

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DO
GUARANÁ (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) NO CONTROLE BIOLÓGICO DA
ANTRACNOSE**

MANAUS

2015

THANA ESASHIKA BEZERRA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DO
GUARANÁ (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) NO CONTROLE BIOLÓGICO DA
ANTRACNOSE**

Defesa de Tese apresentada ao Programa de
Doutorado Multidisciplinar em Biotecnologia da
Universidade Federal do Amazonas, como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Orientação: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

MANAUS

2015

B574p Bezerra, Thana Esashika
Potencial biotecnológico dos fungos endofíticos do Guaraná
(*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) no controle biológico da antracnose /
Thana Esashika Bezerra. 2015
101 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: João Lúcio de Azevedo
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. plantas amazônicas. 2. biocontrole. 3. antracnose. 4. guaraná .
5. endofíticos . I. Azevedo, João Lúcio de II. Universidade Federal
do Amazonas III. Título

THANA ESASHIKA BEZERRA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DO
GUARANÁ (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) NO CONTROLE BIOLÓGICO DA
ANTRACNOSE**

Defesa de Tese apresentada ao Programa de
Doutorado Multidisciplinar em Biotecnologia da
Universidade Federal do Amazonas, como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Defesa da Tese: ____/____/____

Banca da Defesa:

Dr. João Lúcio de Azevedo

Dr. José Odair Pereira

Dra. Rozana de Medeiros Sousa Galvão

Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto

Dr. José Renato Pereira Cavallazzi

*A minha mãe, Amazônia Alfaia
Esashika, pela dedicação, apoio e
incentivo.*

DEDICO.

Menção Especial

Ao Dr. João Lúcio de Azevedo, meus sentimentos de gratidão, respeito, admiração, por tudo que o senhor como professor, pesquisador, orientador e amigo representa para todos aqueles que têm o privilégio de receber o compartilhamento de seu precioso e incomensurável conhecimento e da vivência acadêmica e, principalmente, pelas lições de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Deus, por sempre estar presente em minha vida, por esta força interior oriunda de lugar desconhecido, pelas inúmeras vezes em que pegou em minha mão e me disse: Vamos...você consegue! E a minha mãe Ave Maria, por me abraçar e acalantar nos momentos em que ergui meus olhos chorosos. Muito Obrigada!

Agradeço à minha mãe querida, Amazônia Alfaia Esashika, pelo apoio, incentivo, pelo amor incondicional, pelo suporte, e por todos os esforços a mim direcionados a fim de que eu concluísse meus estudos e continuasse nesta infinita jornada do conhecimento.

Agradeço ao Cleber Kamoda Ruiz Rodrigues, meu grande incentivador! Obrigada por sempre ter uma palavra de amor e carinho. Por sempre dizer: “eu apoio você!” Por sempre me ouvir e por sempre me dizer que eu chegaria ao meu objetivo. E eu consegui! Obrigada, de coração, por tudo! Sempre amarei você.

Agradeço à Universidade Federal do Amazonas – UFAM e ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, pelo ingresso no curso de doutorado, pela confiança, apoio e suporte.

Agradeço à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ, ao Departamento de Genética “João Lúcio de Azevedo”, a Profa. Aline A. Pizzirani-Kleiner “*in memoriam*”, a Joelma Marcon, ao Francisco Tanaka, pelas análises em microscopia e à Maria Carolina Quecine (Carol), pelas análises estatísticas e a todos que direta e indiretamente contribuíram com esta pesquisa.

Agradeço ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, ao Dr. Rogério Hanada, ao M.Sc. Luiz Alberto Assis e à Dr. Rosalee Coelho Netto, pelas orientações e sugestões e pelo apoio institucional.

Agradeço, imensamente, ao Prof. Spartaco Astolfi Filho e ao Prof. José Odair Pereira da Universidade Federal do Amazonas, pelas orientações, apoio institucional, pelas sugestões e pela amizade. Obrigada!

Agradeço ao Prof. João Lúcio de Azevedo, pela orientação, apoio, incentivo, paciência, correções, sugestões, dedicação a fim de que esta pesquisa se tornasse realidade.

Agradeço a Enedina Assunção Nogueira, como profissional e como amiga. Obrigada por ser a única pessoa que eu tinha a certeza absoluta de que iria me ajudar, em todos os sentidos e sempre. Muito Obrigada!

“Uma coisa que aprendi nessa longa vida: toda nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil, ainda sim, é a coisa mais preciosa que nós temos.”

Albert Einstein

RESUMO

A Amazônia possui numa imensa diversidade biológica, a qual é pouco conhecida e por consequência pouco explorada, principalmente com relação aos microrganismos e as suas interações com as plantas da região. Dentre os microrganismos de interesse estão as bactérias (incluindo os actinomicetos) e os fungos (incluindo as leveduras) que habitam o interior e a superfície das plantas hospedeiras (microrganismos endofíticos e epifíticos, respectivamente). Muitos destes microrganismos têm potencialmente características relevantes como a produção de antibióticos, aromas, corantes, hormônios de crescimento vegetal e enzimas úteis, entre outras. O objetivo desta pesquisa foi isolar, selecionar, caracterizar e identificar microrganismos endofíticos presentes nas folhas, ramos e rizosfera do guaraná (*Paullinia cupana*) como possíveis agentes de biocontrole da antracnose do guaranazeiro, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. Para esta pesquisa, Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* foram identificados morfológica e molecularmente e comprovados serem agentes causais da antracnose por meio do teste de patogenicidade. Em seguida, o confronto direto de 522 fungos endofíticos contra o patógeno *C. gloeosporioides* resultaram na seleção dos seguintes isolados que apresentaram índices de antagonismo significativos: *Penicillium verruculosum*, *Penicillium pinophilum*, *Geotrichum* sp., *Schizophyllum commune* e *Aspergillus flavus*. Foram realizados dois experimentos *in vivo*, na casa de vegetação: para o primeiro experimento, foram usados os cinco isolados no teste *in vivo* contra *Colletotrichum gloeosporioides* em que os fungos *P. verruculosum*, *P. pinophilum*, *Geotrichum* sp., *A. flavus* e *S. commune* apresentaram efeito antagonista significativo quanto ao fungo *C. gloeosporioides* e nenhum deles demonstrou patogenicidade contra *P. cupana*. O segundo experimento usou dois isolados de *C. gloeosporioides*, um no qual a ocorrência de bandas RNA fita dupla (dsRNA) foi observada e o outro isolado, sem o RNA fita dupla. Para esse experimento, constatou-se que, as lesões foliares apresentaram-se menores nas folhas em que foi inoculado o isolado com o RNA fita dupla, constatando, assim, uma característica hipovirulenta do isolado. Em ambos os experimentos, observam-se que os fungos endofíticos possuem potencial para o controle de fitopatógenos em *P. cupana*, sendo promissores para o uso no biocontrole de doenças dessa planta.

Palavras-chaves: plantas amazônicas, biocontrole, controle biológico, antracnose.

ABSTRACT

The Amazon has a huge biological diversity, which is little known and consequently little explored, particularly with respect to microorganisms and their interactions with plants in the region. Among the microorganisms of interest are bacteria (including Actinomycetes) and fungi (including yeasts) that inhabit the interior and the surface of the host plants (endophytes and epiphytic microorganisms, respectively). Many of these microorganisms are potentially relevant characteristics as the production of antibiotics, flavorings, colorings, plant growth hormones and useful enzymes, among others. The aim of this study was to isolate, select, characterize and identify endophytic microorganisms present in the leaves, branches and rhizosphere of guarana (*Paullinia cupana*) as potential biocontrol agents of *Colletotrichum*. For this study, isolates of *Colletotrichum* were identified morphologically and molecularly and proven to be causative agents of anthracnose through the pathogenicity test. Then, the direct confrontation of 522 endophytic fungi against the pathogen *Colletotrichum* resulted in the selection of the following isolates showed significant antagonism rates: *Penicillium verruculosum*, *Penicillium pinophilum*, *Geotrichum* sp, *Aspergillus flavus* and *Schizophyllum commune*. Two *in vivo* experiments were performed in a greenhouse: For the first experiment, we used the five isolates *in vivo* test against *Colletotrichum gloeosporioides* in which the fungi *P. verruculosum*, *P. pinophilum*, *Geotrichum* sp, *A. flavus* and *S. commune* showed significant antagonistic effect on the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* and none of them showed pathogenicity against *P. cupana*. The second experiment used two isolates of *C. gloeosporioides*, one in which the occurrence of double-stranded RNA bands (dsRNA) has been observed isolated, and the other without double-stranded RNA. For this experiment, it was found that the foliar lesions were lower in the leaves that were inoculated with the isolated double-stranded RNA, confirming thus a hypovirulent characteristic hypovirulenta isolated. In both experiments, it was observed that the endophytic fungi have the potential to control the pathogen plant pathogens in *P. cupana* and is promising for use in biocontrol of diseases of this plant.

Keywords: Amazonian plants, biological control, anthracnose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Evolução da produção do guaraná em grãos (em toneladas).....	15
Figura 2 - Foto dos sintomas da antracnose nas folhas jovens de guaraná, em Maués.....	17
Figura 3 – Fluxograma das etapas da pesquisa intitulada “Potencial biotecnológico dos fungos endofíticos do guaraná (<i>Paulliniacupana</i> var. <i>sorbillis</i>) no controle biológico da antracnose”.....	38
Figura 4 - Área de coleta na Fazenda Santa Helena, Maués, Amazonas. Detalhe do campo de <i>Paullinia cupana</i>	40
Figura 5 - Fragmentação de folhas de <i>P. cupana</i> e as emissões de hifas de fungos endofíticos.....	42
Figura 6 - Inoculação dos fungos CL1 e CL3 nas folhas de guaraná com e sem feridas feitas com agulhas.....	44
Figura 7 - Placas de Petri com fragmentos de folhas (reisolamento indireto) e folhas inteiras (reisolamento direto) de <i>P. cupana</i>	45
Figura 8 - Inoculação dos isolados CL1 e CL3 em folhas novas de <i>P. cupana</i> , e câmara úmida após a inoculação, na casa de vegetação. A: Inoculação do isolado CL3 (T2); B: câmara úmida utilizando saco plástico umedecido com água estéril; C: Inoculação dos isolados CL1 e CL3 (T4).....	52
Figura 9 - Inoculação dos isolados antagonistas 1, 2, 3, 4, 5 e do patógeno <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em folhas novas de <i>P. cupana</i> , e câmara úmida após a inoculação, na casa de vegetação. A: Inoculação dos isolados antagonistas; B: câmara úmida utilizando saco plástico umedecido com água estéril.....	54
Figura 10 - Quantidade de isolados de fungos das folhas, ramos e rizosfera de <i>P. cupana</i> nos municípios de Maués e Manaus.....	55
Figura 11 - Armazenamento dos fungos endofíticos em tubos criogênicos pela Técnica de Castellani, em duplicata.....	56

Figura 12 - Exemplos de algumas morfoespécies de fungos endofíticos isolados de folhas, ramos e rizosfera de <i>P. cupana</i>	56
Figura 13 - Teste de antagonismo dos isolados de fungos endofíticos contra <i>C. gloeosporioides</i> , aos 15 dias de inoculação em placa de Petri contendo BDA, na seguinte ordem, da esquerda para a direita: Tipo A: Rz 472, Rz 507, CED 372, Rz 473, Rz 479 e CED 415.....	68
Figura 14 - Teste de antagonismo dos isolados de fungos endofíticos contra <i>C. gloeosporioides</i> , aos 15 dias de inoculação em placa de Petri contendo BDA. Tipo de interação B: CP 272, CE 81, CE 47.....	69
Figura 15 - Folhas de <i>P. cupana</i> com sintomas de antracnose: lesões necróticas nas folhas, de coloração marrom-avermelhada, após 2 semanas da inoculação.....	59
Figura 16 - Macromorfológica dos fungos CL1 - <i>C. gloeosporioides</i> – com o L1E, e também do CL3 - <i>C. fragariae</i> – com o L3C, sendo o L1E e L3C, os fungos endofíticos reisolados das lesões necróticas, após 15 dias de crescimento em meio BDA à temperatura ambiente.	60
Figura 17 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio da extração de DNA dos fungos isolados de <i>P. cupana</i> . Primeira fila: Poços de 1 a 6 – Amostras CL1E; Poços 7 e 8 – Controles do CL1 e CL3, respectivamente; Poço 9 – Marcador molecular; Segunda Fila: Poços de 12 a 17 – Amostras CL3C.	61
Figura 18 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio da amplificação da região ITS do rDNA dos fungos isolados de <i>P. cupana</i> . Poço 1 – marcador de peso molecular de 1Kb (Fermentas); Poço 2 – CL1 (controle); Poço 3 – L1E; Poço 4 – L3 (controle); Poço 5 - L3C.	62
Figura 19 - Análise da qualidade das sequências do fungo controle - CL1 (amostra 8) e do fungo reisolado L1E (amostra 9), via Phred, utilizando a ferramenta PHPH, disponível no site < http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html >.....	63
Figura 20 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio da extração de DNA dos fungos antagonistas. Poço 1 – marcador molecular; Poços 2 e 3	

- 81; Poço 4 – 507; Poço 5 - 272; Poços 6 e 7 – 47; Poços 8 e 9 – 472; Poço 10 – 415; Poço 11 – 479; Poço 12 e 13 – 473 74

Figura 21 - Perfil eletroforético da amplificação da região ITS do rDNA dos isolados em gel de agarose 0,8%, corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Pente superior: **Poço 1** – Marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas); Poços 2 e 3 - 81; Poços 4 e 5 - 272; Poços 6 e 7 – 47; Poços 8 - Marcador de peso molecular; Poços 9 e 10– 472; Poços 11 e 12 – 479; Poço 13 e 14 – 473..... 75

Figura 22 - Gel de agarose de DNA do *Colletotrichum gloeosporioides* (CL3) mostrando as bandas RNA fita dupla (dsRNA), apontadas pelas setas..... 78

Figura 23 - Observação de um micovírus, vírus com genoma de RNA fita dupla (RNAfd), no fungo filamentoso, isolado CL3, *Colletotrichum gloeosporioides*. Imagem de 0,2 µm..... 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade de cafeína nas partes da planta do guaraná (<i>Paullinia cupana</i>), citado por Pires (1949); Maravalhas (1965).....	21
Tabela 2- Efeitos benéficos das associações plantas – endofíticos.....	30
Tabela 3 – Alguns metabólitos secundários de interesse medicinal isolados de fungos endofíticos.....	36
Tabela 4 - Descrição das interações antagônicas de acordo com Badalyan et al. (2002), apresentando três tipos de interações possíveis: A, B e C e quatro sub-categorias: C _{A1} , C _{A2} , C _{B1} e C _{B2}	46
Tabela 5– Protocolo da reação de amplificação do PCR para fungos, distinguindo somente o tipo de iniciador (<i>primer</i>) específico.	49
Tabela 6- Protocolo da reação para a limpeza da reação por meio das enzimas Exonuclease I e Fosfatase Alcalina de Camarão.	50
Tabela 7– Isolados de <i>Colletotrichum</i> e seus respectivos tecidos de origem do guaraná, Maués, AM, 2010.	55
Tabela 8- Índice de antagonismo entre 55 fungos endofíticos do guaraná e os fitopatógenos <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (CL1).....	71
Tabela 9- Endófitos identificados e selecionados para o teste <i>in vivo</i> contra o <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , na casa de vegetação.	73
Tabela 10– Análises das sequências obtidas dos fungos isolados de <i>P. cupana</i> (<i>C. gloeosporioides</i> – CL1 e <i>C. fragariae</i> – CL3) e os seus respectivos reisolados (L1E e L3C), número de nucleotídeos semelhantes ao mesmo número de nucleotídeos dos fungos <i>C. gloeosporioides</i> e <i>C. fragariae</i> armazenado no banco de dados (NCBI), query coverage, e-value e a porcentagem de similaridade de cada fungo avaliado.....	64
Tabela 11– Análises das sequências dos fungos controle <i>C. gloeosporioides</i> (CL1) e <i>C. fragariae</i> (CL3) pela comparação da sequência do mesmo fungo após inoculação e reisolamento no guaranazeiro demonstrando 95% e 98% de identidade, respectivamente.	64
Tabela 12– Comparação da identificação molecular e morfológica dos fungos patogênicos CL1 e CL3.....	65
Tabela 13– Análises das sequências obtidas dos fungos antagonistas isolados de <i>P. cupana</i> , número de nucleotídeos semelhantes ao mesmo número de nucleotídeos dos fungos respectivos armazenados no banco de dados (NCBI), e-value, query coverage e a porcentagem de similaridade de cada fungo avaliado.	76
Tabela 14- Comparação da identificação molecular e morfológica dos fungos antagonistas 47, 81, 272, 415, 472, 473, 479, 507.....	77
Tabela 15 – Sintomas da inoculação <i>in vivo</i> de <i>C. gloeosporioides</i> sem e com micovírus nas folhas jovens de <i>P. cupana</i> . Casa de vegetação da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Manaus – AM.....	
Tabela 16– Sintomas da inoculação, <i>in vivo</i> , de <i>C. gloeosporioides</i> e de fungos endofíticos nas folhas jovens de <i>P. cupana</i> . Casa de vegetação da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Manaus – AM.....	

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1- Análises das sequências do fungo controle <i>C. gloeosporioides</i> (CL1) pela comparação das sequências depositadas no bando de dados Gene Bank, demonstrando taxa de similaridade de 99 % com a espécie do fungo <i>C. gloeosporioides</i>	99
Anexo 2- Análises das sequências do fungo controle <i>C. gloeosporioides</i> (CL1) pela comparação das sequências depositadas no bando de dados Gene Bank, demonstrando a semelhança de 497 dentre 503 bases, o que equivale a 99 % de similaridade com a espécie do fungo <i>C. gloeosporioides</i>	100
Anexo 3- Análises das sequências do fungo controle <i>C. fragariae</i> (CL3) pela comparação das sequências depositadas no bando de dados Gene Bank, demonstrando taxa de similaridade de 95 % com a espécie do fungo <i>C. fragariae</i>	100
Anexo 4 - Análises das sequências do fungo controle <i>C. fragariae</i> (CL3) pela comparação das sequências depositadas no bando de dados Gene Bank, demonstrando a semelhança de 478 dentre 501 bases, o que equivale a 95 % de similaridade com a espécie do fungo <i>C. fragariae</i>	101
Anexo 5– Análises das sequências do fungo reisolado do guaraná - L1E pela comparação das sequências depositadas no bando de dados Gene Bank, demonstrando taxa de similaridade de 95 % com a espécie do fungo <i>C. gloeosporioides</i>	101
Anexo 6– Análises das sequências do fungo reisolado do guaraná - L1E pela comparação das sequências depositadas no bando de dados Gene Bank, demonstrando a semelhança de 484 dentre 507 bases, o que equivale a 95 % de similaridade com a espécie do fungo <i>C. gloeosporioides</i>	102
Anexo 7- Análises das sequências do fungo reisolado do guaraná – L3C pela comparação das sequências depositadas no bando de dados Gene Bank, demonstrando taxa de similaridade de 98 % com a espécie do fungo <i>C. fragariae</i>	103
Anexo 8- Análises das sequências do fungo reisolado do guaraná – L3C pela comparação das sequências depositadas no bando de dados Gene Bank, demonstrando a semelhança de 479 dentre 490 bases, o que equivale a 98 % de similaridade com a espécie do fungo <i>C. fragariae</i>	103

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Objetivo Geral	19
1.1.1 Objetivos Específicos	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 O guaraná (<i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i>): características gerais e a antracnose	20
2.2 O fungo <i>Colletotrichum guaranicola</i> Albuq.	23
2.3 Controle biológico de fungos fitopatogênicos com fungos endofíticos	26
2.4 Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo	32
2.5 Produção de metabólitos secundários de origem microbiana.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Locais de realização da pesquisa	39
3.2 Obtenção dos isolados	40
3.2.1 Coleta do material.....	40
3.2.2 Desinfecção e isolamento dos microrganismos epifíticos e endofíticos	41
3.2.3 Isolamento por fragmentação	41
3.3 Confronto interespecífico <i>in vitro</i>	45
3.4 Identificação dos microrganismos	46
3.4.1 Identificação de fungos pela morfologia	47
3.4.2 Identificação pelo método molecular	47
3.5 Teste de Patogenicidade	42
3.5.1 Inoculação dos Fungos Fitopatogênicos.....	43
3.6 Inoculação <i>in vivo</i>	51

3.6.1 Inoculação <i>in vivo</i> do <i>Colletotrichum</i> com e sem vírus de RNA	51
3.7 Análise Estatística	54
4 RESULTADOS PARCIAIS	55
4.1 Isolamentos de <i>C. gloeosporioides</i> e <i>C. fragariae</i>	55
4.2 Isolamento dos fungos endofíticos do guaraná	55
4.3 Identificação parcial dos fungos endofíticos	56
4.4 Armazenamento dos Fungos Isolados do Guaraná	56
4.5 Estudo do confronto dos isolados contra <i>C. gloeosporioides</i>	58
4.6 Teste de Patogenicidade	58
4.6.1 Reisolamento dos fungos inoculados	58
4.6.2 Identificação molecular dos isolados obtidos no teste de patogenicidade.....	61
4.6.2.1 Extração e amplificação do DNA para o sequenciamento	61
4.6.2.2 Análise das sequências obtidas.....	63
4.6.3 Identificação Morfológica	65
4.7 Identificação dos fungos antagonísticos.....	74
4.7.1 Identificação molecular	74
4.7.1.3 Análise das sequências para identificação dos isolados antagonísticos	76
4.7.2 Identificação morfológica dos isolados antagonísticos	77
4.8 Ocorrência de RNA fita dupla (dsRNA) em <i>C. gloeosporioides</i>	78
REFERÊNCIAS	85
ANEXOS	99

1 INTRODUCAO

O guaranzeiro é uma cultura nativa da Amazônia e muito utilizada pelos povos indígenas, há milênios, devido principalmente às suas propriedades medicinais e estimulantes. Segundo Atroch (2001), no Estado do Amazonas, o guaraná é produzido por pequenos agricultores e também por grandes grupos empresariais, que possuem áreas de plantio variando de 80 a 500 ha. No município de Maués, encontram-se cerca de 2.600 produtores familiares de guaraná que cultivam aproximadamente 3.120 ha de guaranazais.

Atualmente, segundo o Levantamento de Avaliação da Safra de Guaraná em Grãos – Safra 2014, até o mês de abril deste ano, o Estado da Bahia permanece como líder no ranking da produção brasileira com 2.691 toneladas, em 6.719 ha de área colhida. O Amazonas deverá produzir 637 toneladas, o que equivale a menos de 17,9% da produção, de acordo com as estimativas do órgão. O IBGE também lançou a estimativa de produção para os outros Estados produtores de guaraná: Acre (0,1%), Pará (0,3%) e o Mato Grosso (6,3%). A Figura 1 mostra a produção de guaraná dos anos de 2009 a abril de 2014, com destaque para os Estados do Amazonas e da Bahia, os dois maiores produtores de guaraná do Brasil. Além disso, mostra o decréscimo da produção de guaraná no Amazonas e a manutenção da produção no Estado da Bahia.

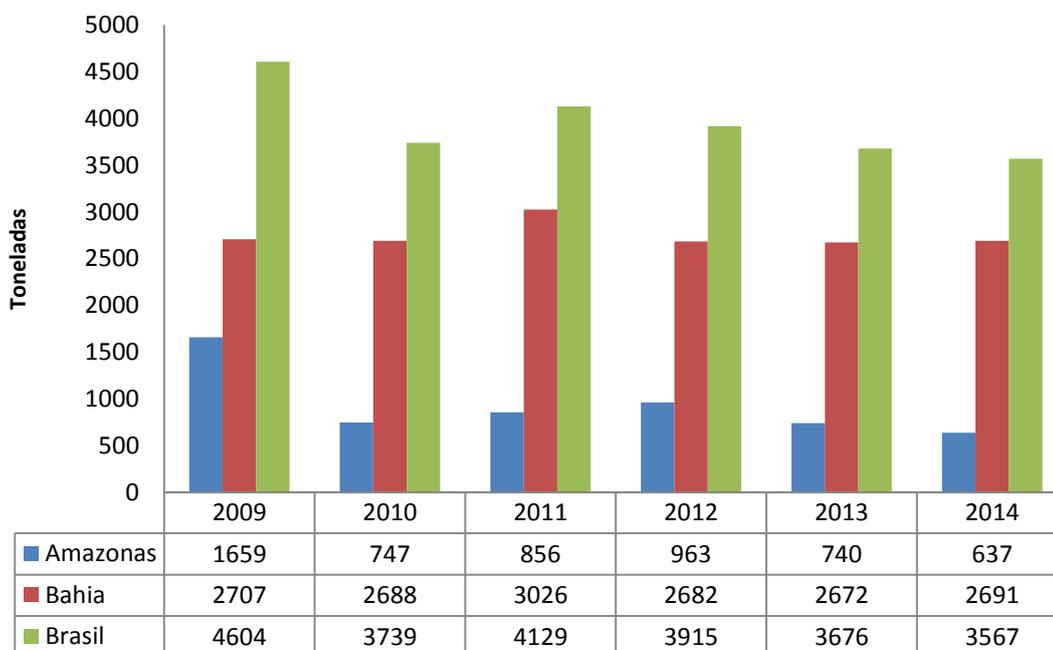


Figura 1 - Evolução da produção do guaraná em grãos (em toneladas). Fonte: IBGE (2014).

Destaca-se a importância econômica do guaraná de Maués, que tem o potencial de alcançar valores em torno de R\$ 4,7 milhões anuais com uma produção de 625 toneladas de sementes de guaraná. Logo, percebe-se sua valorização no mercado nacional e principalmente no europeu, pois o guaraná de Maués é considerado mais “forte” do que o guaraná produzido em outras regiões. Segundo Atroch (2009), até o século XX, o município de Maués foi o maior produtor de guaraná do Brasil. Porém, a produção diminuiu significativamente devido a problemas fitossanitários, doenças causadas por fitopatógenos e o envelhecimento dos guaranazeiros. Esses fatores fizeram com que o Amazonas perdesse o primeiro lugar em produção nacional. Hoje, a produção de guaraná no Amazonas mostra sinais de recuperação como resultado da disponibilidade de materiais genéticos melhorados pela Embrapa e que foram distribuídos aos produtores de guaraná, principalmente em Maués. Entretanto, estudos sobre controle biológico e doenças causadas por fitopatógenos no guaraná ainda são incipientes, principalmente no Amazonas, e ainda mais acentuados com relação à principal doença do guaraná: a antracnose.

No município de Maués, Duarte (1999) comenta sobre epidemias severas de antracnose, registradas em 1959, com o alastramento generalizado da doença no município. Cita também que o fator que mais contribuiu para o ocorrido foi o estímulo ao monocultivo em áreas extensas e contínuas. Atualmente, o patógeno está presente em todas as zonas produtoras deste Estado, onde é muito prevalente e as perdas são mais severas. Ainda, segundo o autor, existem boas perspectivas de solução do problema, devida à alta variabilidade genética existente e à evolução simultânea do hospedeiro e do patógeno. Como já citado, o patógeno não se encontra somente em um determinado local, pois, de acordo com coletas realizadas pelo Laboratório de Fitopatologia do Inpa/Manaus, plantas com sintomas de antracnose já foram encontradas em Boa Vista do Ramos, Manacapuru, Itacoatiara, Rio Preto da Eva, Presidente Figueiredo e Manaus (ASSIS, Comunicação oral, 2012; EMBRAPA).

Nesse contexto, por que estudos sobre controle biológico são importantes?

Segundo Amorim, Rezende e Bergamin (2011), uma preocupação na sociedade em relação aos problemas gerados pelo uso indiscriminado de agrotóxicos (excesso de produtos tóxicos, aquisição de resistência pelos fitopatógenos, contaminações ambientais e riscos à saúde humana) usados no combate aos fitopatógenos e pragas vem surgindo, nos últimos anos, incentivando assim a busca de alternativas sustentáveis e racionais para o controle desses agentes e pragas existentes nas diferentes culturas. Para amenizar a utilização de produtos tóxicos, segundo Romeiro (2007), o mundo ocidental percebeu a incomensurável potencialidade do desenvolvimento de tecnologias específicas para ativação de mecanismos

de defesa biológica como alternativa inteligente ao uso indiscriminado de agrotóxicos. Essas novas tecnologias específicas, em se tratando de controle biológico, referem-se à utilização de fungos no biocontrole pelo fato de alguns microrganismos interromperem algum estágio da doença ou do ciclo de vida do patógeno por meio de diversos mecanismos, tais como: parasitismo, produção de antibióticos e enzimas hidrolíticas, competição por nutrientes e nichos de colonização. Segundo Punja e Utkhede (2003), os diferentes níveis de controle podem ser proporcionados pela prevenção da infecção, redução da colonização, diminuição da esporulação e da sobrevivência do patógeno por meio da utilização de microrganismos antagonistas.

