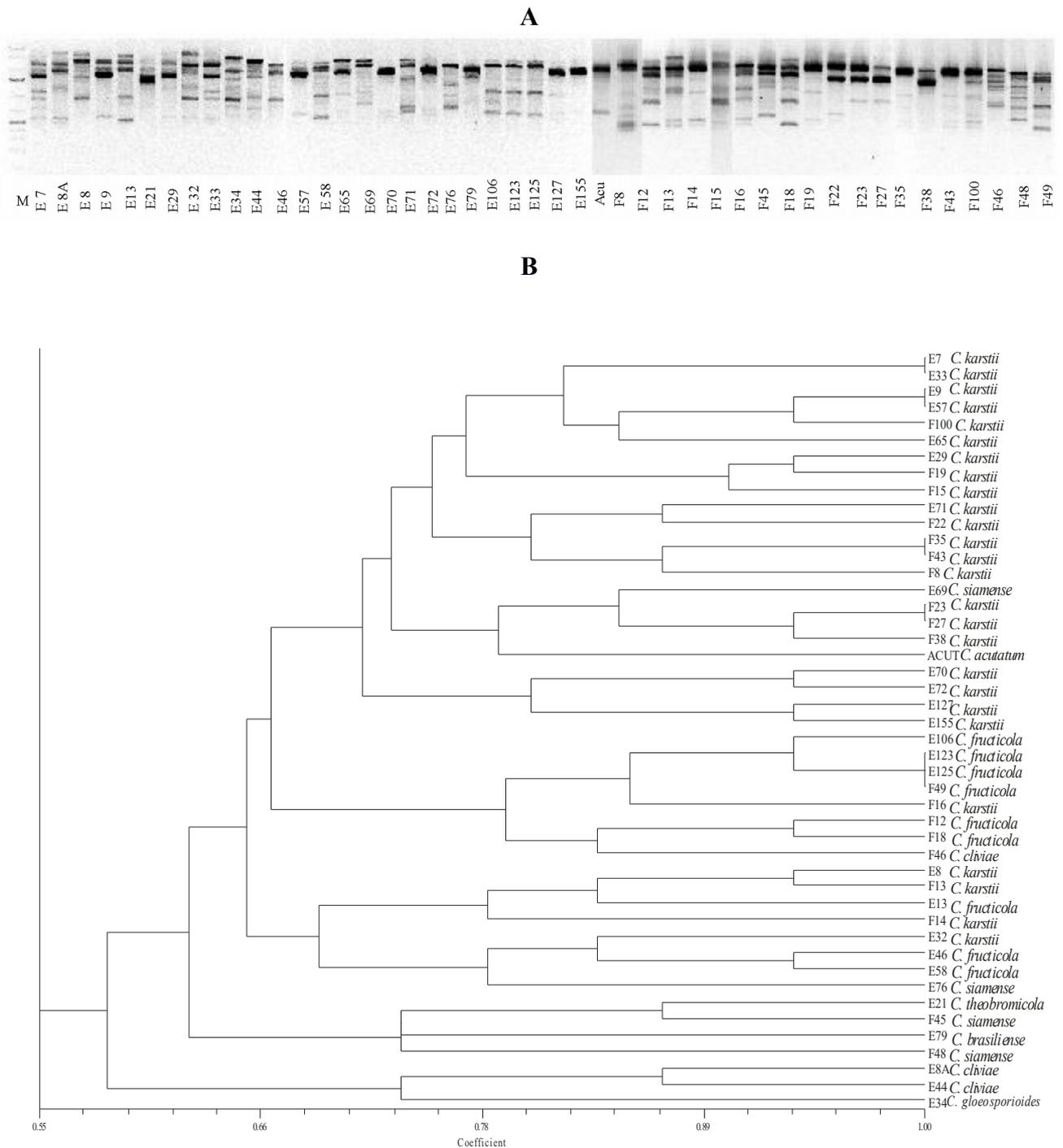
Marcadores moleculares ISSR

Os iniciadores ISSR (GACA)₄ e M13 evidenciaram diferenças intra e interespecíficas entre os isolados e amplificaram fragmentos de tamanhos que variaram em 250-1500pb e 500-4000pb, respectivamente (Figuras 14 e 15). Os marcadores não separaram os isolados pelo seu hábito ecológico, sendo verificada a formação de grupos mistos compostos por isolados fitopatogênicos e endofíticos com 100% de similaridade. o entanto, para o marcador (GACA)₄ (Figura 14), grande parte dos isolados foram separados de acordo com a espécie ou complexo de espécies. Três grandes grupos foram evidenciados. No grupo 1 agruparam-se todos os isolados da espécie *C. karstii* com cerca de 75% de similaridade de tamanho de fragmentos. Dentro deste grupo foram formados cinco subagrupamentos com 100% de similaridade de tamanho de fragmentos e outros cinco com aproximadamente 95%, demonstrando relacionamento estreito. O grupo 2 incluiu os isolados do complexo de espécies *C. gloeosporioides* (*C. fructicola*, *C. siamense* e *C. theobromicola*) e as espécies *C. acutatum* (utilizado como grupo externo) e *C. brasiliense* com cerca de 75% de similaridade de tamanho de fragmentos. Todos os isolados de *C. fructicola* agruparam-se com alta similaridade, sendo um subgrupo formado com aproximadamente 93% a 100% similaridade e outro, com os isolados F12 e F18, que se relaciona com a anterior com cerca de 88% de similaridade. O grupo 3, foi composto pelos três isolados representantes da espécie *C. cliviae* com aproximadamente 91% de similaridade de tamanho de fragmentos (Figura 14).

O iniciador M13 evidenciou maior variabilidade intraespecífica (Figura 15). Foram formados cinco grupos com 100% de similaridade cada. Destes grupos, apenas um apresentou fitopatogênicos e endófitos juntos (E123, E125 e F49), mas todos os isolados são da espécie *C. fructicola*. Não houve separação total entre espécies ou complexos de espécies, mas um grande grupo composto em sua maioria, pela espécie *C. karstii* foi formado com cerca de 72% de similaridade de tamanho de fragmentos.

Não foram observados grupos coincidentes entre os dendrogramas gerados pelos marcadores (GACA)₄ e M13, porém os isolados E8A e E44 da espécie *C. cliviae* mantiveram nas duas análises baixo relacionamento com os demais isolados.

Figura 15. A - Perfil de amplificação de fragmentos de DNA com o iniciador M13. Na pista M, marcador de peso molecular 1Kb. Nas pistas E7-F49, estão representados isolados de diferentes espécies de *Colletotrichum*, para mais detalhes na identificação ver tabela 1. **B** - Dendrograma de similaridade de tamanho de fragmentos de DNA obtidos pela amplificação com o iniciador M13 de isolados de *Colletotrichum* spp. endofíticos (E) e fitopatogênicos (F) de *Malpighia emarginata*.



Fonte: O Autor (2014).

Discussão

O gênero *Colletotrichum* é comumente encontrado associado às numerosas espécies de plantas, sendo isolado, principalmente, como patógeno, mas também é comumente encontrado como endófito (Lima *et al.* 2012; Rojas *et al.*, 2010; Siqueira *et al.*, 2011; Álvarez *et al.* 2014).

Estudos recentes sobre antracnose em plantas frutíferas tropicais, revelaram que além de várias espécies dentro do complexo *C. gloeosporioides* (*C. gloeosporioides*, *C. fructicola*, *C. siamense*, *C. theobromicola*, *C. tropicale* etc.), espécies do complexo *C. boninense* (*C. boninense*, *C. fragariae* e *C. karstii*) também estão comumente associadas a esta doença (Huang *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2013; Udayanga *et al.*, 2013; Álvarez *et al.*, 2014; Kamei *et al.*, 2014). A antracnose em aceroleiras está associada a espécie *C. gloeosporioides* (Almeida *et al.*, 2003; Mendes *et al.* 2012). Entretanto, neste estudo as espécies *C. karstii*, *C. fructicola*, *C. siamense* e *C. cliviae* estão sendo relatadas pela primeira vez como agentes de antracnose nesta cultura.

De acordo com os resultados obtidos, a aceroleira abriga uma alta riqueza de espécies de *Colletotrichum*, principalmente considerando os isolados endofíticos. Espécies do gênero *Colletotrichum* são comumente obtidas como endófitas de uma série de espécies de plantas, sendo a espécie *C. gloeosporioides* a mais citada (Huang *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011; Siqueira *et al.*, 2011; Déon *et al.*, 2012). No entanto, trabalhos cuja abordagem filogenética foi adotada para identificação de isolados desse grupo, indicam que algumas das espécies aqui estudadas, tais como *C. fructicola*, *C. siamense* e *C. karstii* podem ser isoladas como endófitas de plantas frutíferas (Rojas *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2013; Udayanga *et al.*, 2013).

Algumas espécies dentro do gênero *Colletotrichum* estão estreitamente relacionadas (morfológica e filogeneticamente) e são agrupadas em complexos (Sutton, 1980; Damm *et al.*, 2010). Nesse sentido as análises moleculares são necessárias para a identificação precisa das espécies de *Colletotrichum*. Neste estudo, a análise filogenética a partir do consenso entre as sequências das regiões, ITS e TUB2, associada às análises micro e macro-morfológicas das colônias, resolveram de forma satisfatória a identificação dos isolados. Na reconstrução filogenética, os clados de *C. karstii*, *C. fructicola* e *C. siamense* apresentaram de baixo a mediano suporte estatístico, mas as demais análises realizadas (morfológica e ISSR) confirmaram estes agrupamentos.

Colletotrichum karstii foi a espécie mais frequente em aceroleira tanto entre fitopatógenos quanto entre endófitos. Na descrição original da espécie os isolados também foram obtidos tanto de tecidos saudáveis quanto de tecidos doentes de orquídeas na China (Yang *et al.*, 2011). A espécie *C. karstii* ocorre em muitas plantas hospedeiras e, apesar da recente descrição, estudos mostram que

esta é a espécie mais comum e geograficamente diversa no complexo *C. boninense* (Damm *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013; Alvarez *et al.*, 2014). Na reconstrução filogenética realizada, neste trabalho, os isolados de *C. karstii*, foram agrupados em dois subgrupos principais, ambos com alto suporte estatístico, refletindo a alta variabilidade genética da espécie (Damm *et al.*, 2012). A formação de subclados com bom valor de *bootstrap* em *C. karstii*, também foi verificada por Sharma e Shenoy (2013). Estes autores sugerem que *C. karstii* represente um complexo de espécies devido à alta variabilidade intraespecífica encontrada, no entanto, isto ainda não foi validado.

Ainda no complexo *C. boninense*, o endófito E79 foi o único que se agrupou ao clado de *C. brasiliense* com alto valor de confiança. Essa espécie foi recentemente descrita e é conhecida como responsável por antracnose em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* no Brasil (Damm *et al.*, 2012). Conforme descrito na literatura, verificou-se que *C. brasiliense* está estreitamente relacionada com *C. parsonsiae* e *C. hippeastri*, no entanto pôde ser diferenciada destas pela análise das regiões ITS e TUB2 realizadas neste estudo. De acordo com Damm *et al.* (2012) estas espécies podem ser diferenciadas pelo sequenciamento da maioria dos genes.

