

MICROBIOTA ENDOFÍTICA DE BROMÉLIAS EM RESTINGAS E ANTAGONISMO
DE *Trichoderma* spp. A *Fusarium guttiforme*

GUSTAVO DE ANDRADE BEZERRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO – 2017

MICROBIOTA ENDOFÍTICA DE BROMÉLIAS EM RESTINGAS E ANTAGONISMO
DE *Trichoderma* spp. A *Fusarium guttiforme*

GUSTAVO DE ANDRADE BEZERRA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal. ”

Orientador: Prof. DSc. Silvaldo Felipe da Silveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JULHO – 2017

FICHA CATALOGRÁFICAPreparada pela Biblioteca do **CCH / UENF**

076/2017

B574 Bezerra, Gustavo de Andrade.

Micobiota endofítica de bromélias em restingas e Antagonismo de *Trichoderma* spp. A *Fusarium guttiforme* / Gustavo de Andrade Bezerra – Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.

105 f. : il.

Bibliografia: f. – .

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2017.

Orientador: Silvaldo Felipe da Silveira.

1. Bioprospecção. 2. Biotecnologia. 3. Controle biológico. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 635.93485

MICROBIOTA ENDOFÍTICA DE BROMÉLIAS EM RESTINGAS E ANTAGONISMO
DE *Trichoderma* spp. A *Fusarium guttiforme*

GUSTAVO DE ANDRADE BEZERRA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.”

Aprovada em 20 de julho de 2017.

Comissão Examinadora:

Prof. Marcelo Vivas (D. Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) – UENF

Vicente Mussi-Dias (D. Sc., Produção Vegetal) - UENF

Prof. Vicente Martins Gomes (D. Sc., Produção Vegetal) - IFF

Prof. Silvaldo Felipe da Silveira (D. Sc., Fitopatologia) – UENF
(Orientador)

A Deus,
Aos meus pais
A minha avó
Aos meus irmãos
Ao meu sobrinho
Aos meus amigos

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus. A minha família pelo apoio e incentivo de sempre.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da UENF pela oportunidade.

A FAPERJ pela bolsa concedida para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Silvaldo Felipe da Silveira pela orientação.

Ao técnico. Dr. Vicente Mussi-Dias pelo carinho, apoio, companheirismo e importantes contribuições para a realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos Bia, Tathianne, Janielli e ao Pedro em especial pela ajuda sem medidas nos procedimentos de análises moleculares dos fungos, por estarem sempre dispostos a ajudar, e por colaborarem na execução deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pela contribuição em minha formação acadêmica.

Ao laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal (LMGV), no nome da Pós-doutoranda Fernanda, pela ajuda sem medidas com os protocolos de análise molecular de fungos.

Aos colegas de laboratório, pelo apoio, incentivo e momentos de descontração.

Aos amigos que fiz no decorrer da luta pela obtenção deste título. Aos meus amigos, de minha terra natal, agradeço o apoio incomparável.

Ao meu primeiro contato familiar campista: Mônica, Leide e Alex, um apoio essencial.

Ao Ruan Gonçalves, de forma especial, por me apoiar, incentivar, não me fazer desistir nas horas mais difíceis, por me aturar com assuntos que não lhe cabia

conhecimento, por vibrar junto comigo nas minhas conquistas, por me dar uma família e um alicerce de forma irreparável na minha vida.

Ao pai (Tércio Luis), mãe (Nélia), que a vida me deu de presente nessa jornada e que vibraram junto comigo em cada passo e conquista nessa fase.

Aos demais, agradeço.

SUMÁRIO

	RESUMO	x
	ABSTRACT	xiii
1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	4
2.1	Objetivo geral.....	4
2.2	Objetivos específicos.....	4
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1	Ecossistema Restinga.....	5
3.2	Bromeleaceas.....	7
3.3	Fungos endofíticos e suas potencialidades.....	9
3.4	Caracterização molecular de fungos.....	12
3.5	Filogenética molecular.....	13
4	Trabalhos	16
4.1	Fungos endofíticos em bromélias do Parque Nacional de Restingas de Jurubatiba, RJ	16
	Resumo.....	16
	Abstract.....	17
1	Introdução.....	19
2	Material e Métodos.....	21
2.1	Área de Coleta.....	21
2.2	Coleta de Material Botânico.....	22
2.3	Isolamento e preservação dos fungos.....	23
2.4	Identificação e caracterização dos fungos	24

2.5	Análise dos dados	24
3	Resultados e Discussão.....	24
3.1	Caracterização dos grupos de isolados endofíticos obtidos das bromélias.....	27
3.1.1	Gênero <i>Aspergillus</i>	28
3.1.2	Gênero <i>Bipolaris</i>	29
3.1.3	Gênero <i>Curvularia</i>	31
3.1.4	Gênero <i>Monília</i>	32
3.1.5	Gênero <i>Penicillium</i>	33
3.1.6	Gênero <i>Pestalotiopsis</i>	35
3.1.7	Gênero <i>Nigrospora</i>	37
3.1.8	Gênero <i>Trichoderma</i>	38
	Considerações finais.....	42
	Referências bibliográficas.....	44
4.2	Identificação e seleção de espécies de <i>Trichoderma</i> spp. endofíticos de bromélias como agentes de biocontrole.....	50
	Resumo.....	50
	Abstract.....	51
1	Introdução.....	52
2	Material e métodos.....	54
2.1	Origem dos isolados de fungos.....	54
2.2	Extração de DNA e sequenciamento para identificação de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	54
2.3	Análise filogenética.....	57
2.4	Antagonismo por cultivo pareado.....	57
2.5	Ação inibitória de metabólitos voláteis, não-voláteis e termoestabilidade de não-voláteis.....	58
2.6	Teste de biocontrole <i>in vivo</i>	59
2.7	Análises estatísticas.....	60
3	Resultados e Discussão.....	60
3.1	Identificação de espécies de <i>Trichoderma</i> spp.....	60
3.2	Avaliação do antagonismo em cultura pareada.....	62

3.3	Avaliação do efeito inibitório de metabólitos voláteis, não-voláteis e não-voláteis termoestáveis produzidos por isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	64
3.4	Biocontrole <i>in vivo</i> de <i>F. gutiforme</i> em frutos de abacaxi.....	66
	Considerações finais.....	68
	Referências Bibliográficas.....	69
	Resumos geral das considerações finais.....	74
	Referências bibliográficas.....	76

RESUMO

Bezerra, Gustavo de Andrade, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Julho de 2017. Título " **MICROBIOTA ENDOFÍTICA DE BROMÉLIAS EM RESTINGAS E ANTAGONISMO DE *Trichoderma* spp. A *Fusarium guttiforme***" Orientador: Prof. Silvaldo Felipe da Silveira.

Restingas é um ecossistema do bioma Mata Atlântica que compreende grande parte do litoral brasileiro e praticamente nada se conhece sobre a diversidade de fungos ou das doenças ocasionadas por estes em plantas presentes na mesma, durante o seu estabelecimento no habitat, as plantas desenvolvem a capacidade de interagir com diferentes espécies de seres vivos, dentre eles os fungos. Fungos endofíticos fazem parte dessa diversidade em interação com bromélias e microrganismos que vivem nas plantas durante pelo menos uma parte do seu ciclo de vida sem causar qualquer manifestação visível da doença. Exposto isso, o presente trabalho objetivou identificar e descrever a diversidade de fungos endofíticos cultiváveis associados a Bromeliaceae no ecossistema da restinga de Jurubatiba, estado do Rio de Janeiro, identificar e selecionar espécies endofíticas de *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole. Amostras de folhas de plantas saudáveis foram coletadas para o isolamento de fungos endofíticos de 2 espécies de bromélias habitantes da restinga: *Aechmea nudicaulis* (espécie 1) e *Bromelia antiacantha* (espécie 2). As plantas foram coletadas de forma aleatória, percorrendo-se toda a faixa de restinga de sul a norte (30 pontos de coleta – 3 folhas da primeira espécie e 10 pontos de coleta da segunda espécie). Após a amostragem das folhas, em laboratório, com auxílio de um furador de rolha (1,3 cm de diâmetro) retirou-se 6 fragmentos do terço médio da base da bainha foliar, os

quais foram imersos em álcool 70% (1 min.), hipoclorito de sódio 1,5% (1 min.), álcool 70% (30 segs.) para retirar o excesso de hipoclorito e, tríplice lavagem em água destilada estéril. Os fungos isolados foram mantidos pelos métodos de Castellani e em tubos com meio inclinado. A observação das características morfológicas e culturais dos isolados foram feitas através de lâminas ao microscópio óptico, em colônias crescidas em BDA ou em microcultura. A caracterização morfológica das colônias foi por comparação entre as características distintas de cada isolado e dados da literatura. Procedeu-se a fotodocumentação dos fungos em microscópio óptico modelo Nikon i80, onde foi possível obter as medidas de estruturas. Os gêneros fúngicos identificados foram: *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Monilia* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., e *Trichoderma* sp. *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp. e *Monilia* sp. apresentaram um padrão de dominância entre as duas bromélias. Em *Aechmea nudicaulis* foram exclusivos os gêneros *Bipolaris* sp. e *Curvularia* sp., enquanto em *Bromelia antiacantha*, o gênero *Monilia* sp. foi exclusivo. Os demais gêneros identificados apresentaram um padrão de similaridade entre as plantas, com diferentes frequências dos isolados encontrados. Os isolados de todos os fungos obtidos foram depositados na Clínica Fitossanitária da UENF e 5 isolados de *Trichoderma* spp. foram selecionados para continuar os estudos de biocontrole contra *Fusarium gutiforme* patogênico a abacaxi. Foram realizadas Extração de DNA e sequenciamento para identificação dos isolados de *Trichoderma* spp e pela análise filogenética, foi possível agrupar os isolados na seção *Longibrachiatum*. Em seguida foram realizados testes de antiobose *in vitro* para seleção de possíveis antagonistas, além de testes *in vivo* em frutos de abacaxi para avaliar a capacidade inibitórias de crescimento e proliferação de *F. gutiforme*. Segundo a análise filogenética com base no gene ITS, os isolados de *Trichoderma* spp (CF/UENF440, CF/UENF441, CF/UENF442, CF/UENF443, CF/UENF444), pertencem a um novo clado, provavelmente de novas espécies e, com isso, devem ser realizados sequenciamentos nos outros genes para confirmação de espécies. Para os testes de antagonismo em culturas pareadas para inibir crescimento de *F. gutiforme*, o isolado CF/UENF440, se mostrou como um potencial agente de controle *in vitro*. Na avaliação do efeito inibitório por metabólitos voláteis, os isolados CF/UENF441, CF/UENF442, CF/UENF443, CF/UENF444 não apresentaram diferença significativa na inibição de crescimento de *Fusarium*; na avaliação dos metabólitos não-voláteis

e não-voláteis termoestáveis, destaca o isolado CF/UENF440 como potencial inibidor de crescimento de *F. gutiforme*, resultado esse, se equiparando ao teste de antagonismo por pareamento de culturas. Na avaliação do biocontrole *in vivo* em frutos de abacaxi, os isolados do antagonista não apresentaram efeito sobre o agente patogênico *F. gutiforme*.

Palavras-chave: Bioprospecção, biotecnologia, interação, controle biológico, antagonismo

ABSTRACT

Bezerra, Gustavo de Andrade, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. July, 2017. Title "**Mycobiota endophytic in bromelias of restingas and National Park of Jurubatiba, RJ and antagonism of *Trichoderma* spp. the *Fusarium gutiforme***" Advisor: Prof. Silvaldo Felipe da Silveira.

Restingas is an ecosystem of the Atlantic Forest biome that comprises a large part of the Brazilian coast and practically nothing is known about the diversity of fungi or the diseases caused by these in plants present in the same, during their establishment in the habitat, the plants develop the capacity of interact with different species of living beings, among them fungi. Endophytic fungi are part of this diversity in interaction with bromeliads and microorganisms that live in plants for at least part of their life cycle without causing any visible manifestation of the disease. The present work aimed to identify and describe the diversity of endophytic fungi associated with Bromeliaceae in the restinga ecosystem of Jurubatiba, state of Rio de Janeiro, to identify and select endophytic species of *Trichoderma* spp. as biocontrol agents. Samples of leaves of healthy plants were collected for the isolation of endophytic fungi from two species of bromeliads living in the restinga: *Aechmea nudicaulis* (species 1) and *Bromelia antiacantha* (species 2). The plants were collected in a random way, traversing the entire sandbank range from south to north (30 collection points - 3 leaves of the first species and 10 collection points of the second species). After sampling the leaves, in the laboratory, 6 fragments of the middle third of the base of the leaf sheath were removed using a corkscrew (1.3 cm diameter), which were immersed in 70% alcohol (1 min.), sodium hypochlorite 1.5%

(1 min.), 70% alcohol (30 secs.) to remove excess hypochlorite and triple wash in sterile distilled water. The isolated fungi were maintained by the Castellani methods and in tubes with inclined medium. The observations of the morphological and cultural characteristics of the isolates were made through slides under optical microscope, in colonies grown in BDA or microculture. The morphological characterization of the colonies was by comparison between the distinct characteristics of each isolate and data from the literature. The photodocumentation of the fungi was performed in Nikon i80 optical microscope, where it was possible to obtain the measurements of structures. The fungal genera identified were: *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Monilia* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., and *Trichoderma* sp. *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp. and *Monilia* sp. presented a pattern of dominance between the two bromeliads. in *Aechmea nudicaulis* the genera *Bipolaris* sp. and *Curvularia* sp., while in *Bromelia antiacantha*, the genus *Monilia* sp. was exclusive. The other genres identified had a pattern of similarity between plants, with different frequencies of the isolates found. The isolates of all the fungi obtained were deposited in the Phytosanitary Clinic of UENF and 5 isolates of *Trichoderma* spp. were selected to continue the biocontrol studies against *Fusarium gutiforme* pathogenic to pineapple. DNA extraction and sequencing were performed to identify the isolates of *Trichoderma* spp and by phylogenetic analysis, it was possible to group the isolates in the Longibrachiatum section. Then in vitro antiobose tests were performed to select possible antagonists, as well as in vivo tests on pineapple fruits to evaluate the inhibitory capacity for growth and proliferation of *F. gutiforme*. According to the phylogenetic analysis based on the ITS gene, the isolates of *Trichoderma* spp (CF / UENF440, CF / UENF441, CF / UENF442, CF / UENF443, CF / UENF444) belong to a new clade, probably of new species and, sequencing of the other genes for species confirmation. For the antagonistic tests in paired cultures to inhibit *F. gutiforme* growth, CF / UENF440 isolate was shown to be a potential in vitro control agent. In the evaluation of the inhibitory effect by volatile metabolites, the isolates CF / UENF441, CF / UENF442, CF / UENF443, CF / UENF444 showed no significant difference in inhibition of *Fusarium* growth; in the evaluation of the non-volatile and non-volatile thermostable metabolites, highlights the CF / UENF440 isolate as a potential growth inhibitor of *F. gutiforme*, which is equivalent to the antagonism test

by crop pairing. In the evaluation of in vivo biocontrol in pineapple fruits, the isolates of the antagonist had no effect on the pathogenic agent *F. gutiforme*.

Keywords: Bioprospecting, biotechnology, interaction, biological control, antagonismo

1. INTRODUÇÃO

As restingas como ecossistemas da Mata Atlântica compõem um mosaico de formações vegetais, florística e estruturalmente diferenciadas, variando desde fitofisionomia rasteira e herbácea próximas ao mar, passando por formações arbustivas, até florestais à medida em que se afasta do litoral (CONAMA, 2008). Frequentemente, essas formações encontram-se próximas umas das outras, não obstante associadas a áreas topograficamente diferenciadas. O relevo varia desde depressões, que apresentam afloramento do lençol freático com períodos, intensidade e frequência de inundação variados, até ambientes não inundáveis devido a topografia mais elevada, como dunas e cristas de cordões arenosos (Martins et al., 2008).

No Brasil, principalmente nas regiões sul e sudeste, as restingas tem sido alvo de estudos mais sistematizados, sobretudo levantamentos florísticos e estruturais (Assumpção e Nascimento, 2000), que evidenciam a importância desse ecossistema para a biodiversidade. Tal característica reside no fato das espécies que ocorrem nas restingas serem, na sua maioria, formas adaptadas de espécies vegetais oriundas da mata tropical chuvosa e que se estruturam em comunidades através de processos de interação positiva entre elas (Scarano et al., 2001).

Durante o seu estabelecimento no habitat, as plantas desenvolvem a capacidade de interagir com diferentes espécies de seres vivos, dentre elas os fungos. Levantamentos de fungos causadores de doenças de plantas ou não patogênicos, são importantes para se prever epidemias em plantas cultivadas,

origem genética de fitopatógenos e seus variantes, bem como na exploração do potencial biotecnológico de qualquer espécie fúngica associada ou não às plantas em habitats naturais, cujas particularidades e singularidades ecofisiológicas, podem possibilitar a detecção de constituintes ou associações que venham a ser de interesse direto do homem (Neto et al., 2003).

Em ecossistemas de restinga pouco se conhecem sobre a diversidade de fungos ou das doenças ocasionadas por estes em plantas (Mussi-Dias et al., 2016; Freire et al., 2016a), o que vem sendo sugerido ultimamente como fonte inesgotável de biodiversidade para fungos endofíticos (Mussi-Dias e Freire, 2013) pela riqueza, frequência e disponibilidade dessa flora nas explorações realizadas na região norte fluminense (Freire et al., 2016b; Freire et al., 2017).

As espécies vegetais já catalogadas em restingas são da ordem de 2000 até o momento (FLORA DO BRASIL, 2017) pertencentes a mãos de 160 famílias botânicas. Este número tende a crescer em função da criação de diversas unidades de conservação, tanto federais, estaduais quanto particulares, associadas a estudos de diversidade.

Destas espécies, as bromeliáceas se destacam por serem plantas tipicamente tropicais que consiste em mais de 56 gêneros e cerca de 3,5 mil espécies (Nunes, 2003). A sua abundancia em ambientes de Mata Atlântica que é considerado um dos centros de maior diversidade para a família é alta, cuja estimativa gira em torno de 40% das espécies e 73% dos gêneros descritos, tendo nas restinga brasileiras cerca de 116 espécies distribuídas em 18 gêneros (FLORA DO BRASIL, 2017).

Alguns fungos podem ser considerados patogênicos para as bromeliáceas, causando doenças como a fusariose, a mancha-negra-do-fruto, a podridão-do-olho, podridões-de-raízes e podridões em frutos e em mudas, causadas *Fusarium*, *Phytophthora*, *Thielaviopsis paradoxa* e outros, especialmente para a cultura do abacaxi (*Ananas comosus*) (Matos, 2000). Outras doenças relatadas para a família, incluem a antracnose e manchas foliares, causadas por *Colletotrichum* sp. e *Exserohilum rostratum*, respectivamente (Chase, 1992).

A presença de fungos endofíticos coexistindo em bromeliáceas ainda é incipiente e não se sabe a relação entre endofitismo e parasitismo nessa interação. Os fungos endofíticos estão associados intimamente com as espécies vegetais e, embora alguns possuam associação restrita com grupos específicos de vegetais,

outros são encontrados em diferentes espécies de plantas, sem uma seleção aparente (Bacon e Hinton, 2002). Esses organismos podem viver endofiticamente em diferentes partes das plantas, como raízes, ramos, folhas, sementes, frutos, tubérculos e mesmo em flores, colonizando os espaços intercelulares, vasos do xilema ou colonização intracelular (Mundt e Hinkle, 1976; Hallmann et al., 1997; Sturz et al., 1999; Garbeva et al., 2001). Desempenham variadas e estreitas relações ecológicas com seus hospedeiros, sem provocar sintomas de doença. (Araújo et al., 2002).

Os endófitos da parte aérea só recentemente têm despertado o interesse da comunidade científica, especialmente por seu potencial na produção de metabólitos de interesse econômico, incluindo àqueles produzidos pelas suas respectivas plantas hospedeiras (Souza et al., 2004). Assim, estudos nessa área são de grande importância devido à carência de informações para elucidar a base biológica da interação endofíto-planta. Além disso, os fungos endofíticos podem ser potencialmente vantajosos do ponto de vista econômico para exploração no biocontrole de pragas e de fitopatógenos, na produção de metabólitos de interesse médico-farmacológico, na promoção de crescimento vegetal, como vetores para a introdução de genes em plantas e na fixação biológica de nitrogênio (Chen et al., 1995; Liu et al., 1995; Sturz et al., 1997; Reinhold-hurek e Hurek, 1998; Sturz e Nowak, 2000), dentre outras aplicações.

Dessa forma, o estudo da biodiversidade de fungos associados às bromeliáceas de restinga compõe, é inédito e de interesse científico, quer seja para descrição de novas espécies de fungos e/ou para exploração do seu potencial biotecnológico.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Conhecer a diversidade de fungos endofíticos associados a duas espécies de Bromélias (*Aechmea nudicaulis* e *Bromelia antiacantha*) distribuídas ao longo da costa do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, estado do Rio de Janeiro (PNR-RJ).

2.2 ESPECÍFICOS

- Isolar, identificar e manter fungos endofíticos isolados de folhas de bromélias da restinga do PNRJ-RJ;
- Quantificar e verificar a frequência dos isolados obtidos;
- Identificar fungos com potencial de biocontrole de doenças de plantas e avaliá-los quanto à eficiência *in vitro* e *in vivo*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ecossistema Restinga

O termo restinga geralmente é utilizado para caracterizar as planícies costeiras ou planícies litorâneas arenosas (Carrasco, 2003; Tessler e Goya, 2005; Souza et al., 2008), e com base na resolução 303 de 13 de maio de 2002 do Ministério do Meio Ambiente, é o depósito arenoso paralelo à linha da costa, de forma geralmente alongada, produzido por processos de sedimentação, onde se encontram diferentes comunidades que recebem influência marinha, também consideradas comunidades edáficas por dependerem mais da natureza do substrato do que do clima. A cobertura vegetal nas restingas ocorre em mosaico, sendo encontrada em praias, em cordões arenosos, nas dunas e em depressões, apresentando, de acordo com o estágio sucessional, estrato herbáceo, arbustivo e arbóreo, este último mais interiorizado e distante da beira mar. Entretanto, em ecologia, o termo restinga é utilizado para se referir a todos os tipos de vegetação estabelecidos nestas planícies costeiras quaternárias (Souza et al., 2008), com pouca riqueza de espécies, baixa produtividade e pequena complexidade, se comparadas a outras formações florestais (Scarano, 2002).

Mesmo assim, as variações nas formações vegetais das restingas devem-se à diversidade de origem, topografia e condições ambientais das planícies arenosas que propiciam a formação de muitos habitats e, conseqüentemente, a existência de uma flora rica e variada (Sugiyama, 1998; Lopes 2007), apresentando, de maneira geral, aumento na complexidade da vegetação no

sentido oceano-continente (Mantovani, 2000; Lopes, 2007) e a Floresta Atlântica é a principal fonte de espécies ocorrentes nas restingas das regiões Sul e Sudeste brasileiras (Scherer et al., 2005).

Por estarem estabelecidas sobre solos arenosos, altamente lixiviados e pobres em nutrientes, essas formações vegetacionais são muito frágeis e passíveis de perturbações, o que dificulta a recuperação de áreas degradadas (Araújo e Lacerda, 1987) e a obtenção de dados mais conclusivos que, segundo Rodrigues (2000), são escassos.

Regiões como estas estão submetidas às condições ambientais extremas, caracterizadas por altas temperaturas, ventos constantes, elevada salinidade e deficiência em nutrientes (Scarano et al., 2001; Scarano, 2002). Variações fisionômicas são observadas desde a região pós-praia até as áreas mais interiores da planície costeira (Velooso et al., 1991; Oliveira-Filho e Carvalho, 1993). As formações herbáceas, arbustivas e florestais constituem as principais fisionomias de restinga, baseadas na estrutura da vegetação (Silva e Britez, 2005). Sua diversidade biológica é proveniente do Cerrado, da Caatinga e de outros ecossistemas da Mata Atlântica, e representada por espécies aclimatadas à faixa litorânea. A riqueza florística e a diversidade funcional das restingas aumentam gradativamente das dunas em direção às formações florestais mais distantes do mar (Araújo, 2000).

As comunidades de restinga dependem das condições edáficas e exercem uma importante ação sobre a estabilização do substrato nesse ambiente (Assumpção e Nascimento, 2000). Apesar dessa dependência, os principais estudos sobre os padrões de diversidade ao longo dos 5.000 km de extensão de restinga no litoral brasileiro (Holzer et al., 2004) focam, principalmente, nos levantamentos florísticos e fitossociológicos (Almeida Jr. et al., 2011).

Em restingas há uma riqueza de espécies levantadas no Rio de Janeiro e Espírito Santo (Pereira e Araújo, 2000). As famílias Fabaceae, Myrtaceae e Rubiaceae são citadas entre as principais famílias dos ecossistemas brasileiros (Souza & Lorenzi, 2005; Tonhasca-Junior, 2005) e a representatividade florística dessas famílias nas Restingas também é mencionada (Pereira e Assis, 2000; Pereira e Araújo, 2000; Assis et al., 2004). As famílias Orchidaceae e Bromeliaceae são características das regiões neotropicais (Tonhasca-Junior, 2005), ocorrendo no território com elevada riqueza de espécies. Dessa forma, analisando levantamentos

em toda a costa brasileira, Assis et al. (2004) propuseram que as famílias Myrtaceae, Rubiaceae, Orchidaceae e Bromeliaceae, ao se destacarem no que tange à riqueza de espécies, podem ser consideradas como as principais famílias das restingas brasileiras.

3.2 Bromeliáceas

A família Bromeliaceae pertence à ordem Poales, que abrange cerca de um terço das monocotiledôneas, num universo de aproximadamente 20.000 espécies de plantas, apresentando grande variabilidade de formas, sendo em geral, segundo Rizzini (1997) e Benzing (2000), plantas bem características quanto à floração. Essas características são conferidas às bromélias por estarem em diferentes habitats e, especialmente, pela natureza do substrato que influencia no aspecto da planta, podendo variar amplamente em tamanho, coloração das folhas e morfologia das flores.

As bromélias podem ser classificadas como epífitas, terrestres ou rupícolas (Pauletti, 2002) e compreendem aproximadamente 3.300 espécies distribuídas em 58 gêneros (Luther, 2010). Está dividida nas subfamílias Brocchinioideae, Bromelioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Navioideae, Pitcairnioideae, Puyoideae e Tillandsioideae (Givnish et al., 2011), sendo essencialmente neotropical, com exceção de uma espécie que ocorre na costa oeste da África (*Pitcairnia feliciana* (A. Chev.) Harms & Mildbr.) (Smith e Downs, 1974). E de acordo com Benzing (2000), quase todas as Pitcairnioideae são terrestres, algumas Bromelioideae são epífitas e a maioria das Tillandsioideae é epífita. O fato de mais da metade das espécies de bromélias serem epífitas obrigatórias ou facultativas ressalta a relevância de seu papel biológico, à medida que essas plantas criam no interior das florestas nichos ecológicos em diversos patamares, bem acima do solo. Soma-se a isso o grande contingente de espécies rupícolas que tornam habitáveis as superfícies rochosas totalmente expostas e desprovidas de solo.

Essas plantas apresentam, em geral, inflorescência vistosa e folhas distribuídas em roseta, cujo papel eco fisiológico é de grande importância tanto para sua nutrição, como na constituição de um microambiente onde habitam diversos animais, como formigas, sapos, aracnídeos e serpentes (Reitz, 1983).

