

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

MARIA CRISTINA PIRES DE BRUM

**FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Vitis labrusca* L. var. NIAGARA
ROSADA E O SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

MOGI DAS CRUZES, SP

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

MARIA CRISTINA PIRES DE BRUM

**FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Vitis labrusca* L. var. NIAGARA
ROSADA E O SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Tese apresentada ao programa de pós-
graduação integrada da Universidade de
Mogi das Cruzes para obtenção do título
de Doutor em Biotecnologia

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

MOGI DAS CRUZES, SP

2008

FINANCIAMENTO: 

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Brum, Maria Cristina Pires de

Fungos endofíticos de *Vitis labrusca* L. var. Niagara Rosada e o seu potencial biotecnológico / Maria Cristina Pires de Brum -- 2009.

103 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2008

Área de concentração: Biotecnologia aplicada a Recursos Naturais e Agronegócios

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

1. Fungos endofíticos 2. Controle biológico 3. Compostos bioativos 4. *Vitis labrusca* L. Título II. Azevedo, João Lúcio de

CDD 632.96

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

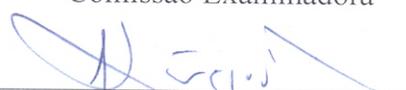
Às dez horas do dia treze de agosto de dois mil e oito, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa da tese "Microorganismos endofíticos de *Vitis labrusca* L. var. Niagara Rosada e o seu potencial Biotecnológico" para obtenção do grau de Doutor pelo(a) candidato(a) **Maria Cristina Pires de Brum**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 72 (setenta e dois), a saber: 36 unidades de crédito em disciplinas e atividades na pós-graduação e 36 unidades de crédito no preparo da Tese, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Doutor. A Comissão Examinadora foi constituída pelos Senhores Professores Doutores João Lúcio de Azevedo, Antonio Carlos Fávero Caires e Elisa Esposito da Universidade de Mogi das Cruzes, Paulo Teixeira Lacava e Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner da Universidade de São Paulo, sob a presidência do primeiro, como orientador da aluna. A Sessão Pública da defesa da Tese foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou a candidata. Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral de seu trabalho, ao final da qual seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir, a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADA por UNANIMIDADE
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

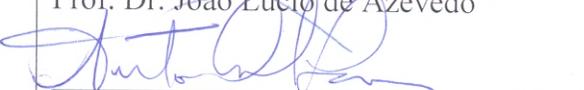
Mogi das Cruzes, 13 de agosto de 2008

Comissão Examinadora

Julgamento


Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

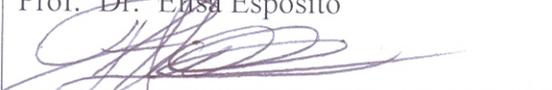
APROVADO
(aprovado(a)/reprovado(a))


Prof. Dr. Antonio Carlos Fávero Caires

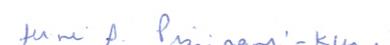
aprovada
(aprovado(a)/reprovado(a))


Prof.^a Dr.^a Elisa Esposito

APROVADA
(aprovado(a)/reprovado(a))


Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

APROVADA
(aprovado(a)/reprovado(a))


Prof.^a Dr.^a Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

aprovada
(aprovado(a)/reprovado(a))

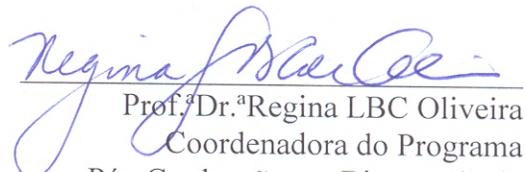
ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às dez horas do dia treze de agosto de dois mil e oito, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa da tese “Microrganismos endofíticos de *Vitis labrusca* L. var. Niagara Rosada e o seu potencial Biotecnológico” para obtenção do grau de Doutor pelo(a) candidato(a) **Maria Cristina Pires de Brum**.

Em adendo, o título da tese, conforme sugestão da banca, foi alterado para “Fungos endofíticos de *Vitis labrusca* L. var. Niagara Rosada e o seu potencial Biotecnológico”, o que deverá constar nas cópias definitivas da tese.

Mogi das Cruzes, 13 de agosto de 2008.


Prof.ª Dr.ª Regina LBC Oliveira
Coordenadora do Programa
Pós-Graduação em Biotecnologia

*Ao meu marido Antonio Gil Vicente de
Bum e aos meus filhos Leon Henrique
Pires de Bum e Isabella Cristina
Pires de Bum, com amor.*

Ofereço

*Aos meus pais Armando de
Nascimento Pires e Maria do Rosário
Pires por toda uma vida de dedicação e
amor.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, que esteve comigo em todos os momentos dessa caminhada. Pelo discernimento, pela paciência e pelas dificuldades transpostas;

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação valiosa e constante, pela confiança e amizade, por sua inestimável sabedoria, a qual contribuiu para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Welington Luís de Araújo pela exaustiva dedicação às discussões e sugestões ao trabalho. Seu apoio e amizade foram fundamentais para o bom desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. Fernando Dini Andreote da EMBRAPA Meio Ambiente pela execução da análise multivariada.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Fávero Caires pelos auxílios prestados na execução dos experimentos.

Ao meu marido Antonio Gil Vicente de Brum pelo companheirismo e apoio.

Aos meus filhos Leon e Isabellinha e minha sobrinha Ohana pelo amor e momentos alegres que as crianças nos proporcionam.

Aos queridos amigos Izildinha Bertolete e Carlos Alberto Valderrama por todo o apoio e carinho.

Aos meus pais Armando e Maria do Rosário e meus queridos irmãos Armando Luiz, Ana Claudia e Eliza Augusta por toda sua generosidade e apoio em todos os momentos.

À querida amiga Maristela Boaceff Ciraulo, pelos ótimos momentos, pela amizade e pela constante ajuda em diversas ocasiões.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos, que muito me auxiliaram no trabalho prático da tese, meu sincero reconhecimento e agradecimento: Almir e Maristela.

Aos amigos do Núcleo Integrado de Biotecnologia pela convivência agradável, pela união e pelos bons momentos que passamos estes anos: Aline (Lininha), Almir; Carol, Emy, Fernanda, Fernanda Helena, Flávia, Luciana, Marília, Maristela (Tela); Tatiane (Taty), Juliana (Jú), Bruno, Corina, Paola, Sara, Marcia, Luiza, Gustavo (Gugu); Carla, Vânia, Fabiana (Fabi), Neilce e Renata Martins.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos da ESALQ pelas dicas valiosas: Joelma Marcon (Jô), Beatriz (Bia), Cris Maki, Rodrigo Mendes; Rodrigo Stuart e Fernando Andreote;

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UMC, pela oportunidade;

À UMC, pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

Endófitos são microrganismos, cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar danos ao hospedeiro e que não desenvolvem estruturas externas visíveis. Estes microrganismos podem proteger a planta hospedeira contra pragas e doenças e tem sido considerados importante fonte de compostos bioativos. Plantas de regiões tropicais apresentam grande diversidade de microrganismos. O Estado de São Paulo é o maior produtor brasileiro de uva de mesa predominando a variedade Niagara Rosada (*Vitis labrusca* L.). Diante do exposto o presente trabalho teve por objetivos: i) Caracterizar e estudar a diversidade de fungos endofíticos associados à Niagara Rosada em vinhedos comercial e agroecológico em duas regiões do Estado de São Paulo; ii) Avaliar o potencial de antagonismo dos endófitos contra *Fusarium* sp. e *Botrytis* sp. e iii) Bioprospecção de fungos capazes de produzir compostos com atividade antimicrobiana. A diversidade de fungos endofíticos isolados foi avaliada por meio de análise morfológica e seqüenciamento do rDNA, e a correlação dos dados ambientais com a ocorrência dos grupos fúngicos (ordens) foi realizada pela Análise de Redundância (RDA). Dessa forma, foram isolados 275 fungos endofíticos, sendo a comunidade fúngica de *Vitis labrusca* L. composta por isolados pertencentes aos filos Ascomycota e Basidiomycota. A diversidade genética dentro desta comunidade é grande, e os gêneros mais freqüentemente encontrados foram: *Alternaria*, *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Daldinia*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Nodulisporium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma* e *Schizophyllum*. Nas folhas, foi observada maior freqüência de isolamento (F.I.) que em caule, porém, isolados de caule apresentam maior capacidade de antagonismo a fungos fitopatogênicos. A cultura agroecológica apresentou valores de F.I., em tecido foliar, maiores que os encontrados em videiras em cultura comercial. A temperatura foi o fator mais importante atuando tanto na quantidade quanto na composição de fungos endofíticos da comunidade fúngica de *V. labrusca* var. Niagara Rosada. Nos experimentos de antagonismo, *in vitro*, contra *Fusarium* sp. e *Botrytis* sp., foi observada maior porcentagem de inibição e intensidade nas reações contra *Botrytis* sp. Foram testados os extratos brutos de 78 endófitos contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Xanthomonas axonopodis* e *Candida albicans*. O isolado 2J2DFT6 produziu um composto com potente atividade antimicrobiana, capaz de inibir fortemente a levedura e as bactérias testadas. A análise filogenética do isolado 2J2DFT6 evidenciou que este pertence ao gênero *Fusarium* sendo possivelmente da espécie *Fusarium solani*. A extração do composto bioativo com solventes orgânicos evidenciou que a fase clorofórmio preservou bioatividade, e a análise por *Fourier Transform Infrared - Attenuated Total Reflectance* (FTIR/ATR) apresentou bandas características de ésteres contendo radicais cíclicos alifáticos, como ocorre nos derivados contendo esqueletos taxólicos. O presente trabalho é o primeiro estudo realizado com videiras da espécie *V. labrusca* com relação à comunidade de fungos endofíticos em uvas de mesa.

Palavras chave: fungos endofíticos; *Vitis labrusca*; biocontrole, compostos bioativos.

ABSTRACT

Endophytic fungi are those, cultivable or not, that live in the inner plant parts causing no harm to host and that do not develop external structures, excluding in this way mycorrhizal fungi. These fungi may protect the host plant against diseases and pests and have been considered an important source for bioactive compounds. Previous studies have shown that plants from tropical areas present a great microbial diversity, which could be exploited for biotechnological purposes. The State of São Paulo is the major Brazilian producer of table grape, mainly the Niagara Rosada (*Vitis labrusca* L.) variety. Therefore, the objectives of the present work were: i) evaluate the fungal endophytic community associated to stems and leaves of *V. labrusca* cultivated in agro ecological and conventional orchards; ii) evaluate the ability of these endophytic fungi to inhibit *Fusarium* sp. and *Botrytis* sp. and iii) evaluate the ability of most frequent fungi to inhibit pathogenic bacteria. The endophytic fungal diversity was evaluated by morphological and molecular analysis. The correlation of this genetic and physiological diversity with environmental data was evaluated by Redundancy Analysis (RDA). Endophytic fungi (275 isolates) were consistently isolated from stems and leaves and showed that this community is composed by the Ascomycota and Basidiomycota phylum, being *Alternaria*, *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Daldinia*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Nodulisporium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma* and *Schizophyllum* the most frequent genera. The isolation frequency (IF) in leaves was higher than in stems. However, the population obtained from stems was more efficient to inhibit *Fusarium* sp. and *Botrytis* sp. phytopathogens. The IF from leaves of plants cultivated in agro ecological systems was higher than that cultivated in conventional system. Also, the results showed that the temperature was the most important factor on diversity and density of endophytic community of *V. labrusca* var. Niagara Rosada. The endohytic fungi were able not only to inhibit *Fusarium* sp. and *Botrytis* sp. but also *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Xanthomonas axonopodis* and *Candida albicans*. The isolate 2J2DFT6, which was identified as *Fusarium solani*, produced an antimicrobial compound that was able to inhibit all essayed microorganisms. This compound was partially purified and characterized by Fourier Transform Infrared - Attenuated Total Reflectance (FTIR/ATR) analysis, revealing the esters characteristics with aliphatic cyclic radicals, similiary those observed in compounds containing taxolic scaffold. The present study was the first attempt to reveal the fungi endophytic diversity inside *V. labrusca* cultivated in Brazil.

Keywords: endophytic fungi; *Vitis labrusca*; biocontrol, bioactive compounds.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Média climatológica dos Municípios de Jundiaí e Salesópolis.	37
Tabela 2.	Coleta de fungos endofíticos de videiras da variedade Niagara Rosada, (<i>Vitis labrusca</i>). Trato cultural em Salesópolis (cultura orgânica) e Jundiaí A e B (tradicional), parte da planta de onde foram isolados os endófitos e época da coleta do material vegetal.....	38
Tabela 3.	Cultura comercial.Tratamento Fungicida aplicado nos vinhedos A e B do IAC em Jundiaí.	38
Tabela 4.-	Quantidade de fungos endofíticos estudados por tratamento.	41
Tabela 5.	Componentes e Concentrações Utilizadas nas Reações de PCR.	44
Tabela 6.	Linhagens de bactérias e levedura.	47
Tabela 7.	Freqüência de infecção (F.I.) de fungos endofíticos isolados de videiras <i>Vitis labrusca</i> L var. Niagara Rosada cultivadas em Salesópolis (cultura agroecológica) e Jundiaí vinhedos A e B (cultura comercial), parte da planta de onde foram isolados os endófitos e época da coleta do material vegetal.	50
Tabela 8.	Espécies de fungos endofíticos isolados de <i>Vitis labrusca</i> var. Niagara Rosada. Os códigos T1, T4 e T7 referem-se a tratamento agroecológico (Salesópolis); T2,T5 e T8 tratamento com fungicidas (Jundiaí), e T3, T6 e T9 vinhedo sem receber tratamento fungicida (Jundiaí).	71

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Metodologia empregada para quantificar a velocidade de crescimento dos fungos endofíticos isolados.....	42
Figura 2.	Frequência de infecção de fungos endofíticos em tecidos foliares de Niagara Rosada em relação aos locais amostrados.....	52
Figura 3.	Frequência de infecção de fungos endofíticos em caules de Niagara Rosada em relação aos locais amostrados.....	52
Figura 4.	Frequência de infecção nos diferentes nichos ocupados por fungos endofíticos em Niagara Rosada.....	53
Figura 5.	Análise de redundância (RDA) entre a ocorrência de grupos de fungos endofíticos e os fatores ambientais.....	55
Figura 6.	Grupos morfológicos de fungos endofíticos de Niagara Rosada.....	57
Figura 7.	Frequência de grupos morfológicos.....	58
Figura 8.	Estruturas Fúngicas.....	59
Figura 9.	Gel de eletroforese mostrando a qualidade do DNA total de fungos endofíticos de Niagara Rosada (<i>Vitis labrusca</i>).....	60
Figura 10.	Gel de eletroforese mostrando o padrão de amplificação das regiões ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA de fungos endofíticos isolados de Niagara Rosada (<i>Vitis labrusca</i>).....	60
Figura 11.	Porcentagem de fungos endofíticos isolados nos Filos Basidiomycota e Ascomycota e distribuição dos ascomicetos nas classes Dothideomycetes e Sordariomycetes.....	62
Figura 12.	Porcentagem das Ordens das Classes Sordariomycetes e Dothideomycetes na comunidade fúngica amostrada.....	62
Figura 13.	Dendrograma construído pelo método de <i>Neighbor-joining</i> com base no modelo de Jukes e Cantor para	

	as seqüências da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA de isolados de fungos endofíticos da Ordem Diaporthales.....	63
Figura 14.	Dendrograma construído pelo método de <i>Neighbor-joining</i> com base no modelo de Jukes e Cantor para as seqüências da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA de isolados de fungos endofíticos da Ordem Phyllachorales.....	64
Figura 15.	Dendrograma construído pelo método de <i>Neighbor-joining</i> com base no modelo de Jukes e Cantor para as seqüências da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA de isolados de fungos endofíticos da Ordem Xylariales.....	65
Figura 16.	Dendrograma construído pelo método de <i>Neighbor-joining</i> com base no modelo de Jukes & Cantor (1969) para as seqüências da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA de isolados de fungos endofíticos das Ordens Sordariales e Hypocreales.....	66
Figura 17.	Dendrograma construído pelo método de <i>Neighbor-joining</i> com base no modelo de Jukes & Cantor (1969) para as seqüências da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA de isolados de fungos endofíticos da Ordem Pleosporalles.....	67
Figura 18.	Dendrograma construído pelo método de <i>Neighbor-joining</i> com base no modelo de Jukes e Cantor para as seqüências da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA de isolados de fungos endofíticos da Ordem Botryosphaeriales.	68
Figura 19.	Dendrograma construído pelo método de <i>Neighbor-joining</i> com base no modelo de Jukes e Cantor para as seqüências da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA de isolados de fungos endofíticos do Filo Basidiomycota.....	69
Figura 20.	Experimentos de antagonismo contra <i>Fusarium</i> sp. e <i>Botrytis</i> sp.	74
Figura 21.	Análise de antagonismo de fungos endofíticos contra <i>Botrytis</i> sp.	74
Figura 22.	Porcentagem de fungos endofíticos de <i>V. labrusca</i> L. var. Niagara Rosada com capacidade de inibir <i>Fusarium</i> sp.....	75

Figura 23.	Porcentagem de fungos endofíticos de <i>V. labrusca</i> L. var. Niagara Rosada capazes de inibir <i>Botrytis</i> sp.	75
Figura 24.	Dendrograma construído pelo método de <i>Neighbor-joining</i> com base no modelo de Jukes e Cantor para a seqüência da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA do isolado fúngico endofítico 2J2DFT6 (produtor de composto bioativo).....	77
Figura 25.	Reações de compostos com atividade antimicrobiana produzidos por fungos endofíticos em meio líquido BD (batata dextrose).....	78
Figura 26.	Reações dos compostos extraídos com solventes orgânicos.....	79
Figura 27.	Espectro de infravermelho medido na região de 4000-650 cm ⁻¹	80
Figura 28.	Esquema de esqueleto taxólico, 5 α hidroxí-10 β hidroxí-taxadieno.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BD	Batata dextrose líquido
BDA	Batata dextrose ágar
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESALQ	Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
F.I.	Frequência de Infecção
FTI/ATR	Fourier Transform Infrared - Attenuated Total Reflectance
ITS	Espaçador interno transcrito
LB	Loading buffer (tampão de carregamento)
pb	Pares de bases
PCR	Reação de polimerização em cadeia
rDNA	Ácido desoxiribonucleico ribossomal
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris HCl - EDTA
UV	Ultra violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 CONCEITOS.....	16
1.1.1 Microrganismos endofíticos e sua ocorrência.....	17
1.1.2 Isolamento de microrganismos endofíticos.....	19
1.1.3 Fungos: importância, características e biodiversidade.....	20
1.1.4 Identificação dos fungos endofíticos.....	22
1.1.5 Fungos associados à videira.....	22
1.1.6 Fungos fitopatogênicos e seu controle.....	24
1.1.6.1 <i>Fusarium</i> sp.....	24
1.1.6.2 <i>Botrytis</i> sp.....	25
1.1.7 Interações endófito - planta hospedeira.....	26
1.1.8 Aplicações biotecnológicas dos endófitos.....	28
1.1.8.1 Fungos como agentes de biocontrole de fitopatógenos.....	29
1.1.9 Niagara Rosada (<i>Vitis labrusca</i> L.) origem e características.....	33
1.1.9.1 Classificação botânica.....	33
1.1.9.2 Aspectos econômicos da viticultura.....	34
2 OBJETIVOS	36
3 MÉTODO	37
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	37
3.2 Desinfecção superficial.....	39
3.3 Isolamento de fungos endofíticos de Niagara Rosada.....	39
3.4 Purificação e armazenamento dos fungos isolados.....	40
3.5 Análise morfológica e citológica.....	40
3.6 Crescimento micelial.....	41
3.7 Extração de DNA total.....	42
3.8 Amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA.....	43
3.9 Seqüenciamento.....	44
3.10 Análise multivariada.....	45
3.11 Experimentos de antagonismo.....	45
3.11.1 Linhagens.....	46
3.11.2 Antagonismo.....	46

3.12 Experimentos de antibiose.....	46
3.12.1 Linhagens.....	46
3.12.2 Produção de compostos com atividade antimicrobiana.....	47
3.12.3 Extração de compostos bioativos.....	48
3.12.4 Análise de antibiose do metabólito extraído da linhagem 2J2DFT6.....	48
3.12.5 Caracterização do composto.....	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	50
4.2 Análise Multivariada.....	54
4.3 Análise morfológica.....	54
4.3.1 Análise morfológica macroscópica.....	56
4.3.2 Identificação citológica.....	58
4.4 Caracterização da comunidade de fungos endofíticos de Niagara Rosada.....	59
4.5 Antagonismo.....	72
4.6 Fungos endofíticos produtores de antimicrobianos.....	76
4.6.1 Extração e identificação de compostos bioativos.....	78
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	81
REFERÊNCIAS.....	82
APÊNDICES.....	95

1 INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos são todos aqueles cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar mal ao hospedeiro e que não desenvolvem estruturas externas (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Fungos colonizando plantas internamente têm sido descritos praticamente em todas as espécies examinadas. Embora muitos desses fungos sejam fitopatógenos, um número considerável de isolados são endofíticos e geralmente colonizam os espaços intercelulares e os tecidos vasculares (WILSON, 1995). A diversidade de fungos endofíticos encontrada nas espécies de plantas tropicais tem sido maior do que nas espécies de clima temperado (ARNOLD *et al.*, 2003; AZEVEDO; ARAÚJO, 2007).

Endófitos possuem a capacidade de produzir alterações fisiológicas e outros efeitos benéficos na planta hospedeira, como proteção contra doenças e pragas, aumento da taxa de crescimento pela produção de reguladores de crescimento vegetal, indução de resistência sistêmica contra patógenos, e reduzindo a herbivoria pela produção de substâncias inseticidas no interior da planta. (WHITE & COLE, 1985; WAGNER & LEWIS, 2000; VARMA *et al.*, 1999; AZEVEDO; ARAÚJO, 2007)

Em virtude das vantagens que a planta hospedeira usufrui pela simbiose que mantém com a comunidade endofítica, diversos estudos, inclusive sobre produção de metabólitos secundários com propriedades de interesse da indústria química e farmacêutica, têm sido desenvolvidos (STROBEL & DAISY, 2003; SELOSSE *et al.*, 2004).

Aspectos da biologia e inter-relação de endófitos com seus respectivos hospedeiros fazem parte de um campo vasto e pouco explorado. Desta maneira, informações anteriores sobre determinadas espécies de plantas e sua microbiota associada, podem ser extremamente importantes no direcionamento de pesquisas para produtos bioativos (STROBEL & DAISY, 2003; ZHANG *et al.*, 2006).

O Estado de São Paulo responde pela maior parcela da produção brasileira de uva de mesa, dentre as variedades cultivadas classificadas como uvas do tipo comum de mesa, o cultivo da variedade Niagara Rosada predomina. O isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de plantas hospedeiras ainda não estudadas possibilitam a descoberta de novas espécies com potencial para produzir

novas substâncias de interesse tais como compostos com atividade antimicrobiana que são de extrema importância para indústria farmacêutica, uma vez que as bactérias adquirem resistência aos antibióticos e novas drogas são necessárias para combatê-las. (STROBEL & DAISY, 2003)

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos gerais isolar e caracterizar a comunidade fúngica endofítica da cultivar *Vitis labrusca* L. variedade Niagara Rosada em vinhedos tratados ou não com fungicidas, testar o potencial de antagonismo dos isolados contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium* sp. e *Botrytis* sp. e fazer a bioprospecção de isolados capazes de produzir compostos com atividade antimicrobiana.

1.1 Conceitos

Apesar de os microrganismos endofíticos terem sido mencionados pela primeira vez no início do século XIX, quem primeiro delineou a diferença entre eles e os patógenos de plantas foi Bary (1866). Apenas no século XX no fim dos anos 70, é que os microrganismos endofíticos começaram a adquirir importância, quando foi verificado que eles apresentavam interações simbióticas com o hospedeiro, protegendo as plantas do ataque de insetos, de doenças e de mamíferos herbívoros (PETRINI *et al.*, 1991).

Microrganismos endofíticos, como podem ser chamados, eram considerados quaisquer microrganismos que em pelo menos uma parte do seu ciclo de vida, colonizavam o interior de tecidos vegetais aéreos sem causar danos aparentes à planta hospedeira (CARROLL, 1986; PETRINI *et al.*, 1991). De outra forma mais abrangente, endófitos puderam ser considerados como microrganismos que eram isolados de tecidos vegetais desinfectados superficialmente ou do interior destes, e que não causavam danos aparentes à planta hospedeira (HALLMANN *et al.*, 1997). Apesar de esta definição ter englobado os microrganismos endofíticos que habitam partes internas da planta, ainda não era completo por excluir ou simplesmente omitir as populações microbianas não cultiváveis difíceis de sobreviver em condições de laboratório, e por isso pouco estudadas (ARAÚJO *et al.*, 2003). Ainda, os endófitos

foram definidos como microrganismos que habitam tecidos internos da planta sem causar qualquer efeito negativo imediato (BACON & WHITE, 2000). Uma definição de endófitos mais ampla diz que: Endófitos são todos microrganismos cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar mal ao hospedeiro e que não desenvolvem estruturas externas, excluindo desta maneira bactérias nodulantes e fungos micorrízicos que embora endofíticos, são estudados de maneira separada (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007) e mais recentemente Mendes e Azevedo (2007) propuseram uma redefinição do termo “microrganismo endofítico”, dividindo os endófitos em dois tipos, sendo a) tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta e; b) tipo II, os que produzem estruturas externas à planta. A importância desta divisão reside no fato de que os endófitos que não produzem estruturas externas terem sido até pouco tempo muito menos estudados que os fixadores simbióticos de nitrogênio e fungos micorrízicos; porém, é importante ressaltar que a classificação em microrganismos endofíticos dos tipos I e II, microrganismos epifíticos ou patógenos, tem uma função meramente didática, pois entre endófitos, epífitos e patógenos existe um gradiente que é intrínseco à Biologia de forma geral. Para penetrar nos seus hospedeiros, os endófitos podem viver como epífitos uma parte do tempo; bem como, um microrganismo endofítico, pode se tornar patógeno em uma planta em condições de estresse; e ainda, um epífito, eventualmente pode penetrar em uma planta.

1.1.1 Microrganismos endofíticos e sua ocorrência

Fungos endofíticos foram estudados principalmente em plantas de regiões temperadas, e mais recentemente em plantas das regiões tropicais (AZEVEDO *et al.*, 2002; ARAÚJO *et al.*, 2003).