Um desses mecanismos citados pode ser usado no biocontrole da doença mais séria da cultura, que causa danos significativos às plantas e é causada por fitopatógenos do guaraná: a antracnose, que tem como agente causal o fungo *Colletotrichum guaranicola* (ALBUQUERQUE, 1961; NASCIMENTO FILHO et al., 2007). Esse fungo causa lesões necróticas nas folhas jovens com coloração marrom-avermelhada, encrestamento das folhas e necrose (Figura 2).



Figura 2 - Foto dos sintomas da antracnose nas folhas jovens de guaraná, em Maués – Foto: L.A. Assis (2011)

O objetivo do controle biológico de doenças de plantas funciona com a redução de inóculo ou das atividades determinantes da doença realizada por um ou mais organismos, com exceção do homem. Isso acontece naturalmente todos os dias na natureza. Logo, o controle biológico é uma transposição do que já é comum para a manutenção do equilíbrio populacional dos organismos. Por isso, há décadas, é uma área específica bastante estudada. Porém, apesar das grandes pesquisas realizadas, a quantidade de produtos comerciais biológicos específicos para determinadas doenças de plantas em relação aos produtos químicos, de acordo com o número registrado no Ministério da Agricultura, é muito pequeno. Há 113 ingredientes ativos de fungicidas químicos e apenas três “ingredientes ativos biológicos”, dos quais dois são fungos. São eles: *Aspergillus flavus*, *Bacillus pumilus* e *Trichoderma harzianum*.

Hoje, a cada dia, há novas descobertas sobre a importância desses microrganismos, envolvendo principalmente os fungos. Nesse contexto, diversos trabalhos nos remetem ao grande potencial biotecnológico pouco conhecido e a evidências de influência desses microrganismos em diversas características expressas pelas plantas, dentre as quais podem ser citados a produção de hormônios de crescimento, antibióticos, proteção contra herbivoria, produção de corantes, aromas antimicrobianos e principalmente no controle biológico.

Com observações em tudo que citamos, o objetivo desta pesquisa está baseado nas hipóteses seguintes: a) há diversos fungos endofíticos no guaraná que possuem diferentes espectros de antagonismo ao gênero *Colletotrichum*; b) na microbiota endofítica pode ser encontrada uma ferramenta para o controle biológico de *Colletotrichum* spp.

Logo, esse trabalho objetiva estudar o potencial dos fungos endofíticos isolados de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* como possíveis agentes de controle biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum fragariae*, agentes causais da antracnose no guaranazeiro, baseados nas hipóteses citadas acima.

1.1 Objetivo Geral

Verificar o potencial dos fungos endofíticos isolados de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* como agentes de controle biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum fragariae*, agentes causais da antracnose.

1.1.1 Objetivos Específicos

- a) Isolar e selecionar fungos endofíticos das folhas, caule e rizosfera de *P. cupana* com potencial de aplicação no controle da antracnose do guaranazeiro;
- b) Comprovar a patogenicidade do agente causal da antracnose do guaranazeiro, a partir de um estudo de interação entre patógeno e hospedeiro *in vivo*;
- c) Analisar, por meio do teste de pareamento *in vitro*, o teste de antagonismo dos fungos isolados contra *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum fragariae*.
- d) Identificar os fungos endofíticos que mostraram potencial antagônico contra *Colletotrichum* sp., nos modos morfológico e molecular;
- e) Realizar teste de confronto *in vivo* com os fungos endofíticos antagônicos contra o patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): características gerais e a antracnose

Os primeiros registros botânicos constantes da literatura científica sobre o guaraná são de Humboldt e Bompland, os quais no início do século passado coletaram a planta na Colômbia e na Venezuela, e de Kunth, que a descreveu e atribuiu-lhe a denominação *Paullinia cupana*, sendo o nome do gênero uma homenagem ao médico e botânico dinamarquês Tranz Paullini, de acordo com Ferraz (1980).

Em 1826, Martius encontrou a planta no Baixo Amazonas e a descreveu com o nome de *Paullinia sorbilis*, pensando tratar-se de espécie diferente daquela. Somente em 1935, uma nova investigação realizada pelo botânico Adolpho Ducke, na qual comparou-se as amostras encontradas do Alto Rio Negro e na Bacia do Rio Orenoco, na Venezuela, com o material do Baixo Amazonas e percebeu divergências em determinados caracteres botânicos, definindo duas subespécies ou variedades geográficas. Ducke(1937), então, classificou a espécie em duas subespécies ou variedades geográficas:

1. *Paullinia cupana* (Kunth) var. *typica* – encontrada na Colômbia e Venezuela;
2. *Paullinia cupana* (Kunth) *sorbilis* [(Mar.) Ducke] – encontrada na flora brasileira.

Há aproximadamente 195 espécies desse gênero distribuídas na América tropical e subtropical e pelo menos nove espécies do gênero *Paullinia* são descritas como nativas do Brasil, segundo Angelo (2008).

O fruto do guaranazeiro é utilizado há muitas décadas pelos índios Saterê-Mauê, segundo Henman (1986). A planta pertence à família Sapindaceae e é originária da Amazônia, encontrada no sub-bosque da floresta. Seus frutos são pequenos e redondos, negros e brilhantes, em forma de cápsula com apenas uma única semente. Quando madura, abre-se parcialmente, deixando à mostra o pelicarpo de cor castanha, parcialmente coberto por uma substância branca, o arilo (FARIA, 2000).

O mercado atual do guaraná é composto de uma variedade de produtos, dentre os quais destacam-se refrigerantes gaseificados, extratos fluidos e secos, xarope, guaraná em pó e bebidas energéticas, para os quais existe elevada demanda tanto no mercado nacional quanto internacional (ATROCH, 2001; SCHIMPL et al., 2013).

A importância dos frutos do guaraná também deriva da sua composição química e dos efeitos na saúde humana, já relatados em pesquisas anteriores. O primeiro estudo químico no

guaraná pensou-se ter sido executado por Dr. Theodor Martius, farmacêutico, em 1926 (VASCONCELOS, NASCIMENTO e MAIA, 1872). Como resultado, foi encontrado um princípio estimulante, ao qual foi dado o nome de guaranina, que, pelas propriedades, foi considerado isômero da cafeína. Entretanto, Machado (1946), em 1840, Berthelot e Dechastelus, ao analisarem o guaraná, demonstraram que a guaranina descoberta por Martius não era apenas um isômero da cafeína, mas idêntica a esse alcalóide e que havia sido descoberta, primeiramente, por Runge, em 1820. Desde então, inúmeras são as descobertas sobre dados da composição química da amêndoa e da casca da semente do guaraná. A cafeína também pode se encontra em todas as partes da planta, como citado tabela abaixo (PIRES, 1949).

Tabela 1 – Quantidade de cafeína nas partes da planta do guaraná (*Paullinia cupana*), citado por Pires (1949); Maravalhas (1965).

Partes da Planta	Composição (%)
Folhas	1,58
Casca do Caule	1,75
Madeira do Caule	0,19
Amêndoa com Tegumento	2,7 a 3,5

O guaraná é comprovadamente uma das plantas mais ricas em cafeína, alcalóide purínico, identificado como 1,3,7 – trimetilxantina, sendo encontrada a concentração média de 3 a 6 % do peso do fruto. Nos produtos comerciais, esse teor pode ser até quatro vezes maior quando comparado ao encontrado em pó de café. Além da cafeína, o guaraná apresenta também alcalóides como teofilina e teobromina; e taninos em altas concentrações, ácido gálico, saponinas, catequinas, epicatequinas e outros compostos em menor concentração (ANVISA, 1978; SCHIMPL et al., 2013).

Foram observadas várias ações farmacológicas oriundas das metilxantinas sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) e cardiovascular. Produz estimulação cardíaca, além de promover vasodilatação periférica e vasoconstrição craniana. Estimula a musculatura esquelética e o centro da respiração. Além disso, aumenta a secreção ácido gástrica e age como um diurético em curto prazo (WICHTL, 2004).

Vários estudos relatam os efeitos na capacidade cognitiva, desempenho físico e como estimulante, assim como na prevenção do câncer. A ação farmacológica da cafeína confere ao

indivíduo o aumento no estado de alerta e como consequência há a melhora significativa na associação de ideias e nas atividades intelectuais, maior resistência ao cansaço com a diminuição da fadiga física e mental e promove a sensação de bem estar (KENNEDY, 2008). No entanto, estes benefícios só se fazem sentir até um limite de 200 mg de cafeína que, ultrapassado, pode inibir estas capacidades (RANG, DALE e RITTER, 2001).

O Brasil é praticamente o único produtor de guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* [Mart.] Ducke), com exceção de pequenas áreas na bacia do Rio Orinoco, sem cultivo sistemático, da Amazônia venezuelana (SUFRAMA, 2003). No Estado do Amazonas, o município de Maués, em 1985, apresentava uma área plantada de cerca de 9.000 ha (DUARTE, 1995). Mas, é o Estado da Bahia o maior produtor de guaraná, seguido pelos Amazonas e Mato Grosso, como já comentado anteriormente. Essa grande produção é fruto de cultivos sistemáticos e racionais, que combina grandes áreas de monocultivo, irrigação, uso intensivo de defensivos agrícolas e outros fatores. Em pequena escala, o guaraná ocorre nos municípios de Barreirinha, Borba, Itacoatiara, Manacapuru e Urucurituba e nos Estados do Acre, Pará e Rondônia. Apesar da grande área cultivada, a produção do Estado do Amazonas não é suficiente para atender a demanda devido à falta de tecnologia adequada para o cultivo e problemas fitossanitários (BENTES e BARRETO, 2004).

Para a economia regional do Amazonas, o guaraná apresenta bons preços na comercialização e constitui-se numa alternativa para diversificação da agricultura local. Porém, um dos fatores limitantes da produção e a expansão da guaranicultura no Amazonas é a antracnose, doença causada pelo fungo *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque e é considerada a doença mais séria da cultura.

Segundo Albuquerque (1960) e Gonçalves (1968), o fungo, uma vez colonizando o guaraná, apresenta como sintomas nas folhas mais jovens, algumas deformações e enrolamento da lâmina foliar. Nas adultas, o crestamento das margens e, em casos mais severos, necrose total. Estas lesões necróticas nas folhas, de coloração marrom-avermelhada, comprometem o desenvolvimento e a produtividade das plantas, constituindo-se um fator altamente limitante à expansão da cultura do guaraná. Pode ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento das plantas, inclusive em mudas ainda no viveiro. A incidência aumenta no período de maior umidade. No Amazonas, esse período compreende os meses de fevereiro, março e abril, de chuvas abundantes. Logo, é nesse período que a disseminação e germinação dos esporos são favorecidas.

Como medidas de controle da antracnose, Albuquerque (1960) propõe as seguintes: a) inspeção dos guaranazais e eliminação das plantas excessivamente atacadas; b) poda e queima

dos ramos afetados; c) aplicação de fungicidas; d) aplicação de inseticidas para o combate aos insetos disseminadores da moléstia; e) aplicação de misturas de fungicidas e inseticidas compatíveis; f) seleção de indivíduos mais vigorosos e propagação das sementes dessas matrizes; e g) obtenção de variedades resistentes.

Em adição às práticas do campo, a Dra. Simone Possedente de Lira, além de Luciana Mercatti Elias e Andrea Cristina Bogas da Escola Superior de Agronomia da USP, realizaram investigações a respeito do potencial fungitóxico de metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos contra *Colletotrichum* sp. A pesquisadora realizou o isolamento de seis compostos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados de guaranazeiros da Amazônia, a partir de técnicas cromatográficas e avaliação destes compostos quanto à sua atividade antifúngica ao fitopatógeno do gênero *Colletotrichum* sp. Estudos futuros deverão avaliar o composto puro em ensaios *in vitro* e *in vivo*. O resultado dessa pesquisa poderá ser um produto comercial que será mais uma ferramenta para a minimização da antracnose do guaraná.

2.2 O fungo *Colletotrichum guaranicola* Albuq.

O gênero *Colletotrichum* pertence ao filo Ascomycota, ordem Phyllachorales (ALEXOPOULOS, MIMS e BLAKWELL, 1996). Segundo Arx (1957), *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld e Schrenk é a forma teleomórfica ou perfeita desse mitospórico; *Colletotrichum* spp., forma anamórfica ou imperfeita, foi escolhido para representar o estágio conidial. Existem muitas outras espécies desse fungo, as quais, via de regra, recebe o nome do hospedeiro: *C. guaranicola* (guaraná), *C. musae* (banana), *C. graminicola* (gramíneas), entre outras.

O gênero *Glomerella*, em geral representado por suas formas imperfeitas ou conidiais, *Gloesosporium* e *Colletotrichum*, tem grande importância fitopatológica, pois é o principal agente causal da antracnose, doença que determina alterações no limbo foliar em várias frutíferas e outras plantas de interesse comercial. Além da importância econômica, também representa um vasto campo de pesquisa, pois incluem numerosas raças fisiológicas agressivas aos mais variados hospedeiros vegetais (BAILEY e JEGER, 1992; PEREIRA, 2007).

Arx (1974) realizou extensa revisão do gênero *Colletotrichum*, tendo concluído que os fungos anamórficos *Colletotrichum*, *Vermicularia* e *Gloesosporium* pertencem ao mesmo gênero. O conceito de gênero *Colletotrichum* foi então ampliado, embora o número de espécies tenha sido reduzido de centenas para apenas onze. O autor indicou o nome *C.*

gloeosporioides Penz. para a fase conidial de *G. cingulata*. O gênero *Vermicularia* passou a ser considerado uma das 600 sinônimas de *C. gloeosporioides*, enquanto *C. capsici* (Syd. Butl e Bisby) foi redefinido como sinônimo de *C. dematium* (Pers. ex Fr.) Grove, considerado como tendo conídios falcados, com a fase telemórfica *G. tucumanensis* (Speg) v. Arx e E. Muell (PEREIRA, 1995).

Denoyes e Baudry (1995) realizaram estudos para classificar espécies de *Colletotrichum* presentes em morango, considerando a forma e o tamanho dos conídios, a resposta a variações de temperatura e à presença de peritécio. Entre os critérios ensaiados, verificou-se que a forma dos conídios parece ser o melhor dado para discriminar as espécies, como também fora discutido por Gunnel e Gubler (1992). Todas as outras características dos conídios apresentaram grandes variações à medida que as condições ambientais foram alteradas. Como, por exemplo, segundo Barnett e Hunter (1972), o gênero *Colletotrichum* apresenta acérvulo discóide ou em forma de almofada, subepidermal; conidióforos simples, alongados; célula conidial hialina, ovóide ou oblonga. Já de acordo com Alexopoulos et al. (1996), *C. graminicola* produz mucilagem destinada à proteção dos conídios ao dessecação, bem como aos efeitos tóxicos de compostos polifenólicos liberados pelos hospedeiros.

Sutton (1980) adverte que apesar de Arx (1957) ter compactado o gênero *Colletotrichum* em onze espécies, entre as quais algumas formas reconhecidas como *G. cingulata* (*C. gloeosporioides* e como *C. dematium*) com muitas sinônimas para *C. gloeosporioides*, *C. graminicola* (Ces.) Will. e *C. dematium*, o número de taxa está novamente aumentando, em razão de novos estudos e reavaliações. O autor reconheceu que em *C. gloeosporioides*, *C. dematium* e *C. capsici*, a separação dos elementos não poderia ter sido feita àquela época. O autor mantém como espécie *C. capsici*, diferentemente de Arx (1957), que a considerou sinônimo de *C. dematium*.

Quanto à identificação do agente causal da antracnose no guaraná como sendo a espécie *C. guaranicola*, essa foi descrita por Albuquerque (1961). Entretanto, a identidade desta espécie de *Colletotrichum* ainda não é reconhecida pela revisão de Sutton (1992) e por muitas outras citadas no Dictionary of the Fungi (KIRK et al., 2008) uma das mais recentes mais recente do gênero.

Com o objetivo de confirmar a identidade do patógeno agente causal da antracnose, em 2004, Bentes e Barreto reexaminaram as características morfológicas de estruturas reprodutivas e de infecção de *C. guaranicola* através de inoculação. A conclusão da pesquisa revela que o agente causal da antracnose do guaranzeiro não se enquadra em qualquer das

espécies de *Colletotrichum* atualmente descritas na literatura especializada deste gênero, pois *C. guaranicola* difere de outras espécies deste gênero, em relação a características como o tamanho do conídio e do apressório, o tamanho e a forma.

Outras espécies também diferem do fungo em estudo não só pelas características morfológicas, mas também por apresentarem especificidade hospedeira. Até o momento, não foi descrita a ocorrência de *C. guaranicola* em outros hospedeiros, além do guaranazeiro, fato que, segundo os autores, reforça a hipótese de patogenicidade positiva entre *C. guaranicola* e *Paullinia cupana*. Essa especificidade é comentada por Muniz, Santos e Barbosa (1998), quando estudou a variabilidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz & Sacc. e sugeriu a existência de grupos de especialização patogênica. Assim, numerosos casos têm sido reportados, nos quais espécies e biótipos de *Colletotrichum* estão associados a um único hospedeiro (SMITH e BLACK, 1990).

Outra pesquisa que tenta ratificar o agente causal da antracnose como sendo o *C. guaranicola* é citada por Bentes e Matsuoka (2002), que inocularam o patógeno em clones resistentes e suscetíveis com o objetivo de estudar o processo de infecção de *C. guaranicola* nas plantas, por meio de microscopia de luz, com avaliação quantitativa dos eventos de penetração em folhas novas e velhas e constataram que, no clone suscetível, com 48 h após a inoculação, as células da epiderme e do parênquima estavam colonizadas por hifas intra e intercelulares. No quinto dia após a inoculação, observou-se o surgimento dos sintomas. No clone resistente, a colonização só foi observada no quarto dia após a inoculação. Somente no sétimo dia após a inoculação, foram observados os primeiros sintomas típicos da doença.

Esses estudos destacados têm a intenção de tornar mais forte o reconhecimento da espécie *C. guaranicola* como um táxon distinto dentro do gênero *Colletotrichum*.

Bentes e Barreto (2004) descreveram a identificação do *Colletotrichum* sp. coletado das folhas do guaraná como sendo *C. guaranicola*. Porém, o sequenciamento realizado em outras pesquisas (NETO, 2009; FIGUEIREDO et al., 2012) em como será apresentado na presente desta tese de doutorado encontrou duas espécies de *Colletotrichum*: *C. gloeosporioides* e *C. fragariae*. Como comentado anteriormente, a taxonomia do *Colletotrichum* foi recentemente revista e ainda é confusa, por isso, novas pesquisas devem ser realizadas e outras ratificadas para chegarmos a uma conclusão sólida e reconhecida pela taxonomia dos fungos.

2.3 Controle biológico de fungos fitopatogênicos com fungos endofíticos

Segundo Baker e Cook (1974), o controle biológico funda-se na redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, de um ou mais patógenos, realizado por ou através de um ou mais organismos que não sejam o homem. Os autores citados, em 1983, comentam que o controle biológico de enfermidades de plantas por práticas empíricas remonta desde 5.000 a.C., em que os egípcios não combatiam o *Sclerotium cepivorum* em cebola, devido às grandes inundações cíclicas do Rio Nilo, pois esse processo favorecia os antagonistas naturais do patógeno na microbiota do solo. Já os chineses, cerca de 4.000 a.C., costumavam deixar em repouso o solo quando a colheita era pobre. Com isso, intuitivamente, aumentavam as chances de recuperação da microbiota de antagonistas presentes no solo.

No início do século XX, a inserção de antagonistas objetivando o controle biológico deu-se nas décadas entre 1920 a 1940. Hartley (1921) inoculou fungos previamente selecionados *in vitro* em solo de viveiros de mudas de espécies florestais. Esses fungos eram ditos como potenciais antagonistas no controle do tombamento. Já em 1931, Henry selecionou actinomicetos, bactérias e fungos com capacidade de combater *Helminthosporium sativum* no trigo. Com ressalva aos fungos, foi a partir de 1940, que surgiram os primeiros estudos específicos da utilização dos fungos como agentes de biocontrole (BAKER; COOK, 1974, 1983).

Esses experimentos iniciais com o uso de microrganismos no biocontrole ainda não visavam à preocupação e à conscientização da poluição química no meio ambiente, o uso indiscriminado e sem controle dos produtos químicos e os resíduos de pesticidas nos alimentos que atualmente permeia produtores, consumidores e empresários comprometidos com a agricultura. Dentro desse contexto, em que a sociedade e a agricultura moderna chocam-se de frente com patógenos mais resistentes aos fungicidas disponíveis no mercado, o controle biológico eleva-se como uma importante possibilidade para minimizar a quantidade de produtos químicos e conseqüentemente de resíduos tóxicos, podendo ser empregado isoladamente ou como parte do sistema de manejo integrado de doenças.

Na aplicação isolada, o nível de controle obtido pode ser abaixo do necessário para que não ocorram danos à produção. Como solução, a aliança de métodos promove o efeito aditivo ou sinérgico objetivando o equilíbrio e chances de sucesso maiores das medidas de controle. Segundo Redman, Dunigan e Rodriguez (2001), essas outras medidas abrangem

práticas culturais, cultivares resistentes ao patógeno, adequação do hospedeiro às atividades antagônicas de microrganismos e introdução em massa de antagonistas.

Vale ressaltar, para que todo esse ambiente de equilíbrio funcione adequadamente, é necessário entendermos os mecanismos das interações microbianas entre os fungos endofíticos e os patogênicos; não somente destas, mas de todas as relações entre microrganismos. Essas interações advindas do compartilhamento dos microrganismos em um mesmo nicho ecológico acobertam-se de características fundamentalmente competitivas. Essa afirmação parte da premissa de que qualquer organismo vivo é capaz de observar alterações no ambiente em que está e principalmente na presença de outros organismos em sua proximidade, ou seja, é o instinto de sobrevivência. Além disso, todos os organismos estão sujeitos a alterações no ambiente como mudanças na disponibilidade de nutrientes e água, acidez e temperatura.

Assim, para os microrganismos conseguirem se estabelecer e sobreviver nesse ambiente mutante, competitivo e adverso, eles foram capazes de desenvolver recursos de monitoramento e defesa tais como a expressão de seus genes em resposta a sinais e potenciais ameaças do ambiente, inibição do crescimento e multiplicação de outro organismo ou mesmo provocar sua morte, produção de substâncias antimicrobianas, como antibióticos, compostos voláteis tóxicos e enzimas, competição por espaço e por nutrientes, predação. Todas essas armas de inibição são resumidas nos termos antibiose, competição e parasitismo (HANADA, 2006; ROMEIRO, 2007).

A antibiose conceitua-se como a interação entre organismos em que indivíduos de uma população secretam metabólitos capazes de inibir ou impedir o desenvolvimento dos indivíduos de outra espécie. *Trichoderma* é um dos gêneros mais importantes para o controle biológico (ALMEIDA, 2009). Pesquisas comprovam que eles são capazes de secretar 100 diferentes antibióticos com capacidade de inibição sobre várias espécies de fungos patogênicos (BEDENDO, MASSOLA e AMORIM, 2011). Nessa mesma linha, outro gênero importante é o *Penicillium*, que segundo Melo (1999), está entre os produtores mais conhecidos de antibióticos que exercem um papel relevante no antagonismo microbiano.

A capacidade de competir pela ocupação dos locais de infecção do patógeno é atribuída aos microrganismos que atuam como agentes de controle biológico. A competição torna-se eficaz quando o agente controlador é capaz de sobressair-se ao crescimento do patógeno no local da infecção. Então, podemos concluir que os agentes controladores por antibiose também estão no grupo dos que agem por competição.

O último tipo de antagonismo, não menos importante que os anteriores, é o parasitismo. Esse tipo de inibição envolve o aspecto nutricional entre dois seres vivos, em que o parasita obtém todo ou parte de seu alimento a partir e às custas do hospedeiro. Quando o hospedeiro é um fitopatógeno, o parasita é dito hiperparasita, ou seja, o parasita do parasita da planta. Apesar de ser uma arma eficaz teoricamente, os hiperparasitas não são selecionados como agentes de controle biológico para doenças em plantas, pois a eficácia do hiperparasitismo somente é válida antes do aparecimento de sintomas do inóculo e na maioria das vezes, o inóculo é produzido após a formação dos sintomas (BEDENDO, MASSOLA e AMORIM, 2011). Segundo Melo (1999), os hiperparasitas são classificados em dois grandes grupos, com base no modo de parasitismo e nos efeitos sobre o hospedeiro: a) Biotrófico: obtém nutrientes das células hospedeiras vivas e não causam nenhum dano ao hospedeiro; b) Necrotrófico: excretam substâncias tóxicas que matam a célula hospedeira e com isso, utilizam os nutrientes liberados; esse caso também pode acontecer quando, no início, o parasita é um biotrófico e no final, torna-se um necrotrófico.

Nesse conjunto de interações, autores renomados como Clay (1988) e Carroll (1991), em primeiros trabalhos, salientam os fungos endofíticos com alto potencial biológico de induzir resistência a inimigos naturais, devido à produção de micotoxinas ou outras substâncias capazes de alterar a morfologia e a fisiologia do hospedeiro.

A diversidade de microrganismos, incluindo os fungos, reflete de forma completamente direta no potencial de associação desses com os vegetais, os quais podem habitar tanto a sua superfície quanto o seu interior. Dentre esses seres, estão os denominados microrganismos endófitos e epífitos, os quais colonizam, praticamente. Os endófitos habitam o interior das plantas hospedeiras e os epífitos habitam a superfície dos órgãos e tecidos vegetais. Ambos distinguem-se dos microrganismos patógenos, os quais são capazes de causar doenças em plantas. Mendes e Azevedo (2007) citam que praticamente todos os principais grupos de microrganismos convivem com vegetais, mas os fungos e bactérias são os mais comumente encontrados em interações microrganismos-plantas, e, além disso, uma informação de igual valor e muito interessante, é a estimativa do número de células microbianas que vivem em contato com vegetais ser bastante superior ao número de células que formam o próprio hospedeiro (AZEVEDO e ARAÚJO, 2003).

No mais, os números ainda surpreendem, segundo Araújo et al. (2002), dentre quase uma centena de espécies de bactérias e cerca de 1,5 milhão de espécies estimadas de fungos, a grande maioria é constituída por endófitos. Vários estudos apontam características manifestadas pela associação dos endófitos, quão a geração de fármacos (antibióticos e

antitumorais) e outros que produzem fatores de crescimento vegetal, toxinas, hormônios e enzimas e principalmente no controle biológico.

Segundo Schulz (2002), em cada vinte medicamentos relacionados a essa associação planta-microrganismo, seis tem origem fúngica. Por conseguinte, um novo campo de exploração e de novas descobertas biotecnológicas é despertado pelos endofíticos. Em adição, é indispensável à busca a novos fármacos, devido ao uso indiscriminado de diversas drogas e resistência de microrganismos à seleção. E assim, por ainda serem pouco estudados, principalmente os presentes em espécies tropicais, os endófitos surgem como um enorme potencial na descoberta de novos produtos (KUMARESAN e SURYANARYANAN, 2001).

Excluindo os insetos, os fungos constituem os mais numerosos seres vivos existentes. Considerando essa diversidade no mundo, estima-se que exista 1,5 milhão de espécies (HAWKSWORTH, 1991), sendo que dessas, menos de 100 mil, foram descritas. Portanto, é possível que haja um grande número de fungos com potencial biotecnológico, como por exemplo, os com capacidade para a micorremediação. Em adição, inclusive, deve-se levar em conta que a grande diversidade encontra-se em países tropicais, dos quais o Brasil é um dos maiores reservatórios (ESPOSITO e AZEVEDO, 2010).

Os fungos são responsáveis pela produção de importantes ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, pela produção de fármacos, como antibióticos, pela produção de enzimas de interesse industrial e de elevado valor econômico, destacando-se as celulasas, lacases, xilanasas, pectinases e amilases, pelo controle biológico de insetos-pragas da agricultura.

Os endófitos foram descritos pela primeira vez no início do século XIX e diferenciados dos fitopatógenos por Bary, em 1866, e a partir dos anos 70, os endófitos foram inicialmente considerados neutros, ou seja, não causavam benefícios nem malefícios às plantas, mas com o passar do tempo, eles começaram a ser mais bem estudados, despertando grande interesse biotecnológico em decorrência da sua importância na obtenção de produtos bioativos para aplicações na indústria farmacêutica, já citados anteriormente.

Várias definições para os microrganismos endofíticos são encontradas na literatura. Uma das primeiras definições foi citada por Bary (1866) apud Araújo et al. (2008), como microrganismos que colonizam internamente tecidos vegetais. Mais além, a comunidade dos endofíticos foi redescoberta por Darnell, em 1904; e desta data em diante, vários pesquisadores tem otimizado o conceito de endofíticos. Carroll (1986) define endofíticos como microrganismos assintomáticos vivendo no interior das plantas, enquanto que Petrini (1991) os define como microrganismos que habitam, pelo menos por um período do ciclo de suas vidas, internamente, tecidos vegetais sem causar prejuízo aparente em seus hospedeiros.

