

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
TROPICAL



ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS DA MALVA

CARLA FIGUEIREDO COELHO

MANAUS

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
TROPICAL

CARLA FIGUEIREDO COELHO

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS DA MALVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia Tropical, área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. PhD. Henrique Dos Santos Pereira
Co-orientador: Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto
Co-orientadora: Profa. Dra. Albejamere Pereira de Castro

MANAUS

2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C672i Coelho, Carla Figueiredo
Isolamento e identificação de fungos endofíticos da malva / Carla Figueiredo Coelho. 2017
43 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Prof. PhD. Henrique dos Santos Pereira
Coorientador: Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto
Coorientador: Profa. Dra. Albejamere Pereira de Castro
Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas.

1. diversidade. 2. folha. 3. endófitos. 4. semente. 5. Urena lobata.
I. Pereira, Prof. PhD. Henrique dos Santos II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CARLA FIGUEIREDO COELHO

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS DA MALVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia Tropical, área de concentração em Produção Vegetal, linha de pesquisa em Manejo da Agrobiodiversidade.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA



Prof. PhD. Henrique Dos Santos Pereira, Presidente
Universidade Federal do Amazonas



Profª. Dra. Therezinha de Jesus Pinto Fraxe, Membro
Universidade Federal do Amazonas



Profª. Dra. Rozana de Medeiros Souza Galvão, Membro
Universidade Federal do Amazonas

DEDICO
A Deus.
Aos meus pais Frank Maia Coelho e Elcy Figueiredo Coelho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meu Criador e Redentor, que me sustenta e capacita.

Aos meus pais, Frank e Elcy; minhas irmãs, Camila e Carina; meu noivo, David, por todo amor, compreensão, apoio e incentivo.

Aos meu orientador Prof. PhD. Henrique dos Santos Pereira e meus co-orientadores Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto e Profa. Dra. Albejamere Pereira de Castro, por todo ensino, trabalho e paciência.

Ao Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana da Faculdade de Ciências Agrárias – FCA/UFAM por todo o suporte.

À CAPES/CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

À Universidade Federal do Amazonas e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical por essa tão importante oportunidade de adquirir mais conhecimento e qualificação profissional.

À Fazenda Experimental pela infraestrutura disponibilizada para realização do projeto.

RESUMO

A malva é cultivada apenas para a obtenção de fibra, e as sementes são oriundas de processo extrativista. Esse cenário tende a mudar, pois esta espécie apresenta relevante importância socioeconômica, principalmente para o Estado do Amazonas. O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de fungos endofíticos em *Urena lobata*, avaliando a influência do órgão vegetal e local de cultivo, visto a interação endófito-hospedeiro poder ser benéfica ou tornar-se maléfica para a planta. Foram calculados a frequência e grau de colonização, índices de diversidade de Shannon-Weaver, Simpson, e uniformidade de Pielou e realizada a curva do componente dominância. Os gêneros encontrados foram: *Phomopsis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Curvularia* e *Cochliobolus*. A maior diversidade e riqueza de fungos foi encontrada em Manaus com elevada colonização presente nas folhas. Observou-se preferência dos gêneros: *Curvularia* e *Fusarium* à semente e *Colletotrichum* em folha. A similaridade foi maior entre órgãos vegetais do que nos locais de cultivo, o que indica a coevolução desses fungos com o hospedeiro, resultado de uma interação mutualística ou antagônica equilibrada.

Palavras-chave: diversidade; endófitos; folha; semente; *Urena lobata*

ABSTRACT

Urena lobata is grown only to obtain fiber, and as seeds are derived from the extractive process. This scenario tends to change, for this issue is relevant for the socioeconomic situation, especially for the State of Amazonas. The objective of this research was to investigate the occurrence of endophytic fungi in *U. lobata*, evaluating an influence of the plant organ and culture site, since the endophyte-host interaction may be beneficial or may become harmful to the plant. The frequency and degree of colonization, diversity indexes of Shannon-Weaver, Simpson, and Pielou uniform were calculated and the dominance component curve was performed. The genera found were: *Phomopsis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Curvularia* and *Cochliobolus*. Greater diversity and fungal richness was found in Manaus with high colonization present in the leaves. Preference was given to the following genera: *Curvularia* and *Fusarium* seed and *Colletotrichum* leaf. A similarity between the main cropping systems and the results of a mutualistic or balanced antagonistic interaction.

Keywords: diversity; endophytes; leaf; seed; *Urena lobata*

Lista de figuras

- Figura 1.** Dendrogramas destacando a relação entre as comunidades de fungos endofíticos em órgãos vegetais e locais de cultivo de *Urena lobata* no Estado do Amazonas. Baseado no Índice de Similaridade de Jaccard, considerando gêneros (A) e morfotipos (B). F = folha; S = semente; M = Manaus; A = Anori. Coef. corr.: 0,78 (A) e 0,90 (B)30
- Figura 2.** Grau de colonização de fungos endofíticos em órgãos vegetais de *Urena lobata* cultivada no Amazonas.32
- Figura 3.** Grau de colonização de fungos endofíticos de *Urena lobata* em dois locais de cultivo no Amazonas.32
- Figura 4.** Curva do componente dominância da diversidade de morfotipos de fungos endofíticos isolados de folhas e sementes de *Urena lobata* cultivada em duas localidades no Amazonas. A = Anori; M = Manaus.33

Lista de tabelas

- Tabela 1.** Fungos endofíticos associados a folhas e sementes de *Urena lobata* cultivadas em Manaus e Anori, municípios do Estado do Amazonas.30
- Tabela 2.** Similaridade de morfotipos de fungos endofíticos observados entre órgãos vegetais de *Urena lobata* L. cultivada em duas localidades no Amazonas. F = folha; S = semente; M = Manaus; A = Anori.31
- Tabela 3.** Análise de variância do grau de colonização dos fungos endofíticos nas folhas e sementes de *Urena lobata* cultivada nos municípios de Manaus e Anori do Estado do Amazonas.....31
- Tabela 4.** Índices de diversidade calculados para comunidades de fungos endofíticos isolados de folhas e sementes de *Urena lobata* cultivada em duas localidades no Amazonas.32

Sumário

Introdução	12
Objetivos	14
Objetivo geral	14
Objetivos específicos	14
Referencial teórico.....	15
Malva (<i>Urena lobata</i>)	15
Aspectos botânicos, econômicos e distribuição geográfica.....	15
Doenças relacionadas à cultura.....	16
Fungos endofíticos.....	16
Interações ecológicas entre fungos endofíticos e plantas	17
Especificidade de fungos endofíticos ao tipo de órgão e tecido vegetal	18
Influência do local de cultivo sobre fungos endofíticos	19
Referências.....	20
Artigo de acordo com as normas da revista Acta Botanica Brasilica	23
Resumo	23
Introdução	23
Material e métodos	25
Coleta do material	25
Isolamento de fungos endofíticos	26
Identificação dos fungos endofíticos.....	27
Análise estatística	27
Resultados.....	29
Discussão.....	33
Conclusão	36
Referências.....	37
ANEXOS	40

Introdução

A malva está amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (Crane & Acuna 1945; Homma 1998). É mundialmente considerada uma planta espontânea e que causa prejuízos por competição no cultivo de outras culturas. No entanto, tem despertado interesse por produzir uma fibra de cor clara, macia, sedosa e muito flexível que é usada principalmente para a confecção de sacarias para a exportação de produtos agrícolas como café, de outros produtos têxteis e em confecções artesanais (Crane & Acuna 1945; Souza 2012).

Esta espécie surgiu como cultura agrícola no Estado do Amazonas em 1971 (Homma 2010; Maciel 2015). E ainda hoje, em algumas regiões, como no Amazonas e no Pará, a malva mantém a importância econômica como fonte de fibra natural. Por isso é cultivada por agricultores familiares tradicionais exclusivamente para a produção de fibra em ambiente de várzea, nas calhas dos rios Amazonas e Solimões no Estado do Amazonas. Devido a este ambiente de cultivo, as plantas são colhidas antes de completarem o ciclo de vida e produzem sementes. (Souza 2012; Bentes 2015).

Assim, os produtores Amazonenses são completamente dependentes das sementes produzidas no Estado do Pará de modo extrativista que são adquiridas e distribuídas pelo governo do Estado do Amazonas por intermédio da Secretaria de Estado da Produção Rural – SEPROR em quantidade que não supre a demanda, causando redução na produção de fibras por falta desse insumo (Souza 2012; Bentes 2015).

Esta situação crítica da cadeia produtiva da malva despertou interesse dos órgãos de pesquisa e atualmente existem projetos em andamento para fornecer informações técnicas, agrônômicas, para a implantação de campo de produção de sementes de malva no Estado do Amazonas, visto que, quando uma espécie explorada por extrativismo apresenta importância econômica, a ocorrência da indução de processos de manejo e domesticação resulta na ampliação da oferta, produto de melhor qualidade e preços mais reduzidos, beneficiando os consumidores e produtores (Homma 2012).

Entretanto, o processo de domesticação pode causar alterações na comunidade de micro-organismos associados à cultura, favorecendo a suscetibilidade das plantas a pragas e doenças de forma direta, induzindo à possível patogenicidade desses micro-organismos antes endófitos, e/ou diminuindo a capacidade de defesa da planta na qual os fungos endofíticos exercem importante função (Paterniani 2001).

