



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA DO
TRÓPICO ÚMIDO**

**OCORRÊNCIA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS RADICULARES COM
POTENCIAL ANTAGÔNICO A TRÊS BIOVARES DE *RALSTONIA
SOLANACEARUM***

LUCINAIA BENTES NOGUEIRA

Manaus, Amazonas

Maio, 2014

LUCINAIA BENTES NOGUEIRA

**OCORRÊNCIA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS RADICULARES COM
POTENCIAL ANTAGÔNICO A TRÊS BIOVARES DE *RALSTONIA*
*SOLANACEARUM***

Orientador: LUIZ ANTONIO DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura no Trópico Úmido.

Manaus, Amazonas

Maio, 2014

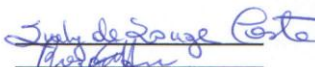
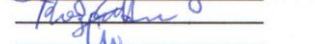

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA NO TRÓPICO ÚMIDO

DEFESA PRESENCIAL PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO

Ata da Defesa Presencial Pública de Dissertação de Mestrado de LUCINIA BENTES NOGUEIRA, aluno(a) do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Agricultura no Trópico Úmido, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, realizada no dia 04 de Dezembro de 2013.

Aos 04 dias do mês de Dezembro de 2013, às 09h00min, na Sala de Aula do Prédio da Botânica, Campus I/INPA, realizou-se a Defesa Presencial Pública da Dissertação de Mestrado, intitulada: "OCORRÊNCIA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS RADICULARES COM POTENCIAL ANTAGÔNICO A TRÊS BIOVARES DE *RALSTONIA SOLANACEARUM*", do(a) aluno(a) **LUCINIA BENTES NOGUEIRA**, sob a orientação do(a) Prof(a). Dr(a). LUIZ ANTÔNIO DE OLIVEIRA (INPA), em conformidade com o Artigo 52 do Regimento Geral da Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (MCTI-INPA) e Artigo 60 do Regimento Interno do PPG-ATU como parte de suas atividades para conclusão e obtenção do título de "**MESTRE EM AGRICULTURA NO TRÓPICO ÚMIDO**". A Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: SUELY DE SOUZA COSTA (INPA), ROGÉRIO EIJI HANADA (INPA) e ARLEM NASCIMENTO DE OLIVEIRA (UFAM). O Presidente da Banca Examinadora deu início à sessão, convidando os membros e o(a) Mestrando(a) a tomarem seus lugares. Em seguida, O Sr. Presidente informou sobre o procedimento do exame. A palavra foi facultada ao(a) Mestrando(a) para apresentar uma síntese do seu estudo e responder às perguntas formuladas pelos membros da Banca Examinadora. Após a apresentação e arguição pelos membros da Banca Examinadora esta decidiu por aprovação. O **Certificado de conclusão do Curso de mestrado e o Diploma** somente serão conferidos ao(a) aluno(a) após a apresentação, em um prazo máximo de 30 (trinta) dias após a Defesa, da versão definitiva contendo as modificações sugeridas pela Banca, impressa em 08 (oito) cópias e 1 (uma) cópia em meio digital (arquivo preferencialmente em .pdf, que inclua todo o texto, figuras e outras matérias que fazem parte da dissertação). Nada mais havendo, a sessão foi encerrada, foi lavrada a presente Ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Banca Examinadora. Em Manaus (AM), aos 03 de Dezembro de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

| <u>Nome</u> | <u>Parecer</u> | <u>Assinatura</u> |
|------------------------------|--|---|
| SUELY DE SOUZA COSTA | <input checked="" type="checkbox"/> Aprovado () Reprovado |  |
| ROGÉRIO EIJI HANADA | <input checked="" type="checkbox"/> Aprovado () Reprovado |  |
| ARLEM NASCIMENTO DE OLIVEIRA | <input checked="" type="checkbox"/> Aprovado () Reprovado |  |

() com "Distinção"

() com "Distinção e Louvor"

Manaus (AM), 04 de Dezembro de 2013.

Obs.:

A banca sugere que sejam aratadas as recomendações realizadas durante a defesa.

N778 Nogueira, Lucinaia Bentes

Ocorrência de fungos endofíticos radiculares com potencial antagônico a três biovars de *Ralstonia solanacearum* / Lucinaia Bentes Nogueira. --- Manaus: [s.n], 2014.

ix, 58 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2014.

Orientador : Luiz Antonio De Oliveira.

Área de concentração : Ciências Biológicas, Agrárias e Humanas.

1. Ecologia microbiana. 2. Antagonismo microbiano. 3. Extrato fúngico. I. Título.

CDD 576.15

Sinopse

Estudou-se a presença de atividade antagônica por fungos endofíticos isolados de raízes de espécies frutíferas contra três biovars da bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum*, causadora da murcha-bacteriana.

Palavras-chave: Ecologia microbiana. Antagonismo microbiano. Microdiluição. Extrato fúngico.

Aos meus pais *Carlos Odélio do Carmo Nogueira e Maria Lúcia Bentes Nogueira*, por todo amor e apoio incondicional.

Aos meus irmãos *Alendson, William e Carla*, pelo companheirismo e incentivo.

À minha avó *Nair do Carmo Nogueira*, pelo exemplo de vida e perseverança.

Dedico.

Agradecimentos

À Deus pelo cuidado, força e serenidade que me concedeu em todos os momentos difíceis que surgiram durante este período de minha vida. Pela minha saúde e de todos meus familiares, que assim, puderam me apoiar nos momentos de fraqueza, mesmo que distantes. Pelas oportunidades e aprendizado a mim concedidos.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, pela oportunidade da realização e conclusão do curso.

À FAPEAM pela concessão da bolsa de estudo.

Ao corpo docente do Curso de Agricultura no Trópico úmido - INPA, pela atenção e pelos ensinamentos recebidos.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio de Oliveira, por aceitar me orientar, pela confiança e por todo incentivo, pelos muitos ensinamentos e dedicação a mim oferecidos, por todo apoio, principalmente nos momentos de insegurança e dúvidas.

Aos companheiros do Laboratório de Microbiologia do Solo do INPA, Edilaine D`Avila, Fabiana Oliveira, Karen Kelly, Luciana Brito, Michelle Isabelle, Tatiana Paulain e Bianca Galúcio, que me ajudaram, contribuindo de alguma forma com o meu trabalho. Ao M.Sc. Francisco Wesen e João Rocha pelo auxílio nas coletas, pelo companheirismo e apoio constantes.

Ao Dr. Rogério Hanada e Dra. Suely Costa pelos esclarecimentos dados e apoio perante as dúvidas que surgiram.

Ao laboratório de Fitopatologia do INPA pela ajuda no que se tratava da área. À Dona Marilene Braga pelo auxílio e conhecimentos a mim transmitido.

Aos meus amigos Alexandre Buzaglo, Lais Alves, Luciana Vaz, Ludmilla Verona, Mariana Irumé, Rafaela Lima, Rina Fátima, Tamires Rezende, que sempre estiveram ao meu lado me motivando a concluir essa fase de minha vida, me encorajando a enfrentar os medos e ajudando de alguma forma, muitas vezes, considerada simples, mas essencial.

Muito obrigada!

OCORRÊNCIA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS RADICULARES COM POTENCIAL ANTAGÔNICO A TRÊS BIOVARES DE *RALSTONIA SOLANACEARUM*

RESUMO

Os fungos endofíticos habitam um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos, podendo assim ser utilizados como seus agentes de controle biológico por meio de competição por nutrientes, produção de substâncias antagônicas, parasitando o patógeno ou induzindo a resistência da planta. *Ralstonia solanacearum* é uma bactéria fitopatogênica que ataca algumas espécies vegetais de importância agrícola, principalmente em regiões tropicais. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antagônico de 51 fungos endofíticos radiculares isolados de plantas de dois Sistemas Agroflorestais contra três biovars de *Ralstonia solanacearum* e estimar a concentração inibitória mínima dos extratos fúngicos.. A avaliação do potencial antagônico dos fungos endofíticos foi através da difusão em disco de papel. As avaliações foram feitas 24 h após a montagem do experimento, medindo o halo de inibição. Os fungos que apresentaram halo de inibição foram submetidos ao teste de microdiluição em caldo em diferentes concentrações de extrato fúngico. Dos 51 fungos endofíticos radiculares testados, dez mostraram potencial antagônico contra pelo menos uma das três biovars de *R. solanacearum*. Dentre os 10 fungos endofíticos, cinco (INPA FE 001, INPA FE 004, INPA FE 005, INPA FE 007 e INPA FE 008) apresentaram potencial para controlar as três biovars. A biovar II de *R. solanacearum*, dentre as três testadas, foi a mais inibida pelos extratos fúngicos. Dentre os dois períodos de obtenção dos extratos fúngicos, os obtidos aos 16 dias de crescimento fúngico apresentaram os melhores resultados (halo de inibição). A menor diluição de extrato fúngico obtida que inibiu o crescimento bacteriano foi de 25% do INPA FE 001 e INPA FE 007 para biovar I, 12,5% do INPA FE 007 para a biovar II e 25% do INPA FE 002 para biovar III.

Palavras-chave: Ecologia microbiana. Antagonismo microbiano. Microdiluição. Extrato fúngico.

OCCURRENCE OF ENDOPHYTES ROOT WITH A THREE ANTAGONISTIC BIOVARS OF *RALSTONIA SOLANACEARUM*

ABSTRACT

The endophytic fungi inhabit an ecological niche similar to that occupied by plant pathogens, and thus can be used as their biological control agents through competition for nutrients, production of antagonistic substances, parasitizing the pathogen or inducing plant resistance. *Ralstonia solanacearum* is a plant pathogen that attacks some plant species of agricultural importance, mainly in tropical regions. The purpose of this study was to evaluate the potential antagonistic of 51 endophytic fungi root isolated from plants of two Agroforestry System against three biovars of *Ralstonia solanacearum* and estimate the minimum inhibitory concentration of fungal extracts. To evaluate the antagonistic potential of endophytic fungi was disk diffusion paper. The evaluations were performed 24h after mounting the experiment by measuring the inhibition zone. The fungi that showed inhibition zone were tested using broth micro dilution in different concentrations of fungal extract. Of the 51 root endophytic fungi tested, ten showed antagonistic potential against at least one of the three biovars of *R. solanacearum*. Among the ten endophytic fungi, five (INPA FE 001, INPA FE 004, INPA FE 005, INPA FE 007 and INPA FE 008) showed potential to control the three biovars. The biovar II of *R. solanacearum*, among the three tested, was the most inhibited by the fungal extracts. Among the two periods of getting fungal extracts, those obtained after 16 days of fungal growth showed the best results (inhibition). The lowest dilution of extract obtained which inhibited fungal bacterial growth was 25% of the INPA FE 001 and INPA 007 for biovar I, 12.5% of INPA FE 007 for biovar II and 25% of the EF INPA 002 to biovar III.

Key-word: Microbiology. Antagonism. Microdilution. Fungal extract.

| SUMÁRIO | Página |
|--|---------------|
| LISTA DE TABELAS | vii |
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. OBJETIVOS | 12 |
| 2.1. Objetivo geral | 12 |
| 2.2. Objetivos específicos | 12 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 13 |
| 3.1. Microrganismos do solo | 13 |
| 3.2. Antagonismo entre microrganismos e Controle Biológico | 15 |
| 3.3. Microrganismos endofíticos | 17 |
| 3.3.1. Fungos endofíticos como antagonistas | 20 |
| 3.4. <i>Ralstonia solanacearum</i> | 24 |
| 3.4.1. O Patógeno | 24 |
| 3.4.2. A doença – Murcha Bacteriana | 25 |
| 3.4.3. A classificação de <i>Ralstonia solanacearum</i> | 25 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 27 |
| 4.1. Obtenção dos fungos endofíticos | 27 |
| 4.1.1. Coleta das amostras radiculares | 27 |
| 4.1.2. Isolamento dos fungos endofíticos radiculares | 28 |
| 4.2. Ensaio de atividade antagônica “ <i>in vitro</i> ” | 29 |
| 4.2.1. Culturas fitopatogênicas | 29 |
| 4.2.2. Obtenção dos extratos brutos fúngicos | 29 |
| 4.2.3. Teste de difusão em disco | 30 |
| 4.3. Determinação da concentração inibitória mínima | 31 |
| 4.3.1. Obtenção das diluições seriadas dos extratos fúngicos | 31 |
| 4.3.2. Padronização das biovars de <i>Ralstonia solanacearum</i> | 31 |
| 4.3.3. Teste de microdiluição | 32 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 33 |
| 5.1. Teste de difusão em disco | 35 |
| 5.2. Microdiluição | 46 |
| 6. CONCLUSÕES | 50 |
| 7. REFERÊNCIAS | 51 |
| ANEXOS | 66 |

| LISTA DE TABELAS | Página |
|---|---------------|
| Tabela 01 - Hospedeiras e local de ocorrência de <i>Ralstonia solanacearum</i> de acordo com raças e biovares. | 31 |
| Tabela 02 - Lista das espécies vegetais coletadas nos Sistemas agroflorestais para isolamento de fungos endofíticos radiculares. | 32 |
| Tabela 03 - Biovares de <i>Ralstonia solanacearum</i> utilizadas e seu respectivo hospedeiro e procedência. | 34 |
| Tabela 04 - Fungos endofíticos radiculares isolados e seus respectivos hospedeiros vegetais e o Sistema Agroflorestal proveniente. | 33 |
| Tabela 05 - Extratos fúngicos obtidos aos oitavo dia de crescimento que se mostraram positivos, apresentando halo de inibição contra três biovares de <i>Ralstonia solanacearum</i> , no teste de difusão em disco. | 38 |
| Tabela 06 - Extratos fúngicos obtidos aos 16 ^o dia de crescimento que se mostraram positivos, apresentando halo de inibição contra três biovares de <i>Ralstonia solanacearum</i> , no teste de difusão em disco. | 42 |
| Tabela 07 - Diâmetros dos halos de inibição causados pelos extratos dos fungos endofíticos radiculares nas três biovares de <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 44 |
| Tabela 08 - Diâmetros dos halos de inibição causados pelos extratos brutos dos fungos endofíticos radiculares. | 48 |
| Tabela 09 - Diâmetros dos halos de inibição formados contra cada biovar de <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 49 |
| Tabela 10 - Halos de inibição causados pelos extratos fúngicos contra as biovares de <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 51 |
| Tabela 11 - Microdiluição dos extratos de fungos endofíticos radiculares sobre três biovares de <i>Ralstonia solanacearum</i> . | 53 |

1. INTRODUÇÃO

A descoberta de novos microrganismos tem ajudado na produção de novos antibióticos, agentes terapêuticos, polímeros, enzimas para aplicações diretas nas indústrias, biorremediação de poluentes, entre outros (Assad, 2000).