Foi verificado que o maior número de espécies de *Colletorichum* de aceroleira pertence ao complexo *C. gloeosporioides*, sendo estas: *C. gloeosporioides* sensu stricto, *C. theobromicola*, *C. fructicola* e *C. siamense*. Este complexo é conhecido por conter o maior número de táxons com significativa diversidade biológica, morfológica e genética (Hyde *et al.*, 2009b; Damm *et al.*, 2010). Os grupos de *C. gloeosporioides* sensu stricto e *C. theobromicola* foram suportados com altos valores de *bootstrap*. De acordo com Weir *et al.* (2012) estas espécies podem ser distinguidas de todas as outras com a análise da região ITS do rDNA, que pode funcionar como “código de barra” para estas espécies. *Colletorichum theobromicola* pode ser encontrado em uma grande gama de hospedeiros em muitas partes do mundo, principalmente como patógeno de plantas (Weir *et al.*, 2012; Álvarez *et al.*, 2014). Já *C. gloeosporioides* sensu stricto é comumente isolada de *Citrus* e alguns outros hospedeiros (Weir *et al.*, 2012; Huang *et al.* 2013; Udayanga *et al.*, 2013). No clado de *C. siamense*, os isolados F45, F48, E76 e E69 apresentaram-se agrupados com alto suporte estatístico com uma das sequências referência para a espécie (ICMP 18578), no entanto, isso não ocorreu com a sequência CBS 125378. Esta última sequência refere-se a espécie *C. hymenocallidis* sinonimizada em *C. siamense* por Weir *et al.* (2012). Este grupo é diverso geneticamente, e foi reconhecido por Udayanga *et al.* (2013) como um complexo de espécies. Estes autores afirmam que as espécies *C. hymenocallidis*, *C. jasmini-sambac*, ambas sinonimizadas como *C. siamense*, e a espécie *C. siamense* sensu stricto podem ser considerados como espécies que divergiram recentemente e por isso não formam grupos monofiléticos fortes. De acordo Weir *et al.* (2012), apesar da região ITS rDNA não separar *C. siamense* de *C. alienum*, *C. fructicola* ou *C. tropicale*,

estas espécies são bem separadas utilizando o gene β -tubulina (TUB2), que foi utilizada neste estudo. O agrupamento de *C. fructicola* não apresentou alto valor de *bootstrap*. A região TUB2 não foi capaz de separar *C. fructicola* de todas as outras espécies, apesar de ser efetivo na distinção de várias espécies do complexo (Weir *et al.*, 2012). Provavelmente para este grupo uma análise multigênica deverá ser necessária para aumentar o valor de confiança desse agrupamento. *Colletotrichum siamense* e *C. fructicola* são comuns em frutos cultivados em regiões tropicais e subtropicais e foram isolados como patógenos e endófitos em café na Tailândia (Prihastuti *et al.*, 2009).

O grupo da espécie *C. cliviae* foi formado com alto valor de confiança. Esta espécie é pouco conhecida e ocupa uma posição basal na árvore filogenética multigênica ou da região ITS rDNA. *Colletotrichum cliviae* foi isolada de *Clivia miniata* Regel (Amaryllidaceae) na China, e parece constituir uma linhagem monofilética que não está incluída em nenhum dos complexos de espécies de *Colletotrichum* (Yang *et al.*, 2009; Cannon *et al.*, 2012).

O iniciador específico para espécies do complexo *C. gloeosporioides* (CgInt/ITS4) foi eficiente para separar os isolados pertencentes a este complexo dos demais táxons identificados neste estudo. Este fato também foi observado por outros autores, os quais isolaram *Colletotrichum* de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi.; Lima *et al.*, 2012) e graviola (*Annona muricata* L.; Alvarez *et al.*, 2014).

As espécies de *Colletotrichum* identificados neste estudo mostraram características culturais e morfológicas semelhantes às descritas em estudos anteriores (Yang *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011; Damm *et al.*, 2012; Weir *et al.* 2012; Álvarez *et al.*, 2014; Kamei *et al.*, 2014). A morfologia da colônia e IVCN foram diversos e em alguns casos não foram condizentes com os descritos por outros autores. Divergências na aparência macroscópica das culturas dentro da mesma espécie provavelmente, ocorrem por diversos fatores como meio de cultura utilizado, condições de armazenamento, repicagens sucessivas e incubação (temperatura, intensidade de luz e fotoperíodo) (Weir *et al.*, 2012; Álvarez *et al.*, 2014).

No dendrograma de similaridade fenotípica, os grupos 1 e 4 compostos pelas espécies *C. fructicola* e *C. siamense*, apresentaram características similares como tamanho e forma de conídio, cor da colônia, formato de apressório e IVCN. Em acordo com a literatura (Prihastuti *et al.*, 2009), foi verificado que o comprimento médio do conídio de *C. fructicola* (14,36 μ m) foi maior que de *C. siamense* (13,63 μ m), no entanto, os valores foram muito próximos. E apesar de na descrição original, a espécie *C. fructicola* apresentar, em sua maioria, conídios cilíndricos com as extremidades arredondadas (Prihastuti *et al.*, 2009), foi verificado que alguns isolados aqui estudados apresentaram conídios subcilíndricos com uma das extremidades mais afinada

(subfusiforme), que condiz com a descrição de *C. ignotum* (Rojas *et al.*, 2010), espécie sinonimizado como *C. fructicola* (Weir *et al.*, 2012). Conídios cilíndricos a subcilíndricos com uma das extremidades mais afinada (subfusiforme), também são encontrados em *C. siamense* (Prihastuti *et al.*, 2009). Os isolados *C. fructicola* E18 e *C. siamense* E45, apresentaram alta similaridade fenotípica (cerca de 90%), pois foram categorizados nas mesmas faixas de cor de reverso de colônia, tamanho de conídio e IVCN.

O grupo 2 foi composto por três diferentes espécies, mas apesar de estarem no mesmo grupo apresentaram baixa similaridade entre si. A principal característica dos isolados desse grupo foi alta relação C/L. De acordo com Yang *et al.* (2009), para *C. cliviae* a largura do conídio está entre as características que diferenciam *C. cliviae* de outras espécies próximas (*C. boninense*, *C. crassipes* e *C. Orbiculare*).

Os grupos 3, 5 e 6 foram compostos, no geral, apenas por *C. karstii* demonstrando a alta variabilidade fenotípica dos isolados estudados. De acordo com Damm *et al.* (2012), essa espécie apresenta alta variabilidade genética e morfológica, com diferenças inclusive no tamanho dos conídios. *Colletotrichum gloeosporioides* sensu stricto ficou no grupo 6, junto com *C. karstii* e *C. brasiliense*. De acordo com Damm *et al.* (2012), *C. gloeosporioides*, *C. karstii* e *C. boninense* sensu stricto podem apresentar características morfológicas em comum, por exemplo, o tamanho e a forma do conídio entre estas espécies é bem semelhante, diferindo ligeiramente na relação C/L e na presença de uma cicatriz saliente na base do conídio. Apesar dessas diferenças, isolados de *C. boninense* foram identificados anteriormente como *C. gloeosporioides* (Damm *et al.*, 2012).

Ambos os marcadores moleculares utilizados [(GACA)₄ e M13] evidenciaram alto polimorfismo intra e interespecífico entre os isolados de aceroleira. Outros estudos confirmaram que marcadores ISSR são úteis para o estudo da diversidade genética em espécies de *Colletotrichum* (Lu *et al.*, 2004; McKay *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2010; Rampersad, 2012). Os marcadores ISSR permitem a detecção de um nível elevado de polimorfismo em comparação com outros marcadores moleculares, uma vez que, as regiões microssatélites acessadas por eles, são hipervariáveis e estão distribuídas aleatoriamente ao longo do genoma; e a taxa de alteração evolutiva dentro dessa região é significativamente maior do que para outras regiões (Kumar *et al.*, 2010; Rampersad, 2012). Os isolados aqui estudados foram obtidos em diferentes períodos de coletas, mas sempre no mesmo local, o que indica que gênero *Colletotrichum* pode apresentar alto polimorfismo mesmo em um espaço geográfico restrito. Assim como neste estudo, Lu *et al.* (2004) verificaram baixa taxa de agrupamentos com 100% de similaridade, e concluíram que em termos genéticos, as populações de *Colletotrichum* são altamente variáveis na Floresta Iwokrama.

Neste estudo foi verificado que o marcador molecular (GACA)₄ foi eficiente para separar os isolados entre os complexos de espécies e portanto, pode auxiliar na identificação de isolados de *Colletotrichum* neste nível. Nascimento *et al.* (2010) também verificaram que o iniciador ISSR, separou em grupos distintos os isolados que depois, foram identificados como *C. magna* e *C. gloeosporioides*. McKay *et al.* (2009) verificaram que o uso do iniciador espécie específico e ISSR foram mais eficientes que as análises morfológicas para separarem os isolados de *C. acutatum* dos de *C. gloeosporioides*.

Os marcadores moleculares são utilizados como uma ferramenta que auxilia a compreensão da dinâmica populacional de patógenos, o que pode facilitar o desenvolvimento de estratégias de controle eficazes (Kumar *et al.*, 2010). Neste estudo, não foi verificada a separação entre isolados endofíticos e fitopatogênicos que, em alguns casos, formaram grupos com alta similaridade.

Em nenhuma das abordagens adotadas (filogenética, morfológica e por marcadores moleculares) foi possível diferenciar isolados endofíticos (isolados de folhas saudáveis) de fitopatogênicos (isolados de folhas doentes), isto pode indicar que os isolados de *Colletotrichum* obtidos como endófitos, podem ser patógenos latentes. Lana *et al.* (2011) com base em análises genéticas com marcador molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e fisiológicas (patogenicidade e atividade enzimática extracelular) também não conseguiram separar os isolados de *Moniliophthora perniciosa*, considerados endofíticos dos patogênicos do cacauero (*Theobroma cacao* L.). Os autores sugeriram a possibilidade que isolados resgatados de tecidos sadios, possam ser formas latentes do patógeno, uma vez que, alguns dos isolados foram capazes de induzir sintomas de vassoura de bruxa em mudas inoculadas com a mesma frequência dos isolados obtidos a partir de ramos doentes. Em contrapartida, isolados de *Guignardia citricarpa*, agente causal da “mancha preta dos citros”, obtidos de lesões (fitopatogênicos) apresentaram diferenças genéticas e morfológicas que os separam de isolados, dessa mesma espécie, procedentes de tecidos saudáveis (Azevedo *et al.*, 2000).

Na análise filogenética, verificou-se a formação de um subclado bem estabelecido de fungos fitopatogênicos da espécie *C. karstii*. No entanto, em nenhuma das outras análises foi reforçado ou repetido este agrupamento, demandando outros estudos sobre a patogenicidade de fitopatogênicos e endófitos dessa espécie em aceroleira. A análise multilocus realizada por Rojas *et al.* (2010), revelou uma aparente dicotomia entre isolados de *Colletotrichum* obtidos a partir de material doente de plantas, frutas ou folhas, e os isolados obtidos a partir de folhas assintomáticos. No entanto, seus resultados não foram conclusivos.

A busca por características que diferenciem fungos endofíticos de patógenos latentes é importante, principalmente, diante do aumento de estudos e do uso de fungos endofíticos como

controladores biológicos de pragas e doenças, sendo que uma diferenciação precisa tornaria a prática mais segura (Rojas *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos indicam que a aceroleira abriga uma alta riqueza de espécies de *Colletotrichum*, sendo a maioria delas relatadas pela primeira vez como endófitas e fitopatógenas desta planta. Este fato é de grande importância fitossanitária para a cultura. As espécies isoladas tanto endófitas como fitopatógenas foram altamente diversas, morfológica e geneticamente. Os marcadores moleculares ISSR (GACA)₄ e M13 evidenciaram diferenças intra e interespecífica entre os isolados e o padrão de bandas gerado pelo marcador (GACA)₄ separou, grande parte dos isolados, de acordo com o complexo de espécie. No geral, em nenhuma das abordagens adotadas (filogenética, morfológica e por marcadores moleculares) foi possível diferenciar isolados endofíticos de fitopatogênicos. Portanto, os resultados indicam que tanto os isolados fitopatogênicos quanto os endofíticos devem ser direcionados para estudos de patogenicidade (*in vitro* e *in vivo*) para revelar o real risco que cada uma pode representar para a cultura da acerola.

5. FUNGOS ASSOCIADOS A *Malpighia emarginata*: *Colletotrichum* spp. CAUSANDO ANTRACNOSE E POTENCIAL ANTAGÔNICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS¹

Resumo

Malpighia emarginata (acerola) é uma planta frutífera resistente, no entanto, a antracnose causada por *Colletotrichum* spp. pode causar grandes perdas na produtividade dos seus frutos. Os objetivos desse estudo foram: verificar a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* agentes da antracnose em aceroleira e avaliar o potencial antagônico de fungos endofíticos de folhas de aceroleira contra o agente da antracnose. Foram realizados testes de patogenicidade *in vitro* com cinco espécies fitopatogênicas de *Colletotrichum* (*Colletotrichum karstii*, *C. fructicola*, *C. siamense*, *C. theobromicola* e *C. cliviae*). O potencial antagônico de fungos endofíticos de *M. emarginata* foi verificado por testes de cultura pareada e os endófitos que produziram halos de inibição foram submetidos a fermentação em meio líquido para a produção dos extratos brutos. Os testes *in vitro* revelaram baixa patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum* testados, mas todas as espécies apresentaram pelo menos um isolado capaz de produzir lesão em folhas e frutos destacados de aceroleira. O isolado *C. theobromicola* URM 7127 apresentou maior patogenicidade e foi submetido aos ensaios de antagonismo utilizando endófitos de *M. emarginata*. Dos endófitos testados, 94% inibiram o crescimento do fitopatógeno em cultura pareada por competição por substrato e/ou antibiose, com destaque para os isolados de *Apiospora camptospora* (C3-17; C1-91; C1-98) inibindo em 70,5% a 74,8% o patógeno. O extrato bruto do endófito *Bipolaris setariae* C3-04 produziu o maior halo de inibição (17 mm) por disco difusão contra o patógeno teste. O presente estudo relata pela primeira vez o potencial patogênico de diferentes espécies de *Colletotrichum* em aceroleira e destaca duas espécies de fungos endofíticos potencialmente úteis no controle da antracnose causada por *C. theobromicola*.