Isto porque, os fungos endofíticos podem produzir compostos bioativos com capacidade de agir como biocontrole, podem apresentar atividade anticancerígena, antimicrobiana, inseticida, promotoras de crescimento de plantas e resistência a doenças, e ainda, por isso, serem

agentes atuantes na fitorremediação (Sudha et al. 2016).

Pesquisas relacionadas à identificação da biodiversidade de micro-organismos associados a espécies vegetais, além de aprimorarem o conhecimento sobre padrões de ocorrência e distribuição da biodiversidade, importantes informações para o planejamento de estratégias de conservação da biodiversidade. Além disso, representam grande oportunidade para a obtenção de fungos com potenciais diferenciados para investigações científicas e utilização na biotecnologia e indústria (Vieira et al. 2012). Esta é uma área que precisa avançar, pois existem poucos estudos de compostos isolados de fungos endofíticos de plantas da Amazônia (Carvalho et al. 2016).

Objetivos

Objetivo geral

Investigar a ocorrência de fungos endofíticos em *Urena lobata* (L.)

Objetivos específicos

Avaliar a influência do local de cultivo na comunidade de fungos endofíticos de malva.

Avaliar a influência do órgão vegetal na composição de fungos endofíticos da malva.

Referencial teórico

Malva (*Urena lobata*)

Aspectos botânicos, econômicos e distribuição geográfica

A malva pertencente ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Malvales, família Malvaceae, espécie *Urena lobata* L. (Bayer et al. 1999). É um arbusto de caule ereto medindo até quatro metros de altura. Como característica do gênero *Urena*, nas bases das nervuras centrais dos limbos há glândulas, chamadas de “nectários extraflorais”, que atraem formigas que são inimigos naturais de muitos outros insetos, desempenhando assim, função protetora.

O fruto é uma cápsula (“carrapicho”) subglobosa, composta de cinco carpelos indeiscentes, secos e tomentosos, cobertos de espinhos moles e recurvados. As sementes são lisas, cuneiformes de um lado e arredondadas do outro. Esta espécie de planta é alógama, ou seja, apresentada polinização cruzada (Joly 1966).

O início do florescimento ocorre por volta de sete meses após a semeadura e se estende até o fim do ciclo da cultura, tendo seu pico no oitavo mês. Uma característica das flores da malva é o fechamento da flor nos horários de maior incidência solar por volta de 12:00 às 15:00 horas e o período de produção de frutos e sementes acontece simultaneamente à floração, dificultando a determinação do momento ideal para colheita, pois, nas ramificações é possível encontrar a presença de flores, frutos verdes e frutos maduros (Bentes 2015).

A malva está amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, recebendo muitas denominações: Congo Jute na República Democrática do Congo; Jute no Peru; no Ceilão, Patta-appelle; na Índia, Banochra; nos Estados Unidos Caesar weed ou Cokle Burr; também Cockle Burr na França; na Venezuela, Cadilla ou Cadillo; em Madagascar, Paka; em Cuba, Malva Branca; e Guizazo na província de Santa Clara (Crane & Acuna 1945; Homma 1998).

Mundialmente é considerada uma planta espontânea, invasora, causando prejuízos por competição no cultivo de outras culturas. No entanto, de tempos em tempos, por muitos anos, tem despertado interesse por produzir uma fibra de cor clara, macia, sedosa e muito flexível usada principalmente para a confecção de sacarias, de outros produtos têxteis e em confecções artesanais. Há relatos do cultivo da malva para a produção de sacarias em Madagascar, Congo Belga, Brasil e outros países da América do Sul e da América Central (Crane & Acuna 1945; Souza 2012).

Esta espécie surgiu como cultura agrícola no Estado do Amazonas em 1971 em substituição ao cultivo da juta (*Corchorus capsularis* L.) trazida com a imigração japonesa entre 1924 e

1935. Os agricultores do Nordeste do Pará descobriram a similaridade das fibras destas culturas, sendo a malva encontrada espontaneamente em áreas secas nas margens de estradas e roçados, e ainda, apresentando sementes com melhor poder germinativo, podendo ser armazenadas por mais tempo, em comparação com as sementes de juta (Homma 2010; Maciel 2015).

E ainda hoje, em algumas regiões, como no Amazonas e no Pará, a malva tem importância econômica como fonte de fibra natural utilizada, principalmente, nas sacarias para a exportação de produtos agrícolas como café. Por isso é cultivada por agricultores familiares tradicionais. Os locais de cultivo no Amazonas são: calhas dos rios Amazonas e Solimões, concentradamente nos municípios de Anamã, Anori, Beruri, Caapiranga, Coari, Codajás, Iranduba, Itacoatiara, Manacapuru e Parintins e totaliza uma área cultivada de 7.684 hectares (Souza 2012; Bentes 2015).

Estes produtores cultivam exclusivamente para a produção de fibras, realizando cultivo adensado para que ocorra o estiolamento das plantas que é desejado para a produção de fibras, e em ambiente de várzea, impedindo que as plantas completem seu ciclo e produzam sementes. Assim, os produtores de fibras do Estado do Amazonas são completamente dependentes das sementes produzidas no Estado do Pará de modo extrativista. O que torna este insumo uma questão estratégica para a cadeia produtiva da fibra, por isso, o governo do Estado do Amazonas adquire e distribui por intermédio da Secretaria de Estado da Produção Rural – SEPROR (Souza 2012; Bentes 2015).

Doenças relacionadas à cultura

A malva é atacada por uma doença denominada de rachadura das hastes, causada pelo fungo *Phomopsis* sp., apresentando rachaduras na haste com exsudação de uma substância semelhante à goma e causando o secamento e morte da planta (Bentes 2015).

A transmissão do patógeno *Phomopsis* sp. se dá pelas sementes de malva (Duarte et al. 1982). Outra doença que ocorre muitas vezes associada à rachadura das hastes é a clorose infecciosa das malváceas (CIM) que expressa mosqueamento nas folhas e manchas pequenas de cor vermelha (vermelhão) (Silva 1989).

Na análise da ocorrência de fungos por meio do teste de sanidade com sementes de quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench), que pertence à mesma família botânica da malva, constatou-se a ocorrência de *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp. em maior percentual, e ainda, *Rhizopus* spp. e *Epicoccum* spp. No entanto, não houveram prejuízos à qualidade fisiológica dessas sementes (Lima et al. 2013).

Fungos endofíticos

Micro-organismos endofíticos são aqueles que em algum período do seu ciclo de vida

colonizam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar dano aparente ao hospedeiro, podendo ou não crescer em meio de cultura. Estão inclusos neste conceito, micro-organismos simbiotes, mutualistas ou neutros, patógenos latentes, inativos e emergentes (Petrini, 1991; Azevedo, 1998; Selosse et al. 2004; Azevedo 2007, Hyde & Soyong; 2008).

Fungos endofíticos são diversos, filogeneticamente e com relação à estratégia de história de vida, mas a maioria destes fungos pertence ao grupo Ascomycota (Petrini 1986; Schulz & Boyle 2005).

Há uma alta diversidade de endófitos referentes às regiões tropicais pouco exploradas (Arnold et al. 2000; Gamboa et al. 2002). Em trabalho realizado com a espécie *Hibiscus tiliaceus* L., também pertencente à família Malvaceae, foi encontrado fungo endofítico *Phomopsis* sp. e dos isolados deste fungo foram obtidos terpenos que desempenham papel importante na proteção da planta hospedeira contra as infecções microbianas (Li et al. 2008).

Entre os endófitos de algodoeiro, que também pertence à família Malvaceae, foram encontrados os fungos *Nigrospora sphaerica* e *Curvularia lunata* var. *aeria* nas sementes analisadas antes do plantio, e *Phoma glomerata*, *Pestalotiopsis maculans* e *Fusarium lateritium* nas sementes analisadas após o plantio. *Curvularia lunata* var. *aeria* foi o mais frequente destes (Vieira et al. 2011).

Interações ecológicas entre fungos endofíticos e plantas

Os mecanismos de colonização dos tecidos vegetais por fungos endofíticos ocorrem por: penetração de esporos por lesões ou aberturas naturais, inoculação direta nas plantas dos esporos por insetos e transmissão por sementes. Neste caso, os fungos da planta hospedeira são transmitidos entre gerações através das sementes (Petrini 1991; Saikkonen et al. 2004; Marinho et al. 2005; Johri 2006).

A colonização do hospedeiro por parte dos endófitos é principalmente intercelular, por isso, os endófitos são dependentes de nutrientes do apoplasto para o crescimento. Mas pode ser intracelulares e limitadas a células individuais; intercelular, discreta e localizada; intercelular e sistêmica (Schulz & Boyle 2006).

Os endófitos geralmente têm uma plasticidade fenotípica muito maior que patógenos. Há uma hipótese de que não há interações neutras, mas sim que as interações endófito-hospedeiro envolvem um antagonismo, independentemente do órgão da planta infectado, pois há sempre pelo menos um grau de virulência por parte do fungo, permitindo a infecção, enquanto a defesa do hospedeiro da planta limita esse ataque, ou seja, a colonização assintomática é um equilíbrio de antagonismos entre hospedeiro e endófito (Schulz & Boyle 2005).

Nesse contexto do triângulo da doença, as condições ambientais adversas podem enfraquecer o estado de defesa da planta, resultando na doença. O estado nutricional da planta também pode torna-la mais susceptível ou resistente. Assim, o isolamento como endófito não exclui a possibilidade de um fungo se tornar patogênico quando o hospedeiro é estressado ou senescente (Kuldau & Yates 2000; Schulz & Boyle 2006).