As bromélias também desenvolveram complexas interações com outros vegetais, animais e microrganismos que são parciais ou totalmente dependentes do micro-habitat aquático formado em seus tanques. Essas interações são muito importantes para que os indivíduos se alimentem, encontrem abrigo, se acasalem e cuidem de sua prole (Del-Claro, 2012).

Dessa maneira, podemos dividir as associações coevolutivas entre invertebrados e bromélias em três tipos, dos quais podem ser encontrados especialistas associados somente às bromélias, e os generalistas que ocupam *habitats* similares (Frank et al., 2004), que são: a) animais e organismos que se alimentam da bromélia consumindo suas folhas, néctar, peças florais, frutos, sementes ou pólen; b) organismos aquáticos que utilizam o tanque durante seus estágios imaturos, e; c) organismos terrestres para os quais as bromélias fornecem refúgio, umidade, local para reprodução e potenciais presas.

A quase totalidade dos representantes desta família é classificada como organismos fitotélmicos (plantas formadoras de rosetas). Nas cisternas ou tanques, formados pelo imbricamento das folhas destes indivíduos, é comum o acúmulo de água (fitotelmata), e matéria orgânica em decomposição, que serve de alimento para uma variedade de outros organismos incluindo protistas, invertebrados e vertebrados que utilizam a água contida no tanque das bromélias para forrageamento, reprodução e refúgio contra predadores (Dias et al., 2000; Kitching, 2000; Vosgueritchian e Buzato, 2006; Ulissêa et al., 2007).

As bromélias desenvolveram, por isso, complexas interações com outros vegetais, animais e microrganismos que são parciais ou totalmente dependentes do microhabitat aquático formado em suas rosetas foliares, sem contar uma gama impressionante de polinizadores, consumidores de frutos e dispersores de sementes que também dependem das bromélias (Kaehler et al., 2005). Sendo assim, a riqueza e abundância de espécies de bromélia em um determinado bioma podem ser utilizadas para estimar o status de conservação do ambiente e a capacidade de suporte da biodiversidade (Leme e Marigo, 1983).

As bromélias se beneficiam das associações simbióticas por assimilar nutrientes da decomposição da matéria orgânica e dos excrementos e/ou morte dos animais que ela abriga (Benzing, 2000) e, provavelmente dos benefícios proporcionados pelas interações com os microrganismos, dentre eles os fungos endofíticos.

3.3 Fungos endofíticos e suas potencialidades

Desde a descoberta dos organismos endofíticos em 1904 por Darnel, vários pesquisadores os definiram de diferentes formas (Strobel e Daise, 2003). Entretanto, De Bary em 1866 foi quem primeiro delineou a diferença existente destes microrganismos com patógenos de plantas (Azevedo, 1999). Desse modo supõe-se que diversas interações entre vegetais e seus endofíticos foram aprimoradas e estabelecidas ao longo dos anos de evolução conjunta, incluindo relações de especificidade entre estes organismos e suas plantas hospedeiras (Tan e Zou, 2001; Strobel, 2003).

Os endófitos são microrganismos que vivem nas plantas durante pelo menos uma parte do seu ciclo de vida sem causar qualquer manifestação visível da doença (Bacon e White, 2000). "Endofitismo" é, portanto, um custo-benefício da associação única planta-micróbio definido por "localização" ("função" ou não) que é transitoriamente assintomática, discreta, e estabelecida inteiramente no interior dos tecidos vegetais do hospedeiro vivo (Kusari e Spiteller, 2012).

As bromélias, assim, servem como reservatório para inúmeros microrganismos endofíticos, que se diferenciam dos fitopatogênicos por não causarem doenças aparente e, distinguem-se também, dos fungos epifíticos que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais (Azevedo, 1998; Souza et al., 2004). Esta associação é considerada mutualística, onde os fungos endofíticos obtêm nutrientes e proteção das plantas hospedeiras, enquanto estas são provavelmente beneficiadas pelos seus metabólitos protegendo-as contra a herbivoria e ao ataque por fungos, bactérias e outros organismos patógenos. Vários endofíticos podem, ainda, auxiliar na fixação do nitrogênio, produção de fitohormônios, armazenamento de nutrientes e água, aumentando assim, a tolerância da planta hospedeira a ambientes inóspitos (Nejad e Johnson, 2000; Araújo et al., 2001; Omacine et al., 2001; Redman et al., 2002).

Há relatos que a interação entre plantas e fungos endofíticos teve início há centenas de milhares de anos, quando os vegetais surgiram no planeta, e existem evidências que confirmam esta associação em fragmentos miceliais destes microrganismos em tecidos fossilizados (Gunatilaka, 2005). Desse modo, supõe-se que as interações entre vegetais e seus endofíticos foram aprimoradas e estabelecidas ao longo dos anos, incluindo relações de especificidade entre estes

micro-organismos e suas plantas hospedeiras (Tan e Zou, 2001; Strobel, 2003). A interação fungos endofíticos - planta hospedeira é tradicionalmente considerada uma relação mutualística, na qual o vegetal fornece nutrição ao endófito e este provê alguma forma de proteção e melhorias à planta (Stone et al., 2000; Castillo et al., 2007; Backman et al., 2008). Os micro-organismos endofíticos se encontram na região do vegetal definida como endosfera, onde se estabelecem protegidos com vantagens competitivas sobre os micro-organismos presentes na rizosfera e filosfera. Na endosfera, os endófitos são favorecidos por condições ideais de nutriente, pH e umidade (Selosse et al., 2004; Gunatilaka, 2005; Kogel et al., 2006; Backmann et al., 2008; Linakoski et al., 2011), provavelmente, por meio dessa interação mutualística, ocorre influência na composição e sucessão da comunidade vegetal, bem como na ciclagem de nutrientes (Davitt et al., 2010).

Além disso, os endófitos frequentemente induzem alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em seus hospedeiros, o que pode afetar o desempenho da planta sob diferentes estresses bióticos ou abióticos, tais como déficit hídrico, elevada salinidade, alta concentração de metais no solo, resistência a ataques de insetos e herbívoros, tolerância à dessecação, proteção contra patógenos e, ainda, estimular o crescimento do vegetal (Rakotoniriana et al., 2007; Bayat et al., 2009).

A penetração desses fungos através do tecido vegetal ocorre por aberturas naturais, como estômatos e hidatódios, por meio de ferimentos e também pelas raízes, onde podem existir aberturas decorrentes da emergência de raízes laterais ou abrasões decorrentes do próprio crescimento ao penetrar no solo (Azevedo, 1998; Peixoto Neto et al., 2002). Além disso, podem penetrar por aberturas causadas por insetos e, até mesmo, diretamente pela cutícula, por meio da formação de apressórios (Carroll, 1988; Azevedo, 1998).

Todas as plantas, de maneira geral e em seu estado natural, possuem uma microbiota endofítica característica, importante para sua sanidade e manutenção (Azevedo, 1999). No entanto, quando se almeja detectar qualitativa ou quantitativamente esta biodiversidade, fatores como a idade da planta, o tecido ou órgão utilizado para estudo e os métodos de isolamento empregados podem interferir e devem ser considerados (Peixoto Neto et al., 2004; Hyde e Soyong, 2008).

Uma riqueza de fungos, a maioria deles pertencente ao Filo Ascomycota, tem sido detectada como endofítica (Hyde e Soyong, 2008). Uma flutuação

espacial e sazonal desses fungos em diversas espécies vegetais tem sido observada, podendo uma mesma espécie de fungo ocorrer ou não em determinada espécie vegetal, dependendo do local de cultivo, das condições ambientais e do estágio fenológico em que a planta se encontra (Gao et al., 2005; Mussi-Dias et al., 2012).

Dentre os diversos papéis benéficos desempenhados pelos fungos endofíticos na interação com seus hospedeiros, um dos principais é a proteção da planta contra doenças, por meio da competição com fitopatógenos por sítios de colonização, nutrientes e produção de antibióticos (Clarke et al., 2006; Ownley et al., 2010). Outra atividade já mencionada, que tem sido atribuída à essa interação, é a proteção das plantas contra o ataques por meio da produção de toxinas, como demonstrado na influência pela preferência e na performance de insetos herbívoros em reduzir danos às plantas (Crawford et al., 2010; Gange et al., 2012).

Já com relação à capacidade de atuarem como agentes inibidores de outros micro-organismos, os fungos endofíticos tem sido utilizados como agentes de biocontrole, como uma alternativa ao controle químico, podendo ser utilizados de forma direta, como antagonistas, ou indireta por meio do emprego de seus metabólitos (Di Piero e Garda, 2008; Morandi e Bettiol, 2009). Assim, o controle biológico de fitopatógenos refere-se ao uso de organismos que reduzem a atividade ou a sobrevivência dos agentes causadoras de doenças em plantas (Ownley et al., 2010) e, entre os mecanismos de biocontrole utilizados, podem ser destacados a antibiose, a competição por espaço, por ferro e outros nutrientes, o parasitismo e a indução de resistência no hospedeiro (Cao et al., 2009; Ownley et al., 2010).

Em função disso, uma abordagem para explicar como um endófito evita a ativação das defesas do hospedeiro, garantindo sua auto-resistência antes de ser incapacitado pelos metabólitos tóxicos do hospedeiro, Van Der Lelie et al. (2009) propuseram uma hipótese de "antagonismo equilibrado". Com isso, o fungo conseguiria crescer dentro de seu hospedeiro sem causar manifestações visíveis de infecção.

Considerando o fato de que os endófitos residem dentro das plantas e estão interagindo continuamente com elas, é provável que as mesmas também exerçam uma influência substancial nos processos metabólicos *in situ* dos endófitos.

A bioprospecção de fungos endofíticos capazes de produzir metabólitos secundários bioativos desejados implica, tradicionalmente, no rastreamento de uma

infinidade de endófitos diferentes isolados a partir de uma única planta hospedeira para identificar aquele "competente" para a característica desejada (Strobel, 2003). Ao se empregar a abordagem clássica de isolamento, apenas alguns ou até mesmo nenhum dos endófitos obtido seja capaz de possuir o potencial desejado. Aqueles tidos como "incompetentes", nesse caso, são descartados sem mais investigação levando à perda de todo o conjunto de produtos naturais que eles, por ventura sejam capazes de produzir em condições adequadas, imitando seu habitat natural. Contudo, estratégias recentes de sequenciamento de genoma completo revelaram que o número de genes que codificam as enzimas biossintéticas em vários fungos e bactérias é, sem dúvida, maior que os metabolitos secundários conhecidos destes microrganismos (Kogel et al., 2006). Portanto, é convincente que os endófitos descartados possam realmente expressar apenas um subconjunto de seus genes biossintéticos sob condições de laboratório padrão *in vitro*, de modo que somente uma pequena porção de seu potencial biossintético real seja aproveitada.

O grande reservatório de metabolitos naturais "crípticos" está, portanto, ainda inexplorado (Mussi-Dias e Freire, 2013). É possível que, em alguns casos, haja produção de compostos alvo desejados em quantidades abaixo do limite de detecção, às vezes acoplado a um grande "fundo metabólico" e condições de cultura discretas (Gange et al., 2012). Por isso, é necessário compreender e desvendar a interação química ecológica dos fungos endofíticos para explorar plenamente seu potencial inesgotável de biossíntese de produtos naturais (Ownley et al., 2010) e, para isso, o conhecimento da biodiversidade desses organismos em seus respectivos hospedeiros vem a ser o ponto de partida nos estudos de bioprospecção fúngica.

3.4 Caracterização molecular de fungos

As técnicas clássicas utilizadas para a caracterização fenotípica, tais como características morfológicas ou bioquímicas, principalmente auxotrofia (incapacidade de um organismo de sintetizar um composto orgânico necessário ao seu próprio crescimento), apresentam restrições nos estudos populacionais e muitas vezes de sistemática quando se objetiva a análise da variabilidade genética em microrganismos. A análise de proteínas, por meio da eletroforese de isoenzimas que detecta diferentes alelos dos genes, dada a diferença de mobilidade

eletroforética, tem sido utilizada com sucesso no estudo da variabilidade genética de populações de nematoides, mas possui baixa estabilidade nos estudos com organismos menores como por exemplo os fungos (Alfenas et al., 1991; Leuchtmann et al., 1992; Leuchtmann, 1994; Zervakis et al., 1994).

A possibilidade de se usar a técnica de eletroforese a fim de separar enzimas e proteínas totais extraídas de microrganismos, objetivando a identificação de fungos em nível de espécies ou mesmo subespécies, está hoje em desuso, sendo estes marcadores substituídos por outros baseados no DNA (ácido desoxirribonucléico).

Estes marcadores têm sido utilizados com sucesso para identificar espécies de fungos ou linhagens intraespecíficas e raças fisiológicas (Metzenberg, 1991; Magnani et al., 2005; Nozaki et al., 2006; Tiago et al., 2011; Ismail et al., 2012; Rodrigues et al., 2014). As técnicas baseadas nestes marcadores representam diretamente a variação genética, não estando sujeitas às influências do ambiente, nem sofrendo variações em função do estágio de desenvolvimento do organismo ou do tipo de tecido utilizado (Puterka et al., 1993).

3.5 Filogenética Molecular

Após Charles Darwin propor o conceito de ancestralidade entre espécies, o conceito de filogenia foi proposto e é de Darwin o primeiro diagrama publicado representando similaridade entre espécies. Assim, as filogenias podem ser definidas como a indicação das relações de ancestralidade supostas para um conjunto de espécies (Miyaki et al., 2001).

Desde os tempos de Darwin, a reconstrução da história evolutiva dos organismos e sua expressão em forma de árvore filogenética tem sido aspiração de muitos naturalistas. A proposta ideal seria a utilização de registros fósseis, porém os mesmos são fragmentados e incompletos, sendo utilizados métodos de comparação morfológica e fisiológica. (Nei e Kumar, 2000).

A biologia molecular tem mudado essa situação drasticamente. Uma vez que todas as informações genéticas dos organismos estão em moléculas de ácido nucleicos, podem-se estudar as relações evolutivas utilizando-se o DNA. Tanto as sequências proteicas quanto de DNA são usadas para inferência filogenética, sendo as proteínas que abriram o caminho para essa metodologia com o

sequenciamento da insulina em 1955, seguido vinte anos depois do sequenciamento de DNA de um bacteriófago, ambos por Sanger (Brown et al, 1955; Sanger e Coulson, 1975).

As técnicas moleculares possuem várias vantagens em relação à abordagem clássica: a primeira consiste no fato de o DNA ser formado de quatro nucleotídeos apenas, assim como proteínas consistem em 20 aminoácidos diferentes, de modo que podem ser utilizados para comparar grupos diversos de organismos; segundo, a evolução dessas moléculas segue um padrão mais ou menos regular, o que permite a utilização de modelos matemáticos para formular as mudanças e comparar organismos até pouco relacionados; e terceiro, os genomas consistem em sequências longas de nucleotídeos, que contém um número maior de informação filogenética em comparação aos caracteres morfológicos (Nei e Kumar, 2000).

Filogenia molecular refere-se ao estudo das relações evolucionárias entre os organismos pelo uso dos dados moleculares, como sequências de ácidos nucleicos e proteínas, ou outros marcadores moleculares (Lima, 2003). A lógica da inferência filogenética para caracteres moleculares e morfológicos é idêntica, mas os dois têm propriedades, métodos e conceitos diferentes (Ridley, 2004).

Em qualquer tipo de filogenia o sistemata deve estar como preocupação primordial a homologia (Russo, 2001), ou seja, em uma análise filogenética deve-se sempre utilizar caracteres homólogos das espécies. A homologia é um caráter compartilhado por duas ou mais espécies que estava presente no ancestral comum a elas (Hennig, 1966).

O termo homologia é utilizado erroneamente como sinônimo de similaridade. Esta última pode ser quantificada, enquanto que a outra trata de um termo qualitativo (Russo, 2001). Assim, em termos moleculares, a homologia não pode ser medida, e sim deve ser hipotetizada, já que concerne a uma história evolutiva do caráter em questão (dois caracteres são homólogos se suas partes idênticas ou semelhantes possuem origem comum). Dizer que caracteres apresentam 95% de homologia não está correto, e sim 95% de similaridade (Salemi e Vandamme, 2003).

Se um ancestral comum possui um estado diferente de um caráter, então esse caráter nas espécies descendentes evoluiu independentemente, o que é considerado uma homoplasia (Ridley, 2004). Para Hennig, a homologia deve ser

aceita na ausência de evidências do contrário, a “não homologia”. Como explica Schuh (2000), todas as similaridades são julgadas homólogas inicialmente, e a não homologia é detectada retrocedendo em direção ao mais recente ancestral; se a análise apoiar uma condição de sinapomorfia (conjunto dos caracteres que, surgindo ao longo da evolução, mantém-se em diversos grupos taxonômicos distintos), então é considerada uma homologia, se a condição derivada compartilhada teve origem independente, um evento de não homologia (homoplasia) foi descoberto. Vários fatores podem ser reponsáveis pelo surgimento das homoplasias. Nas evidências de DNA, podem surgir facilmente ao acaso, mas com caracteres morfológicos é pouco provável ser ao acaso. Nesse caso, a causa mais importante é a evolução convergente, quando a mesma pressão seletiva atuou em duas linhagens (Ridley, 2004).

Em biologia molecular, dois nucleotídeos em sequências diferentes são homólogos se, e somente se, as duas sequências adquiriram esse estado diretamente de seu ancestral comum (Page e Holmes, 1998). Para a filogenia molecular, a homologia por si só não é suficiente, pois dois processos podem gerar genes homólogos: a duplicação e a divergência gênica. No caso de um evento de duplicação gênica, os genes são chamados parálogos. Se esses genes passarem a ter histórias evolutivas independentes a partir de um evento de especiação, eles são chamados ortólogos. Dessa forma, para o estudo de eventos de duplicação gênica em famílias de genes, cópias parálogas de uma única espécie devem ser escolhidas; já para reconstrução filogenética de grupos taxonômicos, os genes ortólogos devem ser preferidos (Russo, 2001).

Quando duas sequências possuem características idênticas em um sítio, ou seja, o mesmo nucleotídeo ou aminoácido, estas não são necessariamente homólogas. Se esse caráter não foi adquirido de um ancestral comum, caracteriza-se como uma homoplasia, que seria resultado de evolução convergente. As homologias podem ser muito difíceis de serem distinguidas das homoplasias, especialmente no nível molecular. Isso porque as sequências são compostas unicamente por poucos símbolos (os quatro nucleotídeos, por exemplo) em uma ordem variante ao longo da sequência (Page e Holmes, 1998).

4. TRABALHOS

4.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS EM BROMÉLIAS DO PARQUE NACIONAL DA RESTINGA DE JURUBATIBA, RJ

RESUMO

Ao longo da evolução, as plantas se adaptaram aos diferentes habitats terrestres e desenvolveram a capacidade de interagir com diferentes espécies de seres vivos, dentre os quais, destacam-se os fungos. Alguns destes, denominados endófitos, vivem colonizando internamente as plantas durante pelo menos uma parte do seu ciclo de vida, sem causar doenças. No entanto, induzem alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em seus hospedeiros, o que pode conferir as plantas vantagens adaptativas, afetando seu desempenho, sob diferentes estresses bióticos e abióticos. Fungos endofíticos de grande interesse biotecnológico ou científico têm sido isolados e estudados a partir de plantas em diferentes biomas naturais. Restingas compreendem grande parte do litoral brasileiro e neste tipo de bioma, praticamente nada se conhece sobre a diversidade de fungos endofíticos. Objetivou-se neste trabalho identificar e descrever a diversidade de fungos endofíticos cultiváveis associados a Bromeliaceae da restinga de Jurubatiba, estado do Rio de Janeiro. Duas coletas foram realizadas no Parque Nacional de Restingas de Jurubatiba (PNRJ), localizada na costa do estado de Rio de Janeiro.

Amostras de folhas do terço superior de plantas saudáveis para o isolamento de fungos endofíticos foram direcionadas às seguintes espécies de bromélias habitantes desta restinga: *Aechmea nudicaulis* (L.) (coleta 1) e *Bromelia antiacantha* (coleta 2). As plantas foram coletadas de forma aleatória, percorrendo-se toda a faixa de restinga, de sul ao norte, visando-se cobrir toda a sua faixa mais representativa. No laboratório, sob condições assépticas, efetuou-se procedimento de isolamento de fungos endofíticos, os quais foram cultivados em meio de BDA (batata-dextrose-água) e mantidos pelos métodos de Castelani e em tubos com meio inclinado. Efetuou-se a caracterização morfológica das culturas em meio BDA e das estruturas reprodutivas dos fungos isolados, a partir de lâminas em lactofenol, sob microscópio óptico. Pode-se identificar os gêneros fúngicos: *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Monilia* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., e *Trichoderma* sp. Isolados de *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp. e *Monilia* sp. foram encontrados nas duas espécies amostradas, embora em percentuais distintos, conforme a espécie/coleta. Na espécie *A. nudicaulis* foram encontrados também isolados de *Bipolaris* sp. e de *Curvularia* sp., os quais não foram encontrados em *B. antiacantha*. Nesta segunda espécie foi identificado um isolado de *Monilia* sp., cuja morfologia aparenta se tratar de espécie incomum, a ser identificada. Dentro de cada gênero, os isolados foram agrupados e caracterizados em subtipos e, com base em levantamento bibliográfico, os fungos endofíticos encontrados poderão ser estudados para diferentes fins e identificados em nível de espécie.

Palavras-chave: Micobiota endofítica cultivável, Bromeliaceae.

ABSTRACT

Throughout the evolution, the plants adapted to the different terrestrial habitats and developed the capacity to interact with different species of living beings, among which, the fungi stand out. Some of these, called endophytes, live by colonizing plants internally for at least part of their life cycle without causing disease. However, they induce morphological, physiological and biochemical changes in their hosts, which can confer adaptive advantages on plants, affecting their performance, under different biotic and abiotic stresses. Endophytic fungi of great biotech or scientific

interest have been isolated and studied from plants in different natural biomes. Restingas comprise a large part of the Brazilian coast and in this type of biome, practically nothing is known about the diversity of endophytic fungi. The objective of this work was to identify and describe the diversity of endophytic fungi associated with Bromeliaceae from the restinga of Jurubatiba, state of Rio de Janeiro. Two collections were carried out in the National Park of Restingas de Jurubatiba (PNRJ), located on the coast of the state of Rio de Janeiro. Samples of leaves of the upper third of healthy plants for the isolation of endophytic fungi were directed to the following bromeliad species inhabiting this restinga: *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb (collection 1) and *Bromelia antiacantha* Bertol (collection 2). The plants were collected in a random manner, covering the entire range of restinga, from south to north, aiming to cover all their most representative range. In the laboratory, under aseptic conditions, an endophytic fungi isolation procedure was carried out, which were cultivated in BDA (potato-dextrose-agar) medium and maintained by Castelani methods and tubes with inclined medium. The morphological characterization of the cultures in BDA medium and the reproductive structures of the isolated fungi were carried out from slides in lactophenol under an optical microscope. It is possible to identify the fungal genera: *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Monilia* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., And *Trichoderma* sp. Isolates from *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp. and *Monilia* sp. Were found in the two species sampled, although in different percentages, according to the species / collection. In the *A. nudicaulis* species, isolates of *Bipolaris* sp. and *Curvularia* sp., Which were not found in *B. antiacantha*. In this second species was identified an isolate of *Monilia* sp., Whose morphology appears to be an unusual species, to be identified. Within each genus, the isolates were grouped and characterized in subtypes and, based on a bibliographical survey, the endophytic fungi found could be studied for different purposes and identified at the species level, since they may be considered of scientific-biotechnological interest. Will require specific studies, with the continuity of the research.

Keywords: Endophitic fungi, Bromeliaceae

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui 9.200 km de extensão de costa atlântica, sendo 5.000 km ocupados por ecossistema de restinga, ocorrendo desde o Rio Grande do Sul até o Amapá. Embora bastante extensa em comprimento, a largura da restinga varia de poucos metros a vários quilômetros, resultante de fenômenos relacionados à variação do nível do mar, às correntes marítimas, aos ventos fortes e aos processos de retenção de sedimentos (Rizzini, 1979). Esse ecossistema possui alta diversidade fitofisionômica, estando sob diversos tipos de influências bióticas e abióticas (Araújo et al., 2004; Menezes e Araújo, 2005), ora com predominância herbácea ou arbustiva, ora florestal, estabelecidas por influência no nível do lençol freático (Pereira, 2003).

Na diversidade vegetal das restinga, cujo quantitativo de famílias botânicas está em torno de 159, até o momento (Flora do Brasil, 2017), as Bromélias estão presentes nas mais diversas formações vegetais do ecossistema (Gomes e Silva, 2013). Pertencentes à família Bromeliaceae, ordem Poales, este grupo abrange cerca de um terço das monocotiledôneas, num universo de aproximadamente 20.000 espécies de plantas, representando grande variabilidade de formas, sendo em geral, plantas bem características quanto à sua floração. Essas características são conferidas às bromélias por possuírem diferentes habitats e, especialmente, porque a natureza do substrato influencia no aspecto da planta, que pode variar amplamente em tamanho e coloração das folhas, assim como na morfologia das flores (Schultz et al., 2012).

Em função dessas variações, as bromélias desenvolveram, complexas interações com outros vegetais, animais e microrganismos que são parciais ou totalmente dependentes do microhabitat aquático formado em suas rosetas foliares. Além disso, ocorre uma gama impressionante de polinizadores, consumidores de frutos e dispersores de sementes que também dependem das bromélias (Kaehler et al., 2005), cujas interações são extremamente importantes para que os indivíduos se alimentem, se abriguem e se desenvolvam por meio das relações mutualísticas, como, por exemplo, àquelas envolvendo microrganismos endofíticos (Del-Claro, 2012).

Os fungos endofíticos, dessa forma, são aqueles que vivem no interior das plantas, habitando a parte aérea, tais como os caules, ramos e folhas, sem causar,

aparentemente, qualquer dano aos seus hospedeiros (Linakoski et al., 2011) distinguindo-se dos fitopatogênicos e dos epifíticos, que causam doenças e que vivem na superfície da parte aérea da planta, respectivamente.

Esses organismos tornaram-se objeto de estudo de diversas pesquisas a fim de avaliar a ecologia, diversidade, fisiologia e adaptação da relação entre os parceiros (Rakotoniriana et al., 2007; Bayat et al., 2009). O interesse em investigar os fungos endofíticos reflete na natureza assintomática da interação com o hospedeiro, comparada ao mutualismo, porém, essa classificação é errônea devido a heterogeneidade dessas interações (Schulz et al., 2005), por ainda não serem bem compreendidas, uma vez que podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas (neste caso, estudadas pela fitopatologia) (Bae et al., 2009). Nas interações simbióticas os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta, tais como: a diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (Arnold et al., 2007; Akello et al., 2007; Redman et al., 2002; Bae et al., 2009). Dentre os metabólitos que podem ser induzidos pelos endófitos as fitoalexinas tem sido importantes pois são substâncias de baixo peso molecular que apresentam atividades antimicrobianas, produzidas pelas plantas ante a ação de microrganismos ou de agentes estressantes (Bayat et al., 2009). Da parte dos fungos podem-se citar a produção de micotoxinas e metabólitos secundários que podem causar doenças em humanos e outros animais (Hong et al., 2000; Rodrigues et al., 2003).

Dentro da planta, os microrganismos endofíticos se encontram na região definida como endosfera, se estabelecendo protegidos com vantagens competitivas sobre os microrganismos presentes na rizosfera e filosfera. Além disso, na endosfera, os endófitos são favorecidos por condições ideais de nutriente, pH e umidade (Backmann et al., 2008; Linakoski et al., 2011).