Wilson e Carroll (1997) sugerem uma definição adicional, considerando endofíticos, fungos e bactérias, que por todo ou parte do ciclo de vida, invadem os tecidos e habitam as plantas, e que causam infecções assintomáticas e não aparentes para a planta hospedeira. Em definições mais completas e recentes, Araújo et al. (2002), Mendes e Azevedo(2008) citam que os endofíticos são aqueles microrganismos cultiváveis ou não, que podem ser isolados do interior de tecidos vegetais desinfectados superficialmente, e que não causam dano ou injúria aparentes ao seu hospedeiro. Mendes e Azevedo (2008) também dividem os endofítios em dois tipos, os que causam formação de estruturas externas como os fungos micorrízicos e actérias fixadoras de nitrogênio formadoras de nódulos e, no segundo tipo, os microrganismos endofíticos que não formam estruturas externas em seus hospedeiros. Nesse conceito, foram incluídos todos os microrganismos que colonizam, cultiváveis ou não, de forma sistêmica ou localizada, o interior de tecidos vegetais e que, em nenhum momento, levam ao desenvolvimento de sintomas relacionados à patogenicidade. Nesse mesmo tempo, esses conceitos omitem as populações microbianas não cultiváveis, as quais, embora possam ter papel importante no desenvolvimento vegetal, são pouco estudadas devido às dificuldades de manipulação.

O papel dos microrganismos endofíticos em associações planta-endófito, nas últimas décadas, tem sido extensivamente discutido. Esses seres colonizam nichos ecológicos similares aos colonizados por fitopatógenos e interações entre esses dois grupos são possíveis, e muitos estudos tem mostrado que os microrganismos endofíticos isolados das superfícies dos tecidos desinfectados das plantas exibem potencial em diversas áreas aplicadas tanto na agricultura quanto na biotecnologia (ARAÚJO et al., 2008; MENDES e AZEVEDO, 2007) como descritas no Tabela 2.

Tabela 2- Efeitos benéficos das associações plantas – endofíticos.

Efeitos benéficos	Referências
a) agentes biocontroladores de bactérias e fungos fitopatógenos, atuando por indução de resistência sistêmica;	Pieterse e Van Loon, 2004 Rubini et al., 2005; Hanada, 2006
b) aceleração do desenvolvimento das plantas e aumento no crescimento;	Mendes et al., 2001 Rodriguez et al., 2007

c) aumento no vigor da planta;	Azevedo; Araújo, 2003
d) tolerância a estresse biótico e abiótico;	Azevedo; Araújo, 2003
e) aumenta tolerância a estresse hídrico;	Azevedo; Araújo, 2003
f) otimiza a utilização do fósforo;	Malinowski e Belesky, 2000
g) produção de fármacos, incluindo novos antibióticos e antifúngicos;	Zhang, Son e Tan, 2006 Sebastianes et al., 2012
h) modificados geneticamente, acrescentando genes específicos para a produção de compostos que possam ser benéficos para a planta, como genes que produzem enzimas ou outros compostos que possam proteger as plantas contra o ataque de pragas e doenças;	Araújo et al., 2007
i) produção de metabólitos secundários de atividade terapêutica;	Zhang, Son e Tan, 2006
j) controle biológico na redução do ataque de insetos pragas;	White e Cole, 1985
l) indicadores de deficiências nutricionais de plantas.	Blodgett et al., 2007

Especificamente com relação ao controle biológico utilizando fungos endofíticos ainda é uma área pouco explorada e de terreno frágil, pela falta de pesquisas direcionadas aos fitopatógenos, em especial aos fungos. A maioria das pesquisas desenvolvidas concentra-se na diversidade, processos de isolamento, caracterização, propriedades e importância dos microrganismos (AZEVEDO et al., 2002). Um exemplo de pesquisa sobre biocontrole com fungos é citado por Almeida (2009) que testou isolados de *Trichoderma viride* quanto à capacidade antagônica aos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum* spp., *Cercospora musae* e

Asperisporium caricae, todos de fruteiras tropicais. O autor constatou que o antagonista colonizou e produziu esporos sobre a maioria das colônias de *C. gloeosporioides*, *C. musae* e *A. caricae*. Além disso, observou a produção de metabólitos fixos e compostos voláteis e não voláteis.

Podemos citar outra pesquisa em que Malathi et al. (2002) investigaram a capacidade de agentes de biocontrole em promover a inativação da toxina sintetizada por *Colletotrichum falcatum*, patógeno da cana-de-açúcar. Os autores utilizaram dois isolamentos de *Trichoderma harzianum*, que foram cultivados em meio contendo a toxina e, posteriormente, tiveram a atividade fitotóxica da cultura monitorada por meio de bioensaios e de detecção de vazamento eletrolítico. Constataram que os isolamentos de *T. harzianum* destruíram completamente a atividade fitotóxica na cultura e as folhas de cana expostas ao filtrado não exibiram sintomas nem aumento na perda de eletrólitos. Essa toxina é uma das mais importantes determinantes de patogenicidade em *C. falcatum* e o biocontrole promovido por esses agentes pode ser explicado por essa capacidade de detoxificação. Segundo Duffy, Schouten e Raaijmakers (2003), esse mecanismo de antagonismo é a degradação de substâncias tóxicas produzidas pelos microrganismos em um dado ambiente. Por exemplo, a cercosporina é uma substância tóxica produzida por espécies de *Cercospora*, um fitopatógeno, contra vários outros microrganismos, sendo também tóxica a plantas e animais (MITCHELL et al., 2003).

Em trabalhos citados por Azevedo et al. (2002), verificou-se que os fungos endofíticos atuam diretamente sobre o patógeno, parasitando suas células e impedindo o surgimento dos sintomas da doença. Normalmente, nesse processo, estão envolvidas as enzimas líticas que degradam a parede celular, assunto que comentaremos em seguida, exterminando o patógeno, além de outros processos já comentados.

2.4 Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo

Um dos mecanismos mais importantes no controle biológico é a grande variedade de enzimas líticas que certos fungos são capazes de produzir para exercer seu antagonismo contra outros fungos, tais como as quitinases, pectinases, glucanases, celulases, lipases e proteases. Esse mecanismo é o micoparasitismo, que se sobressai sobre os demais por ser comum no meio natural. Para que todo esse mecanismo de ação do micoparasitismo funcione de modo eficaz, o processo envolve as seguintes fases: localização, reconhecimento do alvo pelo antagonista, transmissão de sinais que resultam na interação entre antagonista e

fitopatógenos, indução e produção de metabólitos (as enzimas) pelo antagonista e afim, a digestão da célula-alvo. Todas essas fases quanto a duração, presença e importância de cada uma dependem das espécies de fungos que estão na interação, o tipo de micoparasitismo (biotrófico ou necrotrófico) e das condições ambientais presentes (MELO, 1999).

Segundo Romeiro (2007), *Trichoderma harzianum* produz enzimas pectolíticas que degradam a parede de outros fungos e possui o agrupamento gênico *nagl*, que codifica para a síntese quitinases, ao passo que *Fusarium culmorum* e *Fusarium graminearum* produzem a micotoxina deoxinialenol. Para entendermos melhor a ação das enzimas, devemos conhecer a superfície da hifa dos fungos. A parede celular mostra a presença de três matrizes interconectadas: a extracelular ou capsular, a parede e a membrana plasmática. No interior, o citoplasma com uma série de organelas.

A matriz extracelular é formada por substâncias mucilaginosas que tem função de adesão em diferentes grupos de fungos e por diversas enzimas extracelulares. A mucilagem está livre na parede e no meio e pode ser o precursor ou um produto de degradação do β -glucano álcali-insolúvel. A insolubilidade característica do β -glucano é uma forma derivada de sua ligação à quitina (VAN WETTER et al., 2000). A matriz também contém hidrofobinas, que são pequenas proteínas que têm a propriedade de auto-reunião a interfaces hidrofílico/hidrofóbica, formando películas anfipáticas. Sua função está em cobrir o micélio aéreo com essa camada impermeável. Além disso, essas proteínas interferem nos mecanismos de simbiose e parasitismo, de acordo com Bartnichi-Garcia (1999) e já foram encontradas em *Aspergillus niger* e *Penicillium nidulans* (LEITE et al., 2006).

Já a parede celular é constituída de polissacarídeos (80-90%), proteínas, lipídios e carboidratos, sendo responsável pela forma e integridade estrutural do organismo (MORETTI, 2003). Algumas proteínas são enzimas que digerem nutrientes extracelulares ou modificam estruturalmente a parede. Os glucanos constituem um dos polímeros mais importantes, no entanto, a quitina é o maior componente estrutural da parede de *Aspergillus fumigatus* e outros fungos filamentosos (MELLADO et al., 2003). A quitina é um β -glucano, como a celulose e o quitosano, sendo a enzima quitina-sintetase a responsável pela sua síntese.

A parede dos Ascomicetos e Basidiomicetos filamentosos consiste principalmente do complexo (1-3)/(1-6) β -glucano-quitina, (1-3) α -glucano e de glicoproteínas. Há evidências que todos os componentes são expelidos na área da parede como entidades separadas e subsequentemente são modificados (VAN WETTER et al., 2000). As enzimas funcionam como centrais a todos os processos bioquímicos. Atuam em sequências organizadas, catalisam as centenas de reações que degradam passo a passo as moléculas dos nutrientes, conservam e

transformam a energia química, e sintetizam as macromoléculas biológicas a partir dos precursores simples (LEHNINGER, 2006).

A literatura sobre fungos endofíticos e enzimas é vasta. Orlandelli et al., (2011) pesquisou sobre a produção da enzima protease na planta medicinal *Piper hispidum* em 28 fungos e encontraram 9 fungos considerados promissores. El-Diasty e Salem (2007) testaram a atividade proteolítica de 89 isolados dos gêneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Cladosporium* e *Penicillium* em que a produção de protease variou de fraca a forte.

2.5 Produção de metabólitos secundários de origem microbiana

O potencial dos microrganismos como fontes de várias substâncias surgiu desde a descoberta da penicilina por Fleming, em 1928. Desde então, diversos outros fármacos baseados em metabólitos de fungos e bactérias foram descobertos, incluindo os antibióticos antibacterianos – tetraciclina, glicopeptídeos e estreptograminas – antibióticos antitumorais – antraciclina, actinomicinas e mitomicinas – e anti-inflamatórios – ascomicina (BORGES e PUPO, 2006; GUIMARÃES, MOMESSO e PUPO, 2009).

Segundo Demain e Sanchez (2009), os microrganismos são ferramentas promissoras na busca de diversos metabólitos bioativos e, além disso, tem originado relevantes produtos para a indústria farmacêutica, complementando os anteriormente citados: antivirais, imunossupressores, inibidores enzimáticos, inseticidas, herbicidas, antiparasitários e muitos outros compostos.

Dentro desse contexto, há inúmeras pesquisas sobre microrganismos endofíticos – fungos e bactérias, as quais estão pautadas na relação simbiótica entre a planta e o endofítico. Essa simbiose está baseada na exploração mútua através da proteção, alimentação e transmissão do fungo que produz substâncias que contribuem para o aumento no crescimento, reprodução e resistências do hospedeiro ao meio ambiente (SAIKKONEN et al., 2004). Os mesmos autores citam, ainda, que há a hipótese de um equilíbrio entre o poder de virulência do fungo e a defesa da planta, o que caracterizaria a interação fungo-planta hospedeira e caso esse equilíbrio seja perturbado, ocorreria a diminuição da defesa da planta ou o aumento da virulência do fungo.

Com isso, muitos dados na literatura reportam o potencial desses microrganismos na produção de metabólitos secundários. Um dos mais relevantes trabalhos foi relatado por Stierle, Strobel e Stierle (1993), o qual fez emergir ainda mais o interesse biotecnológico para o imenso potencial dos microrganismos endofíticos, quando comprovou a produção de

compostos de interesse medicinal obtidos de fungos endofíticos, como por exemplo, o taxol, um complexo diterpenóide, produzido por *Taxomyces andreanae*, endófito da planta *Taxus brevifolia*, é atualmente alvo de estudos para sua produção em escala industrial. O taxol também é produzido por outros fungos endofíticos, tais como o *Pestalotiopsis microspora*, *Periconia* sp., *Tubercularia* sp. e *Trichothecium* sp. (STROBEL, 2003). Outro relato importante foi realizado por Yang et al., (2004), o qual mostra o isolamento da substância anticancerígena, vincristina, a partir de outro fungo endofítico, *Mycelia sterilia*, isolado de folhas de *Catharanthus roseus*.

Estudos com plantas tropicais da Amazônia têm também sido relatados por Souza et al. (2004) analisando a atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de duas espécies de plantas tóxicas da Amazônia, a *Pausicorea longiflora* e a *Strychnos cogens*.

Outros casos de interação, em geral simbiótica, entre fungos endofíticos e plantas têm sido descritos. É também interessante citar que outros produtos de interesse biotecnológico, como enzimas - amilases, celulases, proteases, lipases, quitinases -, e muitas outras têm sido encontradas a partir de endófitos, o que os tornam excelente material de trabalho do ponto de vista aplicado.

Muitas outras plantas têm sido pesquisadas nesse sentido fazendo supor que algumas das propriedades dessas plantas provêm de seus microrganismos endofíticos ou pelo menos de um sinergismo entre endófito e hospedeiro. Esse fato revela a potencialidade da exploração dos endófitos com fonte inesgotável de metabólitos secundários de interesse aplicado. Um exemplo valioso disso é a pesquisa desenvolvida com o *Muscodor albus*, uma nova espécie de fungo endofítico isolado da canela (*Cinnamomum zeylanicum*), que demonstrou ser capaz de inibir e até exterminar outros fungos e bactérias pela produção de cinco tipos diferentes de compostos metabólitos voláteis (STROBEL et al., 2001).

Um dos estudos sobre metabólitos de fungos endofíticos idênticos aos do hospedeiro são demonstrados pelos compostos anticancerígenos podofilotoxina obtido a partir do endofítico *Trametes hirsuta* associado ao hospedeiro *Podophyllum hexandrum* (PURI et al., 2006). Diante deste cenário, autores consideram que os endófitos ainda são um grupo de microrganismos pobremente estudado e que representam uma fonte abundante de compostos químicos e bioativos com potencial para a aplicação nas áreas médica, agrônômica e industrial (STROBEL e DAISY, 2003), como descritos na Tabela 3.

Adicionalmente, o estudo de endófitos, baseado no isolamento a partir de plantas de florestas tropicais e caracterização de produtos naturais, tem sido proposto para inúmeras pesquisas (STROBEL e STROBEL 2007; WIYAKRUTTA, 2004).

Tabela 3 – Alguns metabólitos secundários de interesse medicinal isolados de fungos endofíticos.

Fungo endofítico	Metabólito secundário	Referências
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Asperfumoidina – inibe a crescimento de <i>Candida albicans</i>	Liu et al., 2004
<i>Aspergillus niger</i>	Aurasperona A – inibe células cancerígenas do cólon e antimicrobiana	Songet al., 2004
<i>Phoma medicaginis</i>	Brefeldina A - tem ação antibiótica e inibidora de apoptose em células cancerígenas	Weber et al., 2004
<i>Phomopsis</i> spp.	Fomol – antifúngica, antibacteriana e anti-inflamatória	Weber et al., 2004

Pileggi (2006) avaliou a atividade antimicrobiana de treze linhagens do fungo *Phomopsis* sp. isoladas endofiticamente de folhas de *Aspidosperma tomentosum*, conhecida popularmente como Peroba-do-Campo e, de pecíolos de *Spondias mombin*, conhecida popularmente como Cajamanga. Do total, três linhagens se mostraram capazes de inibir bactérias, leveduras e fungos filamentosos, mostrando o grande potencial deste fungo como fonte de produtos bioativos.

Lu et al. (2008) detectou a presença de uma nova cepa produtora de natamicina e sua aplicação como agente de controle biológico de doenças fúngicas, após constatar forte efeito inibitório contra vários fungos patogênicos para as plantas, como *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Monilia laxa*. A cepa foi identificada como sendo *Streptomyces lydicus*. Estudos recentes revelam que bactérias endofíticas promovem o controle biológico, resultado de vários fatores como a produção de antibióticos. A presença de bactérias endofíticas do gênero *Pseudomonas* com atividade sobre os patógenos *Achylya klebisiana* e *Phytophthora spinosum* foi pesquisada em arroz, segundo Adhikari et al. (2001). Outro estudo constatou que a comunidade endofítica da batata revelou a alta incidência de isolados que apresentam antibiose ao fungo patogênico *Rhizoctonia solani* (STURZ, CHRISTIE e MATHESON, 1998).

Braga e Spessoto (2008) isolaram e caracterizaram, morfológicamente, bactérias endofíticas de diferentes órgãos vegetais da planta medicinal *Cordia verbenacea*, conhecida como erva-baleeira. Esses isolados foram testados quanto à habilidade de inibir o crescimento dos patógenos humanos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* enteropatogênica, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Shigella* e *Salmonella*. Uma linhagem endofítica com capacidade antimicrobiana foi, ainda, cultivada em meio de cultura líquido para a extração de metabólitos utilizando diferentes solventes orgânicos. Posteriormente, os extratos foram testados quanto à atividade antimicrobiana *in vitro*, utilizando-se a técnica de antibiograma. No total, foram isoladas 116 bactérias endofíticas, agrupadas em cinco grupos morfológicos e 85% delas foram caracterizadas como sendo Gram-positivas, 15 das bactérias endofíticas apresentaram atividade antimicrobiana para todos os patógenos testados, exceto no caso da *E. coli* enteropatogênica. Os metabólitos extraídos e concentrados foram capazes de inibir, de maneira diferenciada, os patógenos *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. mirabilis*, *Shigella*, *Salmonella* e *E. coli*.

Borges et al. (2009) citam uma variedade de novos compostos e substâncias bioativas isoladas recentemente de fungos endofíticos. E avança ainda mais quando comenta a contribuição desses como agentes de biotransformação, o que nos traz valiosa informação para processos biotecnológicos na obtenção de moléculas biotransformadoras, das quais há uma dificuldade de obtenção a partir da síntese convencional em laboratório.

Guimarães (2009), em ensaios antimicrobianos, citotóxicos e enzimáticos, obteve 13 substâncias puras a partir do fungo *Guignardia mangiferae* isolado de folhas de *Viguiera arenaria*, sendo cinco inéditas na literatura. Esse estudo corrobora com outras inúmeras pesquisas sobre a diversidade química obtida a partir de fungos endofíticos.

Muitos esses trabalhos demonstram, também, que propriedades medicinais de certas plantas podem estar relacionadas com metabólitos que são produzidos por microrganismos endofíticos. Nessa abrangência, segundo Azevedo et al. (2002), a diversidade de metabólitos secundários, produzidos por um único microrganismo endofítico, ainda não foi estimada, mas a expectativa é que seja alta, dada a conhecida versatilidade adaptativa dos fungos.

Como mais um exemplo, além dos já citados, o fungo filamentosso *Colletotrichum* é um gênero formado por espécies fitopatogênicas responsáveis por grandes perdas econômicas em todo o mundo. Representantes desse gênero foram isolados de várias plantas, entre elas da *Artemisia annua*, uma erva medicinal chinesa da qual é extraída a droga antimalárica artemisinina. Por meio desta pesquisa, demonstrou-se a síntese de, pelo menos, 11 compostos – o alcalóide ergot e alguns derivados, o hormônio de crescimento vegetal ácido indol-acético

(IAA) e três novos metabólitos – dos quais a grande maioria exibiu atividade *in vitro* contra bactérias e fungos. Como a *A. annua* é uma planta altamente resistente a insetos e patógenos, acredita-se que essa característica possa ser conferida, pelo menos em parte, pelos compostos produzidos pelo endofítico *Colletotrichum* (LU et al., 2000; PEREIRA, AZEVEDO e PETRINI, 1993). E qual a influência da produção desses metabólitos secundários encontrados nesses microrganismos endofíticos? Segundo Azevedo et al. (2002), a produção está intimamente relacionada com a situação fisiológica do hospedeiro e os fatores bióticos e abióticos. A maioria dos microrganismos endofíticos coloniza os espaços apoplásticos entre as células vegetais, de onde retiram água e nutrientes necessários ao desenvolvimento. Fatores ambientais podem alterar as condições internas da planta, levando a uma mudança do ambiente ao redor do endofítico. Este, por sua vez, tem que se adaptar para sobreviver nas novas condições e para isso, produzem compostos que irão atuar nesse processo de adaptação.

Nesse contexto, fungo e bactérias endofíticas são fontes naturais do interesse acadêmico e industrial para a busca de novas substâncias, principalmente em regiões de elevada biodiversidade como a Amazônia, já que a maioria das pesquisas referem-se aos microrganismos isolados em regiões temperadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

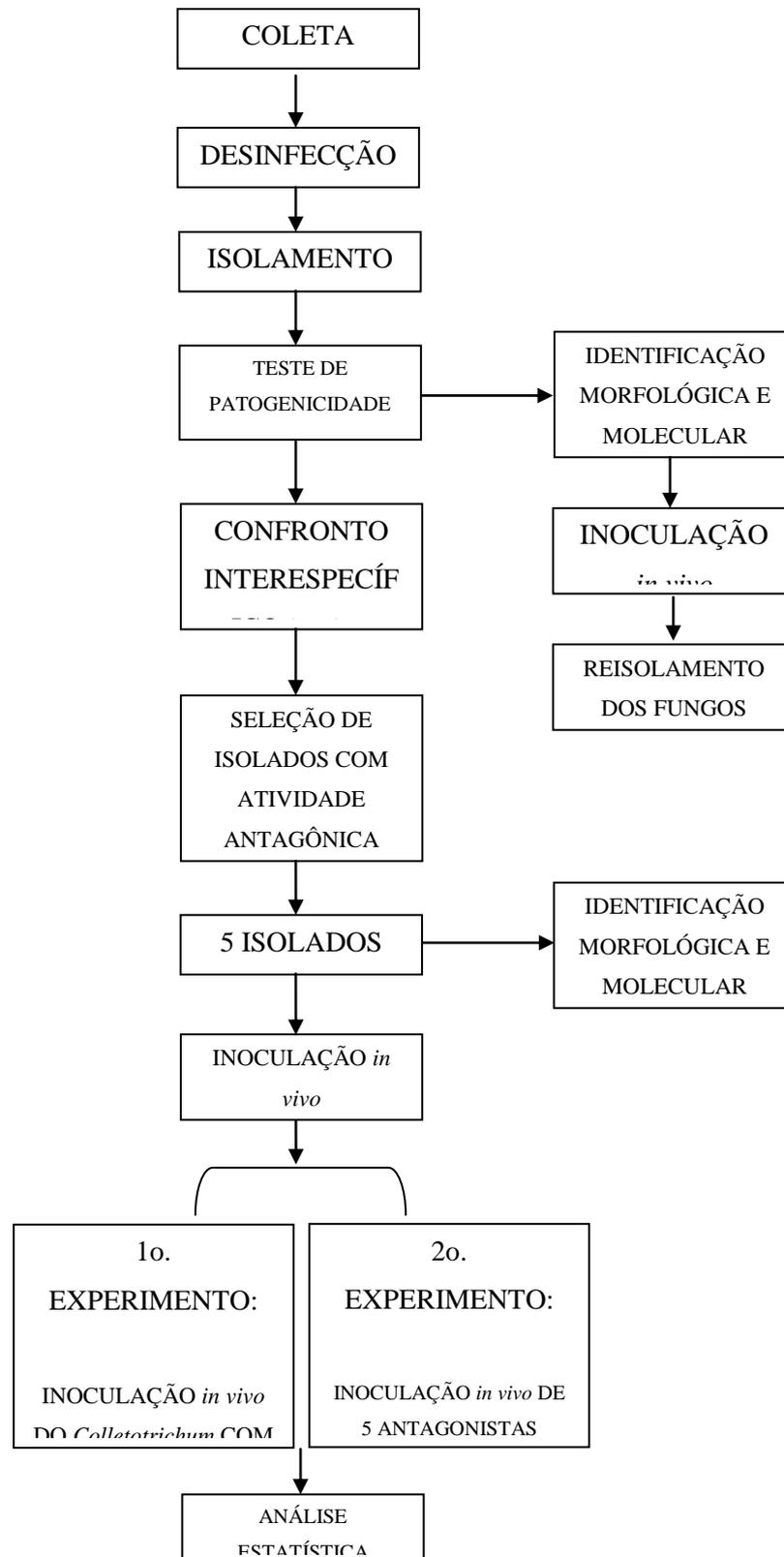


Figura 3 – Fluxograma das etapas da pesquisa intitulada “Potencial biotecnológico dos fungos endofíticos do guaraná (*Paulliniacupana* var. *sorbillis*) no controle biológico da antracnose”.

Para melhor entendimento, elaboramos um fluxograma das principais etapas realizadas na Metodologia (Figura 3). Cada etapa está descrita a seguir.

3.1 Locais de realização da pesquisa

A pesquisa foi realizada nos seguintes laboratórios: Laboratório de Tecnologias de DNA Recombinante (Biotecnologia), Laboratório de Bioativos, ambos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM; no Laboratório de Fitopatologia/Coordenação de Ciências Agrária do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA e na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ, Laboratório de Genética, em Piracicaba – SP.

3.2 Obtenção dos isolados

3.2.1 Coleta do material

As amostras foram coletadas em Manaus, na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas – UFAM(03°22' S e 57°42' O), localizada no km 38 (Manaus-Itacoatiara) e na Fazenda Santa Helena, em Maués (03° 06' S e 60° 01' O), município do Estado do Amazonas (Figura 4).



Figura 4 - Área de coleta na Fazenda Santa Helena, Maués, Amazonas. Detalhe do campo de *Paullinia cupana*. Foto: Mendes, L. (2010).

Para esta pesquisa, foram coletadas pelas equipes da Universidade Federal de Manaus (UFAM) e Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) em projeto financiado pelas Fundações de Amparo a pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e do Estado de São paulo (FAPESP) plantas adultas de *Paullina cupana*, que apresentavam ou não sintomas de antracnose. Em seguida, as amostras foram colocadas em sacos de papel, sendo então transportadas para o Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM) na Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Os fungos *Colletotrichum* sp. utilizados para essa pesquisa, denominados CL1 e CL3, e depois identificados como *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum fragariae*, respectivamente, foram isolados de folhas de guaraná do município de Maués, na primeira coleta realizada em junho de 2010.

3.2.2 Desinfecção dos microrganismos endofíticos

Após a coleta, folhas, ramos e rizospera foram tratadas segundo a metodologia de Araújo et al. (2002), com álcool 70% (1 min.), hipoclorito de sódio 2% (3 min.), álcool 70% (30 seg.) e enxágue em água destilada e esterilizada por duas vezes. Para se ter certeza de que apenas microrganismos endofíticos foram isolados, a última água de lavagem foi distribuída sobre os meios de cultura utilizados e as placas incubadas. Ambos os isolamentos foram realizados por fragmentação, técnica explícita abaixo.

3.2.3 Isolamento por fragmentação

Para o isolamento, as folhas foram cortadas assepticamente em fragmentos de 5 a 7 cm e distribuídos na superfície do meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), acrescido de terramicina (50 µg/ml), tetraciclina (50 µg/ml) ou estreptomina (50 µg/ml), para a inibição do crescimento de bactérias. Todas as placas foram incubadas a 28°C. Diariamente, as placas foram observadas e analisadas quanto ao crescimento dos fungos (Figura 5).



Figura 5 - Fragmentação de folhas de *P. cupana* e as emissões de hifas de fungos endofíticos.

Quando os fungos iniciaram seu crescimento, as colônias foram repicadas para tubos de ensaio com o meio de cultura BDA inclinado e, em seguida, submetidas novamente à incubação, identificados com o número da planta e do fragmento disposto na placa. Em seguida, os tubos foram incubados à temperatura ambiente e submetidos a fotoperíodo de 12 horas sob luz fluorescente para estimular a esporulação e assim, facilitar uma pré-identificação. Depois das colônias purificadas, os fungos foram armazenados em tubos criogênicos utilizando o método de Castellani(1967), em duplicata, etiquetados com data de armazenamento e código.

3.3 Teste de Patogenicidade

Para a realização do teste de patogenicidade, dois isolados de fungos do gênero *Colletotrichum*. Logo, após o isolamento, dois isolados foram identificados no modo morfológicamente e foram inoculados em folhas de guaraná com o objetivo de causar a antracnose na planta, e assim, os confirmá-los como agentes causais da doença. Com a confirmação da doença, os dois isolados foram identificados morfológica e molecularmente (ver resultados) e novamente foram inoculados em folhas de guaraná e reisolados.

Assim, o teste de patogenicidade comprovou que os isolados *Colletotrichum fragariae* e *Colletotrichum gloeosporioides*, coletados nas folhas do guaraná, são agentes causais da antracnose no guaraná.

3.3.1 Inoculação dos isolados *Colletotrichum fragariae* e *Colletotrichum gloeosporioides* nas folhas de guaraná.

A inoculação teve o objetivo de estabelecer de forma artificial uma doença na planta. Consistiu basicamente na transferência de quaisquer estruturas infectivas do patógeno. Para isso, esse processo consistiu de quatro fases: 1) obtenção do inóculo, o preparo e a deposição do inóculo na superfície do hospedeiro; 2) incubação; 3) colonização; e 4) expressão dos sintomas e sinais.