Um fungo ocupando tecido vegetal assintomático pode ser, também, apenas um habitante de um nicho esperando para uma oportunidade de se propagar, ou meramente oportunistas acidentais, fungos que ocorrem normalmente em outros substratos e não é realmente capaz de ocupar um tecido vegetal por longo prazo. As predisposições do hospedeiro e as condições ambientais é que influenciam no equilíbrio entre hospedeiro e endófito (Schulz & Boyle 2006).

Em um mesmo gênero, pode acontecer de uma espécie se adaptar e apresentar estratégia de crescimento endofítico e outra ser considerada um patógeno latente, essa situação já foi registrada para o gênero *Phomopsis* (Freeman & Rodriguez 1993).

Mutações induzidas em várias espécies de *Colletotrichum* demonstraram que alguns mutantes perderam a capacidade de expressão da patogenicidade em seus hospedeiros (Redman et al. 2001).

Há gêneros que são descritos colonizando diversas plantas, como *Phomopsis*, *Phoma*, *Colletotrichum* e *Phyllosticta*, mas também, sabe-se que há alguns que são específicos ao hospedeiro e podem crescer em diferentes condições ecológicas e geográficas (Aly et al 2011).

Sugere-se que ocorra a coevolução dos micro-organismos com os seus hospedeiros, numa relação de mutualismo, onde os endófitos recebem nutrientes e proteção enquanto a planta tem vantagens decorrentes dessa interação. Visto que os endófitos podem controlar os fitopatógenos através da competição por nutrientes, produção de substâncias antagônicas ou parasitando o patógeno, pois ocupam semelhantes nichos ecológicos e ainda podem induzir a planta a desenvolver resistência (Araújo et al. 2010; Chapla et al. 2013).

Especificidade de fungos endofíticos ao tipo de órgão e tecido vegetal

O tipo de órgão vegetal e idade da planta influenciaram na composição dos fungos endofíticos encontrados no algodoeiro. O maior grau de colonização foi encontrado em folhas > caule > raiz e foi crescente durante o ciclo de vida da cultura. A ocorrência de fungos endofíticos em semente de algodoeiro sugere que há transmissão vertical desses micro-organismos por sementes (Vieira et al 2011).

Fungos de diferentes regiões geográficas (Costa Rica, Panamá) apresentaram alta diversidade, mas alta similaridade após semeadas no mesmo local e representavam fungos comuns nas florestas, indicando que fungos associados às sementes não tem especificidade por

hospedeiros, sugerindo a ocorrência de transmissão horizontal. Mas como a amostragem não foi suficiente para a saturação, permaneceu a possibilidade de que alguns fungos em sementes são endófitos transmitidos verticalmente (U'ren et al. 2009).

Em isolamento de fungos endofíticos de diferentes partes da planta de *Bauhinia forticata*, espécie de uso medicinal nativa da América do Sul, a frequência de colonização foi maior em caule, seguido por sépalas, folhas e sementes. Foram encontrados 18 de folhas, 22 de sépalas, 46 de caule e nove de sementes em uma riqueza de espécies de oito, sete, 11 e seis, respectivamente (Bezerra et al. 2015).

Em *Eremanthus erytropappus*, foi constatada diferença entre as taxas de colonização por fungos endofíticos em diferentes tecidos analisados. A taxa de colonização seguiu a seguinte relação caule > folha > semente. Os gêneros *Xylaria* e *Phomopsis* foram considerados generalistas, pois foram encontrados em todos os tecidos analisados. Demonstraram especificidade os gêneros: *Alternaria* e *Fusarium*, presentes em sementes; *Nigrospora* e *Aspergillus* em folha e *Dothiorella* em caule. (Magalhães et al. 2008).

Influência do local de cultivo sobre fungos endofíticos

Alguns gêneros são comuns tanto em clima tropical como em temperado (por exemplo, *Fusarium*, *Phomopsis*, *Phoma*), enquanto que os membros das *Xylariaceae*, *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Phyllosticta* e *Pestalotiopsis* predominam nos trópicos (Frohlich & Hyde 1999; Arnold et al. 2000; Rogers 2000; Arnold et al. 2001; Cannon & Simmons 2002; Suryanarayanan et al. 2003; Draeger & Schulz, não publicado *apud* Schulz & Boyle 2005).

Uma capacidade de dispersão limitada pode explicar a heterogeneidade entre fungos endofíticos em uma mesma cultura em locais aparentemente semelhantes, mas espacialmente distantes (Arnold et al. 2001), como também, a variabilidade das condições microclimáticas, tais como umidade relativa do ar e intensidade de exposição à luz (Petrini 1991; Vieira et al. 2011).

Referências

- Aly, A. H.; Debbad, A.; J.; Proksch, P. 2011. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Appl Microbiol Biotechnol.** 90, 1829. DOI: 10.1007/s00253-011-3270-y
- Araújo, W. L. et al. 2010 Guia Prático: Isolamento e Caracterização de Microrganismos Endofíticos, CALO: Piracicaba.
- Arnold, E. et al. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters** 107: 25-37.
- Arnold, E., Maynard, Z. & Gilbert, G. S. 2001. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. **Mycological Research** 105: 1502–1507.
- Azevedo, J.L. 1998. Microrganismos endofíticos. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. (Ed.). Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente.
- Azevedo, J.L.; Araújo, W.L. 2007. Endophytic fungi of tropical plants: diversity and biotechnological aspects. In: Fungi: multifaceted microbes (B.N. Ganguli & S.K. Deshmukh, Edts.) Anamaya Publishers, New Delhi.
- Bentes, J.G. 2015. Influência do espaçamento na produtividade de sementes de malva (*Urena lobata* L.) em terra firme no Amazonas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Brasil.
- Bezerra, J.D.P. et al. 2015. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. **Brazilian Journal of Microbiology.** São Paulo, v. 46, n. 1, p. 49-57. Doi: 10.1590/S1517-838246120130657
- Carvalho, J.M.; Paixão, L.K.O.; Dolabela, M.F.; Marinho, P.S.B.; Marinho, A.M.R. 2016. Phytoosterols isolated from endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (Melanconiaceae). **Acta Amazonica.** 46(1), 69-72. DOI: 10.1590/1809-4392201500072
- Chapla, V.M.; Biasetto, C.R.; Araujo, A.R. 2013. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química.** Vol 5 No. 3 421-437.
- Crane, J.; Acuna, J. 1945. Effect of planting rate on fiber yield de *Urena lobata* L. as compared with kenaf *Hibiscus Cannabinus* L. *Journal of the American Society of Agronomy.* Vol. 37. No. 4.
- Duarte, M.L.R.; Albuquerque, F.C. 1982. Transmissão de *Phomopsis* sp em sementes de malva (*Urena lobata* L.) EMBRAPA-CPATU, 2p. (EMBRAPA-CPATU. Pesquisa em Andamento, 81).
- Freeman S., Rodriguez R. J. 1993. Genetic conversion of a fungal pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. **Science** 260, 75–78. DOI:10.1126/science.260.5104.75.
- Gamboa, M.; Laureano, S.; Bayman, P. 2002. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? **Mycopathologia** 156: 41-45.
- Homma, A.K.O. 1998. A civilização da juta na Amazônia – expansão e declínio. In: Homma, A.K.O. (Ed.). Amazônia: meio Ambiente e desenvolvimento agrícola. Brasília: Embrapa- SPI, p. 33-60.
- Homma, A.K.O. 2010. A imigração japonesa no Estado do Amazonas: a expansão da juta no médio e baixo Solimões. In: WITKOSKI, Antonio Carlos; FERREIRA, Aldenor da S.; HOMMA, Alfredo K. Oyama; FRAXE, Therezinha de J. P. (Orgs.). A cultura de juta e malva na Amazônia Ocidental: sementes de uma nova racionalidade ambiental? São Paulo: Editora Annablume.
- Homma, A.K.O. 2012. Extrativismo vegetal ou plantio: qual a opção para a Amazônia? **Estudos avançados.** São Paulo. v. 26, n. 74, p. 167-186. DOI: 10.1590/S0103-40142012000100012.
- Hyde, K.D.; Soyong, K. 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 33: 163- 173.