Normalmente, mais de uma espécie de fungo endofítico pode ser obtida dos mesmos tecidos de um único hospedeiro. Entretanto, a preferência pelo local de sua colonização pode ser um reflexo do conteúdo daquele tecido específico, uma vez que diferentes tecidos e órgãos vegetais podem representar microhabitats distintos (Santos et al., 2003).

Como as informações sobre fungos endofíticos em bromélias são escassas e muito menos àquelas relacionadas às espécies presentes no ecossistema de

restinga, nosso trabalho teve como objetivo isolar, identificar e realizar manutenção dos fungos endofíticos de duas espécies de bromélias comumente distribuída e encontrada em áreas da restinga do Parque Nacional de Restinga de Jurubatiba, RJ.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de coleta

Duas coletas de folhas de bromélias foram realizadas no Parque Nacional de Restingas de Jurubatiba (PNRJ) (22°16'41 "S; 41°39'41"W), localizado na costa norte do estado de Rio de Janeiro, Brasil (Figura 1). Segundo a classificação de Alvarez (2013), o clima predominante na região é do tipo tropical com inverno seco (Aw) com uma temperatura média anual entre 22 °C e 24 °C. A média anual de pluviosidade é de 1000 a 1300 mm. A área apresenta 14.922,39 hectares, 44 Km de costa e 18 lagoas costeiras, onde oss pontos de coletas foram gerados iniciando-se a partir do município de Macaé, passando por Carapebus e finalizando em Quissamã. Na coleta das amostras, foram obtidas as folhas de bromélias de vegetação de moitas em pleno sol, em uma faixa de vegetação após a faixa de areia que separa o mar do ecossistema aproximadamente de 2 em 2 km de distância umas das outras. Duas épocas para as coletas foram feitas, sendo a primeira em julho de 2015 e a segunda em outubro de 2015.

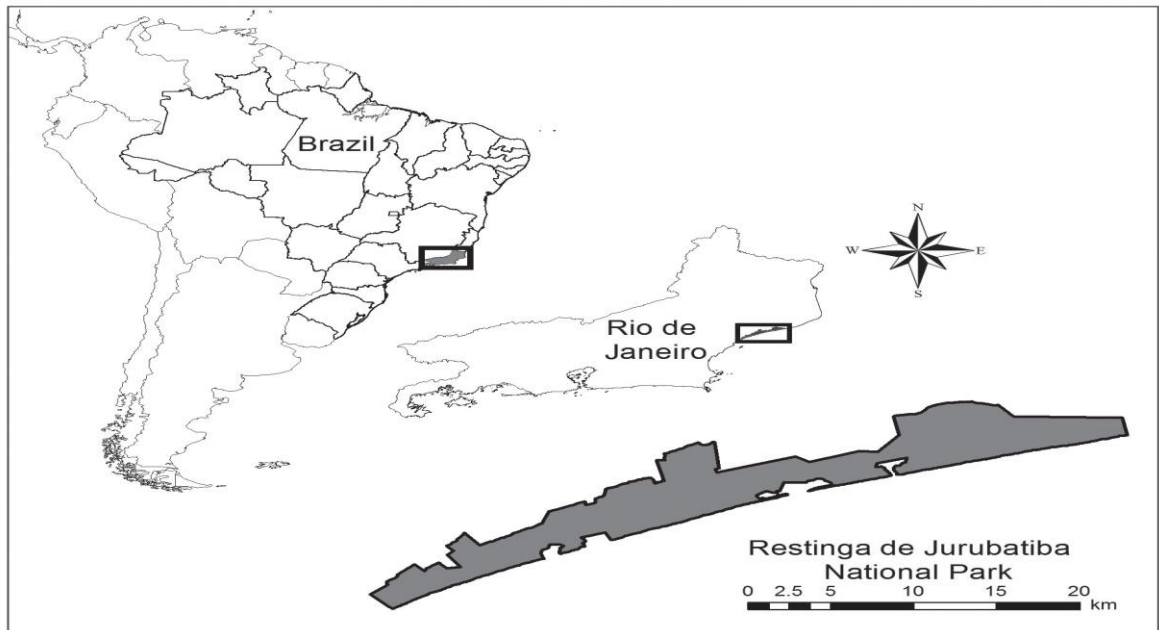


Figura 1. Localização do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, no litoral norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil, de onde foram obtidas amostras de folhas de bromélias para isolamento de fungos endofíticos. (FONSECA et al., 2015).

2.2 Coleta de material botânico

Amostras de folhas sadias das bromélias *Aechmea nudicaulis* e *Bromelia antiacantha*, onde se encontraram maduras e em fase de floração, foram obtidas para o isolamento de fungos endofíticos. Foram amostras folhas maduras e sadias no terço superior da planta. Folhas manchadas, amarelcidas ou apresentando sinais ou sintomas de senescência foram descartadas. Obtiveram-se 3 folhas/plantas em cerca de 30 pontos diferentes de coletas (moitas) para *A. nudicaulis* e 10 pontos de coleta para *B. antiacantha* (Figura 2). Cada folha foi acondicionada em sacola de papel, devidamente identificada e mantida em caixa térmica com temperatura aproximadamente de 18 °C, até o processamento em laboratório.



Figura 2. Bromeleaceas coledas no PNRJ para isolamento de fungos endofíticos: (A) *Aechmea nudicaulis*; (B) *Bromelia antiacantha*.

2.3 Isolamento e preservação dos fungos

O isolamento foi realizado a partir das folhas que foram lavadas com detergente neutro, sob água corrente, para a retirada do excesso de impurezas e da flora epifítica residente. Posteriormente, o material foi colocado sobre papel toalha para a secagem do excesso de água. Com auxílio de um furador de rolha (1,3 cm de diâmetro) retiraram-se seis fragmentos do terço médio das folhas, os quais foram imersos em álcool 70% (1 min.), hipoclorito de sódio 1,5% (1 min.), álcool 70% (30 s) para retirar o excesso de hipoclorito e, tríplice lavagem em água destilada estéril (Mussi-Dias et al., 2012). Todo o procedimento foi realizado sob câmara asséptica.

Os seis fragmentos, de cada folha, foram depositados em duas placas de Petri contendo meio de cultura “BDA” (batata, dextrose e ágar), acrescido de 0,2% de extrato de levedura e Chloranphenicol (0,05g/L em 10 ml de álcool) (Freire e Bezerra, 2001) modificado. As placas foram mantidas em câmaras de crescimento do tipo “BOD” a 28 °C, com fotoperíodo de 12 horas até o crescimento das colônias fúngicas. Quando necessário, de cada colônia crescida, foram feitas repicagens para outras placas contendo meio de cultivo para purificação dos isolados. Após isolamento de cada isolado, os fungos foram mantidos pelos métodos de Castellani e em tubos com meio inclinado (Alfenas e Mafia, 2007).

2.4 Identificação e caracterização dos fungos

As observações das características morfológicas e culturais de cada isolado foram realizadas através de lâminas, ao microscópio óptico, confeccionadas a partir das estruturas reprodutivas obtidas das colônias crescidas em BDA ou em microcultura

A identificação dos fungos ao nível gênero foi baseada em chaves dicotômicas distintas para cada grupo taxonômico (Hanlin, 1996; Barnett e Hunter, 1998; Seifert et al., 2011). Posteriormente, procedeu-se a fotodocumentação das lâminas em microscópio óptico (modelo Nikon i80) das estruturas dos fungos, com auxílio do software “Imaging Software Nis-Elements”.

As colônias de isolados obtidos e identificados como sendo de mesmo gênero foram cultivadas em placas de petri e agrupadas de acordo com as semelhanças visuais de forma, crescimento, coloração e produção de corpos de frutificação ou conidiomas.

2.5 Análise dos dados

Foi realizado avaliação da frequência (percentuais) dos isolados encontrados conforme gênero provável identificado e para cada gênero, com base na identificação morfológica previamente descrita.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das duas coletas realizadas no PNRJ, foram isolados representantes de 8 gêneros fúngicos, oriundos de 166 colônias, a partir de 206 fragmentos de folhas assintomáticas de bromeleaceae. Destas, cerca de 30 colônias oriundas de fragmentos assintomáticos foram consideradas como “fungos não-identificados” por não esporularem em meio de cultura.

Houve uma frequência diferenciada de isolados por espécie de bromeleaceae. Na espécie *Aechmea nudicaulis*, o gênero mais abundante foi *Trichoderma* (29,51%) e na espécie *Bromelia antiacantha*, *Pestalotiopsis* sp. (44,64%) (Figura 3).

Houve uma maior frequência de fungos na espécie 1, devido ao maior número de coletas na espécie. Na coleta 1, referente a espécie 1, 64% dos fungos isolados apresentaram estruturas reprodutivas em BDA e 36% foram de fungos que não esporularam *in vitro*.

Na coleta 2, referente a espécie 2, 88% das culturas obtidas apresentaram estruturas reprodutivas e 12% não esporularam *in vitro*. Com isso, indaga-se que alguns dos fungos endofíticos possuem especificidade ao nicro e podem não esporular em meios de cultura ricos como o BDA. Além disso, observou-se que alguns isolados tendem a perder a viabilidade muito rapidamente, quando cultivados *in vitro*. Estudos testando outros meios de cultura ou técnicas de indução de esporulação são necessários para identificação morfológica destas culturas. Por causa da diversidade de fungos endofíticos encontrados em plantas, a maioria dos estudos tem focado mais na composição de espécies de fungos e seus padrões de distribuição do que nas relações e funções exercidas pelos endófitos em seus hospedeiros (Arnold et al., 2003).

Arnold, et al (2003), conta que a composição de fungos associada a uma mesma espécie vegetal não se altera muito quando as amostragens são realizadas em locais de coleta distantes. Entretanto, a frequência relativa das espécies de fungos, mesmo entre plantas de mesma espécie, pode variar bastante de acordo com o regime de chuvas de cada local, o método de isolamento dos endófitos a partir do hospedeiro e a idade dos órgãos vegetais utilizados.

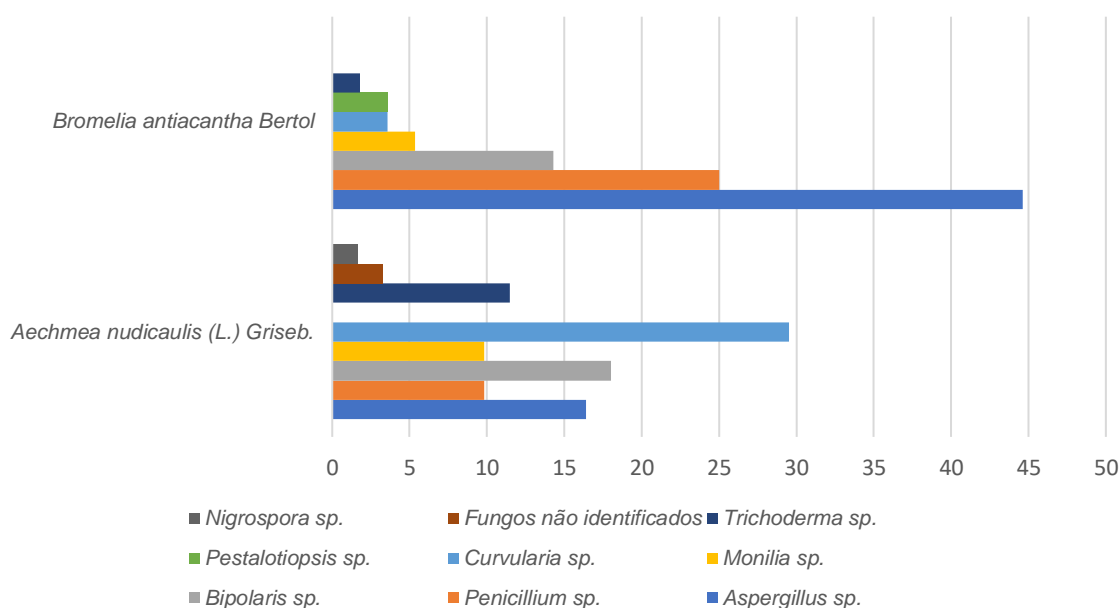


Figura 3 – Gêneros de fungos endofíticos obtidos de bromeleáceas do Parque Nacional da Restingas de Jurubatiba, RJ.

Quanto aos fungos obtidos de bromélias neste estudo, não há relatos anteriores sobre a interação desses gêneros fúngicos com as espécies estudadas, visando elucidar o papel e a influência da micobiota endófito no estabelecimento e na ecologia dessas plantas neste habitat. As bromélias abrigam uma grande diversidade de organismos e, segundo Maki (2006), a estrutura de comunidades endofíticas variam em função do ambiente ao qual as plantas se encontram, bem como, das oscilações de fatores abióticos, tais como, temperatura e regime de chuvas. Contudo, a riqueza e a composição de fungos endófitos podem também estar relacionadas às estações do ano em que se realizam as coletas (Assunção, 2010).

Proferiu-se uma análise de dados agrupados dos isolados identificados e pode-se constatar que embora alguns isolados tenham sido exclusivamente encontrados em uma das duas espécies de bromélias, não se espera que estes sejam relacionadas a alguma especificidade, o que somente poderá ser confirmado com ampliação dos estudos e novas coletas. Em *Aechmea nudicaulis* foram exclusivos os gêneros *Bipolaris* sp. e *Curvularia* sp., enquanto em *Bromelia antiacantha*, o gênero *Monilia* sp. foi exclusivo na análise. Os demais gêneros identificados (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Trichoderma* sp., e *Nigrospora* sp.) foram encontrados em ambas bromélias, mas com diferentes

frequências. Os demais isolados que foram caracterizados como “fungos não-identificados”, apresentaram o mesmo padrão cultural no isolamento e esses fungos apresentaram-se constantes e bastante homogêneos (Figura 4). Na ausência de esporos, estudos de sequenciamento de genes ITS e outros deverão possibilitar a identificação destes isolados em nível de espécie.

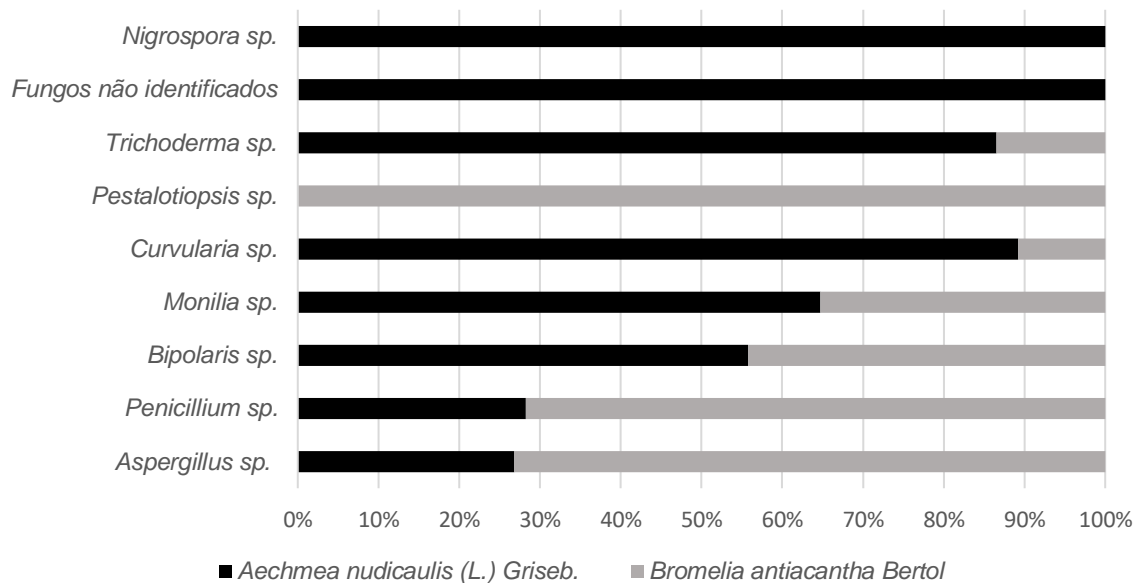


Figura 4 – Análise da similaridade e dominância dos gêneros fúngicos em espécies vegetais de broméleaceae coletadas no Parque Nacional de Restingas de Jurubatiba, RJ.

O estudo revelou que as bromélias *A. nudicaulis* e *B. antiacantha* apresentaram uma baixa diversidade de fungos endofíticos cultiváveis. Estas espécies botânicas apresentam cisternas maiores, que acumularam um maior volume de água e substratos vegetais propiciando assim, possivelmente condições favoráveis ao desenvolvimento de fungos conidiais endofíticos. Todavia, as limitações metodológicas, meios de cultura testados, bem como a forma e intensidade das amostragens efetuadas, restringiram possivelmente o isolamento de maior gama de fungos cultiváveis.

3.1 Caracterização dos grupos de isolados endofíticos obtidos das bromélias

Dos fungos endofíticos isolados das duas espécies de bromélias coletadas na restinga do PNRJ 08 gêneros ocorreram em maior frequência e, são caracterizados como seguem:

Gênero *Aspergillus*

Dois tipos de *Aspergillus* ocorreram como endofíticos de bromélias neste estudo. Foram observadas colônias com conídios em massa pulverulenta de coloração negra, características da espécie do grupo *Aspergillus niger* e colônias com coloração esverdeada, típica de espécies do grupo *Aspergillus flavus* (Figura 5). Fungos do gênero *Aspergillus* são constituídos por inúmeras espécies, sendo a maioria, fungos hialinos que não produzem pigmento melanínico nas suas hifas e conidióforos em cultura pura (Gibbons e Rokas, 2013). A característica microscópica que define este gênero é o seu conidióforo semelhante a um “aspergillum” ou asperge, um objeto utilizado pelo clero da Igreja Católica para aspergir água benta durante uma parte da liturgia (Bennet, 2010; Gibbons e Rokas, 2013).

Este gênero compõe-se das principais espécies de microrganismos produtores de enzimas de interesse alimentício, com utilidades, tais como a clarificação de sucos de frutas (pectinases), fabricação de xaropes (amilases) e a produção do ácido cítrico. São também descritos como produtores de micotoxinas sendo, portanto, de interesse tanto econômico quanto médico (Sousa et al., 2004).

Espécies de *Aspergillus* são comuns no solo e em matéria orgânica em decomposição, principalmente em regiões de clima quente (Ribeiro, 2009), podendo se sapróbias e cosmopolitas apresentam fácil disseminação, além de causarem deterioração em grãos e sementes (Cirio e Lima, 2003), afetando a produção agrícola. As aflatoxinas produzidas por algumas espécies desse gênero são altamente tóxicas e carcinogênicas para homens e animais (Sessegolo et al., 2011). Em algumas espécies vegetais o isolamento de *Aspergillus* sp. como fungo endofítico em folhas já foi relatado, tais como em *Ilex paraguariensis* (Pimentel et al., 2006) e em *Eremanthus erythropappus* (Magalhães et al., 2008).

Muitas espécies de *Aspergillus*, tem sido relacionada à habilidade na solubilização de diferentes fontes de fosfato, associados à produção de ácidos orgânicos (Chuang et al., 2007) podendo constituir em alternativa para reduzir custos de produção e estabelecer a sustentabilidade do sistema agrícola (Vassilev et al., 2006).

Entre as espécies desse gênero, *A. niger* tem sido bastante estudado por sua habilidade em produzir ácidos orgânicos, principalmente o ácido cítrico

(Bizukojc e Ledakowicz, 2004). Inúmeros mecanismos têm sido propostos, com relação à sua regulação e síntese, sendo a produção deste ácido influenciada pelo pH do meio, pelas fontes de carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P) e micronutrientes (Papagianni et al., 2005).

A obtenção de isolados oriundos de novas fontes, ainda pouco exploradas, como é o caso de bromélias adaptadas às restingas pode contribuir na bioprospecção de espécies novas, ainda não descritas, bem como isolados promissores para serem utilizados em benefício do homem.

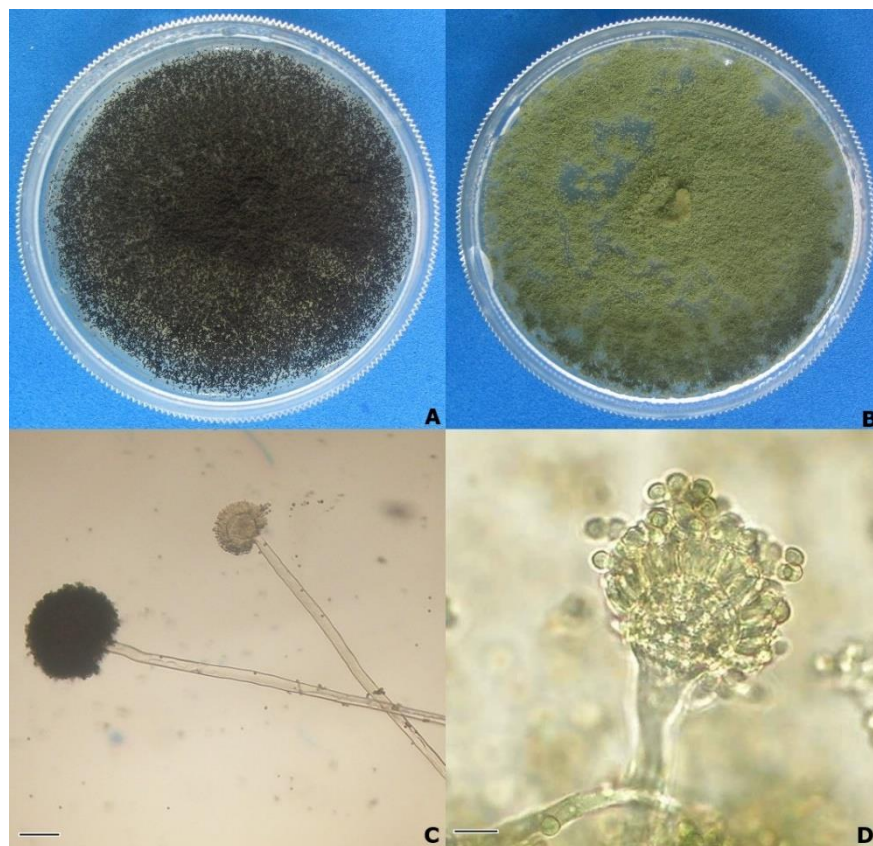


Figura 5 - *Aspergillus* endofíticos obtidos de bromélias do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ. Colônias de *Aspergillus niger* (A) e *Aspergillus flavus* (B). Conidióforos, vesícula fiáides e conídios característicos de cada espécie (C e D), respectivamente. (10 μ m e 20 μ m)

Gênero *Bipolaris*

Dos isolamentos realizados a partir de folhas de bromélias só houve a ocorrência de um tipo de *Bipolaris* sp. (Figura 6). Não há relatos na literatura, até o momento, deste gênero como um endófito em bromeliáceas.

Espécies de *Bipolaris* são taxonomicamente relacionadas a espécies de *Drechslera*, *Exserohilum* e *Curvularia*, grupo que abriga importantes patógenos de

plantas e saprófitos (Pratt, 2006). Em sua fase sexual, tanto *Bipolaris* spp. quanto *Curvularia* spp. são hoje tratados como teleomórfos de *Cochliobolus* (Manangoda et al., 2012).

O isolado de *Bipolaris* obtido apresentou colônias com aparência aveludada e conídios levemente curvos, fusiformes e elipsoidais, arredondados no ápice, e com conidióforos não ramificados. Há, no entanto, possibilidade de o fungo ser reclassificado, uma vez que inúmeras isoformas de *Bipolaris* são hoje consideradas *Curvularia*, com base em análise filogenética de sequências de DNA e, a distinção de *Bipolaris* e *Curvularia* como formas não parasíticas é imprecisa com base apenas na morfologia de conidióforos e conídios (Manangoda et al, 2012).

Este fungo foi capaz de produzir pigmentos amarelo-alaranjados, em meio de cultura, que apresentam dois tipos de estruturas, a antraquinônica e os derivados de xantona. Espécies de *Bipolaris* sp. têm sido utilizadas na biorremediação da poluição por óleo cru no Kuwaiti, devido à sua capacidade de crescer e degradar o hidrocarboneto em meios com altas concentrações de NaCl (+10%) e em altas temperaturas (Obuekwe et al., 2005). Algumas espécies também têm sido estudadas e apresentando bons resultados como micoherbicida para o controle ervas daninhas (Evidente et al., 2005).

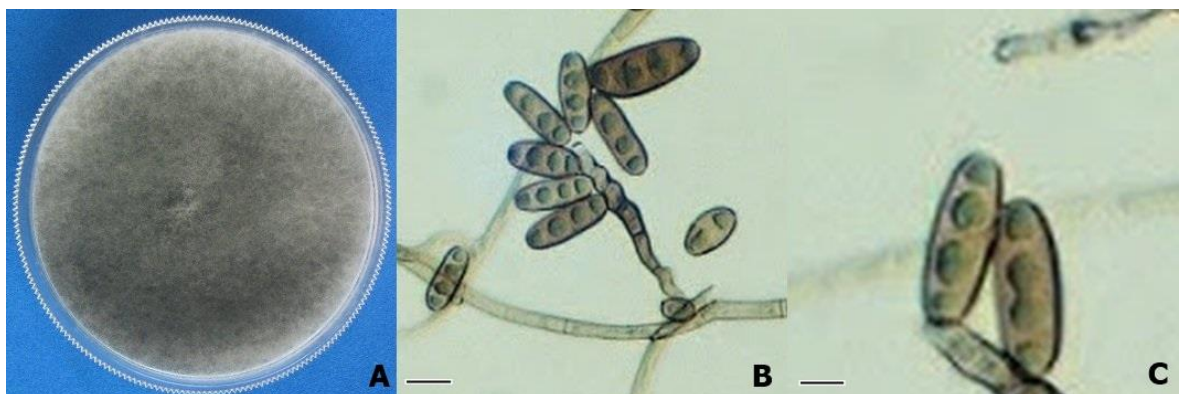


Figura 6 - *Bipolaris* sp. endofítico obtido de bromélias do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ. Aspecto da colônia do fungo cultivado em meio de cultura (A). Conidióforo e conídios (B e C). Barras = 20 µm

Estudos com extratos produzidos por *Bipolaris* tem sido realizado no controle do crescimento celular. De 186 extratos de fungos endofíticos, de diversos gêneros, isolados da planta *Smallanthus sonchifolius*, cerca de 12% apresentaram moderada ou alta atividade citotóxica contra células tumorais e foram considerados

promissoras fontes de compostos anticancerígenos. Dentre estes fungos, *Bipolaris* chamou a atenção, pois seu extrato foi capaz de inibir o crescimento celular (Gallo et al., 2009).

Espécies do complexo *Bipolaris* normalmente podem causar lesões foliares necróticas, provocando a morte dos tecidos em várias gramíneas, como por exemplo, a mancha de *Bipolaris*, importante doença foliar da cultura do milho (Trigiano et al., 2010). Estudos de patogenicidade com isolados endofíticos são recomendados.

Gênero Curvularia

Um único isolado *Curvularia* foi obtido a partir de folhas de *A. nudicaulis*. Este gênero é caracterizado como um fungo filamentosso dematiáceo (Figura 7). É considerado como saprófita do solo. As características da colônia se apresentam como sendo de crescimento rápido, preenchendo toda a placa em menos de uma semana, coloração inicialmente verde escura, tornando-se preto-acinzentada com reverso da placa preto e, textura lanosa (Lima, 2010).

Fungos do gênero *Curvularia* são frequentemente encontrados como sapróbios, fitopatogenos ou endófitos em diferentes substratos vegetais, (Ferreira, 2010; Lima e Furtado, 2007). Como fitopatógenos causam manchas em culturas de grande importância como trigo, milho, arroz, sorgo, cevada, aveia e centeio (FERREIRA, 2010). Tem sido encontrado associado a manchas foliares e endofiticamente em diversas espécies de *Heliconia* (Lins e Coelho, 2004; Costa, 2007; Sobrinho, 2008; Santos et al., 2009), como *C. lunata* isolada de *H. chartacea* cv. Sex Pink, bem como de folhas de *Musa* (Assunção, 2010) e de *Vitis lambrusca* (Lima, 2010).