A técnica utilizada foi a inoculação com cilindros de cultivos artificiais contendo micélio do patógeno, conforme descrita por Alfenas e Ferreira (2007). Essa técnica consiste em colocar sobre o órgão da planta a ser inoculado, discos de cultivo artificial contendo micélio do patógeno com ou sem estruturas reprodutivas. Para esse experimento, foram usados os fungos *Colletotrichum fragariae* e *Colletotrichum gloeosporioides* com 21 dias de crescimento em BDA e três mudas de guaraná que apresentaram folhas novas. Os discos foram feitos com auxílio de extratores de discos de 7 mm. Em seguida, os discos foram colocados sobre as folhas das mudas de guaraná conforme os seguintes tratamentos: a) folha com feridas e sem feridas, inoculando o fungo *Colletotrichum fragariae*; b) folha com feridas e sem feridas, inoculando o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*; c) testemunha (sem inoculação).

Após a inoculação, as folhas inoculadas foram isoladas das demais plantas com uma proteção plástica em câmara úmida por 48 horas, evitando desta forma, contato entre plantas inoculadas com isolados diferentes (Figura 6) esperando-se o surgimento dos sintomas nas folhas para posteriormente reisolar o mesmo fungo inoculado.



Figura 6 - Inoculação dos fungos *Colletotrichum fragariae* e *Colletotrichum gloeosporioides* nas folhas de guaraná com e sem feridas feitas com agulha esterilizada. Foto: T. Esashika (2012).

3.3.2 Reisolamento dos Fungos Inoculados

Após o surgimento dos sintomas de antracnose nas folhas inoculadas com fragmentos de *Colletotrichum fragariae* e *Colletotrichum gloeosporioides*, o reisolamento dos fungos endofíticos fitopatogênicos foi realizado. Foram utilizadas as técnicas de reisolamento direto, em que as folhas inteiras foram postas em câmara úmida na placa de Petri com papel úmido e assim, a emissão da esporulação foi observada após 24 horas e coletada a massa alaranjada para uma placa de Petri com meio de cultura BDA (Figura 7).



Figura 7 - Placas de Petri com fragmentos de folhas (reisolamento indireto) e folhas inteiras (reisolamento direto) de *P. cupana*. Foto: T. Esashika (2012).

3.4 Confronto interespecífico *in vitro* e avaliação dos fungos endofíticos contra os patógenos *C. fragariae* e *C. gloeosporioides*.

Primeiramente, realizou-se uma pré-seleção a partir dos 522 fungos isolados em confronto direto com os patógenos *Colletotrichum fragariae* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Os fungos que apresentavam algum tipo de antagonismo foram selecionados e novamente submetidos ao confronto direto com o *Colletotrichum gloeosporioides*, pois foi o patógeno que apresentou resultados melhores na pré-seleção.

Dos 522 fungos, 55 endófitos apresentaram efeito antagônico significativo, e esses foram submetidos, novamente, ao teste de pareamento contra *Colletotrichum gloeosporioides*, conforme metodologia modificada de Badalyan, Innocenti e Garibyan (2002).

Após o período propício para o crescimento dos fungos selecionados para os testes, discos da cultura de 5 mm de diâmetro, contendo micélio dos isolados foram cortados dos microrganismos selecionados tanto dos antagônicos quanto dos testadores e transferidos para novas placas com meio de cultura BDA, sendo que cada disco de microrganismo selecionado para o teste foi colocado de lados extremos das placas de Petri a 1 cm da borda da placa. O teste foi realizado em triplicata. Como testemunha, usou-se o patógeno cultivado isoladamente, colocando-se um disco de micélio no centro de cada placa. Desta forma, com o crescimento dos dois microrganismos, observamos a ocorrência da inibição de alguns dos fungos selecionados, após 7 e 15 dias em câmara climatizada a 28 °C. As avaliações foram determinadas pelo crescimento radial por meio da medição do diâmetro das colônias dos patógenos, utilizando-se de uma régua milimetrada e medindo-se os três raios partindo do disco de micélio até as bordas da placa tirando-se a média e também o raio do patógeno em direção ao antagonista.

Assim, o crescimento radial foi usado para o cálculo do Índice de Antagonismo (IA) dos isolados que apresentaram inibição, de acordo com Campanile, Ruscelli e Luisi (2007):

$$IA = \frac{(RM - rm)}{RM} \times 100$$

Onde: RM é a média dos três raios da colônia do antagonista em outras direções;
rm é o raio da colônia do fungo endofítico em direção ao antagonista.

As interações competitivas entre endófitos e o patógeno foram baseadas na escala de Badalyan (BADALYAN, INNOCENTI, GARIBYAN, 2002), descrita na Tabela 4.

Tabela 4- Descrição das interações antagônicas de acordo com Badalyan, Innocenti, Garibyan (2002), apresentando três tipos de interações possíveis: A, B e C e quatro sub-categorias: C_{A1}, C_{A2}, C_{B1} e C_{B2}.

Interações antagônicas	Descrição
A	Formação de barreira (<i>deadlock</i>) com contato micelial
B	Formação de barreira (<i>deadlock</i>) sem contato micelial, à distância
C _{A1}	Crescimento parcial do endófito sobre o fitopatógeno depois da formação de barreira inicial (<i>deadlock</i>) com contato micelial
C _{A2}	Crescimento completo do endófito sobre o fitopatógeno depois da formação de barreira inicial (<i>deadlock</i>) com contato micelial
C _{B1}	Crescimento parcial do endófito sobre o fitopatógeno depois da formação de barreira inicial (<i>deadlock</i>) sem contato micelial
C _{B2}	Crescimento completo do endófito sobre o fitopatógeno depois da formação de barreira inicial (<i>deadlock</i>) sem contato micelial

Após o confronto interespecífico *in vitro*, foram selecionados oito isolados que apresentaram atividade antagônica significativa. Esses oito isolados foram identificados morfológica e molecularmente. Em seguida, dos oito isolados, cinco deles foram selecionados para a serem usados na inoculação *in vivo* contra o *C. gloeosporioides*. Os isolados foram identificados morfológica e molecularmente.

3.5 Identificação dos isolados endofíticos e patógenos

3.5.1 Identificação de fungos pela morfologia

A identificação morfológica foi realizada pela Micoteca URM604 da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) com o auxílio da curadora Dra. Cristina Maria de Souza Motta. A partir do teste de antagonismo, os oito fungos, que apresentaram algum tipo de inibição foram selecionados para, posteriormente, serem identificados em nível de gênero ou espécie, baseados nas características morfológicas e por meio de análises moleculares. A análise morfológica consistiu na atribuição de cores exibidas pelo micélio do fungo quando crescido em meio BDA à 28°C. Os fragmentos das colônias fúngicas foram corados em lactofenol azul-de-algodão e analisados em microscópio óptico para a observação de estruturas reprodutivas, de resistência ou análise da morfologia das hifas (grampos de conexão, septação). As estruturas observadas foram comparadas com as estruturas descritas na literatura, conforme Arx (1974), Barnett e Hunter (1972) e Hanlin; Menezes (1996).

3.5.2 Identificação pelo método molecular

3.5.2.1 Extração de DNA cromossomal total de fungos filamentosos

A fim de complementar a identificação dos fungos do teste de patogenicidade e dos fungos que mostraram atividade antagônica, utilizou-se o método para a extração de DNA fenol/clorofórmio. Após o crescimento do fungo em meio líquido, o meio de cultura foi filtrado em funil de Buchner em papel filtro e separado do micélio. Em seguida, o micélio foi triturado com pistilo e almofariz de porcelana com auxílio de nitrogênio líquido até formar uma pasta homogênea. Essa pasta foi transferida para um tubo eppendorf identificado, no qual acrescentou-se 1 ml de tampão de extração (SDS 10%, EDTA 0,5M, H₂O Miliq, TRIS-HCl pH 8, NaCl 5M). Os tubos foram incubados em banho-maria a 70°C por 1 hora. Depois desse período, as amostras foram retiradas do banho-maria e centrifugadas por 10 minutos a 10.000 xg. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado em um novo tubo eppendorf, indicando volume aproximado de 1 ml. No novo tubo com o sobrenadante, adicionou-se fenol na mesma quantidade do sobrenadante. Os tubos foram agitados levemente para misturar o fenol à amostra. Depois de homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 xg. Novamente, o sobrenadante foi coletado cuidadosamente e posto em novo tubo eppendorf. Ao tubo com sobrenadante, adicionou-se a mesma quantidade do sobrenadante de clorofane (clorofórmio e fenol na proporção 1:1). Depois de adicionado o clorofane, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 xg. Novamente, o sobrenadante foi coletado em um novo tubo eppendorf e ao mesmo volume do sobrenadante, foi adicionado

clorofil (clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1). Em seguida, o sobrenadante foi coletado cuidadosamente e posto em novo tubo eppendorf. Depois de adicionado o clorofil, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 xge a sobrenadante foi coletado em novo tubo eppendorf. Para precipitar o DNA, em cada amostra, ao seu sobrenadante foi colocado 60% do seu volume de álcool etílico e 30% de seu volume de NaCl 5M. Depois, todas as amostras foram homogeneizadas levemente e colocadas no congelador a -20° C por 10 minutos. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 10.000 xg. Em seguida, o sobrenadante de cada amostra foi descartado com muito cuidado para que o sedimento não fosse também descartado. A fim de limpar de modo mais completo o sedimento, adicionou-se 300 µl de álcool etílico 70% em cada amostra e retirado em seguida. Depois desse processo, todos os tubos permaneceram secando por 1 hora a 37°C. Após a secagem, aos tubos foram adicionados de 300 a 600 µl de TE, dependendo da viscosidade do líquido. As amostras foram estocadas no congelador a -20°C.

3.5.2.2 Quantificação do DNA

Para verificar a extração e estimar a concentração de DNA, foram colocados 5µl do DNA genômico e 5µl de tampão TBE de amostra em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio 10mg/mL. Foi realizada a fotodocumentação das imagens com auxílio de transluminador com luz ultravioleta.

3.5.2.3 Amplificação do DNA pela reação de PCR

As amostras de DNA genômico extraídas foram submetidas à Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) para a amplificação das regiões ITS do rDNA com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4.

ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3')

ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3')

A reação de amplificação de PCR foi realizada conforme o protocolo descrito na Tabela 5, sendo o volume final de 25 µL:

Tabela 5– Protocolo da reação de amplificação do PCR para fungos, distinguindo somente o tipo de iniciador (*primer*) específico.

Reagentes	1 Reação (µL)	Concentração
Água deionizada autoclavada	7,7	---
Tp 5X	5,0	1x
MgCl ₂ 25mM	2,5	2,5 mM
dNTP 2,5mM	2,5	2,5 mM
Primer(F) 5 pmoles/µL	1,0	0,2 µL
Primer2(R) 5 pmoles/µL	1,0	0,2 µL
Taq 5U/µL	0,3	1,5 U
DNA 10ng/µL	5,0	
Total	25,0	

A quantidade de DNA utilizado para a reação de PCR foi de 50 ng de DNA.

O programa utilizado teve o seguinte perfil de temperatura:

- 1- Desnaturação inicial: 95°C por 2 minutos;
- 2- Desnaturação: 94°C por 40 segundos;
- 3- Anelamento dos *primers*: 60°C por 1 minuto;
- 4- Extensão da fita: 72°C por 2 minutos;
- 5- Repetição das etapas de 2 a 4 em 35 ciclos;
- 6- Extensão final: 72°C por 5 minutos; e
- 7- 4°C daí em diante

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% por cerca de uma hora e em seguida, corados por 20 minutos com brometo de etídio 1%.

3.5.2.4 Sequenciamento do DNA por PCR ExoSAP

As enzimas Exonuclease I e Fosfatase Alcalina de Camarão foram utilizadas para limpar a reação de PCR de restos de *primers* que não foram incorporados ao DNA. Essa reação de limpeza teve como volume final 28 μl para cada amostra: 20 μl da amostra + 8 μl de ExoSAP (para cada 5 μl da amostra, colocou-se 2 μl de ExoSAP). (Exonuclease I + Fosfatase Alcalina de Camarão).

O programa seguiu as seguintes condições de ciclagem:

1. Incubação a 37 °C por 15 minutos;
2. Inativação com ExoSAP a 80 °C por 15 minutos.

Em seguida, para a reação de sequenciamento, 8 μl do Mix (H_2O , *Primers* e BigDye) foram adicionados a 2 μl de DNA, com os reagentes listados na Tabela 6:

Tabela 6- Protocolo da reação para a limpeza da reação por meio das enzimas Exonuclease I e Fosfatase Alcalina de Camarão.

Reagentes	1 Reação (μL)
Água deionizada autoclavada	3,7
Tp 5X Buffer	2,0
Primer1(F) 2 μM	1,0
Primer2(R) 2 μM	1,0
ABI BigDye v 3.1	0,3
DNA 10ng/ μL	2,0
Total	10,0

O programa utilizado teve o seguinte perfil de temperatura:

- 1- Desnaturação inicial: 96 °C por 60 segundos;
- 2- Desnaturação: 96 °C por 10 segundos;
- 3- Anelamento dos *primers*: 50 °C por 15 segundos;
- 4- Extensão da fita: 60 °C por 75 segundos;
- 5- Repetição das etapas de 2 a 4 em 15 ciclos;
- 6- Desnaturação: 96 °C por 10 segundos;
- 7- Anelamento dos *primers*: 50 °C por 15 segundos;
- 8- Extensão da fita: 60 °C por 90 segundos;
- 9- Repetição das etapas de 6 a 8 ciclos;
- 10- Desnaturação: 96 °C por 10 segundos.

3.5.2.5 Análise de dados da identificação molecular

A fim de verificar a qualidade das sequências nucleotídicas, as ferramentas usadas foram a análise via PHRED (verificação da qualidade das sequências); BLASN (Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI (The National Center for Biotechnology Information) para análise de similaridade com bancos de dados.

3.6 Inoculação *in vivo*

3.6.1 Inoculação *in vivo* do *Colletotrichum* sp. com e sem RNA fita dupla (RNAfd)

Após a evidência de bandas RNA fita dupla (RNAfd) observadas no fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, foi realizado um experimento em que os fungos *Colletotrichum fragariae* e *Colletotrichum gloeosporioides* constavam nos tratamentos, sendo um isolado sem a presença do micovírus e outro com o micovírus, respectivamente.

Para a inoculação, cilindros de cultivos artificiais contendo micélio dos dois fungos foram utilizados (Figura 8), conforme metodologia descrita por Alfenas e Ferreira (2007).

O experimento constou de 4 tratamentos com 10 repetições cada, sendo, 40 plantas utilizadas no total:

Tratamentos:

T1 – Controle - sem inoculação (10 plantas)

T2 - *Colletotrichum gloeosporioides* – com vírus (10 plantas)

T3 - *Colletotrichum fragariae* – sem vírus (10 plantas)

T4 - *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum fragariae* – com vírus + sem vírus (10 plantas)

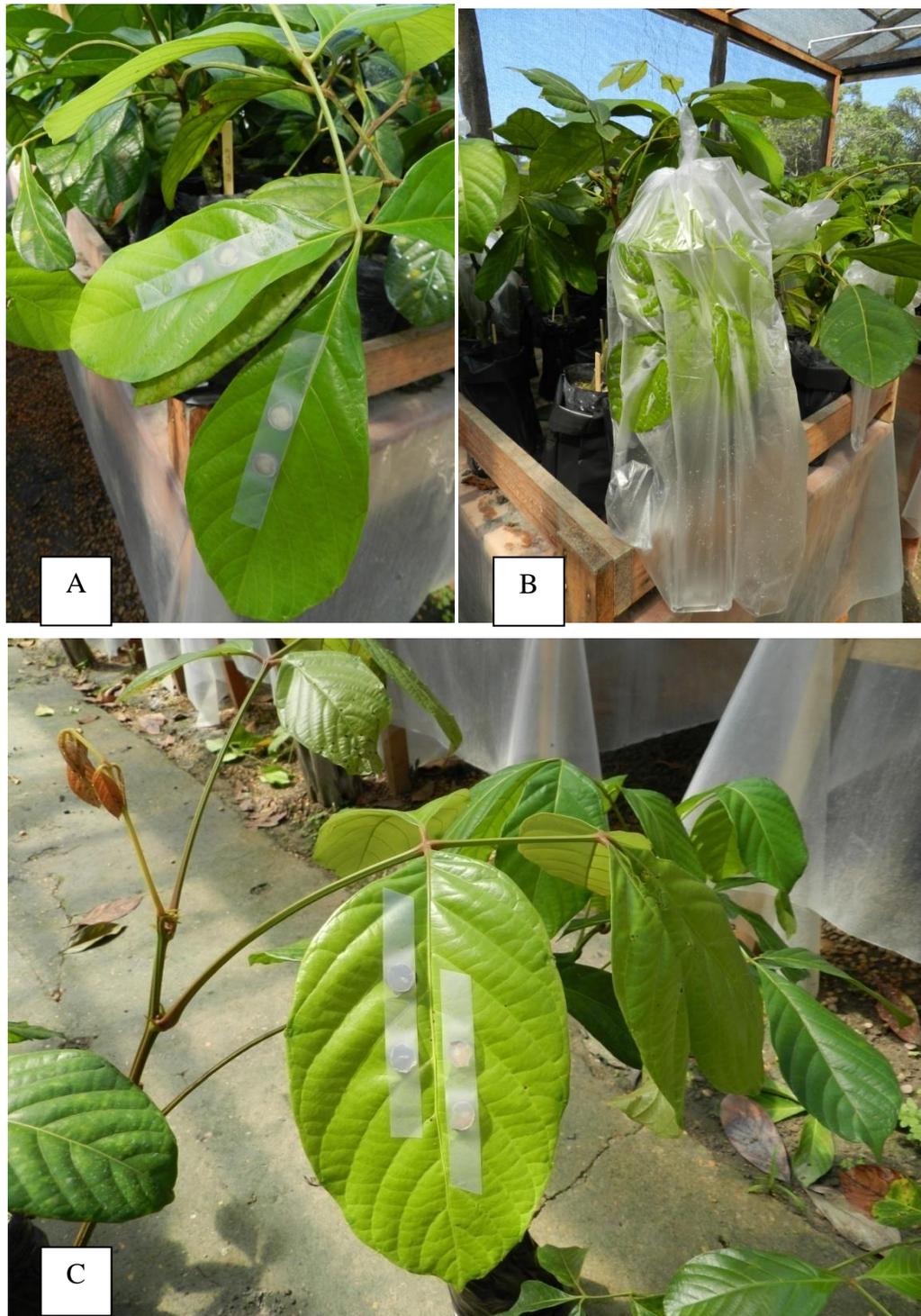


Figura 8 - Inoculação dos isolados *Colletotrichumfragariae* e *Colletotrichumgloeosporioides* em folhas novas de *P. cupana*, e câmara úmida após a inoculação, na casa de vegetação. A: Inoculação do isolado *Colletotrichumgloeosporioides* (T2); B: Inoculação do isolado *Colletotrichumfragariae* em câmara úmida utilizando saco plástico umedecido com água esterilizada; C: Inoculação dos isolados *Colletotrichumfragariae* e *Colletotrichumgloeosporioides* (T4).

3.6.2 Contronto *in vivo* dos fungos antagonistas contra o patógeno *Colletotrichumgloeosporioides*

Neste experimento, foram utilizados os fungos antagonistas *Aspergillus flavus*, *Penicillium verruculosum*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium pinophilum* *Schizophyllum commune* contra o patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*. Foram usadas 120 plantas no total, sendo 12 tratamentos com 10 repetições cada.

Primeiramente, as plantas foram inoculadas no dia 05 de agosto de 2013 com os antagonistas 1, 2, 3, 4 e 5. Após 5 dias de intervalo para os antagonistas se estabelecerem, no dia 09 de agosto, o patógeno *Colletotrichumgloeosporioides* foi inoculado (Figura 9).

Os tratamentos foram os seguintes:

Tratamentos:

T1 – Controle

T2 – Antagonista 1 (*Penicillium verruculosum*)

T3 – Antagonista 2 (*Geotrichum candidum*)

T4 – Antagonista 3 (*Aspergillus flavus*)

T5 – Antagonista 4 (*Penicillium pinophilum*)

T6 – Antagonista 5 (*Schizophyllum commune*)

T7 - Patógeno - *Colletotrichumgloeosporioides* - CL1

T8 – *Penicillium verruculosum* + Patógeno

T9 – *Geotrichum candidum* + Patógeno

T10 – *Aspergillus flavus* + Patógeno

T11 – *Penicillium pinophilum* + Patógeno

T12 – *Schizophyllum commune* + Patógeno

Após a inoculação de ambos os experimentos, esperou-se o aparecimento dos sintomas da antracnose nas folhas das mudas cerca de 20 a 30 dias. Para a análise do antagonismo, as lesões foliares(sintomas) foram medidas com o auxílio de uma régua milimetrada.



Figura 9 - Inoculação dos isolados antagonistas *Aspergillus flavus*, *Penicillium verruculosum*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium pinophilum* e *Schizophyllum commune* do patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* em folhas novas de *P. cupana*, e câmara úmida após a inoculação, na casa de vegetação. A: Inoculação dos isolados antagonistas; B: câmara úmida utilizando saco plástico umedecido com água esterilizada, na casa de vegetação.

3.7 Análise Estatística

Para o experimento inoculação *in vivo* do *Colletotrichum* com e sem vírus de RNA fita dupla, o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 4 tratamentos e 10 repetições cada tratamento. Para o experimento de confronto *in vivo* dos fungos antagonistas contra o patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* também foi inteiramente casualizado, com 12 tratamentos e 10 repetições cada. Para as análises, foi utilizado o programa Assistat 7.7 Beta, com a análise de variância, teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamentos de *C. gloeosporioides* e *C. fragariae*

Das lesões de sintomas de antracnose em folhas de guaraná foram obtidos dois isolados provenientes do município de Maués – AM, em primeira coleta realizada no mês de junho de 2010 (Tabela 7). Houve dificuldade de se obter mais isolados desse fungo com emissão da esporulação nesta época, e muitas vezes, pela emissão de hifas de outros fungos possivelmente saprófitas, tais como *Fusarium* spp.

Tabela 7– Isolados de *Colletotrichum* sp. e seus respectivos tecidos de origem de *P. cupana*, Maués, AM, 2010.

Número do isolado	Tecido	Código Origem/Atual	Município
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Folha	DF1M F (C 1)	Maués
<i>Colletotrichum fragariae</i>	Folha	DF3M C (C 3)	Maués

4.2 Isolamento dos fungos endofíticos do guaraná

De um total de 280 fragmentos (folhas, ramos, rizosfera) obtidos de coletas (Manaus e Maués) obtidos por pesquisadores do grupo participante do projeto “Estudo da diversidade de microrganismos associados ao guaranazeiro (*Paullinia cupana* (Mart.) Ducke) visando o controle da antracnose” foi isolado um total de 522 colônias de fungos endofíticos, sendo 278 isolados oriundos das folhas, 179 dos ramos além de 65 fungos da rizosfera (Figura 10).

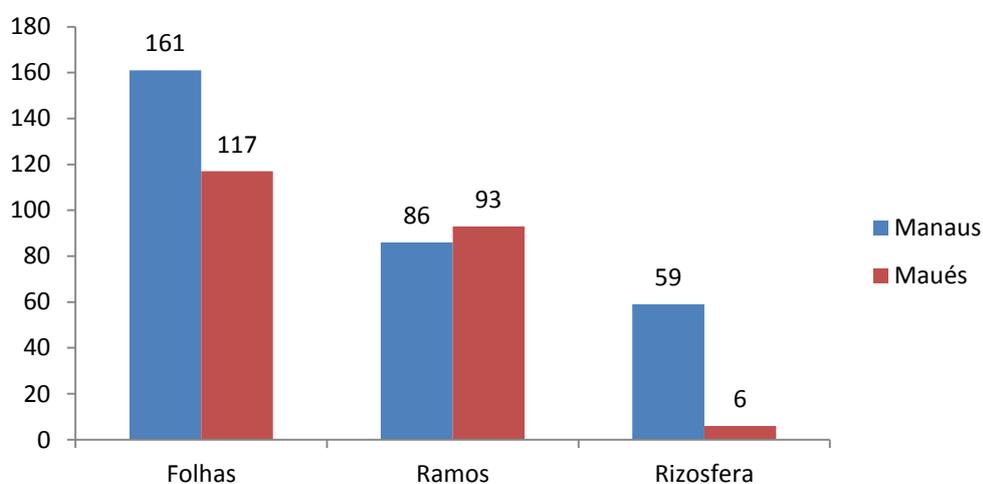


Figura 10 - Quantidade de isolados de fungos endofíticos das folhas, ramos e rizosfera de *P. cupana*, provenientes dos municípios de Maués e Manaus – AM.

4.3 Armazenamento dos fungos isolados do guaraná

Os fungos endofíticos isolados do guaranazeiro foram armazenados em tubos criogênicos, em duplicata, pelo método de Castellani (1967), com fragmentos do meio de cultura contendo pedaços da colônia imersos em água destilada esterilizada, devidamente identificados e datados, em temperatura ambiente e guardados no laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Federal do Amazonas (Figura 11).



Figura 11 -Armazenamento dos fungos endofíticos em tubos criogênicos pela Técnica de Castellani (1967), em duplicata.Foto: K. Oliveira (2011).

4.4 Identificação parcial dos fungos endofíticos

A identificação por meio das características morfológicas dos isolados foi feita por microscopia e aspecto das colônias possibilitando identificar alguns gêneros. Dentre as colônias foram encontrados os gêneros: *Pestalotiopsis*, *Colletotrichum*, *Xylaria*, *Guignardia*, *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium*. A probabilidade do número de gêneros ser bem maior do que os encontrados é inegável, pois além destes gêneros, em alguns isolados não foi possível a identificação e em outros não se observou a presença de estruturas reprodutivas. Também, segundo Azevedo et al. (2000), vários fungos filamentosos endofíticos não possuem estruturas reprodutivas quando cultivados em meio de cultura, o que torna a sua identificação morfológica bastante difícil (RUBINI, 2005). Em um recente estudo sobre fungos endofíticos de folhas de guaranazeiro (SIA et al., 2013) também foram encontrados praticamente os mesmos fungos encontrados por nós pela análise morfológica além de alguns

outros em grande quantidade como *Diaporthe/ Phomopsis*. A Figura 12 exemplifica a diversidade dos isolados endofíticos encontrados nas folhas, ramos e rizosfera de *P. cupana*.



Figura 12 - Exemplos de algumas morfoespécies de fungos endofíticos isolados de folhas, ramos e rizosfera de *P. cupana*.

4.5 Teste de Patogenicidade

4.5.1 Reisolamento dos fungos inoculados

Após a inoculação dos fungos patógenos, o início dos sintomas de antracnose surgiu na primeira semana, sendo que o reisolamento do patógeno foi realizado na segunda semana, quando as lesões foliaresse mostraram mais evidentes, com lesões necróticas nas folhas, de coloração marrom-avermelhada de tamanho significativo. Os sintomas somente surgiram nas folhas feridas com agulha esterilizada, conforme mostrado na Figura 13.

Esse fato corrobora com estudo feito com *C. gloeosporioides* em maracujá que revelou a reprodução dos sintomas da doença somente na inoculação com ferimento no limbo foliar (FRANCISCO NETO et al.,1995). Bailey et al. (1992) ressaltam que o ferimento é essencial para a penetração de algumas espécies do gênero *Colletotrichum*.

No reisolamento direto, nas lesões da antracnose, uma massa alaranjada surgiu em menos de 24 horas, porém, também emergiram hifas de fungos saprófitas, possivelmente do gênero *Fusarium*. Logo, somente por meio do reisolamento indireto (fragmentação das folhas), os fungos endofíticos que emergiram foram isolados e repicados em novas placas de Petri contendo meio BDA.

Foram reisolados quatro fungos dos fragmentos que inoculamos o fungo *C.gloeosporioides* (L1M, L1E, L1G, L1J) e quatro do *C. fragariae* (L3C, L3E, L3FF, L3FG). Na Figura 14, há a comparação da caracterização morfológica do CL1 - *C. fragariae* com o L1E, o fungo endofítico reisolado das lesões necróticas. Bem com o CL3 - *C. gloeosporioides*– com o L3C.



Figura 13 - Folhas de *P. cupana* com sintomas de antracnose: lesões necróticas nas folhas, de coloração marrom-avermelhada, após 2 semanas da inoculação dos patógenos *C. gloeosporioides* e *C. fragariae*. Foto: T. Esashika (2012).