Palavras-chave: acerola; controle biológico; complexo *Colletotrichum gloeosporioides*; complexo *Colletotrichum boninense*; *Colletotrichum theobromicola*.

¹Trabalho a ser submetido para publicação: Nascimento, T.L., Lima, M. R., Cunha, A.O. B., Laranjeira, D., Júnior, N.C.L., Souza-Motta, C.M. Fungos associados a *Malpighia emarginata*: *Colletotrichum* spp. causando antracnose e potencial antagônico de fungos endofíticos. *Journal of Phytopathology*.

Introdução

A aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) é uma planta frutífera de importância econômica para o Brasil. O consumo do seu fruto, a acerola, está em crescente expansão devido ao seu alto teor de ácido ascórbico (vitamina C) que pode chegar a ser 100 vezes superior ao da laranja e 10 vezes ao da goiaba, frutas reconhecidas como as de mais alta concentração dessa vitamina (Mendes *et al.*, 2012). O Brasil é considerado o maior produtor, consumidor e exportador de acerola. O aumento do consumo interno e o interesse de japoneses, europeus e norte-americanos pelo consumo de acerola nas formas de suco concentrado e polpa integral congelada vem tornando seu cultivo uma excelente opção de mercado (Freire *et al.*, 2007; Mendes *et al.*, 2012).

A cultura da acerola está sujeita a várias doenças, cuja severidade depende da região e das condições climáticas do cultivo. A antracnose é a doença mais frequente entre os pomares de acerola no Brasil. Esta doença pode afetar tanto mudas quanto plantas adultas e os frutos atacados são inviáveis para exportação, causando inúmeros prejuízos econômicos (Tavares, 1995; Almeida *et al.*, 2003). *Colletotrichum gloeosporioides* é considerado o agente etiológico da antracnose em aceroleira no Brasil, sendo relatada por Freire (1995), Urban *et al.* (1996), Generoso *et al.* (2002) e Almeida *et al.* (2003).

A aplicação dos fungicidas sintéticos é considerada como uma das abordagens mais baratas e mais comuns para o controle de doenças em plantas, porém, além de seus riscos para a saúde humana, também causam fortes desequilíbrios no ambiente e podem desencadear o desenvolvimento de genótipos resistentes (Bettiol e Morandi, 2009). Nesse contexto, tem aumentado o número de pesquisas buscando agentes potenciais de controle biológico de fungos fitopatogênicos, entre estes agentes encontram-se os micro-organismos endofíticos (Mejía *et al.* 2008; Orole e Adejumo, 2009; Kauss *et al.* 2010; Gond *et al.*, 2012; Abo-Elyousr *et al.*, 2014). Os endófitos são os micro-organismos capazes de colonizar os tecidos internos das plantas sem causar dano aparente ao hospedeiro, em todo ou parte do seu ciclo de vida (Petrini, 1991).

O uso de fungos endofíticos no controle biológico de doenças é vantajoso, pois além de habitarem um nicho ecológico semelhante ao ocupado por fitopatógenos e controlá-los por competição por recursos, os endófitos podem ainda produzir substâncias antibióticas que inibem o crescimento de patógenos (Azevedo *et al.* 2002; Zabalgogezcoa, 2008). Segundo Schulz e Boyle (2005), aproximadamente 80% dos fungos endofíticos produzem compostos biologicamente ativos como: antibacterianos, fungicidas e herbicidas. Na literatura estão descritas várias substâncias produzidas por endofíticos como: Criptocandina A, Criptocina, Pestalocide, Jesterona e Ácido Coletótrico (Strobel, 2003; Strobel *et al.*, 2004). De acordo com Liu *et al.* (2001) é altamente

recomendada a caracterização das substâncias produzidas por fungos endofíticos antagonistas devido à possibilidade de encontrar novas moléculas antifúngicas. Estas moléculas podem ser usados para o desenvolvimento de fungicidas eficientes e menos tóxicos para o controle de doenças em plantas.

Os objetivos desse estudo foram, verificar a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* agentes da antracnose em aceroleira; avaliar o potencial antagônico de fungos endofíticos de folhas de aceroleira contra o agente selecionado como mais patogênico; indicar o isolado endofítico mais promissor para o uso no controle biológico da doença e verificar o potencial dos endófitos em produzir antifúngicos através da avaliação dos seus extratos brutos produzidos a partir da fermentação em meio líquido.

Material e Métodos

Teste de patogenicidade *in vitro*

Vinte e um isolados de *Colletotrichum*, agente da antracnose em aceroleiras, procedentes da Micoteca URM (WDCM 604), foram avaliados quanto à capacidade de causar lesão em frutos e folhas destacadas de *M. emarginata*. Cultura pura de cada isolado foi cultivada em BDA por sete dias a 25°C sob alternância de 12 horas de luz fluorescente /12 horas de escuro. Para a obtenção de esporos foi colocado cerca de 5 ml de água destilada esterilizada sobre cada colônia, sendo esta superficialmente raspada para liberação dos conídios. A densidade de esporos dessa suspensão foi ajustada para uma concentração de 10⁵ esporos/mL utilizando um hemocitômetro (Cai *et al.* 2009).

Frutos sadios (coloração verde-claro), e folhas totalmente expandidas de *M. emarginata* foram desinfestadas superficialmente em hipoclorito de sódio e secas em papel-filtro esterilizado, conforme Menezes e Assis (2004). Os frutos foram dispostos em caixas plásticas tipo gerbox e as folhas em placas de Petri, ambas forradas com papel-filtro esterilizado e umedecido, mantendo uma umidade relativa em torno de 95% no sistema.

As amostras foram inoculadas usando o método de inoculação sobre ferida (*wound/drop*). Neste método, 10µL da suspensão de esporos foi depositado sobre um pequeno ferimento feito por uma agulha esterilizada no centro de cada fruto e folha (modificado de Menezes e Assis, 2004; Cai *et al.* 2009). Para o controle foi utilizado como inóculo água destilada esterilizada. As amostras inoculadas foram mantidas a 25°C sob alternância de 12 horas de luz fluorescente/12 horas de escuro. O re-isolamento a partir das lesões foi realizado para completar o Postulado de Koch. Os testes foram compostos por seis repetições em um delineamento inteiramente casualizado.

A avaliação dos sintomas de antracnose foi realizada no sexto e décimo quarto dia após a inoculação para frutos e folhas, respectivamente. Os sintomas foram avaliados e pontuados em uma escala 0-9 pontos, como descrito por Montri *et al.* (2009). O isolado com maior patogenicidade foi utilizado nos testes de antagonismo.

Teste antagônico entre fungos endofíticos e fitopatógeno*Fungos endofíticos de Malpighia emarginata*

Foram testados 67 fungos endofíticos previamente isolados de folhas sadias de aceroleiras (Tabela 8), cultivadas no pomar comercial Acerolândia, mesmo local de coleta das folhas doentes utilizadas no isolamento dos fitopatógenos.

Tabela 8. Fungos endofíticos isolados de folhas de aceroleira e testados quanto a capacidade de antagonizar o agente causal da antracnose.

Fungos endofíticos	Nº de isolados testados
<i>Acremonium implicatum</i> (J.C. Gilman & E.V. Abbott) W. Gams	1
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	1
<i>Bipolaris setariae</i> Shoemaker	1
<i>Cercospora apii</i> Fresen.	1
<i>Cercospora</i> Fresen.	3
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	1
<i>Cladosporium oxysporum</i> Berk. & M.A. Curtis	1
<i>Colletotrichum cliviae</i> You L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde & L. Cai	1
<i>Colletotrichum fructicola</i> Prihast., L. Cai & K.D. Hyde,	4
<i>Colletotrichum karstii</i> You L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde & L. Cai	1
<i>Colletotrichum siamense</i> Prihast., L. Cai & K.D. Hyde	2
<i>Colletotrichum</i> Corda	2
<i>Corynespora cassicola</i> (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei	3
<i>Corynespora smithii</i> (Berk. & Broome) M.B. Ellis	1
<i>Curvularia brachyspora</i> Boedijn	1
<i>Curvularia pallescens</i> Boedijn	2
<i>Drechslera biseptata</i> (Sacc. & Roum.) M.J. Richardson & E.M. Fraser	1
<i>Fusarium lateritium</i> Nees	1
<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.	4
<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk	2
<i>Guignardia bidwellii</i> (Ellis) Viala & Ravaz	2
<i>Khuskia oryzae</i> H.J. Huds.	1
Morfoespécie 12	1
Morfoespécie 13	1
Morfoespécie 14	1
Morfoespécie 15	1
Morfoespécie 26	1
Morfoespécie 27	1

Continuação Tabela 8.

Fungos endofíticos	Nº de isolados testados
Morfoespécie 28	1
Morfoespécie 29	1
Morfoespécie 3	1
Morfoespécie 32	1
Morfoespécie 35	1
Morfoespécie 36	1
Morfoespécie 8	1
Morfoespécie 9	1
<i>Penicillium verruculosum</i> Peyranel	2
<i>Phoma leveillei</i> Boerema & G.J. Bollen	1
<i>P. tropica</i> R. Schneid. & Boerema	1
<i>Phoma cucurbitacearum</i> (Fr.) Sacc	1
<i>Phomopsis archeri</i> B. Sutton	4
<i>Pseudocochliobolus pallescens</i> Tsuda & Ueyama	1
<i>Pteronidium</i> state of <i>Apiospora camptospora</i> Penz. & Sacc.	4
<i>Xylaria</i> Hill ex Schrank	2
Total	67

Fonte: O Autor (2014).

Teste de antagonismo - Cultura pareada

O potencial dos fungos endofíticos contra o fitopatógeno selecionado no teste de patogenicidade foi verificado pelo método de cultura pareada, proposto por Dennis e Webster (1971). Os isolados de fungos endofíticos e o fungo fitopatogênico foram cultivados individualmente em meio de cultura BDA, por um período de sete dias e incubados em fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de escuro à temperatura de 25°C. Após o período de crescimento foram retirados dois blocos de micélio de 8 mm de diâmetro, um do endófito e o outro do fitopatógeno e em seguida transferidos para lados opostos de uma placa de Petri (9 cm) contendo BDA, respeitando uma distância de aproximadamente 1 cm da borda da placa. Foram realizados dois controles que consistiram no cultivo isolado do fungo endofítico e do fitopatógeno. Após o pareamento dos fungos, as placas foram incubadas em fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de escuro à temperatura de 25°C. O ensaio foi composto por seis repetições em um delineamento experimental inteiramente casualizado.

Para determinar a porcentagem de inibição do fitopatógeno foi empregada a fórmula descrita por Nuangmek *et al.* (2008), que consistiu em: Porcentagem de inibição (%) = (A-B/A)

*100. Onde: A= raio do agente patogênico na placa de controle e B= raio do patógeno na placa teste. Para determinar o halo de inibição foi realizada a leitura das distâncias entre as colônias do fitopatógeno e do endofítico e os resultados expressos em milímetros. A leitura do teste foi realizada em dois momentos, uma no sétimo e outra no décimo quinto dia de incubação. Os dados da porcentagem de inibição foram submetidos a análise de variância, e quando significativo foi aplicado o teste de Tukey, utilizando o programa *Assistat* – Assistência Estatística (Silva, 2007).

Ensaio fermentativo com os fungos endofíticos para extração de metabólitos bioativos

Condições de cultivo

Os fungos endofíticos que produziram halos de inibição maiores que 5 mm no teste de cultura pareada foram selecionados para a produção dos extratos brutos por fermentação em meio líquido. Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA, à temperatura de 27°C, por sete dias. Após esse período, cinco blocos de gelose (6 mm de diâmetro) retirados das extremidades das colônias foram inoculados em frascos tipo Erlenmeyer (250mL) contendo 50mL do caldo batata dextrose (pH 5,5 ± 0,1) e incubados sob agitação de 180rpm, a 25°C durante 15 dias (Kaouadji *et al.*, 1993). O cultivo foi realizado em duplicata.