Figura 7 - Colônia de *Curvularia* sp., endofítica de bromélias do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ. a) aspecto lanoso do micélio quando cultivado em placa de Petri contendo meio BDA; b e c) conídios e conidióforos Barras = 20 μ m e 10 μ m

Este gênero abriga mais de 40 espécies (Watanabe, 2010) e ainda não se conhece papel biotecnológico para estas espécies, embora *C. geniculata* tenha demonstrado atividade positiva na supressão de organismos patogênicos e *Curvularia lunata* na produção de enzimas do sistema lignolítico e biosurfactante (Chomcheon et al., 2010).

Gênero *Monilia*.

Em meio de cultura, o fungo cresce rápido produzindo conídios hialinos que variam conforme a temperatura e o hospedeiro. A coloração da colônia vai de branca a alaranjada com margem inteira, micélio aéreo inicialmente escasso e posteriormente zonado concêntrico.

Das bromélias do PNRJ foi obtido um isolado de *Monilia*, a partir da espécie *B. antiacantha* (Figura 8).

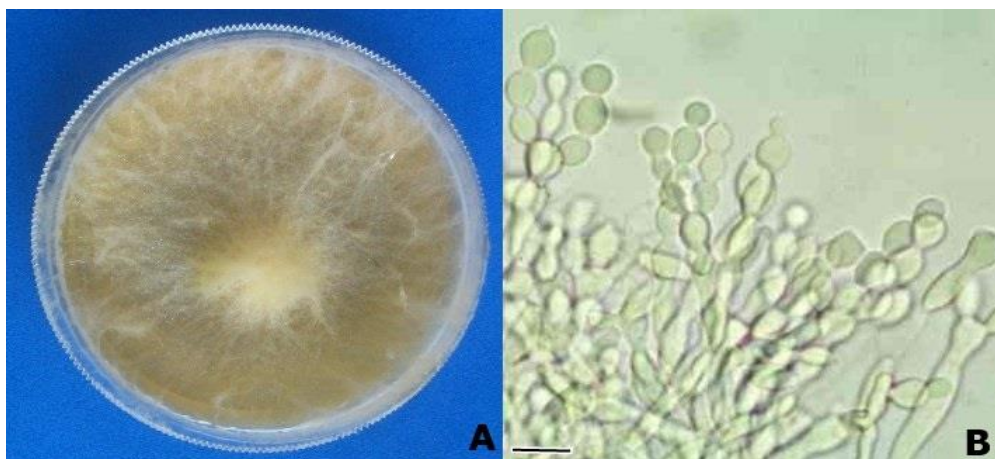


Figura 8 - Colônia de *Monilia* sp. endofítica de bromélias do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ. (a) aspecto do crescimento em placa de Petri contendo meio BDA; b) conídios e conidióforo. Barra = 20 μ m

Gênero *Penicillium*

O gênero *Penicillium*, isolado de folhas de bromélias, apresentou dois padrões quanto à morfologia das colônias, porém em análises microscópicas, não foram diferentes entre si. Em bromeleaceae, não há relatos de interações endofíticas envolvendo o fungo *Penicillium*, a não ser como fitopatógeno de frutos de abacaxi (Verzignassi et al, 2009). Todos os isolados obtidos apresentaram coloração esverdeada, característica da cultura em meio BDA.

Os fungos do gênero *Penicillium* comporta inúmeras espécies e são filamentosos com hifas septadas e hialinas. As diferentes espécies apresentam um crescimento rápido em meio de cultura devendo ser incubadas à temperatura adequada ao local de origem ou da infecção. Em microscópico a estrutura geral do conidióforo é específica e identifica o gênero (Figura 9). O fungo *Penicillium* sp., é conhecido como o fungo dos bolores cuja coloração verde ou azul é uma característica específica deste gênero.

Este fungo possui grande importância, sendo utilizado como organismo modelo em diversos estudos de pesquisa básica e pesquisa aplicada, por exemplo, controle biológico, secreção de metabólitos secundários, fonte de novos fármacos para indústria farmacêutica, fonte de enzimas de interesse industrial, entre outros (Wang et al., 2008). Tem sido frequentemente isolado como endofítico em tecidos de diversas plantas, sendo que o seu papel nesta condição está associado intrinsecamente ao hospedeiro e as condições ambientais envolvidas (Cao et al., 2002).

Espécies de *Penicillium* vem sendo citadas como endófitos produtores de metabólitos secundários bioativos e com potencial de aplicação na indústria farmacêutica e química, tais como esteroides produzidos por *Penicillium* sp., endófito de *Melia azedarach* (Marinho et al., 2009). Wang et al. (2008) descreveram a atividade de metabólitos secundários de *Penicillium* sp. isolado das folhas de *Hopea hainanensis*, relatando a ação destes contra *Candida albicans*, *C. krusei* e *A. niger*.

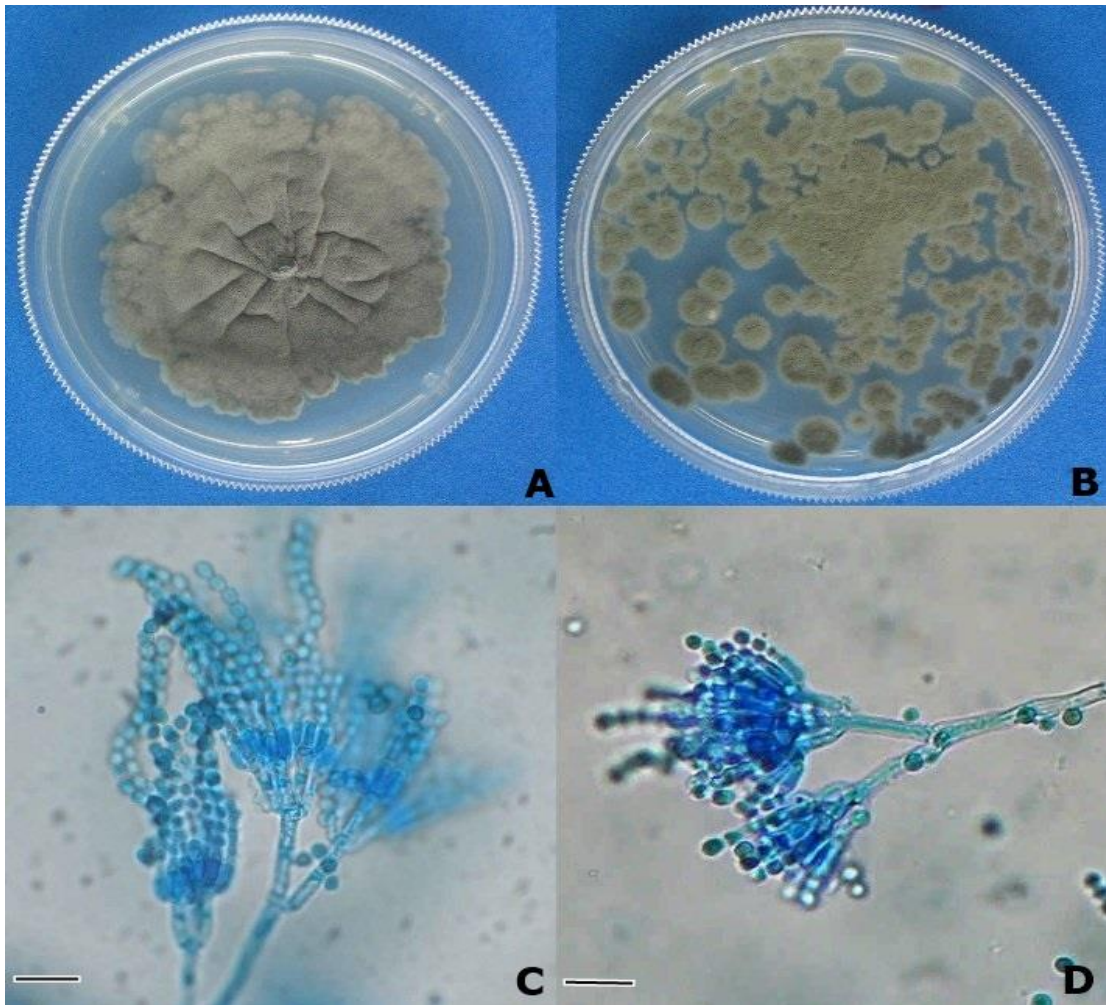


Figura 9 - Colônia de *Penicillium* endofíticas de bromélias do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ. (A, B) organização da colônia do fungo em placa de Petri contendo meio BDA; deposição do gênero *Penicillium* em microscópio óptico, com detalhe da organização dos conídios e conidióforo (C e D). Barras = 20 μ m

Estudos relatam a grande frequência desse gênero habitando internamente tecidos de cana-de-açúcar, assim como a rizosfera (Stuart, 2006; Mendes, 2008; Fávaro, 2009; Romão, 2010), folhas e raízes de *Musa acuminata* (Cao et al., 2002), de folhas, raízes e frutos de *Melia azedarach* (Santos et al., 2003) e em café (*Coffea arabica*, *C. congensis*, *C. dewevrei* e *C. liberica*), os quais foram caracterizados como *P. brevicompactum*, *P. brocae*, *P. cecidicola*, *P. citrinum*, *P. coffeae*, *P. crustosum*, *P. janthinellum*, *P. olsonii*, *P. oxalicum*, *P. sclerotiorum* e *P. steckii* (Vega et al., 2008)

Narloch et al. (2002) estudaram o efeito dos fungos solubilizadores de fosfato *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. associados em diferentes doses de fosfato na

produção da matéria seca e na absorção de fósforo pela cultura do rabanete. De acordo com os autores os isolados diferiram quanto capacidade de promover a produção de matéria seca, dependendo da dose de fósforo aplicada. Plantas submetidas à inoculação de *Penicillium* sp. com 17,5 mg kg⁻¹ de P apresentaram produção de matéria seca equivalente às obtidas por plantas com até 70,0 mg de P por kg de solo, sem inoculação.

Gênero *Pestalotiopsis*

Culturas de *Pestalotiopsis* foram as mais abundantes a partir de *B. antiacantha*, mostrando frequência de 44,64% dos isolados identificados. Este gênero apresentou cerca de 6 (seis) grupos morfológicos distintos, com disposições regulares e irregulares de conidiomas (Figura 10).

Apesar do reconhecimento da importância crescente do gênero *Pestalotiopsis*, a identificação de isolados em nível de espécie ainda é muito complexa. Características consideradas relevantes em chaves baseadas exclusivamente na morfologia nem sempre combinam com a posição taxonômica de isolados obtida por meio de dados de sequenciamento de DNA. Liu et al. (2010) conseguiram associar a característica morfológica, pigmentação das células medianas do conídio com relações filogenéticas inferidas por sequências de DNA de regiões ITS e do gene da β - tubulina.

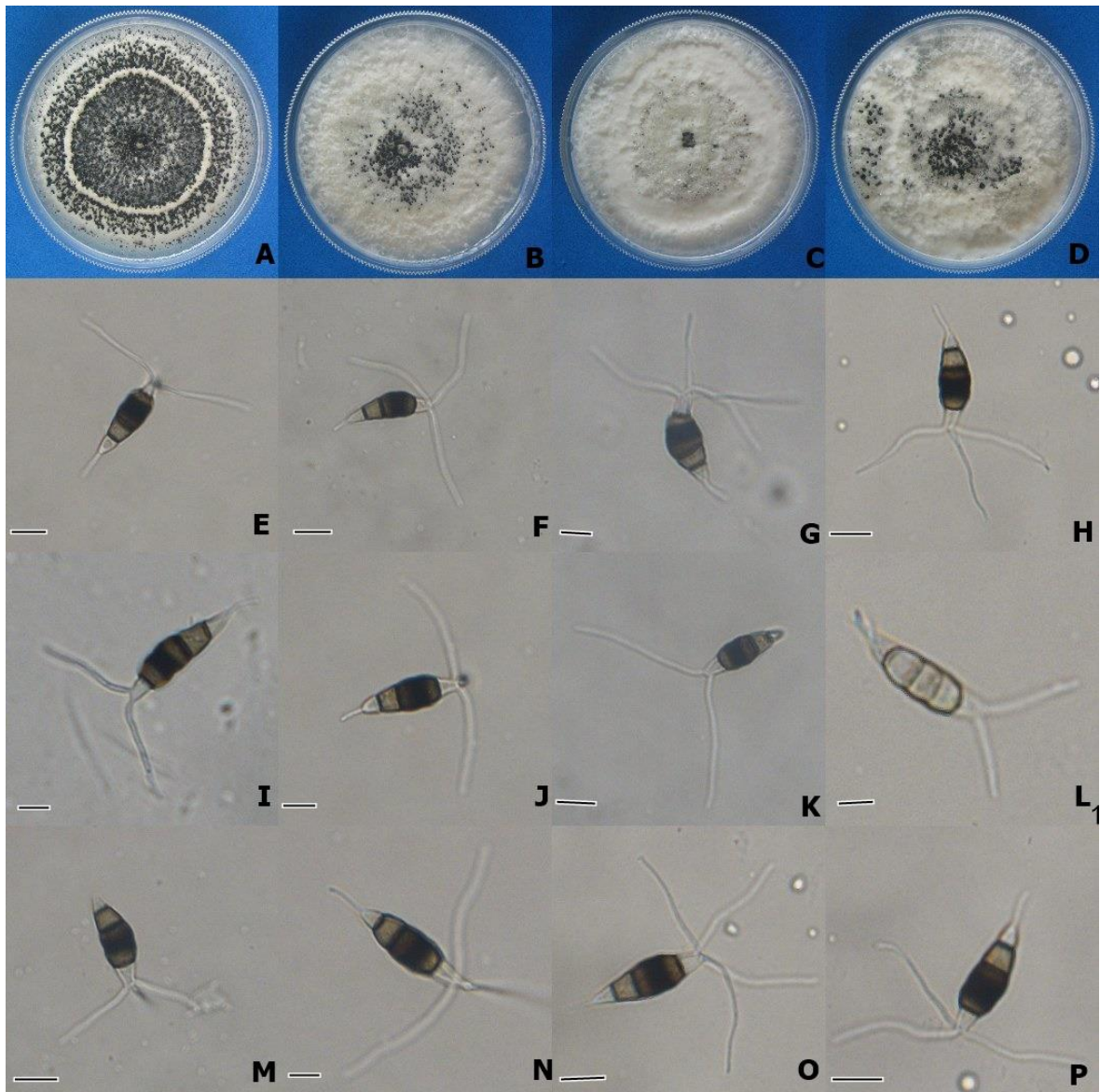


Figura 10 – *Pestalotiopsis* sp. endofíticas de bromélias do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ. (A, B, C, D) Variações morfológicas de colônias de *Pestalotiopsis* sp. em meio BDA, em colônias com 7 dias de crescimento; (E – P) conídios apresentando 2 apêndices basais, 3 apêndices basais, 4 apêndices basais e um apical Barras = 20 μ m

Espécies do gênero *Pestalotiopsis* podem ser encontradas como endofíticas, sapróbias e fitopatógenos (Kruschewsky, 2010). São de ocorrência comum em *Anacardium occidentale* (Kimati et al., 1997)., *Eucalyptus* spp., *Ananas lucidus* (Barguil et al, 2008), *Caryota mitis* (Pessoa et al., 2008), *Licuala grandis*, *Rhapis excelsa*, *Heliconia rostrata*, *H. psittacorum*, *H. psittacorum* cv. *Golden Torch*, *Etilingera elatior*, *H. psittacorum*, *H. rostrata*, *Heliconia* sp., *H. bihai* cv. *Chocolate*, *H.latispatha*, *H. orthotricha* cv. *She*, *H. orthotricha* cv. *Total Eclipse*, *Vigna unguiculata* (Rodrigues; Menezes, 2002; Sologuren; Juliatti, 2007; Castro, 2007; Kruschewsky, 2010). *Pestalotiopsis microspora*, *P. maculans* e *Pestalotiopsis* sp.

são endofíticas em raízes de *Vellozia compacta* (Rodrigues, 2010), folhas de *Musa* spp. (Assunção, 2010), *Vitis labrusca* (Lima, 2010) e *Pinus taeda* (Pimentel et al., 2010).

Pestalotiopsis spp, podem ser um grupo de fungos com um grande potencial biotecnológico devido à produção de alguns metabólitos secundários, entre eles o taxol. Hao et al. (2007) avaliaram a produção de lacase por *Pestalotiopsis* alterando a composição do meio de cultivo, variando as fontes e concentrações de carbono e nitrogênio. A influência de diferentes indutores e inibidores da produção de lacase também foram examinados. Segundo os autores, *Pestalotiopsis* sp. é um produtor da enzima lacase, com grande potencial de uso industrial. O potencial sintético dos fungos é bastante conhecido, pois produzem enzimas que possuem larga aplicação industrial. Devido à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, e por apresentarem baixa especificidade por substratos, as lacases têm sido utilizadas em diversos processos, como remoção de lignina de polpas kraft em indústrias de papel e celulose, remoção de xenobióticos de cursos d'água, análise de drogas, remoção de compostos fenólicos de vinho, clarificação de corantes e efluentes, entre muitos outros (Baldrian & Gabriel, 2002).

Espécies de *Pestalotiopsis* já foram descritas como endófitos em várias plantas, mas para poucas gimnospermas. Wei & Xu (2007) descreveram a ocorrência de cancro provocado por *P. funerea* em gimnospermas adultas de *Cupressocyparis leylandii* na Itália; Yang et al. (2011) isolaram *P. photiniae* da gimnosperma chinesa *Podocarpus macrophyllus*. Entretanto, alguns estudos demonstraram a presença de espécies de *Pestalotiopsis* como fitopatógenos. Gangadevi & Muthumary (2009) caracterizaram isolados de *Pestalotiopsis* capazes de causar apodrecimento das folhas e caules de *Camellia sinensis* no sul da Índia.

Gênero *Nigrospora*

O gênero *Nigrospora*, identificado neste trabalho, apresentou poucas variações morfoculturais, apresentando 4 diferenciações na disposição micelial em meio BDA (Figura 11). Com base nisso, o gênero *Nigrospora* encontrado nesse trabalho, não se pode subestimar a capacidade dos mesmos como patógenos em

algum momento ou fase de desenvolvimento da cultura, uma vez que ainda não há dados suficientes que comprove a sua estrita relação endofítica.

A maioria das espécies de *Nigrospora* possui hábito sapróbio, no entanto, associam este fungo com a podridão das maçãs do algodoeiro (*Gossypium* spp.), a podridão no colmo do milho (*Zea mays*) e do arroz (*Oryza sativa*). *Nigrospora oryzae* foi isolada de folhas de *H. bihai* no DF (Costa, 2007), de *Rosa hybrida* (Salazar; Garcia, 2005), *Annona squamosa* (Silva, 2006), *Leucaena leucocephala* (Mendes et. al., 2009), *Musa* spp. (Assunção, 2010) e *Vitis labrusca* (Lima, 2010).

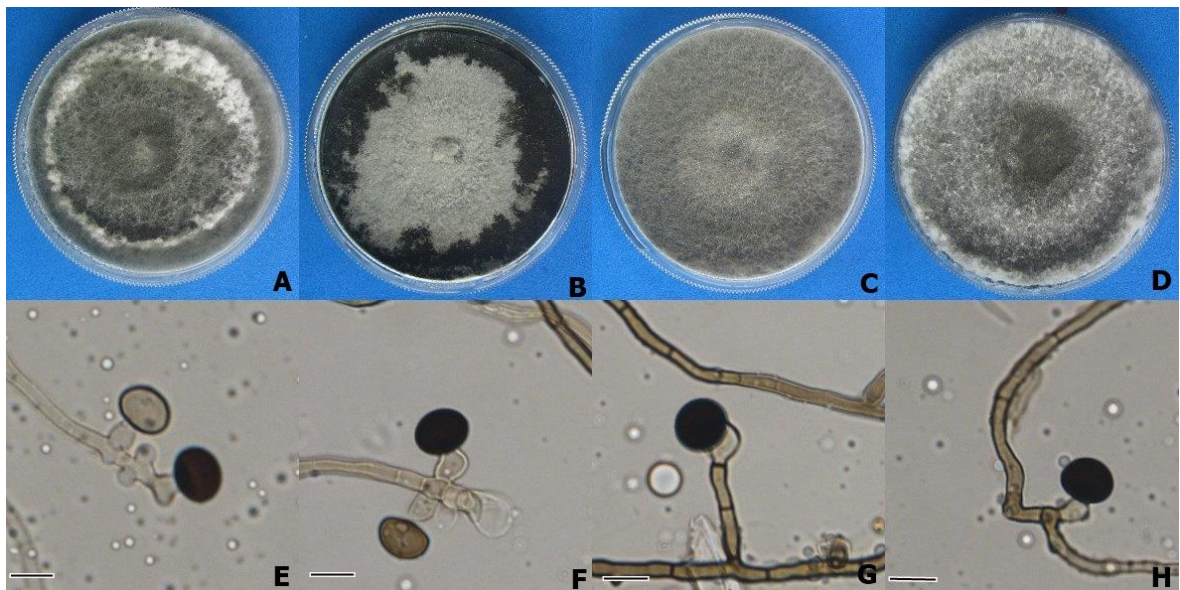


Figura 11 – *Nigrospora* sp. endofíticas de bromélias do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ. (A - D) Variações nas colônias de *Nigrospora* sp. isolados de bromélias e organização da colônia do fungo em placa de Petri contendo meio BDA; (E - H) deposição do gênero *Nigrospora* em microscópio óptico, com detalhe da organização dos conídios e conidióforo. Barras = 20 μ m

Gênero *Trichoderma* spp.

Os caracteres biológicos do gênero *Trichoderma* sp. são saprófitas, muitas vezes no solo ou em madeira, algumas espécies relatadas como parasitas de outros fungos. Usado na produção de antibióticos, enzimas e agentes de controle biológico (Figura 12).

Os isolados de *Trichoderma* sp. apresentaram pouca diferenciação cultural, embora diferiram quanto a aparência das colônias e seu desenvolvimento em meio de cultura.

Fungos do gênero *Trichoderma* tem sido isolado de solos e também como endofítico, porém com menor frequência. Relações antagônicas entre endófitos e fitopatógenos, já foram verificadas em outros trabalhos. O antagonismo entre o fungo endofítico *Trichoderma harzianum* e o fungo fitopatogênico *Alternaria alternata* foi avaliado sob diferentes condições ambientais de temperatura e atividade de água por Sempere e Santamarina (2007). Na análise microscópica os autores verificaram que *T. harzianum* compete por espaço e nutrientes, realizando antagonismo com *A. alternata* e diminuindo seu crescimento, sendo um grande candidato ao biocontrole deste patógeno. Martins-Corder e Melo (1998), analisando a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. em controlar o fitopatógeno da berinjela *Verticillium dahliae*, verificaram que dentre os 47 isolados de *Trichoderma* spp. testados pelo antagonismo em placa, pelo menos 10 obtiveram alto índice de antagonismo, sendo que a maioria colonizou e produziu esporos em abundância sobre as colônias de *V. dahliae*, indicando grande capacidade de antagonismo.

Stolf (2006) avaliou o efeito de fungos endofíticos correspondente a um isolado de *Trichoderma atroviride* e uma cepa não patogênica de *Fusarium oxysporum* sobre o biocontrole de *Radopholus similis* e seu efeito sobre a promoção de crescimento em mudas de bananeira micropropagadas do cultivar "Williams". O experimento foi avaliado seis semanas depois da inoculação com nematóides. Verificou-se que *Trichoderma* apresentou melhor biocontrole que *Fusarium*. Porém, tanto para *Fusarium* como para *Trichoderma*, o melhor efeito de biocontrole foi obtido com três re-inoculações, correspondendo a 69% e 80% de biocontrole respectivamente. Em relação às variáveis de crescimento observou-se que nenhum fungo afetou o crescimento das plantas.

Algumas linhagens de *Trichoderma* são utilizadas no controle de fitopatógenos e na promoção de crescimento vegetal devido a sua versatilidade de ação, como parasitismo, antibiose e competição, além de atuarem como indutores de resistência das plantas contra doenças. Essas características tornam *Trichoderma* um dos fungos mais pesquisados em condições de laboratório, casa de vegetação, no Brasil, estufa em Portugal, e campo (Louzada *et al.*, 2009; Hoyos-Carvajal, Orduz, e Bissett, 2009).

As espécies de *Trichoderma* são as mais utilizadas no controle de fitopatógenos por serem encontradas em uma vasta diversidade de ambientes,

devido à facilidade de serem cultivadas e observadas, ao rápido crescimento em um grande número de substratos e ao fato de não serem patogênicas para plantas superiores. Apresentam-se capazes de inibir fitopatógenos através de competição, parasitismo direto, produção de metabólitos secundários e micoparasitismo de estruturas de resistência de patógenos, como escleródios, esporos e clamidósporos, que em geral são difíceis de serem destruídos. Pesquisas mostram que isolados de *Trichoderma* reduzem a viabilidade de escleródios de *Rhizoctonia solani*. Dentre os antagonistas de fungos fitopatogênicos usados no biocontrole, cerca de 90% têm sido realizados com diferentes isolados pertencentes a este gênero (Benítez *et al.*, 2004; Kunieda-Alonso, Alfenas e Maffia, 2005).

A aplicação de *Trichoderma* tem proporcionado aumentos significativos na porcentagem e na precocidade de germinação, no peso seco e na altura de plantas, além de estimular o desenvolvimento das raízes laterais (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). Eles são capazes de atuar como bioestimulantes do crescimento radicular, promovendo o desenvolvimento de raízes através de fitohormônios e assim, melhorar a assimilação de nutrientes, aumentando a resistência diante de fatores bióticos não favoráveis, além de degradar fontes de nutrientes que serão importantes para o desenvolvimento do vegetal (Harman *et al.*, 2004).

Filho *et al.* (2008), observaram produção de ácido indolacético (AIA) em isolados de *Trichoderma* spp.. De acordo com os resultados obtidos, nos isolados CEN 209 e CEN 500, a produção desse hormônio foi detectada em baixos níveis. No entanto, o isolado CEN 262 revelou níveis consideravelmente superiores em relação aos demais isolados estudados. A concentração elevada de AIA verificada nas análises do isolado CEN 262 foram compatíveis com os valores obtidos nos experimentos relativos ao desenvolvimento de miniestacas de eucalipto clonal, que atingiu aumento de 137%, 145% e 43% da parte aérea, raiz e altura das plantas, respectivamente, comparados à testemunha. Segundo os autores, outros fatores também podem estar envolvidos na promoção de crescimento como solubilização de nutrientes e controle de microrganismos deletérios de raízes.

Hoyos-Carvajal *et al.* (2009), avaliaram a produção de metabólitos de 101 isolados de *Trichoderma* spp. na Colômbia. Vinte por cento das cepas foram capazes de produzir formas solúveis de fosfato de rocha fosfática, 8% das amostras avaliadas mostraram capacidade de produzir sideróforos consistentes para converter ferro a formas solúveis, 60% produziram ácido indol-3-acético (IAA) ou

análogos a auxina. A produção destes metabólitos é uma característica de cepas específicas, assim, variou muito entre as espécies. Além disso, nem todas as substâncias produzidas se correlacionaram com o aumento do crescimento de mudas de feijão, sendo que, sete isolados aumentaram significativamente o crescimento das mudas. Portanto, o potencial biotecnológico dos isolados obtidos no presente estudo deverá ser investigado com a continuidade da pesquisa.