Os microrganismos causadores de doenças de plantas geralmente interagem com o hospedeiro, invadem seus tecidos, gerando o processo infeccioso, e ao colonizar a planta, atrapalham seu crescimento e desenvolvimento (Batista *et al.*, 2007). Entre os fitopatógenos que geram grandes prejuízos no setor agrícola, a bactéria *Ralstonia solanacearum* está entre os principais, devido sua ocorrência em regiões tropicais e subtropicais, aos danos causados às plantas e seu difícil controle, já que sua dispersão ocorre facilmente através de mudas infectadas, água de irrigação e de chuva e por meio dos implementos agrícolas empregados nos tratamentos culturais (Hayward, 1994; Roobs *et al.*, 1988; Coutinho *et al.*, 2000).

Além das características biológicas e epidemiológicas que dificultam o controle desta doença, não há produtos químicos com ação efetiva contra o patógeno e sua resistência, bem como a adoção das medidas de controle cultural não tem obtido sucesso em razão, principalmente, da grande variabilidade genética do patógeno (Javier, 1994; Lopes e Takatsu, 1997). Assim, o controle biológico é uma alternativa promissora.

O controle biológico utilizando microrganismos endofíticos vem sendo bastante estudado, pois são agentes antagonistas capazes de penetrar na planta e se disseminar sistematicamente no hospedeiro sem causar doenças, mas impedindo o avanço dos patógenos (Araújo *et al.*, 2002). Dentro deste contexto, o controle biológico com a utilização de fungos endofíticos, por serem capazes de colonizar os tecidos do hospedeiro sem causar danos, torna-os uma ferramenta importante para aumentar a produtividade das plantas cultivadas e protegê-las dos inimigos naturais.

Embora os mecanismos envolvidos no controle biológico por fungos endofíticos não sejam totalmente conhecidos, este processo vem adquirindo uma importância crescente. Por isso, estudos sobre aspectos biológicos, genéticos e fisiológicos da interação endofito-planta-patógeno, possibilitando um melhor entendimento da atuação dos fungos endofíticos pra a futura aplicação prática desses microrganismos serão sempre necessários.

As interações metabólicas entre os endofíticos e seus hospedeiros podem favorecer a síntese de metabólitos secundários biologicamente ativos (Schulz *et al.*, 2002). Alguns trabalhos demonstraram que na relação micróbio-planta, endofíticos contribuem com substâncias que possuem vários tipos de bioatividade, tais como atividade antibacteriana e antifúngica (Radu e Yoke, 2002). Os endófitos colonizam tecidos vegetais internos e obtêm nutrição e proteção da planta hospedeira. Em troca, eles produzem metabólitos funcionais que melhoram o estado da planta (Tan e Zou, 2001).

Tendo em vista o potencial dos fungos endofíticos como antagonistas a fitopatógenos para emprego futuramente no controle biológico e/ou na descoberta de substâncias com atividade antimicrobiana, o presente trabalho teve como propósito selecionar fungos endofíticos radiculares com potencial antagonista a três biovars de *Ralstonia solanacearum*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial de fungos endofíticos radiculares isolados de espécies de Sistemas Agroflorestais no Amazonas, como antagonistas a três biovars de *Ralstonia solanacearum*.

2.2. Objetivos específicos

- Selecionar fungos endofíticos radiculares antagonísticos a três biovars de *Ralstonia solanacearum*.
- Estimar a concentração inibitória mínima do extrato fúngico para cada biovar de *Ralstonia solanacearum*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Microrganismos do solo

O solo é um habitat microbiano por excelência, onde há inúmeras comunidades de microrganismos, como consequência, constitui o principal reservatório de diversidade desse grupo. Apesar de não se conhecer a identidade da grande maioria de espécies que habitam o solo, grupos funcionais de microrganismos são vitais nos ecossistemas. A presença desses é diretamente afetada pelas condições edafoclimáticas impostas nos diversos microssítios, como a presença de partículas de matéria orgânica, raízes, facilidade de trocas gasosas e outros (Cardoso, 1992).

Os microrganismos representam a fonte mais rica em diversidade química e molecular da natureza, constituindo a base de processos ecológicos, como os ciclos biogeoquímicos e a cadeia trófica, além de manter relações vitais com organismos superiores (Hunter-Cevera, 1998).

A biomassa microbiana, que representa a parte viva da matéria orgânica do solo, contém, em média, de 2 a 5 % do carbono orgânico, de 1 a 5 % do nitrogênio orgânico e de 2 a 20 % do fósforo orgânico nos solos tropicais (Smith e Paul, 1990). Ela é composta por bactérias, fungos e representantes da microfauna, que participam de importantes funções do solo, como a ciclagem de nutrientes e energia, regulando as transformações da matéria orgânica (Turco *et al.*, 1994).

O estudo da diversidade microbiana nos solos é essencial para definir estratégias para a preservação da biomassa e proporcionar parâmetros para desenvolver sistemas que indicam alterações ambientais, associadas geralmente, pela utilização não sustentável de solos agrícolas. Além disso, a diversidade

microbiana benéfica dos solos pode ser tomada como um suposto indicador da qualidade do solo. O entendimento atual do conceito de qualidade do solo compreende o equilíbrio entre os condicionantes geológicos, hidrológicos, químicos, físicos e biológicos (Bruggen e Semenov, 2000; Sposito e Zabel, 2003).

A microbiota do solo encontra-se em contínua interação entre espécies, ocorrendo condições de sinergismo, de antagonismo, de mutualismo, na maioria das vezes com parasitismo e outras vezes de saprofitismo (Stamford *et al.*, 2007).

De uma maneira geral, os microrganismos estão envolvidos em vários processos de grande interesse agrônomo, particularmente no que se refere à agricultura orgânica e à rotação de culturas. Destacam-se os processos de decomposição e ressíntese da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, as transformações bioquímicas específicas (nitrificação, desnitrificação, oxidação e redução do enxofre), fixação biológica do nitrogênio, a ação antagônica aos patógenos, produção de substâncias promotoras ou inibidoras de crescimento, entre outros (Andreola e Fernandes, 2007).

Os fatores que afetam os microrganismos do solo podem ser facilmente identificados, mas sua importância relativa é difícil de ser esclarecida, pois pode resultar da ação de uma ou mais variáveis isoladas e de suas numerosas interações (Moreira e Siqueira, 2002). A alteração de qualquer característica do solo (física, química ou biológica) implica em alterações nessa comunidade de microrganismos do solo (Stamford *et al.*, 2007).

No solo há grande diversidade de microrganismos que estão em constante interação, principalmente na rizosfera das plantas, em razão da grande quantidade de nutrientes secretados e liberados pelas raízes, como lisados e exsudatos radiculares (Sala *et al.*, 2007).

A rizosfera afeta intensamente a atividade da microbiota por possuir características diferentes das do solo que estão distante das raízes. Longe das raízes, os microrganismos dependem da incorporação de matéria orgânica como fonte de energia para seu desenvolvimento. Na rizosfera há maior concentração de nutrientes orgânicos oriundos das raízes, que propiciam o desenvolvimento da microbiota da rizosfera, como estímulo ou inibição de microrganismos promotores de crescimento ou fitopatógenos (Melo e Azevedo, 2008).

3.2. Antagonismo entre microrganismos e controle biológico

As interações endófito/planta ainda não são muito bem compreendidas, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagonicas. Nas interações simbióticas os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta, tais como: a diminuição da herbívora e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (Pereira, 1993; Araújo, 1996; Rodrigues e Dias Filho, 1996). Os fungos endofíticos habitam um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos, podendo, assim, se tornar uma ferramenta poderosa no controle desses patógenos por meio de competição por nutrientes, produção de substâncias antagonicas, parasitismo ou mesmo induzindo a planta a desenvolver resistência (Peixoto-Neto *et al.*, 2002). Exemplo de metabólitos que podem ser induzidos pelos endófitos são as fitoalexinas, substâncias de baixo peso molecular com atividades antimicrobianas, produzidas pelas plantas ante a ação de microrganismos ou de agentes estressantes (Cordeiro Neto e Dietrich, 1992). Da parte dos fungos pode-se citar a produção de micotoxinas e metabólitos secundários (Clay, 1988; D'Mello e Macdonald, 1997).

O controle biológico de pragas e doenças baseia-se na utilização de microrganismos que ajam como antagonistas à ação de predadores e agentes causadores das doenças (Azevedo, 2000). Isto pode ser feito devido a atuação direta do endófito por produção de substâncias nocivas aos herbívoros e patógenos, ou indiretamente por indução de resistência sistêmica (Benhamou e Brodeur, 2000; Marcon, 2002). Qualquer agente biológico capaz de interferir nos processos vitais de fitopatógenos, pode ser classificado como um antagonista, sendo que sua importância depende da relação com o patógeno alvo e o mecanismo através do qual é exercida a ação antagonica (Cook e Baker, 1983). Segundo este mesmo

autor, o controle biológico consiste na redução da densidade de inoculo, de um ou mais patógenos, realizado por um ou mais organismos, que não seja o homem.

A produção de certos compostos como os antibióticos (Fischer *et al.*, 1986) e outros metabólitos por microrganismos endofíticos já sugeria que eles podem controlar doenças de plantas. De fato, *Acremonium coenophialum*, um endófito comumente encontrado em gramíneas, tem efeitos inibitórios sobre vários patógenos (White e Cole, 1985). Tomateiros contendo o fungo endofítico *Acremonium kilense* também apresentam maior proteção contra patógenos como *Fusarium oxysporum* e *Clavibacter michiganense*. Bactérias do gênero *Erwinia* ocorrem no interior de plantas de soja e produzem metabólitos que protegem a planta contra a “queima bacteriana da soja” causada por *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Voltsch *et al.* 1992). O patógeno de *Pinus gremmeniella abietina* também é controlado por endófitos que reduzem ou até suprimem seu crescimento. Interessante, nesse caso, é a redução da população de endófitos em solos com alto teor de níquel, o que ocasiona maior incidência da doença nesses solos (Ranta *et al.*, 1994).

Os fungos foram os primeiros microrganismos explorados para o controle biológico (Varma *et al.*, 1999; Azevedo *et al.*, 2000), porém, muitas bactérias também vem sendo estudadas para esta finalidade (Rajkumar *et al.*, 2005; Bergsman-vlami *et al.*, 2005; Biondi, 2004). Em estudo conduzido por Stinson *et al.* (2003), verificou-se que o fungo *Gliocladium* sp. endofítico isolado da planta *Eucryphia cordifolia*, na Patagônia, produz compostos orgânicos voláteis, capazes de inibir o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Pythium ultimum* e *Verticilium dahliae*.

A seleção de microrganismos antagônicos pode ser realizada *in vitro* ou *in vivo*. A grande maioria dos trabalhos publicados abrange uma seleção inicial ensaiada em laboratório, para posteriormente testar *in vivo*, no campo ou em casa de vegetação, sob condições controladas (Mariano, 1993). Os mecanismos de interações antagônicas que levam ao controle biológico de um determinado organismo são o parasitismo, a antibiose e a indução de resistência. Se mais de um destes mecanismos for utilizado por um micro-organismo antagonista, este fato é

considerado como uma característica favorável para este ser bem sucedido como agente de biocontrole (Bélanger *et al.*, 1994).