- Johri, Bhavdish. 2006. Endophytes to the rescue of plants! **Current Science** 90: 1315-1316.
- Joly, A. B. 1966. Botânica – introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Companhia Ed. Nacional/Edusp.
- Kuldau, G.A.; Yates, I.E. 2000. Evidence for *Fusarium* endophytes in cultivated and wild plants. In: Bacon, C.W.; White Jr., J.F. (eds). Biology and evolution of microbial endophytes. Dekker, New York, USA, p.85-117.
- Li, L. et al. 2008. A-seco-oleane-type triterpenes from *Phomopsis* sp. (strain HKI0458) isolated from the mangrove plant *Hibiscus tiliaceus*. **Phytochemistry** 69: 611-517. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.08.010
- Lima, C.B. et al. 2013. Ocorrência de microrganismos e sua interferência na qualidade fisiológica de sementes de quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). **Cadernos de Agroecologia** – ISSN 2236-7934 – Vol 8, No. 2.
- Maciel, A.C. 2015. Tendências do cultivo da Malva (*Urena lobata* L.) por agricultores familiares em Manacapuru – Am. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Brasil.
- 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, v. 14, n. 3, p. 267-273.
- Marinho, A.R. et al. 2005. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 16: 280-283.
- Paterniani, E. 2001. Agricultura sustentável nos trópicos. **Estudos Avançados**, 15(43), 303-326. DOI:10.1590/S0103-40142001000300023
- Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrewa, J.; Hirano, S. S. (Ed.). Microbial ecology of leaves. New York: Springer Verlag.
- Petrini, O. 1996. Ecological and physiological aspects of host specificity in endophytic fungi. In *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants* (S. C. Redlin & L.M. Carris, eds): 87–100. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN.
- Redman, R.S., Dunigan, D.D.; Rodriguez, R.J. (2001) Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist** 151: 705–716.
- Saikkonen, K. et al. 2004. Evolution of endophyte–plant symbioses. **Trends Plant Science** 9: 275–280.
- Schulz B, Boyle C. 2006. What are endophytes? In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN, editors. *Microbial Root Endophytes*. Berlin, Germany: Springer-Verlag; pp. 1–13.
- Schulz, B.; Boyle, C. 2005. The endophytic continuum. **Mycological Research**, 109: 661-686.
- Selosse, M.A.; Baudoin, E.; Vandenkoornhuyse, P. 2004. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Comptes Rendus Biologies**. 327: 639-648.
- Silva, J.F. 1989. Malva: Iuformações básicas para seu cultivo. Belém, Embrapa UEPAE de Belém, 16 p. EMBRAPA.UEPAE de Belém. Documentos, 07.
- Souza, H.H. 2012. Ambiente e sociedade: A cadeia produtiva da malva (*Urena lobata* L.) no médio Solimões: uma alternativa sustentável? Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Brasil.
- Sudha, V.; Govindaraj, R; Kathirvelu, B; Al-Dhabi, N.A. ; Durairandiyar, V. et al. 2016. Biological properties of Endophytic Fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**., Curitiba, v. 59, e16150436. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2016150436>.
- U'ren J.M. et al. 2009. Diversity and evolutionary origins of fungi associated with seeds of a neotropical pioneer tree: a case study for analysing fungal environmental samples. **Mycological Research**. Vol. 113, Issue 4, 432–449. Doi: 10.1016/j.mycres.2008.11.015.

Vieira, P.D.S., Motta, C.M.S., Lima, D., Torres, J.B., Quecine, M.C., Azevedo, J.L.; Oliveira, N.T. 2011. Endophytic fungi associated with transgenic and non-transgenic cotton. **Mycology**, 2: 91- 97. DOI: 10.1080/21501203.2011.584390

Vieira, P.D.S.; Silva, F.G.; Silva, W.M.T.; Cavalcanti, P.A.; Lima, D. 2012. Primeiro registro de fungos endofíticos em folhas de *Ixora coccinea* L. em Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 10, n. 1, p. 1-4.

Artigo de acordo com as normas da revista Acta Botanica Brasilica

Isolamento e identificação de fungos endofíticos da malva

Isolation and identification of endophytic fungi of malva

Carla Figueiredo Coelho ^I; Henrique dos Santos Pereira ^{II}; Pedro de Queiroz Costa Neto^{II}; Albejamere Pereira de Castro ^{II}; Kelven Wladie dos Santos Almeida Coelho^{III}

^I Universidade Federal Do Amazonas, Programa De Pós-Graduação Em Agronomia Tropical, Manaus, AM, Brasil.

^{II} Universidade Federal Do Amazonas, Departamento De Ciências Fundamentais De Desenvolvimento Agrícola, Manaus, AM, Brasil.

^{III} Universidade Federal Do Amazonas, Graduação Em Zootecnia, Manaus, AM, Brasil.

RESUMO

A malva é cultivada apenas para a obtenção de fibra, e as sementes são oriundas de processo extrativista. Esse cenário tende a mudar, pois esta espécie apresenta relevante importância socioeconômica, principalmente para o Estado do Amazonas. O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de fungos endofíticos em *Urena lobata*, avaliando a influência do órgão vegetal e local de cultivo, visto a interação endófito-hospedeiro poder ser benéfica ou tornar-se maléfica para a planta. Foram calculados a frequência e grau de colonização, índices de diversidade de Shannon-Weaver, Simpson, e uniformidade de Pielou e realizada a curva do componente dominância. Os gêneros encontrados foram: *Phomopsis*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Curvularia* e *Cochliobolus*. A maior diversidade e riqueza de fungos foi encontrada em Manaus com elevada colonização presente nas folhas. Observou-se preferência dos gêneros: *Curvularia* e *Fusarium* à semente e *Colletotrichum* em folha. A similaridade foi maior entre órgãos vegetais do que nos locais de cultivo, o que indica a coevolução desses fungos com o hospedeiro, resultado de uma interação mutualística ou antagônica equilibrada.

Palavras-chave: diversidade; endófitos; folha; semente; *Urena lobata*

Introdução

A malva está amplamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (Crane & Acuna 1945; Homma 1998). É mundialmente considerada uma planta espontânea e que causa prejuízos por competição no cultivo de outras culturas. No entanto, tem despertado interesse por produzir uma fibra de cor clara, macia, sedosa e muito flexível que é usada principalmente para a confecção de sacarias para a exportação de produtos agrícolas como café, de outros produtos têxteis e em confecções artesanais (Crane & Acuna 1945; Souza 2012).

Esta espécie surgiu como cultura agrícola no Estado do Amazonas em 1971 (Homma 2010; Maciel 2015). E ainda hoje, em algumas regiões, como no Amazonas e no Pará, a malva mantém a importância econômica como fonte de fibra natural. Por isso é cultivada por agricultores familiares tradicionais exclusivamente para a produção de fibra em ambiente de várzea, nas calhas dos rios Amazonas e Solimões no Estado do Amazonas. Devido a este ambiente de cultivo, as plantas são colhidas antes de completarem o ciclo de vida e produzem sementes. (Souza 2012; Bentes 2015).

Assim, os produtores Amazonenses são completamente dependentes das sementes produzidas no Estado do Pará de modo extrativista que são adquiridas e distribuídas pelo governo do Estado do Amazonas por intermédio da Secretaria de Estado da Produção Rural – SEPROR em quantidade que não supre a demanda, causando redução na produção de fibras por falta desse insumo (Souza 2012; Bentes 2015).

Esta situação crítica da cadeia produtiva da malva despertou interesse dos órgãos de pesquisa e atualmente existem projetos em andamento para fornecer informações técnicas, agronômicas, para a implantação de campo de produção de sementes de malva no Estado do Amazonas, visto que, quando uma espécie explorada por extrativismo apresenta importância econômica, a ocorrência da indução de processos de manejo e domesticação resulta na ampliação da oferta, produto de melhor qualidade e preços mais reduzidos, beneficiando os consumidores e produtores (Homma 2012).

Entretanto, o processo de domesticação pode causar alterações na comunidade de micro-organismos associados à cultura, favorecendo a suscetibilidade das plantas a pragas e doenças de forma direta, induzindo à possível patogenicidade desses micro-organismos antes endófitos, e/ou diminuindo a capacidade de defesa da planta na qual os fungos endofíticos exercem importante função (Paterniani 2001).

Isto porque, os fungos endofíticos podem produzir compostos bioativos com capacidade

de agir como biocontrole, podem apresentar atividade anticancerígena, antimicrobiana, inseticida, promotoras de crescimento de plantas e resistência a doenças, e ainda, por isso, serem agentes atuantes na fitorremediação (Sudha et al. 2016).

Pesquisas relacionadas à identificação da biodiversidade de micro-organismos associados a espécies vegetais, além de aprimorarem o conhecimento sobre padrões de ocorrência e distribuição da biodiversidade, importantes informações para o planejamento de estratégias de conservação da biodiversidade. Além disso, representam grande oportunidade para a obtenção de fungos com potenciais diferenciados para investigações científicas e utilização na biotecnologia e indústria (Vieira et al. 2012). Esta é uma área que precisa avançar, pois existem poucos estudos de compostos isolados de fungos endofíticos de plantas da Amazônia (Carvalho et al. 2016). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de fungos endofíticos em *Urena lobata*, avaliando a influência do órgão vegetal e local de cultivo.

Material e métodos

Coleta do material

O estudo foi realizado em dois campos experimentais de produção de sementes de malva (*Urena lobata* L.). Um localizado na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, no Km 38 da rodovia BR-174 de coordenadas 2° 38' 57,6" S e 60° 3' 11" W, com histórico agrícola de cultivo de mandioca por três anos consecutivos no período anterior à implantação da cultura da malva realizada em maio de 2015.

O outro campo foi implantado em novembro de 2015, em área de capoeira em sítio de pecuarista interessado em produzir sementes de malva para o comércio, localizado no município de Anori, estrada Anori-Mato Grosso, Km 15, margem esquerda, com coordenadas 03° 36' 57,8" S e 61° 40' 30,58" W. O clima é o mesmo em ambos locais, é do tipo tropical úmido segundo a classificação de Koppen, com temperatura média anual de 25°C e uma estação

seca entre os meses de junho e agosto, elevada pluviosidade (2.050 a 2.650 mm por ano) e umidade relativa do ar (85 e 90%) (Martins et al. 2006).

Os dois campos foram implantados utilizando sementes oriundas do município de Capitão-Poço (Pará). A semeadura foi realizada após a quebra de dormência de sementes. Foram realizadas as operações de desbaste e capação quando as plantas atingiram 30 cm e 100 cm, respectivamente, sendo mantidas duas plantas por cova com espaçamento de 1,5 m x 0,5 m.