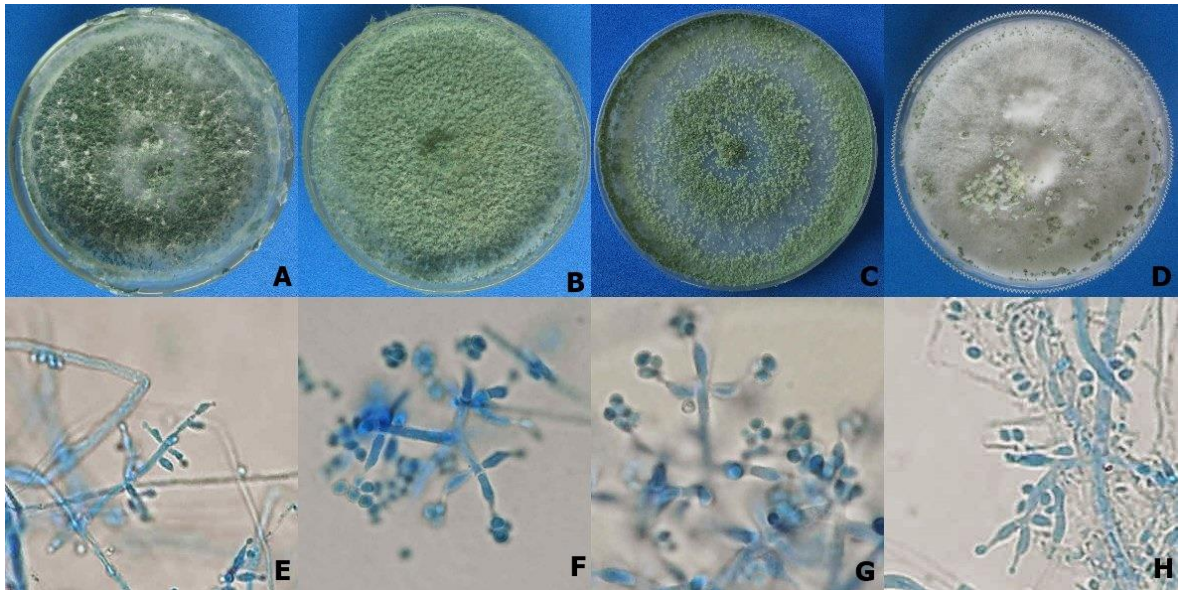


Figura 12– *Trichoderma* sp. endofíticas de bromélias do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ. (A – D) Colônia de *Trichoderma* isolados de bromélias e organização da colônia do fungo em placa de Petri contendo meio BDA; (E – H) deposição do gênero *Trichoderma* em microscópio óptico, com detalhe da organização dos conídios e conidióforo. Está faltando as barras = 20 μ m

Muitos fungos endófitos são considerados benéficos as plantas, pois, quando presentes em determinadas fases do ciclo de vida da planta contribuem para o aumento da tolerância a estresses abióticos e na promoção do crescimento, uma vez que microrganismos endófitos podem atuar inibindo os patógenos por competição por nutrientes, parasitismo direto e pela produção de metabólitos (Grigoletti Jr et al., 2000), estimulando a planta a produzir fitormônios, toxinas e substâncias promotoras de crescimento que estão relacionadas ao escape ou a resistência a fitopatógenos (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006; Azevedo & Araújo, 2007).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram possíveis o isolamento e a identificação de 164 isolados, pertencentes os gêneros: *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Monilia* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., e *Trichoderma* sp. Houve diferenças nas frequências das colônias e isolados obtidos para os gêneros fúngicos dentre espécies e coletas. Na espécie *A. nudicaulis* foram exclusivos os gêneros *Bipolaris* sp. e *Curvularia* sp., enquanto que na espécie *B. antiacantha*, o gênero *Monilia* sp. Os demais gêneros foram encontrados em ambas hospedeiras estudadas, mas com diferentes frequências. 21% isolados que não produziram esporos em cultura pura, foram caracterizados, mas não-identificados em nível de gênero, o que requererá estudos adicionais, com marcadores moleculares. Todavia, acredita-se se tratar de um ou poucas espécies de um mesmo gênero, já as colônias obtidas foram homogêneas quanto ao padrão morfológico. Em associações com bromélias de restinga, ainda não há relato publicado sobre a interação desses fungos identificados e espécies de bromélias. A bibliografia aponta que dentre os fungos caracterizados, há possibilidade de se explorar seu potencial biotecnológico para diferentes fins, tais como: produção de metabólitos secundários e fármacos (*Pestalotiopsis* spp.), solubilização de fosfatos, como indutores de resistência a doenças e no controle biológico, na produção de enzimas de interesses industriais. Visto isso, com os isolados com potencial biotecnológico em cada gênero, espera-se avançar na identificação específica dos isolados de interesse, mediante aprofundamento dos estudos morfológicos e com base em marcadores moleculares (DNA).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAUJO, D. S. D.; PEREIRA, M. C. A.; PIMENTEL, M. C. P. (2002). Flora e estrutura de comunidades na restinga de jurabatiba - síntese dos conhecimentos com enfoque especial para a formação aberta de clusia. In: ROCHA, C. F. D.; ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; LACAVA, P. T. *Manual de isolamento de microrganismos endofíticos*. Piracicaba, 86p.
- AKELLO, J.; DUBOIS, T.; GOLD, C.S.; COYNE, D.; NAKAVUMA, J.; PAPARU, P. (2007) *Beauveria bassiana* (balsamo) vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*musa spp.*). *Journal of invertebrate pathology*, 96: 34–42
- ARNOLD, A. E.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, 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 of the united states of america*. Washington, 100: 15649-15654.
- ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G. (2007). *Métodos em fitopatologia*. Viçosa: UFV, 382p
- ASSUNÇÃO, M.M.C. (2010). Fungos endófitos isolados de folhas de bananeira (*musa spp.*) e seleção de antagonistas a fitopatógenos dessa cultura. 2010. 172f. Tese (Doutorado em biologia de fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife,
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. (2007). Endophytic fungi of tropical plants: diversity and biotechnological aspects. In: Ganguli, B.n.; Deshmukh, S. K. *Fungi multifaceted microbes*. New delhi, *Anamaya Publishers* .189-207.
- BACHMANN, J; ZIEROLD, R; PHIL, Y,T,C; HAUERT, R; PHYS-DIPL, C,S; GRUND-SCHMIDT, R; RHEINLANDER, B; GRUNDMANN, M; GOSELE, U; NIELSCH, K. (2008) Selbstkatalytische atomlagenabscheidung von siliciumdioxid. *Angewandte chemie*. 120(33): 6272–6274.

- BAE, H.; SICHER, R.C.; KIM, M.S.; KIM, S.H.; 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
- BAYAT, F.; MIRLOHI, A.; KHODAMBASHI, M. (2009). Effects of endophytic fungi on some drought tolerance mechanisms of tall fescue in a hydroponics culture. *Russian journal of plant physiology*, 56(4): 510-516.
- BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. (2002). Copper and cadmium increase laccase activity in pleurotus ostreatus, *Fems Microbiology Letters*, 20(1): 69-74.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed. Saint Paul, MS: Aps, Press,
- BIZUKOJC, M.; LEDAKOWICZ, S. (2004). The kinetics of simultaneous glucose and fructose uptake and product formation by *Aspergillus niger* in citric acid fermentation. *Process biochemistry*, 39: 2261-2268.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C. E CONDÓN, A.C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*, 7(4): 249-260.
- BENNET JW (2010) an overview of the genus aspergillus. Disponível em: <<http://open-access-biology.com/aspergillus/aspergillusch1.pdf>> acesso em: 22 fev. 2017
- CAO, R.; LIU, X.; GAO, K.; MENDGEN, K.; KANG, Z.; GAO, J.; DAI, Y.; WANG, X. (2009). Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall–degrading enzymes *in vitro*. *Current microbiology*, 59: 584–592.
- CHUANG, C.C., KUO, Y.L., CHAO, C.C. & CHAO, W.L. (2007). Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and fertility of soils*, 43: 575-584.
- CHOMCHEON, P., WIYAKRUTTA, S., AREE, T., SRIUBOLMAS, N., NGAMROJANAVANICH, N., MAHIDOL, C., RUCHIRAWAT, S., KITTAKOOP, P. (2010). Curvularides a-e: antifungal hybrid peptide-polyketides from the endophytic fungus *Curvularia geniculata*. *Chem. Eur. J*, 16:11178–11185.
- CONTRERAS-CORNEJO, H.A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C. E LÓPEZ-BICIO, J. (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 149(3): 1579–1592.
- COSTA, C.R. (2007). Fungos associados às plantas ornamentais tropicais no distrito federal. 2007. 98f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília.

- DEL-CLARO, KLEBER. 2012. Origens e importância das relações plantas-animais para a ecologia e conservação. In: _____. TOREZAN-SILINGARDI, HELENA MAURA. (orgs). Ecologia das interações plantas-animais: uma abordagem ecológico-evolutiva. Rio de Janeiro: *Technical Books*, p. 336.
- EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; CIMMINO, A.; VURRO, M.; FRACCHIOLLA, M.; CHARUDATTAN, R.; MOT, A. (2005). Drazepinone, a trisubstituted tetrahydronaphthofuroazepinone with herbicidal activity produced by *drechlera siccans*. *Phytochemistry*, 66(6): 715 - 721
- ESTEVES, F. A.; SCARANO, F. R. (orgs.). (2004). Pesquisas de longa duração na restinga de jurabatiba: ecologia, história natural e conservação. São carlos: RIMA, 59-76.
- FONSECA, L.C.N.; VIZENTIN-BUGONI, J.; RECH, A.; ALVES, M.A. (2015). Plant-hummingbird interactions and temporal nectar availability in a *Restinga* from Brazil. *Anais da academia brasileira de ciências*, 87(4): 2163-2175.
- Flora do brasil 2020 em construção. Jardim botânico do rio de janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 07 mai. 2017
- FERREIRA, L.S. (2010). Caracterização de isolados de *curvularia* spp. Endofíticos de milho (*zea mays* L.) por parâmetros morfológicos e moleculares. 118 f. Dissertação (mestre em ciências biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- FILHO, M.R.C.; MELLO, S.C.M.; SANTOS, R.P. E MENÊZES, J.E. (2008). Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*, 226. Brasília, Embrapa recursos genéticos e biotecnologia.
- FREIRE, F.C.O.; BEZERRA, J.L. (2001). Foliar endophytic fungi of Ceará state (Brazil): A preliminary study. *Summa Phytopathologica*, 27(3): 304-08.
- GOMES, J.M.L.; SILVA, N.N.F. (2013). Bromeliaceae das Restingas do estado do Espírito Santo, Brasil. *Natureza online*, 11(2): 79-89.
- GALLO, M. B. C.; CHAGAS, F. O.; ALMEIDA, M. O.; MACEDO, C. C.; CAVALCANTI, B. C.; BARROS, F. W. A.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; BASTOS, J. K.; PUPO, M. T. (2009). Endophytic fungi found in association with *smallanthus sonchifolius* (asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. *Journal of basic microbiology*, 48: 1-10.
- GIBBONS J.G., ROKAS A. (2013). The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends in microbiol.*, 21: 14-22.
- GRIGOLETTI, J. R. A.; FIGUEREDO, A.; GARCÍA, C. (2000). Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. *Revista floresta* (Brasil) 30:155-165

- HONG LU; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. (2000). New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant science*, 151: 67–73.
- HYDE, K.D.; SOYTONG, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal diversity*, 33: 163-173.
- HANLIN, R.T. (1996). Illustrated genera of ascomycetes. Aps press, 274p.
- HAO, J.; SONG, F.; HUANG, F.; YANG, C.; ZHANG, Z.; ZHENG, Y; TIAN, X. (2007). Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 34(3): 233-240.
- HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S. E BISSETT, J. (2009). Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological control*, 51: 409–416.
- KRUSCHEWSKY, M.C. (2010). Taxonomia e ecologia do gênero *Pestalotiopsis* no Brasil, com ênfase para a Mata Atlântica do Sul da Bahia. 59 f. Dissertação (mestre em produção vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus.
- KUNIEDA-ALONSO, S.; ALFENAS, A.C. E MAFFIA, L. A. (2005). Sobrevivência de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* tratados com *Trichoderma* spp., em restos de cultura de *Eucalyptus* sp. *Fitopatologia brasileira*, 30(2): 164-168.
- LINNAKOSKI, R.; PUHAKKA, H.; PAPPINEN, A. (2011). Endophytic fungi isolated from *khaya anthotheca* in ghana. *Fungal ecology*. 12(3): 444-453.
- LIMA, A.; FURTADO, M. (2007). *Curvularia* species (Anamorphic fungi: hyphomycetes) from santiago island, cape vert. *Portugaliae acta biologica*, 22: 145-156.
- LIMA, T.E.F. (2010). Micobiota endofítica de *Vitis labrusca* L. cv. Isabel em regiões do vale do Siriji, Pernambuco, Brasil. 58f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, 2010.
- LINS, S.R.O.; COELHO, R.S.B. (2004). Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no estado de Pernambuco. *Fitopatologia brasileira*, 29(3): 332-335.
- LIU AR, CHEN SC, WU SY, XU T, GUO LD, JEEWON R, WEI JG. (2010). Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and ITS implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy. *Molecular phylogenetics evolution*, 57: 528-35.
- LOUZADA, G.A.S; CARVALHO, D. D. C; MELLO, S.C.M., LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I., BRAÚNA L.M. (2009). Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes ecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. *Biota neotropica*, 9(3): 145–149.

- MAGALHÃES, W. C. S., MISSAGIA, R. V.; COSTA, F. A. F.; COSTA, M. C. M. (2008). Diversidade de fungos endofíticos em candeia *Eremanthus erythropappus* (dc).macleish. *Cerne*, lavras, 14(3): 267-273.
- MANAMGODA, D.S.; CAI, L. MCKENZIE, E.H.C.; CROUS, P.W.; MADRID, H. CHUKEATIROTE, E.; SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P.; HYDE, K.D. (2012). A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* – *Cochliobolus* – *Curvularia* complex. *Fungal diversity*, 56: 131-144.
- MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; RODRIGUES FILHO, E. (2007). Constituintes químicos de *Penicillium* sp, um fungo endofítico isolado de *Murraya paniculata* (rutaceae). *Revista ciências exatas e naturais*, 9(2): 189-199.
- MARTINS-CORDER, M.P., MELO, I.S. (1998). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticicillium dahliae* kleb. *Science agriculture*, 55(1).
- MENEZES, L. F. T.; ARAÚJO, D. S. D. (2005). Formações vegetacionais da restinga da marambaia, Rio de Janeiro. In: MENEZES, L. F. T.; PEIXOTO, A. L.; ARAÚJO, D. S. D. (orgs.). História natural da marambaia. Rio de Janeiro: edur, 67-120.
- MUSSI-DIAS, V.; ARAÚJO, A.C.O.; SILVEIRA, S.F.; ROCABADO, J.M.A.; ARAÚJO, K.L. (2012). Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. *Revista brasileira de plantas medicinais*, 14(2): 261-266.
- NARLOCH, C., OLIVEIRA, V. L., ANJOS, J. T., SILVA FILHO, G. N. (2002). Respostas da cultura do rabanete à inoculação de fungos solubilizadores de fosfatos. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 37(6): 841-845.
- OBUEKWE, C.O.; BADRUDEEN, A.M.; AL-SALEH, E.; MULDER, J. L. (2005). Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under conditions of simultaneous temperature and salt stress. *International biodeterioration & biodegradation*, 56(4): 197-205.
- OSÉS, R.; VALENZUELA, S.; FREER, J.; SANFUENTES, E.; RODRIGUEZ, J. (2008). Fungal endophytes in xylem of healthy chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal diversity*, 33: 77- 86.
- PEREIRA, O. J. (2003). Restinga: origem, estrutura e diversidade. In: JARDIM, M. A. G.; BASTOS, M. N. C.; SANTOS, J. U. M. (orgs.). Desafios da botânica brasileira no novo milênio: inventário, sistematização e conservação da biodiversidade vegetal. Belem: Sociedade Brasileira De Botânica, 177-179.
- PAPAGIANNI, M.; FRANK, W.; MATTEY, M. (2005). Fate and role of ammonium ions during fermentation of citric acid by *Aspergillus niger*. *Applied and environmental microbiology*, 71: 7178-7186.
- PESSOA, W. R. L. S.; BARGUIL, B. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; COELHO, R. S. B. (2008). Ocorrência de *Pestalotiopsis palmarum* em *Caryota mitis*. *Summa phytopathologica*, 34(1): 95, 2008.

- PIMENTEL, I. C.; FIGURA, G.; AUER, C. G. (2010). Fungos endofíticos associados a acículas de *Pinus taeda*. *Summa phytopathologica*, 36(1): 85-88.
- PRATT, R.G. (2006). Enhancement of sporulation in species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, and *Exserohilum* by growth on cellulose-containing substrates. *Mycopathologia*, 162: 133 – 140.
- RIBEIRO, T. P. S. (2009). Fungos queratinofílicos em areia de parques escolares de Boa Vista, Roraima. 47f. Monografia (Pós - graduação em recursos naturais) - Universidade Federal de Roraima. Boa Vista.
- RODRIGUES, A.A.C.; MENEZES, M. (2002). Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de Serra Talhada e de Caruaru, estado de Pernambuco. *Fitopatologia brasileira*, 27: 532-537.
- RODRIGUES, R. L. (2010). Fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* mart. ex schult. F. (velloziaceae) presente em afloramentos rochosos nos estados de Minas Gerais e Tocantins. 70 f. Dissertação (mestrado em ecologia de biomas tropicais) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions* 19:827-837.
- RODRIGUES, K. F.; HESSE, M.; WERNER, C. (2003). Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from spondias mombin. *Journal basic microbial*, 40(4): 261-267.
- RIZZINI CT (1979) tratado de fitogeografia do brasil: aspectos sociológicos e florísticos. 2 ed. São paulo, huncitc, 2 v.
- RAKOTONIRIANA, E. F.; MUNAUT, F.; DECOCK, C.; RANDRIAMAMPIONONA, D.; ANDRIAMBOLOLONIAINA, M.; RAKOTOMALALA, T.; RAKOTONIRINA, E. J.; RABEMANANTSOA, C.; CHEUK, K.; RATSIMAMANGA, S. U.; MAHILLON, J.; EL-JAZIRI, M.; QUETIN-LECLERCQ, J.; CORBISIER, A. M. (2007). Endophytic fungi from leaves of *centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves. *Antonie van Leeuwenhoek*.
- REDMAN, R.S.; SHEEHAN, K.B.; STOUT, T.G.; RODRIGUEZ, R.J.; HENSON, J.M. (2002). Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*, 298.
- SANTOS, A. S.; SANTANA, C.V.S.; ALMEIDA, A. C.; NASCIMENTO, A.R.P.; FRANÇA, F.S. (2009). Fungos associados a manchas foliares em *Heliconia psittacorum* cv. Golden torch, no submédio São Francisco. *Revista verde*, 4(4): 01 – 04.
- SESSEGOLO, T.; TOCHETTO, C.; ZANETTE, R. A.; SILVA, A. S.; ALVES, S. H. MONTEIRO, S. G.; SANTURIO, J. M. (2011). Microbiota fúngica em amostras de água potável e esgoto doméstico. *Semina: ciências agrárias*, 32(1): 301-306.

- SEIFERT, K.; MORGAN-JONES, G.; GAMS, W.; KENDRICK, B. (2011) The Genera of Hyphomycetes. *Cbs biodiversity series*, v. 9, 997p.
- SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; FILHO, S. A.; PINHEIRO, M. L. B. SARQUIS, M. I. M., PEREIRA, J. O. (2004). Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham. *Acta amazonica*, 34(2), 185 -195.
- SCHUTTZ, R.; ARAÚJO, L.C.; SÁ, F.S. (2012). Bromélias: abrigos terrestres de vida de água doce na floresta tropical. *Natureza online*, 10(2): 89-92.
- SOLOGUREN, F. J.; JULIATTI, F. C. (2007). Doenças fúngicas em plantas ornamentais em Uberlândia-MG. *Bioscience journal*, 23(2): 42-52
- SEMPERE, F.; SANTAMARINA, M.P. (2007). *In vitro* biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (fr.) Keissler under different environmental conditions. *Mycopathologia*, 163: 183- 190.
- TRIGIANO, R.; WINDHAM, M.; WINDHAM, A. (2010). Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório.
- VASSILEV, N., MEDINA, A., AZCÓN, R. & VASSILEVA, M. (2006). Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and p uptake. *Plant and soil*, 287: 77-84.
- VERZIGNASSI, J.R.; MATOS, A.P.; SANTOS, M.F.; POLTRONIERI, L.S.; BENCHIMOL, R.L.; SANCHES, N.F. (2009). Mancha negra do abacaxi no Pará. *Summa phytopathol.*, 35(1): 76.
- WANG, F. W.; JIAO, R. H.; CHENG, A. B.; TAN, S. H.; SONG, Y. C. (2006) Antimicrobial potential of endophytic fungi residing in *Guercus variabilis* and brefeldin a obtained from *Cladosporium* sp. *World journal of microbiology and biotechnology*, 23: 79- 83.
- WATANABE, T. (2010). Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. *Crc press*.
- WEI, J.G.; XU, T. (2007). *Pestalotiopsis kunmingensis*, sp. Nov., an endophyte from *Podocarpus macrophyllus*. *Fungal diversity*, 15: 247-254.
- YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R. S.; HESS, W. M. (2011). Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*, 142: 435-440.

4.2 IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE *Trichoderma* spp. ENDOFÍTICOS DE BROMÉLIAS COMO AGENTES DE BIOCONTROLE

RESUMO

Uma das doenças fúngicas de grande importância que ataca a cultura do abacaxizeiro é a gomose, causado pelo fungo *Fusarium guttiforme*. A utilização do *Trichoderma* spp, que são fungos habitantes do solo e de ocorrência natural na forma endofítica em bromélias, ainda não foi estudada visando o biocontrole da gomose do abacaxizeiro. O trabalho objetivou identificar espécies de *Trichoderma* endofíticos de bromélias em Restinga e avaliar o antagonismo *in vitro* e *in vivo* a *Fusarium guttiforme*, agente etiológico da gomose do abacaxi. Foram avaliados 5 isolados de *Trichoderma* mantidos na micoteca da Clínica Fitossanitária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CF/UENF440, CF/UENF441, CF/UENF442, CF/UENF443 CF/UENF444). Um isolado de *F. guttiforme* patogênico ao abacaxizeiro também foi obtido da mesma coleção. Para identificação específica dos isolados de *Trichoderma*, efetuou-se a extração do DNA e o sequenciamento dos genes ITS. Procedeu-se a análise filogenética e os isolados endofíticos de bromélias foram agrupados na seção *Longibrachiatum* e, com baixa homologia dentre as espécies conhecidas, podendo tratar-se, portanto, de nova espécie, o que ainda será confirmado com a obtenção de novas sequências de genes específicos. Foram realizados testes de antibiose *in vitro* para avaliação e seleção dos isolados antagonistas (antagonismo em cultivo pareado, efeito inibitório de compostos voláteis, não voláteis e não voláteis termoestáveis) e

avaliou-se o tratamento biológico de frutos de abacaxi com ferimentos, visando-se avaliar o biocontrole da gomose em pós-colheita. O isolado CF/UENF440 se mostrou como um potencial agente de biocontrole *in vitro* de *F. guttiforme*, pois demonstrou forte antibiose em co-cultivo meio de cultura, tanto para compostos não-voláteis quanto para não-voláteis termoestáveis, diferindo significativamente dos demais isolados testados e do controle. Na avaliação do biocontrole *in vivo* em frutos de abacaxi com ferimentos, os isolados de *Trichoderma* testados não apresentaram significativo efeito protetor no biocontrole da gomose em frutos na pós-colheita.

Palavras-chave: Antibiose, biocontrole.

ABSTRACT

One of the major fungal diseases of the pineapple crop is fusariosis disease, caused by the fungus *Fusarium guttiforme*. On this work, *Trichoderma*, naturally occurring as endophytic forms in Bromeliaceae, were characterized by molecular DNA sequencing (ITS) and were evaluated for *in vitro* and *in vivo* antagonism against one isolate of *Fusarium guttiforme*, the etiological agent of pineapple fusariosis. Five *Trichoderma* isolates maintained in the Phytosanitary Clinic of the State University of North Fluminense Darcy Ribeiro (CF/UENF440, CF/UENF441, CF/UENF442, CF/UENF443 CF/UENF444) were used, as well as one *F. guttiforme* isolate, pathogenic to pineapple. The identification of *Trichoderma* spp. were performed by DNA sequencing and phylogenetic analysis of the ITS gene. The *Trichoderma* isolates from Bromeliaceae were robustly grouped in the *Longibrachiatum* section in a new putative species, which need to be confirmed by pending additional gene sequencing analyses. *In vitro* antibiosis tests were then carried out to select the *F. guttiforme* antagonist isolates (antagonism in matched culture, inhibitory effect of volatile, non-volatile and non-volatile thermostable compounds) and post harvest inoculation on wounded pineapple fruits pre-treated with *Trichoderma* isolates were performed. In the antibiosis tests in paired cultures the CF/UENF440 isolate was shown to be a potential for *in vitro* biocontrol of the pathogen, even for non-volatile and thermo-stable compounds tests. For the evaluation of the inhibitory effect by volatile metabolites, no isolates CF/UENF441, CF/UENF442, CF/UENF443,

CF/UENF444 showed significant difference in inhibition of growth of the pathogen. In the evaluation of the in vivo biocontrol in pineapple fruits, the *Trichoderma* isolates had no effect in relation to controls. Additional studies by inoculation on seedlings and during flowering are needed to evaluate the bioprotection for control of pineapple fusariosis by in vitro selected *Trichoderma* isolates.

Keywords: Antibiosis, biological control

1. INTRODUÇÃO

O abacaxi (*Ananas comosus* (L) Merrill var. *comosus* Coppens e Leal) pertencente à família Bromeliaceae é originário da América do Sul e é frutífera de clima tropical e subtropical com grande importância econômica e social em mais de 70 países (França-Santos et al., 2009). Um dos fatores que mais interferem na produtividade desta fruteira é a presença de microrganismos causadores de doença, como os fungos que afetam diretamente no desenvolvimento, na qualidade e na produtividade de frutos desta cultura (Granada et al., 2004). No Brasil, a fusariose, doença causada pelo fungo *Fusarium guttiforme* Nirenberg e O'Donnell (sin. *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*) é considerada como a doença chave do abacaxizeiro (Aquiye et al., 2010), e a principal cultivar plantada é a Pérola e em seguida a Smooth Cayenne. Ambas suscetíveis à fusariose (Cunha et al., 1999).

A incidência desta doença pode ser minimizada por meio de controles culturais como a utilização de material sadio, inspeção frequente do plantio, remoção de plantas infectadas e evitar produção em época favorável à incidência da doença (Ventura & Costa, 2002). O controle químico permite a produção em épocas favoráveis à doença, mas dentre todos os métodos existentes, o plantio de variedades resistentes ainda é o método mais econômico e eficiente para controlar esta doença (Cabral, 2003).

De maneira geral o controle da fusariose se fundamenta na integração de diversas práticas culturais, entre elas a aplicação de defensivos agrícolas durante o desenvolvimento das inflorescências. A respeito das intervenções de controle, a fusariose continua causando perdas variáveis na produção de frutos e o biocontrole entra como uma estratégia para reduzir a agressividade do agente patogênico. Dentre os muitos agentes potenciais de biocontrole, o fungo *Trichoderma* sp. tem

sido um dos mais estudados, dado as suas características peculiares de antagonismo em condições naturais (Lohmann et al., 2007).