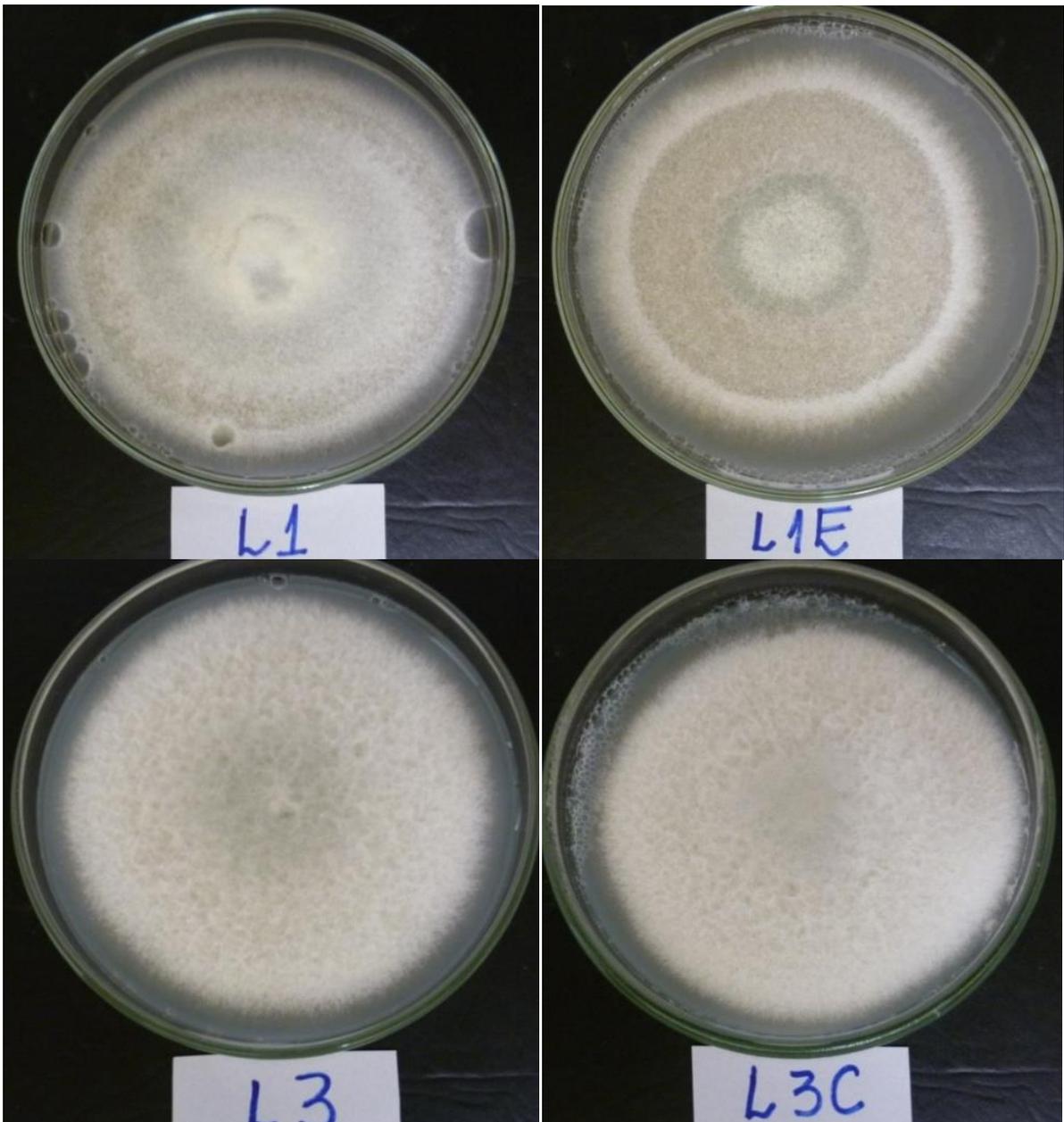


Figura 14 - Macromorfológica dos fungos CL1 - *C. gloeosporioides* – com o L1E, e também do CL3 - *C. fragariae* – com o L3C, sendo o L1E e L3C, os fungos endofíticos reisolados das lesões necróticas, após 15 dias de crescimento em meio BDA à temperatura ambiente.

4.5.2 Identificação molecular dos isolados obtidos no teste de patogenicidade

4.5.2.1 Extração e amplificação do DNA para o sequenciamento

A extração de DNA foi realizada pelo método fenol/clorofórmio, com a utilização de nitrogênio líquido. Os fungos estão definidos como *C. gloeosporioides* (controle) e os reisolados L1M, L1E, L1G, L1J; *C. fragariae* (controle) e seus respectivos reisolados L3C, L3E, L3FF, L3FG, em que *C. gloeosporioides* e *C. fragariae* foram os controles usados para inoculação nos guaranazeiros sadios e os seus reisolados, após infecção por antracnose. Essa metodologia mostrou-se eficiente na extração de DNA da massa micelial dos fungos filamentosos (Figura 15), resultando em quantidade e pureza de DNA suficiente para a utilização posterior das técnicas de PCR e sequenciamento.

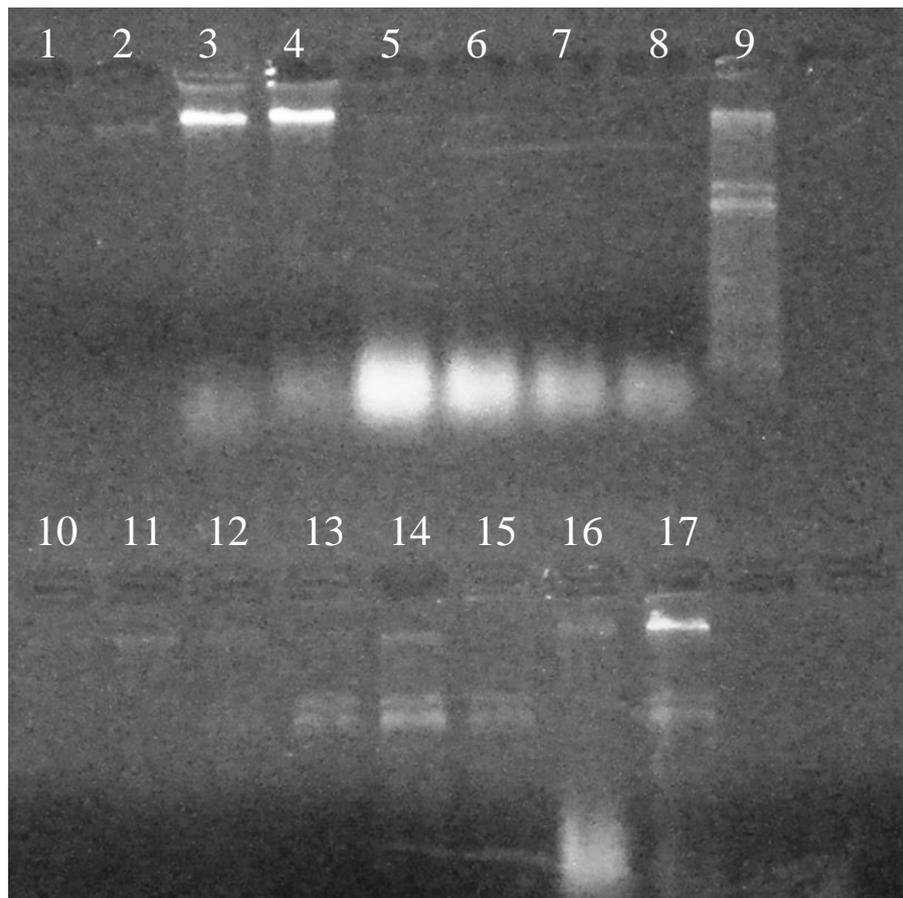


Figura 15 – Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio da extração de DNA dos fungos isolados de *P. cupana*. Primeira fila: Poços de 1 a 6 – Amostras CL1E; Poços 7 e 8 – Controles do *C. gloeosporioides* e *C. fragariae*, respectivamente; Poço 9 – Marcador molecular; Segunda Fila: Poços de 12 a 17 – Amostras CL3C.

Os iniciadores específicos ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) foram utilizados para amplificação da região conservada ITS do rDNA, os quais permitiram a obtenção de um fragmento de cerca de 600 pb (Figura 16) que corresponde ao gene ITS (WHITE et al., 1990). Essa região é útil no estudo da sistemática molecular em nível de espécie e amplamente sequenciada em fungos, de acordo com Gardes e Bruns (1993).

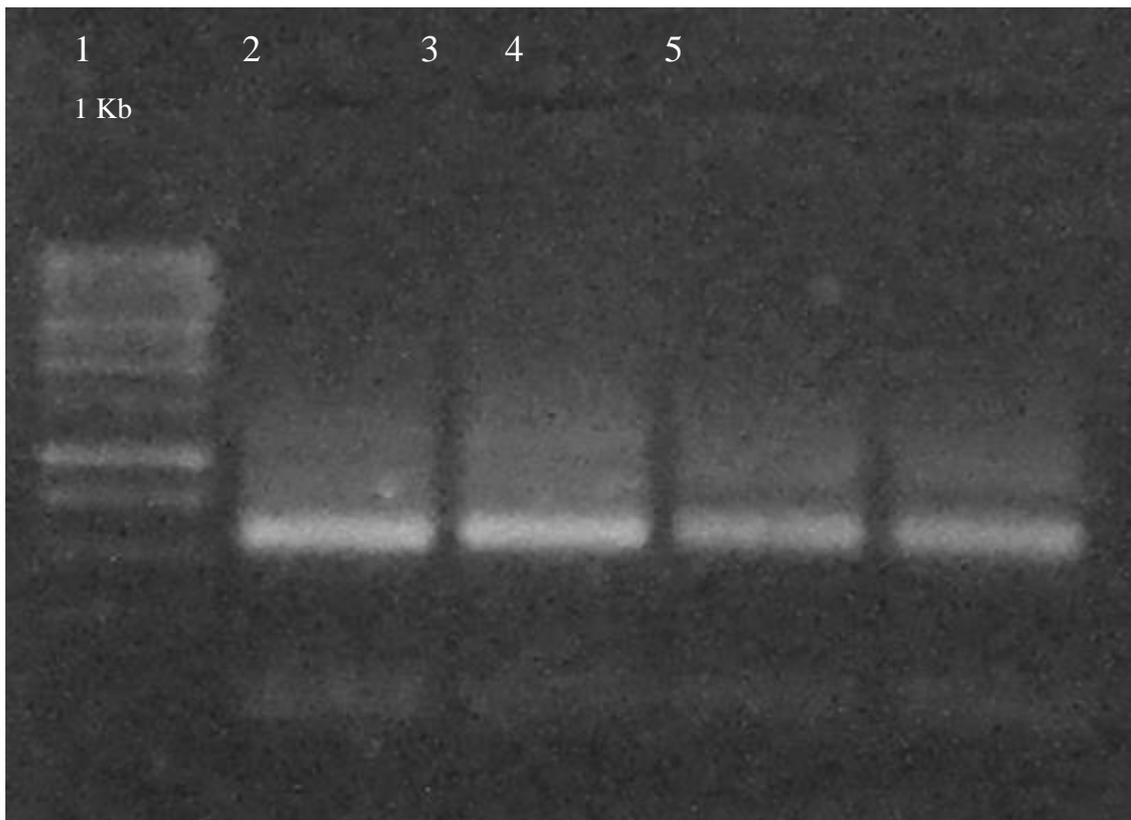


Figura 16 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio da amplificação da região ITS do rDNA dos fungos isolados de *P. cupana*. Poço 1 – marcador de peso molecular de 1Kb (Fermentas); Poço 2 – *C. gloeosporioides* (controle); Poço 3 – L1E; Poço 4 – *C. fragariae* (controle); Poço 5 - L3C.

4.5.2.2 Análise das sequências obtidas dos isolados no teste de patogenicidade.

O produto da PCR foi utilizado para o sequenciamento da região ITS do rDNA e após o resultado do sequenciamento, a análise das sequências foi avaliada via Phred, demonstrando a qualidade das sequências (Figura 17).



Figura 3 –(A)Análise da qualidade das sequências do fungo controle CL1 (amostra 8) e (B)do fungo reisolado L1E (amostra 9), via Phred, utilizando a ferramenta PHPH, disponível no site<http://helix.biomol.unb.br/phph/index.html>.

A análise da identificação molecular dos fungos *C. gloeosporioides* e *C. fragariae*, controles usados para inoculação nos guaranazeiros sadios, e os seus reisolados, foi feita por comparação das sequências depositadas no Gene Bank. O resultado do sequenciamento permitiu um alinhamento de boa qualidade com a sequência nucleotídica que corresponde à identificação dos fungos como sendo *C. gloeosporioides* e *C. fragariae*, com taxas de similaridade de 95 e 98 %, respectivamente, ao alinhamento das sequências dos fungos reisolados do guaranazeiro com antracnose – L1E e L3C – como sendo *C. gloeosporioides* e *C. fragariae*, respectivamente (Tabela 8), confirmando o reisolamento dos fungos fitopatogênicos e o teste de patogenicidade.

Tabela 8– Análises das sequências obtidas dos fungos isolados de *P. cupana* (*C. gloeosporioides* – CL1 e *C. fragariae* – CL3) e os seus respectivos reisolados (L1E e L3C), número de nucleotídeos semelhantes ao mesmo número de nucleotídeos dos fungos *C. gloeosporioides* e *C. fragariae* armazenado no banco de dados (NCBI), query coverage, e-value e a porcentagem de similaridade de cada fungo avaliado.

Fungos	Número de Nucleotídeos	Query Coverage (%)	E-value	Ident. Máxima (%)
<i>C. gloeosporioides</i> (controle)	497/503	92	0.0	99
Reisolado L1E	484/507	92	0.0	95
<i>C. fragariae</i> (controle)	478/501	90	0.0	95
Reisolado L3C	479/490	92	0.0	98

O alinhamento da sequência do fungo *Colletotrichum* (controle) contra a sequência do fungo reisolado no guaranazeiro com sintomas de antracnose apresentou 95% de identidade no programa Blast (Tabela 9). Portanto, podemos inferir que o Teste de Patogenicidade baseado nos Postulados de Kock foi comprovado, pois certificou-se que os fungos isolados das folhas de *P. cupana* identificados como *C. gloeosporioides* e *C. fragariae* foram capazes de causar lesões necróticas características da antracnose e quando reisolados, foram identificados como sendo das mesmas espécies e, portanto, são fungos fitopatogênicos de *P. cupana*.

Tabela 9– Análises das sequências dos fungos controle *C. gloeosporioides* e *C. fragariae* pela comparação da sequência do mesmo fungo após inoculação e reisolamento no guaranazeiro demonstrando 95% e 98% de identidade, respectivamente.

Espécie	Ident. Máxima (%)	Identificação dos Reisolados
<i>C. gloeosporioides</i>	95	<i>C. gloeosporioides</i>
<i>C. fragariae</i>	98	<i>C. fragariae</i>

4.5.3 Identificação morfológica dos fungos *C. fragariae* e *C. gloeosporioides* no teste de patogenicidade.

A identificação morfológica foi realizada pela Micoteca URM604 da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), no Departamento de Micologia, sob a coordenação da curadora Dra. Cristina Maria de Souza Motta e realizada pelo Ms. Jadson Bezerra, do Programa de Pós-Graduação de Biologia de Fungos.

Foram realizadas as identificações dos isolados *C. gloeosporioides* e *C. fragariae*. A identificação morfológica do isolado CL1 corroborou com sua identificação molecular, mostrando como resultado a espécie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc., o que demonstra a complementariedade dos estudos molecular e morfológicos.

Já o isolado CL3, sua identificação molecular apresentou a espécie *Colletotrichum fragariae*, e sua respectiva identificação morfológica identificou a espécie *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc. (Tabela 10).

Tabela 10– Comparação da identificação molecular e morfológica dos fungos patogênicos *C. gloeosporioides* e *C. fragariae*.

Isolado	Identificação Molecular	Identificação Morfológica
CL1	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.
CL3	<i>C. fragariae</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.

Esse contraditório resultado demonstra que a identificação das espécies do gênero *Colletotrichum* necessita de mais estudos, pois as estruturas morfológicas das espécies desse gênero assemelham-se entre si, o que torna a identificação complexa. A Curadora da Micoteca URM, responsável pela identificação morfológica desses isolados, teceu comentário específico sobre esses isolados, a qual os qualificou como complexos e recomendava o estudo molecular.

Realmente, de acordo com Sutton (1992), o gênero *Colletotrichum* apresenta uma grande variação morfológica, o que reflete na ampla variabilidade genética que ocorre entre e

dentro das espécies deste gênero. Essa é a causa principal da difícil definição das espécies desse gênero.

Menezes (2002) cita que nas espécies do gênero *Colletotrichum* as características morfológicas são delimitadas pelo tamanho e forma dos conídios e apressórios e pelas características das colônias, como textura e coloração. A grande plasticidade morfológica é um reflexo da grande variabilidade genética que ocorre neste gênero, além da forte influência do ambiente em alguns caracteres como a formação de setas e produção de conídios.

Photita et al. (2005), em seu artigo sobre a caracterização morfológica e molecular de espécies de *Colletotrichum* em plantas na Tailândia, comentam que a divergência do nucleotídeo de rDNA é variável em diferentes taxa de fungos e não há critério definido da divergência do nucleotídeo rDNA de níveis intra e inter-específicos do *Colletotrichum* sp. Em resumo, as espécies de *Colletotrichum* foram diferenciadas com base na análise das sequências e os resultados foram comparados para a diferenciação do taxa baseada nas características de cultura e morfológicas.

Lacap et al. (2003) têm demonstrado que alguns morfotipos coincidem muito bem com espécies quando testadas usando análise molecular. Na presente pesquisa, a maioria dos isolados de *Colletotrichum* do mesmo hospedeiro com as mesmas características morfológicas foram mostradas por análise molecular serem as mesmas espécies. Por outro lado, isolados de *Colletotrichum* do mesmo hospedeiro, mas com diferentes características morfológicas foram considerados serem espécies diferentes (PHOTITA et al., 2005).

Neto (2009) também estudou a caracterização molecular de fungos endofíticos e patogênicos do gênero *Colletotrichum* spp. e que foram isolados de *P. cupana*.

Assim, a solução para realizar a diferenciação destas espécies seria a repetição do sequenciamento com a abrangência de uma maior cobertura da região que se deseja sequenciar.

4.6 Confronto interespecífico *in vitro* e avaliação dos fungos endofíticos contra o patógeno *C. gloeosporioides*.

Para o teste de antagonismo, foi selecionado o isolado *Colletotrichum gloeosporioides*, proveniente de fragmentos de folhas de guaraná.

Os testes de antagonismo foram realizados pelo confronto direto dos 522 fungos isolados contra o *Colletotrichum gloeosporioides* pela metodologia já descrita em material e métodos.

A partir dos resultados da cultura pareada, foi observado que o confronto direto de 522 fungos endofíticos contra *Colletotrichum gloeosporioides* apresentou 55 resultados de antagonismo, ou seja, 8,73% apresentaram efeito antagônico significativo de investigação com o patógeno, seja inibindo o seu crescimento pela formação de uma barreira ou pela produção de algum metabólito secundário ou ainda pelo crescimento do endofítico sobre o fitopatógeno. Esses efeitos ou habilidades antagonísticas de cada fungo foram classificados de acordo com a escala de Badalyan et al. (2002), a qual apresenta três principais tipos de reações - A, B, C - e quatro subtipos - C_{A1} , C_{B1} , C_{A2} e C_{B2} .

Dos 55 endófitos que apresentaram efeito antagônico significativo, foram obtidas seis interações do tipo A (Figura 18 e Tabela 11), o que representa 11% do total. Essa reação competitiva acontece por inibição do crescimento do fitopatógeno com a formação de uma barreira (*deadlock*) e há contato micelial entre o endófito e o patógeno. O índice de antagonismo desses fungos foi no intervalo entre 31,60 % a 45,60 % (Tabela 12).

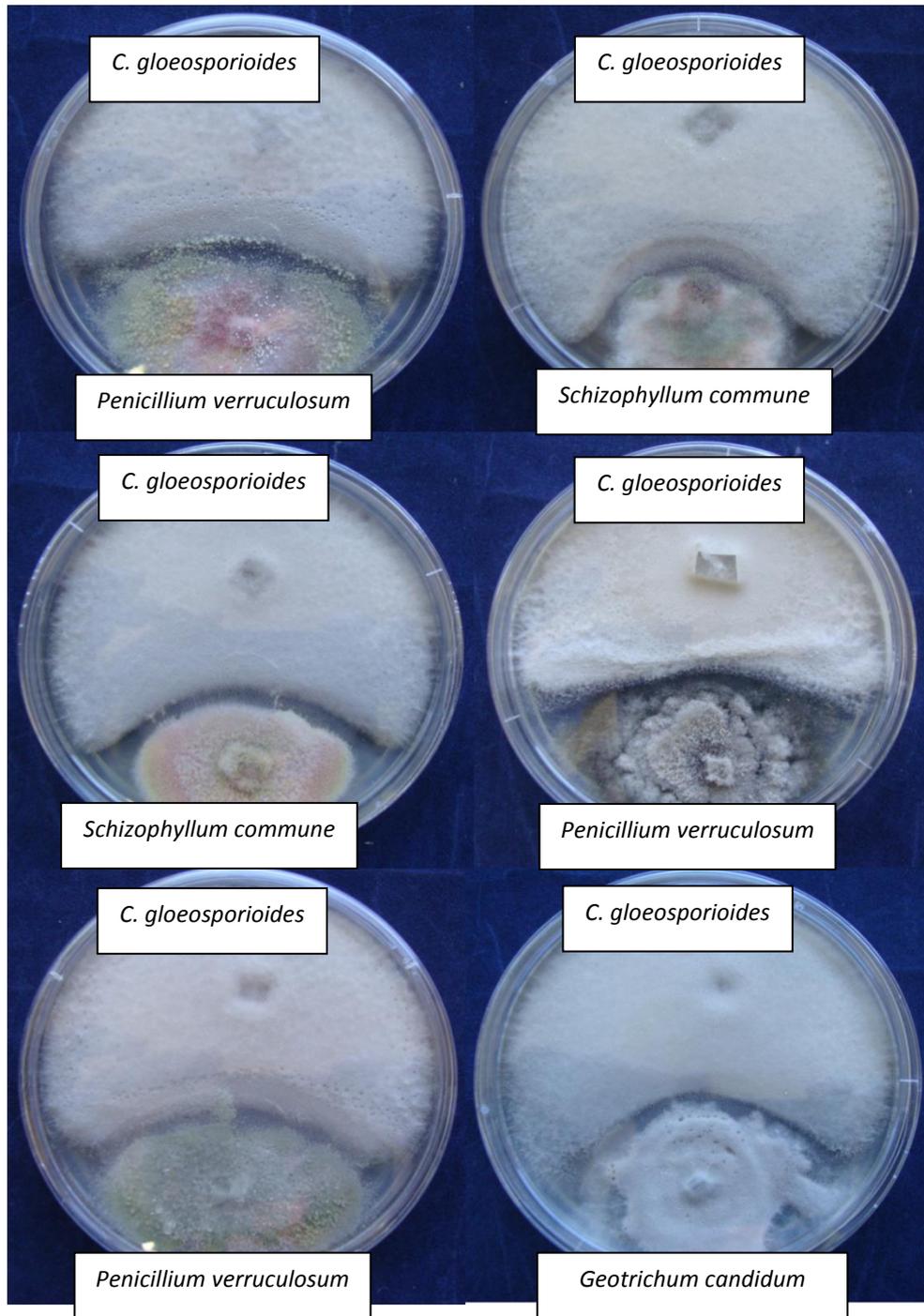


Figura 18 - Teste de antagonismo dos isolados de fungos endofíticos contra *C. gloeosporioides*, aos 15 dias de inoculação em placa de Petri contendo BDA, na seguinte ordem, da esquerda para a direita: Tipo A: 472, 507, 372, 473, 479 e 415.

Foram obtidas também três interações do tipo B, com barreira (*deadlock*) à distância, o que representa 5,4% do total (Figura 19). Esses endófitos apresentaram os maiores índices de antagonismo, entre 64,50 a 69,20% (Tabela 11).

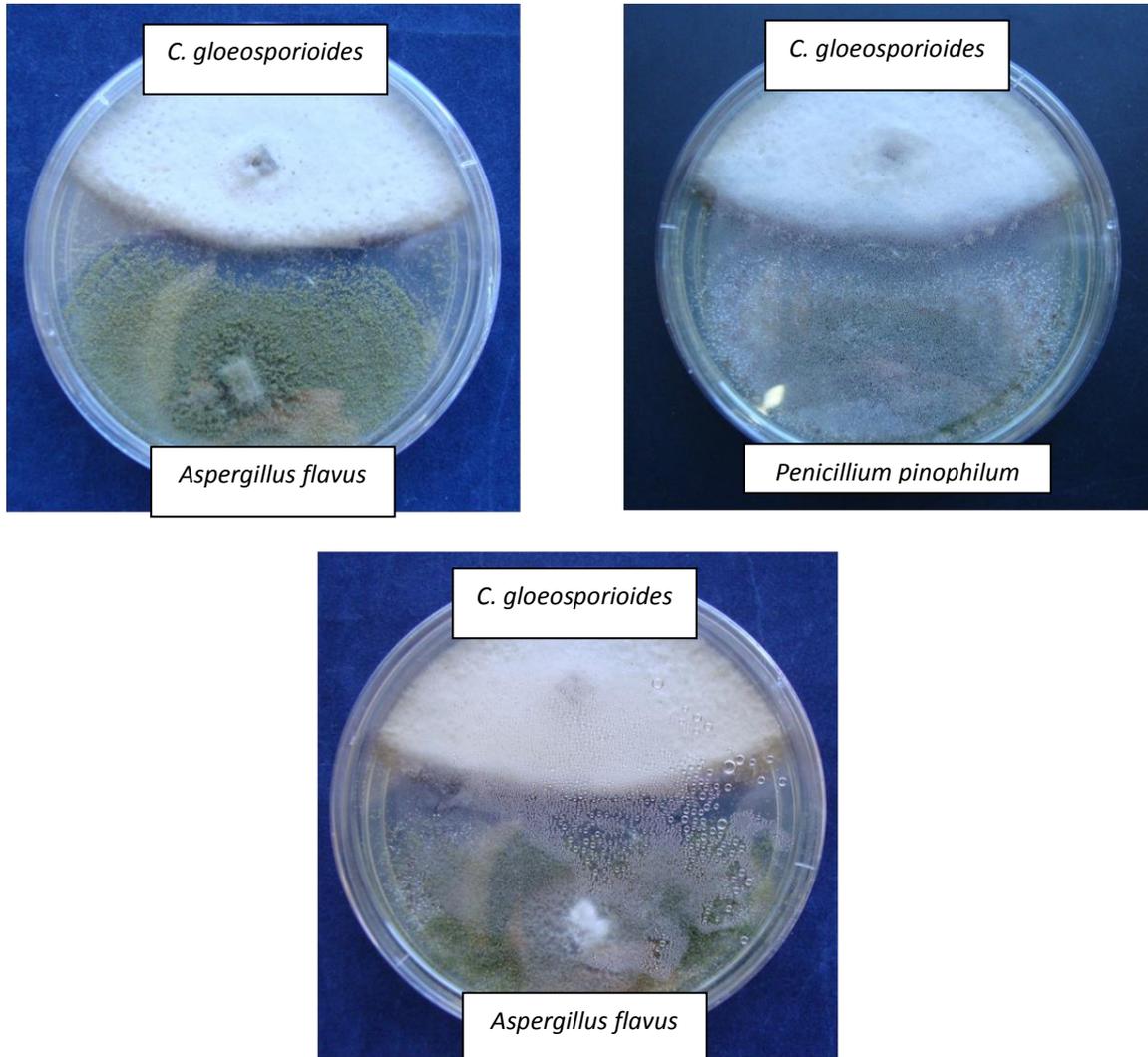


Figura 19 - Teste de antagonismo dos isolados de fungos endofíticos contra *C. gloeosporioides*, aos 15 dias de inoculação em placa de Petri contendo BDA. Tipo de interação B: 272, 81, 47.

Nas interações do tipo C, foram obtidos os seguintes resultados: 12 interações do tipo C_{A1} , que representa um parcial crescimento do endófito sobre o fitopatógeno e há a formação de barreira inicial com contato micelial. O índice de antagonismo nessa interação variou de 12,20 a 35,30% (Tabela 11).

Garcia (2009) avaliou a atividade *in vitro* de 97 fungos endofíticos isolados de folhas da planta *Sapindus saponaria* contra o fitopatógeno *Colletotrichum* sp. Das linhagens avaliadas, 63 apresentaram índices maiores de inibição do crescimento do patógeno, sendo que a interação variou entre 42,22 a 62,79%. Na pesquisa de Garcia e na presente pesquisa, as interações do tipo C_{A1} apresentaram os maiores índices de antagonismo. Polli et al. (2013) também encontrou resultados interessantes com o teste de isolados de *Mikaria glomerata* contra o fitopatógeno *Colletotrichum* sp., sendo que a interação com resultados promissores foi, também, a do tipo C_{A1} .

Foram encontradas cinco interações do tipo C_{A2} , que representa um completo crescimento do endófito sobre o fitopatógeno e há a formação de barreira inicial com contato micelial. Houve variação do índice de antagonismo de 12,30 a 25,30%.

Foram encontradas dez interações do tipo C_{B1} , que representa um parcial crescimento do endófito sobre o fitopatógeno depois da formação de barreira inicial sem contato micelial, com índice de antagonismo que variou de 12,20 a 28,50%.

Do tipo C_{B2} foram encontradas 19 interações, em que há o completo crescimento do endófito sobre o fitopatógeno depois da formação de barreira inicial sem contato micelial, com variação de índice de antagonismo de 20,10 a 39,20%.