Foram coletadas folhas do terço médio e sementes do ápice de 20 plantas de cada local de cultivo no período de colheita de sementes, final do mês de outubro de 2016. O material foi encaminhado ao Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana da Faculdade de Ciências Agrárias – FCA/UFAM para o isolamento de fungos endofíticos.

Isolamento de fungos endofíticos

O material foi submetido à desinfestação superficial pela imersão em etanol (70%) por um minuto, hipoclorito de sódio 2,5% por dois minutos, etanol 70% por 30 segundos e duas lavagens em água destilada esterilizada por um minuto cada (Pereira et al. 1993).

Para confirmar a eficácia do processo de desinfestação, foram plaqueadas alíquotas de 100 µL da água utilizada na última lavagem em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA, pH 6,8).

De cada planta de cada lugar, seis sementes e seis fragmentos com 0,3 cm² do limbo foliar foram depositados em condições assépticas em placa de Petri (totalizando 12 fragmentos por placa) com meio de cultura BDA suplementado com o antibiótico cloranfenicol (100 µg/mL⁻¹), para inibir o crescimento bacteriano.

As placas foram incubadas a 18 °C e observadas diariamente por até 14 dias. As colônias emergentes foram purificadas e preservadas em BDA para posterior identificação (Vieira et al. 2011).

Os fungos do gênero *Phomopsis* foram transferidos para meio de cultura ágar-aveia (AA,

pH 6,8) e submetidos ao fotoperíodo de 24 horas para induzir a esporulação (Nozaki et al. 2004).

Identificação dos fungos endofíticos

Os fungos que apresentaram esporulação nas condições de cultivo foram identificados em nível de gênero por meio da literatura (Ellis 1971; Bennett & Hunter 1972; Sutton 1980) com base nas características macroscópicas das colônias – cor, aspecto, consistência, presença de pigmento, etc. – e características microscópicas – morfologia de estruturas somáticas e reprodutivas, por meio da observação de lâminas com fragmentos das estruturas do fungo em microscópio óptico. De acordo com as características analisadas, os isolados foram agrupados em morfotipos dentro de cada gênero (Banhos et al. 2008; Magalhães et al. 2008). Para maior riqueza de detalhes das estruturas morfológicas dos fungos, foram realizados microcultivos.

Análise estatística

Foi calculada a frequência de colonização (FC%) com a seguinte fórmula (Petrini et al. 1992):

$$FC\% = \frac{\text{número total de fragmentos com um ou mais isolados}}{\text{total de isolados da amostra}} \times 100$$

Foi calculado o grau de colonização pela fórmula:

$$GC(\%) = \frac{\text{número de isolados}}{\text{planta}} \times 100$$

Para comparar a comunidade de fungos endofíticos em *U. lobata*, avaliou-se a similaridade entre órgãos vegetais (folha e semente) e locais de cultivo (Manaus e Anori) tanto para gêneros quanto para morfotipos identificados utilizando-se o índice de Jaccard - JI (Magurran 1998):

$$JI = \frac{a}{(a + b + c)}$$

Onde *a* representou o número de morfotipos em ambos os locais, *b* representou o número de morfotipos no local B, mas não em A e *c* representou o número de morfotipos no local A,

mas não em B. Esse índice pode variar de 0 (sem compartilhamento, baixa similaridade) até 1 (todos os morfotipos compartilhados, alta similaridade). Foi realizado o agrupamento dos dados de gêneros e morfotipos pelo *Ward's method*.

Para representar a diversidade, foram calculados os índices gerais de diversidade que combinam os componentes riqueza e equitabilidade:

Índice de Simpson, que mostra a concentração de dominância, pois quanto maior o valor, maior a dominância por uma ou poucas espécies. Simpson atribui um peso maior às espécies comuns, pois calcula a probabilidade de dois indivíduos removidos ao acaso de uma comunidade, pertencerem ao mesmo gênero ou morfotipo e a elevação ao quadrado de pequenas razões resulta em valores muito pequenos e é representado pela fórmula (Odum 1983):

$$D = \sum Pi^2$$

Onde Pi representou a proporção do gênero ou morfotipos. Quanto maior o valor de D , menor é a diversidade da amostra, pois significa que existe uma grande probabilidade de dois indivíduos removidos ao acaso, pertencerem à mesma espécie. Assim, para tornar o índice mais intuitivo, a probabilidade foi calculada como $1/D$ (índice inverso de Simpson). Esse índice caracteriza se como um dos índices mais robustos e significativos, já que representa a variação da distribuição da abundância das espécies (Magurran 1988).

Índice de Shannon, que atribui um peso maior a espécies raras, e considera que os indivíduos são escolhidos ao acaso em uma comunidade, é relativamente independente do tamanho da amostra, e confere peso maior às espécies, foi calculado segunda a fórmula (Odum 1983):

$$H' = -\sum Pi \log Pi$$

Onde i representa o número de espécies, Pi representou a probabilidade de importância do gênero ou morfotipo.

Foi calculado o Índice de uniformidade de Pielou (Odum 1983):

$$e = \frac{H'}{S}$$

Onde, H' é o índice de Shannon e S , o número de gêneros ou morfotipos.

O número de indivíduos em cada órgão e localidade foi plotado contra o número de ordem dos morfotipos na sequência, desde o mais abundante até o menos abundante, originando a curva do componente dominância da diversidade de morfotipos dos fungos endofíticos isolados (Odum 1983).

Para comparar as comunidades presentes nos órgãos vegetais e nos locais de cultivo, os dados de grau de colonização foram submetidos à análise de variância pelo teste F. Todos os dados analisados e representados graficamente por meio do programa PAleontological STatistics (PAST) Version 3.14 (Hammer et al. 2001).

Resultados

A frequência de colonização por fungos endofíticos na cultura da malva foi de 85,7%, sendo 24,2% em folhas de Manaus; 21,9% em sementes de Manaus; 23,8% em folhas de Anori e 15,8% em sementes de Anori. Nenhum micro-organismo foi observado no controle de desinfecção superficial, indicando que o método de isolamento foi eficiente.

Foram isolados 619 fungos endofíticos a partir de 240 fragmentos de folha e 240 sementes de malva. Destes, 24,88% não foram identificados por não apresentarem estruturas de reprodução. Aqueles que apresentaram estrutura de reprodução foram identificados e agrupados em morfotipos segundo características macro e microscópicas.

Foram identificados seis gêneros, sendo *Phomopsis*, *Colletotrichum* e *Fusarium* os mais frequentes, e *Pestalotiopsis*, *Curvularia* e *Cochliobolus* menos frequentes. A composição de fungos endofíticos diferiu entre os órgãos vegetais e entre locais de cultivo, sendo a maior riqueza em folha de Manaus (Tabela 1).

Foi possível observar preferência de gêneros de fungos endofíticos pelo tipo de órgão

vegetal e local de cultivo. *Curvularia* se apresentou exclusivo de semente, enquanto que *Pestalotiopsis* ocorreu apenas em Manaus, e *Cochliobolus* somente em Anori. *Phomopsis*, *Colletotrichum* e *Fusarium* ocorreram em ambos locais e órgãos, entretanto, *Colletotrichum* foi predominante em folha e *Fusarium* em semente (Tabela 1), resultando em similaridade entre órgãos vegetais maior que entre locais (Figura 1).

Tabela 1. Fungos endofíticos associados a folhas e sementes de *Urena lobata* cultivadas em Manaus e Anori, municípios do Estado do Amazonas.

Gêneros	Folha de Manaus		Semente de Manaus		Folha de Anori		Semente de Anori	
	Isolados	Morfotipos	Isolados	Morfotipos	Isolados	Morfotipos	Isolados	Morfotipos
<i>Phomopsis</i>	125	55	44	26	24	16	6	6
<i>Colletotrichum</i>	65	20	2	2	80	28	3	3
<i>Fusarium</i>	2	2	31	18	2	2	46	18
<i>Pestalotiopsis</i>	4	4	17	11	0	0	0	0
<i>Curvulária</i>			5	1			4	1
<i>Cochliobolus</i>					1	1		
Total (S = riqueza)		81	-	58	-	47	-	28

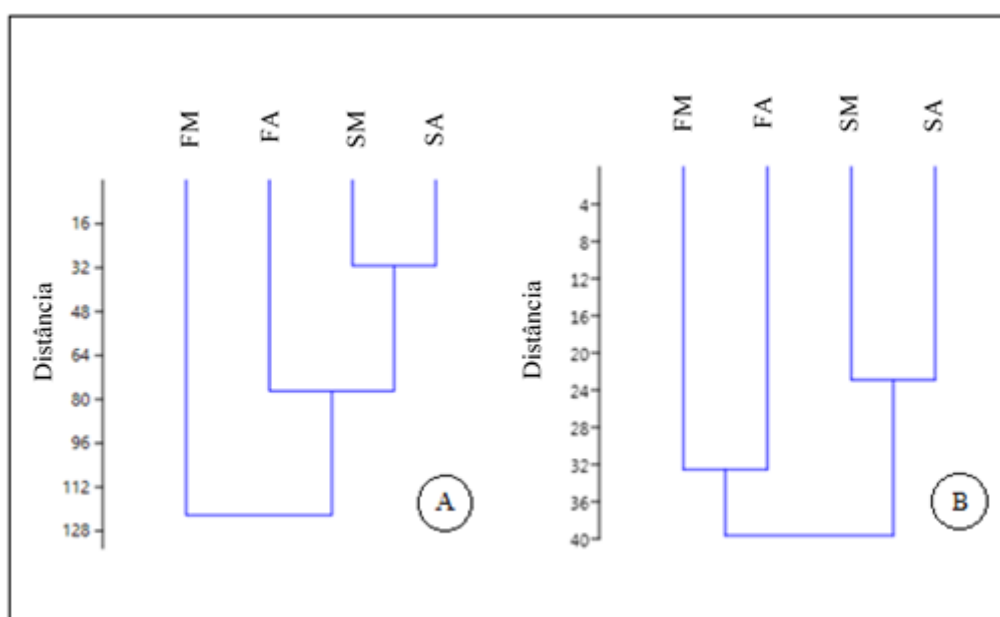


Figura 1. Dendrogramas destacando a relação entre as comunidades de fungos endofíticos em órgãos vegetais e locais de cultivo de *Urena lobata* no Estado do Amazonas. Baseado no Índice de Similaridade de Jaccard, considerando gêneros (A) e morfotipos (B). F = folha; S = semente; M = Manaus; A = Anori.