Todas as espécies vegetais estudadas até o momento apresentaram microrganismos endofíticos (STROBEL & DAISY, 2003). Os estudos sobre endófitos se intensificaram em 1980, e apesar de devidamente comprovada a existência da microbiota endofítica, aspectos ecológicos, genéticos e fisiológicos dessas interações ainda necessitam ser mais bem esclarecidas. O conhecimento da

diversidade desses organismos é de extrema importância, pois eles compõem uma das maiores fontes de diversidade genética disponível entre os seres vivos (PROSSER *et al.*, 2007). Diversas espécies vegetais tais como *Citrus* (ARAÚJO *et al.*, 2001), *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens* (SOUZA & ASTOLFI FILHO., 2004), *Dicksonia sellowiana* (BARROS, 2003), *Bactris gasipaes* (ALMEIDA *et al.*, 2005); *Glicine max* (KUKLINSKY-SOBRAI *et al.*, 2005); *Triticum aestivum* (LARRAN *et al.*, 2002); e *Citrus limon* L. (DURAN *et al.*, 2005), entre outras, já tiveram a sua comunidades endofítica isolada e caracterizada.

A entrada de microrganismos endofíticos na planta se faz por várias vias, e uma das principais é por meio das raízes, por ferimentos causados pelo atrito com o solo durante o crescimento. Outros fungos associados às plantas iniciam seu ciclo de vida com a germinação do esporo seguido do crescimento da hifa na folha ou superfície de raiz, e a penetração destes fungos endofíticos na planta pode ocorrer, até mesmo, por aberturas naturais do hospedeiro como estômatos e hidatódios (WAGNER & LEWIS, 2000). *Piriformospora indica* é um fungo endofítico que pode produzir apressórios que favorecem a penetração nos tecidos da planta hospedeira (VARMA *et al.*, 1999). Entretanto, outros fungos não utilizam apressórios para penetrar na planta hospedeira, seus esporos germinam sobre a planta como milho, crescendo de forma aleatória nesta superfície, onde posteriormente podem penetrar via estômatos ou por entre as células da epiderme através da cutícula. Nesta penetração, deve estar envolvida a ocorrência de ação enzimática a partir das hifas sobre a cutícula dos tecidos do hospedeiro, como ocorre no fungo *Beauveria bassiana*, permitindo assim a sua penetração. Em seguida, o endófito pode se movimentar de forma passiva no interior no hospedeiro, pelo xilema (WAGNER & LEWIS, 2000).

Os endófitos podem colonizar os tecidos vegetais ocupando espaços intercelulares, o interior de tecidos vasculares ou mesmo intracelularmente. Segundo Araújo *et al.* (2003), endófitos podem ser isolados dos mais variados órgãos vegetais como folhas, ramos, caules, raízes e estruturas florais, tais como pólen, ovários, anteras e estames. Entretanto, fungos e bactérias endofíticas parecem apresentar diferentes preferências quanto às regiões da planta hospedeira que colonizam. Fisher *et al.* (1992) isolaram bactérias e fungos endofíticos de três tipos de tecidos (epiderme e córtex do caule e folha) de plantas de milho sadias, e verificaram que as partes das plantas mais próximas ao solo eram mais colonizadas por bactérias que a

parte superior das plantas. Já os fungos endofíticos, parecem colonizar preferencialmente as partes aéreas da planta hospedeira e os espaços intercelulares.

1.1.2 Isolamento de microrganismos endofíticos

O processo de isolamento de microrganismos endofíticos é de suma importância para a caracterização da comunidade endofítica de determinada planta e deve ser realizado criteriosamente de modo que não seja obtido um perfil irreal das comunidades microbianas endofíticas que habitam a planta a ser estudada. Assim, a avaliação de vários fatores deverá preceder o isolamento de microrganismos endofíticos. Segundo Araújo *et al.* (2003) é importante a escolha certa do material vegetal, pois espera-se obter linhagens que colonizem naturalmente a planta e que possam conferir características desejadas ao hospedeiro; a idade da planta, os órgãos e tecidos utilizados para o isolamento. O local e a época da coleta também devem ser considerados.

A produção pela planta de metabólitos de interesse biotecnológico pode ser um fator importante na escolha da planta hospedeira pela possibilidade do endófito ter adquirido geneticamente a capacidade para produzi-los, durante sua coevolução com a planta hospedeira, e esta possibilidade é bastante vantajosa. Segundo Azevedo (1999), a capacidade potencial que os endófitos possuem de produzir fitoquímicos obtidos originalmente da planta hospedeira, permite a produção dos fármacos pelo fungo, por fermentação industrial, protegendo desta maneira plantas que possuem crescimento lento, de possível risco de extinção.

A realização de várias coletas e repetições é importante para a diferenciação dos reais endofíticos, daqueles microrganismos epifíticos que eventualmente possam ser isolados e até mesmo contaminantes, e testes de controle para verificação da eficácia da desinfecção superficial dos tecidos vegetais a serem submetidos a isolamentos devem ser feitos a cada processo de desinfecção (SCHULZ *et al.*,1993).

O emprego da microscopia ótica e eletrônica auxilia na detecção de microrganismos endofíticos, mas não descarta a necessidade de isolamento destes. A etapa de isolamento deve ser cuidadosamente realizada a fim de eliminar a microbiota epifítica existente na planta em estudo sem, entretanto, alterar a endofítica. Esta fase refere-se à lavagem dos tecidos vegetais utilizando agentes desinfectantes (PEREIRA *et al.*, 1993; SCHULZ *et al.*, 1993; ARAÚJO *et al.*, 2003). O tempo de imersão do material vegetal nos agentes desinfectantes e a própria concentração destes pode variar de acordo com a textura do tecido vegetal em estudo (PEREIRA *et al.*, 1993).

Geralmente as técnicas utilizadas para isolar os endófitos baseiam-se na ruptura ou fragmentação do tecido vegetal, seguido de sua inoculação sobre meios específicos para o tipo de microrganismo que está sendo pesquisado (ARAÚJO *et al.*, 2003), sendo possível monitorar organismos específicos no ambiente, por meio do isolamento seletivo de determinados endófitos (MELO; AZEVEDO, 2000).

A purificação dos microrganismos isolados e estocagem dos mesmos empregando o processo de preservação apropriado são as etapas subseqüentes do processo de isolamento.

1.1.3 Fungos: importância, características e biodiversidade

Atualmente estima-se que o Reino Fungi apresente, aproximadamente, 1,5 milhões de espécies com representantes habitando praticamente todos os ecossistemas existentes no planeta. Ainda assim, atenção especial deve ser dispensada com relação à preservação destes microrganismos, pois segundo Cherfas (1991), tem se observado na Europa um grande declínio no número de espécies fúngicas bem como na quantidade de indivíduos nos últimos tempos. Diante desta situação e em vista da importância destes microrganismos, é urgente que estudos para catalogar fungos, no mundo, sejam realizados, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde esta situação ainda é mais grave, pelo risco de extinção de espécies antes mesmo de serem catalogadas.

Os Fungos apresentam grande diversidade dentre as milhares de espécies conhecidas e apresentam características em comum que os distinguem dos demais reinos (AZEVEDO, 2001), podendo ser classificados de acordo com aspectos morfológicos e reprodutivos, nos grupos: Ascomycota, Zygomycota/Trichomycota, Deuteromycota, Chytridiomycota e Stramenophila (Hyphochytridiomycota, Labyrinthulomycota e Oomycota). Encontram-se, nestes grupos, fungos associados a plantas, os quais compreendem uma porção bastante grande e heterogênea que têm importância, tanto na agricultura como em ambientes naturais. Eles apresentam uma diversidade genética bastante grande, fruto das diversas estratégias de sobrevivência e também da interação de cada espécie com seu hospedeiro (HAWKSWORTH, 1991).

São organismos heterotróficos desprovidos de clorofila, mas historicamente comparados às plantas, com destacada habilidade para utilizar praticamente qualquer fonte de carbono como alimento. Realizam nutrição absorptiva liberando enzimas no meio em que habitam, quebrando moléculas grandes presentes no meio, tais como carboidratos, proteínas e lipídios, em moléculas menores e mais solúveis, facilitando sua absorção. Outra característica é sua fonte primária de reserva de carboidratos que é o glicogênio, ao contrário das plantas que têm o amido para desempenhar esta função (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). As paredes celulares fúngicas têm quitina em sua composição, tornando-as rijas e espessas, principalmente dos fungos chamados filamentosos, que possuem filamentos ou hifas que conjuntamente, formam o micélio do fungo. Existem fungos não filamentosos, como as leveduras, que são unicelulares e reproduzem-se por brotamento; outros ainda formam estruturas macroscópicas, como os cogumelos comestíveis (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

Como fonte de produtos químicos, incluindo vários antibióticos, os fungos são extremamente valiosos além de apresentarem grande potencial no controle biológico de pragas (HAWKSWORTH, 1991; AZEVEDO, 1998.b; STROBEL & DAISY, 2003).

Apesar dos efeitos indesejáveis dos fungos serem enfatizados pela população leiga, vários são os benefícios que estes microrganismos oferecem: antibióticos como a penicilina produzida pelo fungo *Penicillium notatum*, as fermentações biológicas envolvendo fungos, utilizadas pelo ser humano há milênios na fabricação de pães e bebidas fermentadas como o vinho e a cerveja

(ALEXOPOULOS *et al.*, 1996). De maneira indireta os fungos também desempenham importante papel, por exemplo, induzindo a planta a produzir determinado metabólito. Mais recentemente, o resveratrol, uma fitoalexina produzida pela videira em resposta de defesa ao fungo *Botrytis cinerea*, tem sido vastamente estudada pelos seus efeitos benéficos contra doenças cardiovasculares e o tratamento de algumas neoplasias.

1.1.4 Identificação dos fungos endofíticos

Os métodos utilizados atualmente para detectar e identificar fungos em tecidos vegetais é: a observação histológica, o método de esterilização superficial do tecido da planta hospedeira e isolamento do fungo emergente sobre meio de cultura adequado e detecção por especificidade química, incluindo métodos imunológicos e de metagenômica (SCHULZ & BOYLE, 2005).

Tradicionalmente, a identificação e classificação de fungos endofíticos são baseadas em características morfológicas como: morfologia da colônia de cultura monospórica de isolados em meios de cultura específicos, pigmentação, taxa de crescimento, especificidade de hospedeiros, perfil dos metabólitos secundários (THRANE, 1990), observação das estruturas reprodutivas dos fungos (KENDRICK & CARMICHAEL, 1973). Entretanto, em face da complexidade na identificação de estruturas reprodutivas fúngicas, as técnicas moleculares vêm sendo preferencialmente utilizadas para esta tarefa, pelo fato das informações fornecidas serem mais precisas, reproduzíveis, além de permitirem estudos filogenéticos; entretanto, a caracterização morfológica microscópica e macroscópica, pela observação da colônia, ainda desempenham um papel fundamental na identificação de fungos, complementando outras técnicas.

1.1.5 Fungos associados à videira

Até o momento os estudos sobre fungos associados à videira, no Brasil, concentram-se no estudo de fungos fitopatogênicos a viticultura, sendo descritos principalmente: o fungo *Elsinoe ampelina*, forma anamorfa *Sphaceloma ampelinum* = *Gloeosporium ampelophagum*, agente causal da antracnose, também conhecida como varola, negrão, carvão ou olho-de-passarinho; *Phomopsis viticola* = *Fusicoccum viticola*, agente causal da escoriose da videira; *Plasmopara viticola*, um pseudofungo, agente causal do míldio; *Uncinula necator* agente causal do oídio; *Pseudocercospora vitis* agente causal da Mancha das folhas, também conhecida como mancha de isariopsis; *Botryotinia fuckeliana*, forma conidiana *Botrytis cinerea* agente causal da podridão cinzenta da uva, também conhecida como podridão do cacho, mofo cinzento ou podridão de botritis; *Glomerella cingulata*, forma conidial *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da Podridão da uva madura; *Greeneria uvicola*, sinônimo de *Melanconium fuligineum* agente causal da podridão amarga; *Fusarium oxysporum* f.sp. *herbemontis* agente causal da fusariose; *Armillaria mellea* agente causal da Podridão de Armillaria; *Rosellinia necatrix* agente causal da comumente conhecida podridão radicular ou podridão de rosellinia. Os aspectos mais abordados são condições de vulnerabilidade da viticultura a estas doenças, sintomatologia e formas de controle (SÔNEGO *et al.*, 2001). No Brasil, até o momento, não foram realizados trabalhos de isolamento de fungos endofíticos de videiras (*Vitis vinifera*), fungos endofíticos de videira da variedade Niagara Rosada (*Vitis labrusca*) foram estudadas por Brum (2006). A maioria dos estudos sobre isolamento de endófitos de videiras foi feito na Europa e África e resumem-se a videiras européias *Vitis vinifera*. Geralmente estes trabalhos estão voltados à caracterização das comunidades endofíticas e as aplicações de biocontrole de pragas da viticultura. Mostert *et al.* (2000) estudou fungos endofíticos associados a brotos e folhas de *Vitis vinifera* com referência específica ao complexo *Phomopsis viticola*. Halleen *et al.* (2003) pesquisaram fungos associados à videiras saudáveis com relação a patógenos envolvidos no declínio de videiras jovens. A inibição da esporulação de *Plasmopara viticola* e alterações ultraestruturais de videiras com míldio pelo fungo endofítico *Alternaria alternata* isolado de folhas de videiras foi pesquisada e confirmada por Musetti *et al.* (2006).

A microbiota endofítica associada a cinco variedades de videiras *Vitis vinifera* cultivadas na Espanha foram estudadas por Medina *et al.* (2005) que

observaram que os principais gêneros de fungos endofíticos foram *Alternaria*, *Cladosporium*, e *Aspergillus*.

1.1.6 Fungos fitopatogênicos e seu controle

1.1.6.1 *Fusarium* sp.

Fusarium é um gênero de fungo filamentosos cosmopolita amplamente distribuído em plantas e no solo. *Fusarium* pode produzir micotoxinas em cereais e grãos estocados, o que pode afetar a saúde de humanos e animais (MARTINS, 2005). As principais toxinas produzidas por *Fusarium* são as fumosinas, conhecidas por causar câncer esofágico em humanos. No Brasil, embora sabidamente as micotoxinas sejam responsáveis por expressivos prejuízos na produção de grãos, praticamente não existem estimativas das perdas econômicas associadas às micotoxinas. Mesmo em países com alta tecnologia para produção e armazenamento de milho, as perdas por presença de micotoxinas são elevadas. (MARTINS, 2005).

Na viticultura, a fusariose, causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *Herbemontis* é uma doença que ataca as plantas por meio do sistema radicular (fungo de solo) e se desenvolve no sistema vascular da planta, é considerado um dos principais problemas da viticultura, pois, quando presente no vinhedo, causa a morte das plantas (SÔNEGO *et al.*, 2001).

A maioria das espécies de *Fusarium* é composta por fungos de solo ativos na decomposição de substratos celulósicos das plantas, sendo alguns parasitas destas, (MARTINS, 2005). Segundo Sonego *et al.* (2001), os fungos de solo são de difícil controle e os tratamentos com fungicidas são muito dispendiosos, principalmente pelo alto custo da incorporação do produto ao solo. Outra desvantagem do controle com substâncias xenobióticas é que, além dos problemas de deposição no meio ambiente e impacto que causam sua utilização não é

completamente eficaz, pelo fato do *Fusarium* se alojar no sistema vascular do vegetal.

Dentre as estratégias no combate ao *Fusarium* estão: o plantio de cultivares menos suscetíveis, cuidado em evitar ferimentos ao sistema radicular das plantas, desinfestação do solo com fungicida químico e rotação de cultura, utilizando plantas não hospedeiras (AGRIOS, 2005; SONEGO *et al.*, 2004). Isolados não patogênicos de *Fusarium*, isolados de solo, bem como isolados endofíticos mostraram-se eficientes para o biocontrole de formas patogênicas do fungo, segundo Fravel *et al.* (2003).

A utilização de outros fungos endofíticos no biocontrole de *Fusarium* pode ser uma alternativa de extrema importância, em vista das dificuldades de controle deste fungo e os prejuízos causados por este em diversas culturas.

1.1.6.2 *Botrytis* sp.

O mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea* ataca diversas culturas de importância econômica no Brasil, inclusive a videira além de flores, plantas ornamentais e pequenas frutas. O patógeno infecta vários órgãos das plantas e causa danos no produto final, tanto no campo quanto na pós-colheita (OSÓRIO; FORTES, 2003; MORANDI; MAFFIA, 2005).

A doença surge em condições de umidade elevada e em temperaturas amenas. Na viticultura, a podridão do cacho, podridão cinzenta ou botritis, existe em todos os países vitícolas do mundo, reduzindo qualitativa e quantitativamente a produção. É considerada a mais importante das podridões do cacho. As perdas podem ser significativas nas cultivares viníferas, especialmente nas de cacho compacto. As medidas mais utilizadas na estratégia de manejo dessas doenças é o controle químico. Uma das preocupações quanto ao uso indiscriminado de fungicidas é a possibilidade de seleção de isolados resistentes (KIMATI, 1995). Caldari Júnior (1998) demonstraram alto nível de resistência de vários isolados de *B. cinerea* a benomyl em testes *in vitro*.

Atualmente, diversos estudos têm sido direcionados ao biocontrole tanto de *Botrytis* quanto de outros fungos fitopatogênicos. Barka *et al.* (2000) observaram o aumento da resistência de videiras a *Botrytis cinerea*, possivelmente associada ao aumento da produção de citocininas na rizosfera por rizobactérias. Mohamed *et al.* (2007) comprovaram respostas de defesa em folhas de videira contra *Botrytis cinerea* induzidas por aplicação de uma amostra de *Pythium oligandrum* ou sua elicítina oligandrina nas raízes.

1.1.7 Interações endófito - planta hospedeira

Fungos endofíticos são simbióticos, não patogênicos ou exercem baixo grau de patogenicidade dentro da planta hospedeira. Todas as partes da planta possuem microrganismos endofíticos, existindo certo grau de especificidade endófito-hospedeiro (MELO, 2002). Entretanto, a existência de um isolado como endófito não exclui a possibilidade de que este venha a se tornar patogênico quando o hospedeiro estiver estressado ou senescente (KULDAU & YATES, 2000), pois um fungo ocupando assintomaticamente um tecido vegetal, pode ser um patógeno fraco ou ainda um habitante de um nicho aguardando uma oportunidade para propagar-se (SCHULZ & BOYLE, 2005).

As interações ou simbioses estabelecidas pelos fungos podem ter as mais variadas características, tais como: mutualística, onde o fungo e o organismo associado obtêm vantagens na interação; neutra ou comensalística, onde o organismo associado não é afetado pela interação e antagonista ou parasítica, onde o organismo associado é comprometido pela interação (CARROLL & WICKLOW, 1992).

Mais recentemente, estas interações entre a planta hospedeira e o endófito foram analisadas por outro enfoque. Schulz & Boyle (2005) lançam a hipótese que não há interações neutras entre endófitos e plantas hospedeiras, mas sim, um balanço de antagonismos, havendo sempre pelo menos um grau de virulência por parte dos fungos possibilitando a infecção, enquanto a defesa da planta hospedeira limita o desenvolvimento do fungo invasor e conseqüentemente, da doença.

Também, os endófitos, em contraste aos fitopatógenos conhecidos, geralmente teriam muito maior plasticidade genotípica e assim teriam mais opções que os fitopatógenos: infecção, local, mas também extensiva colonização, latência, virulência, patogenicidade e/ou saprofitismo. Esta plasticidade genotípica segundo os autores seria um motor de evolução.

Quanto às simbioses e relações mutualísticas, as interações endófito-hospedeiro assintomáticas em geral, parecem envolver dois parceiros ativamente antagonistas (SCHULZ & BOYLE, 2005). Entretanto, uma interação antagonista endófito-hospedeiro balanceada não exclui a possibilidade de que o endófito possa desempenhar um papel benéfico dentro de seu hospedeiro. Por exemplo, pode ocorrer indução de metabólitos de defesa potencialmente ativos contra fitopatógenos (ARNOLD *et al.*, 2003; SELOSSE *et al.*, 2004; SCHULZ & BOYLE, 2005), secreção de fitormônios, promovendo crescimento da planta-hospedeira (TUDZYNSKI & SHARON 2002), aumento de atividade metabólica da planta hospedeira, ou por indução de resistência a doenças.

O status da interação planta-endófito pode ser transitório, sendo que o termo endofítico deve ser empregado para microrganismos que estão comportando-se endofiticamente no momento da detecção (SCHULZ & BOYLE, 2005).

A diversidade dentro de um determinado hospedeiro pode ser alta (CARROLL, 1995), comunidades de endófitos habitando certo hospedeiro particular podem ser amplamente distribuídas ou ter especificidade com determinado hospedeiro (CARROLL, 1988; PETRINI, 1996; STONE *et al.*, 2000; COHEN, 2004), sendo que o termo especificidade deve ser reservado para organismos que irão crescer somente em um hospedeiro (CARROLL, 1999; WAGNER & LEWIS, 2000; ZHOU & HYDE, 2001).

Estudos recentes têm mostrado efeitos genéticos da planta hospedeira sobre a comunidade microbiana e sobre processos no ecossistema, o que permite entender os impactos de características genéticas sobre os endófitos, como, apresentado, por exemplo, no trabalho com algodoeiros híbridos realizado para examinar ligações entre variação genética, fitoquímica da planta e endófitos fúngicos de ramo. Nesse caso, os resultados demonstraram que o genótipo da planta pode albergar parceiros ecológicos escondidos (fungos endofíticos), resultando em conseqüências para a comunidade e o ecossistema (BAILEY *et al.*, 2005).

Diversas interações entre hospedeiros e microrganismos são iniciadas pela detecção de sinais químicos liberados pelo hospedeiro. A detecção destes sinais leva à alteração nos padrões de expressão gênica do microrganismo, que culmina em mudanças específicas e adaptativas na sua fisiologia e que são necessárias para estas associações. Os produtos liberados pela planta têm baixo peso molecular, são moléculas difusíveis e são reconhecidas pelos microrganismos por meio de receptores específicos de proteínas. Em alguns casos, condições nutricionais, tais como limitação de ferro ou falta de fontes de nitrogênio parecem prover um significativo estímulo (BRENCIC & WINANS, 2005).

1.1.8 Aplicações biotecnológicas dos endófitos

Embora os microrganismos endofíticos aparentem ser neutros para o hospedeiro, atualmente são bastante evidentes os benefícios proporcionados à planta por estes microrganismos, tais como: I) proteção da planta contra insetos, patógenos e até mesmo mamíferos herbívoros (AZEVEDO *et al.*, 2000); II) proteção contra estresse ambiental, tal como o hídrico; III) produção de compostos que alteram a fisiologia das plantas como hormônios vegetais. Além disso, certos microrganismos endofíticos produzem substâncias de valor biotecnológico, principalmente fármacos, entre eles, antibióticos e antitumorais (AZEVEDO *et al.*, 2002).

No Brasil, o controle biológico começou a ser utilizado com o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e com o Baculovírus, no controle das cigarrinhas da cana e das pastagens e no controle da *Anticarsia gemmatalis* na soja, respectivamente. Na cultura do cacau, o fungo *Trichoderma* tem sido utilizado com sucesso em restos de ramos doentes para o controle do fungo *Crinipellis pernicioso*, hoje denominado *Moniliophthora pernicioso* agente causal da vassoura-de-bruxa. Recentemente, endófitos foram testados contra *M. pernicioso* *in vitro* e *in vivo* e *Gliocladium catenulatum* apresentou potencial como antagonista reduzindo em 70% a doença nas mudas de cacau analisadas (RUBINI *et al.*, 2005).

Na proteção da planta contra insetos, pode ser citado o *Bacillus thuringiensis*. Esta bactéria produz inclusões protéicas, que lhe confere a capacidade entomopatogênica. Esse cristal, sintetizado durante a fase de esporulação, é formado por polipeptídeos denominados δ -endotoxinas (proteínas cry). Quando este cristal proteico é ingerido por uma larva de inseto suscetível, o efeito tóxico é ativado e ocorre uma ligação das toxinas a receptores específicos nas células intestinais, levando o inseto à morte (VILAS-BÔAS *et al.*, 2002). O *B. thuringiensis* é a espécie mais utilizada no controle de insetos e destaca-se por produzir cristais protéicos ativos contra cerca de 130 espécies de insetos das ordens Lepidóptera, Díptera e Coleoptera, bem como vetores de doenças humanas, como contra os gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* (LERECLUS *et al.*, 1993; LE ROUX, 1996).

Weber (1981) foi provavelmente o primeiro pesquisador a relatar a proteção de plantas a insetos devido a um fungo entomopatogênico. Trabalhos posteriores sustentaram esses dados em gramíneas e outras plantas (FUNK *et al.*, 1983; CLAYDON *et al.*, 1985). A utilização de fungos para o controle de insetos-pragas se fundamenta em sua capacidade de infectá-los, causando doença e morte num processo dependente de fatores bióticos e abióticos (AZEVEDO *et al.*, 2002). Vários fungos, ainda, são conhecidos pela produção de compostos, tais como ácido nodulisporico, novos diterpenos e indol, que possuem potentes propriedades inseticidas. Os compostos nodulisporicos foram isolados primeiramente de um endófito, o *Nodulisporium* sp., da planta *Bontia daphnoides*. Outro fungo endofítico, *Muscodor vitigenus* isolado da planta *Paullina paullinioides* produz naftaleno, que é amplamente utilizado como repelente de insetos (STROBEL & DAISY, 2003). Segundo Azevedo & Araújo (2007), fungos endofíticos também podem influenciar no crescimento da planta diretamente pela produção de reguladores de crescimento vegetal produzidos pelo fungo, ou indiretamente pela proteção da planta contra efeitos deletérios causados por um ou mais organismos fitopatogênicos.

Leveduras são utilizadas no controle biológico, preferencialmente pela proteção de frutos destinados ao consumo *in natura*. Por esses organismos terem sua ação antagonista vinculada mais à competição que à antibiose, geralmente, não produzem antibióticos, elementos considerados contaminantes químicos nos vegetais. As leveduras atuam no controle de doenças, mais como protetoras da infecção (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2000). As principais formas de ação das

leveduras como agentes de biocontrole, são a competição por nutrientes e a indução de resistência (WILSON *et al.*, 1991; WISNIEWSKI *et al.*, 1991). Mais recentemente, a habilidade de leveduras para atacar hifas e conídios de fungos fitopatogênicos, tem sido especulada por contribuir para a atividade de biocontrole sobre a superfície das plantas. Allen *et al.*,(2004) observaram o combate de *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia homoeocarpa* por leveduras do filoplano, comprovado por testes de antagonismo *in vitro*.