Para cada patossistema, existe um local mais apropriado para realizar a seleção de antagonistas, porém as chances de obtenção de microrganismos efetivamente antagonísticos são aumentadas fazendo-se isolamentos no ambiente onde serão usados. Dessa forma, aqueles originários na área rizosférica possivelmente serão os mais adequados a controlar fitopatógenos desse ambiente. Esses microrganismos são denominados antagonistas residentes ou que ocorrem naturalmente em determinada região da planta, como exemplo, a rizosfera (Bettiol, 1991b).

Embora muitos estudos com fungos endofíticos já tenham sido realizados, pouco se sabe sobre os mecanismos utilizados por esses microrganismos na atividade antagonística contra fitopatógenos, bem como a quais fitopatógenos os endofíticos atuam como antagonistas.

3.3. Microrganismos endofíticos

O termo endófito foi mencionado pela primeira vez no início do século XIX, para definir todos aqueles organismos, incluindo os fitopatógenos, que colonizam tecidos internos de plantas, mas algum tempo depois foi considerado uma possível distinção entre endofíticos e patógenos de plantas (Azevedo, 1998). A partir daí foram sendo feitos aperfeiçoamentos na definição de microrganismos endofíticos, Carroll (1986) restringiu o uso do termo endófito a organismos que causam infecções assintomáticas nos tecidos internos de plantas, excluindo os fungos patogênicos e mutualistas, tais como micorrizas. Petrini (1991) propôs que organismos endofíticos são todos aqueles que em algum período do seu ciclo de vida colonizam tecidos internos da planta, sem causar dano aparente a seu hospedeiro. Sendo assim, para este autor, são considerados endófitos aqueles organismos que apresentam uma fase epifítica um tanto longa, bem como patógenos latentes que podem viver assintomaticamente em seus hospedeiros por algum tempo em seu ciclo de vida. Azevedo e Araújo (2007) conceituam os microrganismos endofíticos como aqueles cultiváveis ou não, que habitam o interior

de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais.

Até o final da década de 70, os microrganismos endofíticos eram considerados assintomáticos, ou seja, não produziam efeitos benéficos ou prejudiciais aos seus hospedeiros. Porém, estudos posteriores revelaram propriedades de interesse, como proteção contra predadores e patógenos. Atualmente, atribuem-se outras características importantes a estes organismos, como o aumento da resistência a condições de estresse, alteração em propriedades fisiológicas, produção de fitormônios, toxinas, fármacos (como antibióticos), imunossupressores, antitumorais, e compostos de interesse biotecnológico, como enzimas (Azevedo, 1998; Azevedo *et al.*, 2000; Stamford *et al.*, 2001; Stamford *et al.*, 2002; Suto *et al.*, 2002; Strobel, 2003).

A microbiota endofítica é composta principalmente por fungos e bactérias que podem conferir benefícios às plantas e estes benefícios podem ser recíprocos, resultando em um sistema simbiótico e estão presentes no interior de órgãos e tecidos vegetais como folhas, caules, raízes e até mesmo sementes, estes tecidos são aparentemente saudáveis, podendo em alguns casos produzir danos à planta quando as condições ambientais e estado fisiológico do hospedeiro se tornam favoráveis (Azevedo, 1998; Azevedo *et al.*, 2000).

A penetração dos endofíticos nos vegetais se dá por aberturas naturais ou artificiais, como estômatos, ferimentos causados por instrumentos agrícolas, micro ferimentos nas raízes ocasionadas pelo atrito com as partículas do solo e etc., disseminando de maneira sistêmica ou restrita em diversas partes da planta, habitando de forma ativa o apoplasto, vasos condutores e em alguns casos pode ocorrer colonização intracelular. Após a penetração, o endófito pode se movimentar de forma passiva no interior no hospedeiro, por meio do xilema (Hallmann *et al.* 1997; Wagner e Lewis, 2000).

Microrganismos endofíticos já foram isolados de todas as espécies de plantas até agora analisadas. Devido à íntima associação entre os endófitos e espécies vegetais, tem sido sugerido que estes microrganismosco-evoluíram com os seus hospedeiros (Misaghi e Donndelinge, 1990). É provável que todas as plantas apresentem em seu interior, microrganismosendofíticos, até mesmo diversas

espécies em um único hospedeiro. Em algumas espécies vegetais são mais frequentes determinadas espécies de micro-organismos, designadas dominantes, em contraposição a outras espécies mais raras, chamadas de secundárias. Em alguns casos, constata-se uma especificidade endófito-hospedeiro, em que poucas espécies de fungos são encontradas, enquanto na maioria dos casos, como em *Stylosanthes* sp. e *Musa* sp., uma variedade enorme de gêneros e espécies é observada (Pereira *et al.*, 1993; Glienke, 1995; Azevedo, 1998). Além do hospedeiro, outro fator que influencia a ocorrência de endófitos é o clima da região onde foi realizado o isolamento. A maioria dos estudos descreve a microbiota de vegetais isolados de regiões de clima temperado, que se revela bastante diversa das espécies encontradas em regiões tropicais, tanto em termos quantitativos quanto qualitativos (Rodrigues e Petrini, 1997).

O estudo das comunidades endofíticas tem aumentado substancialmente nos últimos 30 anos, pois foi observado que esses microrganismos apresentam importante papel no desenvolvimento da planta hospedeira (Araújo *et al.*, 2010). De tantos benefícios trazidos pela interação planta-endófito, alguns vem sendo muito estudados e comprovados, como resistência contra patógenos, estímulo e indução do processo de germinação de sementes (Vila-aiub *et al.*, 2005), produção de substâncias bioativas como fitohormônios (Yue *et al.*, 2000) e dessa forma, aumentam a competitividade do hospedeiro na natureza (Tan e Zou, 2001). Possibilitam ainda, o aumento do crescimento vegetal, onde estudos realizados por Silva *et al.* (2006) verificaram que fungos endofíticos isolados de *Annona* spp., dos gêneros *Acremonium*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Cylindrocladium*, *Chaetomium* e *Fusarium* promoveram eficientemente o crescimento vegetal de mudas de pinha.

Alguns endofíticos podem não atuar diretamente sobre seu antagônico, mas induzindo uma resposta na planta, ativando seu sistema de defesa. Essa indução de resistência está associada a alterações bioquímicas e estruturais na planta hospedeira, as quais atuam limitando o desenvolvimento de herbívoros e fitopatógenos na planta (Duijff *et al.*, 1997; M'piga *et al.*, 1997). Estudos de análise citológica em um isolado não patogênico de *Fusarium oxysporum*, conduzidos por Benhamou e Garand (2001), demonstraram que este endófito induziu uma serie de mecanismos de defesa em células de tecidos da raiz de ervilha. Estas células

sofreram varias alterações, como a deposição de material opaco na parede celular e no xilema, dificultando a entrada de patógenos nos tecidos do hospedeiro. Philip *et al.* (2005) testaram a bioatividade de bactérias endofíticas, isoladas de diferentes partes de *H. brasiliensis*, contra uma linhagem virulenta de *Corynespora cassiicola*, que causa sintomas de doença nas folhas de seringueira. Neste trabalho, esses autores observaram que folhas de seringueira tratadas com bactérias endofíticas mostraram tolerância sistêmica para *C. cassiicola*. Este estudo trata-se do único relato sobre o uso de bactérias endofíticas isoladas de seringueira.

A biodiversidade vegetal em países de clima tropical e subtropical como o Brasil é imensa. Estima-se que cada espécie vegetal possua microrganismos endofíticos ainda não classificados e com propriedades pouco conhecidas, mas potencialmente de interesse aplicado (Peixoto Neto *et al.* 2004). Conseqüentemente, a oportunidade de encontrar novos e interessantes endófitos em diferentes ecossistemas é grande. Porém, das quase 300.000 espécies de plantas que existem na Terra, somente algumas foram bem estudadas quanto à biologia dos endofíticos. Entretanto, quase nada se sabe sobre a relação fungo-planta, poucos são os estudos feitos sobre endófitos, principalmente em plantas de clima tropical, e esses microrganismos são praticamente inexplorados (Moreira *et al.* 2009).

Até agora os endofíticos ainda não têm sido amplamente explorados em relação a suas propriedades terapêuticas. Um único endófito pode ser capaz de produzir não só um, mas vários metabólitos bioativos (Ramasamy *et al.*, 2009). Os microrganismos endofíticos são uma fonte rica e confiável de novos compostos farmacologicamente ativos e com grande potencial na medicina e agricultura, principalmente utilizando-os como antagonistas de fitopatógenos (Strobel, 2002; Tan e Zou, 2001).

3.3.1 Fungos endofíticos como antagonistas

Os principais ou mais frequentes grupos, gêneros e espécies de microrganismos endofíticos têm sido descritos em vários trabalhos nos últimos dez anos, alguns deles apresentando extensas revisões sobre o assunto, nos mais

diversos aspectos. Os fungos predominam em número de trabalhos na literatura científica, seguidos de bactérias e actinomicetos (bactérias filamentosas), não por isso menos importantes (Petrini 1991; Fisher *et al.* 1995; Chanway 1996; Hallmann *et al.* 1997; Rodrigues e Petrini 1997; Azevedo 1998; Okane *et al.* 1998; Azevedo *et al.* 2000; Strobel 2002; Strobel 2003). Estudos realizados (Faeth e Fagan 2002; Abreu 2005), levam a crer que grande parte ou mesmo a totalidade dos vegetais seja colonizada por fungos endofíticos e que seus tecidos saudáveis possam estar acometidos por infecções assintomáticas. Essa característica leva à hipótese de que a presença desses organismos é um fenômeno geral e comum (Faeth 2002).

Os fungos endofíticos vêm se destacando principalmente diante de seu potencial biotecnológico, já que muitos são produtores de metabólitos primários (Stamford *et al.* 1998) e secundários usados em produtos farmacêuticos e também são utilizados como agentes de controle biológico; alguns fungos endofíticos têm sido amplamente estudados devido à sua ação antimicrobiana (Azevedo *et al.* 2000; Rodrigues e Samuels, 1999; Strobel, 2002; 2003). A produção de metabólitos de interesse biotecnológico pelas plantas pode ser um fator relevante na escolha do hospedeiro, devido à possibilidade do endófito ter adquirido geneticamente a capacidade para produzi-los durante sua co-evolução com o hospedeiro. Esta possibilidade é bastante vantajosa, pois, segundo Azevedo (1999), a capacidade que os endófitos possuem de produzir compostos bioativos originalmente produzidos pela planta, facilita a produção pelo micro-organismo, de substâncias de interesse por fermentação industrial, substituindo desta maneira, plantas de crescimento lento. Bactérias do gênero *Erwinia*, por exemplo, ocorrem no interior da soja e produzem metabólitos que protegem a planta contra o ataque do fitopatógeno *Pseudomonas syringae pr. glycinea* (Voltsch *et al.*, 1992).

Muitos estudos vêm sendo realizados visando à utilização dos fungos endofíticos como produtores de substâncias antimicrobianas. Peláez *et al.* (1998) isolaram 152 espécies de fungos endofíticos de nove espécies de plantas, incluindo medicinais, provenientes de regiões de solo salino e calcáreo da Espanha. Foram investigadas 187 linhagens de 136 espécies diferentes de fungos quanto à produção de antimicrobianos, frente a bactérias e leveduras, algumas de interesse clínico. Do total de 187, 45 (24%) linhagens, pertencendo a 37 (27%) espécies diferentes,

revelaram-se produtoras de compostos antimicrobianos, mais frequentemente antibacterianos (84,4%). Os autores detectaram grandes diferenças na capacidade de produzir metabólitos com atividade antimicrobiana entre os isolados, inclusive dentro da mesma espécie de fungo.

Lu *et al.* (2000) constataram atividade de três novos metabólitos produzidos pelo fungo *Colletotrichum* sp., isolado da planta medicinal *Artemisia annua* L. (Asteraceae), contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* e *Pseudomonas* sp., atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Aspergillus niger*, e inibição de crescimento de fungos patogênicos como *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum* e *Phytophthora capsici*.

Rodrigues *et. al.* (2000) pesquisaram a presença de compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). Extratos dos fungos isolados foram testados frente a quatorze micro-organismos, incluindo actinomicetos, bactérias Gram negativas e Gram positivas, leveduras e fungos filamentosos. Todos os fungos inibiram o crescimento de actinomicetos. *Guignardia* sp. apresentou ainda atividade contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum* sp. e *Penicillium canadensis*. *P. guepinii* inibiu o crescimento de *S. cerevisiae*, enquanto linhagens de *Phomopsis* sp. mostraram um pronunciado efeito antifúngico contra *Cladosporium elatum*, *Mycotypha* sp. e *S. cerevisiae*.