Obtenção dos extratos brutos

Ao final da fermentação, a fase líquida foi separada do micélio por filtração a vácuo utilizando papel de filtro. À fase líquida obtida foi então, adicionada o solvente acetato de etila (v/v). Após 24 horas ocorreu a extração dos metabólitos secretados ao meio de cultura, utilizando a metodologia de partição líquido-líquido em balão de separação de 250 mL, onde foram separadas as duas fases não miscíveis formadas no sistema, a aquosa (líquido metabólico) da outra orgânica (solvente de extração, acetato de etila rico em metabólitos). A fase orgânica foi, então, concentrada em rotaevaporador a 40° C e, em seguida, colocada em dessecador até a obtenção de peso constante. Os extratos obtidos foram pesados em balança analítica e armazenados em freezer a -20°C.

Teste de disco difusão

O teste foi realizado pelo método de difusão em disco de papel (Bauer *et al.*, 1966). Os extratos brutos foram solubilizados em acetato de etila e 50 µL foram transferidos para discos de

papel-filtro (8 mm). Os discos foram depositados nas superfícies do meio de cultura BDA contido em placas de Petri e previamente semeado com uma suspensão de esporos do fitopatógeno (10^5 esporos/mL). As placas de Petri foram incubadas a 25°C por 48 horas e, então, os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados e expressos em milímetros. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Resultados e Discussão

Os isolados que apresentaram maior patogenicidade pertencem ao complexo de espécies *C. gloeosporioides* (*C. fructicola*, *C. siamense* e *C. theobromicola*). No entanto, todas as espécies testadas apresentaram pelo menos um isolado capaz de produzir lesão em frutos e/ou folhas destacadas de aceroleira. A pontuação na escala de severidade variou de 0 a 7 em frutos e de 0 a 3 em folhas destacadas. Em frutos, a maior pontuação foi atingida por *C. theobromicola* F105/URM 7137, seguido por *C. siamense* F45. Já em folhas, a maioria dos isolados apresentou severidade igual a 1 na escala, e a maior pontuação (3) foi atingida pelos isolados: *C. karstii* F38, *C. siamense* F47 e *C. theobromicola* F105/URM 7137 (Tabela 9).

Os testes de patogenicidade em frutas e folhas destacadas de *M. emarginata*, revelaram, no geral, baixa patogenicidade dos isolados de *Colletotrichum* spp. Schena *et al.* (2014), em testes de patogenicidade em frutos de azeitona destacados, também verificaram que algumas espécies mostraram-se fracamente patogênicas, incluindo *C. aenigma*, *C. kahawae* subsp. *ciggaro*, *C. queenslandicum*, *C. siamense* e *C. karstii*. No entanto, as inoculações artificiais em partes destacadas de vegetais, geralmente não revelam a real patogenicidade de um fungo, mas é um bom indicador de potencial de infecção (Cai *et al.*, 2009).

Os isolados das espécies já relatadas na literatura como agentes da antracnose pertencem as espécies *C. gloeosporioides* e *C. theobromicola* (Weir *et al.*, 2012; Bragança, 2013). *Colletotrichum theobromicola* que apresentou maior patogenicidade tanto em frutos quanto em folhas, já foi anteriormente relatado como fitopatógeno de aceroleira (Bragança, 2013). Membros de *C. theobromicola* ocorrem em uma grande variedade de hospedeiros em todo o mundo e muitos são considerados patógenos especializados (Weir *et al.*, 2012). Considerando este fato e por apresentar maior pontuação na escala de patogenicidade entre os fitopatógenos, o isolado *C. theobromicola* F105/URM 7137 foi selecionado para ser utilizado nos testes de antagonismo.

Tabela 9. Patogenicidade *in vitro* de isolados de *Colletotrichum* spp. obtidos de folhas de aceroleira com sintomas de antracnose (adotada a escala da doença de 0-9, Montri *et al.*, 2009).

Espécie	Nº de identificação	Pontuação na escala ¹	
		Fruto	Folha
<i>Colletotrichum karstii</i>			
	F13	1	0
	F38	0	3
	F22	1	0
	F23	1	1
	F27	0	1
<i>Colletotrichum</i> sp.1/ <i>C. karstii</i>			
	F35	3	1
	F14	1	1
	F43	0	1
	F100	1	0
	F8	0	1
	F19	0	1
	F15	0	1
<i>Colletotrichum</i> sp.2/ <i>C. fruticola</i>			
	F12	2	0
	F18	3	1
	F49	1	1
<i>C. siamense</i>			
	F45	5	1
	F47	3	3
<i>C. theobromicola</i>			
	F105	7	3
<i>C. cliviae</i>			
	F46	1	1
	F6	1	1
	F24	3	0

¹Foram excluídos da tabela os isolados testados que não formaram lesões em frutos e folhas de acerola.
Fonte: O Autor (2014).

Do total de 67 fungos endofíticos utilizados nos testes de antagonismo (cultura pareada), 94% apresentaram antagonismo ao fitopatógeno teste da aceroleira (*C. theobromicola* F105/URM 7137). Este percentual é superior aos encontrados na literatura. No isolamento realizado por Gond *et al.* (2012) nove em cada 16 (56,25%) fungos endofíticos de *Nyctanthes arbor-tristis* exibiram atividade antifúngica a um ou mais patógenos fúngicos, sendo *Colletotrichum dematium* o melhor antagonista inibindo em 55,87% o crescimento do fitopatógeno *Curvularia lunata*. Já no estudo realizado por Siqueira *et al.* (2011), apenas 7,88% dos fungos endofíticos isolados de diferentes

partes da planta medicinal Alecrim-pimenta apresentaram atividade antagônica em meio sólido contra fitopatógenos. Vale ressaltar que, além da verificação de elevada taxa de potencial antagônico dos endófitos de aceroleira, este é o primeiro relato sobre a atuação de fungos endofíticos de aceroleira no biocontrole do agente da antracnose.

A porcentagem de inibição do fitopatógeno pelo endófitos na primeira leitura (sete dias) variou de 4% a 72%; na segunda leitura (15 dias) a variação foi de 12% a 74,8%. Na Tabela 10, estão descritos os isolados endofíticos com capacidade antagônica igual ou maior que 40%. Na primeira leitura do experimento, o isolado endofítico *Pteroconium* state of. *Apiospora camptospora* C1-91 apresentou a maior atividade antagônica, inibindo *C. theobromicola* F105/URM 7137 em 72%; seguido pelos isolados *Khuskia oryzae* C1-42 com 61% e *Phomopsis archeri* C1-07 com 54,7% ($f = 39,6$; $p < 0,001$). Após 15 dias de incubação, houve um aumento no número de isolados com capacidade antagônica igual ou maior que 40% de inibição. A espécie com maior destaque foi *Pteroconium* state of. *A. camptospora* (isolados C3-17; C1-91; C1-98) variando de 70,5% a 74,8% de inibição, seguida das espécies *K. oryzae* C1-42 e *P. archeri* C1-40, inibindo 61% e 60,2% respectivamente (Figura 16).

Tabela 10. Porcentagem de inibição igual ou maior que 40% por isolados de fungos endofíticos frente ao fitopatógeno *Colletotrichum theobromicola* aos sete e 15 dias de incubação.

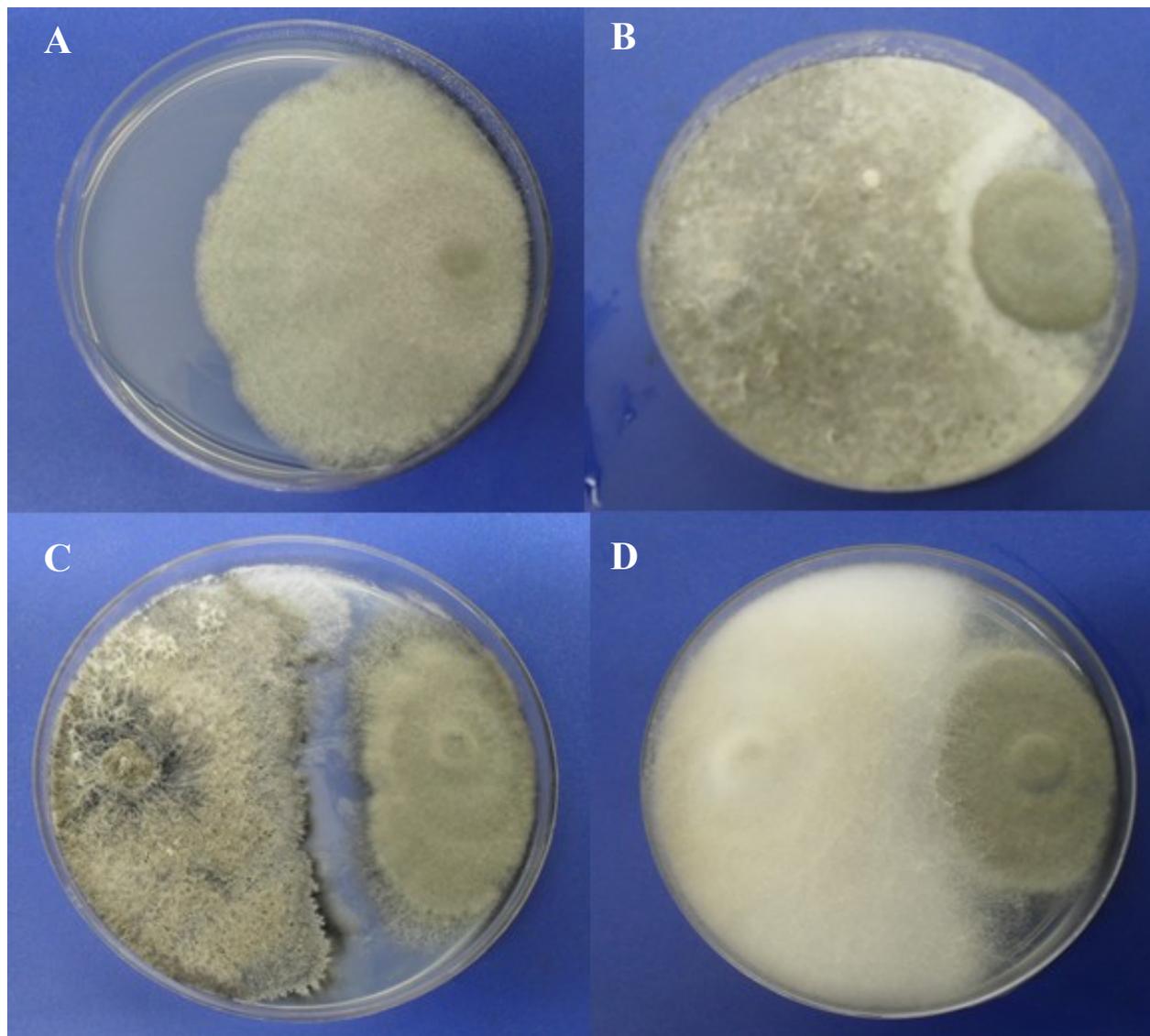
Fungos endofíticos	Nº de identificação	Porcentagem de inibição (%)	
		7dias	15dias
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	C2-61	- ¹	41 hi
<i>Colletotrichum fructicola</i> Prihast., L. Cai & K.D. Hyde	C3-46	-	42,3 ghi
<i>C. fructicola</i>	E125	-	45,7 efghi
<i>C. fructicola</i>	E123	-	52,3 cd
<i>C. fructicola</i>	E106	-	52,8 cd
<i>C. karstii</i> You L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde & L. Cai	E29	-	46,8 defgh
<i>C. siamense</i> Prihast., L. Cai & K.D. Hyde	E76	-	45,8 efghi
<i>C. siamense</i>	E43	-	52,3 cd
<i>Fusarium oxysporum</i> Schldtl.	C2-99	43 e	43 fghi
<i>F. oxysporum</i>	C2-07	-	39,7 i
<i>F. oxysporum</i>	C2-102	42,8 e	42,8 ghi
<i>F. oxysporum</i>	C2-101	49,3 cde	49,3 cdef
<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk	C1-34	-	47,3 defgh
<i>G. cingulata</i>	C1-46	-	49,7 cde
<i>Khuskia oryzae</i> H.J. Huds.	C1-42	61 b	61 b
Morfoespécie 29	C1-66	44,2 de	44,2 efghi
<i>Phomopsis archeri</i> B. Sutton	C1-07	54,7 bc	54,7 bc
<i>P. archeri</i>	C1-40	-	60,2 b
<i>Pteronidium</i> state of <i>Apiospora camptospora</i> Penz. & Sacc.	C3-17	72 a	72 a
<i>P. state of. A. camptospora</i>	C1-98	50,5 cd	70,5 a
<i>P. state of. A. camptospora</i>	C1-91	-	74,8 a
<i>Xylaria</i> Hill ex Schrank	C3-59	-	47,7 defg

¹Porcentagem de inibição <40%

*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade.