1.1.8.1. Fungos como agentes de biocontrole de fitopatógenos

Os fungos têm aprimorado muitos mecanismos de sobrevivência e metabolismo de fontes nutricionais. Assim, durante a evolução, eles desenvolvem mecanismos de competição por nutrientes e ou por espaço e diferentes métodos de antagonismo. Aqueles fungos que melhor exploram determinados micro-habitats e competem com sucesso com outros microrganismos, podem se constituir em potentes agentes de controle biológico (MELO, 1996)

Os mecanismos de interações entre microrganismos patôgenicos e antagônicos podem ser divididos em antibiose, competição, parasitismo, hipovirulência, predação e indução de defesa do hospedeiro. Se mais de um destes mecanismos for utilizado por um microrganismo antagonista, este fato será considerado como uma característica favorável para este ser bem sucedido como agente de biocontrole (BÉLANGER *et al.*, 1998).

O micoparasitismo é comum na natureza, freqüentemente fungos crescem sobre outros fungos, embora essa associação não necessariamente implique uma relação parasítica. Apesar de ainda não ser bem compreendida, micoparasitismo é de ocorrência geral entre todos os grupos de fungos. Muitos desses micoparasitas demonstram possuir ampla gama de hospedeiros, como *Trichoderma* e *Gliocladium*. Outros parasitas apresentam uma limitada gama de hospedeiros, como por exemplo, *Sporidesmium sclerotivorum*. (MELO, 1996)

Apesar de ocorrer naturalmente, o micoparasitismo possui mecanismos de ação bastante complexos que incluem as fases de localização, reconhecimento do

alvo pelo antagonista, transmissão de sinais que resulta na interação entre antagonistas e fitopatógenos, indução e produção de metabólitos (enzimas) pelo antagonista e digestão da célula-alvo (MELO, 1996; LIMA *et al.*, 2000). A presença, a duração e a importância de cada fase dependem dos fungos envolvidos, o tipo de micoparasita (biotrófico ou necrotrófico) e das condições ambientais prevalentes. No micoparasitismo biotrófico, o parasita obtém nutrientes de células vivas, com pouco ou nenhum dano aparente para o hospedeiro. Nessas interações, o parasita ataca o hospedeiro sem penetração, obtendo nutrientes por meio de células de absorção ou, então, pode penetrar na hifa e crescer internamente sem efeitos aparentes no seu desenvolvimento. Já no micoparasitismo necrotrófico, o parasita destrói a célula hospedeira e utiliza os nutrientes do hospedeiro. A invasão é freqüentemente iniciada por meio de enrolamento de hifas do parasita sobre hifas do fungo patogênico ou por penetração direta de hifas. (MELO, 1996).

O biocontrole, utilizando microrganismos antagônicos a fitopatógenos que utilizam mecanismos de micoparasitismo vem sendo bastante explorado. Assante *et al.*, (2004), enfocam o controle biológico de um fitopatógeno por micoparasitismo. *Cladosporium tenuissimum*, o micoparasita, cresce dentro do esporo de *Uromyces appendiculares* (fitopatógeno), preenchendo seu interior com micélio e emergindo do esporo, formando conidióforos e conídios. Knudsen e Bin (1990) evidenciaram que *T. harzianum* tem potencial como agente de biocontrole sobre vários fungos de solo tanto por micoparasitismo de hifas e esclerócios como por antibiose. Robbs (1992) aponta o micoparasitismo, a competição trófica e a antibiose como os mecanismos mais observados na ação de fungos fitopatogênicos e considera os gêneros *Trichoderma*, *Chaetomium* e *Penicillium* tão eficientes quanto os fungicidas Thiram e Captan. Os mecanismos de ação da proteína AFP produzida, em larga escala, por *Aspegillus giganteus* na inibição da síntese de quitina em fungos sensíveis foi investigada por Hagen *et al.*, (2007). A proteína antifúngica AFP é altamente eficaz na restrição do crescimento da maioria dos fungos filamentosos patogênicos para humanos e plantas. Djonovic *et al.*, (2006) demonstraram o envolvimento da β -1,6-glicanase em micoparasitismo e sua relevância na atividade de biocontrole de *Trichoderma virens* contra *Pythium ultimum*.

A antibiose é definida como a interação entre organismos na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o outro (BETTIOL & GHINI, 1995). A seleção de fungos capazes de produzir compostos com

atividade antimicrobiana é amplamente explorada para biocontrole. Robbs (1992) aponta o hiperparasitismo, a competição trófica e a antibiose como os mecanismos mais observados na ação de fungos fitopatogênicos e considera os gêneros *Trichoderma*, *Chaetomium* e *Penicillium* tão eficientes quanto os fungicidas Thiram e Captan. Henis *et al.*, (1983) citados por Silveira *et al.*,(1994). Muitos microrganismos endofíticos são capazes de sintetizar compostos bioativos, estes metabólitos secundários são formados geralmente nas fases finais do crescimento, e podem ser utilizados pela planta na defesa contra fungos e bactérias fitopatogênicas. Aparentemente são substâncias não essenciais para o crescimento, e dentre outros produtos, podem ser antibióticos, metabólitos antifúngicos, auto – inibidores, pigmentos, toxinas, etc.

A maioria dos microrganismos produtores de antibióticos é comumente encontrada no solo. No entanto, certos endófitos também têm se mostrado potentes produtores de antibióticos, dos quais muitos com propriedades de uso na agricultura e na medicina. Entre os fungos produtores de antibióticos *Penicillium* e *Cephalosporium* spp. são os mais conhecidos (STROBEL & DAISY, 2003).

A produção de substâncias capazes de inibir a germinação de esporos por alguns fungos vem sendo investigada, segundo Chitarra *et al.*, (2004) a pesquisa de auto – inibidores é relevante para o desenvolvimento de técnicas que previnem doenças da agricultura e a decomposição de alimentos. Geralmente a infecção começa com a germinação de um esporo fúngico, os “auto - inibidores” são substâncias inibidoras produzidas por diversos fungos quando em alta densidade de esporos e inibem germinação e crescimento, prevenindo a germinação prematura de esporos diretamente após a sua formação e antes da dispersão, este mecanismo garante que esporos somente germinem após dispersão em ambientes que favoreçam o crescimento e estabelecimento do micélio. auto inibidores têm sido caracterizados em *Puccinia*, *Uromyces*, *Colletotrichum*, *Dictyostelium*, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus* e podem ser voláteis ou não (BACON & SUSSMAN, 1973; CHITARRA *et al.*, 2004).

1.1.9. Niagara Rosada (*Vitis labrusca* L.) origem e características

A variedade de uva Niagara (*Fox Grape*, uva rústica, uva comum) é originária dos Estados Unidos da América (EUA), pertencente à espécie *Vitis labrusca* L. Teve origem em 1868 a partir do cruzamento das variedades *Labruscas concord x cassady* (HEDRICK, 1917).

No Brasil, a variedade Niagara Branca foi introduzida em 1894, disseminando-se na região de Jundiaí. Em 1933 surge no município de Louveira, em Jundiaí, a Niagara Rosada a partir de uma mutação somática ocorrida em uma videira da variedade Niagara Branca (SOUSA, 1996). Houve então declínio da produção de Niagara Branca, sendo substituída aceleradamente e quase que totalmente por sua mutação Rosada estabelecendo-se desta maneira o perfil do vinhedo do maior centro produtor de uva de mesa do Brasil (SOUSA, 1996).

O setor vinícola brasileiro apresenta uma característica atípica em relação aos países tradicionais produtores de vinhos, pois enquanto naqueles são admitidos apenas produtos originários de uvas viníferas (*Vitis vinifera*), no Brasil, além destes existem produtos originários de cultivares americanas e híbridas (*V. labrusca* e *V. bourquina*). Os vinhos comuns representam mais de 80% do volume total de vinhos produzidos no país (BARNABÉ *et al.*, 2007).

1.1.9.1 Classificação botânica

A videira pertence ao grupo Cormófitas (plantas com raiz, talo, folha e autotróficas), divisão Spermatophyta (planta com flor e semente), subdivisão Angiospermae (planta com semente dentro do fruto), classe Dicotyledoneae (plantas com dois cotilédones), ordem Rhamnales (plantas lenhosas com um ciclo de estames situados dentro das pétalas), família Vitaceae (flores com corola de pétalas soldadas na parte superior e de prefloração valvar, com cálice pouco desenvolvido, gineceu bicarpelar e bilocular, com fruto tipo baga) (HIDALGO, 1993; ALVARENGA, *et al.*, 1998).

A família Vitaceae pode ser dividida em dois gêneros: *Vitis* (de grande importância econômica, pois se destina a produção de vinho e frutas) e *Cissus* (com algumas espécies de interesse medicinal e ornamental) (SOUZA, 1996).

O gênero *Vitis* pode, ainda, ser dividido em dois subgêneros: Muscadínea (compreendendo três espécies) e *Euvitis* (compreendendo mais de 50 espécies). Dentro do subgênero *Euvitis* encontram-se duas espécies de grande importância para a agricultura, *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera*, utilizadas para produção de vinho e para consumo *in natura* das frutas. *Vitis labrusca* é uma espécie de origem americana que apresenta características mais rústicas quanto à suscetibilidade a doenças comparada a *Vitis vinifera*, de origem européia, mas que é responsável por mais de 90% dos vinhos fabricados no mundo (GIOVANNINI, 1999).

1.1.9.2 Aspectos econômicos da viticultura

O Brasil é o décimo quarto produtor de uva, respondendo por 1,8% da produção mundial, segundo dados da FAO referentes ao período de 2001 a 2006. Em 2006, o País teve uma produção de 1.257.064 toneladas, 2,0% maior que a do ano anterior. O Estado de São Paulo aparece na segunda colocação com uma produção de 195.357 toneladas, que correspondeu a 15,5% do total (IBGE, 2006). A viticultura no Brasil ocupa uma área de 65.450 ha e está situada, principalmente, nos estados do Rio Grande do Sul (36,6 mil ha), São Paulo (12,1 mil ha), Paraná (6 mil ha), Pernambuco e Bahia (6,2 mil ha), e segundo dados do IBGE (2006), no período de 2001 a 2006, a área plantada e destinada à colheita de uva no País se manteve praticamente inalterada, ao passo que a produção teve alternadamente, elevações e reduções ao longo do referido período.

O Estado de São Paulo é o maior produtor nacional de uvas para mesa, destacando-se a região leste com área de aproximadamente 7.870 ha. Nessa região, em 2006, os maiores produtores de uvas foram os Municípios de São Miguel do Arcanjo, Jundiaí, Pilar do Sul e Indaiatuba. Juntos eles concentraram 8,0% da produção nacional, e 16,1% da produção estadual (IBGE, 2006). A produção de uva comum para mesa representa 67% da área, predominando a cultivar Niagara

Rosada (GHILARDI & MAIA, 2001), por apresentar características intrínsecas apreciadas pelo mercado consumidor, bem como vigor médio, tolerância à doenças e pragas e alta produtividade (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, 2001; CATO, 2002).

2 OBJETIVOS

I. Isolar os fungos endofíticos da videira, *Vitis labrusca* L. var. Niagara Rosada em cultura agroecológica e comercial no verão (janeiro) e inverno (junho) e caracterizar sua comunidade fúngica endofítica por técnicas citológicas e seqüenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA;

II. Testar o potencial antagonista dos fungos endofíticos de *Vitis labrusca* L. var. Niagara Rosada, *in vitro*, contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium* sp. e *Botrytis cinerea* ;

III. Testar a capacidade de fungos endofíticos isolados em produzir compostos com atividade antimicrobiana contra as bactérias *Xanthomonas axonopodis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, e a levedura *Candida albicans*.

3 MÉTODO

3.1 Material vegetal

No presente trabalho foram coletadas amostras de caule e folha, sem sintomas aparentes de doenças de plantas de videiras da variedade Niagara Rosada cultivada em Salesópolis SP, localizada a 96 km da cidade de São Paulo, SP., Brasil (23°32'S e 45°51'W) e no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) em Jundiaí SP, localizado a 60 km da capital (23°11'11" S e 46°53'03" W). O clima em Salesópolis e Jundiaí é do tipo Cwa, segundo a classificação climática de Koeppen que se baseia em dados mensais pluviométricos e termométricos. O tipo de clima Cwa é caracterizado pelo clima tropical de altitude, com chuvas no verão e seca no inverno, com a temperatura média do mês mais quente superior a 22°C. As coletas do material vegetal foram realizadas nos meses de janeiro e junho de 2007, as médias climatológicas dos locais e meses de coleta são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Média climatológica dos Municípios de Jundiaí e Salesópolis

Mês	Jundiaí				Salesópolis			
	Temperatura do ar (C)				Temperatura do ar (C)			
	Mínima média	Máxima média	Média	Chuva (mm)	Mínima média	Máxima média	Média	Chuva (mm)
Janeiro	19,0	29,0	24,0	222,6	17,4	28,4	22,9	210,9
Junho	10,5	23,8	17,1	48,5	9,7	22,8	16,3	42,1

**Adaptado de: "Clima dos Municípios Paulistas" (Fonte: CEPAGRI 2008).*

As folhas e caules foram coletados a aproximadamente 1,0 m do tronco principal e a 1,5 m de altura do solo, de videiras conduzidas em cultura agroecológica (Salesópolis) e cultura comercial em dois vinhedos no IAC em Jundiaí (vinhedos A e B). O local de coleta, trato cultural, parte da planta de onde os fungos foram isolados bem como a época da coleta são apresentados na Tabela 2. O

vinhedo A, em Jundiaí, recebeu as últimas aplicações de fungicidas em novembro/2006 Oxicloreto de Cobre e em janeiro/2007 o fungicida sistêmico Maconzeb+Metalaxyl-M. O vinhedo B recebeu as últimas aplicações de fungicidas em julho/2006, e, portanto na coleta realizada em janeiro/2007 estava há seis meses sem receber nenhum tipo de tratamento químico. Os fungicidas utilizados na viticultura comercial em Jundiaí, bem como o tempo de permanência no meio ambiente são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Coleta de fungos endófitos de videiras da variedade Niagara Rosada, (*Vitis labrusca*). Trato cultural em Salesópolis (cultura orgânica) e Jundiaí A e B (tradicional), parte da planta de onde foram isolados os endófitos e época da coleta do material vegetal.

Época das coletas	Local/Vinhedo	Trato cultural	Parte da planta	
Janeiro/2007	Salesópolis	Cultura agroecológica	Folha	-
	Jundiaí A	Cultura comercial	Folha	-
	Jundiaí B	Cultura comercial	Folha	-
Junho/2007	Salesópolis	Cultura agroecológica	Folha	Caule
	Jundiaí A	Cultura comercial	Folha	Caule
	Jundiaí B	Cultura comercial	Folha	Caule

- Isolamentos não realizados

Tabela 3. Cultura comercial. Tratamento Fungicida aplicado nos vinhedos A e B do IAC em Jundiaí.

Concentração	Nome Comercial	Princípio ativo	Classe	Persistência e degradação no ambiente
150g/100l	Delan	Dithianon	Fungicida de contato	Curta
200g/100l	Rovral	Iprodione	Fungicida de contato	Média
150g/100l	Cuprocarb 500	Oxicloreto de Cobre	Fungicida	Longa
300g/100l	Ridomil Gold MZ	Mancozeb + Metalaxyl-M*	Fungicida sistêmico e de contato	Curta

* Indicativo de persistência e degradação no meio ambiente (Fonte: ANVISA 2008):

Curta: meia vida até 90 dias

Média: meia vida de 91 a 180 dias

Longa: meia vida acima de 181 dias.

3.2 Desinfecção superficial

O material vegetal foi lavado em água corrente, em seguida desinfectado superficialmente por meio de imersão sucessiva em etanol 70% (30 seg), solução de hipoclorito de sódio (2% de Cl disponível) 2 min 30 seg e finalmente enxaguado em água destilada esterilizada, por duas vezes. O tempo ideal de cada etapa foi determinado em testes preliminares pela modificação dos protocolos descritos por PETRINI (1996). O processo de desinfecção foi avaliado por meio da colocação de 100µl da água utilizada na última etapa do processo sobre meio batata - dextrose - ágar (BDA) seguindo-se incubação deste material por até 14 dias a 28°C.

3.3 Isolamento de fungos endofíticos de Niagara Rosada

Após desinfecção superficial, folhas e caules foram cortados em fragmentos (4 - 6 mm), e colocados sobre meio BDA contendo 100 µg/mL de tetraciclina (para impedir crescimento de bactérias) e incubados por 7 a 14 dias a 28°C. Após crescimento, a determinação da frequência de infecção (FI) foi avaliada pela contagem do número de fragmentos apresentando crescimento fúngico em relação ao número total de fragmentos de tecido vegetal.

$$FI = \frac{\text{Nº de fragmentos foliares com crescimento fúngico}}{\text{Nº total de fragmentos foliares}}$$

As pontas de hifas de micélio morfológicamente diferentes, que cresceram a partir de fragmentos de tecido vegetal, foram transferidas e subcultivadas em meio BDA para posterior identificação.

3.4 Purificação e armazenamento dos fungos isolados

Os fungos isolados nas etapas anteriores foram purificados pelo método de estrias de esgotamento, que consiste em coletar, um fragmento da extremidade da hifa e fazer estrias em meio sólido de cultura, este método foi repetido três vezes para a obtenção de colônias puras. Os fungos endofíticos isolados estão sendo mantidos armazenados utilizando-se para isso dois métodos: 1) o tubo com meio de cultura inclinado submerso em Óleo Mineral (Nujol) e 2) o método de Castellani (1939) em que fragmentos de colônia com meio são colocados em água esterilizada dentro de frascos fechados. Ambos os processos permitem manter os microrganismos por um período de cerca de 1 a 4 anos. No processo com óleo mineral, após cada fungo ser purificado, ele foi inoculado com alça de platina em tubo contendo meio de cultura inclinado e após crescimento da colônia, óleo mineral (autoclavado) foi adicionado ao tubo até cobrir completamente o meio e o fungo endofítico, sendo então os tubos tampados com rolhas ou tampas e guardados em estantes. Pelo método de Castellani, os fungos a serem mantidos conservados, foram cultivados em meio de cultura sólido e posteriormente, fragmentos de cerca de 0,5 cm do meio de cultura contendo pedaços de colônia foram retirados e colocados em frascos contendo água esterilizada. Em ambos os métodos, tubos e frascos com as amostras foram marcados com o código da amostra e data de armazenamento e mantidos à temperatura ambiente.

3.5 Análise morfológica e citológica

Foram obtidos 30% de amostras de fungos endofíticos isolados de Niagara Rosada (*Vitis labrusca*), procurando manter a proporção dos diferentes fungos endofíticos isolados em cada um dos tratamentos avaliados, de forma que as amostragens fossem representativas das comunidades em questão. Desta maneira, 78 isolados no total, foram analisados por morfologia, citologia e utilizados em experimentos realizados posteriormente para caracterização das comunidades

endofíticas e avaliação do potencial de antagonismo dos isolados contra fungos fitopatogênicos e da capacidade de produção de compostos antimicrobianos (Tabela 4).

Inicialmente, os 78 fungos endofíticos isolados de tecidos vegetais de Niagara Rosada foram agrupados por semelhanças morfológicas e segundo a coloração predominante apresentada pela colônia.

Tabela 4. Quantidade de fungos endofíticos estudados por tratamento:

Número de isolados selecionados por tratamento (30% do número total de isolados)								
Folha Janeiro/2007			Folha Junho/2007			Caule Junho/2007		
S	JA	JB	S	JA	JB	S	JA	JB
10	5	7	12	9	10	9	7	9

*S - Salesópolis
JA - Jundiáí A
JB - Jundiáí B

Para a análise citológica, os isolados foram crescidos em meio BDA e lâminas foram preparadas para a observação de estruturas reprodutivas e coloração das hifas. Foi empregada a técnica de microcultivo na qual duas lamínulas foram flambadas e colocadas sobre meio BDA, o fungo a ser observado foi inoculado sobre o meio, margeando a lamínula e encubado por 7-14 dias a 28°C. Após este período, as lamínulas sobre as quais houve crescimento de hifas, foram utilizadas na preparação de lâminas que foram coradas com azul-algodão, ou tratadas com lactofenol de Onions *et al.* (1981) e observadas ao microscópio ótico em aumento de 400X e 1000X (óleo de imersão). Os resultados foram analisados com base na literatura específica (BARNETT & HUNTER, 1972).

3.6 Crescimento micelial

Fungos inoculados em meio BDA foram mantidos em 28°C por um período de 14 dias após isto, os fungos foram avaliados quanto ao raio de crescimento micelial *in vitro*, como mostra a Figura 1, assim colônias que cresceram, em 14 dias, não ultrapassando o perímetro do terço central do raio da placa, foram considerados fungos de crescimento lento, aqueles cujo crescimento atingiu o terço mediano do raio, fungos de crescimento médio e finalmente os que neste período de tempo atingiram o terço próximo a borda os de crescimento rápido.

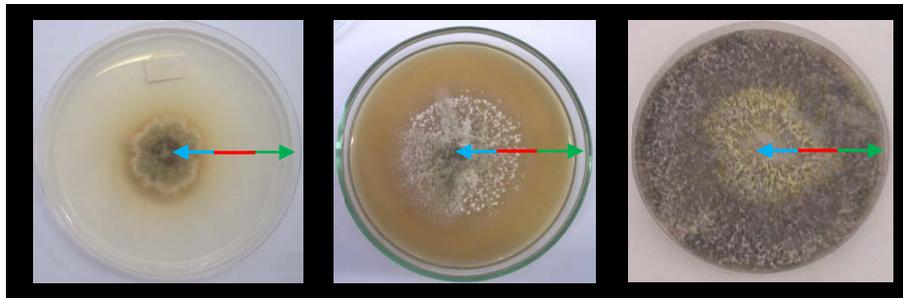


Figura 1. Metodologia empregada para quantificar a velocidade de crescimento dos fungos endofíticos isolados. A análise foi realizada no 14º dia após a inoculação do endófito em meio BDA e mantido a 28°C, a medida do raio da placa foi dividida em três, desta forma, os fungos cujas colônias cresceram dentro do limite do terço próximo ao centro (flecha azul) foram considerados de crescimento lento, aqueles que atingiram o terço médio, (segmento vermelho) e o terço do raio próximo a borda da placa (flecha verde) foram considerados respectivamente fungos de crescimento médio e rápido.

3.7 Extração de DNA total

O DNA total de fungos isolados foi extraído segundo Raeder & Broda (1985). Para a extração de DNA, os fungos endofíticos isolados foram crescidos em meio BD (batata dextrose líquido). Cada fungo foi inoculado em tubos contendo 3 ml de BD e incubados a 28°C por um período de aproximadamente 7 - 14 dias, dependendo do tempo de crescimento do fungo. A massa micelial formada foi então removida para o funil de porcelana contendo papel filtro, lavado por duas vezes com água destilada esterilizada. Após esse processo, a massa micelial foi retirada do papel com pinça e embalada em folha de alumínio, sendo discriminado o código da

amostra, conservando-se em câmara fria a 4°C por um período de até 15 dias. O papel filtro e folha de alumínio utilizados foram previamente autoclavados.

A massa micelial foi triturada em N₂ líquido e 2g do pó resultante foi ressuspenso em 2 mL de solução Tampão (Tris 1M e pH 8.0; EDTA, 0,5M; NaCl 5M; SDS 10% e H₂O MilliQ). Esta suspensão foi incubada a 65°C por 60 min. e centrifugada a 12000 Xg por 10 minutos. A seguir, 800 µL de sobrenadante foram transferidos para tubos tipo ependorff de 2,0 mL contendo 800 µL de fenol. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 12000 Xg por 10 minutos. Após esse processo, o sobrenadante foi coletado e este foi transferido para outro tubo ependorff de 1,5mL e adicionado um volume de “Clorofane” (Fenol: Clorofórmio na proporção de 1:1). Os tubos foram novamente homogeneizados e centrifugados a 12000 Xg por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5mL, e adicionado um volume de “Clorofil” (Clorofórmio: Álcool isoamílico na proporção de 24:1). Mais uma vez os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 12000 X g por 10 minutos, o sobrenadante, mais uma vez, foi transferido para outro tubo de 1,5mL e foi adicionado a este 50µL de NaCl (5M) e etanol P.A. para completar um volume total de 1,5mL. Os tubos foram levemente agitados e mantidos por 60 minutos a -20°C. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 3 minutos a 12000 X g. Desta vez, o sobrenadante foi descartado e aos tubos foram acrescentados 200µL de álcool 70% para lavagem do DNA. Esse processo foi repetido mais uma vez. Os tubos foram centrifugados a 12000 Xg por mais 3 minutos e finalmente o sobrenadante foi descartado e o DNA foi seco 4°C por 12 horas e em seguida adicionados 50µL de TE e aquecido por 15 minutos a 37°C. Posteriormente o DNA foi quantificado em gel de agarose 1,2% juntamente com marcador λ. Após eletroforese o gel foi corado por 15 – 20 min. em solução de brometo de etídio (1,0 µg/m) e fotografado sobre luz U.V. Para a realização da reação de PCR, as amostras foram padronizadas e diluídas para 20ng.

3.8 Amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA

A reação de PCR foi preparada com 2,0 μ L de DNA fúngico com o intuito de amplificar a região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA. Para cada amostra, os componentes e quantidades da mistura para cada reação da PCR estão descritos na Tabela 5, os iniciadores utilizados para a amplificação foram ITS1 (5'-TCCGTAGGTAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Em seguida, as amostras foram amplificadas em termociclador programado para uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por um minuto.

A separação dos fragmentos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,2% (1,2g de agarose dissolvidos em 100 mL Tampão Tris-Ácido acético-EDTA 1X) a 100 Volts, conjuntamente com o marcador de peso molecular (1Kb). Após o término da eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,0 μ g/mL), e foi fotografado (câmara Kodak Digital Science), sobre transluminador de luz UV.

Tabela 5. Componentes e Concentrações Utilizadas nas Reações de PCR.

Componentes	1 Reação (μ L)	Concentração Final
Água Milli-Q*	34.1	
Tampão da enzima (Invitrogen)	5.0	7,4Mm
MgC12	3.7	50mM
dNTP (2,5uM de cada dNTP)	4.0	0,2 mM
Iniciador ITS1	0.4	50 μ M
Iniciador ITS4	0.4	50 μ M
Taq DNA Polimerase (Invitrogen)	0.2	1u/ μ L
DNA (10ng/uL)	2,0	

*Autoclavada.

3.9 Seqüenciamento

A purificação do produto da PCR foi realizada pelo método de PEG 8000. Um volume de 50 μ L do produto de PCR de cada amostra foi transferido para microtubos de 1,5mL contendo 50 μ L de PEG 8000, em seguida o material foi incubado a 37°C por 15 min., centrifugado a 14.000 Xg por 15 min. (temperatura

ambiente) e o sobrenadante foi retirado e descartado. Em seguida, 125 μ L de etanol 80% gelado foi adicionado aos microtubos, que foram incubados, em temperatura ambiente por 1 min. e após isto o sobrenadante foi retirado e descartado, mais 125 μ L de etanol 80% gelado foi adicionado aos microtubos, em seguida, incubados em temperatura ambiente por 1 min. e o sobrenadante retirado e descartado. Após, os microtubos contendo produto de PCR purificado, foram secos, para completa evaporação do etanol, e após isto o DNA foi dissolvido em água MilliQ e mantido em câmara fria a 4°C por 12 horas. A fim de confirmar a eficiência do processo de purificação, os produtos de PCR purificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,2%. As amostras foram enviadas ao Instituto do Genoma Humano (IB/USP) onde foram seqüenciadas.