Scrugli *et al.* (2000), na Itália, isolaram fungos endofíticos de raízes de várias espécies de orquídeas dos gêneros *Barlia*, *Epipactis*, *Limodorum*, *Neottia*, *Ophrys* e *Orchis*. Testaram a ação antibiótica dos isolados contra algumas linhagens de referência, como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*, notando que no Meio BDA (Agar de Batata e Dextrose), os resultados foram melhor evidenciados do que no Meio Müeller Hinton. Algumas espécies do gênero *Barlia* mostraram amplo espectro de ação antimicrobiana, enquanto em *Limodorum*, as espécies testadas apresentaram atividade bastante específica contra apenas um tipo de bactéria ou fungo.

O ácido coletótrico, produzido pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., isolado da planta medicinal *Artemisia mongolica*, mostrou

inibição do crescimento de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Sarcina lutea* com concentrações mínimas inibitórias (MICs) de 25, 50 e 50 µg/mL, respectivamente. Também apresentou atividade antifúngica contra o patógeno *Helminthosporium sativum*, a 50 µg/mL (MIC) (Zou *et al.*, 2000).

Corrado e Rodrigues (2004) observaram atividade antimicrobiana de 13 linhagens do fungo *Phomopsis* sp., isoladas endofiticamente de folhas da planta medicinal *Aspidosperma tomentosum* e de pecíolos da planta medicinal *Spondias mombin*. Do total, três extratos foram capazes de inibir todas as linhagens testadas, entre bactérias, leveduras e fungos filamentosos, mostrando o grande potencial deste fungo como fonte de produtos bioativos.

Rubini *et al.* (2005) isolaram a comunidade de fungos endofíticos de plantas de cacau (*Theobroma cacao* L.) resistentes e suscetíveis ao agente causal da vassoura da bruxa, o basidiomiceto *Moniliophthora perniciosa*. Os autores identificaram ainda alguns endófitos potencialmente antagonistas, destacando-se *Gliocladium catenulatum*, que reduziu em 70% a incidência da vassoura da bruxa *in vivo* em plântulas de cacauzeiro.

Em estudo sobre o potencial de fungos endofíticos no controle biológico da *G. citricarpa*, causadora da mancha preta dos *citrus*, estes apresentaram potencial antagonista a esta doença (Corrêa, 2008).

Em pupunheira, Almeida (2005), observou que os fungos *E. nigrum* e *Neotyphodium* sp. podem ser utilizados como agentes biológicos de controle biológico dos patógenos causadores do apodrecimento radicular dessa pupunheira.

Schulz *et al.* (2002) isolaram, em doze anos de estudos, mais de 6.500 fungos endofíticos de árvores e herbáceas, na busca de novos metabólitos com potencial industrial e sugerem que a associação entre fungos endofíticos e seus hospedeiros conduza à produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana.

Vieira *et al.* (2012) estudaram a diversidade e atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados com a *Solanum cernuum* Vell. (*Solanaceae*). Ao final do processo de isolamento, 246 isolados de endófitos foram obtidos (225 fungos filamentosos e 21 leveduras) e identificadas espécies de *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Zygomycota*, das quais 26,01% apresentaram atividade antimicrobiana.

3.4. *Ralstonia solanacearum*

3.4.1. O Patógeno

Ralstonia solanacearum é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica, com formato de bastão, raramente apresentam flagelos. Existem espécies dentro do gênero *Ralstonia* que são saprófitas, patogênicas ao homem e animais e espécies fitopatogênicas. O genoma de *R. solanacearum* é bipartido, composto de dois replicons circulares, um cromossomo de 3,7 megabases e um megaplasmídeo de 2,1 megabases (Genin e Boucher, 2004).

R. solanacearum é um importante fitopatógeno causador de uma doença chamada murcha bacteriana. Esse patógeno possui características únicas e significantes e atinge uma grande faixa de hospedeiras com cerca de 200 espécies pertencentes a mais de 50 famílias botânicas, mas afeta principalmente as espécies da família Solanaceae (Hayward, 1994).

Essa bactéria é um fitopatógeno presente no solo, sendo bastante distribuído em regiões tropicais e de temperaturas mais altas (Swanson *et al*, 2005). Este patógeno infecta as raízes de seu hospedeiro entrando por feridas ou quando as raízes secundárias emergem (Liu *et al*. 2005). Ela invade os vasos xilemáticos e se espalha rapidamente para as partes aéreas das plantas pelo sistema vascular. A disfunção vascular induzida pela colonização extensiva causa sintoma de murcha e eventual morte da planta (Tans-Kersten *et al.*, 2004).

Há uma enorme dificuldade em controlar a murcha bacteriana, pois a *R. solanacearum* pode sobreviver saprofiticamente por longos períodos em diferentes tipos de solos. Essa capacidade de sobrevivência pode ser explicada pela sua utilização de uma variedade de compostos orgânicos como fonte de energia ou ainda pela habilidade de entrar em uma fase dormente. Pelo fato do patógeno utilizar ácidos graxos e também compostos aromáticos derivados da degradação da lignina, faz com que o solo continue sendo favorável à sua manutenção mesmo após a morte do hospedeiro, dificultando os testes de previsão de contaminação do

terreno, pois as células continuam vivas e capazes de causar doença, porém não detectáveis (Grey e Steck, 2001; Genin e Boucher, 2002; Denny, 2005;).

3.4.2. A doença – Murcha bacteriana

A doença causada por *Ralstonia solanacearum* (Murcha bacteriana) pode levar a perdas de até 100% na produção de solanáceas (Lopes, 1994). Doença ocorrente em todo Brasil, inclusive em áreas recém desmatadas, tendo sido descrita em diversas solanáceas como batata (*Solanum tuberosum* L.), tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.), berinjela (*Solanum melongena* L.), e fumo (*Nicotiana tabacum* L.). A bactéria também infecta espécies cultiváveis de outras famílias botânicas como as musáceas banana (*Musa* sp.) e helicônia (*heliconia* spp.); curcubitáceas como pepino (*Cucumis sativus* L.) e abóbora-de-moita (*Curcubita pepo* L.) (Hayward, 1994).

Essa bactéria infecta as raízes de seus hospedeiros, atinge o córtex radicular e invadindo os vasos xilemáticos. Uma vez nos vasos xilemáticos, a bactéria se multiplica, espalhando-se rapidamente para as partes aéreas da planta pelo sistema vascular (Tans-Kersten *et al.* 2004). As células bacterianas produzem polissacarídeos de alta viscosidade (pus bacteriano), que obstrui parcialmente ou totalmente o xilema impedindo que a água atinja a parte aérea da planta, ocasionando o principal sintoma da doença que é a murcha, sem o amarelecimento da parte aérea (González e Allén, 2003).

De maneira a confirmar a doença na planta visivelmente murcha, pode-se fazer o teste-do-copo. É um método simples e rápido, podendo ser realizado no campo. Esse teste é feito mergulhando uma seção do caule da planta doente em um copo transparente com água. Se ocorrer exsudação de pus esbranquiçado, a probabilidade de a infecção ser por *R. solanacearum* é grande. Porém, este método não consegue identificar qual isolado está infectando a planta (Santana, 2009).

3.4.3. A classificação de *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum é uma bactéria cosmopolita, extremamente variável, adaptada a um grande número de plantas hospedeiras, sob as mais diversas condições edafoclimáticas. Com isso, *R. solanacearum* foi classificada em nível infra-específico, em raças de acordo com sua capacidade de infectar diferentes espécies hospedeiras (Buddenhagen *et al.*, 1962; Takatsu e Lopes, 1997).

Os isolados de *R. solanacearum* também foram separados em biovars, de acordo com a capacidade de cada um em utilizar açúcares e alcoóis (maltose, lactose, celobiose, manitol, dulcitol e surbitol) como fontes de carbono (Haward, 1991). Agronomicamente falando, o sistema de classificação por raças é mais utilizado já que leva em consideração a reação da espécie à doença em questão, já a classificação por biovars baseia-se em testes bioquímicos.

Tabela 01: Hospedeiras e local de ocorrência de *Ralstonia solanacearum* de acordo com raças e biovars.

| Raça | Espécie hospedeira | Ocorrência | Biovar |
|-------------|---------------------------------------|---------------------------|---------------|
| 1 | Muitas espécies, mais de 50 famílias | Ásia, Austrália, Américas | 1, 3, 4 |
| 2 | Banana e outras espécies de Musa | Brasil, Caribe, Filipinas | 1 |
| 3 | Batata (Ataca poucas outras espécies) | Geral exceto EUA e Canadá | 2 |
| 4 | Gengibre | Ásia | 3 e 4 |
| 5 | Amora | China | 5 |

Fonte: Buddenhagen *et al.* (1962).

Embora as classificações em raças e biovars tenham sido úteis nos últimos anos, têm a inconveniência de não serem constantes, uma vez que se baseiam em características fenotípicas (Silveira *et al.*, 2005). Essa aparente homogeneidade das biovars pode-se diminuir quando se adicionam novos critérios, como o que aconteceu com a biovar 2. A adição de carboidratos, como trealose e inositol, revelou a existência de novos fenótipos para a biovar 2. A nomenclatura utilizada para separar esses novos subfenótipos foi biovar 2-A (A de Andinino), que acomoda a raça 3 e os isolados especializados em batata encontrado especialmente no Chile e na Colômbia. Já a biovar 2-T (T de tropical) compreenderia os isolados encontrados em terras mais baixas, especialmente no Peru e no Brasil. Sendo

assim, isolados de *R. solanacearum* classificados como pertencentes à biovar 2-A não consomem trealose e consomem inositol e os pertencentes à biovar 2-T consomem ambos os substratos (Hayward, 1994).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos fungos endofíticos

4.1.1. Coleta das amostras radiculares

As coletas foram realizadas em plantas de dois Sistemas agroflorestais, localizados no município de Presidente Figueiredo, Amazonas. Os SAF 1 e SAF 2 estão localizados nos km 46 (02°03'18,3" S e 059°40'04,1" W) e 44 (02°02'34" S e 059°37'04,6"), respectivamente.

O clima da região é o tropical úmido, tipo Afi (Köppen), com precipitação média de 200 mm, temperatura média de 28 °C e o solo é classificado como Latossolo amarelo que apresenta caráter ácido e baixa fertilidade natural. A umidade do ar situa-se em torno de 88% e a precipitação média anual varia de 1800 a 2000 mm/ano (Bastos e Diniz 1982).

As raízes foram coletadas de cinco espécies de interesse econômico de cada Sistema Agroflorestal (SAF's).

Tabela 02: Lista das espécies vegetais coletadas nos Sistemas agroflorestais para isolamento de fungos endofíticos radiculares.

| SAF 1 | | SAF 2 | |
|--------------|-------------------------------|--------------|-------------------------------|
| Nome popular | Nome científico | Nome popular | Nome científico |
| Açaí | <i>Euterpe oleracea</i> Mart. | Açaí | <i>Euterpe oleracea</i> Mart. |
| Banana | <i>Musa</i> sp. | Banana | <i>Musa</i> sp. |
| Cupuaçu | <i>Theobroma grandiflorum</i> | Cupuaçu | <i>Theobroma grandiflorum</i> |

| | | | |
|----------------|-------------------------------|-----------------|------------------------------------|
| | (Willd. ex Spreng.) K. Schum. | | (Willd. ex Spreng.) K. Schum. |
| Goiaba | <i>Psidium guajava</i> L. | Laranja | <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck |
| Rambutã | <i>Nephelium lappaceum</i> L. | Maracujá | <i>Passiflora edulis</i> Sims |

Foram coletadas amostras de raízes secundárias (finas) com tamanho adequado para análise. O método utilizado foi o de escavação ao redor da planta. As amostras foram devidamente identificadas e armazenadas em sacos plásticos e transportadas até o laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia (LEBMAM), no INPA III (V-8) para o isolamento dos fungos endofíticos radiculares.

4.1.2. Isolamento dos fungos endofíticos radiculares

Como uma mesma planta pode possuir microrganismos epifíticos e patogênicos além dos endofíticos, o isolamento desses últimos deve ser feito a partir do interior de tecidos e órgãos sadios, evitando-se, assim, os patogênicos. Deve ser feita também, a desinfecção da superfície do fragmento da planta, eliminando-se, dessa forma, os microrganismos epifíticos (Azevedo, 1998).

Para o isolamento dos fungos endofíticos, seguiu-se a metodologia descrita por Ahlich e Sieber (1996), onde as raízes foram lavadas cuidadosamente em água corrente e utilizou-se também sabão neutro. As raízes lavadas foram seccionadas em fragmentos de 1 cm com auxílio de tesoura devidamente esterilizada. Em seguida os fragmentos foram desinfetados superficialmente com hipoclorito de sódio a 2%, por 2 minutos e peróxido de hidrogênio a 33% por 1 minuto.

Os fragmentos de raízes foram semeados em placas de Petri, em triplicata, contendo o meio Batata dextrose Agar (BDA) acrescido de cloranfenicol (A) à 1 mg/L, evitando assim, o crescimento de possíveis bactérias endofíticas. As placas foram incubadas em estufa a 28 °C, no escuro, e observadas diariamente por duas semanas.