Fonte: O Autor (2014).

Figura 16. Antagonismo em cultura pareada: A – Placa controle do fitopatógeno *Colletotrichum theobromicola* F105/URM 7137; B - Endófito *Pteroniconium* state of *Apiospora camptospora* C1-91 (esquerda) e fitopatógeno (direita); C - Endófito *Phomopsis archeri* C1-40 (esquerda) e fitopatógeno (direita); D - *Khuskia oryzae* C1-42 (esquerda) e fitopatógeno (direita).

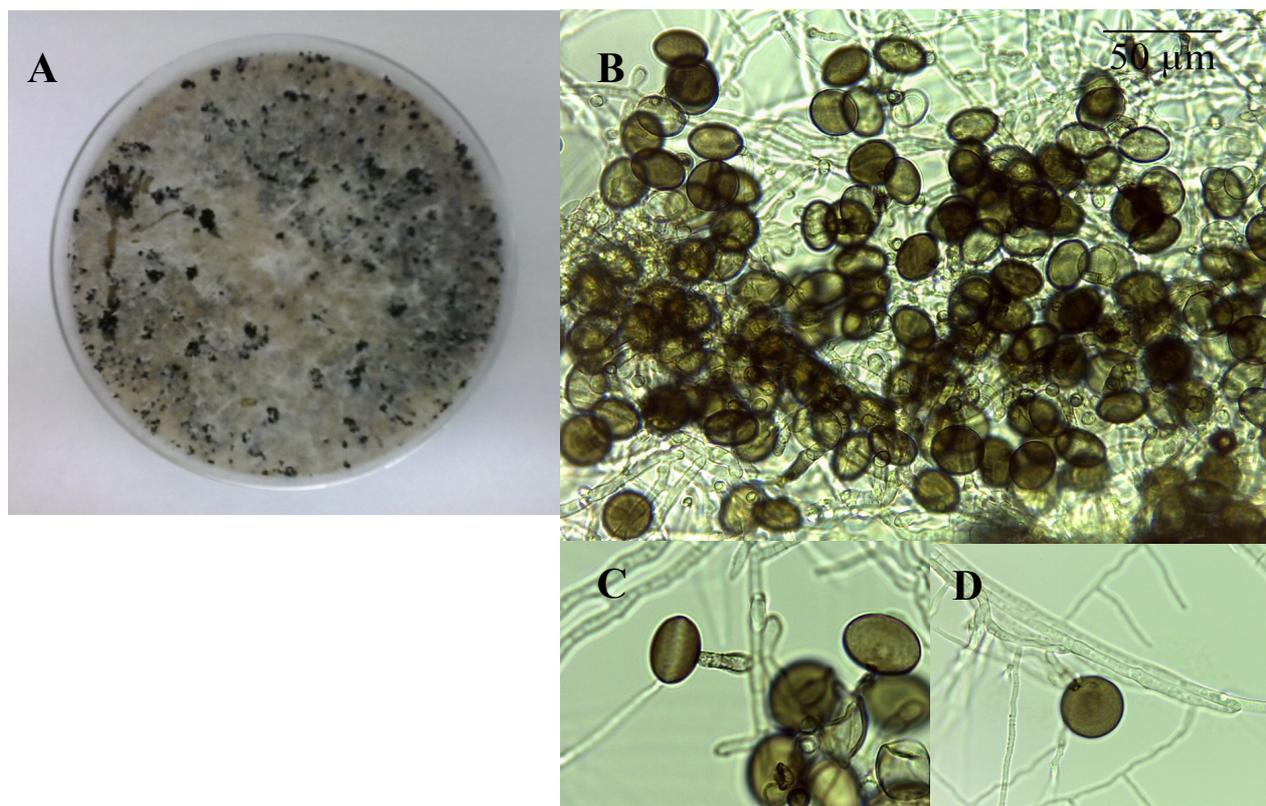


Fonte: O Autor (2014).

O pareamento entre antagonista e patógeno é uma técnica simples e muito útil para a seleção inicial de fungos potencialmente antagonistas para posterior elaboração de bioprodutos utilizados no controle biológico em campo (Soytong *et al.*, 2005). Abo-Elyousr *et al.* (2014) reduziram em 79,9% a incidência da mancha-púrpura causada por *Alternaria porri* em plantas de cebola, utilizando o fungo endofítico *Trichoderma harzianum*, inicialmente selecionados por um teste *in vitro*. O sucesso do uso de fungos endofíticos no biocontrole de doenças de plantas já foi relatado para diferentes culturas como a do cacau (Mejía *et al.* 2008; Kauss *et al.* 2010), do milho (Orole e Adejumo, 2009) e da uva (Soytong *et al.*, 2005).

Foi verificado dois tipos de interação antagonista: antagonismo por competição por substrato e antibiose. Os isolados de fungos endofíticos que se destacaram nos testes de antagonismo inibiram o patógeno por competição de substrato, sendo este o mecanismo de inibição mais comum relatado em testes de cultura pareada (Mejía *et al.*, 2008; Nuangmek *et al.*, 2008; Abo-Elyousr *et al.*, 2014). De acordo com os autores entende-se por competição por substrato o crescimento excessivo de um organismo por outro. Neste estudo, os isolados da espécie *Pteroconium* state of *A. camptospora* apresentaram as maiores porcentagens de inibição contra *C. theobromicola* F105/URM 7137. Este fungo endofítico foi considerado um bom antagonista e devido ao seu rápido crescimento em meio de cultura contido em placa de Petri, impediu o desenvolvimento do fitopatógeno. De acordo com Abo-Elyousr *et al.* (2014), esta é uma característica vantajosa para o antagonista na disputa da colonização da área, inibindo o patógeno na competição por espaço ou por nutrientes.

Pteroconium state of *A. camptospora* pertence ao filo Ascomycota, ao subfilo Pezizomycotica e a classe Sordariomycetes. As características morfológicas estão de acordo com a descrição da espécie feita por Ellis (1971) e podem ser verificadas na Figura 17. Os isolados apresentaram esporodóquios de coloração negra; conidióforo marrom claro, verruculoso, com mais de 140 μ de comprimento e largura média de 4 μ ; conídio sem septo, marrom a marrom escuro, liso a discretamente verruculoso, dependendo da superfície visualizada pode ser redondo a globoso ou lenticular (lateral do conídio). A face lateral é caracterizada por um cume equatorial (fenda germinativa), de coloração mais clara. Esta espécie apresenta, ainda, fácil cultivo e abundante produção de esporos, sendo estas interessantes características para seu uso no controle biológico de doenças. Poucos trabalhos na literatura foram encontrados sobre *P. state of A. camptospora*. Há relatos desta espécie causando doença em milho (*Zea mays* L.) na Índia (Lambhate *et al.*, 1993), fruta-pão (*Artocarpus altilis* Fosb.) na Índia (Shamsi *et al.*, 2012), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) em Burma (Thaung, 2008) e como decompositor de caules e folhas de cana-de-açúcar (*S. spontaneum* L.) na Tailândia (Bhilabutra *et al.*, 2010).

Figura 17. *Pteronidium* state of *Apiospora camptospora* : A- Colônia; B a D - Esporos.

Fonte: O Autor (2104).

Cerca de 59% dos fungos endofíticos antagonistas a *C. theobromicola* F105/URM 7137 liberaram substâncias antifúngicas no meio de cultura formando halos ou zonas de inibição, que é uma característica de antagonismo por antibiose (Liu *et al.* 2001; Mejía *et al.* 2008). Dos 37 isolados de fungos endofíticos que produziram alguma substância antagonista perceptível nos testes, apenas 45,9% apresentaram halos de inibição maiores que 5 mm e foram submetidos ao ensaio fermentativo em meio líquido para a produção dos extratos brutos e teste de disco difusão (Tabela 11).

O isolado *Curvularia pallescens* C3-69 foi o mais eficiente, com halo de inibição igual a 13,8 mm. Com exceção deste, os demais isolados endofíticos apresentaram halos de inibição menores que 10 mm nos testes de cultura pareada. No entanto, nesse tipo de seleção em meio de cultura sólido, a verificação da produção de metabólitos extracelulares com atividade antifúngica é apenas qualitativa e útil para selecionar isolados para testes subsequentes (Liu *et al.*, 2001).

Dezessete isolados endofíticos foram selecionados para aos ensaios de fermentação em meio líquido e produção do extrato bruto por acetato de etila. Destes, apenas cinco apresentaram atividade antifúngica nos testes de disco difusão utilizando as condições de cultivo ensaiadas. Os halos de inibição produzidos pelos extratos brutos variaram de 7,33 a 17 mm. O maior halo de

inibição foi produzido por *Bipolares setariae* C3-04 e os menores por *Cercospora* sp. C1-116 e *Phomopsis archeri* C1-40 (Tabela 11).

Tabela 11. Média dos halos de inibição (>5mm) produzidos por fungos endofíticos frente ao fitopatógeno *Colletotrichum theobromicola* F105, no teste de cultura pareada aos 15 dias de incubação e no teste de disco difusão dos seus extratos brutos.

Fungos Endofíticos	Nº de Identificação	Halo de Inibição (mm)	
		Cultura Pareada	Disco difusão
<i>Cercospora</i> Fresen.	C1-116/URM 7153	8,0	7,33
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	C2-31	5,2	nd ¹
<i>Colletotrichum karstii</i> You L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde & L. Cai	C3-29/ URM 7136	5,3	8
<i>C.fruticicola</i> Prihast., L. Cai & K.D. Hyde 2009	E106	6,5	nd
<i>Corynespora cassiicola</i> (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei	C3-51	7,5	nd
<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk	C1-46	6,5	nd
<i>G. cingulata</i>	C3-44	5,1	nd
<i>G. cingulata</i>	C2-36	5,2	nd
<i>Cerospora</i> sp.	C2-65	8,5	nd
<i>Bipolaris setariae</i> Shoemaker	C3-04/URM 7151	5,7	17
Morfoespécie 35	C3-03	9,3	nd
<i>Curvularia pallescens</i> Boedijn	C3-53	6,3	nd
<i>C. pallescens</i>	C3-69/ URM 7155	13,8	nd
<i>Phoma cucurbitacearum</i> (Fr.) Sacc	C1-05/ URM 7155	7,3	nd
<i>Cercospora</i> sp.	C2-54/URM 7154	7,2	13,67
<i>Phomopsis archeri</i> B. Sutton	C1-40	7,5	7,33
<i>Fusarium oxysporum</i> Schldtl	C2-102	5,3	nd

¹ nd - Atividade não detectada.

Fonte: O Autor (2014).

Não houve inibição pelo extrato bruto do isolado *C. pallenses* C3-69 que apresentou o melhor resultado na cultura pareada. Outros estudos também verificaram resultados não correspondentes entre os testes de cultura pareada e disco difusão com os extratos brutos dos antagonistas (Liu *et al.* 2001; Siqueira *et al.*, 2011). De acordo com Strobel *et al.* (2004), a quantidade e os tipos de compostos produzidos por fungos endofíticos são afetados pela temperatura, composição do meio e o grau de aeração em que os mesmos são cultivados. Ramos e Said (2011) verificaram que diferentes condições de cultivo resultaram em diferentes compostos

bioativos produzidos pelo fungo endofítico *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei*. Provavelmente as condições de cultivo utilizadas não favoreceram a produção dos metabólitos com atividade antifúngica.

O extrato bruto de *Bipolaris setariae* C3-04 apresentou o melhor resultado contra *C. theobromicola* F105/URM 7137. O gênero *Bipolaris* é conhecido por causar doenças em gramíneas e outras plantas (Shi *et al.*, 2010) e não há trabalhos sobre a produção de substâncias antifúngicas por essa espécie. Sendo assim, este isolado é indicado para novos ensaios fermentativos para futura realização da prospecção química e bioautografia do seu extrato bruto.