As seqüências foram contrastadas com seqüências depositadas no *GenBank* <[HTTP://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)>, em busca de seqüências mais similares.

3.10 Análise multivarida

A análise multivariada foi realizada pelo Dr. Fernando Dini Andreote da EMBRAPA Meio Ambiente. As freqüências de isolamento de cada grupo foram consideradas em cada amostra avaliada. Como fatores ambientais foram considerados as variáveis nominais (qualitativas) local de isolamento e aplicação de fungicida, enquanto que como variáveis quantitativas foram consideradas pluviosidade, temperatura e freqüência de inibição de *Fusarium* e *Botrytis*. A análise de Correlação por DCA determinou o gradiente de distribuição das espécies nas amostras, levando à aplicação do modelo matemático de redundância. O teste estatístico de permutação de Monte Carlo foi aplicado considerando 499 permutações aleatórias, permitindo avaliar a significância (valor *p*) dos fatores ambientais considerados na distribuição de espécies nas amostras.

3.11 Experimentos de antagonismo

3.11.1 Linhagens

As linhagens de *Botrytis* sp. (isolado de *Eucalyptus saligna*) e *Fusarium* sp. (agente causal de fusariose em videiras) foram gentilmente cedidas pela Dra. Isabel Paz da coleção da Universidade de Caxias do Sul e pela EMBRAPA Uva e Vinho, respectivamente. *Botrytis* sp. e *Fusarium* sp. foram crescidos em placas contendo meio BDA por 7 dias a 22°C e 28°C respectivamente. Após isto, foram conservados a 4°C.

3.11.2 Antagonismo

Os experimentos de antagonismo *in vitro* foram realizados pelo método de confrontação direta dos endófitos contra os isolados fitopatogênicos *Fusarium* sp. e *Botrytis* sp. Um disco de 8 mm retirado da borda da colônia do fungo patogênico foi inoculado no centro da placa, contendo meio BDA, e em duas extremidades foram inoculados fungos endofíticos. Como controle o fungo patogênico foi inoculado sem a presença dos endófitos. A avaliação foi realizada quando a colônia do fungo (controle) alcançou as bordas da placa. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

3.12 Experimentos de antibiose

3.12.1 Linhagens

As linhagens de bactérias e levedura patogênicas (Tabela 6) utilizadas neste trabalho foram obtidos da coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos da

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) e Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (DAUFPE).

Linhagens de *Xanthomonas axonopodis* e *Xanthomonas citri* foram mantidas em estufa a 28°C e *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Candida albicans* a 37°C, todas as linhagens foram crescidas em placas de petri e tubos de penicilina (10 ml) contendo meio Nutriente Agar (NA) por cinco dias. Após esse período, todo o material foi armazenado a 4°C.

Tabela 6. Linhagens de bactérias e levedura.

Bactéria	Linhagem
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	ESALQ 01
<i>Bacillus subtilis</i>	DAUFPE 16
<i>Escherichia coli</i>	DAUFPE 22A 25922 ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	DAUFE 01
<i>Candida albicans</i>	DAUFPE MC7

3.12.2 Produção de compostos com atividade antimicrobiana

Para a verificação da produção de compostos com atividade antimicrobiana pelos fungos endofíticos isolados, cada amostra foi crescida em tubos Falcon contendo 10 mL de meio BD por um período de 14 dias ou até o fungo alcançar a fase estacionária. Após isto, o meio foi retirado com auxílio de uma pipeta e transferidos 2 mL para tubo centrifugado (14000 Xg) por 10 min. Em seguida o sobrenadante foi transferido para outro tubo e conservado em 4°C para experimentos posteriores .

Testes de produção de compostos antimicrobianos foram realizados utilizando-se o sobrenadante centrifugado do crescimento dos endófitos contra as bactérias *Xanthomonas axonopodis*; *Bacillus subtilis*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*, e a levedura *Candida albicans*. As bactérias e a levedura foram inoculadas em placas contendo meio nutriente Agar NA (extrato de carne: 3,0g; peptona: 5,0g; Agar: 15,0g; água destilada: 1,0 L; pH 7,3), com auxílio de alça de vidro (100µL de solução bacteriana e de leveduras em diluição de 10⁻¹). Cada placa inoculada com uma bactéria recebeu cinco perfurações, com um perfurador de

0,8 mm de diâmetro. Após isto, cada poço recebeu 60 µL do sobrenadante do isolado endofítico a ser testado. Após incubação a 28°C por 24 horas, as placas foram observadas para verificação de formação de halo de inibição.

3.12.3 Extração de compostos bioativos

A linhagem de fungo 2J2DFT6 foi inoculada em 250 mL de BD, e mantida em cultura estática a 28°C por 14 dias. Após isto, a cultura foi centrifugada por 15 minutos em 14000rpm o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi enviado ao Laboratório de Síntese de Compostos Organometálicos do Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (CIIB), onde foi realizada a extração dos compostos bioativos, pela equipe do Dr. Antonio Carlos Fávero Caires de acordo com metodologia padrão, utilizando clorofórmio, acetona e água como solventes. Após extração, a amostra foi concentrada com rotavapor para um volume de 5 mL.

3.12.4 Análise de antibiose do metabólito extraído da linhagem 2J2DFT6

Para testar a presença dos compostos bioativos, extraídos com solventes orgânicos, dos metabólitos produzidos pelo isolado 2J2DFT6, foram realizados testes dos extratos contra as bactérias *Xanthomonas axonopodis*; *Bacillus subtilis*; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; e a levedura *Candida albicans*. As bactérias e levedura foram inoculadas em placas contendo meio NA (100 µL de solução bacteriana e de levedura com diluição de 10^{-1}) com auxílio de alça de vidro. Cada placa inoculada com uma bactéria ou a levedura recebeu três discos de papel filtro de 10,0mm de raio cada um, que foram previamente embebidos com 80µL das frações obtidas em H₂O; Clorofórmio e Acetona e secos por 4 horas para a eliminação do solvente. Após incubação a 28°C por 24 horas, as placas foram observadas para verificação de formação de halo de inibição.

3.12.5 Caracterização do composto

O extrato obtido pela extração em clorofórmio foi analisado pela técnica de FTIR/ATR. Utilizou-se um espectrofotômetro Perkin-Elmer mod. Spectrum 100 e um monocristal de Seleneto de Zinco 45° como elemento óptico de reflexão interna. Um filme da amostra foi obtido depositando-se 1 mL da solução sobre o monocristal e evaporando-se o solvente. O espectro de infravermelho foi medido na região de $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$, com uma resolução de 2 cm^{-1} .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento de fungos endofíticos

Por meio da metodologia empregada foi possível isolar 275 fungos associados a videiras em cultura agroecológica em Salesópolis e cultura comercial em Jundiaí (vinhedos A e B). A Tabela 7 mostra todos os isolamentos realizados bem como as frequências de infecção.

Tabela 7. Frequência de infecção (F.I.) de fungos endofíticos isolados de videiras *Vitis labrusca* L var. Niagara Rosada cultivadas em Salesópolis (cultura agroecológica) e Jundiaí vinhedos A e B (cultura comercial), parte da planta de onde foram isolados os endófitos e época da coleta do material vegetal.

Tratamento	Local	Parte planta	Mês coleta 2007	Frequência infecção (F.I.)
T1	Salesópolis	Folha	Janeiro	0,99±0,01
T2	Jundiaí A	Folha	Janeiro	0,45±0,19
T3	Jundiaí B	Folha	Janeiro	0,86±0,09
T4	Salesópolis	Folha	Junho	0,60±0,07
T5	Jundiaí A	Folha	Junho	0,78±0,07
T6	Jundiaí B	Folha	Junho	0,87±0,09
T7	Salesópolis	Caule	Junho	0,22±0,02
T8	Jundiaí A	Caule	Junho	0,53±0,14
T9	Jundiaí B	Caule	Junho	0,73±0,09

Em relação ao local de amostragem, os valores de frequência de infecção em folhas variaram entre 0,45 e 0,99 (Figura 2). O valor de frequência de infecção (FI) de endófitos isolados de folhas de videiras cultivadas em Salesópolis e Jundiaí (vinhedo B), em janeiro, não diferiu significativamente. No vinhedo A, em Jundiaí no

mesmo período, foi obtido o menor valor de FI de endófitos de folha, 0,45, como os vinhedos A e B estão sob as mesmas condições climáticas, possivelmente na época do isolamento as plantas, deste campo, ainda estavam sob a ação da aplicação de tratamentos fungicidas.

Comparando-se as freqüências de infecção obtidas em caule em Salesópolis e Jundiaí, foram observadas maiores freqüências de isolamento nos vinhedos de Jundiaí (A e B), variando entre 0,53 e 0,73, em Salesópolis o valor de freqüência de infecção obtido em caule foi 0,22 (Figura 3). A diferença entre a freqüência de infecção de caule em Salesópolis e Jundiaí possivelmente é devido a diferenças climáticas locais, tais como temperaturas e pluviosidades médias mais baixas na região de Salesópolis que em Jundiaí no mês de junho.

Quanto a variações na freqüência de infecção, segundo a época em que foi realizado o isolamento de fungos endofíticos de folhas (Figura 2), o valor da FI, nos isolamentos de endófitos de videiras cultivadas na região de Salesópolis, no mês de janeiro (verão) foi maior comparada ao valor obtido no mês de junho (inverno). Brum (2006) em estudo de comunidades endofíticas de videiras Niagara Rosada, observou a prevalência de fungos endofíticos isolados nas coletas em que as temperaturas foram mais altas, estes dados coincidem com os resultados obtidos neste estudo para a mesma região. Em Jundiaí, no vinhedo A, o valor de FI foi menor em janeiro comparado ao observado no mês de junho e no vinhedo B as freqüências de infecção foram praticamente iguais nas duas amostragens. O aumento do número total de isolados endofíticos ao longo do tempo tem correlação com a sazonalidade e a idade da planta, como já descrito para outras plantas (BERNSTEIN & CARROLL, 1977; BROWN *et al.*, 1998; BUSSABAN *et al.*, 2001; RODRIGUES & SAMUELS, 1990; RODRIGUES, 1992). Os fatos que podem contribuir para estas mudanças ao longo da idade da planta estão relacionados ao aumento da exposição a propágulos em relação ao tempo e mudanças fisiológicas nos tecidos das mesmas (ESPINOSA-GARCIA & LONGENHEIM, 1990). Em tecidos foliares de videiras, o ponto máximo de infecção por endófitos deve ser pouco antes das mudanças fisiológicas, na planta, que culminaram com a perda das folhas e a entrada no período de repouso hibernar, pois nesta época as folhas atingiram a idade máxima. Desta maneira, mudanças locais de temperatura, nos meses em que a planta entra em repouso hibernar, podem interferir adiantando ou atrasando o início do repouso hibernar, de modo que nestes meses de transição é provável que os

valores de freqüência de infecção sejam flutuantes por estarem entre o ponto máximo de infecção dos tecidos e o declínio pela chegada da época de repouso hibernar da planta hospedeira. A temperatura média em Salesópolis é menor que em Jundiáí (Tabela 1), possivelmente, as videiras na região de Salesópolis estavam mais adiantadas no processo de entrada na fase de repouso hibernar e isto poderia explicar a freqüência de infecção em caule e folha, em Salesópolis no mês de junho, ter sido menor que em Jundiáí.

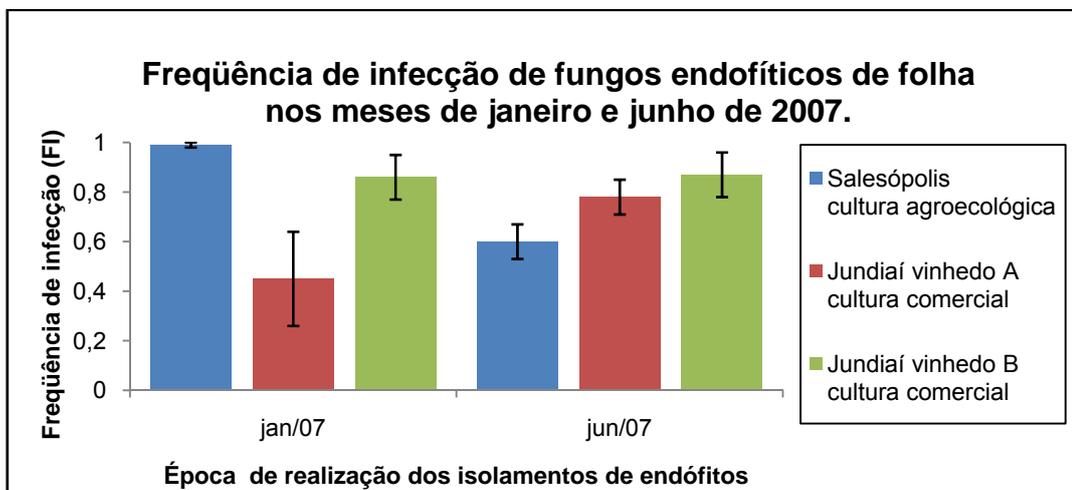


Figura 2. Freqüência de infecção de fungos endofíticos em tecidos foliares de Niagara Rosada em relação aos locais amostrados.

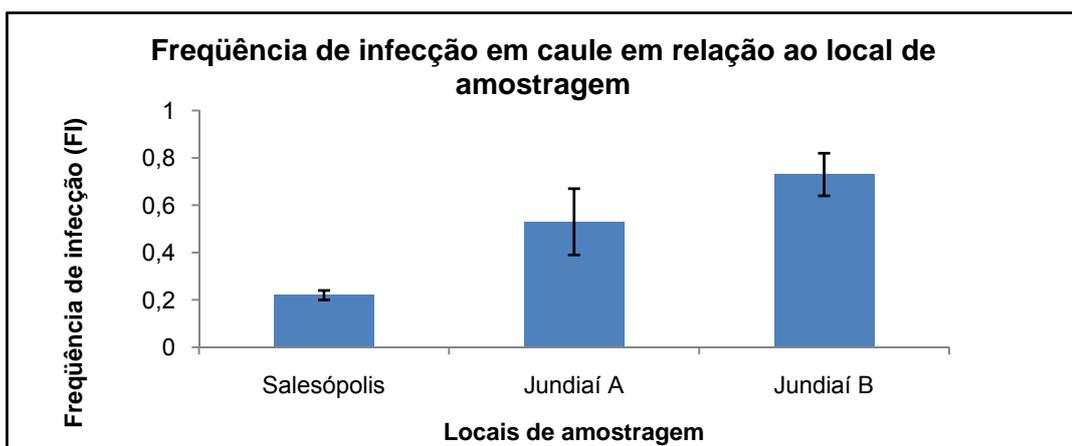


Figura 3. Freqüência de infecção de fungos endofíticos em caules de Niagara Rosada em relação aos locais amostrados.

Considerando apenas parte da planta, independente do local de amostragem ou trato cultural, foi observado que a freqüência média de infecção (F.I.)

variou entre 0,22 e 0,87. A Figura 4 mostra os valores das freqüências de infecção obtidas para folha e caule em todos os vinhedos onde foram realizados isolamentos de endófitos. Os valores de FI de folha foram maiores que os encontrados para caule em todos os isolamentos, independente do local de amostragem ou trato cultural. Este dado mostra que a parte da planta a ser analisada pode ser um fator importante na densidade microbiana, visto que a densidade de fungos endofíticos é menor em caule se comparada a FI apresentada para tecido foliar.

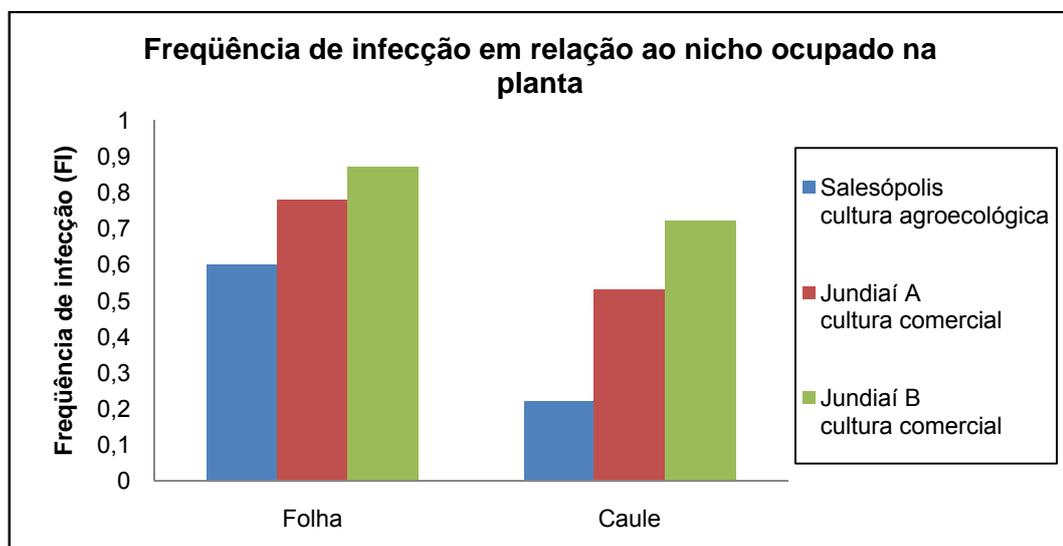


Figura 4. Frequência de infecção nos diferentes nichos ocupados por fungos endofíticos em Niagara Rosada.

Quanto à influência do trato cultural sobre a comunidade endofítica, a cultura agroecológica, em janeiro, apresentou o maior valor de FI comparado aos resultados na cultura comercial. Sartori *et al.* (2005), em uma estimativa sobre a influência de três sistemas de produção de maçãs, convencional, integrado e orgânico, sobre a diversidade das populações de microrganismos, verificou variação nas populações de microrganismos de acordo com o sistema de produção e época da coleta, e constatou que o sistema agroecológico apresentou um maior número e diversidade de microrganismos.

Foi observado na cultura comercial diminuição da frequência de infecção de endófitos no período após aplicação de fungicidas e durante o tempo de permanência do fungicida no meio ambiente, após isto, a frequência de infecção

aumenta gradativamente. No vinhedo A, em Jundiaí, os últimos produtos fungicidas aplicados antes das coletas foram: Maconzeb +Metalaxyl-M (vida curta) em janeiro de 2007 e Oxicloreto de Cobre (vida longa) em novembro de 2006. A FI no vinhedo A no mês de Janeiro/07 foi 0,45, menor que os valores obtidos para os outros vinhedos (cultura agroecológica e comercial B que estava a 6 meses sem tratamento fungicida em janeiro) é provável que a comunidade endofítica ainda estivesse sob a ação do fungicida sistêmico Maconzeb+Metalaxyl-M e do Oxicloreto de Cobre. Em junho/07, após cinco meses sem receber nenhum tratamento fungicida, a FI obtida em plantas no vinhedo A aumentou para 0,78. O vinhedo B, em janeiro/07, que estava a mais de 6 meses sem receber tratamento fungicida apresentou, em janeiro, valor maior de FI 0,86 e em junho 0,87, valores de FI maiores que aqueles obtidos no vinhedo A (Figura 2). Esta recuperação no número de endófitos colonizando plantas tratadas com agroquímicos, também foi observada por Stuart (2006) que investigou a diversidade da comunidade endofítica de fungos associada à cana-de-açúcar transgênica tolerante a imazapyr e suas linhas de cultivo não transgênicas, e observou que a aplicação do herbicida imazapyr induziu mudanças rápidas e transientes na comunidade de fungos, as plantas transgênicas induziram mudanças mais lentas que foram mantidas ao longo do tempo.

4.2 Análise Multivariada

A análise multivariada mostrou o comportamento conjunto das variáveis amostradas. O gradiente de distribuição dos dados foi de 1.495, o que determinou a aplicação da análise de redundância (RDA). Nesta análise, como os vetores tendem para a mesma direção pode-se dizer que a temperatura e a pluviosidade aumentam conjuntamente, como já esperado. Adicionalmente a estes fatores, a frequência de inibição de *Fusarium* também respondeu ao aumento destes fatores no ambiente, enquanto que a frequência de inibição de *Botrytis* parece ser independente da variação na temperatura e pluviosidade. Porém, correlacionando estatisticamente a ocorrência de isolados endofíticos com os fatores ambientais, o único fator significativamente interferindo na comunidade fúngica obtida é a temperatura

($p=0,05$). Os demais apenas mostram tendências, porém sem significância ($p>0,05$) de acordo com o teste de permutação Monte Carlo (Figura 5).

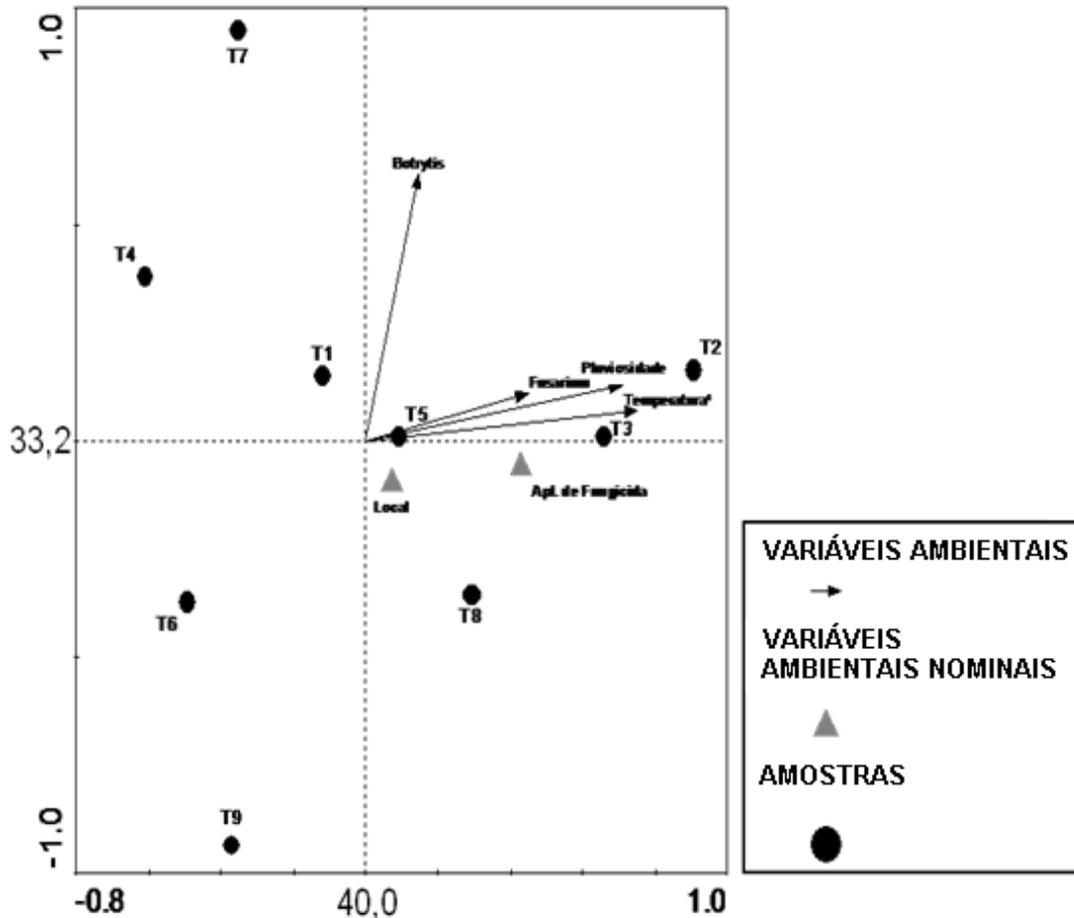


Figura 5. Análise de redundância (RDA) entre a ocorrência de grupos de fungos endofíticos e os fatores ambientais. Todos os fatores ambientais são apresentados, porém apenas os marcados com * foram significantes para determinar a composição das comunidades ($p<0,05$) de acordo com o teste de permutação de Monte Carlo. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da correlação grupos-variáveis ambientais no respectivo eixo.

4.3 Análise morfológica

4.3.1 Análise morfológica macroscópica

Com relação às semelhanças morfológicas e coloração micelial, os fungos endofíticos analisados apresentaram grande variabilidade (Figura 6) e a freqüência em cada grupo é apresentada na Figura 7, muito embora os grupos morfológicos tenham sido classificados segundo as tonalidades branca, cinza, preta, verde, marrom, amarela, cinza com laranja, rosa e vermelha, segundo a cor predominante. Fungos brancos e cinza representaram a metade do total de isolados sendo estes fungos de crescimento rápido. Fungos de crescimento rápido *in vitro* predominaram em quantidade de isolados obtidos dos tecidos foliares e caulinares de videiras da variedade Niagara Rosada, totalizando 77,4% enquanto fungos de crescimento médio e lento representaram 14,6% e 8% respectivamente. Embora tenham sido predominantes, os fungos de crescimento rápido não necessariamente se encontram em maior número sob condições naturais, pois as condições de laboratório e método de isolamento utilizado podem ter privilegiado o crescimento destes fungos selecionando-os.