À medida que ocorreu formação de micélio dos fungos, se procedeu a sua purificação (Araújo *et al.* 2002), em placas de Petri contendo o meio BDA+A. Depois de purificadas, as colônias foram armazenadas em tubos de armazenamento de 5

ml contendo água destilada estéril, segundo a metodologia de Castellani (1967) por meio da transferência de pequenos discos de micélio e ágar das culturas puras para tubos lacrados, previamente esterilizados, contendo água destilada estéril, sendo mantidos em temperatura ambiente.

4.2. Ensaio de atividade antagônica “*in vitro*”

A atividade antagônica dos fungos endofíticos radiculares frente ao fitopatógeno *R. solanacearum* foi avaliada pelo teste de difusão em disco de papel (Kawamoto e Lorbeer, 1976), em meio de cultura LPGA (Kpémova *et al.* 1996).

4.2.1. Cultura fitopatogênica

Foram utilizados isolados de três biovares de *Ralstonia solanacearum* provenientes da coleção do laboratório de fitopatologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Tabela 03: Biovares de *Ralstonia solanacearum* utilizadas e seu respectivo hospedeiro e procedência.

| Biovares | Hospedeira | Local | Estirpe |
|-------------------|-------------------|-------------------|----------------|
| Biovar I | Tomateiro | Manaus | V55 |
| Biovar II | Tomateiro | Manaus | V13 |
| Biovar III | Tomateiro | Benjamim Constant | V1 |

Para a realização do teste de difusão em disco, as três biovares testadas foram retiradas dos tubos de armazenamento e riscadas em placas com meio LPGA e incubadas por 3 dias, a 29 °C em estufa do tipo BOD. Após o tempo de incubação com as colônias crescidas, cada biovar (I, II e III) foi inoculada em um erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido LPG e colocados sob agitação a 120 rpm em mesa agitadora, até a fase logarítmica de crescimento, onde nesta fase foram padronizadas para 10^7 ufc, em câmara de Newbauer, para realização do teste.

4.2.2. Obtenção dos extratos fúngicos

Os fungos endofíticos radiculares isolados foram inoculados em placas de Petri com meio BDA (Batata dextrose ágar), incubadas em estufa do tipo BOD por 8 a 14 dias, a ± 28 °C. Após o período de incubação, foram retirados de cada placa, 4 cilindros de ágar de 7 mm de diâmetro da região periférica da colônia fúngica de crescimento. Os cilindros foram feitos com auxílio de ponteira esterilizada de 7 mm de diâmetro. Os cilindros foram inoculados em meio líquido BD (Batata dextrose) em frascos de Erlenmeyer com capacidade de 125 mL, contendo 70 mL de meio líquido e os erlenmeyers foram incubados a ± 28 °C, a 120 rpm em mesa agitadora.

Os testes de antagonismo “*in vitro*” foram realizados com extratos fúngicos obtidos em tempos de crescimento diferentes. De cada fungo foram retiradas duas alíquotas de líquido metabólico, a primeira ao oitavo dia e a segunda ao décimo sexto dia após o início da inoculação para verificar se há diferença na ação inibitória do líquido metabólico na realização dos testes de antagonismo.

Após cada período de crescimento, foram retirados 35 mL de líquido metabólico fúngico dos erlenmeyers em fluxo laminar e filtrado com gase devidamente autoclavada para a retirada da maior parte do micélio. O líquido resultante foi armazenado em tubos de Falcon de 15 mL devidamente esterilizados e identificados. Em seguida, o líquido metabólico foi centrifugado por 20 minutos a 4000 rpm, para separar os restos miceliais do sobrenadante (extrato bruto fúngico). Por fim, o líquido metabólico foi filtrado em membrana Millipore (0,22 μm) e armazenado em freezer para realização dos testes de antagonismo.

4.2.3. Teste de difusão em disco

Discos de papel filtro (Whatman nº 02) de 5,5 mm de diâmetro, feitos com auxílio de furador de papel, foram autoclavados duas vezes para esterilização e em seguida, foram embebidos com o extrato bruto de cada fungo endofítico radicular testado (Item 3.2.2).

A suspensão padronizada de *Ralstonia solanacearum* (10^7 UFC/mL), foi semeada em placas de Petri contendo meio LPGA com auxílio de alça de Drigalski. Sobre a superfície do meio semeado com a bactéria fitopatogênica, foram colocados cinco discos de papel filtro embebidos com o extrato bruto de cada fungo testado e

cada período de crescimento. As placas foram incubadas a 29 °C em estufa tipo BOD, seguindo-se a incubação por 24 h. Os testes foram realizados em triplicata, com cinco discos cada placa, totalizando 15 discos por fungo.

A avaliação foi realizada após o período de incubação, onde foi verificada a presença de halos de inibição bacteriana, formado ao redor dos discos. Quando houve presença de halos de inibição, esses foram medidos com paquímetro digital (mm). Os resultados foram expressos pela média das três repetições.

4.3. Teste de Concentração Inibitória Mínima

Os testes de Concentração Inibitória Mínima foram realizados pela metodologia padronizada de microdiluição em caldo, em microplacas de 96 cavidades. Somente os fungos endofíticos que apresentaram potencial antagônico no teste de difusão em disco foram submetidos a esse teste.

4.3.1 Obtenção das diluições seriadas dos extratos fúngicos

As diluições foram distribuídas nas linhas da microplaca e os diferentes extratos fúngicos se distribuíram nas colunas. Foram realizadas diluições seriadas dos extratos fúngicos obtidos no item 3.2.2.

Na cavidade da primeira linha foram adicionados 100 µL de extrato bruto fúngico em 100 µL de meio de cultura líquido LPG. Os líquidos foram misturados com auxílio de pipeta devidamente esterilizada e desta mistura, 100 µL foram retirados e homogeneizados com 100 µL de meio LPG da cavidade da linha seguinte, e assim sucessivamente, obtendo-se assim uma gama de concentração de extratos fúngicos de 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39%.

4.3.2. Padronização das biovars de *Ralstonia solanacearum*

As três biovars de *Ralstonia solanacearum* foram retiradas dos tubos de armazenamento e riscadas em meio LPGA e incubadas por 3-4 dias a 29 °C em estufa do tipo BOD. Após o tempo de incubação com as colônias crescidas, cada

biovar (I, II e III) foi inoculada em um erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido LPG e colocados sob agitação a 120 rpm em mesa agitadora, até a fase logarítmica de crescimento, onde nesta fase foram padronizadas para 10^3 ufc, em câmara de Neubauer, para realização do teste de microdiluição.

4.3.3. Microdiluição

A esta gama de concentrações de extratos fúngicos obtidas em 3.3.1, foram adicionados 100 μ L do fitopatógeno em fase logarítmica de crescimento, padronizado para 10^3 UFC/mL. Foi utilizado no teste como controle negativo: meio líquido e fitopatógeno e controle positivo: antibiótico clorafenicol (1 ppm), meio de cultura líquido (LPG) e fitopatógeno (10^3 UFC/mL).

As microplacas foram incubadas a 28 ± 2 °C, por 24 h. Após o período de incubação, a ação antagônica dos extratos fúngicos frente ao crescimento das três biovars de *Ralstonia solanacearum* foi observado. Terminado o período de incubação, foi colocada em cada cavidade, uma solução de tetrazólio a 2%, para verificar a presença de células vivas, ou não, a partir da mudança de cor (vermelha) do meio de cultura indicando a presença de células vivas.

O teste foi realizado em duplicata e todos os procedimentos foram realizados de maneira estéril em capela de fluxo laminar.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados, purificados e armazenados 96 fungos endofíticos radiculares das plantas provenientes dos Sistemas Agroflorestais. Dos fungos endofíticos radiculares isolados foram selecionados 51 (Tabela 04), aqueles mais representativos, para serem aplicados nos testes de antagonismo “*in vitro*” contra as três biovaries de *Ralstonia solanacearum*.

Vários estudos já foram realizados visando o isolamento da comunidade endofítica das plantas, a fim de conhecer o potencial destes micro-organismos. Bernardi-Wenzel *et. al.* (2012), isolaram 31 fungos endofíticos de fragmentos foliares de soja, visando testá-los contra quatro fitopatógenos. Pileggi (2006) isolou fungos endofíticos de folhas, pecíolos e sementes da planta medicinal espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss) com o objetivo de investigar o seu potencial farmacológico, obtendo 915 endofíticos de diferentes tecidos das plantas. Bernardi-Wenzel *et. al.* (2010) também isolaram um total de 1000 fragmentos foliares de duas árvores de *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini) 127 endófitos. Outros trabalhos demonstraram que a frequência de isolados, bem como as espécies isoladas, pode ser variável, dependendo dos tecidos vegetais amostrados e das espécies investigadas (Souza *et al.* 2004; Silva *et al.* 2006; Magalhães *et al.* 2008).

Tabela 04: Fungos endofíticos radiculares isolados e seus respectivos hospedeiros vegetais e o Sistema Agroflorestal proveniente.

| SAF | Espécie vegetal | Isolado fúngico |
|-----|--------------------------------------|-----------------|
| A | Açaí - <i>Euterpe oleracea</i> Mart. | INPA FE 001 |
| A | Açaí - <i>Euterpe oleracea</i> Mart. | INPA FE 002 |
| B | Açaí - <i>Euterpe oleracea</i> Mart. | INPA FE 003 |
| B | Banana - <i>Musa</i> sp. | INPA FE 004 |
| B | Banana - <i>Musa</i> sp. | INPA FE 005 |
| B | Banana - <i>Musa</i> sp. | INPA FE 006 |
| B | Banana - <i>Musa</i> sp. | INPA FE 007 |

| | | |
|---|--|-------------|
| B | Banana - <i>Musa</i> sp. | INPA FE 008 |
| A | Goiaba - <i>Psidium guajava</i> L. | INPA FE 009 |
| A | Rambutã - <i>Nephelium lappaceum</i> L. | INPA FE 010 |
| B | Maracujá - <i>Passiflora edulis</i> Sims | INPA FE 011 |
| B | Maracujá - <i>Passiflora edulis</i> Sims | INPA FE 012 |
| B | Maracujá - <i>Passiflora edulis</i> Sims | INPA FE 013 |
| B | Maracujá - <i>Passiflora edulis</i> Sims | INPA FE 014 |
| B | Maracujá - <i>Passiflora edulis</i> Sims | INPA FE 015 |
| B | Maracujá - <i>Passiflora edulis</i> Sims | INPA FE 016 |
| B | Maracujá - <i>Passiflora edulis</i> Sims | INPA FE 017 |
| B | Maracujá - <i>Passiflora edulis</i> Sims | INPA FE 018 |
| B | Maracujá - <i>Passiflora edulis</i> Sims | INPA FE 019 |
| B | Maracujá - <i>Passiflora edulis</i> Sims | INPA FE 020 |
| A | Rambutã - <i>Nephelium lappaceum</i> L. | INPA FE 021 |
| B | Açaí - <i>Euterpe oleracea</i> Mart. | INPA FE 022 |
| B | Maracujá - <i>Passiflora edulis</i> Sims | INPA FE 023 |
| B | Maracujá - <i>Passiflora edulis</i> Sims | INPA FE 024 |
| A | Goiaba - <i>Psidium guajava</i> L. | INPA FE 025 |
| B | Cupuaçú - <i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng.) K. Schum. | INPA FE 026 |
| B | Cupuaçú - <i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng.) K. Schum. | INPA FE 027 |
| B | Maracujá - <i>Passiflora edulis</i> Sims | INPA FE 028 |
| A | Rambutã - <i>Nephelium lappaceum</i> L. | INPA FE 029 |
| B | Banana - <i>Musa</i> sp. | INPA FE 030 |
| B | Cupuaçú - <i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng.) K. Schum. | INPA FE 031 |
| B | Laranja - <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck | INPA FE 032 |
| B | Banana - <i>Musa</i> sp. | INPA FE 033 |
| B | Laranja - <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck | INPA FE 034 |
| A | Açaí - <i>Euterpe oleracea</i> Mart. | INPA FE 035 |
| A | Açaí - <i>Euterpe oleracea</i> Mart. | INPA FE 036 |
| B | Laranja - <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck | INPA FE 037 |
| B | Laranja - <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck | INPA FE 038 |
| B | Laranja - <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck | INPA FE 039 |
| B | Banana - <i>Musa</i> sp. | INPA FE 040 |
| A | Banana - <i>Musa</i> sp. | INPA FE 041 |
| A | Cupuaçú - <i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng.) K. Schum. | INPA FE 042 |
| A | Cupuaçú - <i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng.) K. Schum. | INPA FE 043 |
| A | Cupuaçú - <i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng.) K. Schum. | INPA FE 044 |
| A | Cupuaçú - <i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng.) K. Schum. | INPA FE 045 |
| A | Cupuaçú - <i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. ex Spreng.) K. Schum. | INPA FE 046 |

| | | |
|---|--|-------------|
| A | Banana - <i>Musa</i> sp. | INPA FE 047 |
| A | Banana - <i>Musa</i> sp. | INPA FE 048 |
| B | Laranja - <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck | INPA FE 049 |
| B | Maracujá - <i>Passiflora edulis</i> Sims | INPA FE 050 |
| B | Banana - <i>Musa</i> sp. | INPA FE 051 |

5.1. Teste de antagonismo “*in vitro*”

Foram submetidos aos testes de difusão em disco, 51 fungos endofíticos radiculares. Foram testados extratos brutos destes fungos obtidos em diferentes períodos de crescimento (8º dia e 16º dia). Dos extratos dos 51 fungos endofíticos radiculares testados, apenas 10 (19,6%) apresentaram halos de inibição contra pelo menos uma das biovars de *R. solanacearum* em um dos períodos de crescimento fúngico para obtenção de extrato testados (Tabelas 05 e 06). Por isso, somente esses 10 fungos foram analisados estatisticamente.