Neste trabalho são destacadas duas espécies de fungos endofíticos de aceroleira potencialmente úteis no controle da antracnose causada por *C. theobromicola*. Sendo *P. state of A. campitospora* indicada para estudos sobre sua real eficiência como controladora biológica de fitopatógenos e o endófito *Bipolaris setariae* C3-04 é indicado como promissor para a produção de novos antifúngicos no controle da antracnose em *M. emarginata*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As folhas de *M. emarginata* abrigam alta riqueza de fungos endofíticos e o método de amostragem vertical é eficaz para aumentar o número de táxons obtidos;
- A comunidade de fungos endofíticos de aceroleira é composta por poucos táxons dominantes e muitos táxons com poucos indivíduos;
- Os táxons dominantes de fungos endofíticos de aceroleira são *Colletotrichum* spp. (inferior da copa) e *Guignardia bidwellii* (ápice da copa);
- A frequência e a composição taxonômica endofítica modifica-se com o período de coleta;
- A análise filogenética consenso das regiões ITS do rDNA e do gene parcial da β -tubulina (TUB2), associada às análises morfológicas das colônias, possibilitam de forma satisfatória a identificação dos isolados de *Colletotrichum* fitopatógenos e/ou endófitos obtidos de folhas de aceroleira;
- As espécies *C. karstii* e *C. brasiliense* (complexo *C. boninense*), *C. fructicola*, *C. siamense*, *C. gloeosporioides* sensu stricto e *C. theobromicola* (complexo *C. gloeosporioides*) e a espécie *C. cliviae* estão associadas a aceroleira;
- Várias espécies de *Colletotrichum* podem estar associadas a antracnose em *M. emarginata*;
- Existe alta variabilidade morfológica e genética, intra e interespecífica entre isolados de *Colletotrichum* spp. de mesma origem geográfica e mesmo hospedeiro;
- A amplificação das regiões ISSR utilizando o iniciador (GACA)₄ é eficiente para separar isolados de *Colletotrichum* de acordo com o complexo de espécie e pode ser utilizado no apoio para identificação do gênero;
- O agrupamento dos fungos por características fenotípicas é útil para separar os complexos de espécies *C. gloeosporioides* e *C. boninense*;
- A espécie *Colletotrichum karstii* é a espécie mais frequente entre os fitopatógenos e entre os isolados de *Colletotrichum* obtidos como endófitos;
- As análises filogenéticas (ITS e TUB2), morfológicas e por marcadores moleculares ISSR (GACA)₄ e M13 são eficientes para separar os isolados endofíticos dos fitopatogênicos de *Colletotrichum* spp;

- A maioria dos isolados de *Colletotrichum* obtidos como fitopatógenas de aceroleira apresenta baixa patogenicidade;
- Tanto fitopatógenos quanto os endófitos devem ser direcionados para estudos de patogenicidade (*in vitro* e *in vivo*) para revelar o real risco que cada um pode representar para a cultura da acerola;
- Os endófitos de *M. emarginata* são potencialmente úteis no controle da antracnose causada por *C. theobromicola*, com destaque para as espécies *Pteronidium* state of *Apiospora camptospora* e *Bipolaris setariae*.

REFERÊNCIAS

- Abo-Elyousr, K.A.M., Abdel-Hafez, S.I.I., Abdel-Rahim, I.R. 2014. Isolation of *Trichoderma* and evaluation of their antagonistic potential against *Alternaria porri*. DOI: 10.1111/jph.12228.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant pathology*. 5th edition. Burlington, Elsevier Academic Press.
- Ahlholm, J., Helander, M.L., Elamo, P., Salonemi, I., Neuvonen, S., Hanhimäki, S., Saikkonen, K. 2002. Micro-fungi and invertebrate herbivores on birch trees: fungal mediated plant–herbivore interactions or responses to host quality? *Ecology Letters* 5: 648–655.
- Almeida, F.A., Araújo, E., Gonçalves Junior, H., Barreto, A.F., Carvalho, R.A.G. 2003. Diagnóstico e quantificação de doenças fúngicas da acerola no Estado da Paraíba. *Fitopatologia Brasileira* 28(2): 176-179.
- Almeida, L.C.C., Coêlho, R.S.B. 2007. Caracterização da agressividade de isolados de *Colletotrichum* de maracujá amarelo com marcadores bioquímico, fisiológico e molecular. *Fitopatologia Brasileira* 32: 318-328.
- Álvarez, E., Gañán, L., Rojas-Triviño, A., Mejía, J.F., Llano, G.A., González, A. 2014. Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species isolated from soursop in Colombia. *European Journal of Plant Pathology* 139:319–332. DOI: 10.1007/s10658-014-0388-7
- Andrade, E.M., Uesugi, C.H., Ueno, B., Ferreira, M.A.S.V. 2007. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 32 (1): 21-31.
- Araújo, P.S.R., Minami, K. 1994. *Acerola*. Campinas, Fundação Cargill.
- Araújo, W.L., Lacava, P.T., Marcon, J., Lima, A.O.S., Sobral, J.K., Pizzirani-Kleiner, A.A., Azevedo, J.L. 2010. *Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos*. 1^a edição. Piracicaba, ESALQ.
- Araújo, W.L., Lima, A.O.S., Azevedo, J.L., Marcon, J., Sobral, J. K., Lacava, P.T. 2002. *Manual de isolamento de microrganismos endofíticos*. Piracicaba, ESALQ.
- Arnold, A.E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* 21: 51-66.
- Arnold, A.E., Henk, D.A., Eells, R.L., Lutzoni, F., Vilgalys, R. 2007. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia* 99(2): 185–206.
- Arnold, A.E., Lutzoni, F. 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88 (3): 541-549.
- Arnold, A.E., Maynard, Z., Gilbert, G.S. 2001. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycological Research* 105: 1502-1507.
- Arnold, A.E., Mejia, L.C., Kyllö, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N., Herre, E.A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:15649-15654.
- Assis, T.C., Menezes, M., Andrade, D.E.G.T., Coelho, R.S.B., Oliveira, S.M.A. 2001. Estudo comparativo de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* quanto ao efeito da nutrição de carboidratos no crescimento, esporulação e patogenicidade em frutos de três variedades de mangueira. *Summa Phytopathologica* 27 (2): 208-212.
- Ayres, M., Ayres, M. Jr., Ayres, D.L., Santos, A.S. 2007. *Bioestat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém, MCT – CNPq.
- Azevedo, J.L., Maccheroni Jr., W., Pereira, J.O., Araújo, W.L. de. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 3(1): 40-65.

- Azevedo, J.L., Serafine, L.A., Barros, N.M. 2002. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: Serafine, L.A., Barros N.M., Azevedo, J.L. (eds.). *Biotecnologia: avanços na agricultura e na indústria*. Caxias do Sul, Editora da Universidade de Caxias do Sul, pp. 233-265.
- Bae, H., Sicher, R.C., Kim, M.S., Kim, S., Strem, M.D., Melnick, R.L., Bailey, B.A. 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany* 60 (11): 3279–3295.
- Bailey, B.A., Bae, H., Strem, M.D., Crozier, J., Thomas, S.E., Samuels, G.J., Vinyard, B.T., Holmes, K.A. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control* 46: 24-35.
- Baldassari, R.B., Wickert, E., Goes, A. 2008. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from *Citrus* spp. *European Journal of Plant Pathology* 120: 103-110.
- Baynes, M.A., Russell, D.M., Newcombe, G., Carta, L.K., Rossam, A.Y., Ismael, A. 2012. A mutualistic interaction between a fungivorous nematode and a fungus within the endophytic community of *Bromus tectorum*. *Fungal Ecology* 5: 610-623.
- Bettiol, W.; Morandi, M.A.B. 2009. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente.
- 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.A., Souza-Motta, C.M. 2013. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. *Symbiosis* 60: 53-63.
- 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.
- Bragança, C.A.D. 2013. Molecular characterization of *Colletotrichum* spp. associated with fruits in Brazil. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 69p.
- Bussaban, B., Lumyong, S., Lumyong, P., Hyde, K.D., McKenzie, E.H.C. 2003. Three new species of *Pyricularia* are isolated as zingiberaceous endophytes from Thailand. *Mycologia* 95(3): 519–524.
- Caceres, A., Lopez, B., Juarez, X., Del Aguila, J., García, S. 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. *Journal of Ethnopharmacology* 40: 207-213.
- Cai, L., Hyde, K.D., Taylor, P.W.J., Weir, B.S., Waller, J., Abang, M.M., Zhang, J.Z., Yang, Y.L., Phoulivong, S., Liu, Z.Y., Prihastuti, H., Shivas, R.G., McKenzie, E.H.C.m, Johnston, P.R. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39: 183-204.
- Cannon, P.F., Buddie, A.G., Bridge, P.D. 2008. The typification of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mycotaxon* 104: 189-204.
- Cannon, P.F., Simmons, C.M. 2002. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia* 94: 210–220.
- Carmichael, J.W., Kendrick, W.B., Connors, I.L., Singler, L. 1980. *Genera of Hyphomycetes*. Edmonton, University of Alberta Press.
- Carroll, G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69(1): 2-9.
- Chang, S.C., Macêdo, D.P.C., Souza-Motta, C.M., Oliveira, N.T. 2013. Use of molecular markers to compare *Fusarium verticillioides* pathogenic strains isolated from plants and humans. *Genetics and Molecular Research* 12 (3): 2863-2875.

- Chen, X.Y., Qi, Y.D., Wei, J.H., Zhang, Z., Wang, D.L., Feng, J.D., Gan B.C. 2011. Molecular identification of endophytic fungi from medicinal plant *Huperzia serrata* based on rDNA ITS analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 495–503.
- Clarke, K.R., Gorley, R.N. 2006. PRIMER v6: User Manual/Tutorial. PRIMER-E, Plymouth.
- Clay, K. 2004. Fungi and the food of the gods. *Nature* 427 (29): 401-402.
- Costa, I.P.M.W., Assunção, M.M.C., Lima, T.E.F., Oliveira, R.J.V., Cavalcanti, M.A.Q. Checklist of endophytic fungi from tropical regions. *Mycotaxon* 119: 493-494, 2012.
- Costa, L.C., Pavani, M.C.M.D., Moro, F.V., Perecin, F. 2003. Viabilidade de sementes de acerola (*Malpighia emarginata* DC): Avaliação da vitalidade dos tecidos. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25 (3): 532-534.
- Costa, M.J.C., Terto, A.L.Q., Santos, L.M.P., Rivera, M.A.A., Moura, L.S.A. 2001. Efeito da suplementação com acerola nos níveis sanguíneos de vitamina C e de hemoglobina em crianças pré-escolares. *Revista Nutrição* 14(1): 13-20.
- Cui, J., Guo, S., Pei-gen, Xião, P. 2011. Antitumor and antimicrobial activities of endophytic fungi from medicinal parts of *Aquilaria sinensis*. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)* 12 (5): 385-392.
- Damm, U., Baroncelli, R., Cai, L., Kubo, Y., O’Connell, R., Weir, B., Yoshino, K., Cannon, P.F. 2010. *Colletotrichum*: species, ecology and interactions. *IMA Fungus* 1(2): 161–165.
- Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., Johnston, P.R., Weir, B.S., Tan, Y.P., Shivas, R.G., Crous, P.W. 2012. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology* 73: 1–36.
- Davis, E.C., Shaw, A. J. 2008. Biogeographic and phylogenetic patterns in diversity of liverwort-associated endophytes. *American Journal of Botany* 95(8): 914–924.
- Déon, M., Scomparin, A., Tixier, A., Mattos, C.R.R., Leroy, T., Seguin, M., Roeckel-Drevet, P., Pujade-Renaud, V. 2012. First characterization of endophytic *Corynespora cassiicola* isolates with variant *cassiicolin* genes recovered from rubber trees in Brazil. *Fungal Diversity* 54: 87-99.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T. 1993. *Compendium of soil fungi*. San Francisco, IHW – Verlag.
- Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew, Commonwealth Mycological Institute.
- Ellis, M.B. 1976. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew, Commonwealth Mycological Institute.
- Estrada, A.E.R., Jonkers, W., Kistler, C., May, G. 2012. Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Ustilago maydis*, and *Zea mays*: an endophyte, a pathogen, and their shared plant host. *Fungal Genetics and Biology* 49: 578–587.
- Faeth, S., Fagan, W.F. 2002. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrative and Comparative Biology* 42:360–368.
- Ferreira, D.F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35(6): 1039-1042.
- Freire, F.C.O. 1995. Doenças da Acerola no Brasil. In: São José, A.R., Alves, R.E. (Eds.). *Acerola no Brasil: Produção e Mercado*. Vitória da Conquista, UFBA, p.71-76.
- Freire, J.L.O., Lima, N., Santos, F.G.B., Marinus, J.V.M.L., Freitas, H.E.S.C. 2007. Teores de nutrientes na área foliar de plantas em fase de produção e exportação de nutrientes de frutos de acerola em pomares do estado da Paraíba. *Engenharia Ambiental* 4 (2): 79-91.
- Fundação de Desenvolvimento Municipal do Interior de Pernambuco (Recife, Pe). 1994. Histórico do Município de Paudalho. In: - *Perfil municipal do interior de Pernambuco*. Recife, pp. 639-642.
- Gamboa M.A., Laureano S., Bayman P. 2002. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: does size matter? *Mycopathologia* 156: 41–45.
- Gamboa, M.A., Bayman, P. 2001. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). *Biotropica* 33(2): 352-360.