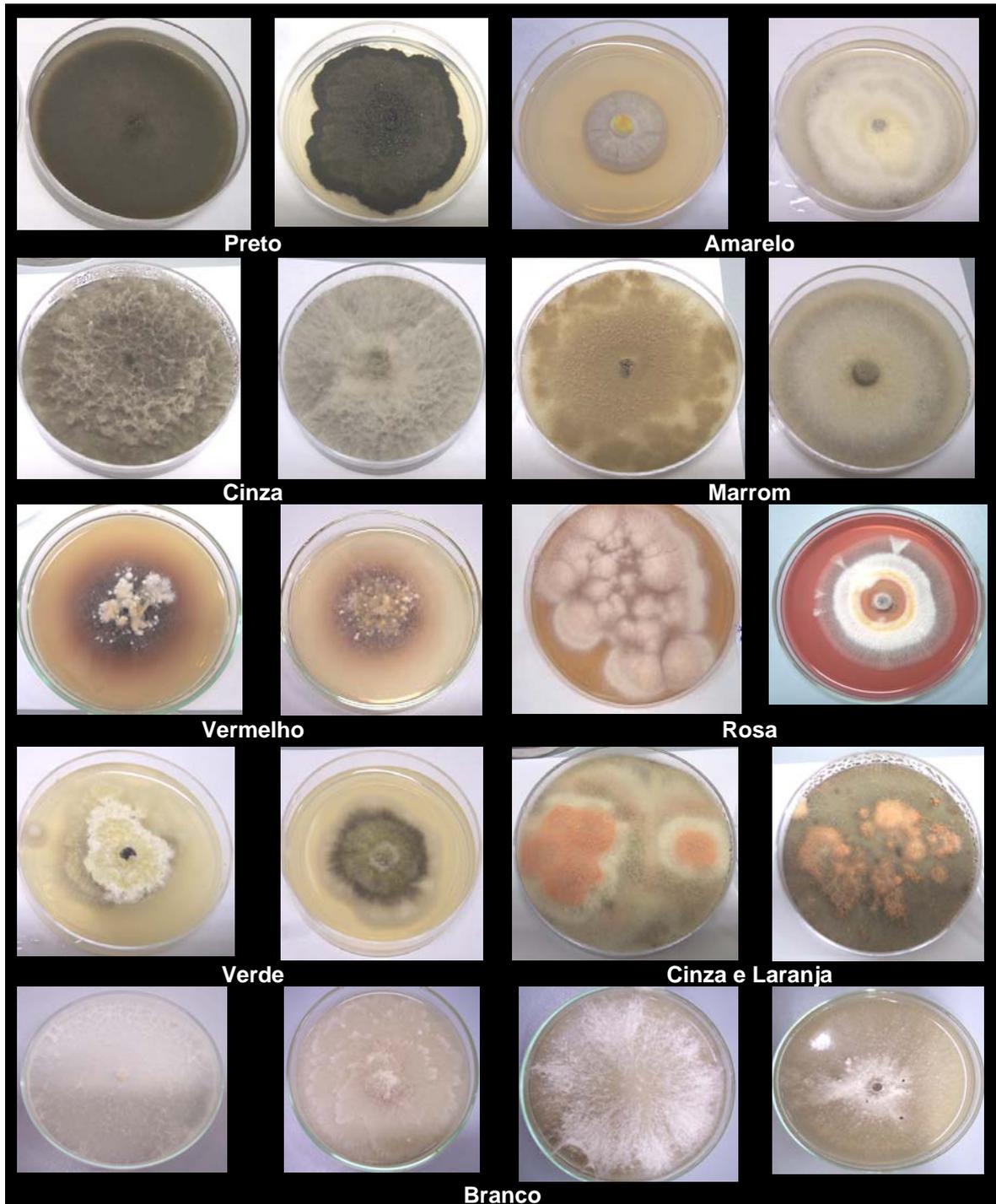


Figura 6. Grupos morfológicos de fungos endofíticos de Niagara Rosada. Agrupamentos baseados na coloração micelial predominante.

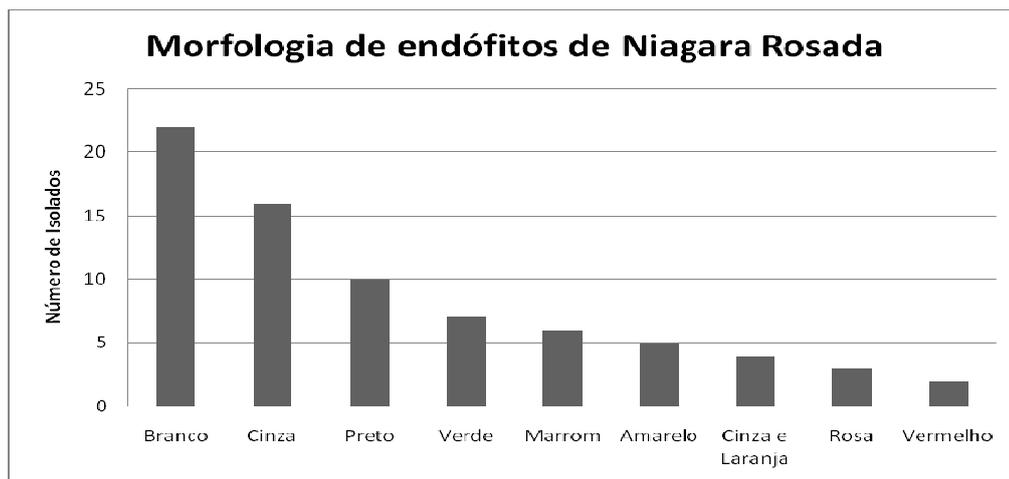


Figura 7. Frequência de grupos morfológicos. Distribuição geral de fungos endofíticos de *Vitis labrusca* L. var. Niagara Rosada segundo a frequência desses isolados dentro das classes de coloração micelial.

4.3.2 Identificação citológica

Os fungos isolados de folha e caule de Niagara Rosada foram microcultivados e identificados pela morfologia de estruturas reprodutivas. A identificação citológica depende da produção de estruturas reprodutivas *in vitro* (Figura 8) e da observação de estruturas características que possibilitam a identificação do isolado. Dos fungos endofíticos isolados cerca de 20 % puderam ser identificados por técnicas citológicas, visto que alguns isolados não produziram estruturas reprodutivas nas condições utilizadas.

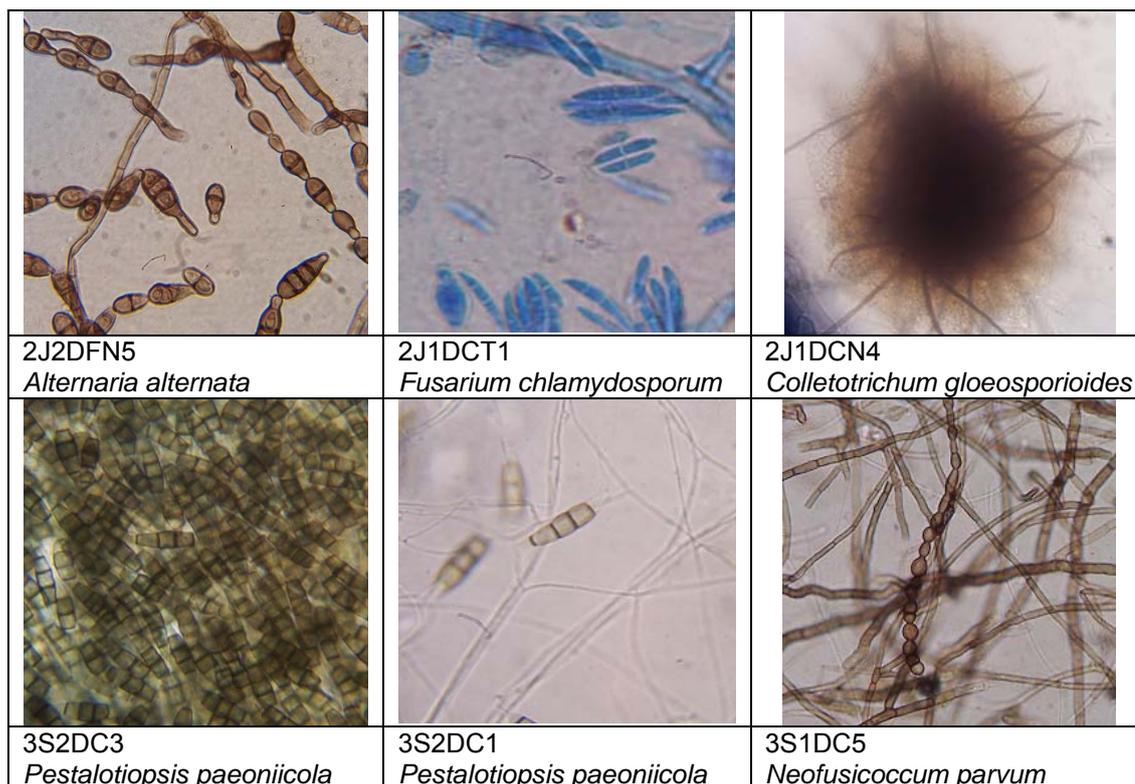


Figura 8. Estruturas Fúngicas. As fotos de estruturas reprodutivas (código da amostra e identificação) observadas ao microscópio ótico em aumento de 400x e 1000x.

4.4 Caracterização da comunidade de fungos endofíticos de Niagara Rosada

O protocolo utilizado para a extração de DNA genômico dos fungos endofíticos isolados de Niagara Rosada (*Vitis labrusca*) proporcionou bom rendimento e DNA de boa qualidade (Figura 9). A amplificação da região ITS1 – 5,8S – ITS2 do gene rRNA resultou em produtos de PCR com tamanho entre 600pb a 700pb (Figura 10).

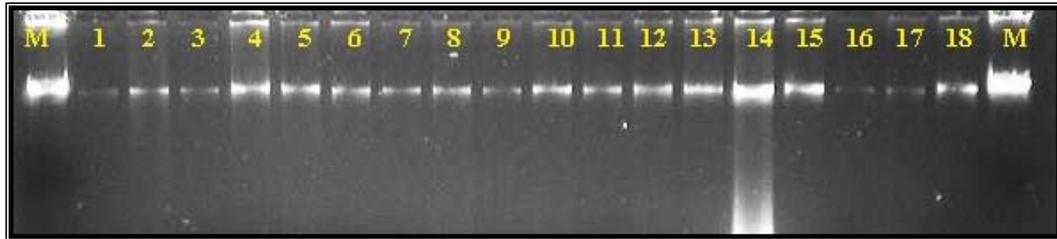


Figura 9. Gel de eletroforese mostrando a qualidade do DNA total de fungos endofíticos de Niagara Rosada (*Vitis labrusca*).



Figura10. Gel de eletroforese mostrando o padrão de amplificação das regiões ITS1 – 5,8S – ITS2 do rDNA de fungos endofíticos isolados de Niagara Rosada (*Vitis labrusca*).

O seqüenciamento da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA foi realizado para identificação dos fungos endofíticos e para avaliar a relação filogenética entre isolados. Foram utilizados 78 isolados fúngicos, 30% dos isolados de cada tratamento foram selecionados e seqüenciados. As seqüências foram confrontadas com o banco de dados do *GeneBank*, por meio do *Blast_n*. Os alinhamentos para a identificação dos isolados e construção dos dendrogramas foram realizados com as seqüências que apresentaram similaridade de bases entre 90 e 100% encontradas no *GeneBank*, conferindo uma boa confiabilidade (Anexo A).

Os fungos endofíticos isolados de *Vitis labrusca* L. var. Niagara Rosada pertencem aos filos Ascomycota e Basidiomycota, sendo 90% de todos os isolados ascomicetos e apenas 10% basidiomicetos. As classes de ascomicetos presentes foram Sordariomycetes 70% e Dothideomycetes 30% (Figura 11), os basidiomicetos isolados foram todos da classe Agaricomycetes.

A porcentagem de isolados ascomicetos em cada ordem das classes Sordariomycetes e Dothideomycetes pode ser observada na Figura 12. Na classe

Dothideomycetes houve predomínio dos isolados pertencentes à ordem Pleosporales, enquanto na classe Sordariomycetes as ordens predominantes foram Diaporthales, Phyllachorales e Xylariales. As ordens Hypocreales e Sordariales apresentaram número reduzido de isolados.

Para fins de organização dos dados, os isolados foram selecionados pela Ordem a que pertencem, para construção dos dendrogramas. Assim, foram construídos 7 dendrogramas: *Diaporthales* (Figura 13); *Phyllachorales* (Figura 14); *Xylariales* (Figura 15); as ordens Hypocreales e Sordariales, devido ao número reduzido de isolados, foram agrupadas (Figura 16); Pleosporales (Figura 17); *Botryosphaeriales* (Figura 18) e *Agaricales* (Figura 19).

Na Figura 14, Ordem *Phyllachorales*, é possível observar que todas as seqüências de isolados apresentaram grande similaridade formando agrupamentos apenas com seqüências do gênero *Colletotrichum* e sua forma teleomórfica *Glomerella*, o mesmo ocorreu na Ordem *Diaporthales*, em que os isolados apresentaram similaridade com o complexo *Diaporthe/Phomopsis* (Figura 13). Nos demais grupos, os isolados apresentaram similaridade com maior número de gêneros, na Figura 15, Ordem *Xylariales*, os gêneros presentes foram *Nodulisporium*, *Pestalotiopsis* e *Hypoxylon*, sendo predominante o gênero *Nodulisporium*. Em *Botryosphaeriales*, Figura 18, os gêneros encontrados foram *Botryosphaeria*, *Guignardia* e *Pseudofusicoccum*, e o mais freqüente foi *Botryosphaeria*. O gênero *Alternaria* foi o mais freqüente dentro da ordem Pleosporales. Os isolados da Ordem *Agaricales* distribuíram-se formando quatro ramos bem definidos (Figura 19), as seqüências dos isolados apresentaram similaridade com os gêneros *Irpex*, *Homobasidiomycete*, *Aphylophorales* e *Schizophyllum*.

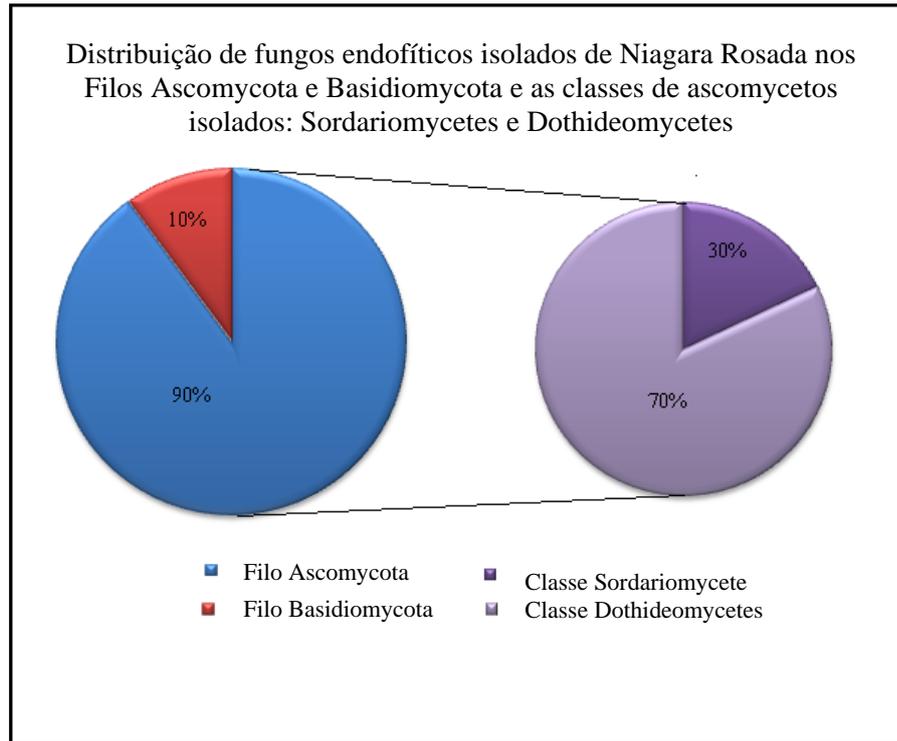


Figura 11. Porcentagem de fungos endofíticos isolados nos Filos *Basidiomycota* e *Ascomycota* e distribuição dos ascomicetos nas classes *Dothideomycetes* e *Sordariomycetes*.

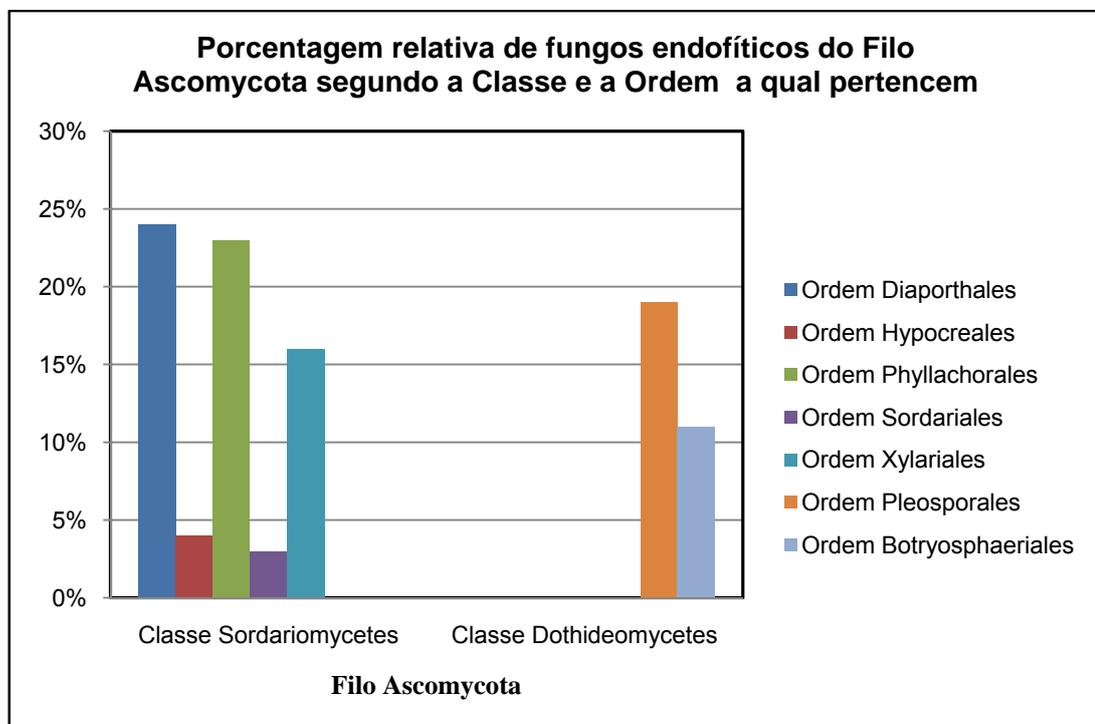


Figura 12. Porcentagem das Ordens das Classes *Sordariomycetes* e *Dothideomycetes* na comunidade fúngica amostrada.

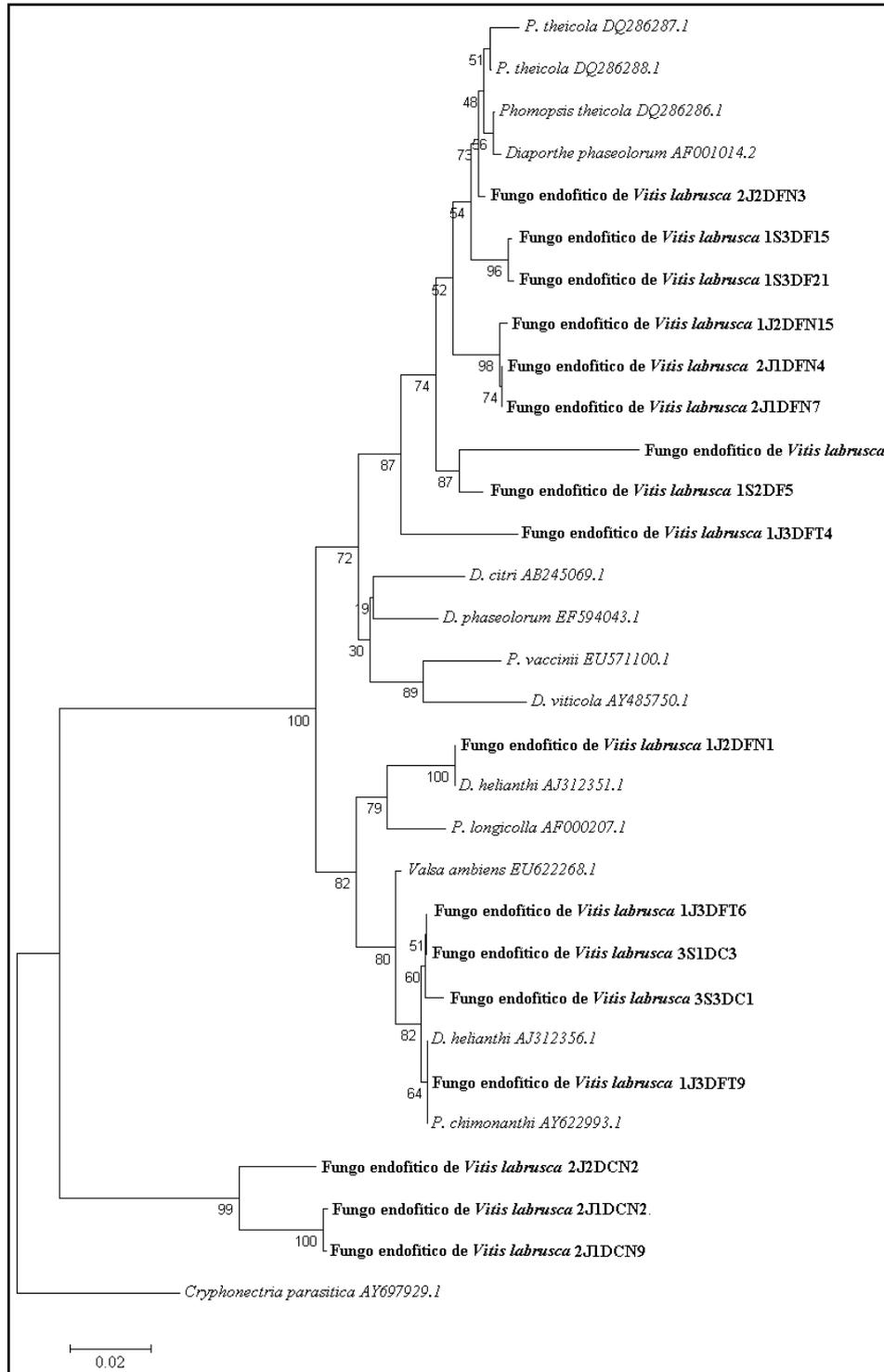


Figura 13. Dendrograma construído pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes & Cantor (1969) para as seqüências da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA de isolados de fungos endofíticos da Ordem Diaporthales. Seqüências referência do GenBank foram utilizadas para comparação entre os isolados. O ascomiceto *Cryphonectria parasitica* foi utilizado como grupo externo. Em negrito estão as seqüências obtidas neste trabalho. Valores de *bootstrap* ($n=1000$ replicatas) $\geq 50\%$ estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0.02 substituições por posição.

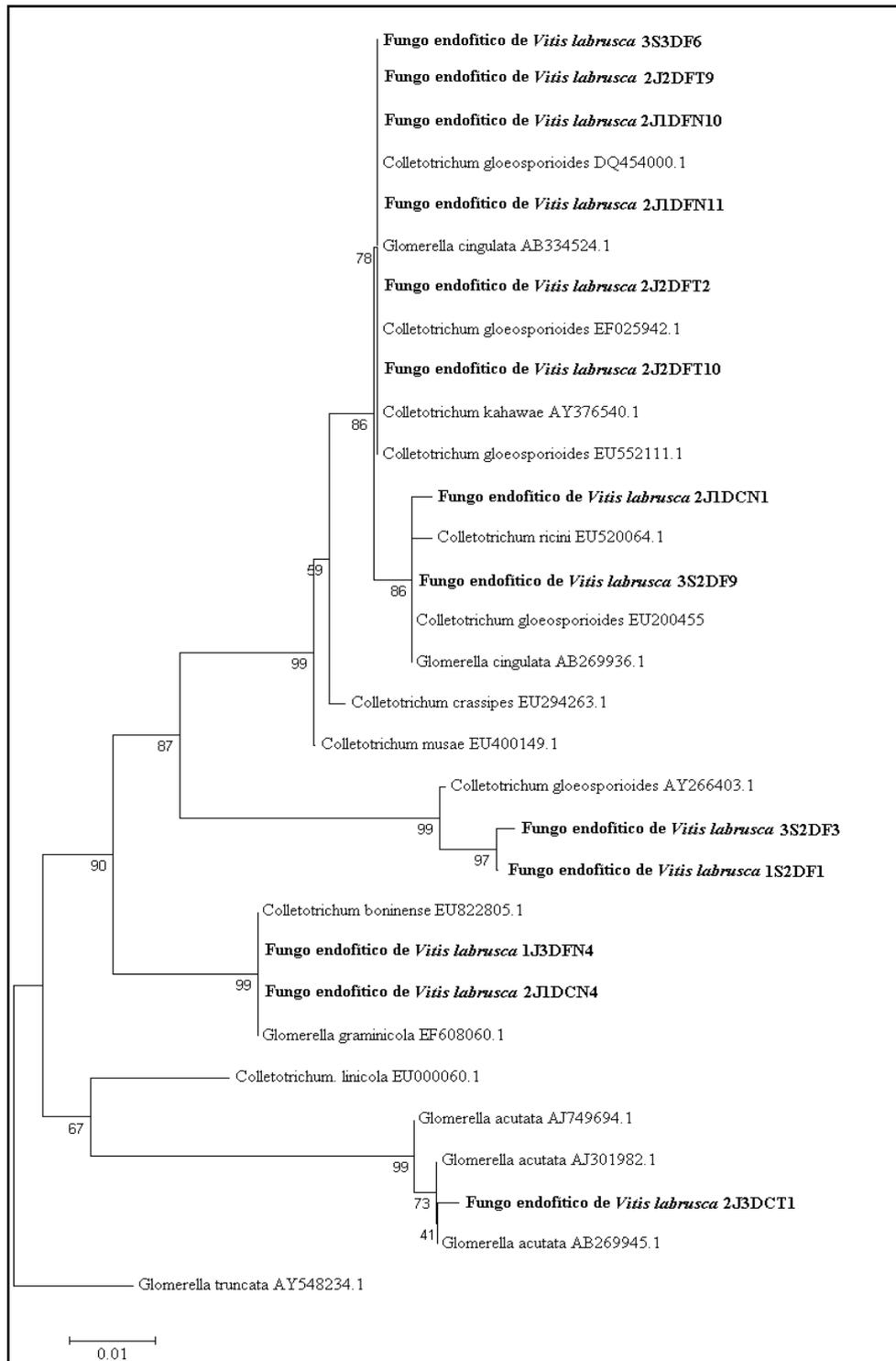


Figura 14. Dendrograma construído pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes & Cantor (1969) para as seqüências da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA de isolados de fungos endofíticos da Ordem Phyllachorales. Seqüências referência do GenBank foram utilizadas para comparação entre os isolados. O ascomiceto *Glomerella truncata* foi utilizado como grupo externo. Em negrito estão as seqüências obtidas neste trabalho. Valores de *bootstrap* ($n=1000$ replicatas) $\geq 50\%$ estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0.01 substituições por posição.