Conforme Luz (2001), os bioprotetores apresentam-se como uma tecnologia alternativa para o controle de fitopatógenos e os microrganismos que apresentam esta capacidade, em especial *Trichoderma*, poderão ter um importante impacto na redução do uso de fungicidas químicos, no alcance da agricultura sustentável e na proteção da natureza.

Os mecanismos de ação pelos quais *Trichoderma* pode atuar no controle biológico são: antibiose, competição, parasitismo e predação, podendo o antagonista agir por um ou mais mecanismos de interações. Inclusive, quando age por mais de um mecanismo, as chances do sucesso da capacidade de biocontrole são aumentadas (Bettiol, 2001).

A antibiose é definida como a interação na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o outro (Stadnik & Bettiol, 2000) e, dentre os fungos que possuem informação genética para a produção de substâncias inibidoras e/ou antibióticas, destaca-se *Trichoderma*. As substâncias que podem ser sintetizadas são antibióticos e enzimas líticas capazes de inibir e destruir propágulos de fungos fitopatogênicos. Esses metabólitos podem ser voláteis e não voláteis (Harman, 2000).

O antagonismo de espécies de *Trichoderma*, foi comprovado com o uso de *T. viride* sobre fungos fitopatogênicos em testes de culturas pareadas sobre *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.), *Cercospora musae* Zimm e *Asperisporium caricae* (Speg) Maubl. Observou-se o domínio dos extratos e dos metabólitos sobre o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos, havendo inibição no desenvolvimento destes (Almeida, 2009).

Em avaliações realizadas com o objetivo de comprovar a efetividade de *Trichoderma* no controle de *Fusarium spp.* os resultados são positivos. Como exemplos, trabalhos mostraram que três isolados de *Trichoderma sp.* apresentam-se efetivos no controle de *F. oxysporum f. sp. phaseoli*, *in vitro*, quando inoculados 48 horas antes e simultaneamente com o fitopatógeno e, *in vivo*, um isolado foi efetivo no controle do fitopatógeno (Pandolfo, 2007). Dentre dez isolados de *Trichoderma* avaliados quanto ao antagonismo em relação à *F. oxysporum*, três (CEN 289, CEN 288 e CEN290) apresentaram forte inibição do patógeno *in vitro* (Carvalho et al., 2008).

Considerando-se a eficácia de *Trichoderma* no controle biológico de doenças de plantas e conhecendo seu efeito de parasita e capacidade de estabelecer competição com outros microrganismos, o presente trabalho objetivou identificar espécies de *Trichoderma* endofíticos a bromélias do ecossistema Restinga e avaliar o antagonismo *in vitro* e *in vivo* a *Fusarium guttiforme*, agente etiológico da gomose do abacaxi.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem dos isolados de fungos

Foram utilizados 5 isolados de *Trichoderma* da micoteca da Clínica Fitossanitária da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CF/UENF440, CF/UENF441, CF/UENF442, CF/UENF443 CF/UENF444). As culturas foram isoladas de folhas de bromélias (*Aechmea nudicaulis*), do Parque Nacional de Restingas de Jurubatiba (PNRJ), localizado no litoral norte do estado do Rio de Janeiro.

O isolado de *F. guttiforme* patogênico à abacaxi também foi obtido da mesma coleção, sendo previamente armazenado em água destilada esterilizada (método Castellani).

2.2 Extração de DNA e sequenciamento para identificação de isolados de *Trichoderma spp.*

O DNA genômico dos fungos foi extraído por maceração da colônia do fungo utilizando-se protocolo de Santos et al. (2017). Após a maceração, a extração foi feita pelo kit de purificação de DNA genômico da Promega (WizardGenomic DNA Purification Kit) (Pinho et al. 2013). O DNA eluído foi armazenado a -20 °C até sua utilização.

A qualidade da extração do DNA genômico foi verificada por meio da eletroforese em gel de agarose 1%. O gel consiste em 100 mL de solução TAE 1X e 1 g de agarose. Essa mistura foi dissolvida em forno micro-ondas e posteriormente resfriada para aplicação dos DNAs. Uma alíquota de 2 µL de cada amostra de DNA foi misturada a 3 µL de gelred e 3 µL de blue Juice e aplicados ao

gel de eletroforese em tampão TAE 1X. A corrida de eletroforese foi realizada a 80 V por 1 hora. Em seguida, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador. Foi utilizado marcador Kasvi DNA Ladder, RTU modelo K9-100 L.

As reações de amplificação foram realizadas com os primers ITS1 (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3") e ITS4 (5"-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3") (White et al. 1990). As condições da reação foram as seguintes: 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 1,5U de Taq polimerase, 0,06 µM de primers (3 pmol/reação), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, e volume final de 50 µl. A amplificação foi realizada em termociclador modelo Veriti[®] Thermal Cyclers, com desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 55 °C, 1 minuto a 72 °C; seguida de extensão final de 3 minutos a 72 °C. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1% (p/v) com o marcador de massa Kasvi DNA Ladder, RTU modelo K9-100 L.

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o sistema comercial de purificação Agencourt AMPure XP (Ambion Magnetic Stand-96). As amostras purificadas foram enviadas para sequenciamento na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda (Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil).

As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software DNA Dragon (Hepperle, 2011). Todas sequências foram corrigidas manualmente e o arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas corrigidos utilizando as sequências dos primers no sentido 5'-3' e 3'-5'. As novas sequências foram depositadas no GenBank (Tabela 1) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A identificação dos isolados seguiu o protocolo sugerido pela Comissão Internacional de Taxonomia de *Trichoderma* e *Hypocrea* (ISTH), utilizando o programa TrichOKEY (Druzhinina et al. 2005). Os isolados foram alocados na seção Longibrachiatum. Como a identidade dos isolados com as espécies do banco de dados da ISTH foi baixa, necessitou-se realizar estudo filogenético com espécies dentro desta seção.

Tabela 1. Isolados de *Trichoderma* incluídos na comparação filogenética de espécies endofíticas de bromélia

Espécie	Isolado	Fonte	Genbank – ITS¹
<i>T. citrinoviride</i>	B163	Ninhos de <i>Atta cephalotes</i>	KR812250
	GJS 90-140	-	X93957
<i>T. reesei</i>	ATCC 13631	-	Z31016
	IMI 192654*	<i>Gossypium hirsutum</i>	NR120297
<i>Hypocrea novaezelandiae</i>	GJS 81-264	-	X93968
	GJS 81-265	-	X93969
<i>T. andinense</i>	LESF560	Ninhos de <i>Atta cephalotes</i>	KT278909
	LESF541	Ninhos de <i>Atta cephalotes</i>	KT278891
<i>T. patella</i>	BPI GJS 91-141*	Madeira decorticada	NR134338
	GJS 91-141	-	AF487663
<i>T. poronioideum</i>	BPI GJS 01-203*	Madeira decorticada	NR134446
	GJS 01-203	Madeira decorticada	KP109821
<i>T. cerebriforme</i>	GJS 85-245	Madeira	KP109822
	BPI GJS 85-245*	Madeira	NR134447
<i>T. pseudokoningii</i>	T-KN9	Solo	LT707591
	GJS 81-300	Casca de Árvore	DQ083025
<i>T. effusum</i>	MYA-4837*	Solo	NR111833
	UFMGCB9736	Endofítico em <i>Vellozia gigantea</i>	KU727722
<i>T. ghanense</i>	HB40016	Solo	KY764894
	ATCC 208858*	Solo	NR120299
<i>T. konilangbra</i>	SD3604	Solo de plantação de Arroz	KT314324
	CY161	Ninhos de <i>Cyphomyrmex wheeleri</i>	HQ607999
<i>T. saturnisporum</i>	ATCC 28023	-	X93977
	QT22143	Solo	KY225677
<i>T. sinensis</i>	SH4206	-	JQ040381
	DAOM 230004	Casca de Árvore	HQ260623
<i>Trichoderma</i> sp. MA 3642	mms1397	Sedimentos	JQ653083
	mms852	Sedimentos	JQ653070
<i>T. orientale</i>	CBS 130428*	Toco de <i>Plagianthus</i> sp. queimado	NR111317
	LESF544	Ninhos de <i>Atta capiguara</i>	KT278894
<i>T. longibrachiatum</i>	LESF009	Ninhos de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	KT278853
<i>Trichoderma</i> spp.	CF/UENF440	Endofítico em <i>Aechmea nudicaulis</i>	MF164017
	CF/UENF441		MF164018
	CF/UENF442		MF164019
	CF/UENF443		MF164020
	CF/UENF444		MF164021

¹ITS = internal transcribed spacer; *Espécie Tipo. Isolados obtidos neste estudo estão destacados em negrito.

2.3 Análise filogenética

Regiões consenso foram comparadas no banco de dados do GenBank utilizando o programa Mega BLAST. As novas sequências foram adicionadas ao conjunto de sequências obtido no Genbank e alinhadas no programa MUSCLE® (Edgar 2004) existente no software MEGA v. 5 (Tamura et al. 2013). Espaços (Gaps) (inserções/deleções) foram tratados como inexistentes.

A análise de Inferência Bayesiana (BI) empregando o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) foi realizada. MrMODELTEST (Posada & Buckley 2004) foi utilizado para selecionar o modelo de substituição de nucleotídeos para análise de BI. Os valores de verossimilhança foram calculados e o modelo selecionado de acordo com Akaike Information Criterion (AIC). O modelo de evolução selecionado para ITS foi HKY+I+G. A análise de BI foi concluída com MrBayes v.3.1.1 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). As quatro cadeias MCMC foram conduzidas simultaneamente, iniciando as árvores aleatoriamente até 107 de gerações. As árvores foram amostradas a cada 1 000 gerações, resultando em 10 000 árvores. As primeiras 2 500 árvores foram descartadas da análise. Os valores de probabilidade posterior (Rannala & Yang 1996) foram determinados da árvore consenso através das 7 500 árvores remanescentes. A convergência dos log de verossimilhança foi analisada com o software TRACER v. 1.4.1 (Rambaut & Drummond 2013). A árvore foi visualizada no software FigTree (Rambaut 2009) e exportada para programas gráficos. A espécie *Penicillium glabrum* SQU-QU09 foi utilizada como grupo externo (outgroup) nas análises.

2.4 Antagonismo em cultura pareada

O antagonismo dos isolados de *Trichoderma* contra *F. guttiforme* foi avaliado utilizando o método de pareamento de culturas, de acordo com Isaias et al, (2014). A multiplicação dos isolados de *Trichoderma* e do patógeno, foi procedida em placas de Petri contendo o meio de batata-dextrose-ágar (BDA), mantidas a 25 °C e fotoperíodo de 12 h, por 7 dias. Posteriormente, discos de 5 mm de diâmetro foram retirados da cultura pura dos fungos e foram depositados a 1,0 cm de distância da borda da placa de Petri, contendo o mesmo meio. O antagonista foi

posicionado no lado oposto ao patógeno e as placas foram mantidas nas mesmas condições descritas acima.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada quando toda a superfície do meio se apresentava colonizada pelo *F. guttiforme* no tratamento controle com ausência do antagonista. O experimento foi realizado com seis repetições com os tratamentos (T0 – controle; T1 – CF/UENF440; T2 – CF/UENF441; T3 – CF/UENF442; T4 – CF/UENF443; T5 – CF/UENF444) distribuídos ao acaso na câmara de crescimento. Com o término do período de cultivo, foram realizadas as avaliações, onde foram aferidas as medidas do diâmetro das colônias do patógeno com o auxílio de régua milimetrada.

2.5 Ação inibitória de metabólitos voláteis, não-voláteis e termoestabilidade de não-voláteis de isolados de *Trichoderma* spp.

A avaliação do efeito inibidor de metabólitos voláteis preferiu-se segundo Isaias et al, (2014). Duas bases de placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo BDA receberam individualmente, discos de 5 mm, das culturas do patógeno e do antagonista. Após 24 h, as bases contendo antagonista e patógeno foram sobrepostas e unidas com filme de PVC. Como testemunha, foram sobrepostas duas bases contendo o patógeno. As placas foram incubadas a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h. Cada tratamento foi composto por seis repetições em delineamento inteiramente casualizado.

Posteriormente, para metabólitos não-voláteis, os isolados de *Trichoderma* foram cultivados em frascos Erlenmeyer contendo 250 mL de meio líquido contendo batata-dextrose. Foram incubadas em agitador orbital a 150 rpm, a 25 °C, em ausência de luz, durante cinco dias. Após esse período, a parte líquida foi filtrada em papel de filtro e centrifugada. A fase líquida foi esterilizada em membrana de celulose (0,45 µm) e incorporada ao meio BDA, na proporção de 25% (v/v). Foram preparadas seis placas com filtrado de cada antagonista, para confronto com o patógeno. Discos de ágar (5 mm) retirados de cultura do patógeno, foram depositados no centro de cada placa de Petri contendo meio BDA suplementado com filtrado de culturas do antagonista. As culturas foram incubadas a 25 °C. O tratamento controle consistiu do patógeno cultivado na ausência de filtrados de culturas dos antagonistas. As avaliações do crescimento micelial foram realizadas

quando toda a superfície do meio foi colonizada pelo *F. guttiforme* nas placas do tratamento controle.

Concomitantemente, realizou-se avaliação da termoestabilidade dos metabólitos não-voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. Os procedimentos para avaliação foram conduzidos em paralelo com a avaliação de metabólitos não-voláteis, porém os filtrados de cultura foram previamente submetidos ao aquecimento a 121 °C por 20 min, antes de serem plaqueados com meio de cultivo. Utilizou-se seis placas para cada agente obtido dos antagonistas. O tratamento controle consistiu do patógeno. As avaliações do crescimento micelial foram realizadas quando toda a superfície do meio foi colonizada pelo *F. guttiforme* nas placas do tratamento controle.

2.6 Teste de biocontrole *in vivo*

Para avaliar a eficácia do antagonismo mediado por isolados de *Trichoderma* spp. contra o fungo patogênico *F. guttiforme*, agente causal da gomose do abacaxi, foi realizado um teste *in vivo* em frutos de abacaxi. Foram utilizados frutos de abacaxi da cultivar Pérola, suscetível à doença. Os frutos utilizados foram selecionados de acordo com o estágio de maturação, que foi o estágio 1, em que os segmentos do fruto são, na sua parte central, de cor verde, passando a verde bem escuro na sua periferia e a marrom escuro nos sulcos divisórios.

Os frutos passaram por desinfestação superficial, onde foram mergulhados em hipoclorito de sódio (água sanitária comercial) a 0,5% para limpeza, por 5 minutos e colocados em bancada para secagem. Após a secagem, receberam uma perfuração de 1 cm de profundidade, na região do terço inferior, utilizando-se, para isso, uma ponteira de 100 uL de capacidade. Posteriormente, os frutos foram imersos em suspensão de 10^7 conídios/mL obtida individualmente de cada um dos cinco isolados de *Trichoderma* spp. A imersão ocorreu por um tempo de 2 minutos seguida por incubação dos frutos em câmara úmida por 24 horas para aderência da suspensão e início do crescimento do antagonista nos frutos. Passado esse período, os frutos foram inoculados, nos orifícios anteriormente feitos, com um disco de 0,5 cm da colônia da cultura pura de *F. guttiforme*, permanecendo em câmara úmida por mais 48 horas. Após esse tempo, os frutos foram retirados de câmara úmida e deixados em bancada de 7 a 10 dias até a avaliação da infecção.

Foram utilizados 4 frutos para cada tratamento que consistiu de: T1 – controle sem *F. guttiforme* (fruto sem tratamento com antagonista e sem a inoculação de *F. guttiforme*; T2 – controle com *F. guttiforme* (fruto sem tratamento com antagonista e com inoculação do fungo patogênico); T3 – suspensão do isolado CF/UENF440; T4 - suspensão do isolado CF/UENF441; T5 - suspensão do isolado CF/UENF442; T6 – suspensão do isolado CF/UENF443; T7 – suspensão do isolado CF/UENF444. O ensaio foi repetido três vezes. Os frutos foram abertos e foram realizadas medidas de largura, comprimento e área da lesão formada pelo fungo patogênico em todos os tratamentos.

2.7 Análises estatísticas

Para cada isolado, realizou-se um teste de comparação de médias de inibição de crescimento do patógeno *F. guttiforme* sob efeito inibitório por metabólitos voláteis, não-voláteis, termoestáveis e biocontrole *in vivo* através do teste de Skott-knott, considerando o nível de 5% de significância estatística. O mesmo foi aplicado ao biocontrole *in vivo*. Para as análises adotou-se o programa de linguagem estatística R, livre para download no site <http://www.r-project.org/>. Utilizou-se o pacote ExpDes (Ferreira et al. 2014) para obtenção das análises.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação de espécies de *Trichoderma* spp.

A análise filogenética foi realizada com 38 táxons e o alinhamento das sequências resultou num total de 746 caracteres, dos quais 89 foram informativos para parcimônia, 227 foram variáveis e 473 foram conservados. Pela análise filogenética utilizando o gene ITS foi possível a identificação de um novo clado, bem suportado (pp = 0.99), entre os clados de *T. andinense* e *T. citrinoviride*, indicando a possibilidade de estes isolados pertencerem à uma nova espécie (Figura 1). Estudos complementares utilizando os genes Tef-1 α e Rpb-2 deverão ser realizados, assim como as análises morfológicas deverão ser complementadas para confirmação e descrição de provável nova espécie. Todos os isolados de

bromélias estudados parecem se tratar de uma mesma espécie, com base na análise filogenética.

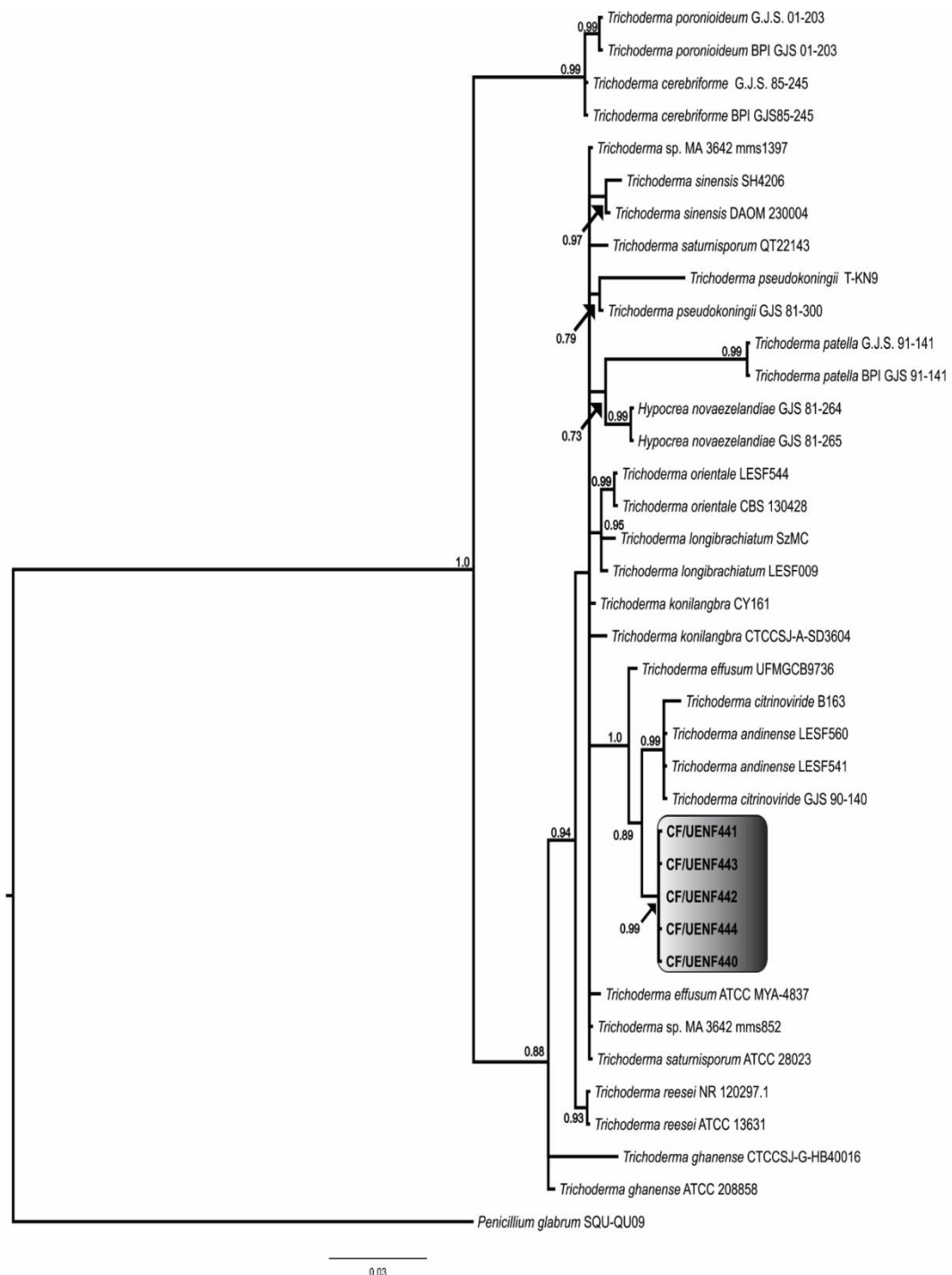


Figura 1 – Filograma baseado na Inferência Bayesiana de seqüências do gene ITS de isolados de *Trichoderma* sp., endofíticos de bromélia *Aechmea nudicaulis*. A probabilidade posterior está indicada próxima aos nós dos ramos. A árvore foi enraizada em *Penicillium glabrum* SQU-QU09

Os isolados foram alocados na seção *Longibrachiatum*, porém a identidade dos isolados com as espécies do banco de dados da ISTH foi baixa.

Taxonomicamente, *Trichoderma* foi dividido em cinco seções, incluindo a seção *Longibrachiatum*, mas com análises filogenéticas moleculares crescentes, a nomenclatura seccional de *Trichoderma* foi abandonada em favor da nomeação de clados filogenéticos (Kubicek et al., 2008). Curiosamente, porém, a seção distintiva morfológica e metabólica *Longibrachiatum* é uma das duas únicas seções que permaneceu intacta na sequência da análise filogenética (Druzhinina et al., 2012).

O clado *Longibrachiatum* compreende as espécies de *Trichoderma* mais intensamente estudadas, compreende espécies que são utilizadas industrialmente na produção de enzimas celulolíticas e hemicelulases envolvidas na indústria alimentar, têxteis e tecnologia biocombustível (Kubicek et al., 2009; Gal-Hamed et al., 2011).

3.2 Avaliação do antagonismo em cultura pareada

Para o antagonismo em cultivo pareado, avaliou-se inibição do crescimento micelial de *F. guttiforme* confrontado com os 5 isolados de *Trichoderma*. Os isolados CF/UENF441, CF/UENF442 e CF/UENF443 foram os que apresentaram inibição de crescimento micelial do agente patogênico, com 82.62%, 83.3% e 80.63%, respectivamente de percentuais de inibição de crescimento micelial.

O *Trichoderma* utiliza diferentes mecanismos de ação contra seus competidores, incluindo ação direta, degradação e uso de carboidratos complexos pela ação de enzimas produzidas (Harman et al., 2004), tornando-os, como um dos mais bem-sucedido colonizadores dos seus habitats (Shuster e Schomol, 2010).

A maior inibição de crescimento micelial de *F. guttiforme* a 5 isolados (Figura 3) de *Trichoderma* pode estar relacionada à origem dos isolados de *Trichoderma*, já que os mesmos foram obtidos de forma endofítica em bromeláceas de restinga. Como *F. guttiforme* foi isolado de abacaxi infectado, pode-se supor que os isolados de *Trichoderma* provenientes de bromeláceas tenham uma ação mais efetiva do que os provenientes de outras culturas e apresente estratégia de defesa mais eficaz.

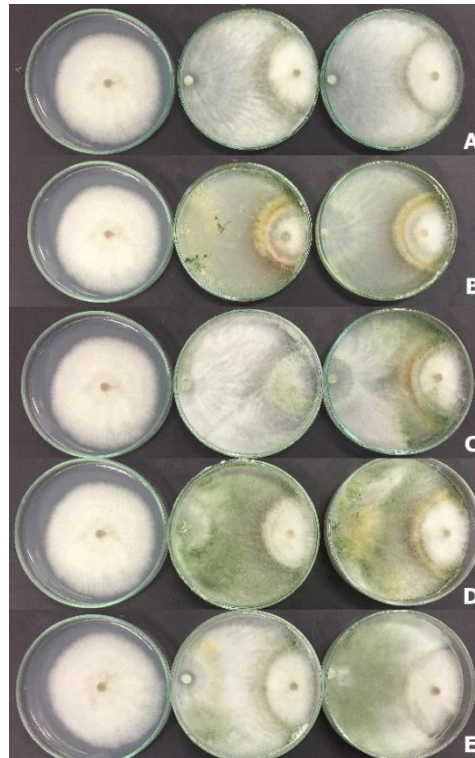


Figura 2 – Culturas pareadas em meio de BDA, mostrando a inibição de crescimento micelial do *F. guttiforme* pelo agente antagonístico *Trichoderma* spp. (A) controle e repetições do isolado CF/UENF440; (B) controle e repetições do isolado CF/UENF441; (C) controle e repetições do isolado CF/UENF442; (D) controle e repetições do isolado CF/UENF443; (E) controle e repetições do isolado CF/UENF444

Os fungos com mecanismos antagonistas utilizam diferentes mecanismos de interações com patógenos (Duffy et al., 2003). Howell (2003) por sua vez, demonstra que, o melhor método para obter um potencial agente de biocontrole de *Trichoderma*, é realizando o isolamento de áreas de solos e plantas onde a doença esteja ocorrendo. A avaliação de cultura pareada serve para selecionar isolados que tenham maior atividade antagonística e de micoparasitismo (Mello et al, 2007).

Na avaliação, crescimento e o enrolamento de hifas são importantes na interação com o patógeno, e por si só não garantem sucesso no controle biológico (Almeida et al., 2007). Alguns pesquisadores citam a ação sinérgica atribuída à produção de enzimas e antibióticos, possa explicar essa interação.

Os metabólitos produzidos por espécies de *Trichoderma* foram encontrados com altos índices de enzimas líticas, hormônio e metabólitos secundários com importantes funções biológicas (Lorito et al., 2010). Nas aplicações de antagonistas no controle de fitopatógenos têm sido utilizadas diferentes espécies de isolados *Trichoderma* e a antibiose tem sido considerada um dos principais mecanismos de ação realizados pelo antagonista (Reino et al., 2008).

3.3 Efeito inibitório de metabólitos voláteis, não-voláteis e não-voláteis termoestáveis produzidos por isolados de *Trichoderma* spp.

A inibição de crescimento de *F. guttiforme* mediado pelo efeito inibitório de metabólitos voláteis, não-voláteis e não-voláteis termoestáveis de isolados de *Trichoderma* spp. está representado na Tabela 2. Para os metabólitos voláteis, os isolados CF/UENF441, CF/UENF442, CF/UENF443, CF/UENF444, foram os que apresentaram menores média de crescimento de *F. guttiforme*, onde os percentuais de inibição de crescimento promovido pela ação antagonônica de *Trichoderma* spp. variam de 67,30% a 71,66%, mostrando que os isolados dos antagonistas atuam diretamente na inibição de crescimento do agente patogênico por ação de metabólitos voláteis.

Tabela 2 - Médias (mm) do diâmetro das colônias de *F. guttiforme* por metabólitos voláteis, não-voláteis e não voláteis termoestáveis produzidos por isolados de *Trichoderma* spp.