- Gangadevi, V., Muthumary, J. 2008. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. *Mycologia Balcanica* 5: 1–4.
- García, A., Rhoden, S.A., Filho, C.J.R., Nakamura, C.V., Pamphile, J.A. 2012. Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindus saponaria* L. and their localization by scanning electron microscopy. *Biological Research* 45: 139-148.
- Gazis, R., Rehner, S., Chaverri, P. 2011. Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. *Molecular Ecology* 20: 3001–3013. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05110.x.
- Generoso, E.C.S., Konrad, M., Hernandez, F.B.T., Papa, M.F.S. Ocorrência de fungos patogênicos na aceroleira irrigada, no município de Junqueirópolis, SP. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola, 16, 2002, Salvador, *Anais...* Salvador: *Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola*, 2002.
- Gomes, J. E., Pavani, M.C.M.D., Perecin, D., Baldo, A., Martins, G. 2001. Morfologia floral e biologia reprodutiva de genótipos de aceroleira. *Scientia Agrícola* 58 (3): 519-523.
- Gond, S.K., Mishra, A., Sharma, V.K., Verma, S.K., Kumar, J., Kharwar, R.N., Kumar, A. 2012. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Nyctanthes arbor-tristis*, a well-known medicinal plant of India. *Mycoscience* 53:113–121.
- Gond, S.K.; Verma, V.C.; Kumar, A. 2007. Study of endophytic fungal community from different parts of *Argle marmelos* Correae (Rutaceae) from Varanasi (India). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1371–1375.
- Guo, L.D., Hyde, K.D. and Liew, E.C.Y. 1998. A method to promote sporulation in palm endophytic fungi. *Fungal Diversity* 1: 109-113.
- Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 1-9.
- Hanamura, T., Uchida, E., Aoki, H. 2008. Changes of the composition in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit in relation to cultivar, growing region and maturity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 1813–1820.
- Hawksworth, D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105(12): 1422-1432.
- Holanda, Y.C.A., Pontes, J.J. da, Silveira Filho, J. 1997. Doenças da acerola (*Malpighia glabra* L.) no Estado do Ceará, Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 22: 453-453.
- Huang, F., Chen, G.Q., Hou, X., Fu, Y.S., Cai, L., Hyde, K.D., Li, H.Y. 2013. *Colletotrichum* species associated with cultivated citrus in China. *Fungal Diversity* 61:61–74. DOI: 10.1007/s13225-013-0232-y.
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Hyde, K.D., Corke, H., Sun, M. 2008. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity* 33: 61-75.
- Hwang, C.S., Flaishamn M.A., Kolattukudy, P.E. 1995. Cloning of a gene expressed during appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporioides* and a marked decrease in virulence by disruption of this gene. *Plant Cell* 7: 183-193.
- Hyde, K.D., Cai, L., Cannon, P.F., Crouch, J.A., Crous, P.W., Damm, U., Goodwin, P.H., Chen, H., Johnston, P.R., Jones, E.B.G., Liu, Z.Y., McKenzie, E.H.C., Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycook, S.R., Pfenning, L.H., Prihastuti, H., Sato, T., Shivas, R.G., Tan, Y.P., Taylor, P.W.J., Weir, B.S., Yang, Y.L. and Zhang, J.Z. 2009b. *Colletotrichum*-names in current use. *Fungal Diversity* 39: 147-182.
- Hyde, K.D., Cai, L., McKenzie, E.H.C., Yang, Y.L., Zhang, J.Z., Prihastuti, H. 2009a. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity* 39: 1-17.
- Hyde, K.D., Soyong, K. 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 33: 163-173.
- Inácio, M.L., Silva, G.H., Teles, H.L., Trevisan, H.C., Cavalheiro, A.J., Bolzani, V.S., Young, M.C.M., Pfenning, L.H., Araújo, A.R. 2006. Antifungal metabolites from *Colletotrichum*

- gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Cryptocarya mandioccana* Nees (Lauraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 822-824.
- Kamei, S.H., Costa, J.F., Netto, M.S.B, Assunção, I.P., Lima, G.S.A. 2014. Identificação e caracterização de espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose de anonáceas no estado de Alagoas. *Revista Brasileira de Fruticultura* 36:209-216.
- Knapp, D.G., Pintye, A., Kovács, G.M. 2012. The dark side is not fastidious – dark septate endophytic fungi of native and invasive plants of semiarid sandy areas. *Plos one* 7 (2): 32570.
- Kumar, N., Jhang, T., Satyavir, Sharma, T.R. 2010. Molecular and pathological characterization of *Colletotrichum falcatum* infecting subtropical Indian sugarcane. *Journal of Phytopathology*. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2010.01759.x
- Lacap, D.C., Hyde, K.D., Liew, E.C.Y. 2003. An evaluation of the fungal ‘morphotype’ concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity* 12: 53–66.
- Lana, T.G., Azevedo, J.L., Pomella, A.W., Monteiro, R.T., Silva, C.B., Araújo, W.L. 2011. Endophytic and pathogenic isolates of the cacao fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa* (Tricholomataceae) are indistinguishable based on genetic and physiological analysis. *Genetics and Molecular Research* 10(1): 326-334.
- Larran, S., Mònaco, C., Alippi, H.E. 2001. Endophytic fungi in leaves of *Lycopersicon esculentum* Mill. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 17: 181-184.
- Likar, M.M., Regvar. 2009. Application of temporal temperature gradient gel electrophoresis for characterization of fungal endophyte communities of *Salix caprea* L. in a heavy metal polluted soil. *Science of the Total Environment* 407(24): 6179-87.
- Lima, J.S., Figueiredo, J.G., Gomes, R.G., Stringari, D., Goulin, E.H., Adamoski, D., Kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L.V., Glienke, C. 2012. Genetic Diversity of *Colletotrichum* spp. an Endophytic Fungi in a Medicinal Plant, Brazilian Pepper Tree. *International Scholarly Research Network (ISRN) Microbiology*. Disponível em: <<http://www.isrn.com/journals/microbiology/2012/215716/>>. Acesso em: 15 julho 2013.
- Lima, J.S., Figueiredo, J.G., Gomes, R.G., Stringari, D., Goulin, E.H., Adamoski, D., Kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L.V., Glienke, C. 2012. Genetic Diversity of *Colletotrichum* spp. an endophytic fungi in a medicinal plant, brazilian pepper tree. *International Scholarly Research Network Microbiology*. DOI: 10.5402/2012/215716.
- Liu, C. H.; Zou, W. X.; Lu, H.; Tan, R. X. 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology* 88: 277-282.
- Lu, G., Cannon, P.F., Reid, A., Simmons, C.M. 2004. Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycological* 108: 53-63. DOI: 10.1017/S0953756203008906.
- Luz, J. S., Silva, R.L.O., Silveira, E.B., Cavalcante, U.M.T. 2006. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas do maracujazeiro-amarelo. *Revista caatinga*. 19 (2): 128-134.
- Maccheroni Jr., W., Araújo, W.L., Azevedo, J.L. 2004. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. *Scientia Agricola* 61 (3): 298-302.
- Maciel, D.B.; Medeiros, L.V. de; Medeiros, V.V.de; Leão, M.P.C.; Camargo, L.E.A.; Oliveira, N.T.de. 2010. Amplification of the *cap20* pathogenicity gene and genetic characterization using different markers molecular in *Colletotrichum gloeosporioides* isolates. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53 (6): 1255-1265,
- Maheshwari, R. 2006. What is an endophytic fungus? *Current Science* 90(10): 1309.
- Maki, C.S. 2006. *Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (Theobroma cacao L.)*. Tese (Doutorado: Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 127p.
- Marino Neto, L. 1986. *Acerola: a cereja tropical*. São Paulo, Nobel.

- Martín-García, J., Espiga, E., Pando, V., Diez, J.J. 2011. Factors influencing endophytic communities in poplar plantations. *Silva Fennica* 45(2): 169–180.
- Martins, M. K. 2005. *Variabilidade genética de isolados de Fusarium spp. e estudo da interação com a planta hospedeira*. Tese (Doutorado: Genética e Melhoramento de Plantas), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo, Piracicaba. 110p.
- McKay, S.F., Freeman, S., Minz, D., Maymon, M., Sedgley, M., Collins, G.C., Scott, E.S. 2009. Morphological, genetic, and pathogenic characterization of *Colletotrichum acutatum*, the cause of anthracnose of almond in Australia. *Phytopathology* 99 (8): 985-995. DOI: 10.1094 /PHYTO-99-8-0985.
- Mejía, L.C.; Rojas, E.R.; Maynard, Z.; Bael, S.V.; Arnold, A.E.; Hebbbar, P.; Samuels, G.J.; Robbins, N.; Herre, E.A. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control* 46(1): 4-14.
- Mendes, A.M.S., Oliveira, A.R., Teixeira, A.H.C., Bastos, D.C. et al. 2012. *A cultura da acerola*. 3ª edição. Brasília, EMBRAPA.
- Mills, P.R., Sreenivasaprasad, S., Brown, A. E. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiology Ecology* 98: 137-144.
- Montri, P., Taylor, P.W.J., Mongkolporn, O. 2009. Pathotypes of *Colletotrichum capsici*, the causal agent of chili anthracnose, in Thailand. *Plant Disease* 93:17-20.
- Motohashi, N., Wakabayashi, H., Kurihara, T., Fukushima, H., Yamada, T., Kawase, M., Sohara, Y., Tani, S., Shirataki, Y., Sakagami, H., Satoh, K., Nakashima, H., Molnár, A., Spengler, G., Gyémánt, N., Ugocsai, K., Molnár, J. 2004. Biological activity of Barbados cherry (*Acerola* fruits, fruit of *Malpighia emarginata* DC) extracts and fractions. *Phytotherapy Research* 18: 212– 223.
- Nogueira R.J.M.C., Moraes J.A.P.V., Burity H.A., Silva Jr.J.F. 2002. Efeito do estágio de maturação dos frutos nas características físico-químicas de acerola. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37: 463–470.
- Nuangmek, W., McKenzie, E.H.C., Lumyong, S. 2008. Endophytic fungi from wild banana (*Musa acuminata* Colla) works against anthracnose disease caused by *Colletotrichum musae*. *Research Journal of Microbiology* 3 (5): 368-374.
- Odum, E.P. 1985. *Ecologia*. Rio de Janeiro, Interamericana.
- Oki, Y., Soares, N., Belmiro, M.S., Junior, A.C., Fernandes, G.W. 2009. Influência dos fungos endofíticos sobre os herbívoros de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). *Neotropical Biology and Conservation* 4(2): 83-88.
- Olbrich, M., Knappe, C., Wenig, M., Gerstner, E., Häberle, K.H., Kitao, M., Matyssek, R., Stich, S., Leuchner, M., Werner, H., Schlink, K., Müller-Starck, G., Welzl, G., Scherb, H., Ernst, D., Heller, W., Bahnweg, G. 2010. Ozone fumigation (twice ambient) reduces leaf infestation following natural and artificial inoculation by the endophytic fungus *Apiognomonina errabunda* of adult European beech trees. *Environmental Pollution* 158:1043–1050.
- Oliveira, J.R.P., Soares Filho, W.S. 1998. Situação da cultura da acerola no Brasil e ações da Embrapa Mandioca e Fruticultura em recursos genéticos e melhoramento. In: *Simpósio de Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste do Brasil*. Petrolina. **Anais...** Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 1998.
- Orole, O.O., Adejumo, T.O. 2009. Activity of fungal endophytes against four maize wilt pathogens. *African Journal of Microbiology Research* 3(12): 969-973.
- Peixoto-Neto, A. S. P.; Azevedo, J. L.; Caetano, L. C. 2004. Microrganismos endofíticos em plantas: Status atual e perspectivas. *Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 3(4): 69-72.