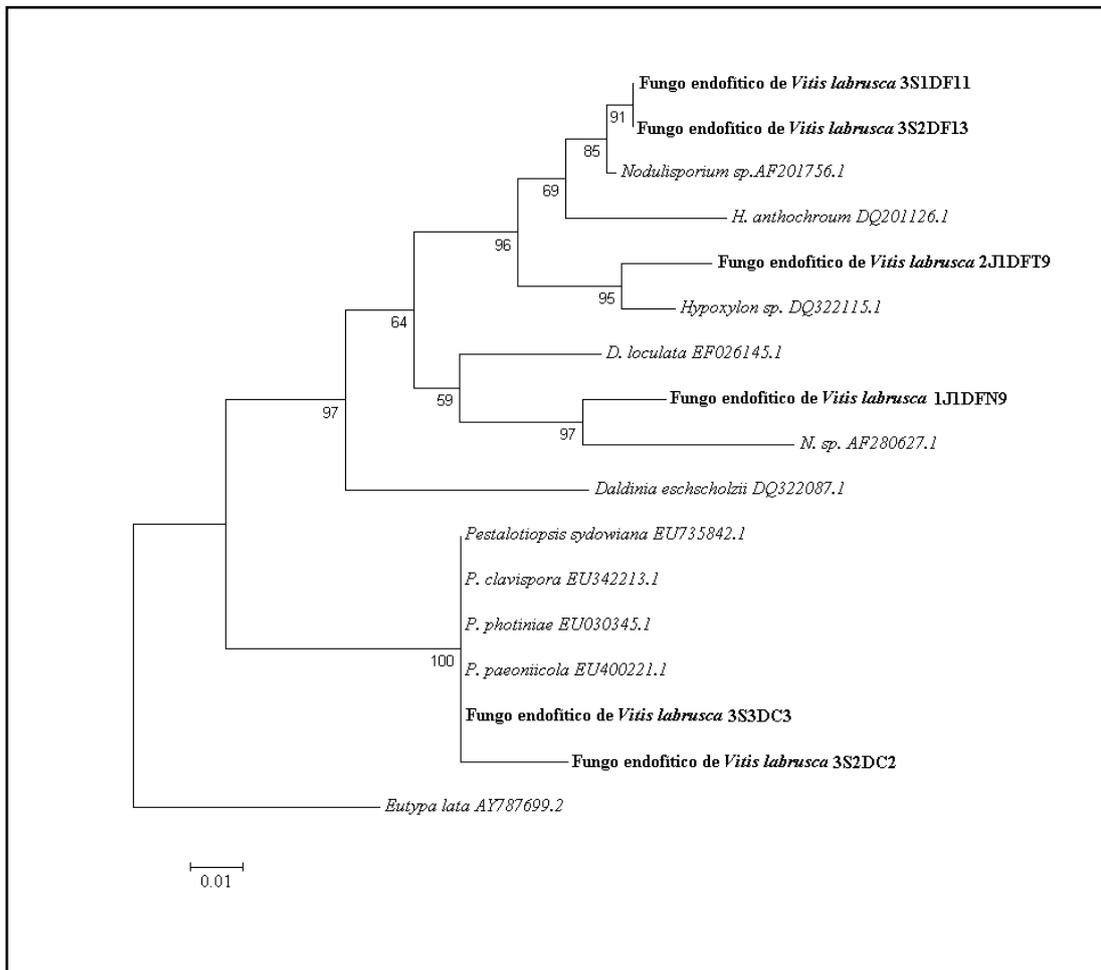


Figura 15. Dendrograma construído pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes & Cantor (1969) para as seqüências da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA de isolados de fungos endofíticos da Ordem Xylariales. Seqüências referência do GenBank foram utilizadas para comparação entre os isolados. O ascomiceto *Eutypa lata* foi utilizado como grupo externo. Em negrito estão as seqüências obtidas neste trabalho. Valores de *bootstrap* (n=1000 replicatas) \geq 50% estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0.01 substituições por posição.

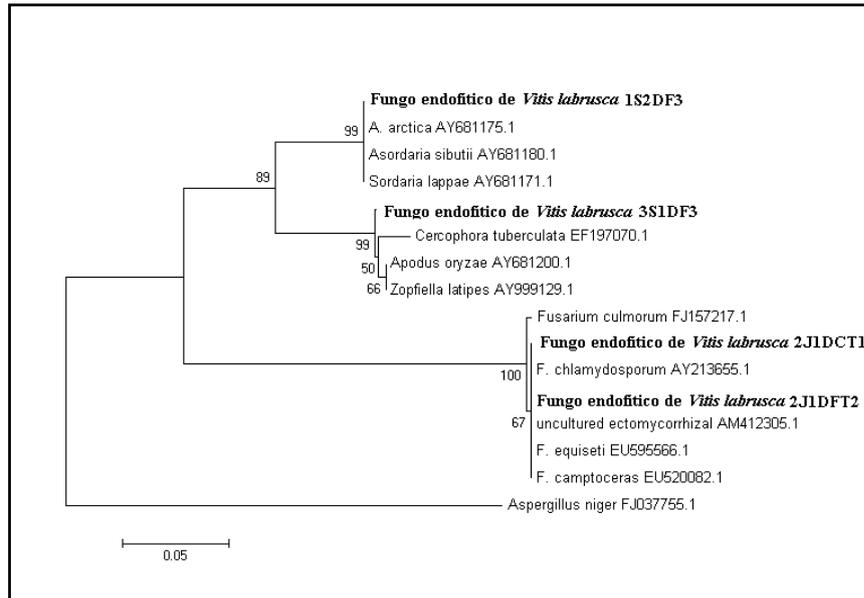


Figura 16. Dendrograma construído pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes & Cantor (1969) para as seqüências da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA de isolados de fungos endofíticos das Ordens Sordariales e Hypocreales. Seqüências referência do GenBank foram utilizadas para comparação entre os isolados. O ascomiceto *Aspergillus niger* foi utilizado como grupo externo. Em negrito estão as seqüências obtidas neste trabalho. Valores de *bootstrap* ($n=1000$ replicatas) $\geq 50\%$ estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0.01 substituições por posição.

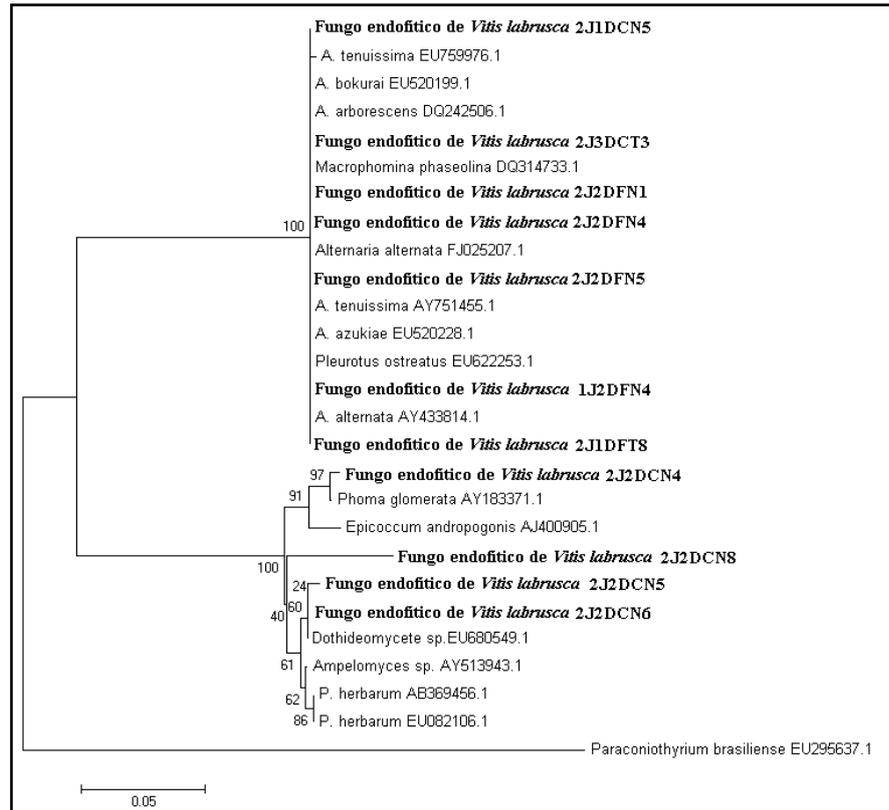


Figura 17. Dendrograma construído pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes & Cantor (1969) para as seqüências da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA de isolados de fungos endofíticos da Ordem Pleosporales. Seqüências referência do GenBank foram utilizadas para comparação entre os isolados. O ascomiceto foi *Paraconiothyrium brasiliense* utilizado como grupo externo. Em negrito estão as seqüências obtidas neste trabalho. Valores de *bootstrap* ($n=1000$ replicatas) $\geq 50\%$ estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0.01 substituições por posição.

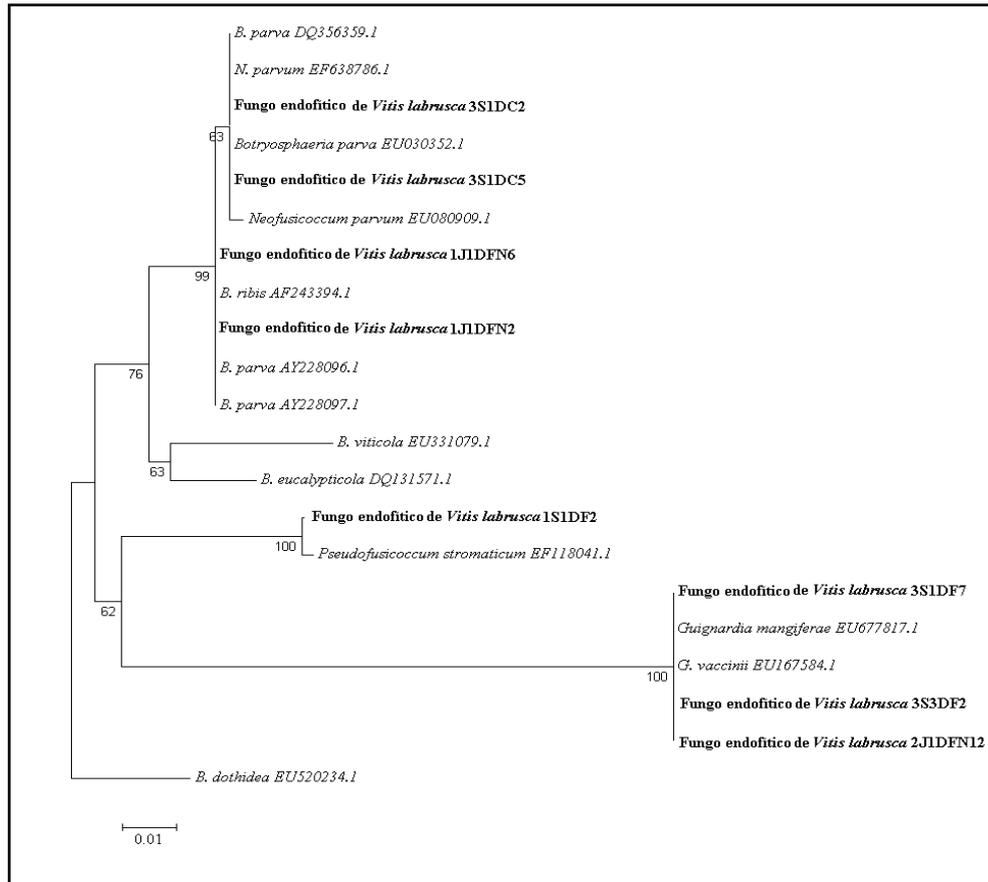


Figura 18. Dendrograma construído pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes & Cantor (1969) para as seqüências da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA de isolados de fungos endofíticos da Ordem Botryosphaeriales. Seqüências referência do GenBank foram utilizadas para comparação entre os isolados. O ascomiceto *Botryosphaeria dothidea* foi utilizado como grupo externo. Em negrito estão as seqüências obtidas neste trabalho. Valores de *bootstrap* ($n=1000$ replicatas) $\geq 50\%$ estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0.01 substituições por posição.

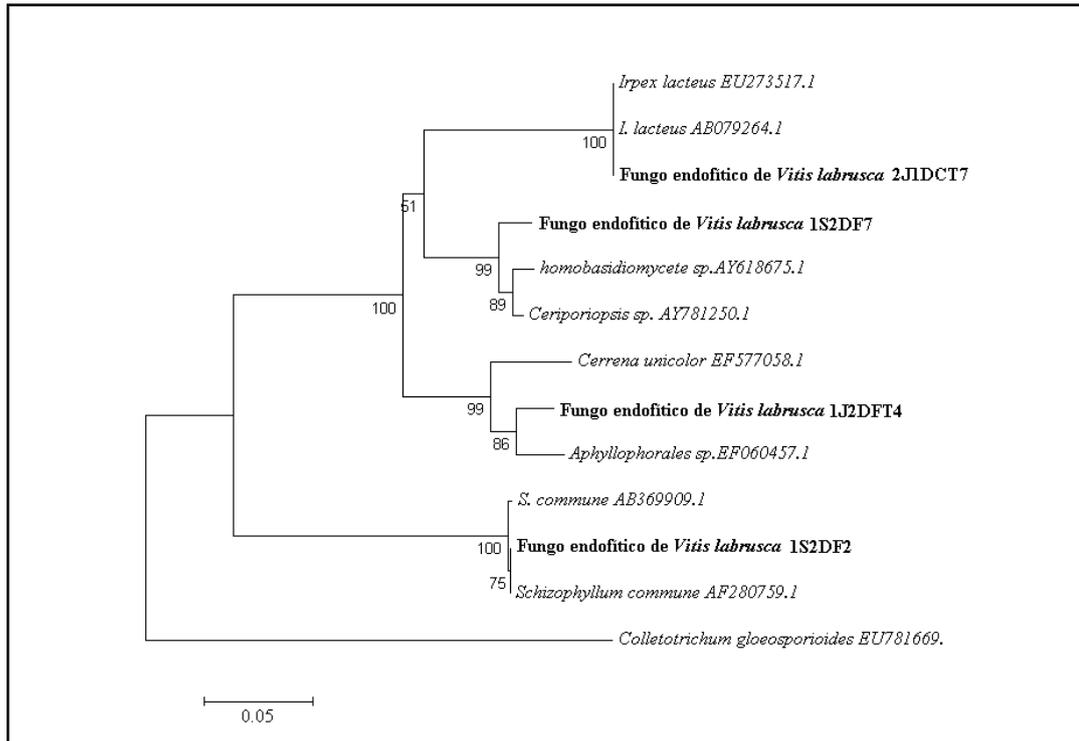


Figura 19. Dendrograma construído pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes & Cantor (1969) para as seqüências da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA de isolados de fungos endofíticos do Filo Basidiomycota. Seqüências referência do GenBank foram utilizadas para comparação entre os isolados. O ascomiceto *Botryosphaeria dothidea* foi utilizado como grupo externo. Em negrito estão as seqüências obtidas neste trabalho. Valores de *bootstrap* (n=1000 replicatas) \geq 50% estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0.05 substituições por posição.

Os gêneros mais freqüentemente isolados foram: *Alternaria*; *Botryosphaeria*; *Colletotrichum*; *Diaporthe* e *Guinardia*.

A maioria dos gêneros isolados de caule e folha de Niagara Rosada é descrita como fitopatogênicos, inclusive para a viticultura. Estes microrganismos isolados podem habitar em equilíbrio, vivendo endofiticamente nos tecidos da videira. Membros do gênero *Botryosphaeria* são cosmopolitas, apresentando ampla variedade de hospedeiros, e ampla distribuição geográfica (NIEKERK *et al.*, 2004). *Colletotrichum* é fitopatogênico em diversas culturas, causando doenças como a podridão da uva madura causada pelo *C. gloeosporioides* e também tem sido isolado endofiticamente de diversas plantas, tais como: *Glycine max* (MENDES *et al.*, 2001) e *Himanthus sucuba* (MAGALHÃES, 2000). Dos fungos associados à Niagara Rosada, o gênero *Colletotrichum* apresentou a maior freqüência.

Espécies do gênero *Guignardia* são citadas como os agentes da podridão da videira e da doença “mancha preta” nas culturas de citros (GLIENKE-BLANCO, 1999). *Colletotrichum*, e *Guignardia* foram isolados de plantas saudáveis neste trabalho, indicando que estes gêneros podem habitar endofiticamente *Vitis labrusca* L. (Niagara Rosada).

Os gêneros *Alternaria*, *Colletotrichum* e *Guignardia* têm sido frequentemente isolados como endófitos de diversas fruteiras: *Anacardium occidentale* (caju), (MEDEIROS, 1988; OLIVEIRA, 1999; FREIRE & BEZERRA, 2001); *Citrus* spp. (laranja, tangerina e limão), (WRIGHT *et al.*, 1998; GAI *et al.*, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2001; GLIENKE-BLANCO *et al.*, 2002; DURAN *et al.*, 2005); *Malpighia emarginata* (acerola), (FREIRE & BEZERRA, 2001); *Mangifera indica* (manga), (FREIRE & BEZERRA, 2001; CARVALHO *et al.*, 2005); *Musa* (banana), (PEREIRA *et al.*, 1999; PHOTITA *et al.*, 2001; CAO *et al.*, 2003); *Punica granatum* (romã), (FREIRE & BEZERRA, 2001).

Em estudo sobre endófitos isolados de *Vitis vinífera*, Mostert *et al.* (2000) observaram que as espécies mais freqüentes foram *Alternaria alternata* (40%) e *Sphaeropsis* sp. (27%).

As espécies *Irpex lacteus* e *Cerrena unicolor* do filo Basidiomycota, e as espécies *Amphilogia gyrosa* (sinônimo: *Cryphonectria gyrosa*), *Asordaria sicutii* e *Metarhizium anisopliae* do filo Ascomycota da classe Sordariomycetes foram isolados pela primeira vez como endófitos. A comunidade fúngica endofítica de Niagara Rosada apresentou alta diversidade de espécies, a Tabela 8 apresenta as espécies encontradas e a freqüência por tratamento.

Tabela 8. Espécies de fungos endofíticos isolados de *Vitis labrusca* var. Niagara Rosada. Os códigos T1, T4 e T7 referem-se a tratamento agroecológico (Salesópolis); T2, T5 e T8 tratamento com fungicidas (Jundiaí), e T3, T6 e T9 vinhedo sem receber tratamento fungicida (Jundiaí).

Espécies	Janeiro / Folha			Junho / Folha			Junho / Caule		
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
<i>Alternaria alternata</i>			1		1	2			
<i>Alternaria arborescens</i>						1		1	
<i>Alternaria tenuissima</i>									1
<i>Amphilogia gyrosa</i>									1
<i>Apodus oryzae</i>				1					
<i>Asordaria sicutii</i>	1								
<i>Botryosphaeria parva</i>			2				1		
<i>Ceriporiopsis sp.</i>	1								
<i>Cerrena unicolor</i>	1	1							
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	1			4	2				1
<i>Daldinia eschscholzii</i>					1				
<i>Daldinia loculata</i>			1						
<i>Diaporthe helianthi</i>		2					2		
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	1		1	1		1			
<i>Epicoccum andropogonis</i>									1
<i>Fusarium sp.</i>					1				
<i>Fusarium chlamydosporium</i>								1	
<i>Fusarium solani</i>					1				
<i>Glomerella acutata</i>								1	
<i>Glomerella cingulata</i>			1	1	1	2		1	
<i>Guignardia mangiferae</i>						1			
<i>Guignardia vaccinii</i>				2					
<i>Hypoxyton sp.</i>				1	2				
<i>Irpex lacteus</i>								1	
<i>Microthia havanensis</i>						1			1
<i>Metarhizium anisopliae</i>	1								
<i>Neofusicoccum parvum</i>							1		
<i>Nodulisporium sp.</i>				2					
<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>								1	
<i>Pestalotiopsis microspora</i>							1		
<i>Pestalotiopsis paeoniicola</i>							3		
<i>Phoma glomerata</i>									1
<i>Phoma herbarum</i>								1	2
<i>Phomopsis sp.</i>	1	1							
<i>Phomopsis theicola</i>						1			
<i>Phlebia subseriales</i>	1								
<i>Polyporales sp.</i>									1
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	1								
<i>Schizophyllum commune</i>	1						1		

4.5 Antagonismo

Foram testados 78 endófitos nos experimentos de antagonismo realizados contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium* sp. e *Botrytis* sp., os resultados de todos os testes estão apresentados no Anexo B. Reações positivas de antagonismo, de fungos endofíticos isolados de *Vitis labrusca* L var. Niagara Rosada contra *Fusarium* sp. e *Botrytis* sp. podem ser observadas nas Figuras 20 e 21.

A porcentagem de antagonismo de fungos endofíticos, isolados de videiras em todos os tratamentos, contra *Fusarium* sp. e *Botrytis* sp. são apresentados nas Figuras 22 e 23, respectivamente. Fungos endofíticos isolados de videiras Niagara Rosada em cultura agroecológica apresentaram maior capacidade de antagonizar fungos fitopatogênicos que isolados endofíticos de videiras em cultura comercial, apenas a comunidade fúngica isolada de folhas (janeiro) em cultura comercial A, apresentou maior capacidade em antagonizar *Fusarium* sp. No mês de junho, os fungos endofíticos isolados de folhas de videiras em cultura comercial A e B, não foram capazes de antagonizar *Fusarium* sp. Os isolados de videiras em cultura comercial A, no mês de junho, apresentaram baixa porcentagem de antagonismo contra *Botrytis* sp e a cultura comercial B não apresentou microrganismos capazes de inibir *Botrytis* sp. Isolados de videiras em cultura agroecológicas, em junho também, apresentaram menor capacidade de inibir *Fusarium* sp. e *Botrytis* sp. que os isolados de folhas em janeiro. Estes resultados de capacidade de antagonismo contra os fungos fitopatogênicos apresentados pelas comunidades endofíticas de folha, no mês de junho, podem ser devido a mudanças sazonais e fisiológicas na planta hospedeira induzidas pela época de transição para o período de repouso hibernar, que culmina com a queda das folhas.

Os fungos endofíticos isolados de Niagara Rosada apresentaram maior capacidade de antagonismo contra *B. cinerea* que a *Fusarium* sp. Em testes de antagonismo realizados contra uma linhagem de *Fusarium oxysporum* isolado como fitopatógeno de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), foi observado que esta espécie esta era mais suscetível ao antagonismo por endófitos de videira que a linhagem de *Fusarium* sp isolada como fitopatógeno para videiras (BRUM, 2006). É possível que, a linhagem de *Fusarium* sp. fitopatogênica de videiras tenha

desenvolvido mecanismos de defesa e resistência na interação com endófitos de videira. Apesar de serem gêneros diferentes, as reações de inibição observadas contra a linhagem de *Botrytis* sp., isolado de *Eucalyptus saligna*, comparado aos resultados de inibição ao *Fusarium* sp. fitopatógeno de videira, foram mais intensos e apresentaram maior porcentagem de reações de antagonismo positivo, inclusive com produção de halo (Figura 21). Diferente do resultado observado para comunidades endofíticas isoladas de videiras em cultura agroecológica, nos vinhedos sob trato comercial, a maioria das comunidades endofíticas apresentou capacidade de antagonismo igual contra *B. cinerea* e *Fusarium* sp. ou maior contra *Fusarium* sp. Estes dados poderiam ser explicados pela perda de fungos endofíticos específicos para *Vitis labrusca* L. var. Niagara Rosada após o tratamento com fungicidas, e recolonização das videiras por fungos não específicos. Na interação entre *Fusarium* sp. (fitopatogênico para videiras) e endófitos de videira, ambos devem ter desenvolvido mecanismos de competição um com o outro. Desta maneira, *Fusarium* sp. adaptado à competir com fungos específicos de videira, não apresentaria a mesma eficiência na competição contra estes novos fungos que recolonizaram as videiras, e levariam vantagem no antagonismo contra *Fusarium* sp. em relação aos endófitos específicos de videira.

As comunidades fúngicas endofíticas de videiras em cultura agroecológica apresentaram maior capacidade de antagonismo a fungos fitopatogênicos que aquelas em cultura comercial. Diversos estudos comprovam a estreita relação de endófitos com a planta - hospedeira. Peters *et al.* (1998) utilizaram duas culturas de calo de plantas e endófitos, e descobriu que nas interações de endófitos com seu próprio hospedeiro, metabólitos secretados pelo calo hospedeiro no meio de crescimento resultou em respostas de crescimento positivo dos endófitos. Em dupla cultura com calos de um não hospedeiro, este não foi o caso, sugerindo que os endófitos responderam a estímulo específico produzido por seus respectivos hospedeiros. Segundo Schulz & Boyle (2005) a sinalização quimiotáxica envolvida em diversas interações de endófitos com a planta hospedeira sugere que estes endófitos não foram meros oportunistas incidentais em seus hospedeiros, mas que tem ocorrido uma adaptação evolucionária entre alguns endófitos e seus hospedeiros. Os dados apresentados confirmam a perda de proteção natural da planta após tratamento com agroquímicos.

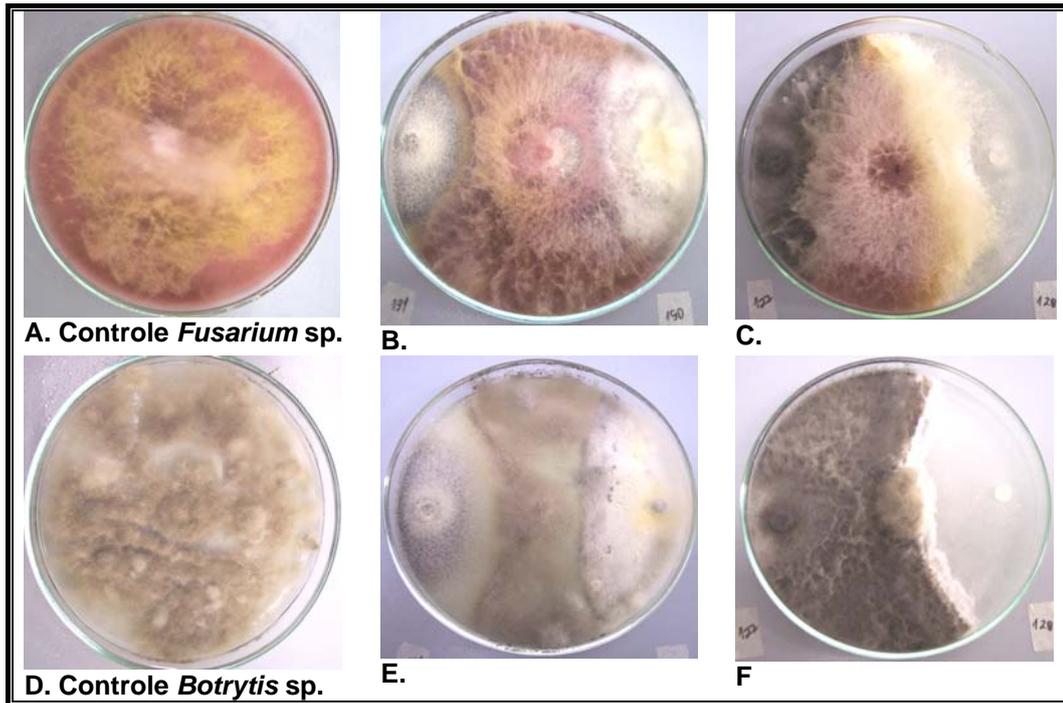


Figura 20. Experimentos de antagonismo contra *Fusarium* sp. e *Botrytis* sp. A e D são placas de controle; em B e C ao centro *Fusarium* sp. e em E e F *Botrytis* sp. em B e E foram testados os isolados 1S1DF10, à esquerda e *Colletotrichum gloeosporioides* à direita; C e F testados os isolados *Pseudofusicoccum stromaticum*, à esquerda e 1S1DF6 à direita.