A similaridade entre os morfotipos foi muito baixa, ou seja, a grande maioria dos morfotipos foram exclusivos em cada localidade e órgão vegetal. O maior número de morfotipos em comum foi encontrado entre as sementes de Manaus e Anori (Tabela 2).

Tabela 2. Similaridade de morfotipos de fungos endofíticos observados entre órgãos vegetais de *Urena lobata* L. cultivada em duas localidades no Amazonas. F = folha; S = semente; M = Manaus; A = Anori.

	FM	SM	FA	SA
FM				
SM	0,02			
FA	0,03	0,01		
SA	0,00	0,05	0,03	

Pela análise de variância, ambos os fatores (órgão vegetal e local de cultivo) apresentaram efeitos significativos na comunidade de fungos endofíticos de malva. A interação desses fatores não foi significativa (Tabela 3). A colonização foi maior nas folhas do que nas sementes, independentemente do local de cultivo (Figura 2); e maior em Manaus do que em Anori, independentemente do tipo de órgão vegetal (Figura 3).

Tabela 3. Análise de variância do grau de colonização dos fungos endofíticos nas folhas e sementes de *Urena lobata* cultivada nos municípios de Manaus e Anori do Estado do Amazonas.

Fatores de variação	Soma dos quadrados	GL	Quadrados médios	F	p
Local	10305,8	1	10305,8	44,22	3,98E-09
Órgão	3564,45	1	3564,45	15,3	0,0001984
Interação	101,25	1	101,25	0,4345	0,5118
Resíduo	17710,5	76	233,033		
Total	31682	79			

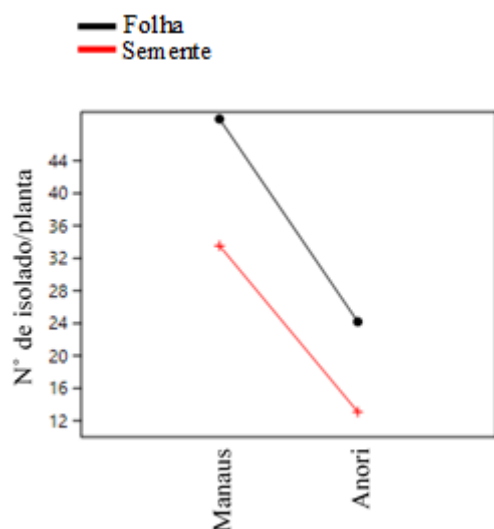


Figura 2. Grau de colonização de fungos endofíticos em órgãos vegetais de *Urena lobata* cultivada no Amazonas.

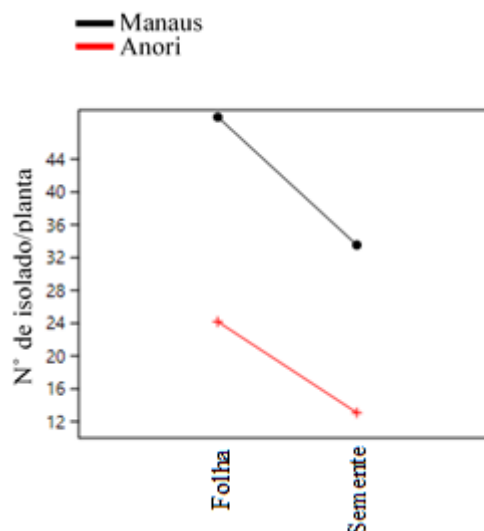


Figura 3. Grau de colonização de fungos endofíticos de *Urena lobata* em dois locais de cultivo no Amazonas.

Os índices de diversidade calculados indicam que a comunidade de fungos endofíticos associados à malva de Manaus, tanto em folhas quanto sementes, é mais diversa quando comparada com Anori (Tabela 4).

Tabela 4. Índices de diversidade calculados para comunidades de fungos endofíticos isolados de folhas e sementes de *Urena lobata* cultivada em duas localidades no Amazonas.

Amostras	Shannon-Weaver (H')		Simpson inverso ($1/D$)		Pileou (e)	
	Gênero	Morfotipo	Gênero	Morfotipo	Gênero	Morfotipo
Folha de Manaus	0,8	3,9	1,9	21,2	1,3	2,0
Semente de Manaus	1,3	3,9	3,0	38,1	1,8	2,2
Folha de Anori	0,6	3,3	1,6	13,7	1,0	1,9
Semente de Anori	0,8	2,6	1,6	11,1	1,4	2,0

Pela curva do componente dominância da diversidade de morfotipos dos fungos endofíticos isolados, é possível perceber a grande diversidade de morfotipos e que, de forma geral, estes são representados por poucos indivíduos. Também é possível verificar que houve morfotipos predominantes, contendo um número maior de indivíduos (Figura 4).

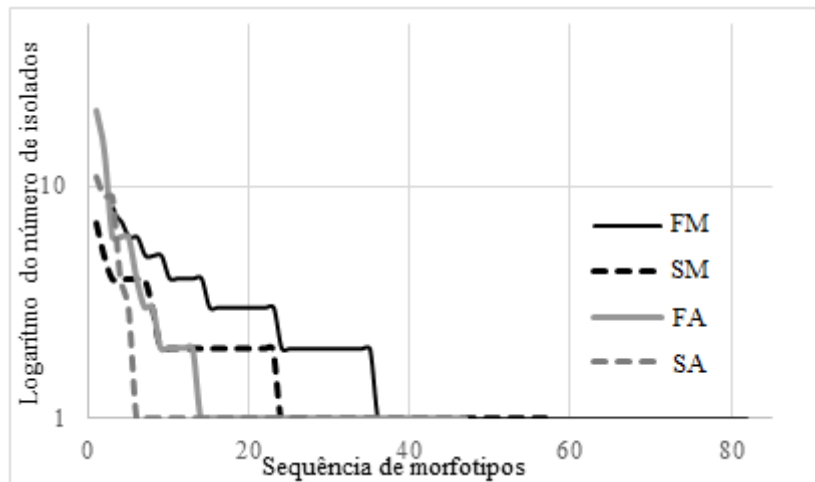


Figura 4. Curva do componente dominância da diversidade de morfortipos de fungos endofíticos isolados de folhas e sementes de *Urena lobata* cultivada em duas localidades no Amazonas. A = Anori; M = Manaus.

Discussão

O registro de uma alta incidência de fungos endofíticos mostra que estes micro-organismos são comuns em *U. lobata* cultivadas no Amazonas. Esta espécie é uma fonte de fungos endofíticos, uma vez que apenas um tipo de meio de cultura foi utilizado para o processo de isolamento e foi obtido um número considerável de endófitos (85,7%).

O baixo número de gêneros encontrados pode ser devido a um possível efeito antagônico entre os fungos endofíticos habitantes de um mesmo nicho. A dominância de determinados gêneros pode ter ocasionado a baixa frequência de outros (Vieira et al. 2012). A comunidade de fungos endofíticos foi mais diversa em Manaus, muito provavelmente por ser em fazenda experimental, onde há muitas outras culturas próximas. Em Anori, a área era mais uniforme por tratar-se de pastagem com uma menor ocorrência de espécies vegetais.

A predominância de *Colletotrichum* nas folhas está de acordo com outros trabalhos realizados, nos quais este gênero aparece em outros órgãos, mas unanimemente em folha. Já foi isolado como endófito em folha de *Virola michelli*, planta medicinal típica da Amazônia, usada no combate a infecções de pele (Carvalho et al. 2016). Também achado em folha da planta ornamental *Ixora coccinia* (Vieira 2012), em folhas e raízes de *Annona spp.* (Silva et al. 2006)

e em folha e caule de *Gossypium* sp. (Vieira 2011).

Curvularia se apresentou exclusivo de semente. O que condiz com estudo realizado com algodoeiro (*Gossypium* L.), pertencente à mesma família botânica da malva, Malvaceae, onde *Curvularia* apareceu como endófito mais frequente associado à semente (Vieira 2011).

Há relato deste gênero também em folhas de planta ornamental arbustiva e em espécie florestal (Vieira et al. 2012; Freire et al. 2015). Também é citado como patógeno em sementes de espécies florestais nativas (Seneme et al. 2012; Medeiros et al. 2016). É transmitido da semente à planta, causando manchas foliares em mudas de planta forrageira (Santos et al. 2014).