Dos nove isolados que apresentaram inibição, quatro são isolados da rizosfera, três são de plantas que apresentaram sintomas de antracnose e dois são de plantas saudáveis. Dos 46 que apresentaram algum tipo de antagonismo, 21 são de plantas que não apresentaram nenhum sintoma, 23 são de plantas que apresentaram sintomas e três de rizosfera.

Tabela 11- Índice de antagonismo entre 55 fungos endofíticos do guaraná e os fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides*.

Fungos Endofíticos	Índice do Antagonismo IA (%)	Tipo de Interação
CED 415	42,60	Formação de barreira <u>com</u> contato micelial A
CED 372	31,60	
RZ 479	32,20	
RZ 473	38,90	
RZ 507	40,00	
RZ 472	45,60	
CP 272	64,50	Formação de barreira <u>sem</u> contato micelial (a distância)B
CE 81	66,30	
CE 47	69,20	
CE 179	25,80	Parcial crescimento do endófito sobre o fitopatógeno depois da formação de barreira inicial com contato micelial C_{A1}
CE 161	24,50	
CE 157	35,30	
CE 53	12,20	
CE 57	22,30	
CE 58	23,40	
CE 62	29,30	
CE 16	34,10	
CE 43	20,20	
CP 243	28,20	
EP 653	12,20	
EP 650	14,30	
Rz 500	17,20	
Rz 467	24,20	
CED 413	12,30	
CP 214	20,10	
CP 241	25,30	
Rz 465	18,20	Parcial crescimento do

CE 164	28,20	endófito sobre o fitopatógeno depois da formação de barreira inicial sem contato micelial C _{B1}
CE 137	28,50	
CE 49	28,40	
CE 134	28,40	
EP 604	12,20	
EP 532	12,90	
CED 381	13,30	
CED 404	14,20	
CP 198	20,00	
CP 213	36,30	Completo crescimento do endófito sobre o fitopatógeno depois da formação de barreira inicial sem contato micelial C _{B2}
CP 208	39,20	
CP 212	29,10	
CP 211	26,20	
CP 250	27,70	
CP 247	28,90	
CP 246	30,00	
CP 249	26,20	
CE 84	28,20	
CE 71	24,20	
CE 83	30,00	
CE 160	34,20	
CE 173	33,20	
CE 171	20,10	
CE 108	24,90	
CE 78	23,70	
CP 204	21,10	
CP 222	23,50	
CP 225	22,30	

Após o teste de antagonismo, foram selecionados cinco isolados para o teste *in vivo* contra o *Colletotrichum gloeosporioides* na casa de vegetação. Como critério para a seleção desses isolados, foram selecionados os que apresentaram os índices de antagonismo significantes, do tipo de interação A e B, que são as interações com contato micelial e formação de barreira, como mostra a Tabela 12. Esses cinco isolados foram identificados na forma morfológica e molecular, conforme veremos nos próximos tópicos.

Tabela 12- Endófitos identificados e selecionados para o teste *in vivo* contra o *Colletotrichum gloeosporioides*, na casa de vegetação.

Fungo endofítico identificado	Identificação	Índice de Antagonismo (%)	Tipo de Interação
472	<i>Penicillium verruculosum</i>	45,60	A
415	<i>Geotrichum</i> sp.	42,60	A
507	<i>Schizophyllum commune</i>	40,00	A
47	<i>Aspergillus flavus</i>	69,20	B
81	<i>Penicillium pinophilum</i>	66,30	B

Esta inibição de crescimento de *C. gloeosporioides*, sob condições *in vitro*, ocorreu, possivelmente, devido à antibiose, uma vez que foi impedido o desenvolvimento do fitopatógeno, como citado por Kupper, Fernandes e Goes (2003). Microrganismos que agem por antibiose geralmente têm amplo espectro de ação, de forma que na inibição dos fungos a produção de substâncias tóxicas é mais efetiva do que qualquer outro mecanismo de ação envolvido. A constatação da produção de substâncias inibidoras produzidas pelos fungos endofíticos isolados do guaraná ao *C. gloeosporioides* é importante para o entendimento do mecanismo de ação do antagonismo, possibilitando, dessa forma, o controle da doença pelo uso das substâncias produzidas.

4.7 Identificações dos fungos antagonistas *Penicillium verruculosum*, *Geotrichum* sp., *Schizophyllum commune*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium pinophilum*.

4.7.1 Identificação molecular

4.7.1.1 Extração e amplificação do DNA para o sequenciamento

A extração de DNA pelo método fenol/clorofórmio, com a utilização de nitrogênio líquido para a trituração da massa micelial dos fungos filamentosos (47, 81, 272, 415, 472, 473, 479, 507) foi mais eficiente em comparação ao método CTAB + força mecânica, resultando em quantidade e pureza de DNA suficientes para a utilização posterior das técnicas de PCR e sequenciamento (Figura 20). Algumas amostras foram amplificadas duas vezes porque a extração de alguns fungos foi extremamente difícil e também foram extraídos de três a quatro vezes.

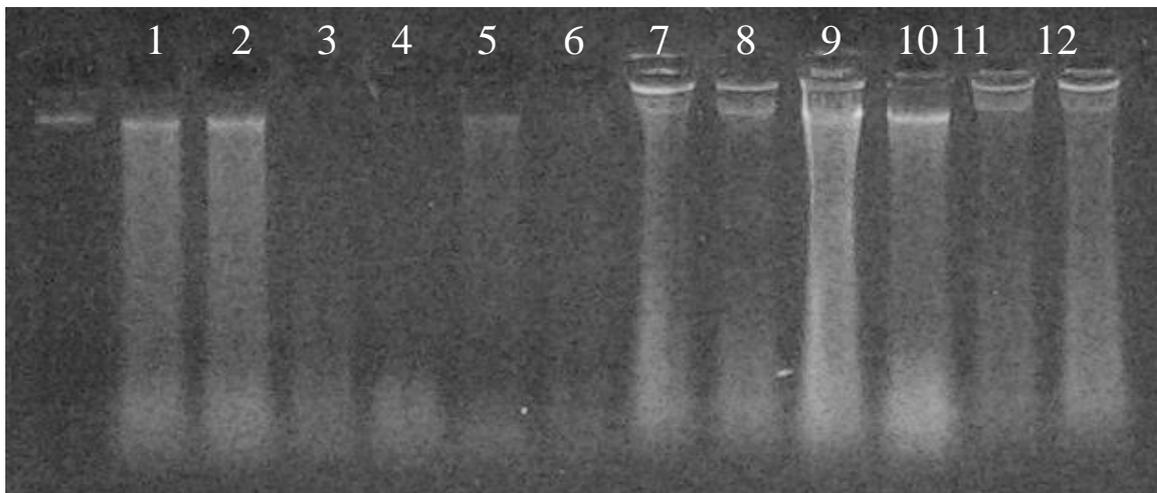


Figura 20 - Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio da extração de DNA dos fungos antagonistas. Poço 1 – marcador molecular; Poços 2 e 3 - 81; Poço 4 – 507; Poço 5 - 272; Poços 6 e 7 – 47; Poços 8 e 9 – 472; Poço 10 – 415; Poço 11 – 479; Poço 12 – 473

4.7.1.2 Resultado do PCR

A região conservada do gene DNA ribossomal (rDNA) de ITS foi amplificada utilizando oligonucleotídeos iniciadores ITS1/ITS4 permitindo a amplificação de uma banda única que representa um fragmento de DNA de aproximadamente 600 pares de base (pb). Assim, com a quantidade e pureza suficientes de DNA, a região ITS foi amplificada dos seguintes fungos antagonistas (Figura 21).

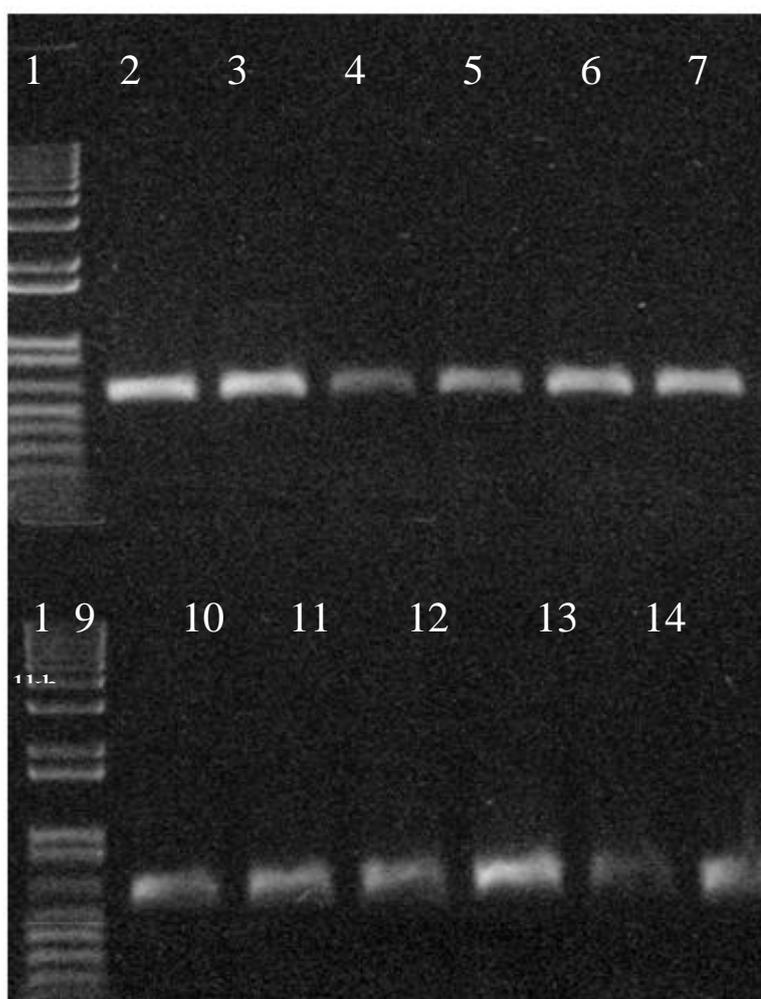


Figura 21 - Perfil eletroforético da amplificação da região ITS do rDNA dos isolados em gel de agarose 0,8%, corado com 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Pente superior: Poço 1 – Marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas); Poços 2 e 3 - 81; Poços 4 e 5 - 272; Poços 6 e 7 – 47; Marcador de peso molecular; Poços 9 e 10– 472; Poços 11 e 12 – 479; Poço 13 e 14 – 473.

4.7.1.3 Análise das sequências para identificação dos isolados antagonistas

Os produtos da PCR do sequenciamento da região ITS1-5, 8S-ITS4 do rDNA foram analisados via os programas BioEdit e BLAST. O BLAST compara as sequências obtidas com aquelas depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e fornece informações quanto à homologia entre elas. A comparação das sequências de nucleotídeos da região ITS1-5,8S-ITS4 das amostras fúngicas e as sequências cadastradas no Banco Internacional de Genes (NCBI) permitiram a identificação taxonômica dos isolados do presente trabalho em nível de gênero. Os resultados mostraram a identificação dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum* e *Schizophyllum* como possíveis fungos antagonistas da espécie *Colletotrichum gloeosporioides*. Todas as identificações mostraram o valor de e sendo 0 (zero), o que significa que quanto mais próximo de 0 é o valor do e , maior é o significado da similaridade entre as sequências comparadas. O *query cover* é um indicativo da qualidade do alinhamento das sequências e a identificação máxima nos fornece a porcentagem do número de bases da sequência do fungo antagonista que alinharam com a da sequência armazenada do fungo (Tabela 13).

Tabela 13– Análises das sequências obtidas dos fungos antagonistas isolados de *P. cupana*, número de nucleotídeos semelhantes ao mesmo número de nucleotídeos dos fungos respectivos armazenados no banco de dados (NCBI), e-value, query coverage e a porcentagem de similaridade de cada fungo avaliado.

Isolado	Identificação Molecular	Número de Nucleotídeos	E-Value	Query Cover (%)	Identidade Máxima (%)
47 A	<i>Aspergillus flavus</i>	559/564	0	100	99
81 A	<i>Aspergillus flavus</i>	563/563	0	100	100
272 A	<i>Aspergillus flavus</i>	563/566	0	100	99
415 B	<i>Geotrichum</i> sp.	594/592	0	100	99
472 B	<i>Penicillium aculeatum</i>	533/543	0	100	98
473 B	<i>Penicillium</i> sp.	515/516	0	100	99
479 B	<i>Penicillium</i> sp.	510/519	0	100	98
507 B	<i>Schizophyllum</i> sp.	546/546	0	100	99

4.7.2 Identificação morfológica dos isolados antagonistas

A identificação morfológica dos fungos antagonistas, como já mencionado, foi realizada pela Micoteca URM604 da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), no Departamento de Micologia, sob a coordenação da curadora Dra. Cristina Maria de Souza Motta e realizada pelo Ms. Jadson Bezerra, do Programa de Pós-Graduação de Biologia de Fungos. A identificação molecular confirmou a morfológica de oito isolados, com exceção do isolado 81A, em que a molecular demonstrou a espécie *Aspergillus flavus*, enquanto que a morfológica *Penicillium pinophilum* Thom. (Tabela 14).

Tabela 14- Comparação da identificação molecular e morfológica dos fungos antagonistas 47, 81, 272, 415, 472, 473, 479, 507.

Isolado	Identificação Molecular	Identificação Morfológica
47 A	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i> Link
81 A	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium pinophilum</i> Thom.
272 A	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i> Link
415 B	<i>Geotrichum</i> sp.	<i>Geotrichum candidum</i> Link
472 B	<i>Penicillium aculeatum</i>	<i>Penicillium verruculosum</i> Peyronel
473 B	<i>Penicillium aculeatum</i>	<i>Penicillium verruculosum</i> Peyronel
479 B	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium verruculosum</i> Peyronel
507 B	<i>Schizophyllum</i> sp.	<i>Schizophyllum commune</i> Fr.

4.8 Ocorrência de RNA fita dupla (dsRNA) em *C. gloeosporioides*

Durante o teste de patogenicidade do CL3, identificado como sendo a espécie *Colletotrichum gloeosporioides*, a ocorrência de bandas RNA fita dupla (dsRNA) foi observada (Figura 22). Segundo Frazzon et al. (2000), os micovírus infectam frequentemente vários gêneros de fungos. A maioria dessas infecções são latentes, porém, em alguns casos, a presença destes vírus pode interferir no fenótipo do hospedeiro. O estudo sobre os efeitos do dsRNA em fungos concentra-se em espécies fitopatogênicas, nos quais a presença deles tem sido associada à hipovirulência em seus hospedeiros.

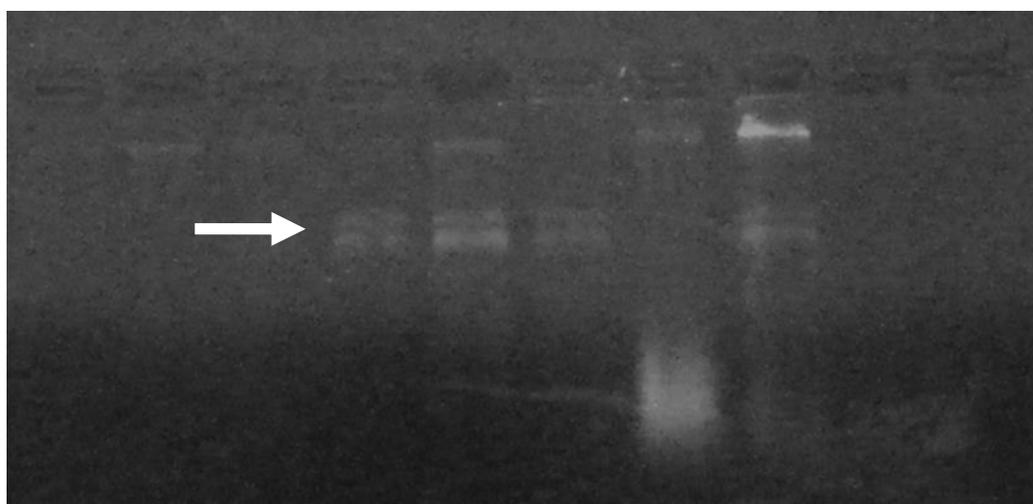


Figura 22 - Gel de agarose de DNA do *Colletotrichum gloeosporioides* mostrando as bandas RNA fita dupla (dsRNA), apontadas pelas setas.

McCabe, (1999) e Yu et al. (2010) comentam sobre a importância da hipovirulência dos micovírus como uma ferramenta de controle biológico contra fungos fitopatogênicos, pois quando eles estão nas células vegetais, atuam como perturbador do desenvolvimento dos fungos, como, por exemplo, afetam a esporulação, a reprodução sexual e a virulência, sem causar debilitação geral. Outra informação que tem atraído o interesse de pesquisadores: os vírus mantêm os fungos hospedeiros em estado vegetativo do crescimento, o que equivale a um desenvolvimento defeituoso do fungo (McCABE, PFEIFER e VAN ALFEN, 1999). Compreender como os micovírus causam esse fenótipo é essencial para oferecermos regras de como podemos utilizar esse conhecimento no controle biológico das doenças causadas por fungos fitopatogênicos.

Pearson et al. (2009) citam também que a hipovirulência dos fungos pode causar infecção e pode induzir a hipovirulência em outros patógenos por transferência viral, ou seja, os micovírus são regularmente transmitidos por meio do contato citoplasmático pela fusão de hifas e também, essas partículas virais podem ser transmitidas para os esporos durante o desenvolvimento do fungo. Eles não têm habilidade de lisar as células do hospedeiro. Logo, o único mecanismo natural é o citoplasma. Porém, esse modo de transmissão abrange um limitado número de hospedeiros, já que os fungos filamentosos possuem um sistema de auto-reconhecimento geneticamente regulado que impede a fusão de hifas entre linhagens incompatíveis. Esse sistema de incompatibilidade vegetativa limita a transmissão dos micovírus por meio da transmissão sexual em populações fúngicas (McCABE et al., 1999).

Vários outros estudos já foram realizados e os micovírus têm sido reportados em diversas espécies de fungos fitopatogênicos, como no *Fusarium oxysporum* (KILIC e GRIFFIN, 1998) e *Fusarium graminearum* (KWON et al., 2009). Em *Colletotrichumlindemuthianum*, um estudo foi realizado por Rawlinston, Carpenter e Muthyalu (1975) e em *Colletotrichum gloeosporioides* comentado por Dale et al. (1988).

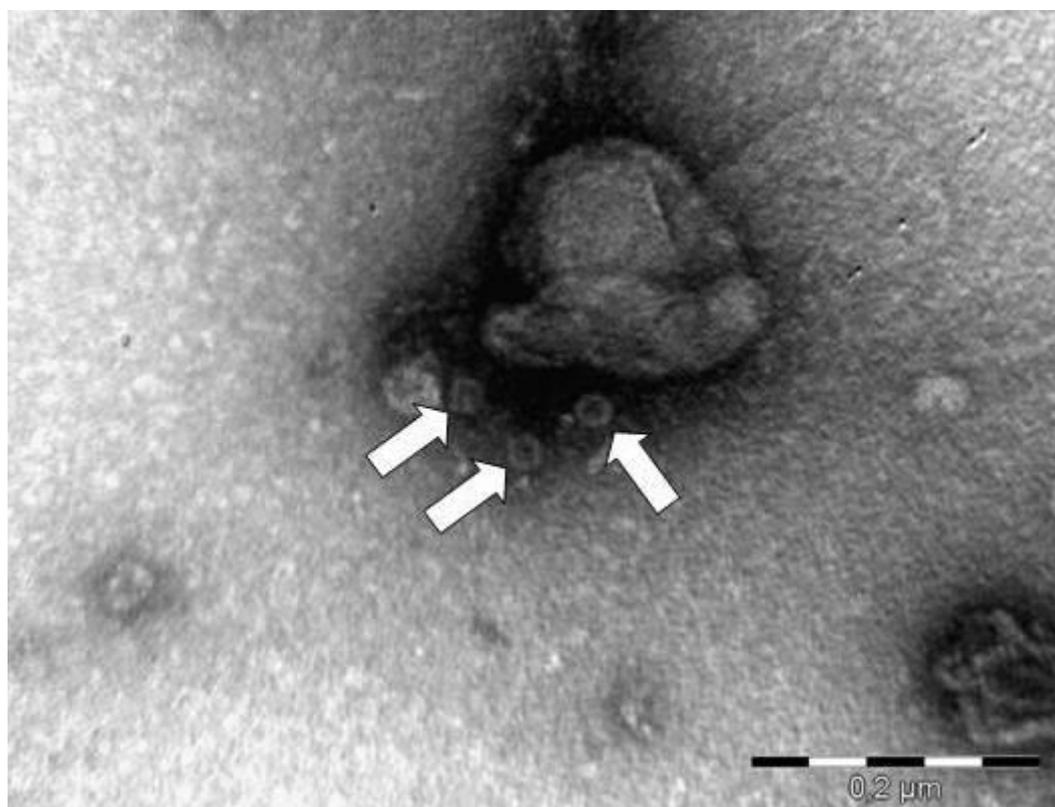


Figura 23 - Observação de um micovírus, vírus com genoma de RNA fita dupla (RNAfd), no fungo filamentoso, isolado CL3, *Colletotrichum fragariae*. Imagem de 0,2 µm. Foto: Francisco Tanaka – Esalq (2013).

Nesta pesquisa, reportamos a presença de partículas virais dsRNA isométricas em guaraná (Figura 23). Figueirêdo et al. (2012) reportou, pela primeira vez, a presença de partículas virais encontradas em *C. gloeosporioides*, agente causal da antracnose no caju (*Anacardium occidentale* L.). Ainda comenta que, uma vez provada a hipovirulência de *C. gloeosporioides*, mais pesquisas podem ser realizadas de modo a permitir o uso dessa descoberta como uma alternativa de controle biológico em *A. occidentale*.

Logo, micovírus encontrados em fungos fitopatogênicos têm sido reportados como uma alternativa para ser usado como agente de controle biológico contra doenças em plantas. No caso, deve ser uma questão de estudo aprofundado e novos estudos *in vitro* e *in vivo* deverão ser realizados visando o controle da antracnose no guaraná.

4.9 Inoculação *in vivo*

4.9.1 Inoculação *in vivo* do *Colletotrichum* com e sem micovírus.

Como observado na Tabela 15, o patógeno sem o micovírus foi significativamente diferente em comparação ao patógeno com o micovírus, apresentando maior patogenicidade que o *Colletotrichum*, possuidor de vírus Nas folhas de *P.cupana* e com a ausência do micovírus, os sintomas da antracnose, tais como lesões necróticas com coloração marrom-avermelhada, encrestamento das folhas e necrose foram expostos de forma ampla.

Tabela 15 – Sintomas da inoculação *in vivo* de *C. gloeosporioides* sem e com micovírus nas folhas jovens de *P. cupana*. Casa de vegetação da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Manaus – AM.

Patógenos	Sintomas (cm)
<i>C. gloeosporioides</i> (com micovírus)	0,92 b
<i>C. gloeosporioides</i> (sem micovírus)	2,43 a
<i>C. gloeosporioides</i> (com e sem micovírus)	0,70 b
Controle	0,00 c

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, para cada patógeno.

O patógeno com micovírus demonstrou resultados menos significativos, mas foram resultados essenciais para observar que a presença do micovírus no patógeno, torna esse patógeno hipovirulento, pois não permitiu que a colonização e os sintomas da antracnose causados pelo patógeno fossem expressados como eles foram nas folhas inoculadas com o patógeno que não tem o micovírus. De alguma forma, comenta Tiago e Furlaneto (2002), esses micovírus não estão latentes e têm ampla participação na expressão da característica analisada, a virulência.

O controle, ou seja inoculação sem o patógeno, como esperado, foi diferente dos dois patógenos, ou seja, zero de sintomas. Por outro lado, a inoculação conjunta dos patógenos com e sem micovírus em uma mesma folha, não se diferenciou estatisticamente da com o hipovirulento (patógeno com o micovírus), mostrando que o patógeno que tem o micovírus reduziu o efeito do altamente patogênico (patógeno sem micovírus), não permitindo que o *C. gloeosporioides* colonizasse de forma ampla as folhas de *P. cupana*.

Figueirêdo et al. (2012) comentam que, em muitos casos, esses micovírus estão associados com a hipovirulência de fitopatógenos fúngicos e por isso, podem se tornar um método alternativo de controle biológico (DALZOTO et al., 2006). A presença de RNA fita dupla (RNAdf) e partículas virais em fungos pode estar associada a diversas alterações fenotípicas nos hospedeiros. Muitos autores observaram alterações na virulência de fungos fitopatogênicos, geralmente a hipovirulência e a revisão de Ghabrial et al. (2009) apresenta uma série de casos em que a presença de micovírus reduz a patogenicidade de fungos que atacam plantas. O mesmo deve estar ocorrendo em nossa pesquisa com *Colletotrichum*, que pode ter tido sua patogenicidade modificada pela presença de RNAdf.

Geralmente RNAs fita dupla são latentes ou crípticos, mas em alguns casos, fenótipos particulares são observados em fungos que contêm esses micovírus, como alterações na patogenicidade, principalmente hipovirulência. Dalzoto et al. (2006) obtiveram resultados interessantes com o entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Em bioensaio contra percevejo marrom da soja, *Euschistus heros*, uma linhagem de *B. bassiana* com RNAdf foi menos virulenta que a isogênica, o que evidencia o caráter de hipovirulência do RNAdf neste fungo.

Em *Colletotrichum*, há registros da presença de RNAdf associado a partículas virais descrito por Rawlinson et al., em 1975 e por Figueirêdo et al. (2012). Entretanto, muitos estudos concentram-se apenas na detecção da presença destes micovírus. Enquanto a ação que eles podem exercer na morfologia ou fisiologia de fungos ainda não foi investigada. E o *Colletotrichum* é um dos fungos fitopatogênicos principais descritos no Brasil.

Embora haja muitos relatos sobre RNAs dupla fita em fungos, o significado biológico dessas micoviroses, incluindo sua influência na patogenicidade e/ou influência no fenótipo do hospedeiro, ainda é incerto para a maioria dos casos. Conseqüentemente, essas infecções têm gerado grande interesse e têm se tornado alvo de extensas pesquisas, especialmente em fitopatógenos em que há um grande potencial na utilização de RNAs dupla fita como agentes de controle biológico, utilizando a hipovirulência que estes vírus podem conferir a estes fungos.

4.9.2 Contronto *in vivo* dos fungos antagonistas contra o patógeno *C. gloeosporioides*.

O patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, inoculado sozinho, colonizou e causou lesões foliares em *P. cupana*, de forma agressiva e diferente de todos os outros tratamentos, como podemos observar na Tabela 16.

As inoculações com os endofíticos *P. verruculosum*, *G. candidum*, *A. flavus*, *P. pinophilum*, *S. commune* realizadas nas mudas de *P. cupana* não produziram lesões foliares após o período de incubação. Desse modo, verificou-se que esses fungos não são patogênicos em folhas de *P. cupana* e podem ser utilizados em testes de antagonismo em viveiros florestais. Segundo Azevedo (1998), estabelecer um limite que defina qual microrganismo é o endofítico e qual é o patógeno é complexo, sendo que, algumas vezes, certos endofíticos que não causam sintomas aparentes em determinado hospedeiro podem agir como patógenos em outros.

No controle biológico, a doença não é só a interação entre patógeno e hospedeiro, mas o resultado da interação entre patógeno, hospedeiro e uma série de microrganismos não patogênicos que também repousam no sítio de infecção. O papel desses microrganismos não patogênicos seria de limitar ou aumentar a atividade do patógeno, ou a resistência do hospedeiro (REMUSKA et al., 2009).

Ademais, podemos também observar que os fungos endofíticos *P. verruculosum*, *G. candidum*, *A. flavus* e *P. pinophilum* apresentaram efeito antagônico ao *Colletotrichum gloeosporioides*, sendo que o isolado *S. commune* apresentou efeito antagônico menor aos demais (Tabela 16). Nas pesquisas de Júnior et al. (2013), eles também encontraram fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* com efeito antagônico, mas contra *Botrytis cinerea*.

Tabela 16–Sintomas da inoculação, *in vivo*, de *C. gloeosporioides* de fungos endofíticos nas folhas jovens de *P. cupana*. Casa de vegetação da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Manaus – AM.

Tratamentos	Sintomas (cm)
Controle	0,00 d
<i>Penicillium verruculosum</i>	0,00 d
<i>Geotrichum candidum</i>	0,00 d
<i>Aspergillus flavus</i>	0,00 d
<i>Penicillium pinophilum</i>	0,00 d
<i>Schizophillum commune</i>	0,00 d
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	2,65 a
<i>P. verruculosum</i> + <i>C. gloeosporioides</i>	0,90 c
<i>G. candidum</i> + <i>C. gloeosporioides</i>	1,09 c
<i>A. flavus</i> + <i>C. gloeosporioides</i>	0,96 c
<i>P. pinophilum</i> + <i>C. gloeosporioides</i>	0,89 c
<i>S. commune</i> + <i>C. gloeosporioides</i>	1,68 b

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, para cada patógeno.