Dos extratos brutos obtidos ao 8º dia de crescimento fúngico testados contra as três biovars de *Ralstonia solanacearum*, cinco apresentaram halo de inibição contra a Biovar I, oito contra a Biovar II e três contra a Biovar III de *Ralstonia solanacearum* (tabela 5).

Apenas os extratos obtidos dos fungos INPA FE 004 e INPA FE 005 aos 8 dias de crescimento, apresentaram ação antagônica contra as três biovars testadas. Somente os extratos fúngicos de INPA FE 009 e INPA FE 006 apresentaram halo de inibição para apenas uma biovar de *R. solanacearum*, a biovar II neste tempo de crescimento.

Tabela 05: Extratos fúngicos obtidos aos oito dias de crescimento que se mostraram positivos, apresentando halo de inibição contra três biovars de *Ralstonia solanacearum*, no teste de difusão em disco.

| Fungo | Biovar I | Biovar II | Biovar III |
|-------------|----------|-----------|------------|
| INPA FE 001 | + | + | - |
| INPA FE 002 | + | + | - |
| INPA FE 003 | - | - | - |
| INPA FE 004 | + | + | + |
| INPA FE 005 | + | + | + |
| INPA FE 006 | - | + | - |

| | | | |
|-------------|---|---|---|
| INPA FE 007 | - | + | + |
| INPA FE 008 | + | + | - |
| INPA FE 009 | - | + | - |
| INPA FE 010 | - | - | - |
| INPA FE 011 | - | - | - |
| INPA FE 012 | - | - | - |
| INPA FE 013 | - | - | - |
| INPA FE 014 | - | - | - |
| INPA FE 015 | - | - | - |
| INPA FE 016 | - | - | - |
| INPA FE 017 | - | - | - |
| INPA FE 018 | - | - | - |
| INPA FE 019 | - | - | - |
| INPA FE 020 | - | - | - |
| INPA FE 021 | - | - | - |
| INPA FE 022 | - | - | - |
| INPA FE 023 | - | - | - |
| INPA FE 024 | - | - | - |
| INPA FE 025 | - | - | - |
| INPA FE 026 | - | - | - |
| INPA FE 027 | - | - | - |
| INPA FE 028 | - | - | - |
| INPA FE 029 | - | - | - |
| INPA FE 030 | - | - | - |
| INPA FE 031 | - | - | - |
| INPA FE 032 | - | - | - |
| INPA FE 033 | - | - | - |
| INPA FE 034 | - | - | - |
| INPA FE 035 | - | - | - |
| INPA FE 036 | - | - | - |
| INPA FE 037 | - | - | - |
| INPA FE 038 | - | - | - |
| INPA FE 039 | - | - | - |
| INPA FE 040 | - | - | - |
| INPA FE 041 | - | - | - |
| INPA FE 042 | - | - | - |
| INPA FE 043 | - | - | - |
| INPA FE 044 | - | - | - |
| INPA FE 045 | - | - | - |
| INPA FE 046 | - | - | - |
| INPA FE 047 | - | - | - |
| INPA FE 048 | - | - | - |
| INPA FE 049 | - | - | - |
| INPA FE 050 | - | - | - |

| | | | |
|---|---|---|---|
| INPA FE 051 | - | - | - |
| (+) Inibição de crescimento | | | |
| (-) Não houve inibição do micro-organismo teste | | | |

Dos extratos obtidos com 16 dias de crescimento, dos 51 fungos testados, sete apresentaram halo de inibição contra a biovar I de *Ralstonia solanacearum*, 10 extratos fúngicos contra a biovar II e cinco extratos fúngicos apresentaram halo de inibição contra a biovar III.

Os fungos INPA FE 001, INPA FE 004, INPA FE 005, INPA FE 007 e INPA FE 008 apresentaram halos de inibição contra todas as três biovars de *R. solanacearum* testadas. Os extratos dos fungos INPA 003 e INPA 009 apresentaram halo de inibição apenas contra a biovar II.

Tabela 06: Extratos fúngicos obtidos aos 16^o dia de crescimento que se mostraram positivos, apresentando halo de inibição contra três biovars de *Ralstonia solanacearum*, no teste de difusão em disco.

| Fungo | Biovar I | Biovar II | Biovar III |
|-------------|----------|-----------|------------|
| INPA FE 001 | + | + | + |
| INPA FE 002 | + | + | - |
| INPA FE 003 | - | + | - |
| INPA FE 004 | + | + | + |
| INPA FE 005 | + | + | + |
| INPA FE 006 | - | + | - |
| INPA FE 007 | + | + | + |
| INPA FE 008 | + | + | + |
| INPA FE 009 | - | + | - |
| INPA FE 010 | + | + | - |
| INPA FE 011 | - | - | - |
| INPA FE 012 | - | - | - |
| INPA FE 013 | - | - | - |
| INPA FE 014 | - | - | - |
| INPA FE 015 | - | - | - |
| INPA FE 016 | - | - | - |
| INPA FE 017 | - | - | - |
| INPA FE 018 | - | - | - |
| INPA FE 019 | - | - | - |
| INPA FE 020 | - | - | - |
| INPA FE 021 | - | - | - |
| INPA FE 022 | - | - | - |

| | | | |
|-------------|---|---|---|
| INPA FE 023 | - | - | - |
| INPA FE 024 | - | - | - |
| INPA FE 025 | - | - | - |
| INPA FE 026 | - | - | - |
| INPA FE 027 | - | - | - |
| INPA FE 028 | - | - | - |
| INPA FE 029 | - | - | - |
| INPA FE 030 | - | - | - |
| INPA FE 031 | - | - | - |
| INPA FE 032 | - | - | - |
| INPA FE 033 | - | - | - |
| INPA FE 034 | - | - | - |
| INPA FE 035 | - | - | - |
| INPA FE 036 | - | - | - |
| INPA FE 037 | - | - | - |
| INPA FE 038 | - | - | - |
| INPA FE 039 | - | - | - |
| INPA FE 040 | - | - | - |
| INPA FE 041 | - | - | - |
| INPA FE 042 | - | - | - |
| INPA FE 043 | - | - | - |
| INPA FE 044 | - | - | - |
| INPA FE 045 | - | - | - |
| INPA FE 046 | - | - | - |
| INPA FE 047 | - | - | - |
| INPA FE 048 | - | - | - |
| INPA FE 049 | - | - | - |
| INPA FE 050 | - | - | - |
| INPA FE 051 | - | - | - |

(+) Inibição de crescimento

(-) Não houve inibição do micro-organismo teste

Analisando os resultados da ação dos 10 melhores extratos fúngicos nas biovares de *Ralstonia solanacearum* testadas, pode-se observar que os dos isolados INPA FE 001, INPA FE 002, INPA FE 004, INPA FE 005 e INPA FE 007 apresentaram os melhores resultados para a biovar I de *R. solanacearum*. Já contra a biovar II, os extratos que se destacaram foram os dos fungos INPA FE 004 e INPA FE 007. A ação dos extratos dos fungos INPA FE 001, INPA FE 002, INPA FE 004, INPA FE 005, INPA FE 007, INPA FE 008 contra a biovar III apresentou os melhores resultados (Tabela 07). Dentre as três biovares de *R. solanacearum* testadas, a

biovar II foi a mais controlada “*in vitro*” pelos extratos fúngicos utilizados no teste. Isso demonstra que os fungos endofíticos testados, no geral, mostraram grande potencial antagônico contra a biovar II da bactéria fitopatogênica *Ralstonia solanacearum*, comparando-se estatisticamente com os resultados obtidos contra as demais biovars testadas.

A partir do interesse da utilização de microrganismos no biocontrole de patógenos e fitopatógenos e da descoberta dos benefícios dos fungos endofíticos para as plantas, despertou o interesse da comunidade científica em estudar tais micro-organismos. Vários estudos avaliando o potencial antagônico de fungos endofíticos isolados de plantas evidenciaram a presença de atividade antagônica contra patógenos e fitopatógenos. Rodrigues *et. al.* (2000) avaliaram fungos endofíticos isolados de *Spondians monbim* e estes apresentaram atividade antagônica contra bactérias filamentosas (actinomicetos), bactérias Gram-negativas, Gram-Positivas e fungos filamentosos.

Tabela 07: Diâmetros dos halos de inibição causados pelos extratos dos fungos endofíticos radiculares nas três biovars de *Ralstonia solanacearum*.

| Fungo | Biovar | | | Médias |
|--------------|----------|-----------|------------|---------------|
| | Biovar I | Biovar II | Biovar III | |
| | (mm) | | | |
| INPA FE 001 | 1,70 aB | 2,98 bA | 0,76 aC | 1,81 b |
| INPA FE 002 | 1,83 aA | 2,39 bA | 0,76 aB | 1,67 b |
| INPA FE 003 | 0,00 bA | 0,45 cA | 0,00 bA | 0,15 d |
| INPA FE 004 | 2,11 aB | 3,38 aA | 0,90 aC | 2,13 a |
| INPA FE 005 | 1,66 aB | 2,56 bA | 1,06 aB | 1,76 b |
| INPA FE 006 | 0,00 bB | 1,63 cA | 0,00 bB | 0,54 d |
| INPA FE 007 | 1,74 aB | 3,75 aA | 1,43 aB | 2,31 a |
| INPA FE 008 | 0,91 bA | 1,03 cA | 1,22 aA | 1,06 c |
| INPA FE 009 | 0,00 bB | 0,85 cA | 0,00 bB | 0,28 d |
| INPA FE 010 | 0,28 bB | 1,23 cA | 0,00 bB | 0,50 d |
| Média | 1,02 b | 2,02 a | 0,6156 c | |

Obs.: As médias com letras minúsculas iguais nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott a 1 % de probabilidade.

Caldos de metabólitos de fungos endofíticos obtidos de *Piper aduncum* foram testados quanto à sua atividade antagonista à bactéria *Mycobacterium tuberculosis*.

Dos 83 caldos dos fungos isolados, 15 apresentaram atividade antagonista (Lima, 2007). Figueiredo (2006) isolou fungos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* e testou quanto à atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas em humanos e fitopatógenos, evidenciando o grande potencial destes fungos. Metabólitos ativos de *Colletotrichum* sp., isolados endofiticamente da planta medicinal *Artemisia annua*, também mostraram inibição frente a *S. aureus* (Lu *et al.*, 2000).

Ao se analisar com mais detalhes os efeitos desses extratos contra as três biovars de *R. solanacearum*, separando-os pelos tempos de obtenção, observou-se que extratos obtidos aos 16 dias de crescimento fúngico apresentaram médias de halos de inibição maiores comparados aos halos de inibição com extratos obtidos aos 8 dias de crescimento fúngico (Figuras 01, 02 e 03). Alguns extratos fúngicos apresentaram a particularidade de somente manifestarem halo de inibição com os extratos obtidos aos 16 dias de crescimento, como o INPA FE 003 e INPA FE 010 para a biovar II, INPA FE 007 e INPA FE 010 para a biovar I, INPA FE 001, INPA FE 002 e INPA FE 008 para biovar III. Este fato pode ter ocorrido devido à liberação de metabólitos secundários que são produzidos na fase estacionária de crescimento fúngico. Os metabólitos secundários não são essenciais para o crescimento fúngico, mas os produtos produzidos nesta fase possuem atividade antimicrobiana, outros são inibidores enzimáticos, promotores de crescimento ou dotados de outras propriedades farmacológicas (Teixeira *et. al.* 2011).

Os extratos que proporcionaram halos de antagonismo contra a biovar I foram os dos fungos INPA FE 001, INPA FE 002, INPA FE 004, INPA FE 005, INPA FE 007, INPA FE 008 e INPA FE 010, ressaltando que os dos fungos INPA FE 007 e INPA FE 010 proporcionaram halos de inibição apenas quando foram obtidos aos 16 dias de crescimentos fúngico. O maior halo de inibição contra a biovar I com extratos obtidos aos 8 dias de crescimento fúngico foi proveniente do fungo INPA FE 004, com 1,88 mm de diâmetro e com os extratos obtidos aos 16 dias o maior foi proveniente do fungo INPA FE 007, com 3,49 mm (figura 01).