O que significa que este fungo pode se translocar para as folhas, permanecer como endófito, e, possivelmente, em dado momento, por condições adversas do ambiente para a planta, se manifestar causando sintomas de doença.

Fusarium foi encontrado predominante em sementes, resultado semelhante ao encontrado em isolamento de fungos endofíticos de diversos órgãos de *Eremanthus erytropappus* e este gênero de fungo colonizou apenas as sementes (Magalhães et al. 2008). É um gênero patogênico que muitas vezes é encontrado como endófito (Banhos et al. 2014). Há relatos de *Fusarium* como patógeno em semente (Seneme et al. 2012) e como endofítico em folha (Freire et al. 2015).

O gênero *Cochliobolus* apresentou apenas um isolado em Anori. Foram encontrados *Cochliobolus australiensis* e *C. lunatus* em baixa frequência de colonização como endófitos em folhas e não encontrados em sementes de *Bauhinia forficata*, planta medicinal nativa da América do Sul (Bezerra et al. 2015). Esta frequência baixa indica colonização momentânea, ou seja, este fungo pode não ser um endófito natural, mas um epífito ou mesmo um patógeno vegetal que tenta colonizar o tecido vegetal transitoriamente (Banhos et al. 2014).

Pestalotiopsis apareceu apenas em Manaus. Isto pode ser explicado pela influência de diversos fatores, como: idade da espécie vegetal coletada, uma vez que o campo de Manaus foi

semeado seis meses antes do campo de Anori; diferenças na oferta nutricional do tecido do hospedeiro, pois em nenhum dos campos foi realizado qualquer correção e adubação do solo ou irrigação; e variabilidade das condições microclimáticas, tais como umidade relativa do ar e intensidade de exposição à luz (Petrini 1991; Vieira et al. 2011).

Phomopsis apareceu em ambos os órgãos vegetais e em ambos locais de cultivo de forma mais frequente que os demais gêneros encontrados. Este gênero, na condição de endófito, também foi o de maior frequência de colonização e predominantemente encontrado em caules, seguido por folhas e sementes de *E. erytropappus*, sendo considerado como generalista (Magalhães et al. 2008).

Já foi relatado sintomas de doença causada por *Phomopsis* sp. em campo experimental de produção de sementes de malva em Manaus, e que após um período os sintomas desapareceram sem aplicação de qualquer método de controle (Bentes 2015). O que sugere que este fungo endofítico, nesta cultura, pode tornar-se patogênico e voltar a ser endófito por efeito das condições ambientais no hospedeiro, e, conseqüentemente, no fungo (Schulz & Boyle 2005).

Foram encontrados fungos endofíticos associados à malva que, segundo a literatura, produzem compostos bioativos com capacidade de biocontrole. *Pestalotiopsis* produz compostos fenólicos, isopestacina, diterpenóide taxol, com ações antifúngica antimicrobiana e anticancerígena, respectivamente (Summerel et al., 1998; Strobel et al. 2002; Li et al. 2008).

Este gênero produz ainda compostos com atividades antioxidante e fitotóxica, apresentando potencial inibitório da germinação e do desenvolvimento de plantas daninhas da Amazônia (Strobel et al. 2002; Santos et al. 2008).

Phomopsis produz os compostos bioativos isopestacina e lactonas (Strobel et al. 2002). *Colletotrichum*, *Phomopsis* e *Fusarium* foram os gêneros mais frequentes isolados como endofíticos de folha de *Annona* spp. e promoveram de forma eficiente o crescimento vegetal em muda de *Annona squamosa* (Silva et al. 2006).

Os mesmos gêneros encontrados como endófitos foram citados como fitopatógenos indicando a necessidade de estudo sobre os efeitos dos fatores agronômicos como fertilidade do solo, espaçamento e irrigação no desenvolvimento e produtividade da cultura. Visto que uma planta em condição de estresse, por condições adversas do ambiente torna-se suscetível a pragas e doenças. Um ambiente desfavorável para a planta/hospedeiro e favorável ao micro-organismo/patógeno proporciona o aparecimento da doença em campo.

Conclusão

U. lobata alberga uma comunidade diversificada de fungos endofíticos.

A maior riqueza foi encontrada em folhas de malva cultivadas em Manaus.

A diversidade de endófitos foi maior na malva cultivada no município de Manaus.

A colonização dos endófitos foi maior nas folhas do que nas sementes, independentemente do local de cultivo de malva e maior em Manaus que em Anori, independente do tipo de órgão vegetal.

Entre os seis gêneros identificados, *Curvularia* e *Fusarium* demonstraram preferência pela colonização em sementes, enquanto *Colletotrichum* pelas folhas; *Pestalotiopsis* se limitaram à ocorrência em Manaus e *Cochliobolus* a Anori.

A similaridade foi maior entre órgãos vegetais do que nos locais de cultivo, o que indica a coevolução desses fungos com o hospedeiro, resultado de uma interação mutualística ou antagônica equilibrada.

Referências

- Banhos, E.F. et al. 2014. Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: distribution and bioactivity. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 45, n. 1, p. 153-162.
- Bentes, J.G. 2015. Influência do espaçamento na produtividade de sementes de malva (*Urena lobata* L.) em terra firme no Amazonas. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Brasil.
- Bennett, H.L.; Hunter, B.B. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Third Edition. Burgess Publishing Company.
- Bezerra, J.D.P. et al. 2015. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 46, n. 1, p. 49-57. Doi: 10.1590/S1517-838246120130657
- Carvalho, J.M.; Paixão, L.K.O.; Dolabela, M.F.; Marinho, P.S.B.; Marinho, A.M.R. 2016. Phytosterols isolated from endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* (Melanconiaceae). **Acta Amazonica**. 46(1), 69-72. DOI: 10.1590/1809-4392201500072
- Crane, J.; Acuna, J. 1945. Effect of planting rate on fiber yield de *Urena lobata* L. as compared with kenaf *Hibiscus Cannabinus* L. Journal of the American Society of Agronomy. Vol. 37. No. 4.
- Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Intitute. England.
- Freire, K.T.L.S. et al 2015. Fungos endofíticos de opuntia ficus-indica (L.) Mill. (cactaceae) sadia e infestada por *Dactylopius opuntiae* (cockerell, 1896) (hemiptera: dactylopiidae). **Gaia Scientia**. Edição especial cactaceae. Volume 9(2): 104-110.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and P. D. Ryan. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp. <http://folk.uio.no/ohammer/past>
- Homma, A.K.O. 1998. A civilização da juta na Amazônia – expansão e declínio. In: Homma, A.K.O. (Ed.). *Amazônia: meio Ambiente e desenvolvimento agrícola*. Brasília: Embrapa- SPI, p. 33-60.
- Homma, A.K.O. 2010. A imigração japonesa no Estado do Amazonas: a expansão da juta no médio e baixo Solimões. In: WITKOSKI, Antonio Carlos; FERREIRA, Aldenor da S.; HOMMA, Alfredo K. Oyama; FRAXE, Therezinha de J. P. (Orgs.). *A cultura de juta e malva na Amazônia Ocidental: sementes de uma nova racionalidade ambiental?* São Paulo: Editora Annablume.
- Homma, A.K.O. 2012. Extrativismo vegetal ou plantio: qual a opção para a Amazônia? **Estudos avançados**. São Paulo. v. 26, n. 74, p. 167-186. DOI: 10.1590/S0103-40142012000100012.
- Li, L. et al. 2008. A-seco-oleane-type triterpenes from *Phomopsis* sp. (strain HKI0458) isolated from the mangrove plant *Hibiscus tiliaceus*. **Phytochemistry** 69: 611-517. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.08.010
- Maciel, A.C. 2015. Tendências do cultivo da Malva (*Urena lobata* L.) por agricultores familiares em Manacapuru – Am. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Brasil.
- 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. **Cernea**, Lavras, v. 14, n. 3, p. 267-273.
- Magurran, A. E. 1988. *Ecological Diversity and Its Measurement*. Princeton University Press, New Jersey.
- Martins, G. C.; Ferreira, M. M.; Curi, N.; Vitorino, A. C. T.; Silva, M. L. N. 2006. Campos nativos e matas adjacentes da região de Humaitá (AM): atributos diferenciais dos solos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 2. DOI: 10.1590/S1413-70542006000200005