	Efeito inibitório		
	Voláteis	Não-voláteis	Termoestáveis
Controle	83,00 a	77,00 a	77,00 a
CF/UENF440	54,08 b	26,00 d	36,66 e
CF/UENF441	47,16 c	34,91 c	50,00 b
CF/UENF442	45,08 c	42,75 b	42,91 d
CF/UENF443	44,16 c	33,33 c	46,66 c
CF/UENF444	43,50 c	42,25 b	40,66 d
CV(%)	12,53	7,70	4,89

Letras iguais mostram que o isolado não difere entre si quanto à inibição do patógeno por compostos voláteis, não-voláteis e não-voláteis termoestáveis, segundo o teste de Skott-knott, ao nível de 5% de significância estatística.

Gruber e Seidel-Seiboth (2012), avaliaram e constataram que, o crescimento em direção à hifa do patógeno, o *Trichoderma* produz metabólitos voláteis e enzimas hidrolíticas que, ao degradar a parede celular do patógenos e ativam a expressão de genes envolvidos no micoparasitismo (Almeida et al., 2007).

Para metabólitos não-voláteis e não voláteis termoestáveis, o isolado CF/UENF440 foi o que se mostrou promissor na inibição de crescimento de *F. guttiforme* segundo demonstra os dados estatísticos da Tabela 2.

Os dados de percentuais de inibição de crescimento, mostram que o isolado endofítico CF/UENF440, apresentou 88,43% de inibição para o ensaio de metabólitos não-voláteis e de 77,30% para o ensaio de metabólitos não-voláteis

termoestáveis. Esses dados mostram que o *Trichoderma* spp. vem se mostrando como um agente promissor de biocontrole de *F. guttiforme* *in vitro*.

Na avaliação, os metabólitos voláteis, não-voláteis e não-voláteis termoestáveis produzidos pelos isolados de *Trichoderma*, proporcionaram uma variação no percentual de inibição do crescimento micelial desse patógeno, dependendo do metabólito avaliado. Os resultados mostraram que *F. guttiforme* foi mais suscetível a ação dos metabólitos não-voláteis e não-voláteis termoestáveis produzidos pelos isolados de *Trichoderma*, com inibição acima de 70%.

No teste de termoestabilidade, os metabólitos de *Trichoderma* spp. se mantiveram ativos mesmo após autoclavagem, pois inibiram o crescimento micelial do patógeno, indicando o potencial desses metabólitos antifúngicos, nas condições experimentais utilizadas.

Vários estudos apontam uma susceptibilidade dos fungos fitopatogênicos a metabólitos produzidos por antagonistas, inclusive por isolados de *Trichoderma* spp. (Duffy et al., 2003). Segundo Martin-Corder & Melo (1998), a capacidade de *Trichoderma* produzir metabólitos secundários e o seu efeito fungicida pode variar entre espécies, entre isolados da mesma espécie e de suas fontes de isolamento, como ocorre com os endofíticos (Sivasithanparam e Ghisalberti, 1998) e em função dos compostos antifúngicos secretados (Lorito et al., 2010).

As análises de metabólitos produzidos por isolados de *Trichoderma* são importantes para selecionar os biologicamente ativos para biocontrole. Os mecanismos usados pelos agentes de biocontrole são complexos e sua ação varia de acordo com o agente de biocontrole, do patógeno e da planta hospedeira envolvida na interação (Howel, 2003; El-Hassan et al., 2009). A aplicação dos metabólitos de *Trichoderma*, obtidos via cultivo massal desses fungos, pode viabilizar a obtenção de novos biofertilizantes e biopesticidas baseado em compostos bioativos (Vinale et al., 2009).

O entendimento dos mecanismos de ação envolvido no antagonismo de isolados *Trichoderma* sobre fitopatógenos são importante para a seleção de agentes de biocontrole, levando em consideração que esse potencial deve ser também avaliado em condições de campo, pois o nível de controle biológico de um patógeno pode variar em função do agente de biocontrole utilizado e sua capacidade de adaptação às condições bióticas e abióticas (Dennis et al., 1971a; Dennis et al., 1971b), dentro e entre espécies de *Trichoderma*.

3.4 Biocontrole *in vivo* de *F. guttiforme* em frutos de abacaxi

Nas análises realizadas nos testes *in vivo* para avaliação do potencial de biocontrole de *F. guttiforme* com suspensões de isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos, pode-se constatar que os isolados do antagonista não apresentaram efeito de biocontrole sobre o agente patogênico aplicando-se esta metodologia. Na tabela 3, no parâmetro comprimento da lesão não houve diferença significativa entre o controle e os isolados e o controle. O mesmo aconteceu com o parâmetro largura e área das lesões, onde os isolados CF/UENF440 e CF/UENF443 obtiveram médias relativamente mais altas que o controle.

Tabela 3 – Comparação do crescimento de lesões de *Fusarium guttiforme* em frutos de abacaxi protegidos com suspensão de por isolados de *Trichoderma* spp.

Biocontrole de <i>F. guttiforme</i>			
	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Área (cm²)
Controle com <i>F. guttiforme</i>	3,725 a	3,750 b	14,267 b
CF/UENF440	3,675 a	5,825 a	24,400 a
CF/UENF441	3,575 a	4,125 b	14,957 b
CF/UENF442	3,875 a	4,125 b	16,675 b
CF/UENF443	4,200 a	6,975 a	29,130 a
CF/UENF444	3,750 a	3,875 b	14,267 b
CV (%)	11,74	26,57	32,01

Letras iguais mostram que o isolado não difere entre si quanto à inibição do patógeno volátil, não-volátil e não-volátil termoestável, segundo o teste de Skott-knott, ao nível de 5% de significância estatística.

Com as análises realizadas, ressalta-se que os isolados não proporcionaram efeito antagônico contra o *F. guttiforme*. Os metabólitos produzidos pelos isolados sob condições controladas podem se distinguir funcional e quantitativamente daqueles presentes nos fermentos em fruto. Isto pode ocorrer devido a variações nas condições de temperatura, umidade, fatores nutricionais e estágio de maturação dos frutos. Além disso, a ação antagonista pode resultar do efeito sinérgico da atividade enzimática dos fungos nos tecidos internos do fruto. Assim, faz-se necessário avaliar se os isolados oferecem proteção as mudas e durante a floração no campo.

Uma hipótese que pode ser levantada a respeito dos dados obtidos no experimento é que, no momento de interação entre os isolados endofíticos de *Trichoderma* spp. com o *F. guttiforme*, a ação de enzimas hidrolíticas secretadas pelo antagonista pode ter efetuado um sinergismo sobre o fungo patogênico, potencializando sua ação no fruto, aumentando o tamanho e a área da lesão.

Segundo Massart e Jujakli (2007), o processo de como os agentes de biocontrole efetivamente atuam na proteção é um requisito para sua aplicação prática, exemplo disso, na identificação dos genes que são expressos preferencialmente e que podem significar um determinado processo biológico (Huang *et al.*, 2007).

No biocontrole mediado por *Trichoderma*, as enzimas hidrolíticas, antibióticos, metabólitos voláteis, moléculas de resistência ao estresse e de indução de resistência em plantas (Viterbo *et al.*, 2002). Moléculas liberadas pelo hospedeiro e pela ação das enzimas hidrolíticas sobre a parede do hospedeiro ativam a expressão de genes envolvidos.

Outro mecanismo de biocontrole que pode ocorrer em plantas e não em frutos, é a indução da resistência no hospedeiro por elicitores ou indutores de resistência, os quais podem ser proteínas com atividade enzimática, como xilanase; produtos de genes de tipo avirulência capaz de induzir reações de defesa em plantas; compostos de baixo peso molecular liberados de paredes de células de fungos ou de plantas pela atividade de enzimas secretadas por *Trichoderma* spp (Harman *et al.*, 2004; Woo e Lorito, 2007).

Para *Trichoderma* spp., o mecanismo de biocontrole mais aceito tem sido o micoparasitismo mediado pela produção de quitinases e outras enzimas que degradam a parede celular do patógeno (Gruber *et al.*, 2011). Em estudos *in vitro*, confrontando-se *Trichoderma* spp. com *F. culmorum* e *F. graminearum*, os resultados mostraram uma regulação positiva de todos os genes testados durante o micoparasitismo, indicando o envolvimento de enzimas quitinolíticas nessa interação (Matarese *et al.*, 2012). Todavia, em frutos de abacaxi, a metodologia utilizada não possibilitou a avaliação e a atividade de enzimas sobre o patógeno pode não ter sido expressa ou rápida ao ponto de impedir a rápida infecção de *F. guttiforme* em frutos com ferimento na pós-colheita.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os Isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos de bromeliáceas de restingas, realizada segundo análise filogenética com base no gene ITS, propõe que estes isolados, (CF/UENF440, CF/UENF441, CF/UENF442, CF/UENF443, CF/UENF444), pertencem a uma provável nova espécie do clado *Longibrachiarum*.

Para os testes de antagonismo em culturas pareadas para inibir crescimento de *F. guttiforme*, o isolado CF/UENF440, se mostrou como um potencial agente de controle *in vitro* do agente patogênico.

Para avaliação do efeito inibitório por metabólitos voláteis, os isolados CF/UENF441, CF/UENF442, CF/UENF443, CF/UENF444 não apresentaram diferença significativa na inibição de crescimento do agente patogênico; na avaliação dos metabólitos não-voláteis e não-voláteis termoestáveis, destaca o isolado CF/UENF440 como potencial inibidor de crescimento de *F. guttiforme*, resultado esse, se equiparando com o teste de antagonismo por pareamento de culturas.

Na avaliação do biocontrole *in vivo* em frutos de abacaxi com ferimentos, os isolados do antagonista não apresentaram efeito sobre o agente patogênico *F. guttiforme*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AQUIJE, G.M.F.V.; ZORZAL, P. B; BUSS, D.S.; VENTURA, J.A; FERNANDES, P.M. B; FERNANDES, A. A. R. (2010). Cell wal alterations in the leaves of fusariosis resistant and susceptible pineapple cultivars. *Plant Cell Reports*, 9(10): 1109-1117.
- ALMEIDA, W. K. D. S. (2009). Antagonismo de *Trichoderma viride* sobre fungos fitopatogênicos, *Colletotrichum* spp., *Cercospora musae* e *Asperisporium caricae* em Fruteiras Tropicais. *Revista Brasileira de Agroecologia*. 4(2): 1374-1378.
- ALMEIDA, F.B.; CERQUEIRA, F.M.; SILVA, R. DO N.; ULHOA, C.J.; LIMA, A.L. (2007). Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 29(8): 1189-93.
- BETTIOL W. (2001). Métodos Alternativos para o Controle de Doenças de Plantas. In.: *Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável*. Editores: S. J. MICHEREFF e R. BARROS. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; M., LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249-260.
- CABRAL, J.R.S., SOUZA, A., MATOS, A. P., CALDAS, R. C. (2003). Efeito da autofecundação em cultivares de abacaxi. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 25 (1): 184-185.
- CUNHA, G.A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S.; (1999). O Abacaxizeiro. Cultivo, agroindústria e economia. Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, BA). Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 17-480.

- CARVALHO, D. D. C.; OLIVEIRA, T. A. S.; BRAÚNA, L. M., MELLO, S. C. M. (2008) Isolados de *Trichoderma* sp. antagônicos a *Fusarium oxysporum*. COMUNICADO TÉCNICO 178.
- DRUZHININA I, KOPTCHINSKI A, KOMON M, BISSETT J, SZAKACS G, KUBICEK CP (2005) An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genet Biol* 42:813–828
- DRUZHININA IS, KOMON-ZELAZOWSKA M, ISMAIEL A, JAKLITSCH WM, MULAW T, SAMUELS GJ, KUBICEK CP (2012) Molecular phylogeny and species delimitation in the Longibrachiatum Clade of *Trichoderma*. *Fung Genet Biol*: 49(5): 358–368
- DUFFY, B.; SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J.M. (2003). Pathogen Self-Defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review Phytopathology*, 41: 501-538.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. (1971a) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III. Hyphal interactions. *Transactions British Mycological Society*, 57(1): 363-369.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. (1971b). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Transactions British Mycological Society*, 57(11): 41-48.
- EDGAR, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797
- EL-HASSAN, A.; WALKER, F.; SCHÖNE, J.; BUCHENAUER, H. (2009). Detection of viridifungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 124: 457–470.
- FRANÇA-SANTOS, A; ALVES, R. S.; LEITE, N. S; FERNANDES, R. P. M. (2009). Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi). *Scientia Plena, Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro* 5(11): 1-6.
- GRANADA, G. G.; ZAMBIAZ, R. C.; MENDONÇA, C. R. B. (2004). Abacaxi: produção, mercado e subprodutos. Curitiba: Boletim do CEPPA, 405-422.
- GAL-HEMED, I., ATANASOVA, L., KOMON-ZELAZOWSKA, M., DRUZHININA, IS, VITERBO, A., YARDEN, O., (2011). Isolados marinhos de *Trichoderma* como possíveis agentes halotolerantes de controle biológico para zonas áridas agricultura. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(15): 5100–5109
- GRUBER, S.; SEIDL-SEIBOTH, V. (2012). Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. *Microbiology*. 158: 26-34.

- HARMAN, G. E. (2000). Myths and Dogmas of Biocontrol: Changes and Perceptions derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*. 377-393
- HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. (2004). *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews/Microbiology*, 2(1): 43–56.
- HOWELL, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The History and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87: 4-10.
- HUANG, X., LI, Y., NIU, Q., ZHANG, K. (2007). Suppression Subtractive Hybridization (SSH) and its modifications in microbiological research. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 76(4):753-760.
- HOITINK, H.A.J., MADDEN, L.V., DORRANCE, A.E., (2006). Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp.: interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. *Phytopathology* 96, 186–189.
- HEPPERLE, D. (2011). DNA Dragon 1.4.1 - DNA Sequence Contig Assembler Software. Disponível em: www.dna-dragon.com. Acessado em 22 de maio de 2017.
- ISAIAS, C.O.; MARTINS, I.; SILVA, J.B.T.; SILVA, J.P.; MELLO, S.C.M. (2014). Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. *Summa Phytopathologica*, 40(1): 34-41.
- VENTURA, J. A.; COSTA, H. (2002). Manejo integrado das doenças de fruteiras tropicais: Abacaxi, Banana e Mamão. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). *Manejo integrado: fruteiras tropicais doenças e pragas*, 279-352.
- KVAS, M; MARASAS, W. F. O; WINGFIELD, B. D; WINGFIELD, M. J; STEENKAMP, E. T. (2009). Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal diversity*, 39: 1-18.
- KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. (2003). Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. *Fitopatologia Brasileira*, 28(3): 251-257
- KUBICEK CP, KOMON-ZELAZOWSKA M., DRUZHININA IS. (2008) Gênero fúngico *Hypocrea* / *Trichoderma* : dos códigos de barras à biodiversidade. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. 9 : 753-763.
- KUBICEK CP, MIKUS M., SCHUSTER A., SCHMOLL M., SEIBOTH B. (2009) Estratégias de engenharia metabólica para a melhoria da produção de celulase pela *Hipocereia jecorina*. *Biotechnol. Biocombustíveis*. 2: 19.
- LOHMANN R.T.; PAZUCH D.; STANGARLIN J. R.; SELZLEIN C., NACKE H. (2007). Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para controle de *Sclerotium rolfsii* em soja. *Revista Brasileira de Agroecologia*. 2(2): 1665-1668.

- LUZ, W. C. (2001). Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. *Fitopatologia Brasileira*. v. 26.
- LORITO, M.; WOO, S.L.; HARMAN, G.E.; MONTE, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annual Review Phytopathology*, 498: 395–417.
- MATARESE, F.; SARROCCO, S.; GRUBER, S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; VANNACCI, G. (2012). Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. *Microbiology*, 158, 98–106
- MARTINS-CORDER, M.P.; MELO, I.S. (1998). Antagonismo “in vitro” de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* Kleb. *Scientia Agrícola*, 55: 1-7.
- MELLO, S.C.M.; ÁVILA, Z.R.; BRAÚNA, L.M.; PÁDUA, R.R.; GOMES, D. (2007). Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 11(1): 3-9.
- MASSART, S., JIJAKLI, H.M. (2007). Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents: A review. *Journal of Microbiolcal Methods*. 69:229-241.
- PANDOLFO, J. D. (2007). Dissertação de Mestrado: Associação de *Trichoderma* sp. a fungicidas no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- PINHO, D.B.; DUTRA, D.C.; PEREIRA, O.L. (2013). Notes on *Ceratocystis paradoxa* causing internal post-harvest rot disease on immature coconut in Brazil. *Trop. Plant Pathol.* 38: 152-157.
- POSADA, D.; BUCKLEY, T.R. (2004). Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over relationships ratio tests. *Systematic Biology*, 53:793-808.
- RAMBAUT, A. (2009). FigTree 1.2.2. Disponível em: tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree. Acessado em 22 de maio de 2017.
- RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J. (2003). Tracer version 1.2 [computer program]. Disponível em: <http://evolve.zoo.ox.ac.uk>. Acessado em 22 de maio de 2017.
- RANNALA, B.; YANG, Z. (1996). Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* 43: 304-311
- RONQUIST, F.; HEULSENBECK, J.P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574
- REINO, J.L.; GUERRERO, R.F.; HERNÁNDEZ-GALÁN R.; COLLADO, I.G. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 7: 89–123.

- STADNIK, M.J.; BETTIOL, W. (2000). Controle biológico de oídeos. In: MELO, I.S. de. AZEVEDO, J.L. (editores). Controle biológico. Jaguariúna: EMBRAPA MEIO AMBIENTE. 3: 95-112.
- SANTOS, P.H.D.; CARVALHO, B.M.; AGUIAR, K.P.; AREDES, F.A.S.; POLTRONIERI, T.P.S.; VIVAS, J.M.S.; MUSSI DIAS, V.; BEZERRA, G.A.; PINHO, D.B.; PEREIRA, M.G.; SILVEIRA, S.F. (2017). Phylogeography and population structure analysis reveals diversity by mutations in *Lasiodiplodia theobromae* with distinct sources of selection. *Genetics and Molecular Research*, 16 (2): gmr16029681.
- SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 787–799.
- SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L. (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. *Trichoderma and Gliocladium*. Harman, G.E. and Kubicek, C.P. London: Taylor and Francis Ltd. 1:139–191.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. (2013). MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L. (2002). Controle das doenças do abacaxizeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. DO.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. (Eds) *Controle de doenças de plantas: Fruteiras*, 445-510.
- VINALE, F.; GHISALBERTI, E.L.; SIVASITHAMPARAM, K.; MARRA, R.; RITIENI, A.; FERRACANE, R.; WOO, S.; LORITO, M. (2009). Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 48: 705–711.
- VITERBO, A. V., RAMOT.O., CHERNIN, L., CHET, I. (2002). Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. *Ant. Van Leeuwenhoek*. 81: 549-556.
- 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.K. (Eds). *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Sam Diego, Ca, USA. Academic Press. 315-322
- WOO, S.L., LORITO, M., (2007). Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In: Vurro, M., Gressel, J. (Eds.), *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*. IOS, Springer Press, Amsterdam, the Netherlands, pp. 107–130
- WOO, S.L., SCALA, F., RUOCCO, M., LORITO, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology* 96, 181–185.

RESUMO GERAL DAS CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, de caráter exploratório, foram isolados e identificados em nível de gênero, fungos endofíticos de duas espécies de bromélias do Parque Nacional de Restingas de Jurubatiba – RJ. Obtiveram-se 164 isolados, identificados nos gêneros: *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp, *Monilia* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., e *Trichoderma* sp. Houve diferenças nas frequências das colônias e isolados obtidos para os gêneros fúngicos dentre espécies e coletas.

Na espécie *A. nudicaulis* foram exclusivos os gêneros *Bipolaris* sp. e *Curvularia* sp., enquanto que na espécie *B. antiacantha*, o gênero *Monilia* sp. Os demais gêneros foram encontrados em ambas hospedeiras estudadas, mas com diferentes frequências. 21% isolados que não produziram esporos em cultura pura, foram caracterizados, mas não-identificados em nível de gênero, o que requererá estudos adicionais, com marcadores moleculares. Todavia, acredita-se se tratar de um ou poucas espécies de um mesmo gênero, já as colônias obtidas foram homogêneas quanto ao padrão morfológico. Em associações com bromélias de restinga, ainda não há relato publicado sobre a interação desses fungos identificados e espécies de bromélias.

A bibliografia aponta que dentre os fungos caracterizados, há possibilidade de se explorar seu potencial biotecnológico para diferentes fins, tais como: produção de metabólitos secundários e fármacos (*Pestalotiopsis* spp.), solubilização de fosfatos, como indutores de resistência a doenças e no controle biológico, na produção de enzimas de interesses industriais. Visto isso, os isolados

com potencial biotecnológico em cada gênero, espera-se avançar na identificação específica dos isolados de interesse, mediante aprofundamento dos estudos morfológicos e com base em marcadores moleculares (DNA).

Os Isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos de bromeliáceas de restingas, CF/UENF440, CF/UENF441, CF/UENF442, CF/UENF443, CF/UENF444, segundo análise filogenética com base nas sequências do gene ITS, pertencem a uma provável nova espécie do clado Longebrachiarum.

Nos testes de antagonismo em culturas pareadas para inibir crescimento de *F. guttiforme*, o isolado CF/UENF440 se destacou como um potencial agente de controle *in vitro* do agente patogênico. Para avaliação do efeito inibitório por metabólitos voláteis, os isolados CF/UENF441, CF/UENF442, CF/UENF443, CF/UENF444 não apresentaram diferença significativa na inibição de crescimento do agente patogênico. Todavia, quanto a a avaliação de metabólitos não-voláteis e não-voláteis termoestáveis, novamente destacou-se o isolado CF/UENF440 como potencial inibidor de crescimento de *F. guttiforme*, resultado esse, se equiparado a teste de pareamento de culturas.

Na avaliação do biocontrole *in vivo* em frutos de abacaxi, os isolados de *Trichoderma* sp. avaliados não apresentaram efeito protetor em frutos com ferimento, visando ao biocontrole da gomose em frutos na pós-colheita.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C., MAFIA, R.G. Métodos em fitopatologia. Viçosa: UFV, 2007. 382p.
- ALFENAS, AC; PETERS, I; BRUCE, W; PASSADOR, GC. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 242p., 1991.
- ALMEIDA JR. E.B.; OLIVO, M.A.; ARAÚJO, E.L. & ZICKEL, C.S. Caracterização da vegetação de restinga da RPPN de Maracaípe, PE, Brasil, com base na fisionomia, flora, nutrientes do solo e lençol freático. *Acta Botanica Brasilica* 23(1): 36-48. 2009.
- ALMEIDA JR., E.B., SANTOS-FILHO, F.S., ARAÚJO, E.L.; ZICKEL, C.S. Structural characterization of the woody plants in restinga of Brazil. *Journal of Ecology and the Natural Environment* 3: 95-103, 2011.
- ARAÚJO, D.S.D. Análise florística e fitogeografia das restingas do estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2000.
- ARAÚJO, D.S.D.; LACERDA, L. A natureza das restingas. *Ciência Hoje*, 6: 42-48, 1987.
- ARAÚJO, W. L. et al. Variability and interaction on between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology*, 47:229-236, 2001.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; KUBLINCKYSOBRAL, J.; LACAVAL, P. T. Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: ESALQ, 2002, 86 p.

- ASSIS, A. M.; THOMAZ, L. D.; PEREIRA, O. J. Florística de um trecho de floresta de Restinga no município de Guarapari, Espírito Santo, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 18(1):191-201, 2004.
- ASSUMPÇÃO, J.; NASCIMENTO, M.T. Estrutura e composição florística de quatro formações vegetais de restinga no complexo lagunar Grussaí/Iquipari, São João da Barra, RJ, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 14: 301-315, 2000.
- ASSUNÇÃO, M.M.C. Fungos endófitos isolados de folhas de bananeira (*Musa* spp.) e seleção de antagonistas a fitopatógenos dessa cultura. 2010. 172f. Tese (Doutorado em Biologia de fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. 2007. Endophytic fungi of tropical plants: diversity and biotechnological aspects. In: Ganguli, B.N.; Deshmukh, S. K. *Fungi multifaceted microbes*. New Delhi, Anamaya Publishers. pp.189 - 207, 2007.
- AZEVEDO, J.L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, 22(2), 225-229, 1999.
- AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: I.S. Melo & J.L. Azevedo (eds.). *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna, Embrapa-CNPMA. 117-137, 1999.
- BACHMANN, J; ZIEROLD, R; PHIL, Y,T,C; HAUERT, R; PHYS-DIPL, C,S; GRUND-SCHMIDT, R; RHEINLANDER, B; GRUNDMANN, M; GOSELE, U; NIELSCH, K. Selbstkatalytische Atomlagenabscheidung von Siliciumdioxid. *Angewandte Chemie*. 120 (33): 6272–6274, 2008.
- BACKMAN, P. A.; SIKORA, R. A. Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control*, 46:1-3, 2008.
- BACON, C.W.; HINTON, D.M. Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. *Biological Control*, 23, 274-284, 2002.
- BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*, *FEMS Microbiology Letters*, 20(1): 69-74, 2002.
- BARGUIL, B. M.; PESSOA, W. R. L. S., OLIVEIRA; S. M. A., COELHO, R. S. B. Ocorrência de *Pestalotiopsis neglecta* em *Ananas lucidus*. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, 34(1): 96, 2008.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th ed. Saint Paul, MS: APS, PRESS, 1998.
- BAYAT, F.; MIRLOHI, A.; KHODAMBASHI, M. Effects of Endophytic Fungi on Some Drought Tolerance Mechanisms of Tall Fescue in a Hydroponics Culture. *Russian Journal of Plant Physiology*, 56(4): 510-516, 2009.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C. E CONDÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7, 4: 249-260, 2004.

- BENNET JW (2010) An overview of the genus *Aspergillus*. Disponível em: <<http://open-access-biology.com/aspergillus/aspergillus1.pdf>> Acesso em: 22 FEV. 2017.
- BENZING, David. Bromeliad trichomes: structure, function and ecological significance. *Selbyana*, 1(1) 330-348, 1976.
- BIZUKOJC, M.; LEDAKOWICZ, S. The kinetics of simultaneous glucose and fructose uptake and product formation by *Aspergillus niger* in citric acid fermentation. *Process Biochemistry*, 39: 2261-2268, 2004.
- CAO, R.; LIU, X.; GAO, K.; MENDGEN, K.; KANG, Z.; GAO, J.; DAI, Y.; WANG, X. Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. *Current Microbiology* 59: 584–592, 2009.
- CARRASCO, P.G. Produção de mudas de espécies florestais de restinga, com base em estudos florísticos e fitossociológicos, visando a recuperação de áreas degradadas, em Ilha Comprida – SP. 2003. 186p. Tese (Doutorado em Biociências) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2003.
- CARROL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualist symbiont. *Ecology*, 69(1): 2–9, 1988.
- CASTILLO, U.F.; BROWNE, L.; STROBEL, G.; HESS, W.M.; EZRA, S.; PACHECO, G.; EZRA, D. Biologically Active Endophytic Streptomycetes from *Nothofagus* spp. and Other Plants in Patagonia. *Microbial Ecology*, 53: 12-19, 2007.
- CHASE, A.R. Compendium of ornamental foliage plant diseases. APS Press: Minnesota. 1992. 92p.
- CHEN, C. et al. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control*, 5(1): 83-91. 1995.
- CHOMCHEON, P., WIYAKRUTTA, S., AREE, T., SRIUBOLMAS, N., NGAMROJANAVANICH, N., MAHIDOL, C., RUCHIRAWAT, S., KITTAKOOP, P. Curvularides A-E: Antifungal hybrid peptide-polyketides from the endophytic fungus *Curvularia geniculata*. *Chem. Eur. J*, 16:11178–11185, 2010.
- CHUANG, C.C., KUO, Y.L., CHAO, C.C. & CHAO, W.L. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and Fertility of Soils* 43: 575-584, 2007.
- CLARKE, B.B.; WHITE JR, J.F.; HURLEY, R.H.; TORRES, M.S.; SUN, S.; HUFF, D.R. Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. *Plant Disease* 90: 994–998, 2006.
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. (2008). State Decree Nº 41612 of December 23, 2008. Available in <http://www.marica.com.br/2009/1202restinga.htm>. Accessed on 25 feb 2015.