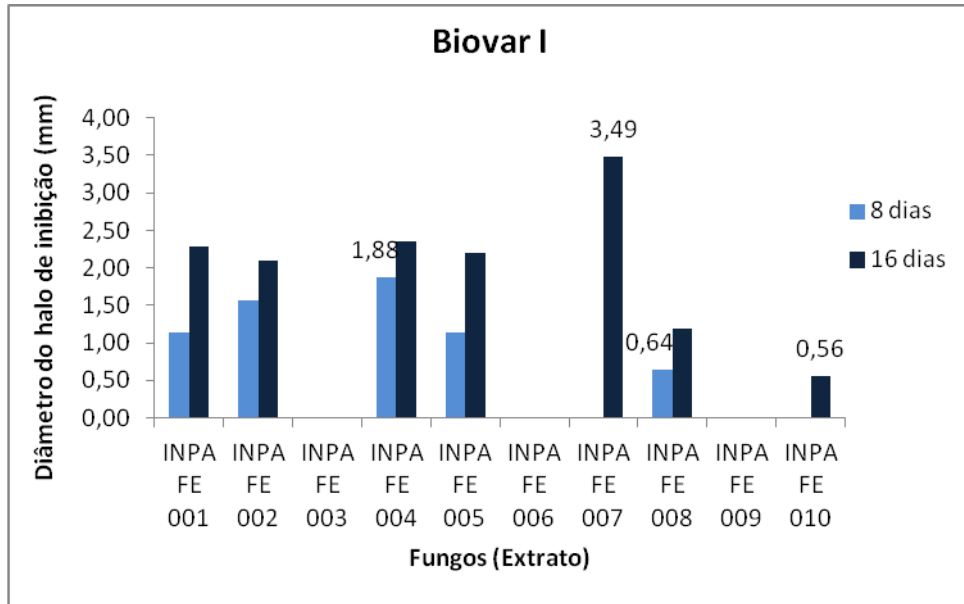


Figura 01: Halos de inibição obtidos no teste de difusão em disco contra a biovar I de *Ralstonia solanacearum*.

Os extratos dos 10 fungos endofíticos radiculares apresentaram halos de inibição contra a biovar II aos 8 e 16 dias de crescimento, exceto os dos isolados INPA FE 003 e INPA FE 010, que apresentaram halo de inibição apenas com o extrato obtido aos 16 dias de crescimento fúngico. Testando a atividade antagônica destes fungos com extratos de 8 dias, o maior halo de inibição foi o do fungo INPA FE 001 com 2,77 mm de diâmetro e dos extratos de 16 dias, o do fungo INPA FE 007 proporcionou o maior halo de inibição, com 4,60 mm (Figura 02).

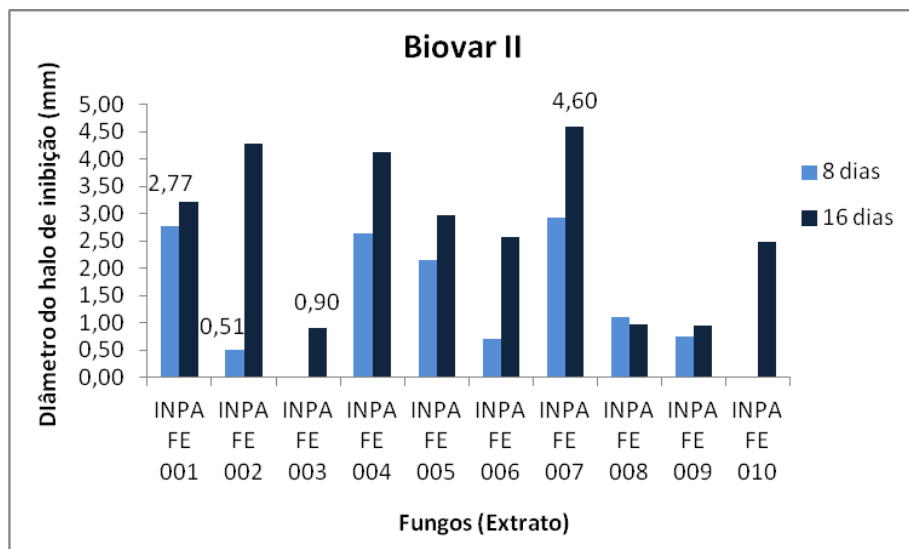


Figura 02: Halos de inibição obtidos no teste de difusão em disco contra a biovar II de *Ralstonia solanacearum*.

Observando os halos de inibição causados pelos extratos fúngicos obtidos aos 8 e 16 dias contra a biovar III de *R. solanacearum*, apenas os fungos INPA FE 001, INPA FE 002, INPA FE 004, INPA FE 005, INPA FE 007 e INPA FE 008 apresentaram halo de inibição para esta biovar em um dos períodos de obtenção dos extratos testados (Figura 03). Apenas os fungos INPA FE 004, INPA FE 005, INPA FE 007 apresentaram halo de inibição tanto com os extratos de 8 dias quanto com os de 16 dias de crescimento fúngico. O maior halo de inibição obtido com extratos de 8 dias foi o do fungo INPA FE 005 (1,04 mm), já para os extratos obtidos aos 16 dias de crescimento, o maior halo de inibição contra a biovar III foi de 4,78 mm do fungo INPA FE 002 (Figura 03).

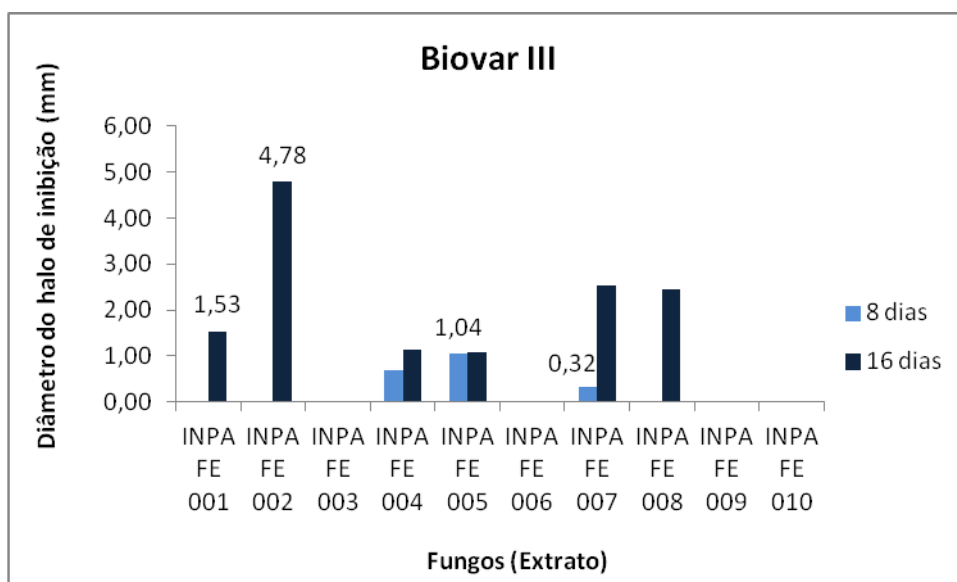


Figura 03: Halos de inibição obtidos no teste de difusão em disco para a biovar III de *Ralstonia solanacearum*.

Houve interação significativa entre os extratos fúngicos utilizados nos testes e o período de crescimento para obtenção dos extratos de cada isolado fúngico segundo a análise estatística. Os extratos dos fungos INPA FE 001, INPA FE 004, INPA FE 005 e INPA FE 007 apresentaram os melhores resultados contra as três biovars de *R. solanacearum* quando comparados com os extratos dos demais fungos também obtidos aos 8 dias de crescimento. Observando a interação com extratos obtidos aos 16 dias de crescimento fúngico, apenas o extrato do isolado INPA FE 007 apresentou o melhor resultado quando comparado com os extratos

dos demais fungos neste mesmo período de tempo, apesar das médias de todos estes extratos terem sido maiores que as médias dos halos obtidas com extratos com 8 dias. O isolado fúngico INPA FE 007 apresentou o melhor resultado nos dois períodos (8 e 16 dias) de obtenção de extrato testados (Tabela 08). Esse fungo endofítico pode estar produzindo substâncias antimicrobianas em um tempo de crescimento mais curto (8 dias), comparado com aqueles que apresentaram melhores resultados somente com extratos obtidos aos 16 dias de crescimento fúngico.

Tabela 08: Diâmetros dos halos de inibição causados pelos extratos brutos dos fungos endofíticos radiculares.

| Fungos | Tempo de crescimento fúngico | | Médias |
|--------------------|------------------------------|---------------|---------------|
| | 8 dias | 16 dias | |
| | ----- mm ----- | | |
| INPA FE 001 | 1,30 aB | 2,34 bA | 1,81 b |
| INPA FE 002 | 0,69 bA | 2,13 bA | 1,67 b |
| INPA FE 003 | 0,00 bA | 0,30 eA | 0,15 d |
| INPA FE 004 | 1,73 aB | 2,54 bA | 2,13 a |
| INPA FE 005 | 1,44 aA | 2,08 bA | 1,76 b |
| INPA FE 006 | 0,23 bA | 0,86 dA | 0,54 d |
| INPA FE 007 | 1,08 aB | 3,54 aA | 2,31 a |
| INPA FE 008 | 0,53 bB | 1,59 cA | 1,06 c |
| INPA FE 009 | 0,25 bA | 0,32 eA | 0,28 d |
| INPA FE 010 | 0,00 bB | 1,01 dA | 0,50 d |
| Médias | 0,73 B | 1,73 A | |

Obs. As médias com letras minúsculas iguais nas linhas e, maiúsculas iguais nas colunas, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 1 % de probabilidade.

A interação entre biovares testadas e tempo de obtenção do extrato fúngico (8 e 16 dias) foi significativa, onde para as três biovares de *R. solanacearum* testadas, os extratos obtidos aos 16 dias apresentaram os melhores resultados e a biovar mais controlada (maior halo de inibição) foi a biovar II (Tabela 09).

Tabela 09: Diâmetros dos halos de inibição formados contra cada biovar de *Ralstonia solanacearum*.

| Biovar | Tempo | | Médias |
|-------------------|----------------|---------------|---------------|
| | 8 dias | 16 dias | |
| | ----- mm ----- | | |
| Biovar I | 0,63 bB | 1,41 bA | 1,02 b |
| Biovar II | 1,33 aB | 2,72 aA | 2,02 a |
| Biovar III | 0,20 cB | 1,02 cA | 0,61 c |
| Médias | 0,73 B | 1,73 A | |

OBs. As médias com letras minúsculas iguais nas linhas e, maiúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 1 % de probabilidade.

Segundo Dai e Tao (2008), fatores como a temperatura, pH, umidade e tempo de crescimento das culturas podem resultar em diferenças significativas na produção de metabólitos de interesse, como os antimicrobianos, explicando assim, a influência do tempo de obtenção do extrato e a presença ou não do halo de inibição.

Na tabela 10 é possível observar individualmente as interações entre cada um dos fatores testados (fungo, biovar e tempo). De acordo com a análise estatística, os extratos fúngicos dos isolados INPA FE 001, INPA FE 002, INPA FE 004, INPA FE 005 obtidos aos 8 dias apresentaram os melhores resultados contra a biovar I. Já com os extratos obtidos aos 16 dias de crescimento fúngico, apenas o do isolado fúngico INPA FE 007 apresentou o maior halo de inibição contra essa biovar. É possível observar também, que os melhores resultados contra essa biovar pelos 10 metabólitos fúngicos foram com extratos obtidos aos 16 dias.

Analisando os resultados obtidos contra a biovar II de *R. solanacearum* nesta mesma tabela (Tabela 10), observa-se que para extratos obtidos aos 8 dias de crescimento fúngico os melhores resultados foram obtidos pelos fungos INPA FE 001, INPA FE 004, INPA FE 005 e INPA FE 007. Já utilizando extratos obtidos aos 16 de crescimento fúngico os isolados INPA FE 002, INPA FE 004, e INPA FE 007 apresentaram os melhores resultados de inibição. Para esta biovar (biovar II) os extratos obtidos aos 16 dias foram melhores que aqueles obtidos aos 8 dias de crescimento fúngico segundo a análise estatística.

Para a biovar III de *R. solanacearum*, com extratos obtidos aos 8 dias de crescimento fúngico, as médias não diferiram estatisticamente entre si neste período de obtenção de extrato. Para esta mesma biovar, utilizando os extratos obtidos aos 16 dias de crescimento fúngico, os isolados INPA FE 007 e INPA FE 008 apresentaram os melhores resultados comparados aos demais fungos testados para esta biovar.