Figura 21. Análise de antagonismo de fungos endofíticos contra *Botrytis* sp. Isolados endofíticos inibindo, com formação de halo (seta), *Botrytis* sp., ao centro da placa. O isolado endofítico a esquerda é o fungo *Botryosphaeria parva* e a direita a linhagem 3S1DC3.

Apesar de a folha ser a parte da planta com maior frequência de infecção, caule apresentou maior porcentagem de endófitos capazes de inibir os fungos fitopatogênicos avaliados

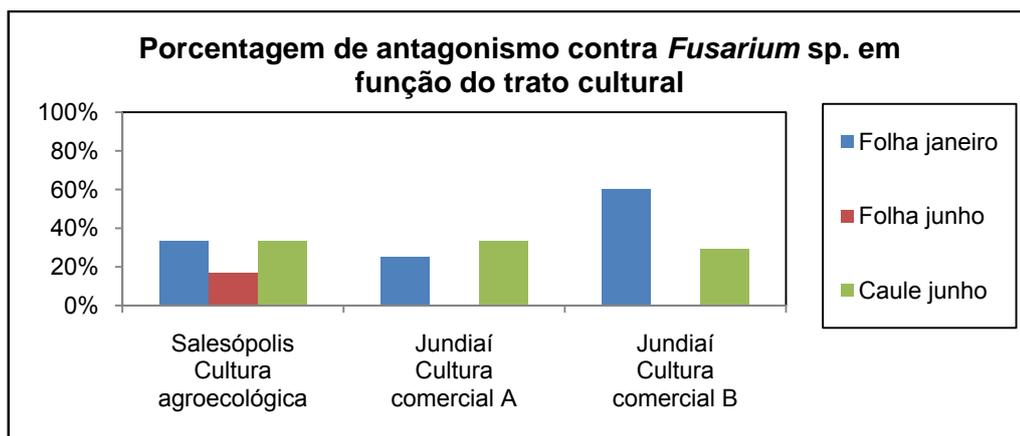


Figura 22. Porcentagem de fungos endofíticos de *V. labrusca* L. var. Niagara Rosada com capacidade de inibir *Fusarium* sp.

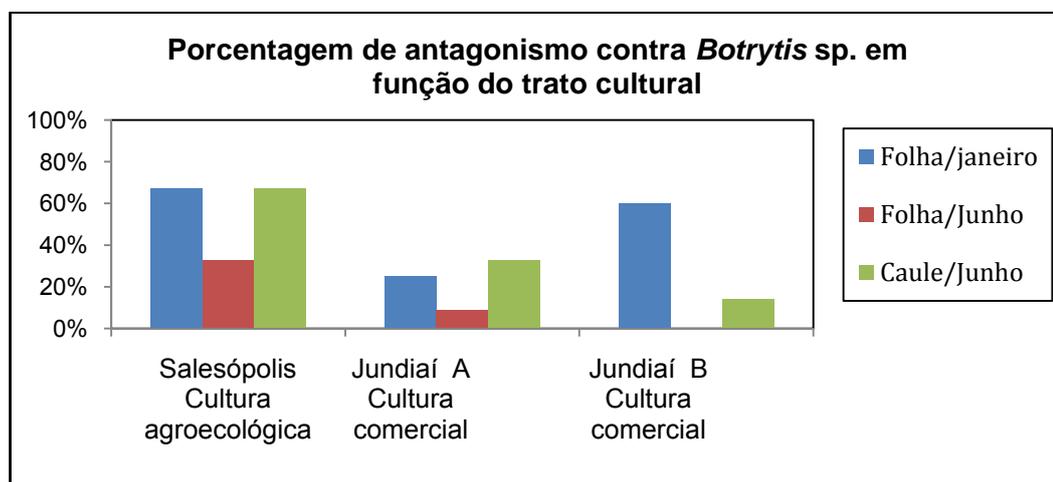


Figura 23. Porcentagem de fungos endofíticos de *V. labrusca* L. var. Niagara Rosada capazes de inibir *Botrytis* sp.

Após a colheita da uva, a videira inicia a fase de acúmulo de reservas, na qual carboidratos produzidos nas folhas serão dirigidos principalmente para raízes e tronco. A fase seguinte compreende a perda total das folhas e a dormência. Desta maneira, é provável que a cada ciclo os endófitos sejam eliminados da planta juntamente com as folhas, ocorrendo uma nova reinfecção e colonização por fungos endofíticos a cada início de ciclo com a brotação. No tronco, durante a dormência, os fungos endofíticos devem manter-se alojados, com a brotação devem estender suas hifas recolonizando os novos caules. Como existem, entre os diferentes gêneros de fungos, preferências de colonização de diferentes partes da planta (PETRINI, 1996;

SIEBER *et al.*, 1999; KUMAR & HYDE, 2004; SCHULZ & BOYLE, 2005) estes endófitos que permaneceram alojados no tronco durante a dormência podem não ter as folhas como seu habitat preferencial. Assim, fungos endofíticos de caule, que permanecem na planta por toda sua vida devem ter desenvolvido maior especificidade com a planta hospedeira. Nesta relação simbiótica com a planta devem ter evoluído mecanismos de defesa contra fitopatógenos, isto explicaria os resultados obtidos neste estudo, em que a capacidade de antagonismo dos fungos endofíticos de caule foi maior que a de endófitos de folha.

4.6 Fungos endofíticos produtores de antimicrobianos

Experimentos para avaliar a produção de compostos com atividade antimicrobiana pelos isolados endofíticos foram realizados com o extrato bruto de cada um dos 78 endófitos isolados. O isolado endofítico 2J2DFT6 apresentou forte reação inibitória, e sua análise filogeneticamente indicou pertencer ao gênero *Fusarium*, sendo possivelmente da espécie *Fusarium solani* como pode ser observado na Figura 24. A Figura 25 mostra a reação de inibição do isolado 2J2DFT6 contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Xanthomonas axonopodis* e *Candida albicans*. O isolado 2J2DFT6 produziu um potente composto antimicrobiano capaz de inibir fortemente o crescimento de bactérias Gram +, Gram⁻ e a levedura patogênica humana *C. albicans*, mas não inibiu os fungos *Fusarium* sp. e *Botrytis* sp.

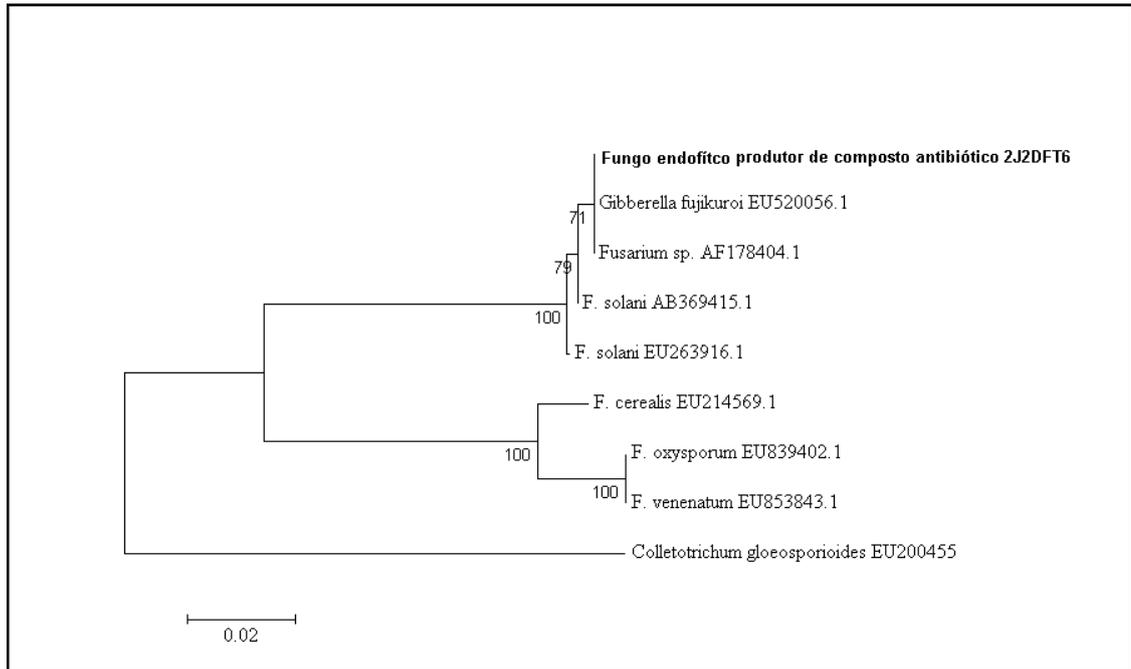


Figura 24. Dendrograma construído pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes & Cantor (1969) para a seqüência da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA do isolado fúngico endofítico 2J2DFT6 (produtor de composto bioativo). Seqüências referência do GenBank foram utilizadas para comparação com o isolado. O ascomiceto *Colletotrichum gloeosporioides* foi utilizado como grupo externo. Valores de *bootstrap* ($n=1000$ replicatas) $\geq 50\%$ estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0.05 substituições por posição.

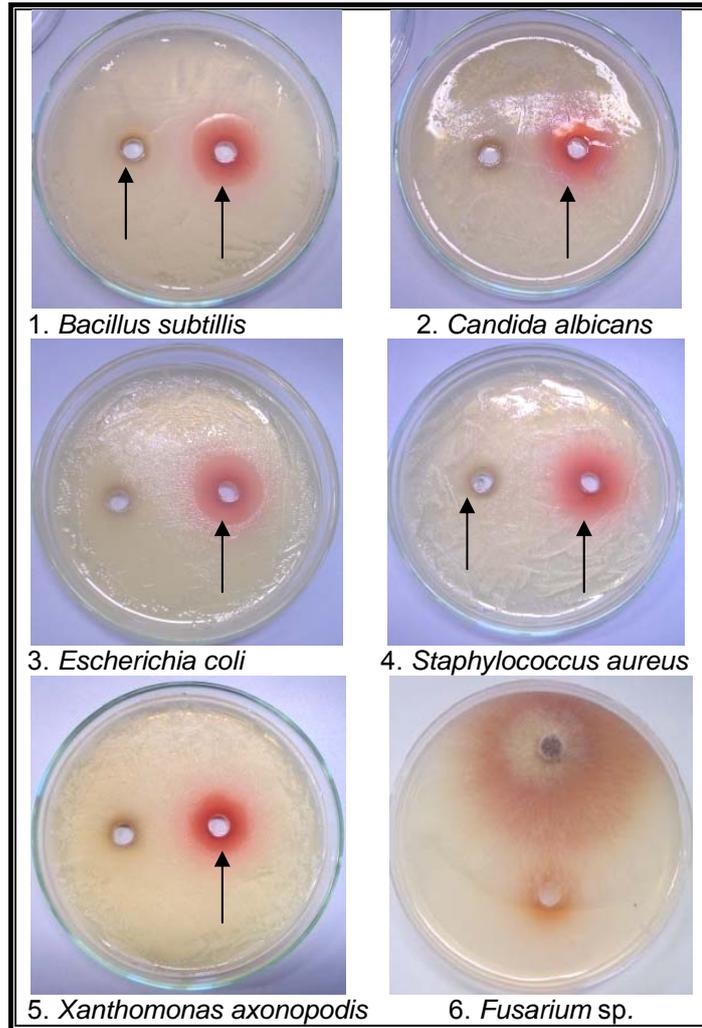


Figura 25. Reações de compostos com atividade antimicrobiana produzidos por fungos endofíticos em meio líquido BD (batata dextrose). Nas placas, o poço à esquerda mostra o teste de antibiose da amostra 3S2DF13 que apresentou inibição fraca apenas sobre as bactérias *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, e a direita o teste de antibiose da amostra 2J2DFT6 apresentando forte reação de inibição com formação de halo contra as bactérias. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*; *Xanthomonas axonopodis* e contra a levedura patogênica *Candida albicans*, como está indicado pelas setas nas fotos 1 à 5. Na foto 6 pode se observar que o teste do composto de 2J2DFT6 contra *Fusarium* sp. não inibe o crescimento micelial do fungo filamentoso.

4.6.1 Extração e identificação de compostos bioativos

As soluções resultantes das extrações com os solventes orgânicos: água, acetona e clorofórmio a partir do extrato bruto produzido pelo isolado 2J2DFT6, foram testadas contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*; *Xanthomonas axonopodis* e a levedura *Candida albicans*. O composto extraído na

fase clorofórmio preservou algumas propriedades bioativas, mantendo a capacidade de inibição contra a bactéria Gram⁺ *Bacillus subtilis* e a bactéria Gram⁻ *Xanthomonas axonopodis* (Figura 26).

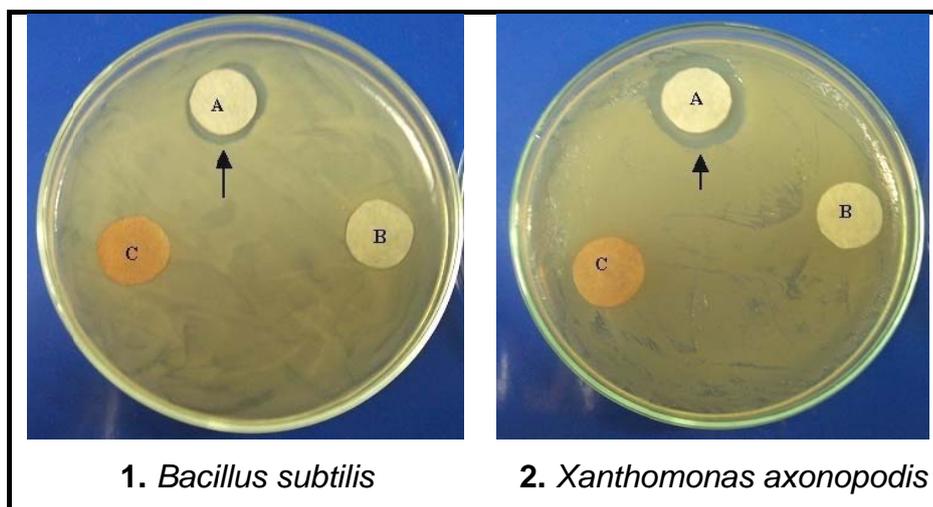


Figura 26. Reações dos compostos extraídos com solventes orgânicos. Nas placas as letras A, B e C são respectivamente os testes com extratos obtidos com clorofórmio, água e acetona. As setas indicam a formação de halo de inibição em torno do papel filtro que foi embebido com o extrato obtido com clorofórmio e seco antes de ser colocado sobre a placa.

A análise do extrato obtido pela extração com clorofórmio realizada pela técnica de FTIR/ATR. Gerou um filme da amostra que foi obtido depositando-se 1 mL da solução sobre o monocristal e evaporando-se o solvente. O espectro de infravermelho foi medido na região de 4000-650 cm^{-1} , com uma resolução de 2 cm^{-1} . Especialmente a banda em 1712 cm^{-1} (Figura 27) é bastante característica de ésteres contendo radicais cíclicos alifáticos, como ocorre nos derivados contendo o esqueleto taxólíco apresentado na Figura 28. Dessa forma é bem possível que o composto antibiótico isolado desse fungo possua uma estrutura similar. Na Índia, Chakravarthi, et al. (2008) isolaram um fungo de fragmentos de caule de *Taxus celebica* que foi capaz de produzir paclitaxel em meio de cultura líquido, com base em características de colônia, morfologia de conídio e análise da seqüência 26S do rDNA, este isolado foi identificado como *Fusarium solani*. Entretanto este tópico deverá ser alvo de intensas pesquisas na continuidade deste trabalho.

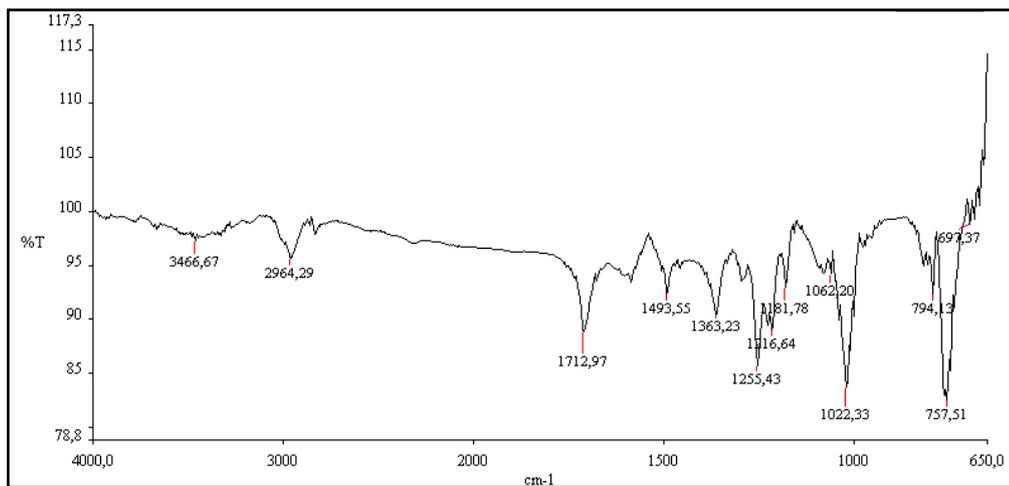


Figura 27. Espectro de infravermelho medido na região de 4000-650 cm^{-1} . A banda em 1712 cm^{-1} característica de ésteres contendo radicais cíclicos alifáticos.

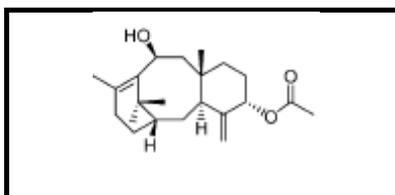


Figura 28. Esquema de esqueleto taxóico, 5 α hidroxi-10 β hidroxi-taxadieno.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os resultados apresentados no presente trabalho permitem concluir que:

- I - A comunidade fúngica endofítica de *Vitis labrusca* L. variedade Niagara Rosada apresenta uma grande diversidade genética sendo composta pelas espécies: *Alternaria alternata*, *Alternaria arborescens*, *Alternaria tenuissima*, *Amphilogia gyrosa*, *Apodus oryzae*, *Asordaria sicutii*, *Botryosphaeria parva*, *Ceriporiopsis sp.*, *Cerrena unicolor*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Daldinia eschscholzii*, *Daldinia loculata*, *Diaporthe helianthi*, *Diaporthe phaseolorum*, *Epicoccum andropogonis*, *Fusarium sp.*, *Fusarium chlamydosporium*, *Fusarium solani*, *Glomerella acutata*, *Glomerella cingulata*, *Guignardia mangiferae*, *Guignardia vaccinii*, *Hypoxylon sp.*, *Irpex lacteus*, *Microthia havanensis*, *Metarhizium anisopliae*, *Neofusicoccum parvum*, *Nodulisporium sp.*, *Paraconiothyrium brasiliense*, *Pestalotiopsis microspora*, *Pestalotiopsis paeoniicola*, *Phoma glomerata*, *Phoma herbarum*, *Phomopsis sp.*, *Phomopsis theicola*, *Phlebia subseriales*, *Polyporales sp.*, *Pseudofusicoccum stromaticum*, *Schizophyllum commune*.
- II - Fungos fitopatogênicos para outras culturas ou mesmo para a viticultura tais como *Botryosphaeria parva*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diaporthe helianthi*, *Alternaria alternata* podem habitar endofiticamente Niagara Rosada (*Vitis labrusca*).
- III - Fungos endofíticos associados à Niagara Rosada têm a capacidade de inibir o crescimento de *Fusarium sp.* e *Botrytis sp.*, sugerindo que sua comunidade fúngica endofítica está equilibradamente envolvida na proteção da planta hospedeira, auxiliando-a no controle de doenças fúngicas.
- IV - Em *Vitis labrusca* L. var. Niagara Rosada, os tecidos foliares apresentam maior densidade e diversidade de fungos endofíticos que os tecidos caulinares, porém a comunidade fúngica endofítica de caule apresenta maior capacidade de antagonismo a fungos fitopatogênicos que a comunidade endofítica de folha.
- V - A frequência de fungos capazes de inibir fitopatógenos é maior em videiras cultivadas no sistema agroecológico.
- VI - A temperatura interfere significativamente na comunidade fúngica de *Vitis labrusca* var. Niagara Rosada.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); **Monografias técnicas do Ministério da Saúde sobre substâncias com ação tóxica sobre animais ou plantas de uso permitido no Brasil em atividades agropecuárias e produtos domissanitários.** Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 25 mar.2008.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. Amsterdam: ed. Elsevier, 2005, 635p.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**,. 4. ed. New York: Wiley & Sons, 1996, 332p.

ALLEN T. W.; BURPEE L. L.; BUCK J. W. In: vitro attachment of phylloplane yeasts to *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, and *Sclerotinia homoeocarpa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p. 1041 - 1048, 2004.

ALMEIDA, C. V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos Endofíticos Isolados de Ápices caulinares de Pupunheira Cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p. 467 - 470, 2005.

ALVARENGA, A. A.; ABRAHÃO, E.; REGINA, M. A. *et al.* Origem e classificação botânica da videira. **Informe Agropecuário**, v.19, p. 5 - 8, 1998.

ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI, W. J.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A. V. SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p. 229 - 236, 2001.

ARAUJO, W. L. ; LIMA, A. S. ; AZEVEDO, J. L. ; KUKLINSKY-SOBRAL, J. ; MARCON, J. ; LACAVAL, P. T. **Manual: isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 1: 86 p., 2003.

ARNOLD, A. E.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYMARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.26, p. 15649 - 15654, 2003.

ASSANTE, G.; MAFFI, D.; SARACCHI, M.; FARINA, G.; MORISCCA, S.; RAGAZZI, A. Histological studies on the mycoparasitism of *Cladosporium tenuissimum* on urediniospores of *Uromyces appendiculatus*. **Mycological Research**, v.108, p. 170 - 182, 2004.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: Melo, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, p. 117 - 137; 1998 a, 486p.

AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p. 445 - 461, 1998 b, 486p.

AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, p. 225 - 229, 1999.

AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi and their roles in tropical plants. **Progress in Microbial Ecology**, 279 - 287, 2001.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, JR. W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances In tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, p. 40 - 65, 2000.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W. J.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. Microrganismos Endofíticos e seu Papel em Plantas Tropicais In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotechnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria**. Caxias do Sul, RS, Universidade de Caxias do Sul, p. 235 – 268, 2002, 433p.

AZEVEDO, J. L. & W. L. ARAÚJO. **Diversity and Applications of Endophytic Fungi Isolated from Tropical Plants**. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. **Fungi: Multifaceted Microbes**: Nova Delhi, Anamaya Publishers, p. 189 – 207, 2007, 321p.

BACON, C. W. & SUSSMAN, A. S. Effects of the self-inhibitor of *Dictyostelium discoideum* on spore metabolism. **Journal of Genetic and Microbiology**, v.76, p. 331 - 344, 1973.

BACON, C. W. & WHITE, J. F. Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. In: BACON, C. J.; WHITE, J. F. **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Dekker, 237 – 261, 2000.

BAILEY, J. K.; DECKERT, R.; SCHWEITZER, J. A.; REHILL, B. J.; LINDROTH, R. L.; GEHRING, C.; WHITHAM, T. G. Host plant genetics affect hidden ecological players: links among *Populus*, condensed tannins, and fungal endophyte infection. **Canadian Journal of Microbiology**, v.83, p.356 - 361, 2005.

BARÇA, E. A.; BELARBI, A.; HACHET, C.; NOWAK, J.; AUDRAN, J. C. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultures with plant growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.186, p.91 - 95, 2000.

BARNABÉ, D.; VENTURINI FILHO, W. G.; BOLINI, H. M. A. Análise descritiva quantitativa de vinhos produzidos com uvas Niagara Rosada e Bordô. **Braslian Journal of Food Technology**, v.10, p. 122 - 129, 2007.

BARNETT, H. L. & HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Minneapolis, Minnesota, USA. Burgess Publishing Company, 1972.

BARROS, I. A.; Isolamento e biodiversidade de bactérias endofíticas de *Dicksonia sellowiana* e seu potencial biotecnológico. **Dissertação de Mestrado**: Universidade de Mogi das Cruzes, 2003.

BARY, A. **Morfologie und physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten**: Engelman, 1866.

BÉLANGER, R. R.; LABBÉ, C.; JARVIS, W. R. Comercial-scale control of rose powdery mildew with a fungal antagonist. **Plant Disease**, v.78, p. 420 - 424, 1998.

BERNSTEIN, M. E. & CARROLL, G. C. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. **Canadian Journal of Botany**, v.55, p. 644 - 653, 1977.

BETTIOL, W. & GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN-FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**: Agronômica Ceres, 1995.

BRENCIC, A. & WINANS, S. C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.1, p. 15 - 94, 2005.

BROWN, K. B.; HYDE, K. D.; GUEST, D. I. Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. **Fungal Diversity**, v.1, p. 27 - 51, 1998.

BRUM, M. C. P. Microrganismos endofíticos da videira Niagara Rosada (*Vitis labrusca* L.) e o controle de *Fusarium*. **Dissertação de Mestrado**; Universidade de Mogi das Cruzes, 2006.

BUSSABAN, B.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p. 943 - 948, 2001.

CALDARI JÚNIOR, P. Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de *Botrytis cinerea* de flores e plantas ornamentais. **Dissertação de Mestrado**: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1998.

CAO, L. X.; YOU, J. L.; ZHOU, S. N. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China. **World Journal microbiology Biotechnology**, v.18, p. 69 - 171, 2003.

CARROLL, G. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: **Microbiology of the phylloplane**,. FOKKEMA, N. J.; VAN DER HEAVEL, J.:ed. Cambridge University Press, 1986.

CARROLL, G. C. Fungal Endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiotic. **Ecology**, v.69, p. 2 - 9, 1988.

CARROLL, G. C. Forest Endophytes: pattern and process. **Canadian Journal of Botany**, v.73, p. 1316 - 1324, 1995.

CARROLL, G. C. The foraging ascomycete. Abstracts, **XVI International Botanical Congress**, 1999.

CARROLL, G. C. & WICKLOW, D. T. **The fungal community: its organization and role in the ecosystem**: Marcel Dekker, 1992.

CARVALHO, A. C.; SILVA, J. A.; MARCON, J.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. Isolamento e diversidade genética de fungos endofíticos de manga (*Mangifera indica*). **51º Congresso Brasileiro de Genética**, 2005.