- Peixoto-Neto, P.A.S.; Azevedo, J.L.; Araújo, W.L. Microrganismos endofíticos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 29, 2002. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/micro.asp>>. Acesso em: 14 nov. 2012.
- Pereira, G.M.D., Ribeiro, K.G., Júnior, P.I.F., Vital, M.S.S., Kasuya, M.C.M., Zilli, J.E. 2011. Ocorrência de fungos endofíticos "dark septate" em raízes de *Oryza glumaepatula* na Amazônia. *Pesquisa Agropecuária brasileira* 46(3): 331-334.
- Pereira, J.O., Carneiro-Vieira, M.L., Azevedo, J.L. 1999. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15:37-40.
- Perfect, S.E., Hughes, H.B., O'Connell, R.J., Green, J.R. 1999. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology* 27:186-198.
- Petrini O. 1991. Fungal endophyte of tree leaves. In: Andrews J., Hirano S.S. (eds.). *Microbial ecology of leaves*, New York, Springs Verlag, pp. 179-197.
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P., Hyde, K.D. 2001. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycological Research* 105: 1508-1513.
- Photita, W., Taylor, P.W.J., Ford, R., Hyde, K.D., Lumyong, S. 2005. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity* 18: 117-133.
- Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity* 39: 89-109.
- Rampersad, S.N. 2013. Genetic structure of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato isolates infecting papaya inferred by multilocus ISSR markers. *Phytopathology* 103(2): 182-189.
- Redman, R.S., Sheehan, K.B., Stout, R.G., Rodriguez, R.J., Henson, J.N. 2002. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* 298:1581.
- Ritzinger, R., Ritzinger, C.H.S.P. 2004. *Acerola - Aspectos Gerais da Cultura*. Acerola em foco 9. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/produto_em_foco/acerola_09.pdf>. Acesso em: 20 junho 2012.
- Ritzinger, R., Ritzinger, C.H.S.P., Cordeiro, Z.J.M. 2007. *Doenças em viveiro de mudas de aceroleira*. Acerola em foco 13. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/publicacoes/produto_em_foco/acerola_13.pdf>. Acesso em: 20 junho 2012.
- Rocha, R., Luz, D.E., Engels, C., Pileggi, S.A.V., Jaccoud Filho, D.S., Matiello, R.R., Pileggi, M. 2009. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for in vitro biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Brazilian Journal of Microbiology* 40:73-78.
- Rodriguez, R., Redman, R. 2008. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 59 (5): 1109-1114.
- Rohlf, F.J. 2000. *NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Manual. Applied Biostatistics. Inc. New York.
- Rojas, E.I., Rehner, S.A., Samuels, G.J., Van Bael, S.A., Herre, E.A., Cannon, P., Chen, R., Pang, J., Wang, R., Zhang, Y., Peng, Y.Q., Sha, T. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. associated with *Theobroma cacao* and other plants in Panamá: multilocus phylogenies distinguish host-associated pathogens from asymptomatic endophytes. *Mycologia* 102(6): 1318-1338. DOI: 10.3852/09-244.
- Romão, A.S., Spósito, M.B., Andreote, F.D., Azevedo, J.L., Araújo, W.L. 2011. Enzymatic differences between the endophyte *Guignardia mangiferae* (Botryosphaeriaceae) and the citrus pathogen *G. citricarpa*. *Genetics and Molecular Research* 10 (1): 243-252.

- Romero, A., Carrion, G., Rico-Gray, V. 2001. Fungal latent pathogens and endophytes from leaves of *Parthenium hysterophorus* (Asteraceae). *Fungal Diversity* 7: 81-87.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Rosa, L.H., Vieira, M.L.A., Santiago, I.F., Rosa, C.A. 2010. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*) in Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology* 73: 178–189.
- Rubini, M.R., Silva-Ribeiro, R.T., Pomella, A.W.V., Maki, C.S., Araújo, W.L., Santos, D.R., Azevedo, J.L. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences*. 1: 24-33
- Saikkonen, K., Faeth, S.H., Helander, M., Sullivan, T.J. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 29: 319–343.
- Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M., Faeth, S.H. 2004. Evolution of endophyte–plant symbioses. *TRENDS in Plant Science* 9(6): 275-280.
- Salla, M.F.S., Ruas, C.F., Ruas, P.M., Carpentieri-Pípolo, V. 2002. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 24(1): 015-022.
- Schena, L., Mosca, S., Cacciola, S.O., Faedda, R., Sanzani, S.M., Agosteo, G.E., Sergeeva, V., Magnano di San Lio, G. 2014. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose. *Plant Pathology* 63(2): 437-446.
- Scholtysik, A., Unterseher, M., Otto, P., Wirth, C. 2012. Spatio-temporal dynamics of endophyte diversity in the canopy of European ash (*Fraxinus excelsior*). *Mycological Progress* DOI: 10.1007/s11557-012-0835-9.
- Schreckinger, M.E., Lotton, J., Lila, M.A., Mejia, E.G. 2010. Berries from South America: A Comprehensive Review on Chemistry, Health Potential, and Commercialization. *Journal of Medicinal Food* 13(2): 233–246.
- Schulz, B., Boyle, C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research* 109(06): 661-686.
- Serra, I.M.R.S.; Silva, G.S. da. 2004. Caracterização morfofisiológica de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* agentes de antracnose em frutíferas no maranhão. *Summa Phytopathologica* 30 (4): 475-480.
- Shamsi, S., Sultana, R., Fatema, Y. 2012. Association of fungi with breadfruit (*Artocarpus altilis* FOSB.). *Journal of Bangladesh Academy of Sciences* 36 (1): 143-146.
- Sharma, G., Shenoy, B.D. 2013. Multigene sequence-based identification of *Colletotrichum cymbidiicola*, *C. karstii* and *C. phyllanthi* from India. *Czech Mycology* 65(1): 79–88.
- Shi, T., Li, C.P., Li, J.F., Cai, J.M., Huang, G.X. 2010. First report of leaf spot caused by *Bipolaris setariae* on cassava in China. *Plant Disease* 94 (7): 919-919.
- Silva, G.S., Rodrigues, A.A.C., Soares Júnior, A.C. 1997. Mancha de *Corynespora* em Acerola (*Malpighia glabra* L.). *Fitopatologia Brasileira* 22:452.
- Siqueira, M. V., Braun, U., Souza-Motta, C. M. 2008. *Corynespora subcylindrica* sp. nov. - a new hyphomycete species from Brazil and a discussion on the taxonomy of corynespora-like genera. *Sydowia* 60(1): 113-122.
- Siqueira, V.M., Conti, R., Araújo, J.M., Souza-Motta, C.M. 2011. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. *Symbiosis* 53: 89-95.
- Soytong, K., Srinon, W., Rattanacherdchai, K., Kanokmedhakul, S. and Kanokmedhakul, K. 2005. Application of antagonistic fungi to control anthracnose disease of grape. *Journal of Agricultural Biotechnology* 1: 33-41.
- Staden, R., Beal, K.F., Bonfield, J.K. The Staden Package. 1998. Computer methods in molecular biology. *Bioinformatics Methods and Protocols* 132: 115-130.
- Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreans* an

- endophytic fungus of pacific yew. *Science* 260:214-216.
- Strobel, G., Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(04): 491-502.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 67(2): 257-268.
- Strobel, G.A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection* 5: 535–544.
- Suryanarayanan, T.S., Ravishankar, J.P., Venkatesan, G., Murali, T.S. 2004. Characterization of the melanin pigment of a cosmopolitan fungal endophyte. *Mycological Research* 108(8):974-978.
- Suryanarayanan, T.S., Senthilarasu, G., Muruganandam, V. 2000. Endophytic fungi from *Cuscuta reflexa* and its host plants. *Fungal Diversity* 4: 117-123.
- Suryanarayanan, T.S., Venkatesan G., Murali, T.S. 2003. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. *Current Science* 85(4): 489-493.
- Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. Kew, Commonwealth Mycological Institute.
- Swofford, D. L. (2002). *PAUP**. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sinauer Associates, Sunderland MA.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Tavares, S.C.H. 1995. *Doenças da acerola no Brasil*. Petrolina, EMBRAPA/CPATSA.
- Tejesvi, V.M., Mahesh, B., Nalini, M.S., Prakash, H.S., Kini, K.R., Subbiah, V., Shetty, H.S. 2005. Endophytic fungal assemblages from inner bark and twig of *Terminalia arjuna* W. & A. (Combretaceae). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 1535-1540.
- Thaug, M.M. 2008. A list of Hyphomycetes (and Agonomycetes) in Burma. *Australasian Mycologist* 27 (3): 149–172.
- Tiago, P.V., Carneiro-Leão, M.P., Lima, M.L.A., Oliveira, N.T., Luna-Alves Lima, E.A. 2011. Polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) based on internal transcribed spacer-RFLP, ISSR and intron markers. *Genetics and Molecular Research* 10 (3): 1565-1575.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. 2005. *Microbiologia*. 8ª edição. Porto Alegre, Artmed.
- Udayanga, D., Manamgoda, D.S., Liu, X., Chukeatirote, E., Hyde, K.D. 2013. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits? *Fungal Diversity* 61:165–179. DOI: 10.1007/s13225-013-0257-2.
- Unterseher, M., Reiher, A., Finstermeier, K., Otto, P., Morawetz, W. 2007. Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. *Mycological Progress* 6(3): 201–212.
- Urban, A.F., Junqueira, N.T.V., Ramos, V.H.V., Oliveira, M.A.S. 1996. Doenças da acerola e de frutos nos cerrados da região centro-oeste e Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira* 21:387.
- Vega, F.E., Simpkins, A., Aime, M.C., Posada, F., Peterson, S.W., Rehner, S.A., Infante, F., Castillo, A., Arnold, A.E. 2010. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawaii, Mexico and Puerto Rico. *Fungal Ecology* 3:122–138.
- Venâncio, M. *Produtor faz pesquisas e experiências com acerola*. 2000. Disponível em: <<http://www.jornal.atarde.com.br/arq01/ru160105.html>>. Acesso em: 01 junho 2012.
- Weir, B.S., Johnston, P.R., Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115–180.
- Wickert, E., Goes, A., Lemos, E.G.M., Souza, A., Silveira, É.L., Fernanda, P.D., Rinaldo, D. 2009. Relações filogenéticas e diversidade de isolados de *Guignardia* spp. oriundos de diferentes hospedeiros nas regiões ITS1-5,8s-ITS2. *Revista Brasileira de Fruticultura* 31(2): 360-380.

- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds.). PCR protocols: a guide to methods and applications. New York, Academic Press, pp. 315-322.
- Yang, Y., Cai, L., Yu, Z., Liu, Z., Hyde, K.D. 2011. *Colletotrichum* species on Orchidaceae in southwest China. *Cryptogamie* 32(3): 1-26
- Yang, Y.L., Liu, Z.Y., Cai, L., Hyde, K.D., Yu, Z.N., McKenzie, E.H.C. 2009. *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. *Fungal Diversity* 39: 123-146.
- Zabalgogea, I. 2008. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 6 (Special issue): 138-146.
- Zhang, C., Liu, S., Lin, F., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. 2007. *Trichoderma taxi* sp.nov., an endophytic fungus from Chinese yew *Taxus mairei*. *FEMS Microbiology Letters* 270: 90-96.
- Zhang, P., Zhou, P., Yu, L. 2009a. An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Current Microbiology* 59: 227-232.
- Zhao, K., Ping, W., Li, Q., Hao, S., Zhao, L., Gao, T., Zhou, D. 2009. *Aspergillus niger* var. *taxi*, a new species variant of taxol-producing fungus isolated from *Taxus cuspidata* in China. *Journal of Applied Microbiology* 107(4): 1202-1207.
- Zou, W.X., Meng, J.C., Lu, H., Chen, G.X., Shi, G.X., Zhang, T.Y., Tan, R.X. 2000. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *Journal of Natural Products* 63: 1529-1530.