- CONTRERAS-CORNEJO, H.A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C. E LÓPEZ-BICIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149, 3: 1579–1592, 2009.
- COSTA, C.R. Fungos associados às plantas ornamentais tropicais no Distrito Federal. 2007. 98f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, 2007.
- CRAWFORD, K.M.; LAND, J.M.; RUDGERS, J.A. Fungal endophytes of native grasses decrease insect herbivore preference and performance. *Oecologia* 164(2): 431–444, 2010.
- DAVITT, A. J.; STANSBERRY, M.; RUDGERS, J. Do the costs and benefits of fungal endophyte symbiosis vary with light availability? *New Phytologist*, 188: 824-834, 2010.
- DEL-CLARO, K. Origens e importância das relações plantas-animais para a ecologia e conservação. In: _____. TOREZAN-SILINGARDI, Helena Maura. (Orgs). *Ecologia das Interações Plantas-Animais: Uma Abordagem Ecológico-Evolutiva*. Rio de Janeiro: Technical Books, p. 336, 2012.
- DI PIERO, R.M.; GARDA, M.V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43(9): 1121-1128, 2008.
- DIAS, S.C.; BRESCOVIT, A.D.; SANTOS, L.T.; COUTO, E.C.G. Aranhas em Bromélias de duas Restingas do Estado de Sergipe. *Biologia Geral e Experimental* 1:22-24, 2000.
- Espírito Santo e Rio de Janeiro. In: ESTEVES, F. A.; LACERDA, L. D. (Eds.). *Ecologia de Restingas e Lagoas Costeiras*. Macaé: NUPEM/UFRJ, 25-63, 2000.
- EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; CIMMINO, A.; VURRO, M.; FRACCHIOLLA, M.; CHARUDATTAN, R.; MOT, A. Drazepinone, a trisubstituted tetrahydronaphthofuroazepinone with herbicidal activity produced by *Drechslera siccans*. *Phytochemistry*, 66(6) 715 - 721, 2005.
- FERREIRA, L.S. Caracterização de isolados de *Curvularia* spp. endofíticos de milho (*Zea mays* L.) por parâmetros morfológicos e moleculares. 2010.118 f. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) -Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- FILHO, M.R.C.; MELLO, S.C.M.; SANTOS, R.P. E MENÊZES, J.E. (2008) - Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*, 226. Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

- FLORA DO BRASIL - Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 30 Abr. 2017.
- FONSECA, L.C.N.; VIZENTIN-BUGONI, J.; RECH, A.; ALVES, M.A. Plant-hummingbird interactions and temporal nectar availability in a restinga from Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 87(4): 2163-2175, 2015.
- FRANK, J. H. et al. Invertebrate animals extracted from native *Tillandsia* (Bromeliales: Bromeliaceae) in Sarasota County, Florida. *Florida Entomologist*, v. 87(2), p. 176-185, 2004.
- FREIRE, F.C.O.; BEZERRA, J.L. Foliar endophytic fungi of Ceará State (Brazil): a preliminary study. *Summa Phytopathologica*, 27(3): 304-08. 2001.
- FREIRE, M.G.M., MUSSI-DIAS, V., MATTOSO, T.C., HENK, D.A., MENDES, A., MACEDO, M.L.R., TURATTI, C., MACHADO, S.W., SAMUELS, R.I. Survey of endophytic *Alternaria* species isolated from plants in the Brazilian restinga biome. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 12(2 Ver. III): 84-94, 2017.
- FREIRE, M.G.M., SANTOS, P.H.D., COUTINHO, H.S., HERNANDEZ, G.A.F., TAVARES, L.P.S., MUSSI-DIAS, V. Patogenicidade de isolados endofíticos de *Alternaria* em frutos pós-colheita. *Anais do VIII Congresso Brasileiro de Micologia*. Florianópolis – SC. P. 81, 2016a.
- FREIRE, M.G.M.; COUTINHO, H.G. ; HERNANDEZ, G. A. F. ; TAVARES, L. P. S. ; MUSSI-DIAS, V. . Bioprospecção da flora fúngica endofítica da reserva de jurubatiba. *Perspectivas online: biológicas e saúde*, v. 6, p. 6-13, 2016b.
- GALLO, M. B. C.; CHAGAS, F. O.; ALMEIDA, M. O.; MACEDO, C. C.; CAVALCANTI, B. C.; BARROS, F. W. A.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; BASTOS, J. K.; PUPO, M. T. Endophytic fungi found in association with *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. *Journal of Basic Microbiology*, 48: 1-10, 2009.
- GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. Taxol production by *Pestalotiopsis terminaliae*, an endophytic fungus of *Terminalia arjuna* (arjun tree). *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 52: 9–15, 2009.
- GANGE, A.C.; ESCHEN, R.; WEARN, J.A.; THAWER, A.; SUTTON, B.C. Differential effects of foliar endophytic fungi on insect herbivores attacking a herbaceous plant. *Oecologia* 168(4): 1023–1031, 2012.
- GAO, X.X.; ZHOU, H.; XU, D-Y.; YU, C-H.; CHEN, Y-Q.; QU, L-H. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. *FEMS Microbiology Letters* 249: 255-266, 2005.

- GARBEVA, P.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN VUURDEN, J.W.L.; VAN ELSAS, J.D. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturin gradient gel electrophoresis (DGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microbial Ecology*, 41, 369-383, 2001.
- GIBBONS J.G., ROKAS A. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends in Microbiol* 21: 14-22, 2013.
- GIVNISH, T. J. et al. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. *American Journal of Botany* 98(5): 872-895, 2011.
- GOMES, B.Z.; MARTINS, F.R. & TAMASHIRO, J.Y. Estrutura do cerradão e da transição entre cerradão e floresta paludícola num fragmento da Internacional Paper do Brasil Ltda. em Brotas, SP. *Revista Brasileira de Botânica* 27(2): 249-262. 2004.
- GRIGOLETTI, J. R. A.; FIGUEREDO, A.; GARCÍA, C. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. *Revista Floresta (Brasil)* 30:155-165, 2000.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plants-associated microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and applications of their occurrence. *Journal of Natural Products*, 69: 509-526, 2005.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43, 10, 895-914, 1997.
- HANLIN, R.T. *Illustrated Genera of Ascomycetes*. APS PRESS, 1996. 274p.
- HAO, J.; SONG, F.; HUANG, F.; YANG, C.; ZHANG, Z.; ZHENG, Y; TIAN, X. Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(3): 233-240, 2007.
- HARMAN, G.E.; PETZOLDT, R.; COMIS, A. E CHEN, J. Interactions between *Trichoderma harzianum* Strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Plant Physiology*, 94, 2: 146-153, 2004.
- HARPER, J. L. *Population biology of plants*. London: Academic Press, 1977. 892p.
- HOLZER, W., CRICHYNO, J.; PIRES, A.C. Sustentabilidade da urbanização em áreas de restinga: uma proposta de avaliação pós-ocupação. *Paisagem Ambiente* 19: 49-66, 2004.
- HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S. E BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control*, 51: 409-416, 2009.

- HYDE, K.D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33: 163-173, 2008.
- KAEHLER, M.; VARASSIN, I.G.; GOLDENBERG, R. Polinização em uma comunidade de bromélias em floresta Atlântica Alto-Montana no Estado do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira Botânica* 28: 219-228, 2005.
- KITCHING, R.L. Food webs and container habitats: the natural history and ecology of phytotelmata. Cambridge, Cambridge University Press, 2000.
- KOGEL, K-H.; FRANJKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite-what decides? *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 358-363, 2006.
- KRUSCHEWSKY, M.C. Taxonomia e ecologia do gênero *Pestalotiopsis* no Brasil, com ênfase para a mata atlântica do Sul da Bahia. 2010. 59 f. Dissertação (Mestre em Produção Vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.
- KUNIEDA-ALONSO, S.; ALFENAS, A.C. E MAFFIA, L. A. Sobrevivência de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* tratados com *Trichoderma* spp., em restos de cultura de *Eucalyptus* sp. *Fitopatologia Brasileira*, 30, 2: 164-168, 2005.
- LEME, E.M.C; MARIGO L.C. Bromélias na Natureza, Rio de Janeiro, Marigo comunicação visual Ltda, 1983.
- LEUCHTMANN, A. 1994. Isozyme relationships of Acremonium endophytes from twelve Festucasp. *Mycological Research*, Cambridge, 98 (1): 25-33.
- LEUCHTMANN, A; PETRINI, O; PETRINE, LE; CARROL, GC. 1992. Isozyme polymorphism in six endophytic Phyllosticta sp. *Mycological*, 96: 287-295.
- LIMA, A.; FURTADO, M. Curvularia species (anamorphic fungi: Hyphomycetes) from Santiago island, Cape Vert. *Portugaliae Acta Biologica*, 22: 145-156, 2007.
- LIMA, T.E.F. Micobiota Endofítica de *Vitis labrusca* L. CV. Isabel Em Regiões do Vale do Siriji, Pernambuco, Brasil. 2010. 58f. Dissertação (Mestrado)- Universidade federal de Pernambuco, 2010.
- LINNAKOSKI, R.; PUHAKKA, H.; PAPPINEN, A. Endophytic fungi isolated from Khaya anthotheca in Ghana. *Fungal Ecology*. 12(3): 444-453, 2011.
- LINS, S.R.O.; COELHO, R.S.B. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais
- LIU AR, CHEN SC, WU SY, XU T, GUO LD, JEEWON R, WEI JG. Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 57: 528-35, 2010.

- LIU, L. et al. Introduction of systematic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology*, 85: 1064-1068. 1995.
- LOPES, E. Formações Florestais de Planície Costeira e Baixa Encosta e sua relação com o substrato geológico das Bacias dos Rios Itagararé e Guaratuba (Bertioga, SP). 2007. 126p.
- LOUZADA, G.A.S.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S.C.M., LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I., BRAÚNA L.M. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes ecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. *Biota neotropica*, 9, 3: p.145–149, 2009.
- LUTHER, H. An alphabetical list of bromeliad binomials. The Bromeliad Society International, Sarasota. 11th ed. 2008.
- MAGALHÃES, W. C. S., MISSAGIA, R. V.; COSTA, F. A. F.; COSTA, M. C. M. Diversidade de fungos endofíticos em Candeia *Eremanthus erythropappus* (DC). *MacLeish. Cerne, Lavras*, 14(3): 267-273, 2008.
- MANAMGODA, D.S.; CAI, L. MCKENZIE, E.H.C.; CROUS, P.W.; MADRID, H. CHUKEATIROTE, E.; SHIVAS, R.G.; TAN, Y.P.; HYDE, K.D. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* – *Cochliobolus* – *Curvularia* Complex. *Fungal Diversity*, 56: 131-144, 2012.
- MANTOVANI, W. A região litorânea paulista. In: Barbosa, L. M. (Coord.) Anais do Workshop sobre recuperação de áreas degradadas da Serra da Mar e formações litorâneas. 2000. Secretaria do Meio ambiente, São Paulo, 33-41, 2000.
- MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; RODRIGUES FILHO, E. Constituintes químicos de *Penicillium* sp, um fungo endofítico Isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae). *Revista Ciências Exatas e Naturais, Santa Cruz*, 9(2): 189-199, 2007.
- MARTINS, S.E., ROSSI, L., SAMPAIO, P.S.P., MAGENTA, M.A.G. Caracterização florística de comunidades vegetais de restinga em Bertioga, SP, Brasil. *Acta bot. bras.* 22(1): 249-274. 2008.
- MARTINS-CORDER, M.P., MELO, I.S. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. A *Verticillium dahliae* KLEB. *Science Agriculture*, 55(1), 1998.
- MESTRE, L.A.; ARANHA, J.M.; ESPER, M.L. Macroinvertebrate Fauna Associated to the Bromeliad *Vriesea inflata* of the Atlantic Forest (Paraná State, Southern Brazil) *Brazilian Archives of Biology and Technology* 44: 89-94, 2001.
- MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Ed.). *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Embrapa Meio Ambiente, 341 p, 2009.

- MUNDT, J.O.; HINKLE, N.F. Bacteria within ovules and seeds. *Applied and Environmental Microbiology*, 32, 694-698. 1976.
- MUSSI-DIAS, V, COUTINHO, H.S., HERNANDEZ, G.A.F., TAVARES, L.P.S., FREIRE, M.G.M. Coleção biológica de fungos endofíticos das restingas do norte fluminense. *Anais do VIII Congresso Brasileiro de Micologia*. Florianópolis – SC. P. 284, 2016.
- MUSSI-DIAS, V., FREIRE, M.G.M. Fungos endofíticos em ecossistemas tropicais: diversidade incalculável. *MG.Biota*, 6:(1): 40-44. 2013.
- MUSSI-DIAS, V.; ARAÚJO, A.C.O.; SILVEIRA, S.F.; ROCABADO, J.M.A.; ARAÚJO, K.L. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 14(2): 261-266, 2012.
- METZENBERGM RL. 1991. Benefactor's lecture: the impact of molecular biology on mycology. *Mycology Research*, 95: 9-13.
- MAGNANI, M; FERNANDES, T; PRETE, CEC; HOMECHIM, M; ONO, EYS; VILAS-BOAS, LA; SARTORI, D; FURLANETO, MC; FUNGARO, MHP. 2005. Molecular indentification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. *Scientia Agrícola*, Piracicaba, 62 (1): 45-49.
- NOZAKI, MH; CAMARGO, M; LEMOS, EGM; AUKARM, APA; BARRETO, M. 2006. Caracterização molecular através da tecnica FAFLP de isolados de *Diaporthe citri*. *Summa Phytopathologica*, 32: 147-150.
- NALINI, M. S; SUNAYANA, N.; PRAKASH, H. S. Endophytic fungal diversity in medicinal plants of Western Ghats, India. *International Journal of Biodiversity* doi.org/10.1155/2014/ 494213, 2014.
- NARLOCH, C., OLIVEIRA, V. L., ANJOS, J. T., SILVA FILHO, G. N. Respostas da cultura do rabanete à inoculação de fungos solubilizadores de fosfatos. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, 37:(6)841-845, 2002.
- NEJAD, P.; JOHNSON, P. A. Endophytic bactéria induce growth promotion and wild suppresion in oilseed rape and tomato. *Biological Control*, 18: 208-215, 2000.
- NETO, P.A.S.P. et al. Microrgasmos endofíticos. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*. 29: 62-76. 2003.
- NUNES, J.V.C. Bromélias. In: SIMÕES, L.L.; LINO, C.F. (eds) *Sustentável Mata Atlântica*. São Paulo: Senac São Paulo, 117-130, 2003.
- OBUEKWE, C.O.; BADRUDEEN, A.M.; AL-SALEH, E.; MULDER, J. L. Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under conditions of simultaneous temperature and salt stress. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 56(4): 197-205, 2005.
- Ocorrência de *Pestalotiopsis palmarum* em *Caryota mitis*. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.34, n. 1, p. 95, 2008.

- OLIVEIRA-FILHO, A.T.; CARVALHO, D.A. Florística e fisionomia da vegetação no extremo norte do litoral da Paraíba. *Revista Brasileira de Botânica* 16: 115-130, 1993.
- OMACINE, M. et al. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. *Nature*, 409:78-81, 2001.
- OWNLEY, B.H.; GWINN, K.D.; VEGA, F.E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl* 55: 113–128, 2010.
- PAULIN-MAHADY, AE; HARRINGTON, TC; MCNEW, D. 2002. Phylogenetic and taxonomic evaluation of *Chalara*, *Chalaropsis* and *Thielaviopsis* anamorphs associated with *Ceratocystis*. *Mycologia*, 94(1): 62-72
- PUTERKA, GJ; BLACK, WC; STEINER, WM; BURTON, RL. 1993. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Morkvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity*, London, 70: 604-618
- PAPAGIANNI, M.; FRANK, W.; MATTEY, M. Fate and role of ammonium ions during fermentation of citric acid by *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 7178-7186, 2005.
- PAULETTI, K.R. Desenvolvimento de bromélias em ambientes protegidos com diferentes alturas e níveis de sombreamento. Dissertação de Mestrado. Piracicaba, ESALQ – USP, 2002.
- PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 29: 62-77, 2002.
- PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; CAETANO, L.C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. *Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 3(4): 69-72, 2004.
- PEREIRA, O. J.; ASSIS, A. M. Florística da Restinga de Camburi. *Acta Botanica Brasílica*, 14 (1):99-111, 2000.
- PESSOA, W. R. L. S.; BARGUIL, B. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; COELHO, R. S. B.
- PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. *Microbial Ecology of Leaves*. Springer-Verlag, New York, 179- 197, 1991.
- PIMENTEL, I. C.; FIGURA, G.; AUER, C. G. Fungos endofíticos associados a acículas de *Pinus taeda*. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v.36, n.1, p.85-88, 2010.
- PRATT, R.G. Enhancement of sporulation in species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, and *Exserohilum* by growth on cellulose-containing substrates. *Mycopathologia*, 162: 133 - 140, 2006.

- RAKOTONIRIANA, E. F.; MUNAUT, F.; DECOCK, C.; RANDRIAMAMPIONONA, D.; ANDRIAMBOLOLONIAINA, M.; RAKOTOMALALA, T.; RAKOTONIRINA, E. J.; RABEMANANTSOA, C.; CHEUK, K.; RATSIMAMANGA, S. U.; MAHILLON, J.; EL-JAZIRI, M.; QUETIN-LECLERCQ, J.; CORBISIER, A. M. Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2007.
- REDMAN, R. S. et al. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*, 298:1581, 2002.
- REINHOLD-HUREK, B., HUREK, T. Interactions of graminaceous plants with *Azoarcus* sp. and diazotrophs: identification, localization and perspectives to study their function. *Critical Review in Plant Science*, 17: 29-54. 1998.
- REITZ, R. Bromeliáceas e a Malária-Bromélia Endêmica. *Flora Ilustrada Catarinense. Fasc. Brom. Itajaí: Herbário Bardosa Rodrigues*, 1983.
- RIBEIRO, T. P. S. Fungos queratinofílicos em areia de parques escolares de Boa Vista, Roraima. 2009. 47f. Monografia (Pós - graduação em Recursos Naturais) - Universidade Federal de Roraima. Boa Vista, 2009.
- RIZZINI, C.T. Tratado de fitogeografia do Brasil. Rio de Janeiro, Âmbito Cultural Edições Ltda, 1997.
- RODRIGUES, A.A.C.; MENEZES, M. Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de Serra Talhada e de Caruaru, Estado de Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira*, 27: 532-537, 2002.
- RODRIGUES, R. L. Fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* Mart. Ex Schult. F. (Velloziaceae) presente em afloramentos rochosos nos estados de Minas Gerais e Tocantins. 2010. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Biomas Tropicais) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.
- RODRIGUES, R. R. (coord). Workshop sobre recuperação de áreas degradadas e formações florestais litorâneas. *Anais. São Paulo, SMA*, 199 p, 2000.
- RODRIGUES, AL; PINHO, DB; LISBOA, DO; NASCIMENTO, RJ; PEREIRA, OL; ALFENAS, AC; FURTADO, GQ. 2014. *Colletotrichum theobromicola* causes defoliation, stem girdling and death of mini-cuttings of eucalyptus in Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 39(4): 326-330.
- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:827-837, 2006.
- SANTOS, A. S.; SANTANA, C.V.S.; ALMEIDA, A. C.; NASCIMENTO, A.R.P.; FRANÇA, F.S. Fungos associados a manchas foliares em *Heliconia psittacorum* cv. Golden Torch, no Submédio São Francisco. *Revista Verde. Mossoró*, 4(4): 01 – 04. 2009.

- SCARANO, F.R. Prioridades para Conservação: a Linha Tênuê Que Separa Teorias e Dogmas. In: Carlos Frederico Duarte Rocha, Helena Godoy Bergallo, Monique Van Sluys e Maria Alice Santos Alves. *Biologia da Conservação: Essências*. RIMA. São Carlos. 23-39, 2006.
- SCARANO, F.R. Structure, Function na Floristic Relationships of Plant Communities in Stressful Habitats Marginal to the Brazilian Atlantic Rainforest. *Annals of Botany*, 90: 517-524, 2002.
- SCARANO, F.R.; DUARTE, H.M.; RIBEIRO, K.T.; RODRIGUES, P.J.F.P.; BARCELLOS, E.M.B.; FRANCO, A.C.; BRULFERT, J.; DELEENS, E & LUTTGE, U. Four sites with contrasting environmental stress in southeastern Brazil: relations of species, life form diversity, and geographical distribution to ecophysiological parameters. *Botanical Journal of the Linnean Society* 136: 345-364. 2001.
- SCHERER, A.; MARASCHIN-SILVA, F. E BAPTISTA, L.R. DE. Florística e estrutura do componente arbóreo de matas de Restinga arenosa no Parque Estadual de Itapuã, RS, Brasil. *Acta Botânica Brasílica*, 19(4): 717-726, 2005.
- SEIFERT, K.; MORGAN-JONES, G.; GAMS, W.; KENDRICK, B. The Genera of Hyphomycetes. CBS Biodiversity Series, v. 9, 2011. 997p.
- SELOSSE, M.A.; BAUDOIN, E; VANDENKOORNHUYSE, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus Biologies*, 327: 639-648, 2004.
- SEMPERE, F.; SANTAMARINA, M.P. In vitro biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler under different environmental conditions. *Mycopathologia*, 163: 183- 190, 2007.
- SESSEGOLO, T.; TOCHETTO, C.; ZANETTE, R. A.; SILVA, A. S.; ALVES, S. H.; MONTEIRO, S. G.; SANTURIO, J. M. Microbiota fúngica em amostras de água potável e esgoto doméstico Fungal microbiota in drinking water and domestic sewage. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 32(1): 301-306. 2011.
- SILVA, R. L. O.; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, E. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). *Revista Acta Botânica Brasileira*, 20(3): 649-655, 2006.
- SILVA, S.M.; BRITEZ, R.M. A vegetação da planície costeira. In: M. C. M. Marques & R. M. Britez (eds.). *História Natural e Conservação da Ilha do Mel*. UFPR, Curitiba, pp. 49-84, 2005.
- SMITH, L.B.; Downs, R.J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph* 14(1): 1-658, 1974.
- SOLOGUREN, F. J.; JULIATTI, F. C. Doenças fúngicas em plantas ornamentais em Uberlândia-MG. *Bioscience Journal, Uberlândia*, 23(2): 42-52, 2007.

- SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; FILHO, S. A.; PINHEIRO, M. L. B. SARQUIS, M. I. M., PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* Benth. *Acta Amazonica*, 34(2), 185 -195, 2004.
- SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M.L.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica* 34(2): 185-195, 2004.
- SOUZA, C. R. G; HIRUMA, S. T.; SALLUN, A. E. M.; RIBEIRO, R. R. e SOBRINHO, A. M. A. "Restinga": Conceitos e Empregos do Termo no Brasil e Implicações na Legislação Ambiental. São Paulo: Instituto Geológico. 2008, 104p.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.
- STOLF, E. C. Efeito de re-inoculações de fungos endofíticos sobre o controle do nematóide cavernícola da bananeira (*Radopholus similis*). 2006. 50 f. Relatório (Graduação em Agronomia)-Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
- STONE, J.K., BACON, C.W. & WHITE, J.F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: C.W. BACON & J.F. WHITE (Ed.) *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker. 3-30, 2000.
- STROBEL, G. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, 5: 535-544, 2003.
- STROBEL, G.; DAISY B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67: 491-502, 2003.
- STURZ, A.V. et al. Biodiversity of endophytic which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biology and Fertility of Soils*, 25: 13-19. 1997.
- STURZ, A.V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and strategies required to creat yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*, 15: 183-190. 2000.
- SUGIYAMA, M. Estudo de florestas da restinga da Ilha do Cardoso, Cananéia, São Paulo, Brasil. *Boletim do Instituto de Botânica*, 11: 119-159, 1998.
- SUTTON, B. C. *The Coelomycetes*. 1. ed. London: Common Wealth Mycological Institute, 1980. 696 p.
- TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, 18: 448-459, 2001.

- TESSLER, M.G. & GOYA, S.C. Conditioning factors of coastal processes in the Brazilian Coastal Area. *Revista do Departamento de Geografia*, 17: 11-23, 2005.
- TONHASCA-JUNIOR, A. *Ecologia e história natural da Mata Atlântica*. Rio de Janeiro: Interciência, 2005.
- TRIGIANO, R.; WINDHAM, M.; WINDHAM, A. *Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório*. 2010.
- tropicais no Estado de Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira*, 29(3): 332-335, 2004.
- TIAGO, PV; CARNEIRO LEÃO, MP; LIMA, MLA, OLIVEIRA, NT, LUNA-ALVES LIMA, EA. 2011. Polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) based on internal transcribed spacer-RFLP, ISSR and intro markers. *Genetic and Molecular Research*, 10(3): 1565-1575
- ULISSÊA, M.A.; LOPES, B.C.; ZILLIKENS, A.; STEINER, J. Formigas associadas a *Nidularium innocentii* e *Aechmea lindenii* (Bromeliaceae) em Mata Atlântica no sul do Brasil. *Biológico* 69: 19-324, 2007.
- VAN DER LELIE D, TAGHAVI S, MONCHY S, SCHWENDER J, MILLER L, FERRIERI R. Poplar and its bacterial endophytes: coexistence and harmony. *Crit Rev Plant Sci*. 2009; 28:346–358.
- VASSILEV, N., MEDINA, A., AZCÓN, R. & VASSILEVA, M. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. *Plant and Soil* 287: 77-84, 2006.
- VELOSO, H.P., RANGEL-FILHO, A.L.R.; LIMA, J.C.A. *Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal*. IBGE - DERMA, Rio de Janeiro, 1991.
- VOSGUERITCHIAN, S.B.E.; BUZATO, S. Sexual reproduction of *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) and pant-animal interaction. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 433-442, 2006.
- WANG, F. W.; JIAO, R. H.; CHENG, A. B.; TAN, S. H.; SONG, Y. C. Antimicrobial potential of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 79- 83, 2006.
- WATANABE, T. *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species*. CRC press, 2010. ISBN 1439804206.
- WEI, J.G.; XU, T. *Pestalotiopsis kunmingensis*, sp. nov., an endophyte from *Podocarpus macrophyllus*. *Fungal Diversity* v. 15, p. 247-254, 2007.

- WILSON, D. Fungal endophytes which invade insect gall: insect pathogens, benign saprophytes or fungal inquilines. *Oecologia*, 103:255-260, 1995.
- WINTTHUHN, RC; WINGFIELD, BD; WINGFIELD, MJ; WOLFAARDT, M. 1998. Monophyly of the conifer species in the *Ceratocystis coerylescens* complex based on DNA sequence data. *Mycologia*, 90(1): 96-101.7
- YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R. S.; HESS, W. M. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*, Great Britain, 142: 435-440, 2011.
- ZERVAKIS, G; SOURDIS, J; BALIS, C. 1994. Genetic variability and systematics of elen *Pleurotus* species based on isozyme analysis. *Mycological Research*, Cambridge, 98(3): 329-341