Bettiol (1991) e Kupper et al. (2003) relatam que a eficácia dos antagonistas *in vitro* ou *in vivo* (casa de vegetação) não corresponde à garantia de redução de doenças no campo e pode ser insuficiente para estabelecer o limiar de população exigida para um biocontrole no campo, mas, com certeza, pode servir como indicador da viabilidade no controle de fitopatógenos sob condições naturais de infecção.

A partir desses resultados preliminares de antagonismo por meio do método de pareamento de culturas, pode-se evidenciar o potencial de controle de alguns fungos endofíticos. E assim, com base nesses ensaios, cria-se a expectativa de que, se aumentássemos a quantidade do fungo antagonista em relação à população natural do fungo patógeno, combinado com a maior frequência de aplicações no seu tempo ideal, seria possível aumentar, também, as possibilidades de sucesso de biocontrole da antracnose. Entretanto, embora os endófitos antagonistas não tenham demonstrado patogenicidade contra o guaranazeiro, sua aplicação no controle biológico tem que ser precedida por testes para estudo de outras propriedades que possam ser prejudiciais. Sabe-se, por exemplo, que um dos antagonistas ensaiados, o *A. flavus*, possui linhagens que apresentam produção de toxinas cancerígenas, como a aflatoxina. Se esta linhagem produzir tal toxina, ela não seria recomendada para o biocontrole, especialmente em plantas como o guaranazeiro usada na fabricação de bebidas e medicamentos. Futuros estudos poderão também indicar qual ou quais princípios ativos nestes antagonistas endofíticos possam ser purificados e utilizados como fungicidas com amplas possibilidades de uso agrícola.

CONCLUSÕES FINAIS

- Foram isolados 522 fungos endofíticos do guaranazeiro, provenientes de plantas dos municípios de Manaus e de Maués, sendo 278 isolados oriundos das folhas, 179 dos ramos, 65 da rizosfera; vários deles podem apresentar propriedades de valor biotecnológico.
- No teste de patogenicidade, foram identificados os isolados *C. gloeosporioides* e *C. fragariae*, como patógenos de *P. cupana*. Por meio de testes morfológicos a diferença entre as duas espécies não puderam ser separadas mas processos moleculares indicaram tratar-se de duas espécies distintas.
- Nos testes de confronto interespecíficos *in vitro* contra o *C. gloeosporioides*, os isolados *Penicillium verruculosum*, *Geotrichum* sp., *Schizophyllum commune*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium pinophilum* foram identificados como potenciais fungos antagonistas de *C. gloeosporioides*. Novamente a importância do uso de testes moleculares e morfológicos permitiu neste último caso classificação das espécies *Schizophyllum commune* e *Geotrichum candidum* não classificados como espécies por técnicas moleculares.
- A ocorrência de bandas RNA fita dupla (dsRNA) foi observada no isolado *C. gloeosporioides*. E nos testes *in vivo* na casa de vegetação, o patógeno sem o micovírus demonstrou resultado estatisticamente significativo possuindo maior patogenicidade em relação ao com vírus que mostrou uma hipovirulência o que é importante para o controle biológico de doenças como a antracnose.
- As inoculações com os endofíticos *P. verruculosum*, *G. candidum*, *A. flavus*, *P. pinophilum*, *S. commune* realizadas nas mudas de *P. cupana* não produziram lesões foliares após o período de incubação. Desse modo, verificou-se que esses fungos não são patogênicos em folhas de *P. cupana* e podem ser utilizados em testes de antagonismo em viveiros florestais, desde que não apresentem outros efeitos prejudiciais como produção de toxinas.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, T.B.; Joseph, C.M.; Yang, G.; Phillips, D.A.; Nelson, L.M. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 10, p. 916-924. 2001.
- ALBUQUERQUE, F.C. Antracnose do guaraná. **Boletim Técnico do Instituto Agronômico do Norte**. Belém, p.1-33. 1960.
- ALEXOPOULOS, C.J.; Mims, C.W.; Blakwell, M. **Introductory Mycology**, 40o. Ed. New York: John Wiley & Sons Inc. 869p. 1996.
- ALFENAS, A.C.; Ferreira, F.A. Inoculação de fungos fitopatogênicos. In: Alfenas, A.C.; Mafia R.G. (Eds.). **Métodos em Fitopatologia**. Ed. UFV. Viçosa. 382p. 2007.
- ALMEIDA, W. K. D. S. Antagonismo de *Trichoderma viride* sobre fungos fitopatogênicos, *Colletotrichum* spp., *Cercospora musae* e *Asperisporium caricae* em fruteiras tropicais. **Rev. Bras. Agroec.**, v. 4, n. 2. 2009.
- AMORIM, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho (Eds.). **Manual de Fitopatologia**.4ª. edição. Piracicaba: **Agron. Ceres**.704p. 2011.
- ANGELO, P.C.S. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), an anciently consumed stimulant from the Amazon Rain Forest: the seeded-fruit transcriptome. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 117-124. 2008.
- ANVISA. **Resolução de Normas Técnicas Especiais – CNNPA**, n. 12. 1978. Disponível em:< www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78_guarana.htm>. Acesso em: 10 de março de 2012.
- ARAÚJO, W.L.; Lacava, P.T.; Andreote, F.D.; Azevedo, J.L. Interaction between endophytes and plant host: biotechnological aspects. **Plant Microbe Interactions**. 2008.
- ARAÚJO, W.L.; Lima, A.O.S.; Azevedo, J.L.; Marcon, J.; Sobral, J.K.; Lacava, P.T. **Manual: isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: ESALQ. 86p. 2002.
- ARX, J.A.Von. Die arten des galtung *Colletotrichum*. Berlim: **Phytopathologisch Zeitschrift**. N. 29, p. 413-68. 1957.
- ARX, J.A.Von. **The genera of fungi sporulating in pure culture**. 2o. Ed. Vaduz: J. Cramer. 351p. 1974.

ATROCH, A.L. Avaliação e seleção de progênies de meios irmãos de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) utilizando caracteres morfo-agronômicos. **Tese de Doutorado**. Manaus: INPA/UFAM. 2009.

ATROCH, A.L. Situação da cultura do guaraná no Estado do Amazonas. In: ATROCH, A.L. (Ed). Reunião técnica da cultura do guaraná, 1. Manaus, AM, 6 a 9 de novembro, 2000. **Anais**. Manaus, Embrapa Amazônia Ocidental. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, n. 16). 2001.

AZEVEDO, A.C.S.; Sosa-Gómez, D.R.; Faria, M.R.; Fungaro, M.H.P. Effects of double-stranded RNA on virulence of *Paecilomycesfumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the silverleaf whitefly, *Bemisiatabaci* strain B (Homoptera: Aleyrodidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 01, p. 61-63. 2000.

AZEVEDO, J.L.; Araújo, W.L. Genetically modified crops: environmental and human health concerns. **Mut. Res.**,N. 544, p. 223–233. 2003.

AZEVEDO, J.L.; Maccheroni, W.; Araújo, W.L.; Pereira, J.O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: Serafini, L.A.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L. (Orgs.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS. 433p. 2002.

BADALYAN, S.M.; Innocenti, G.; Garibyan, N.G. Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereal in dual culture. **Phytopatol. Medit.**, N. 41, p. 200-225. 2002.

BAILEY, J. A.; O'Connell, R. J.; Pring, R. J.; Nash, H. C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: Bailey, J. A.; Jeger, M. J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International. p. 88-120. 1992.

BAILEY, J.A.; Jeger, M.J. **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. CABI: Wallingford UK, 388p. 1992.

BAKER, K.F.; Cook, R.J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W.H. Freeman. 433p. 1974.

BAKER, K.F.; Cook, R.J.; The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, Minnesota: APS Press, **American Phytopathological Society**. 539p. 1983.

BARNETT, H.L.; Hunter, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3o.Ed. Burgess Publishing Company. Minneapolis. 241p. 1972.

BARTNICKI-GARCIA, S. Hyphal tip growth; outstanding questions. In: Osiewacz, H.D. (Eds.) **Molecular Biology of Fungal Development**. Marcel Dekker, New York, USA, p. 29-58. 1999.

BARY, A. de. **Holmeister's Handbook of Physiological Botany**, v. II, Leipzig.1866.

BEDENDO, I.P.; Massola N.S.; Amorim, L. Controles Cultural, Físico e Biológico de Doenças de Plantas. In: Amorim, L., Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho (Eds.). **Manual de Fitopatologia**.4ª. edição. Piracicaba: Agron. Ceres. 704p. 2011.

BENTES, J.L.S.; Barreto, R.W. Reavaliação taxonômica de *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque. Agente causal da antracnose do guaranazeiro. **Acta Amazônica**. N. 34, v.1, p. 129-131. 2004.

BENTES, J.L.S.; Matsuoka, K. Histologia da interação *Colletotrichum guaranicola* e *Paullinia cupana* var. *sorbilis* em clones resistente e suscetível. **Rev. Fit. Bras.** N. 27, V.1. 2002.

BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In: Bettiol, W. (Org.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Embrapa – CNPDA, p. 223-236. Jaguariúna. 1991.

BLODGETT J.T.; Swart, W.J.; Louw, S.M.; Weeks, W.J. Soil amendments and watering influence the incidence of endophytic fungi in *Amaranthus hybridus* in South Africa. **Applied Soil Ecology**, N.35, p. 311-318. 2007.

BORGES, W.S.; Borges, K.B.; Bonato, P.S.; Pupo, M.T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, n. 12, v. 13, p.1137-1163. 2009.

BORGES, W.S.; Pupo, M.T. Novel anthraquinone derivatives produced by *Phoma sorghina*, an endophyte found in association with the medicinal plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**. São Paulo, v. 17, n. 5: 929-934. 2006.

BRAGA, M.O.; Spessoto, A.M. Produção de antimicrobianos por bactérias endofíticas isoladas de *Cordia verbenacea* (erva-baleeira). **BioFar Revista de Biologia e Farmácia**, n. 2, v.3, p. 82-86. 2008.

CAMPANILE, G.; Ruscelli, A.; Luisi, N. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by *in vitro* and in plant test. **Eur. Jour. Plant Pathol.**, n. 117, p. 237-246. 2007.

CARROLL, G.C. Fungal endophytes in stem and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecol.**, n.69, p. 2–9. 1986.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungal in sterile distilled water for the researchers. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, p. 181-184, 1967.

CLAY, K. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. **Ecology**, n. 69, v. 1, p. 10-16. 1988.

DALE, J.L.; Manners, J.M.; Irwin, J.A.G. *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing different anthracnose diseases on *Stylosanthes* in Australia carry distinct double-stranded RNAs. **Transactions of the British Mycological Society**, n. 91, p. 671-676. 1988.

DALZOTO, P.R.; Glienke-Blanco, C.; Kava-Cordeiro, V.; Ribeiro, J.Z.; Kitajima, E.W.; Azevedo, J.L. Horizontal transfer and hypovirulence associated with double-stranded RNA in *Beauveria bassiana*. **Mycological Research** n. 11: 1475-1481. 2006.

DEMAIN, A.L.; Sanchez, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The journal of antibiotics**, v. 62, p. 05-16. 2009.

DENOYSES, B.; Baudry, A. Species identification and pathogenicity of french *Colletotrichum* strains isolated from strawberry using morphological and cultural characteristics. St. Paul-Minnesota USA. **Phytopathology**, n.85, p. 53-57. 1995.

DUARTE, M.L.R. **Doenças de plantas do trópico úmido brasileiro e plantas industriais**. Belém: Edição da EMBRAPA Amazônia Oriental. 30p. 1999.

DUARTE, M.L.R.; Albuquerque, F.C.; Corrêa, M.P.F. Variações morfológicas e fisiológicas em isolamentos de *Colletotrichum guaranicola*. Brasília: **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p.141-144. 1995.

DUCKE, A. Diversidade dos guaraná. **Rodriguésia**, p.155-156. 1937.

DUFFY, B.; Schouten, A.; Raaijmakers, J.M. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. **Annual Review Phytopathology**, v. 41, p. 501-538. 2003.

EL-DIASTY, E. M.; Salem, R. M. Incidence of lipolytic and proteolytic fungi in some milkproducts and their public health significance. **Journal of Applied Sciences Research**, v.3, n. 12, p. 1684-1688, 2007.

ELIAS, L. A.; Azevedo, J.L.; Marcon, J.; Gomes, L.H.; Lira, S.P. Compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos contra o crescimento micelial de fungos do gênero *Colletotrichum*. Resumo 527-1. XXI ALAM. **Anais**. Acesso em 21 de setembro de 2014. Disponível em: <<http://www.sbmicrobiologia.org.br/cdlatino/resumos/R0527-1.html>>

ESPOSITO, E.; Azevedo, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul. EDUCS. Segunda Edição 638p. (2010)510p. 2004.

FARIA, J.J.P. **Manual de Produção do Guaraná**. Edição SEBRAE. Cuiabá. 2000.

FERRAZ, C.L.A. *Paullinia weinmanniaefolia* Mart. (Sapindaceae). Morfologia externa e anatomia foliar. Rio de Janeiro: **Dissertação de Mestrado**, 50p. 1980.

FIGUEIRÊDO, L.C.; Figueirêdo, G.S.; Giancoli, A.C.H.; Tanaka, Francisco, A.O.; da Silva, L. A.O.; Kitajima, E.W.; Astolfi-Filho, S.; Azevedo, J.L. Detection of isometric, dsRNA-containing viral particles in *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from cashew tree. Short Communication. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 2, p. 142-142. 2012.

FRANCISCO NETO, E.; Oliveira, J. C. de; Centurion, M. A. P. C.; Nakamura, K. Influência da idade da folha, da luz e do método de inoculação na infecção de *Passiflora* por *Colletotrichum gloeosporioides*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 21, n. 1, p. 25-30, 1995.

FRAZZON, A. P.G.; Vaz Junior, I.S.; Masuda, A.; Schrank, A.; Vainstein, M.H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus micropus*. **Veterinary Parasitology**, v. 94, p. 117-125. 2000.

GARCIA, A. **Bioprospecção e caracterização citológica e molecular de fungos endofíticos isolados de folhas de *Sapindus saponaria* L.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, 2009.

GARDES, M.; BRUNS, T. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular Ecology**, n. 02, v. 2, p. 113-118. 1993.

GENBANK. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em <www.Acesso em: 10 de outubro de 2013>.

GHABRIAL, S.A. ; Suzuki, N. Viruses of plant pathogenic fungi. *Annual Review Phytopathology* v.47, p.353-384, 2009.

GONÇALVES, J.R.C. Observações sobre doenças e pragas do guaraná no Estado do Amazonas. Belém. IPEAN. **Culturas da Amazônia**, v.2, n.1. 1968.

GUIMARÃES, D.O. Produtos naturais de fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae e ensaio antibiótico no modelo de infecção em *Caenorhabditis elegans*. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2009.

GUIMARÃES, D.O.; Momesso, L.S.; Pupo, M. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**. Aceito. 2009.

GUNNEL, P.S.; GUBLER, W.D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. Lancaster: **Mycologia**, v. 84, n. 2, p.157-65. 1992.

HANADA, R.E. Controle de *Phytophthora palmivora*, agente causal da podridão-parda dos frutos de cacauero com fungos endofíticos. Manaus-AM: **Tese de Doutorado**. UFAM. 120p. 2006.

HANLIN, R.T.; Menezes, M. **Generos ilustrados de actinomicetos**. Universidade Rural de Pernambuco. Recife. 274p. 1996.

HARTLEY, C. **Damping-off in forest nurseries**. U.S.Dept. Agric. Bull., v. 934, p. 1-99. 1921.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimensions of biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycol. Res.**, n. 95, p. 641-655. 1991.

HENMAN, A.R. Guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) ecological and social perspective on an economic plant of Central Amazon basin. **Journal of Ethnopharmacology**, v.6, p. 311-338. 1986.

IBGE. **Economia**. Disponível em <www.ibge.gov.br/home> Acesso em: 10 mar 2012. 2012.

KENNEDY, D.O. Improved cognitive performance and mental fatigue following a multi-vitamin and mineral supplement with added guarana (*Paullinia cupana*). **Appetite** **50**, p. 506-513. 2008.

KILIC, O.; Griffin, G. Effect of dsRNA-containing and dsRNA-free hypovirulent isolates of *Fusarium oxysporum* on severity of *Fusarium* seedling disease of soybean in naturally infested. **Plant and Soil**, n. 201, p. 125-135. 1998.

KIRK, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J. A. Dictionary of the Fungi 10th Ed. CABI Europe-UK 771p. (2008)

KUMARESAN, V.; Suryanaryanan, T. S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. **Mycology Research**, v. 105, n. 11, p. 1388-1391, 2001.

KUPPER, K.C.; Fernandes, N.G.; Goes, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 251-257. 2003.

KWON, S-J.; Cho, S-Y.; Lee, K-M.; Yu, J.; Son, M.; Kim, K-M. Proteomic analysis of fungal host factors differentially expressed by *Fusarium graminearum* infected with *Fusarium graminearum* virus-DK21. **Virus Research**, n.144, p. 96-106. 2009.

LACAP, D.C.; Liew, E.C.Y.; Hyde, K.D. An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. **Fungal Diversity**, n. 12, p. 53-66. 2003.

LEGNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. Nelson, D.L.; Cox, M.M. (Eds.). Sarvier. 4ª. Edição. 1202p. 2006.

LEITE, C.L.; Groposo, C.; Drescheler-Santos, E.R.; Figueiredo, N.F.; Godinho, P.S.; Abrão, R.L. A particularidade de ser um fungo: I – Constituintes celulares. **Biotemas**, n. 19, v. 2, p. 17-27. 2006.

LU, C. G.; Liu, W.C.; Qiu, J.Y.; Wang, H. M.; Liu, T.; Liu, de W. Identification of an antifungal metabolite produced by a potential biocontrol actinomyces strain AO1. **Braz. Journal of Microbiology**, n. 39, p. 701-707. 2008.

LU, H.Y.; Zou, W.X.; Meng, J.C.; Hu, J.; Tan, R.X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annual*. **Plant Science**, v. 151, p.67-73. 2000.

LUI, J.Y.; Song, Y.C.; Zhang, Z.; Wang, L.; Gui, Z.J.; Zou, W.X.; Tan, R.X. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, v. 114, n. 3, p. 279-287. 2004.

MACHADO, O. Contribuição ao estudo das plantas medicinais do Brasil: o guaraná, **Rodriguésia**. Rio de Janeiro, n.9, v. 20, p. 89-110. 1946.

McCABE, O.M.; Pfeiffer, P.; Van Alfen, N. The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 9: 377-381. 1999.

MALATHI, P.; Viswanathan, R.; Padmanaban, P.; Mohanraj, D.; Sundar, A.R. detoxification of *Colletotrichum falcatum* toxin. **Current Science**, v. 83, n. 6, p. 745-749. 2002.

MALINOWSKI D.P., Belesky, D.P. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. **Crop. Sci.**,n. 40, p. 923-940. 2000.

MARAVALHAS, N. Casca do Guaraná – matéria-prima para cafeína – método industrial de extração. In: Maravalhas, N. **Estudos sobre o guaraná e outras plantas produtoras de cafeína**. Manaus. INPA-Química, n. 10, p. 05–11. 1965.

MELLADO, E.G.; Dubreucq, P.M.; Sarfati, J.; Paris, S.; Diaquin, M.; Holden, D.W.; Rodriguez-Tudela, J.L.; Latg, J.P. Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (chsG-chsE-) of *Aspergillus fumigatus*. **Fungal Genetics and Biology**, n. 38, p. 98-109. 2003.

MELO, I.S. Potencialidade de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. **Controle Biológico**. Ed. EMBRAPA. Jaguariúna, v.1, 1999.

MENDES R.; Kuklinsky-Sobral J.; Geraldi I.O.; Araújo W.L.; Azevedo J.L.; Pizzirani-Kleiner, A.A. Monitoring soybean endophytic fungal community associated with glyphosate.

Anais. In: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu, Sociedade Brasileira de Microbiologia, São Paulo, Brasil, p. 242. 2001.

MENDES, R.; AZEVEDO, J.L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A.M. (Org.). **Micologia: avanços no conhecimento**, p. 129-140. Recife: UFPE. 2007.

MENEZES, M. Biological and taxonomic aspects of *Colletotrichum* species. **Fitopatologia Brasileira**, n. 27, p. 23-24. 2002.

MITCHELL, T.K.; Alejos-Gonzalez, F.; Gracz, H.S.; Danehower, D.A.; Daub, M.E.; Chilton, W.S. Xanosporic acid, an intermediate in bacterial degradation of the fungal phototoxin cercosporin. **Phytochemistry**, v. 62, n. 5, p. 723-732. 2003.

MORETTI, P.E. **Projeto Microrganismos: Fungo.** Disponível em <http://www.fam.br/microrganismos/microfun_citologia.htm>. Acesso em 16 de março de 2012. 2003.

MUNIZ, M.F.S.; Santos, R.C.R.; Barbosa, G.V.S. Patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre algumas plantas frutíferas. **Summa Phytopathologica**, n. 24, p. 177-179. 1998.

NASCIMENTO FILHO, F.J.; Atroch, A.L.; Pereira, J.C.R.; Araújo, J.C.A. BRS-Cereçaporanga: nova cultivar para o agronegócio do guaraná. Manaus – AM. **Comun. Técnico**, n. 56. 2007.

NETO, P.Q.C. Caracterização molecular de fungos endofíticos e patogênicos *Colletotrichum* spp. isolados de guaranazeiro (*Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (mart.) Ducke). Manaus, AM: **Tese de doutorado**, UFAM, 108p. 2009.

ORLANDELLI, R.C.; Almeida, T.T.; Azevedo, J.L.; Pamphile, J.A. Produção da enzima protease por fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Piper hispidum*. **Anais.** Encontro Internacional de Produção Científica. VII EPCC. 2011.

PEARSON, M.N.; Beever, R.E.; Boine, B.; Arthur, K. Mycovirus of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, n. 10. 2009.

PELCZAR, M.; Reid, R.; Chan, E.C.S. **Microbiologia**. Volumes 1 e 2. São Paulo. McGraw-Hill. 1996.

PEREIRA, J.C.R. **Pesquisa com guaranazeiro na EMBRAPA Amazônia Ocidental: status atual e perspectivas**. Manaus: EMBRAPA Amazônia Ocidental,. 246p. 2007.

PEREIRA, J.O.; Azevedo, J.L.; Petrini, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia**, n. 85, p. 362-364. 1993.

PEREIRA, R.M.F.V. Caracterização morfológica, fisiológica, serológica e eletroforética de *Colletotrichum gloeosporioides* Sensu Arx, isolados de pimentão (*Capsicum annum* L.) e jiló (*Solanum gilo* Radd.) e seu controle químico. 1995. Piracicaba: **Tese de Doutorado**. ESALQ, 155p.

PETRINI, O. **Microbial Ecology of Leaves**. Andrews, J., and Hirano, S.S. (Eds.), Springer-Verlag, New York, p. 179–197. 1991.

PHOTITA, W.; Taylor, P.W.J.; Ford, R.; Hyde, K.D.; Lumyong, K. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. **Fungal Diversity**, n. 18, p. 117-133. 2005.

PIETERSE, C.M.; Van Loon, L.C. NPR1: The spider in the web of induce resistance signaling. **Current Opinion in Plant Biol.**, n. 7,p. 456-464. 2004.

PILEGGI, S.A.V. Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. 2006.

PIRES, J.M. Guaraná e Cupana. **Revist. Soc. Agron. Veter.** Pará, Belém, n.1, v. 3, p. 9-20. 1949.

POLLI, A.D.; Rhoden, S.A.; Garcia, A.; Polonio, J.C.; Santos, C.M.; Pamphile, J.A. Teste de antagonism utilizando fungos endofíticos isolados de folhas de *Mikaria glomerata* Spreng. (Asteracea) contra o fitopatógeno *Colletotrichum* sp. **Anais**. VIII Encontro Internacional de Produção Científica. UNICESUMAR. Maringá, Paraná. 2013.

PUNJA, Z.K.; Utkhede, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnonology**, v. 21, n. 9, p.400-407. 2003.

PURI, S.C.; Nazir, A.; Chawla, R.; Arora, R.; Riyaz-Ul-Hasan, S.; Amnaa, T.; Ahmeda, B.; Verma, V.; Singh, S.; Sagar, R.; Sharma, A.; Kumar, R.; Sharma, R.K.; Qazi, G.N.The

endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 494-510, 2006.

RANG, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M. **Farmacologia**. 4a.edição. Guanabara Koogan. 350p. 2001.

RAWLINSTON, C.J.; Carpenter, J.M.; Muthyalu, G. Double-stranded RNA virus in *Colletotrichum lindemuthianum*. **Transactions of the British Mycological Society**, n. 65, p. 305-330. 1975.

REDMAN, R.S.; Dunigan, D.D.; Rodriguez, R.J. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? **New Phytol.**, n. 151, p. 705-716. 2001.

REMUSKA, A.C.; Pria, M.D. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. **Publicatio UEPG Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, v. 13, n. 03, p. 31-36. 2009.

RODRIGUEZ, R.; Redman R.; Kim Y.O. Conferring stress tolerance and yield enhancement to crops via symbiosis as a strategy for diminishing regulatory processes. **Entomological Research**, n. 37; v.1, Suppl.: A73. 2007.

ROMEIRO, R. S. **Controle Biológico de Doenças de Plantas: fundamentos**. Viçosa: Ed. UFV. 269p. 2007.

RUBINI, M.R.; Silva-Ribeiro, R.T.; Pomella, A.W.V.; Maki, C.S.; Araújo, W.L.; Santos, D.R.; Azevedo, J.L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**. v. 1, p. 24-33. 2005.

SAIKKONEN, K.; Wäli, P.; Helander, M.; Faeth, S.H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, Issue 6, p. 275-280. 2004.

SEBASTIANES, F. L. S.; Cabedo, N.; El Aouad, N.; Valente, A. M. M. P.; Lacava, P. T.; Azevedo, J. L.; Pizzirani-Kleiner A. A.; Cortes, D. 3-Hydroxypropionic Acid as an Antibacterial Agent from Endophytic Fungi *Diaporthe phaseolorum*. **Curr. Microbiol.**, n. 65: 622-632. 2012.

SCHIMP, F.C. ; Silva J.F. ; Gonçalves, J.F.C. ; Mazzafera, P. Guaqrana : revisting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology** v. 150, p.14-31, 2013

SCHULZ, B. Endophyte fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, n.9, v. 106, p. 996-1004, 2002.

SIA, E.F.; Marcon, J.; Luvizotto, D.M.; Quecine, M.C. ; Tsui, S.; Pereira, J.O. ; Pizzirani-Kleiner, A.A. ; Azevedo, J.L. Endophytic fungi from the Amazon plant paullinia cupana and from *Olea europaea* isolated using cassava as an alternative starch media source. **Springer Plus** v.2, p.579-589, 2013.

SMITH, B.J.; Black, L.L. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. **Plant Disease**,n. 74, p. 69-76. 1990.

SONG, Y.C.; Li, H.; Ye, Y.H.; Shan, C.Y.; Yang, Y.M.; Tan, R.X. Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase SW 1116 cell and some microbial growths. **FEMS Microbiology Letters**, n. 01, v. 241, p. 67-72. 2004.

SOUZA, A.Q.L.; Souza A.D.L.; Astolfi-Filho S.; Balém-Pinheiro L.; Sarquis M.M.; Pereira J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Paucicorea longiflora* and *Strychnos cogens*. **Acta Amazonica**, n. 34, p. 185-195. 2004.

STIERLE, A.; Strobel, G, Stierle, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces Andreanae* an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**. New York, v. 260, p. 214-216. 1993.

STROBEL S.A.; Strobel G.A. Plant endophytes as a platform for discovery-based undergraduate science education. **Nat. Chem.Biol.**, n. 3, p. 356-359. 2007.

STROBEL, G.A., Dirksie, E., Sears, J., Markworth, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**,n. 147, p. 2943-2950. 2001.

STROBEL, G.A.; Daisy, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 491-502. 2003.

STURZ, A.V.; Christie, B.R.; Matheson, B.G. Association of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 162-167. 1998.

SUFRAMA. **Desenvolvimento Regional**. 2003. Disponível em <www.suframa.gov.br/zfm_principal.cfm> Acesso em: 12 de março de 2012. 2012.

SUTTON, B.C. **The Coleomycetes**. Surrey: Common Wealth Mycological Institute. 696p. 1980.

SUTTON, B.C. The Genus *Glomerella* and it's anamorph *Colletotrichum*, p. 1-26. In: BAILEY, J.A., Jeger, M.J. (Eds.) **Colletotrichum: biology, pathology and control**. CAB International, Wallingford, U.K. 1992.

TIAGO, P.V.; FURLANETO, M.C. Ocorrência de RNA Fita Dupla (RNAfd) em fungos entomopatogênicos. **Revista do Programa de Ciências Agro-Ambientais**, Alta Floresta, v.1, n.1, p. 17-22. 2002.