- Medeiros, J.G.F. et al. 2016. Fungos associados às sementes de *Enterolobium contortisiliquum*: análise da incidência, controle e efeitos na qualidade fisiológica com o uso de extratos vegetais. **Ciência Florestal**. Santa Maria, v. 26, n. 1, p. 47-58. Doi: 10.5902/1980509821090.
- Nozaki, M.H., Camargo, M.; Barreto, M. 2004. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**. 29(4), 429- 32. DOI: 10.1590/S0100-41582004000400012
- Odum, E.P. 1983. Basic Ecology. Harcourt Brace College Publishers.
- Paterniani, E. 2001. Agricultura sustentável nos trópicos. **Estudos Avançados**, 15(43), 303-326. DOI:10.1590/S0103-40142001000300023
- Pereira, J.O.; Azevedo, J.L.; Petrini, O. 1993. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia**. 85: 362-364.
- Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrewa, J.; Hirano, S. S. (Ed.). Microbial ecology of leaves. New York: Spring Verlag.
- Petrini, O., Sieber, T., Toti, L., Viret, O. 1992. Ecology, metabolite production and substrat utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins** 1: 185-196.
- Santos, G.R. et al. 2014. Sanitary analysis, transmission and pathogenicity of fungi associated with forage plant seeds in tropical regions of Brazil. **Journal of Seed Science**. Londrina, v. 36, n. 1, p. 54-62. DOI: 10.1590/S2317-15372014000100007.
- Santos, L.S. et al. 2008. Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*. **Planta daninha**. Viçosa, v.26, n.3, p.539-48. DOI: 10.1590/S0100-83582008000300009.
- Schulz, B.; Boyle, C. 2005. The endophytic continuum. **Mycological Research**, 109: 661-686.
- Seneme, A.M. et al. 2012. Germinação, qualidade sanitária e armazenamento de sementes de canafistula (*Peltophorum dubium*). **Revista Árvore**. Viçosa, v.36, n. 1, p. 01-06. DOI:10.1590/S0100-67622012000100001.
- Silva, R.L.O. et al. 2006. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 649-655. DOI: 10.1590/S0102-33062006000300015.
- Souza, H.H. 2012. Ambiente e sociedade: A cadeia produtiva da malva (*Urena lobata* L.) no médio Solimões: uma alternativa sustentável? Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Brasil.
- Strobel, G. et al. 2002. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**. v. 60, p. 179-183.
- Sudha, V.; Govindaraj, R; Kathirvelu, B; Al-Dhabi, N.A. ; Duraipandiyar, V. et al. 2016. Biological properties of Endophytic Fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**., Curitiba, v. 59, e16150436. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2016150436>.
- Summerell, B. et al. *Pestalotiopsis guepinii*, a Taxolproducing Endophyte of the Wollemi Pine, *Wollemia nobilis*. **Australian Journal of Botany**. v. 45, n. 6, p. 1073-1082, 1998.
- Sutton, B.C. 1980. The Coelomycetes. Commonwealth Mycological Intitute. England.
- Vieira, P.D.S., Motta, C.M.S., Lima, D., Torres, J.B., Quecine, M.C., Azevedo, J.L.; Oliveira, N.T. 2011. Endophytic fungi associated with transgenic and non-transgenic cotton. **Mycology**, 2: 91- 97. DOI: 10.1080/21501203.2011.584390

Vieira, P.D.S.; Silva, F.G.; Silva, W.M.T.; Cavalcanti, P.A.; Lima, D. 2012. Primeiro registro de fungos endofíticos em folhas de *Ixora coccinea* L. em Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 10, n. 1, p. 1-4.

ANEXOS

Lista de identificação em gêneros e morfotipos de fungos endofíticos isolados de folhas e sementes de *Urena lobata* L. nos municípios de Manaus e Anori do Estado do Amazonas.

Gêneros	Manaus		Anori		Gêneros	Manaus		Anori	
	Folha	Semente	Folha	Semente		Folha	Semente	Folha	Semente
<i>Phomopsis</i>					Morfotipo 35	2			
Morfotipo 1	3	1			Morfotipo 36	2			
Morfotipo 2	2				Morfotipo 37	1			
Morfotipo 3	2				Morfotipo 38	1			
Morfotipo 4	2				Morfotipo 39	2			
Morfotipo 5	3				Morfotipo 40	1			
Morfotipo 6	1				Morfotipo 41	3			
Morfotipo 7	1				Morfotipo 42	3			
Morfotipo 8	6				Morfotipo 43	3			
Morfotipo 9	4				Morfotipo 44	1			
Morfotipo 10	3	1			Morfotipo 45	3			
Morfotipo 11	1				Morfotipo 46	1			
Morfotipo 12	5				Morfotipo 47	3			
Morfotipo 13	4				Morfotipo 48	1			
Morfotipo 14	4				Morfotipo 49	1			
Morfotipo 15	5				Morfotipo 50	1			
Morfotipo 16	1				Morfotipo 51	1			
Morfotipo 17	7				Morfotipo 52	1			
Morfotipo 18	2				Morfotipo 53	6			
Morfotipo 19	2				Morfotipo 54	1			
Morfotipo 20	4				Morfotipo 55	1			
Morfotipo 21	5				Morfotipo 56		1		
Morfotipo 22	2				Morfotipo 57		2		
Morfotipo 23	1				Morfotipo 58		1		
Morfotipo 24	1				Morfotipo 59		1		
Morfotipo 25	1				Morfotipo 60		4		
Morfotipo 26	1				Morfotipo 61		1		
Morfotipo 27	1				Morfotipo 62		1		
Morfotipo 28	1				Morfotipo 63		2		
Morfotipo 29	2				Morfotipo 64		1		
Morfotipo 30	1				Morfotipo 65		1		
Morfotipo 31	1				Morfotipo 66		1		
Morfotipo 32	4				Morfotipo 67		1		
Morfotipo 33	1				Morfotipo 68		1		
Morfotipo 34	2				Morfotipo 69		2		

Lista de identificação em gêneros e morfotipos de fungos endofíticos isolados de folhas e sementes de *Urena lobata* L. nos municípios de Manaus e Anori do Estado do Amazonas.

Gêneros	Manaus		Anori		Gêneros	Manaus		Anori	
	Folha	Semente	Folha	Semente		Folha	Semente	Folha	Semente
Morfotipo 70		1			Morfotipo 5	1			
Morfotipo 71		2			Morfotipo 6	1			
Morfotipo 72		4			Morfotipo 7	1			
Morfotipo 73		1	1	1	Morfotipo 8	1		3	
Morfotipo 74		2			Morfotipo 9	1			
Morfotipo 75		2			Morfotipo 10	1			
Morfotipo 76		1			Morfotipo 11	1			
Morfotipo 77		4			Morfotipo 12	1			
Morfotipo 78		4			Morfotipo 13	1			
Morfotipo 79		1			Morfotipo 14	1			
Morfotipo 80			1		Morfotipo 15	2		1	
Morfotipo 81			6		Morfotipo 16	3			
Morfotipo 82			1		Morfotipo 17	1			
Morfotipo 83			1		Morfotipo 18	1			
Morfotipo 84			1		Morfotipo 19	1			
Morfotipo 85			2		Morfotipo 20	1			
Morfotipo 86			1		Morfotipo 21		1		
Morfotipo 87			1		Morfotipo 22		1		
Morfotipo 88			1		Morfotipo 23			1	
Morfotipo 89			2		Morfotipo 24			1	
Morfotipo 90			1		Morfotipo 25			1	
Morfotipo 91			2		Morfotipo 26			1	
Morfotipo 92			1	1	Morfotipo 27			1	
Morfotipo 93			1		Morfotipo 28			1	
Morfotipo 94			1		Morfotipo 29			6	
Morfotipo 95				1	Morfotipo 30			1	
Morfotipo 96				1	Morfotipo 31			1	
Morfotipo 97				1	Morfotipo 32			1	
Morfotipo 98				1	Morfotipo 33			1	
<i>Colletotrichum</i>					Morfotipo 34			2	
Morfotipo 1	8		4		Morfotipo 35			3	
Morfotipo 2	1				Morfotipo 36			1	
Morfotipo 3	36		21		Morfotipo 37			1	
Morfotipo 4	1				Morfotipo 38			1	

Lista de identificação em gêneros e morfotipos de fungos endofíticos isolados de folhas e sementes de *Urena lobata* L. nos municípios de Manaus e Anori do Estado do Amazonas.

Gêneros	Manaus		Anori		Gêneros	Manaus		Anori	
	Folha	Semente	Folha	Semente		Folha	Semente	Folha	Semente
Morfotipo 39			1		Morfotipo 24				1
Morfotipo 40			6		Morfotipo 25				11
Morfotipo 41			1		Morfotipo 26				1
Morfotipo 42			14		Morfotipo 27				1
Morfotipo 43			1		Morfotipo 28				1
Morfotipo 44			2		Morfotipo 29				1
Morfotipo 45			1		Morfotipo 30				1
Morfotipo 46			1		Morfotipo 31				1
Morfotipo 47				1	Morfotipo 32				1
Morfotipo 48				1	Morfotipo 33				1
Morfotipo 49				1	Morfotipo 34				1
<i>Fusarium</i>					Morfotipo 35				1
Morfotipo 1	1				Morfotipo 36				1
Morfotipo 2	1				Morfotipo 37				1
Morfotipo 3		1			<i>Pestalotiopsis</i>				
Morfotipo 4		7			Morfotipo 1	1	4		
Morfotipo 5		2		1	Morfotipo 2	1			
Morfotipo 6		2			Morfotipo 3	1			
Morfotipo 7		2			Morfotipo 4	1			
Morfotipo 8		2			Morfotipo 5		1		
Morfotipo 9		1			Morfotipo 6		2		
Morfotipo 10		3		3	Morfotipo 7		2		
Morfotipo 11		1			Morfotipo 8		1		
Morfotipo 12		1			Morfotipo 9		2		
Morfotipo 13		2			Morfotipo 10		1		
Morfotipo 14		1			Morfotipo 11		1		
Morfotipo 15		1			Morfotipo 12		1		
Morfotipo 16		1			Morfotipo 13		1		
Morfotipo 17		2			Morfotipo 14		1		
Morfotipo 18		1			<i>Curvularia</i>				
Morfotipo 19		1			Morfotipo 1		5		4
Morfotipo 20			1		<i>Cochliobolus</i>				
Morfotipo 21			1		Morfotipo 1			1	
Morfotipo 22				9					
Morfotipo 23				9					