CATO, S. C. Efeito do anelamento e de doses de ácido giberélico na frutificação das uvas Niagara Rosada e Venus nas regiões noroeste e da alta paulista do Estado de São Paulo. **Dissertação de Mestrado**: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2002.

CEPAGRI; Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura. “**Clima dos Municípios Paulistas**”. Disponível em: <<http://www.cpa.unicamp.br>>. Acesso em: 30 abr. 2008.

CHAKRAVARTHI, B. V. S. K.; DAS, P.; SURENDRANATH, K.; KARANDE, A. A.; JAYBASKARAN, C. Production of paclitaxel by *Fusarium solani* isolated from *Taxus celebica*. **Journal of Bioscience**, v.33, p. 259 - 267, 2008.

CHERFAS, J. Disappearing Mushrooms: Another Mass Extinction? **Science** v.254, p. 1458, 1991.

CHITARRA, G. S.; ABEE, T.; ROMBOUTS, F. M.; POSTHUMUS, M. A. Germination of *Penicillium paneum* Conidia Is Regulated by 1-Octen-3-ol, a Volatile Self-Inhibitor. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p. 2823 - 2829, 2004.

CLAYDON, N.; GROVE, J. F.; POPLE, M. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. **Phytochemistry**, v.24, p. 937 - 943, 1985.

COHEN, S. D. Endophytic-host selectivity of *Discula umbrinella* on *Quercus alba* and *Quercus rubra* characterized by infection pathogenicity and mycelial compatibility. **European journal of Plant Pathology**, v.110, p. 713 - 721, 2004.

DJONOVIC, S.; POZO, M. J.; KENERLEY, C. M. Tvbg3, a β -1,6-Glucanase from the Biocontrol Fungus *Trichoderma virens*, Is Involved in Mycoparasitism and Control of *Pythium ultimum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p. 7661 - 7670. 2006.

DURÁN, E. L.; PLOPER, L. D.; RAMALHO, J. C.; PICCOLO GRANDI, R. A.; HUPPER GIANCOLI, A. C.; AZEVEDO, J. L. The foliar fungal endophytes of *Citrus limon* in Argentina. **Canadian Journal of Botany**, v.83, p. 350 - 355, 2005.

ESPINOSA-GARCIA, F. J.; LONGENHEIN, J. H. The leaf fungal endophytic community of a coastal red wood population - diversity and spatial patterns. **New Phytologist**, v.116, p. 89 - 98, 1990.

FISHER, P. J.; PETRINI, O.; SCOTT, H. M. L. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, v.122, p. 299 - 305, 1992.

FRAVEL, D.; OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. **New phytologist**, v.157, p. 493 - 502, 2003.

FREIRE, F. C. O.; BEZERRA, J. L. Foliar endophytic fungi of Ceara State (Brasil): A preliminary study. **Summa Phytopathologica**, v.27, p. 304 - 308, 2001.

FUNK, C. R.; HALISKY, P. M.; JOHNSOS, M. C.; SIEGEL, M. R.; STEWART, A. V.; AHMAD, S.; HURLEY, R. H.; HARVEY, I. C. An endophytic fungus and resistance to sod webworms: association in *Lolium perenne*. **Bio/Technology**, v.1, p. 189 - 191, 1983.

GAI, C. S.; MACCHERONI Jr, W.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. Microscopia eletrônica de varredura para localização de leveduras endofíticas em citros (*Citrus sinensis*) e análise de variabilidade entre os isolados através de marcadores de RAPD. In: **Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo**, 2000.

GHILARDI, A. A.; MAIA, M. L. Tecnologia, custo de produção e rentabilidade do cultivo de uva Niagara no Estado de São Paulo. Informações Econômicas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.31, p. 48 - 64, 2001.

GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. Porto Alegre: Renascença, 364p. 1999.

GLIENKE-BLANCO, C. *Guignardia citricarpa* Kiely. Análise genética cariotípica e interação com o hospedeiro. **Tese de Doutorado**: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 1999.

GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR – VILDOSO, C. L.; VIEIRA, M. L. C.; BARROSO, P. A. V.; AZEVEDO, J. L. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plant. **Genetic Molecular Biology**, v.25, p. 251 - 255, 2002.

HAGEN, S.; MARX, F.; RAM, A. F. AND MEYER, V. The Antifungal Protein AFP from *Aspergillus giganteus* Inhibits Chitin Synthesis in Sensitive Fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p. 2128 - 2134, 2007.

HALLEEN, F.; CROUS, P. W.; PETRINI, O. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. **Australasian Plant Pathology**, v.32, p. 47 - 52, 2003.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFEE, W. F.; OEPPER, J. W. Bacterial Endophytes In: Agricultural Crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p. 895 - 914, 1997.

HAWKSWORTH, D. L. The Fungal Dimension of Biodiversity: Magnitude, significance, and Conservation. **Mycological Research**, v.95, p. 641 - 655, 1991.

HENDRICK, U. P. **The grapes of New York**: J. B. Lyon company: 541,1917.

HIDALGO, L. **Tratado de viticultura geral**: Mundi-Prensa, 1993.

IBGE; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal**, v.33, p. 45 – 67, 2006.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. **Produção e número de plantas de videira no Estado de São Paulo**. Disponível em: <[http:// www.iea.sp.gov.br](http://www.iea.sp.gov.br)>. Acesso em: 25 mar. 2008.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. **Evolution of protein molecules** In: Mammalian Protein Metabolism. New York, Academic Press, 21-132, 1969.

KENDRICK, W. B.; CARMICHAEL, J. W. **Hyphomycetes: The Fungi. An advanced treatise**. In: AINSWORTH, G. C.; SPARROW, F. K.; SUSSMAN, A. S.: ed. Academic Press 4: 323 - 509, 1973.

KIMATI, H. Controle químico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Agrônômica Ceres.v.1**, p..46 - 95, 1995.

KNUDSEN, G. R. & BIN, L. Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran on growth of *Trichoderma harzianum* from alginate pellets. **Phytopathology**, v.80, p. 724 - 727, 1990.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, v.273, p. 91 - 99, 2005.

KULDAU, G. A.; YATES, I. E. **Evidence for *Fusarium* endophytes in cultivated and wild plants**. In: Microbial Endophytes. BACON, C. W.; WHITE, J. F.: ed. Marcel Dekker, 2000.

KUMAR, D. S. S. & HYDE, K. D. Biodiversity and tissue- specificity of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Diversity**, v.17, p. 69 - 90, 2004.

LARRAN, S.; PERELLÓ, A.; SIMÓN, M. R.; MORENO, V. Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, p. 683 - 686, 2002.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J. & HIGGS, S. ***Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice**. ed. Chischer: John. Wiley & Sons, v.1, p. 37 - 70, 1993.

LE ROUX, C. N. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* toxins. **Simpósio de Controle Biológico. Foz do Iguaçu**, Resumos, EMBRAPA: 264 - 269, 1996.

LIMA, L. H. C.; MARCO, J. L.; FELIX, C. R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. **Controle biológico**.:Embrapa-CNPMA v.2, p. 263 - 304, 2000.

MAIA, J. D. G.; CAMARGO, U. A. Implantação do vinhedo e manejo das plantas. In: MAIA, J. D. G.; KUHN, G. B. **Cultivo da Niagara Rosada em regiões tropicais do Brasil**: Embrapa-CNPV v.1, p. 13 - 23, 2002.

MAGALHÃES, A. A. S. Isolamento e variabilidade genética detectada por RAPD do fungo endofítico *Guignardia* sp. de *Himatanthus succuba* Spruce (Wood) Apocynaceae. **Dissertação de mestrado**: FUA/UFSCAR, 2000.

MARTINS, M. K. Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira. **Tese de Doutorado**: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2005.

MEDEIROS, S. A. F. Microflora da folhagem do cajueiro *Anacardium occidentale* (L) e controle biológico do agente da antracnose *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc "in vitro". **Dissertação de Mestrado**: Universidade Federal do Pernambuco, 1988.

MEDINA, A.; MATEO, R.; LÓPEZ-OCAÑA, L.; VALLE-ALGARRA, F. M.; JIMÉNEZ, M. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and others members of *Aspergillus* section *Nigri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p. 496 - 4702, 2005.

MELO, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p. 261 - 395. 1996.

MELO, I. S. & SANHUEZA, R. M. V. Métodos de seleção de microrganismos antagonísticos a fitopatógenos. **Manual técnico**. 1. Jaguariuna: Embrapa-Meio Ambiente, 72p., 1995.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**: ed. EMBRAPA Meio Ambiente, 2000.

MELO, I. S.; VALADARES-INGLES, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Microrganismos**. 1. ed. Campinas: EMBRAPA Meio Ambiente, 743p., 2002.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. **5º Congresso Brasileiro de Micologia**, Sociedade Brasileira de Micologia, v.5, p. 129 - 140, 2007.

MENDES, R.; KUKLINSKY-SOBRAI, J.; GERALDI, I. O.; ARAUJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; Monitoring soybean endophytic fungal community associated with glyphosate. **XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Sociedade Brasileira de Microbiologia, v.1, p. 242, 2001.

MOHAMED, N.; LHERMINIER, J.; FARMER, M. J.; FROMENTIN, J.; BÉNO, N.; HOUOT, V.; MILAT, M. L.; BLEIN, J. P. Defense responses in grapevine leaves against *Botrytis cinerea* induced by application of a *Pythium oligandrum* strain or its elicitor, oligandrin, to roots. **Biochemistry and Cell Biology**, v.97, p. 611 - 620, 2007.

MORANDI, M. A. B. & MAFFIA, L. A. **Manejo integrado do mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea***: Embrapa Meio Ambiente, v.44, p. 35, 2005.

MOSTERT, L.; CROUS, P. W.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. **Sydowia**, v.52, p. 46 - 48, 2000.

MUSETTI, R.; POLIZZOTTO, R.; VECHIONE, A.; BORSELLI, S.; ZULINI, L.; D'AMBROSIO, M.; SANITÀ DI TOPPI, L.; PERLOT, I. Antifungal activity of diketopiperazines extracted from *Alternaria alternate* against *Plasmopara viticola*: An ultrastructural study. **Micron**, v.38, p. 643 - 650, 2006.

NCBI, National Center for Biotechnology Information; **Gene Bank**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 28 jul. 2008.

NIEKERK, J. M.; CROUS, P. W.; FOURIE, P. H.; HALLEEN, F. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of Botryosphaeria species on grapevines. **Mycologia**, v.96, p. 781 - 798, 2004.

OLIVEIRA, F. C. O. Fungos endofíticos de folhas de cajueiro, *Anacardium occidentale* L.: Propriedades antagônicas a *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Sacc, Avaliação enzimática através de eletroforese e substratos específicos. **Dissertação de Mestrado**: Universidade Federal do Pernambuco, 1999.

ONIONS, A. H. S.; ALLSOPP, D.; EGGINS, H. O. W. Smith's introduction to industrial mycology: ed. Edward Arnold, London v.7, 398p., 1981.

OSÓRIO, V. A. & FORTES, J. F. Introdução. **Morango: fitossanidade**: ed. Embrapa Informação Tecnológica v.1, 36p., 2003.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic Fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia**, v.85, p. 362 - 364, 1993.

PEREIRA, J. O.; CARNEIRO - VIEIRA, M. L.; AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.15, p. 37 - 40, 1999.

PETERS, S.; DAMMEYER, B.; SCHULZ, B. Endophyte - host interactions I. Plant defence reactions to an endophytic and a pathogenic fungus. **Symbiosis**, v.25, p. 193 - 211, 1998.

PETRINI, O. **Fungal endophytes of tree leaves; Microbial ecology of leaves.** ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. (Eds.), New York: Springer-Verlag, p. 179-197, 1991.

PETRINI, O. Ecological and physiological aspects of host specificity in endophytic fungi. In **Endophytic Fungi in Grasses and Wood Plants:** ed. American Phytopathological Society Press, 1996.

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, K. D. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycology Research**, v.105, p. 1508 - 1513, 2001.

PROSSER, J. I.; BOHANNAN, B. J. M.; CURTIS, T. P.; ELLIS, R. J.; FIRESTONE, M. K.; FRECKLETON, R. P.; GREEN, J. L.; KILLHAM, K.; LENNON, J. J.; OSBORN, A. M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C. J.; YOUNG, J. P. Essay – the role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p. 384 – 392, 2007.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.1, p. 17 – 20, 1985.

ROBBS, F. C. Controle Biológico de doenças em plantas. In: NETO, A. M. A.; BARAN, C. L. **Manual de Controle Biológico:** Lidador v.1, p. 46 - 51, 1992.

RODRIGUES, K. F. Endophytic fungi in the tropical palm *Euterpe oleracea* Mart. **Tese de Doutorado:** University of New York, 1992.

RODRIGUES, K. F. & SAMUELS, G. J. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. **Micological Research**, v.94, p. 827 - 830, 1990.

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.

SARTORI, V. C.; RIBEIRO, R. T. S.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; PAGNOCCA, F. C.; ECHEVERRIGARAY, S.; AZEVEDO, J. L. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. **Journal of Basic Microbiology**, v.45, p. 397 - 402, 2005.

SCHULZ, B.; WANKE, U.; DRAEGER, S.; AUST, H. J. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycological Research**, v.97, p. 1447 - 1450, 1993.

SCHULZ, B. & BOYLE, C. **The Endophytic Continuum**. Review, Cambridge University Press, v.109, p. 661 - 686, 2005.

SELOSSE, M. A.; BAUDOIN, E.; VANDENKOORNHUYSE, P. Symbiotic microorganisms, a Key for ecological success and protection of plants. **Article Comptes Rendus Biologies**, v.327, p. 639 - 648, 2004.

SIEBER, T. N.; RYS, J.; ROLDENRIEDER, O. Mycobiota in symptomless needles of *Pinus mugo* ssp. *uncinata*. **Mycological Research**, v.103, p. 306 - 310, 1999.

SILVEIRA, N. S. S.; MICHEREFFI, S. J.; MENEZES, M.; TAKAKIM, G. M. C. Potencial de isolados de *Trichoderma* sp. no controle de *Sclerotium rolfsii* em feijoeiro. **Summa Phytopathologic**, v.20, p. 22 - 24, 1994.

SÔNEGO, O. R.; BOTTON, M.; MAIA, J. D. G.; GARRIDO, L. R. Doenças e pragas. In.: Maia, J. D. G.; Kuhn, G. B. **Cultivo da Niágara rosada em áreas tropicais do Brasil**: ed. Embrapa Uva e Vinho, p.45 - 63, 2001.

SÔNEGO, O. R. BOTTON, M.; MAIA, J. D. G.; GARRIDO, L. R. Doenças e Pragas. In: MAIA, J. D. G.; KUHN, G. B. **Cultivo da Niágara Rosada em áreas tropicais do Brasil**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa-Uva e Vinho, v.1, p.1-77, 2004.

SOUSA, J. S. I. **Uvas para o Brasil**: ed. FEALQ v.2, p. 632 - 791, 1996.

SOUZA, A. Q. L. & ASTOLFI FILHO, A. D. L. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) Rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, v.34, p. 185 - 195, 2004.

STIERLE, A.; STROBEL, G. A.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. **Science**, v.260, p. 214 - 216, 1993.

STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE, J. F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In **Microbial Endophytes**. BACON, C. W.; WHITE, J. F.: Marcel Dekker 3 - 30, 2000.

STROBEL, G. A. & DAISY, B. Bioprospecting for microbial Endophytes and their Natural Products. **American Society of Microbiology News**, v.67, p. 491 - 502, 2003.

STROBEL, G. A. & LONG, D. M. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. **American Society of Microbiology News**, v.64, p. 263 - 268, 1998.

STUART, R. M. Comunidades de fungos endofíticos associada cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada. **Dissertação de Mestrado**: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; Universidade de São Paulo, 2006.

THRANE, U. Grouping *Fusarium* section *Discolor* isolates by statistical analysis of quantitative high performance liquid chromatographic data on secondary metabolite production. **Journal Microbiologic Methods**, v.12, p. 23 - 39, 1990.

TUDZYNSKI, B. & SHARON, A. Biosynthesis, biological role and application of fungal hormones. In: **The Mycota X: Industrial Applications**. OSIEWACZ, H. D.: Springer-Verla : 183 - 211, 2002.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Leveduras para o Biocontrole de Fitopatógenos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico** v.3, p. 41 - 55, 2000.

VARMA, A.; SUDHA, S.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*-a cultivable plant growth promoting root endophyte with similarities to arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p. 2741 - 2744, 1999.

VILAS-BÔAS, G. T.; VILAS-BÔAS, L. A.; ARANTES, O. M. N. *Bacillus thuringiensis*: Estratégias no Controle Biológico. In: AZEVEDO, J. L.; SERAFINI, L.A.; BARROS, N. M. **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria**: Educ 1: 269 - 294, 2002.

WAGNER, B. L. & LEWIS, L. C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p. 3468 - 3473, 2000.

WEBER, J. A natural control of Dutch elm disease. **Nature**, v.292, p. 449 - 451, 1981.

WHITE, J. F. & COLE, G. T. Endophyte-host associations in forage grasses.3. *in vitro* inhibition of fungi by *Acremonium coenophialum*, **Mycologia**, v.77, p. 487 - 489, 1985.

WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E.; Mc LAUGHLIN, R.; CHALUTZ, E.; DROBY, S. Biological control of postharvest diseases of fruits: alternatives to synthetic fungicides. **Crop Protection**, v.10, p. 172 - 177, 1991.

WILSON, D. Endophyte: the evolution of a term and clarification of its use and definition. **Oikos**, v.73, p. 274 - 276, 1995.

WISNIEWSKI, M.; BILES, C. The use of yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent; Characterisation of attachment to *Botrytis cinerea*. In: WILSON, C. L.; CHALUTZ, E. **Biological control of post harvest diseases of fruits and vegetables**, Workshop Proceedings. (S.L): USDA, Agricultural Research Service, 394p., 1991.

WRIGT, J. G.; JOHNSON, G. L.; HYDE, K. D. Studies on the endophytic mycota of *Citrus* spp. Disease resistance in fruit. Proceedings of the international Workshop, Chian Mia, Thailand, **ACIAR Proceedings Series**, v.80, p. 167 - 173, 1998.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v.23, p. 753 - 771, 2006.

ZHOU, D. & HYDE, K. Host-specificity, host-exclusivity and host-recurrence in saprobic fungi. **Mycological Research**, v.105, p. 449 - 457, 2001.

APÊNDICE A - Isolados de fungos endofíticos de *Vitis labrusca* L. var. Niagara Rosada identificados pelo seqüenciamento da região ITS1 – 5.8S – ITS2 do rDNA

Isolados	Identificação	Código do NCBI	Ident. Max.
1S2DF7	<i>Homobasidiomycete sp.</i>	AY618675.1	94%
1S2DF17	<i>Metarhizium anisopliae</i>	EU307898.1	87%
1S2DF3	<i>Asordaria sicutii</i>	AY681180.1	99%
1S1DF2	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	EF118041.1	99%
1S1DF6	<i>Phlebia subseriales</i>	AB084620.1	99%
1S2DF1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	AY266402.1	98%
1S2DF5	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	EU622854.1	93%
1S3DF15	<i>Phomopsis sp.</i>	AY620999.1	96%
1S2DF2	<i>Schizophyllum commune</i>	AF280759.1	99%
1S3DF21	<i>Diaporthe sp.</i>	AY513950.1	97%
1J3DFT5	<i>Diaporthe helianthi</i>	AJ312356.1	97%
1J3DFT6	<i>Diaporthe helianthi</i>	AJ312356.1	98%
1J3DFT9	<i>Diaporthe helianthi</i>	AJ312356.1	98%
1J3DFT4	<i>Phomopsis sp.</i>	AY620999.1	92%
1J2DFT4	<i>Aphylophorales sp.</i>	EF060449.1	93%
1J1DFN2	<i>Botryosphaeria parva</i>	AY228097.1	98%
1J1DFN6	<i>Botryosphaeria parva</i>	AY228097.1	98%
1J2DFN1	<i>Diaporthe helianthi</i>	AJ312351.1	98%
1J2DFN4	<i>Alternaria alternata</i>	DQ156340.1	100%
1J2DFN15	<i>Phomopsis theicola</i>	DQ286286.1	94
1J3DFN4	<i>Glomerella cingulata</i>	AB269938.1	99%
1J1DFN9	<i>Hypoxyton sp.</i>	DQ322128.1	92%
3S3DF13	<i>Phomopsis sp.</i>	AY620999.1	89%
3S2DF6	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	EU427042.1	88%
3S2DF9	<i>Glomerella cingulata</i>	AB219012.1	98%
3S2DF3	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	AY266402.1	98%
3S3DF2	<i>Guignardia vaccinii</i>	EU167584.1	98%
3S1DF3	<i>Apodus oryzae</i>	AY681200.1	99%
3S2DF13	<i>Nodulisporium sp.</i>	AF201756.1	98%
3S1DF7	<i>Guignardia vaccinii</i>	EU167584.1	98%
3S1DF14	<i>Hypoxyton sp.</i>	DQ201131.1	96%
3S1DF11	<i>Nodulisporium sp.</i>	AF201756.1	98%
3S3DF6	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	EU552111.1	99%
3S2DF11	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	EU427042.1	95%
2J1DFT2	<i>Fusarium sp.</i>	EU594570.1	98%
2J1DFT8	<i>Alternaria alternata</i>	AY433814.1	99%
2J1DFT9	<i>Hypoxyton sp.</i>	DQ322116.1	95
2J2DFT2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	EU294027.1	99%
2J2DFT7	<i>Daldinia eschscholzii</i>	DQ322087.1	87%
2J2DFT9	<i>Glomerella cingulata</i>	AB334524.1	99%
2J2DFT10	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	EU294027.1	99%
2J3DFT5	<i>Hypoxyton sp.</i>	DQ322115.1	93%
2J2DFT6	<i>Trametes corrugata</i>	EU661875.1	99%
2J1DFN7	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	EU622854.1	98%
2J1DFN9	<i>Microthia havanensis</i>	DQ368734.1	97%
2J1DFN10	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	EU552111.1	98%

2J1DFN11	<i>Glomerella cingulata</i>	AB334524.1	95%
2J1DFN12	<i>Guignardia vaccinii</i>	EUI67584.1	98%
2J2DFN1	<i>Alternaria alternata</i>	AY433814.1	99%
2J2DFN3	<i>Phomopsis sp.</i>	AY620999.1	99%
2J2DFN4	<i>Alternaria azukiae</i>	EU520228.1	100%
2J2DFN5	<i>Alternaria alternata</i>	AY433814.1	100%
3S3DC1	<i>Diaporthe helianthi</i>	AJ312356.1	97%
3S3DC3	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	EU273522.1	99%
3S2DC1	<i>Pestalotiopsis paeoniicola</i>	EU400221.1	100%
3S2DC2	<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	EU342213.1	100%
3S2DC3	<i>Pestalotiopsis paeoniicola</i>	EU400221.1	100%
3S1DC2	<i>Botryosphaeria parva</i>	DQ356359.1	98%
3S1DC3	<i>Diaporthe helianthi</i>	AJ312356.1	98%
3S1DC5	<i>Neofusicoccum parvum</i>	EUO80926.1	98%
3S3DC2	<i>Schizophyllum commune</i>	AF280759.1	98%
2J3DCT3	<i>Alternaria arborescens</i>	DQ242506.1	99%
2J1DCT1	<i>Fusariumchlamyosporum</i>	AY213655.1	99%
2J1DCT6	<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	EU295637.1	99%
2J1DCT2	<i>Glomerella cingulata</i>	EF423519.1	99%
2J3DCT1	<i>Glomerella acutata</i>	AB269945.1	98%
2J3DCT2	<i>Phoma herbarum</i>	AB369456.1	99%
2J1DCT7	<i>Irpex sp.*</i>	EU301643.1	98%
2J1DCN2	<i>Microthia havanensis</i>	EF025970.1	97%
2J1DCN5	<i>Alternaria tenuissima</i>	AY51455.1	99%
2J2DCN1	<i>Polyporales sp.</i>	EF672293.1	99%
2J2DCN2	<i>Amphilogia gyrosa *</i>	EF026147.1	95%
2J2DCN5	<i>Phoma herbarum</i>	AB369456.1	99%
2J2DCN6	<i>Phoma herbarum</i>	AB369456.1	98%
2J1DCN4	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	AB042314.1	98%
2J2DCN4	<i>Phoma glomerata</i>	AYI83371.1	99%
2J2DCN8	<i>Phoma herbarum</i>	EUO82106.1	99%

APÊNDICE B - Resultados dos experimento de antagonismo

Tabela 6. Resultados dos experimento de antagonismo

Amostra	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Botrytis</i> sp.	Amostra	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Botrytis</i> sp.
3S2DC1	+	+	2J1DFT8	-	-
3S1DC2	+++	+++	2J1DFT9	-	-
3S1DC5	+	+	2J2DFT2	-	-
2J2DCN4	+	+	2J2DFT4	-	-
2J2DCN8	-	-	2J2DFT6	-	++
2J1DCN5	-	-	2J2DFT7	-	-
2J3DCT1	-	-	2J2DFT9	-	-
2J3DCT2	+	-	2J2DFT10	+	+
2J1DCT7	++	++	3J3DFT5	-	-
2J2DCN2	++	-	2J1DFN4	-	-
2J1DCN1	++	+++	2J1DFN7	-	-
2J1DCN3	+	-	2J1DFN10	-	-
2J1DCN4	+	-	2J1DFN11	-	-
3S1DC1	+	++	2J1DFN12	-	-
3S1DF9	-	++	2J2DFN1	-	+
3S1DF7	-	-	2J2DFN3	-	+
3S1DF3	+	-	2J2DFN4	-	-
3S1DF11	+	++	2J2DFN5	-	+
3S1DF14	-	+	1J3DFT6	-	-
3S2DF9	+++	+++	1J3DFT9	-	-
3S2DF6	-	-	1J1DFN2	+++	+++
3S2DF11	-	-	1J1DFN6	+++	+++
3S2DF3	-	-	1J1DFN15	-	+
3S3DF13	++	++	1J3DFN15	-	-
3S3DF2	-	-	1S2DF1	-	+
1S2DF7	-	-	1S2DF5	+	++
1S2DF15	-	-	1S3DF12	+	+
1S1DF6	+++	+++	1S3DF15	+	++
1S1DF2	++	++++	1J1DFN9	+++	+++
3S3DF6	-	-	1JT3DF4	+	+
3S2DF13	-	++	1JT2DF4	+++	+++
1S1DF10	+	+++	1S2DF2	+	+++
2J1DFT2	-	-	1S2DF9	+++	+++
2J1DFT5	-	-	1S3DF21	++	++

* - = ausência de antagonismo

+ = antagonismo fraco

++ =antagonismo médio

+++ = forte antagonismo

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)