VAN WETTER, M.A.; Wösten, H.A.B.; Sietsma, J.H.; Wessels, J.G.H. Hydrophobin gene expression affects hyphal wall composition in *Schizophyllum commune*. **Fungal Genetics and Biology**, n. 31, p. 99-104. 2000.

VASCONCELOS, A.; NASCIMENTO. J.C.; MAIA. A.L. A cultura do guaraná. 25p. 1972.

WEBER, R.W.; Stenger, O.; Meffert, A.; Hahn, M. Brefeldin. A production by *Phoma medicaginis* in dead pre-colonized plant tissue: strategy for habitat conquest? **Mycological research**, v. 108, p. 662-671. 2004.

WHITE, J.F.; Cole, G.T. Endophyte-host associations in forage grasses. II. Taxonomic observations on the endophyte of *Festuca arundinacea*. **Mycologia** 77:483-486. 1985.

WICHTL, M. Herbal drugs and phytopharmaceuticals: **A handbook for practice on a scientific basis**. 3ª. Ed., p. 434-437. 2004.

WILSON, D.; Carroll, G.C. Avoidance of high-endophyte space by gall- forming insects. **Ecol.**, p. 2153-2163. 1997.

WIYAKRUTTA, S. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 265-272, 2004.

YANG, X., Zhang, L.; Guo, B.; Guo, S. Preliminary study of vincristine producing endophytic fungus isolated from leaves of *Catharanthus roseus*. **Zhongcaoyao**, n. 35, v.01, p. 79-81. 2004.

YU, X.; Li, B.; Fu, Y.; Jiang, D.; Ghabrial, S.A.; Li, G.; Peng, Y.; Xie, J.; Cheng, J.; Huang, J.; Yi, X. A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 107, p. 8387-8392. 2010.

ZHANG, H.W., Song Y.C.; Tan R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Nat. Prod. Rep.** n. 23, p. 753-771. 2006.

ANEXOS

ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
HQ645081.1	Colletotrichum gloeosporioides strain JX-12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	896	896	92%	0.0	99%	
GU944855.1	Sordariomyces sp. MD4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	896	896	92%	0.0	99%	
GU972122.1	Colletotrichum gloeosporioides clone m9 18S ribosomal RNA gene, pai	896	896	92%	0.0	99%	
HM016726.1	Colletotrichum gloeosporioides clone m6 18S ribosomal RNA gene, pai	896	896	92%	0.0	99%	
GU810909.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate ED(W) 18S ribosomal RNA gene	896	896	92%	0.0	99%	
GU965659.1	Colletotrichum gloeosporioides strain CCGH01 18S ribosomal RNA gene	896	896	92%	0.0	99%	
GU126590.1	Colletotrichum gloeosporioides clone 12 18S ribosomal RNA gene, par	896	896	92%	0.0	99%	
GU126496.1	Colletotrichum gloeosporioides clone 18 18S ribosomal RNA gene, par	896	896	92%	0.0	99%	
GU126487.1	Colletotrichum gloeosporioides clone 4 18S ribosomal RNA gene, parti	896	896	92%	0.0	99%	
GU126482.1	Colletotrichum gloeosporioides clone 9 18S ribosomal RNA gene, parti	896	896	92%	0.0	99%	
GU126486.1	Colletotrichum gloeosporioides clone 8 18S ribosomal RNA gene, parti	896	896	92%	0.0	99%	
GU126485.1	Colletotrichum gloeosporioides clone 7 18S ribosomal RNA gene, parti	896	896	92%	0.0	99%	
GU126488.1	Colletotrichum gloeosporioides clone 10 18S ribosomal RNA gene, par	896	896	92%	0.0	99%	
F459916.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate T33 18S ribosomal RNA gene, i	896	896	92%	0.0	99%	
F459917.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate T35 18S ribosomal RNA gene, i	896	896	92%	0.0	99%	
EU211076.1	Glomerella cingulata isolate A2 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	896	896	92%	0.0	99%	
EU209593.1	Colletotrichum gloeosporioides strain QP961 18S ribosomal RNA gene	896	896	92%	0.0	99%	
AF249526.1	Glomerella cingulata genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S	896	896	92%	0.0	99%	
AF249525.1	Glomerella cingulata genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S	896	896	92%	0.0	99%	
AF249524.1	Glomerella cingulata genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S	896	896	92%	0.0	99%	
H0874975.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate JB.L.VC6 18S ribosomal RNA gene	891	891	92%	0.0	99%	
FN866224.1	Colletotrichum gloeosporioides 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S r	891	891	92%	0.0	99%	
FN822681.1	Colletotrichum gloeosporioides strain CD5 18S ribosomal RNA gene, p	891	891	92%	0.0	99%	
FN835223.1	Uncultured fungus 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and ;	891	891	92%	0.0	99%	
FN836222.1	Uncultured fungus 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and ;	891	891	92%	0.0	99%	
FN836139.1	Uncultured fungus 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and ;	891	891	92%	0.0	99%	
FN836140.1	Uncultured fungus 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and ;	891	891	92%	0.0	99%	
FN836137.1	Uncultured fungus 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and ;	891	891	92%	0.0	99%	
HQ645072.1	Colletotrichum gloeosporioides strain Hbwh1 18S ribosomal RNA gene	891	891	92%	0.0	99%	
GU934320.1	Colletotrichum tropicale strain Z1080 18S ribosomal RNA gene, parti	891	891	92%	0.0	99%	
GU933880.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate CO7009 18S ribosomal RNA gene	891	891	92%	0.0	99%	
EU1149818.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate F1014 18S ribosomal RNA gene	891	891	92%	0.0	99%	

Anexo 1- Análises das sequências do fungo controle *C. gloeosporioides* (CL1) pela comparação das sequências depositadas no bando de dados Gene Bank, demonstrando taxa de similaridade de 99 % com a espécie do fungo *C. gloeosporioides*.

```
>gb|HQ645081.1 Colletotrichum gloeosporioides strain JX-12 18S ribosomal RNA
gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S
ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete
sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=580

Score = 896 bits (485), Expect = 0.0
Identities = 497/503 (99%), Gaps = 0/503 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 43  TGGGGGCTTCGCGGTAGAGTCCCTCCGGATCCAGTCCGAGACGTAAGTTGCTACGC 102
Sbjct 504  TGGGGGCTTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCAGTCCGAGACGTAAGTTACTACGC 445

Query 103 AAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACATCAGCTGTAGGGCCC 162
Sbjct 444  AAAGGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACATCAGCTGTAGGGCCC 385

Query 163 CAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATG 222
Sbjct 384  CAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAATG 325

Query 223 CTGGCGGGCGCAATGTGCGGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAAITCTGCAAITCACAIT 282
Sbjct 324  CTGGCGGGCGCAATGTGCGGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAAITCTGCAAITCACAIT 265

Query 283 ACTTATCGCAITTCGCTGCGGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAA 342
Sbjct 264  ACTTATCGCAITTCGCTGCGGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAA 205

Query 343 GTTTTGATTATTTGCTTGTACCACTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGGTTATC 402
Sbjct 204  GTTTTGATTATTTGCTTGTACCACTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGGTTATC 145

Query 403 CTCGGCGGGCGCCGACCCGCCCGGAGGCGGGAGGCGGGAGGTCGCGGAGACCCCTACC 462
Sbjct 144  CTCGGCGGGCGCCGACCCGCCCGGAGGCGGGAGGCGGGAGGTCGCGGAGACCCCTACC 85

Query 463 CGCCGAAGCAACAGTTATAGGTATGTTACAAAGGGTTGTAGAGCGTAAACTCAGTAATG 522
Sbjct 84  CGCCGAAGCAACAGTTATAGGTATGTTACAAAGGGTTGTAGAGCGTAAACTCAGTAATG 25

Query 523 ATCCCTCCGAGGTTACCTACG 545
Sbjct 24  ATCCCTCCGAGGTTACCTACG 2
```

Anexo 2- Análises das sequências do fungo controle *C. gloeosporioides* (CL1) pela comparação das sequências depositadas no bando de dados Gene Bank, demonstrando a semelhança de 497 dentre 503 bases, o que equivale a 99 % de similaridade com a espécie do fungo *C. gloeosporioides*.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AF141262.1	Colletotrichum fragariae isolate CF63 18S ribosomal RNA gene, partial	791	791	96%	0.0	95%	
AF141263.1	Colletotrichum fragariae strain LC0220 internal transcribed spacer 1,	800	800	93%	0.0	95%	
EF512328.1	Colletotrichum sp. Vega242 internal transcribed spacer 1, partial seq	798	798	93%	0.0	95%	
AF511773.1	Colletotrichum fragariae isolate LA26 18S ribosomal RNA gene, partial	798	798	93%	0.0	95%	
DQ002030.1	Colletotrichum fragariae strain CF-75 18S ribosomal RNA gene, partial	797	797	92%	0.0	95%	
EU669303.1	Colletotrichum fragariae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; r	785	785	91%	0.0	95%	
EF972390.1	Colletotrichum sp. Vega398 internal transcribed spacer 1, partial seq	800	800	94%	0.0	95%	
GU810510.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate CBE(Ro) 18S ribosomal RNA gene	811	811	95%	0.0	95%	
F7984939.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate SL1a(9) 18S ribosomal RNA gene	795	795	93%	0.0	95%	
F2683089.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate N440a(11) 18S ribosomal RNA	793	793	92%	0.0	95%	
AF341372.1	Colletotrichum fragariae isolate GDO-7-349-Mexico 18S ribosomal RNA	793	793	93%	0.0	95%	
HQ188923.1	Colletotrichum fragariae strain 6846 18S ribosomal RNA gene, partial	787	787	92%	0.0	95%	
AY505089.1	Colletotrichum fragariae isolate M35-R-Mexico 18S ribosomal RNA gene	784	784	92%	0.0	95%	
F1122290.1	Colletotrichum fragariae strain ATCC MYA-4443 18S ribosomal RNA gene	780	780	91%	0.0	95%	
GU124546.1	Colletotrichum fragariae culture-collection JOMP-17914 18S ribosomal	804	804	94%	0.0	94%	
DQ002029.1	Colletotrichum fragariae strain CF-63 18S ribosomal RNA gene, partial	804	804	94%	0.0	94%	
AF323312.1	Colletotrichum fragariae 18S rRNA gene, 5.8S rRNA gene, 28S rRNA c	804	804	94%	0.0	94%	
H8018355.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate CMM1827 18S ribosomal RNA gene	806	806	94%	0.0	94%	
F1310010.1	Colletotrichum fragariae strain ATCC MYA-4442 18S ribosomal RNA gene	800	800	94%	0.0	94%	
EF572322.1	Colletotrichum sp. Vega381 internal transcribed spacer 1, partial seq	800	800	94%	0.0	94%	
DQ004492.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate L38 18S ribosomal RNA gene, r	800	800	94%	0.0	94%	
DQ004493.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate P-1 18S ribosomal RNA gene, r	800	800	94%	0.0	94%	
AF451205.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate CS69 18S ribosomal RNA gene,	800	800	94%	0.0	94%	
GU091034.1	Colletotrichum theobromicola strain G2506_S1 internal transcribed sp	798	798	94%	0.0	94%	
F2002021.1	Colletotrichum gloeosporioides strain PP143 18S ribosomal RNA, intern	798	798	94%	0.0	94%	
EU724579.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate GMB6 internal transcribed spac	798	798	94%	0.0	94%	
H8018798.1	Colletotrichum gloeosporioides clone N6 18S ribosomal RNA gene, par	782	782	93%	0.0	94%	
H8018793.1	Colletotrichum gloeosporioides clone H4 18S ribosomal RNA gene, par	782	782	93%	0.0	94%	
EF572284.1	Colletotrichum sp. Vega274 internal transcribed spacer 1, partial seq	795	795	94%	0.0	94%	
EU181644.1	Glonerella conigata isolate L66 18S ribosomal RNA gene, partial seq.	795	795	94%	0.0	94%	
H8026166.1	Fungal endophyte isolate NBEF6 contain 18S ribosomal RNA gene, int	793	793	95%	0.0	94%	
GU334620.1	Colletotrichum sp. HS-EF13 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	791	791	95%	0.0	94%	
GU828202.1	Colletotrichum tropicale strain Z1080 18S ribosomal RNA gene, partial	789	789	95%	0.0	94%	
GU066871.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate 1148M/T 18S ribosomal RNA gene	789	789	95%	0.0	94%	

Anexo 3- Análises das sequências do fungo controle *C. fragariae* (CL3) pela comparação das sequências depositadas no bando de dados Gene Bank, demonstrando taxa de similaridade de 95 % com a espécie do fungo *C. fragariae*.

```

>gb[AF411767.1] Colletotrichum fragariae isolate CF63 18S ribosomal RNA gene,
partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal
RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence;
and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=512

Score = 791 bits (428), Expect = 0.0
Identities = 478/501 (95%), Gaps = 0/501 (2%)
Strand=Plus/Minus

Query 43   AAA-TGGTGGGTGTTTTACGGCAAGAGTCCCTCC-G-CCCTCTTGTGCGAGACGTAAGC 99
Sbjct 502   AAATTGG-GGG-GTTTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCC-C-AGTGCAGACGTAAGT 447

Query 100  TGCTACGCACAGGAGGCTCCGGAAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACTTCACCTG 159
Sbjct 446   TACTACGCARAGAAGGCTCCGGAAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCCTACTTCAGCTG 387

Query 160  TAGGGCCCAACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACTCGAACAGGCATGCCCA 219
Sbjct 386   TAGGGCCCAACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCG 327

Query 220  CCAAAATGCTGGCGGGGCAATGTGCGTTCAAATATTCAATGATTCACTGAATTCGCAA 279
Sbjct 326   CCAGAAATGCTGGCGGGGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCGCAA 267

Query 280  TTCACATTACTTATCGCATTTCGCTCGCGTCTTCATCGATGCCAGAACCAACAGATCCG 339
Sbjct 266   TTCACATTACTTATCGCATTTCGCT-CGGTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCG 208

Query 340  TTGTTAAAAGTTTTGATTATTTGCTTGTACCCTCAGAAAGAACGTCGTTAAAACAGAGT 399
Sbjct 207   TTGTTAAAAGTTTTGATTATTTGCTTGTACCCTCAGAAAGAACGTCGTTAAAACAGAGT 148

Query 400  TTGGTTATCCTCCGGGGGGCGCCAGCCCGCCCGgggggggCGGGAGGCCGGGAGGGTCACG 459
Sbjct 147   TTGGTTATCCTCCGGGGGGCGCCAGCCCGCCCGGGGGGGCGGGAGGCCGGGAGGGTCACG 88

Query 460  GGGACCTACCCGCGAAGCAACAGTTGTAGGTATGTTCAAAAAGGTTGTAGAGCGTAA 519
Sbjct 87    GGGACCTACCCGCGAAGCAACAGTTGTAGGTATGTTCAAAAAGGTTGTAGAGCGTAA 28

Query 520  ACTCAGTAGTATCCCTCCGC 540
Sbjct 27   ACTCAGTAATGATCCCTCCGC 7

```

Anexo 4 - Análises das sequências do fungo controle *C. fragariae* (CL3) pela comparação das sequências depositadas no bando de dados Gene Bank, demonstrando a semelhança de 478 dentre 501 bases, o que equivale a 95 % de similaridade com a espécie do fungo *C. fragariae*.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E-value	Per ident	Links
F452516.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate T33 18S ribosomal RNA gene, f	802	808	92%	0.0	95%	
F452517.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate T35 18S ribosomal RNA gene, f	802	808	92%	0.0	95%	
F1566872.1	Colletotrichum gloeosporioides 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S r	802	802	92%	0.0	95%	
FJ459238.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate C1014-4 18S ribosomal RNA ge	802	802	92%	0.0	95%	
G1264555.1	Sordariomycetes sp. N44 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	802	802	92%	0.0	95%	
G1267322.1	Colletotrichum gloeosporioides clone m9 18S ribosomal RNA gene, pa	802	802	92%	0.0	95%	
H8016738.1	Colletotrichum gloeosporioides clone m6 18S ribosomal RNA gene, pa	802	802	92%	0.0	95%	
GU812028.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate ED(Ne) 18S ribosomal RNA gen	802	802	92%	0.0	95%	
G2085569.1	Colletotrichum gloeosporioides strain CCG-PR1 18S ribosomal RNA ge	802	802	92%	0.0	95%	
GQ120480.1	Colletotrichum gloeosporioides clone 12 18S ribosomal RNA gene, par	802	802	92%	0.0	95%	
GQ120486.1	Colletotrichum gloeosporioides clone 18 18S ribosomal RNA gene, par	802	802	92%	0.0	95%	
GQ120482.1	Colletotrichum gloeosporioides clone 4 18S ribosomal RNA gene, parti	802	802	92%	0.0	95%	
GQ120485.1	Colletotrichum gloeosporioides clone 8 18S ribosomal RNA gene, parti	802	802	92%	0.0	95%	
GQ120483.1	Colletotrichum gloeosporioides clone 7 18S ribosomal RNA gene, parti	802	802	92%	0.0	95%	
GQ120484.1	Colletotrichum gloeosporioides clone 10 18S ribosomal RNA gene, par	802	802	92%	0.0	95%	
AF921138.1	Colletotrichum gloeosporioides 18S rRNA gene (partial), 5.8S rRNA ge	802	802	92%	0.0	95%	
FJ320091.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate NW639 18S ribosomal RNA gen	802	802	92%	0.0	95%	
FJ459232.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate T72 18S ribosomal RNA gene, f	802	802	92%	0.0	95%	
FJ459230.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate T64 18S ribosomal RNA gene, f	802	802	92%	0.0	95%	
FJ320050.1	Colletotrichum coffeanum isolate NW322 18S ribosomal RNA gene, ps	802	802	92%	0.0	95%	
FJ320078.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate NW562a 18S ribosomal RNA ge	802	802	92%	0.0	95%	
FJ271026.1	Glomerella cingulata isolate A2 18S ribosomal RNA gene, partial sequ	802	802	92%	0.0	95%	
FJ200455.1	Colletotrichum gloeosporioides strain QP091 18S ribosomal RNA gen	802	802	92%	0.0	95%	
AB255235.1	Glomerella cingulata genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S	802	802	92%	0.0	95%	
AB218923.1	Glomerella cingulata genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S	802	802	92%	0.0	95%	
AB218924.1	Glomerella cingulata genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S	802	802	92%	0.0	95%	
AB112029.1	Colletotrichum gloeosporioides 18S rRNA gene (partial), 5.8S rRNA ge	802	802	92%	0.0	95%	
H2824929.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate 30-LV3 18S ribosomal RNA ge	800	800	92%	0.0	95%	
H2645088.1	Colletotrichum gloeosporioides strain 3X-12 18S ribosomal RNA gene,	800	800	92%	0.0	95%	
GQ414345.1	Colletotrichum gloeosporioides strain SDAU-08-80 18S ribosomal RNA	800	800	92%	0.0	95%	
GQ120487.1	Colletotrichum gloeosporioides clone 9 18S ribosomal RNA gene, parti	800	800	92%	0.0	95%	
H2645090.1	Fungal sp. SV1103 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; stran	788	798	92%	0.0	95%	
H2645082.1	Colletotrichum gloeosporioides strain 3X-19 18S ribosomal RNA gene,	788	798	92%	0.0	95%	
H2645080.1	Colletotrichum gloeosporioides strain 3X-7 18S ribosomal RNA gene, r	788	798	92%	0.0	95%	

Anexo 5– Análises das sequências do fungo reisolado do guaraná - L1E pela comparação das sequências depositadas no bando de dados Gene Bank, demonstrando taxa de similaridade de 95 % com a espécie do fungo *C. gloeosporioides*.

```

> [gb|FJ459916.1] Colletotrichum gloeosporioides isolate T33 18S ribosomal RNA
gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S
ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete
sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=575

Score = 808 bits (437), Expect = 0.0
Identities = 484/507 (95%), Gaps = 2/507 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 40 TGGGGGGTTCGCGGCTAGAGTCCCTCCGGATCCCACATGCGACACGTCAGTTCGTACGC 99
      |||
Sbjct 505 TGGGGGGTTCACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTGCAGACGTAAGTACTACGC 446
      |||

Query 100 CGAGCGACGCTCCGGAGAGGTCGCGCACTACCTTTGAGGGCTACTCCGCTGTGGGCG 159
      |||
Sbjct 445 AAAG-GAGGCTCCGGAG-GGTCCGCACTACCTTTGAGGGCTACTCGGCTGTAGGGC 388
      |||

Query 160 CCCAACACCAACCAAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAA 219
      |||
Sbjct 387 CCCAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAA 328
      |||

Query 220 TGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACA 279
      |||
Sbjct 327 TGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACA 268
      |||

Query 280 TTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCCTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTATA 339
      |||
Sbjct 267 TTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCCTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTATA 208
      |||

Query 340 AAGTTTTGATTATTTGCTTGTACCACTCACAAAAACGTCCTTAAATCAGAGTGTGGTTA 399
      |||
Sbjct 207 AAGTTTTGATTATTTGCTTGTACCACTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTGTGGTTA 148
      |||

Query 400 TCCTCCGGCGGGCGCCGACCCGCCGGAGGGGGAGGCCGGGAGGGTTCGCGGAGACCCCTA 459
      |||
Sbjct 147 TCCTCCGGCGGGCGCCGACCCGCCGGAGGGGGAGGCCGGGAGGGTTCGCGGAGACCCCTA 88
      |||

Query 460 CCGCGGAAGCAACAGTTATAGGTATGTTCAAAAGGGTTGTAGAGCGTAAACTCAGTAA 519
      |||
Sbjct 87 CCGCGGAAGCAACAGTTATAGGTATGTTCAAAAGGGTTGTAGAGCGTAAACTCAGTAA 28
      |||

Query 520 TGATCCCTCCGAGGTTACCTACGGA 546
      |||
Sbjct 27 TGATCCCTCCGAGGTTACCTACGGA 1
      |||

```

Anexo 6– Análises das sequências do fungo reisolado do guaraná - L1E pela comparação das sequências depositadas no bando de dados Gene Bank, demonstrando a semelhança de 484 dentre 507 bases, o que equivale a 95 % de similaridade com a espécie do fungo *C. gloeosporioides*.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Hit ident	Links
U054308.1	Colletotrichum fragariae strain LC0220 internal transcribed spacer 1,	845	845	92%	0.0	98%	
EF972328.1	Colletotrichum sp. Vega242 internal transcribed spacer 1, partial seq	843	843	92%	0.0	98%	
DQ003029.1	Colletotrichum fragariae strain CF-75 18S ribosomal RNA gene, partia	841	841	91%	0.0	98%	
FJ050285.1	Colletotrichum fragariae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; i	839	839	90%	0.0	98%	
EF972325.1	Colletotrichum sp. Vega398 internal transcribed spacer 1, partial seq	836	834	93%	0.0	98%	
F286859.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate SL1a(9) 18S ribosomal RNA ge	837	837	92%	0.0	98%	
AJ394132.1	Colletotrichum fragariae isolate GRO-7-349-Mexico 18S ribosomal RN	837	837	92%	0.0	98%	
F296502.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate NA40a(11) 18S ribosomal RNA	835	835	91%	0.0	98%	
U0488923.1	Colletotrichum fragariae strain 6946 18S ribosomal RNA gene, partial	830	830	91%	0.0	98%	
AY505089.1	Colletotrichum fragariae isolate M35-R-Mexico 18S ribosomal RNA ge	828	828	91%	0.0	98%	
GU174588.1	Colletotrichum fragariae culture-collection ICMP:17814 18S ribosoma	848	848	93%	0.0	97%	
DQ003029.1	Colletotrichum fragariae strain CF-63 18S ribosomal RNA gene, partia	848	848	93%	0.0	97%	
AJ320312.1	Colletotrichum fragariae 18S rRNA gene, 5.8S rRNA gene, 28S rRNA c	848	848	93%	0.0	97%	
AF411723.1	Colletotrichum fragariae isolate LA26 18S ribosomal RNA gene, partia	832	832	92%	0.0	97%	
AF411722.1	Colletotrichum fragariae isolate CF63 18S ribosomal RNA gene, partia	832	832	92%	0.0	97%	
H0315853.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate CMM1827 18S ribosomal RNA g	843	843	93%	0.0	97%	
J281510.1	Colletotrichum fragariae strain ATCC MYA-4442 18S ribosomal RNA g	843	843	93%	0.0	97%	
EF972322.1	Colletotrichum sp. Vega381 internal transcribed spacer 1, partial seq	843	843	93%	0.0	97%	
DQ084692.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate L38 18S ribosomal RNA gene, p	843	843	93%	0.0	97%	
DQ084691.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate P-1 18S ribosomal RNA gene, p	843	843	93%	0.0	97%	
AF411805.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate C589 18S ribosomal RNA gene,	843	843	93%	0.0	97%	
GU984352.2	Colletotrichum theobromicola strain G506_53 internal transcribed sp	843	843	93%	0.0	97%	
F286860.1	Colletotrichum gloeosporioides strain PP143 18S ribosomal RNA, inten	843	843	93%	0.0	97%	
EU734579.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate GM86 internal transcribed spac	843	843	93%	0.0	97%	
GU815227.1	Colletotrichum gloeosporioides strain TEN1 18S ribosomal RNA gene,	838	838	92%	0.0	97%	
EF972326.1	Colletotrichum sp. Vega274 internal transcribed spacer 1, partial seq	838	839	93%	0.0	97%	
DQ184543.1	Glomerella cingulata isolate L66 18S ribosomal RNA gene, partial seq.	837	837	93%	0.0	97%	
GU810510.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate CBE(Ro) 18S ribosomal RNA ge	841	841	94%	0.0	97%	
GU284520.1	Colletotrichum sp. HS-EF13 18S ribosomal RNA gene, partial sequenc	835	835	94%	0.0	97%	
DQ184544.1	Glomerella cingulata isolate L46 18S ribosomal RNA gene, partial seq.	832	832	93%	0.0	97%	
H057032.1	Fungal endophyte sp. q24 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	830	830	93%	0.0	97%	
F2020453.1	Glomerella cingulata isolate ntub2 internal transcribed spacer 1, part	828	828	93%	0.0	97%	
H0874889.1	Colletotrichum gloeosporioides isolate MM1.1A122 18S ribosomal RN	826	826	93%	0.0	97%	
H0950165.1	Fungal endophyte isolate NBEF6 contain 18S ribosomal RNA gene, int	837	837	95%	0.0	97%	

Anexo 7- Análises das sequências do fungo reisolado do guaraná – L3C pela comparação das sequências depositadas no bando de dados Gene Bank, demonstrando taxa de similaridade de 98 % com a espécie do fungo *C. fragariae*.

```
>[gb|JN943083.1] Colletotrichum fragariae strain LC0220 internal transcribed spacer
1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete
sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence
Length=552

Score = 845 bits (457), Expect = 0.0
Identities = 479/490 (98%), Gaps = 0/490 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GGGGTTTTACGGCAAGATTCCTCCAGATCCCAGTCCGAGACCTACAGTACTACGCACA 60
      |||
Sbjct 492 GGGGTTTTACGGCAAGAGTCCCTCCGGATCCCAGTCCGAGACGTAAGTTACTACGCAAA 433

Query 61 GGACGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCTACATCACCTGTAGGGCCCCAA 120
      |||
Sbjct 432 GGAGGCTCCGGGAGGGTCCGCCACTACCTTTGAGGGCTACATCAGCTGTAGGGCCCCAA 373

Query 121 CACCAAGCAAAAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAAAATGCTG 180
      |||
Sbjct 372 CACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAAAATGCTG 313

Query 181 GCGGGGCAATGTGCGTTCAAAGATTCAATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACT 240
      |||
Sbjct 312 GCGGGGCAATGTGCGTTCAAAGATTCAATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACT 253

Query 241 TATCGCATTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAGTT 300
      |||
Sbjct 252 TATCGCATTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAGTT 193

Query 301 TTGATTATTTGCTTGACCACTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGGTTATCCTC 360
      |||
Sbjct 192 TTGATTATTTGCTTGACCACTCAGAAGAAACGTCGTTAAATCAGAGTTTGGTTATCCTC 133

Query 361 CGCGGGCCGACCCGCCCGGGGGGGCGGGAGGCCGGAGGGTACGSGGGACCCCTACCC 420
      |||
Sbjct 132 CGCGGGCCGACCCGCCCGGGGGGGCGGGAGGCCGGAGGGTACGSGGGACCCCTACCC 73

Query 421 GCCGAAGCAACAGTTGTAGTATGTTACAAAGGGTTGTAGAGCGTAAACTCAGTAATGA 480
      |||
Sbjct 72 GCCGAAGCAACAGTTGTAGTATGTTACAAAGGGTTGTAGAGCGTAAACTCAGTAATGA 13

Query 481 TCCTCCGCA 490
      |||
Sbjct 12 TCCTCCGCA 3
```

Anexo 8- Análises das sequências do fungo reisolado do guaraná – L3C pela comparação das sequências depositadas no bando de dados Gene Bank, demonstrando a semelhança de 479 dentre 490 bases, o que equivale a 98 % de similaridade com a espécie do fungo *C. fragariae*.