Com base nos resultados obtidos nos testes de antagonismo “*in vitro*”, observou-se que houve diferença entre os fatores analisados (fungo, biovar e tempo de obtenção do extrato), confirmando assim a diferença de comportamento pelos fungos endofíticos radiculares diante as três biovars testadas, bem como entre os dois períodos de obtenção de extratos testados. Isso pode ser explicado, pois por se tratar de diferentes tipos de fungos (macro morfologicamente diferentes), o crescimento destes também pode ser diferente, com a produção ou não de metabólitos secundários, responsáveis pela ação antagônica, também acontecendo em diferentes períodos de acordo com o metabolismo de cada um dos fungos.

Fisher *et al.* (1884) detectaram atividade antibiótica em 10 dos 24 isolados de fungos endofíticos obtidos de cinco espécies de Ericaceae. Entre os 10 isolados, cinco apresentaram atividades antifúngicas e antibacterianas. Fisher *et al.* (1986) ensaiaram 25 isolados do hospedeiro *Ulex europeuse* e *U. gallii* e encontraram atividade antibiótica em quatro desses isolados. Analisando a atividade antagônica de isolados de *Coniothyrium* spp., foi observado que estes produziram uma ampla faixa de atividade antibiótica. Neste estudo, em nenhum dos ensaios descritos, houve preocupação de se verificar de forma exaustiva a produção de antibióticos pelos isolados endofíticos, mas se é confirmada a hipótese de que os endofíticos estariam aptos a competirem como antagônicos (Fisher *et al.*, 1984a).

Oliveira (2008) estudou a atividade de caldos metabólicos de fungos obtidos de *Caesalpinia ferrea* Martius sobre *Mycobacterium tuberculosis* e observou atividade antagônica destes fungos contra esta bactéria.

Tabela 10: Halos de inibição causados pelos extratos fúngicos contra as biovares de *Ralstonia solanacearum*.

| Fungo | Biovar x Tempo | | | | | | Médias |
|--------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| | Médias(mm) | | | | | | |
| | B1T1 | B1T2 | B2T1 | B2T2 | B3T1 | B3T2 | |
| INPA FE 001 | 1,13 aB | 2,28 bA | 2,76 aA | 3,20 bA | 0,00 aC | 1,52 bB | 1,82 b |
| INPA FE 002 | 1,56 aB | 2,09 bB | 0,51 bC | 4,28 aA | 0,00 aC | 1,52 bB | 1,66 b |
| INPA FE 003 | 0,00 bA | 0,00 cA | 0,00 bA | 0,90 cA | 0,00 aA | 0,00 cA | 0,15 d |
| INPA FE 004 | 1,88 aC | 2,34 bB | 2,63 aB | 4,13 aA | 0,68 aC | 1,13 bC | 2,14 a |
| INPA FE 005 | 1,13 aB | 2,19 bA | 2,14 aA | 2,97 bA | 1,04 aB | 1,07 bB | 1,76 b |
| INPA FE 006 | 0,00 bB | 0,00 cB | 0,69 bB | 2,57 bA | 0,00 aB | 0,00 cB | 0,54 d |
| INPA FE 007 | 0,00 bC | 3,49 aB | 2,91 aB | 4,59 aA | 0,31 aC | 2,54 aB | 2,31 a |
| INPA FE 008 | 0,63 bB | 1,19 cB | 0,96 bB | 1,11 cB | 0,00 aB | 2,45 aA | 1,06 c |
| INPA FE 009 | 0,00 bA | 0,00 cA | 0,74 bA | 0,95 cA | 0,00 aA | 0,00 cA | 0,28 d |
| INPA FE 010 | 0,00 bB | 0,56 cB | 0,00 bB | 2,47 bA | 0,00 aB | 0,00 cB | 0,51 d |
| Médias | 0,63 bB | 1,41 bA | 1,33 aB | 2,72 aA | 0,20 cB | 1,02 cA | |

Obs. As médias com letras minúsculas iguais nas linhas e maiúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Scott-Knott a 1 % de probabilidade. B1= Biovar I; B2 = Biovar II; B3 = Biovar III. T1 = Extratos obtidos aos 8 dias de crescimento fúngico; T2 = Extratos obtidos aos 8 dias de crescimento fúngico.

5.2. Microdiluição

Foi realizado o teste de microdiluição dos extratos fúngicos a fim de determinar a concentração inibitória mínima (CIM) daqueles que apresentaram atividade antagônica contra as três biovares testadas de *Ralstonia solanacearum*. Como os extratos fúngicos obtidos aos 16 dias apresentaram os melhores resultados de halo de inibição frente as três biovares de *Ralstonia solanacearum*, apenas estes foram submetidos à microdiluição.

Contra a biovar I, os isolados INPA FE 001 e INPA FE 007 apresentaram inibição mínima na diluição com 25% de extrato fúngico. Os isolados INPA FE 002, INPA FE 004, INPA FE 005, INPA FE 008 e INPA FE 010 apresentaram inibição na diluição com 50% de extrato fúngico (Tabela 11). Os extratos dos fungos INPA FE 003, INPA FE 006 e INPA FE 009 não inibiram o crescimento da bactéria *R. solanacearum* neste teste em nenhuma das concentrações de extrato testadas, como mostra a tabela 11. Comparando o resultado da microdiluição com o resultado obtido no teste de difusão em disco com extratos de 16 dias contra a biovar I (Figura 01), esses mesmos isolados fúngicos não apresentaram halo de inibição para esta biovar.

Contra a biovar II de *R. solanacearum*, o extrato do isolado INPA FE 007 apresentou inibição mínima na diluição com 12,50% de extrato. Os demais isolados, com exceção do INPA FE 003, apresentaram a inibição mínima com 50% de diluição do extrato bruto fúngico. O extrato obtido pelo fungo INPA FE 003, não inibiu o crescimento de *R. solanacearum* neste teste de microdiluição, concordando com o resultado obtido contra a biovar II no teste de antagonismo em difusão em disco (Figura 02).

Para a biovar III de *R. solanacearum*, é possível observar (Tabela 11) que o isolado INPA FE 002 apresentou inibição mínima com extrato fúngico diluído a 25%, os INPA FE 001, INPA FE 004, INPA FE 005, INPA FE 007 e INPA FE 008 apresentaram o inibição com extrato diluído em 50% para esta biovar (biovar III). Não apresentaram inibição em nenhuma das concentrações de extrato testadas, os extratos dos fungos INPA FE 003, INPA FE 006, INPA FE 009 e INPA FE 010. Comparando estes resultados com os obtidos no teste de difusão em disco para esta biovar (Figura 03), os mesmos isolados fúngicos não apresentaram halos de inibição contra a biovar III de *R. solanacearum*.

Souza (2009), testando extratos do fungo *L. edodes* contra o *S. aureus*, obteve inibição até a diluição 1:8 de seus extratos metabólicos e contra *E. coli* o mesmo fungo apresentou inibição com seu extrato diluído até 1:10.

Vários autores, a fim de aprofundar o conhecimento da atividade antagônica de fungos endofíticos contra microrganismos patogênicos e fitopatogênicos, utilizaram o teste de microdiluição para determinar a concentração inibitória mínima (CIM). Pereira *et al.* (2004) analisaram extratos do endófito *Pestalotiopsis guepini* e obtiveram ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, a qual exibiu CIM de 125 µg/ml. Weber *et al.* (2007), encontraram 4 espécies de fungos endofíticos, isolados de diferentes espécies vegetais sem identificação botânica, com atividade antagônica a *Candida albicans* em concentrações mínimas inibitórias de 5 a 50 mg/mL. Prince (2008), utilizando extratos brutos dos fungos endofíticos provenientes da espécie vegetal *Styrax camporum* observou atividade anti - *Mycobacterium tuberculosis* promissora, com valor de MIC de 125 e de 62,5 µg/mL. Os extratos brutos produzidos por fungos endofíticos isolados da espécie vegetal *Michelia*

champaca apresentaram atividade anti - *M. tuberculosis* promissora com MIC de 125µg/mL e 31,25µg/mL respectivamente.

Para Pandey *et al.* (2004), a CIM não é uma constante para um determinado agente, pois é influenciado por uma série de fatores. Esses fatores incluem a natureza do micro-organismo-teste utilizado, o tamanho do inóculo, bem como a composição do meio de cultura, o tempo de incubação, e aeração. Alguns microrganismos são capazes de produzir metabólitos que contribuem para o crescimento de outros, tais como as vitaminas tiamina e riboflavina, flavoproteínas, vitamina B12, várias porfirinas-like, compostos contendo ferro e coenzima A (Santos *et al.*, 1976; Uetanabaro, 2004). As concentrações mínimas obtidas não passaram de 12,50% de extrato fúngico. Por se tratar de um estudo inicial do potencial dos fungos endofíticos radiculares como antagonista às biovars de *R. solanacearum*, trabalhos seguintes visando aprofundar os mecanismos desta ação antagônica podem ser realizados utilizando a extração dos metabólitos presentes nos extratos em questão.

Tabela 11: Microdiluição dos extratos de fungos endofíticos radiculares sobre três biovars de *Ralstonia solanacearum*.

| Biovars | Fungos | Concentrações de extrato bruto fúngico (%) | | | | | | |
|-----------|-------------|--|----|------|------|------|------|------|
| | | 50 | 25 | 12,5 | 6,25 | 3,12 | 1,56 | 0,78 |
| Biovar I | INPA FE 001 | x | x | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 002 | x | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 003 | - | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 004 | x | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 005 | x | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 006 | - | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 007 | x | x | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 008 | x | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 009 | - | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 010 | x | - | - | - | - | - | - |
| Biovar II | INPA FE 001 | x | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 002 | x | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 003 | - | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 004 | x | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 005 | x | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 006 | x | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 007 | x | x | x | - | - | - | - |
| | INPA FE 008 | x | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 009 | x | - | - | - | - | - | - |

| | | | | | | | | |
|-------------------|--------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| | INPA FE 010 | x | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 001 | x | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 002 | x | x | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 003 | - | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 004 | x | - | - | - | - | - | - |
| Biovar III | INPA FE 005 | x | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 006 | - | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 007 | x | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 008 | x | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 009 | - | - | - | - | - | - | - |
| | INPA FE 010 | - | - | - | - | - | - | - |

(x) Inibição de crescimento

(-) Não houve inibição do micro-organismo teste

Outros testes tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” são necessários para avaliar melhor a capacidade antagonista dos fungos endofíticos radiculares frente ao fitopatógeno *R. solanacearum*. Além disso, ressalta-se a importância deste estudo inicial para elucidar o potencial destes fungos contra a *Ralstonia solanacearum*. Por fim, pretende este trabalho ser uma contribuição para a compreensão das interações endófitos/plantas e abrir novas perspectivas sobre o potencial biotecnológico dos microrganismos endofíticos de plantas, praticamente inexplorada neste campo, porém, como constatado, com grandes potencialidades.

6. CONCLUSÕES

- Dos 51 fungos endofíticos radiculares testados, dez mostraram potencial antagônico contra pelo menos uma das três biovars de *Ralstonia solanacearum*.
- Dentre os 10 fungos endofíticos, cinco (INPA FE 001, INPA FE 004, INPA FE 005, INPA FE 007 e INPA FE 008) apresentaram potencial contra as três biovars.
- A biovar II de *R. solanacearum*, dentre as três testadas, foi a mais inibida pelos extratos fúngicos.
- Os extratos obtidos aos 16 dias de crescimento fúngico apresentaram melhores resultados (halos de inibição) do que os obtidos com 8 dias.
- A maior diluição de extrato fúngico obtida que inibiu o crescimento bacteriano foi de 25% do isolado INPA FE 001 e INPA FE 007 contra a biovar I, 12,5% do isolado INPA FE 007 contra a biovar II e 25% do isolado INPA FE 002 contra a biovar III.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, L.M. 2005. *Diversidade de fungos endófitos associados à planta parasita Phoradendron perrottetti (DC.) eichler e sua hospedeira Tapirira guianensis aubl.* Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras. 86 pp.

Ahlich, K.; Sieber, T.N. 1996. The profusion of dark septate endophytic fungi in nonmycorrhizal fine roots of forest trees and shrubs. *New Phytologist*, 132: 259-270.

Almeida, C.V. de.; Yara, R.; Almeida, M. de. 2005. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 40: 467-470.

Andreola, F.; Fernandes, S.A.P. 2007. A microbiota do solo na agricultura orgânica e no manejo de culturas, p. 21-37. In: Silveira, A.P.D. da; Freitas, S.S. (Eds.). *Microbiota do solo e qualidade ambiental*. Instituto Agronômico de Campinas.

Araújo, W.L.; Lima, A.O.S.; Azevedo, J. L.; Marcon, J.; kukinsky-sobral, J.; Lacava, P.T. 2002. *Manual: isolamento de microrganismos endofíticos*. Piracicaba, São Paulo. 86 pp.

Araújo, W.L.; Marcon, J.; Mac-cheroni jr, W; Vanelsas, J.D.; Vanvuerde, J.W.L.; Azevedo, J.L. 2002. Diversity of Endophytic Bacterial Population and Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4906-4914.b

Araújo, W.L. 1996. *Isolamento, Identificação e Caracterização Genética de Bactérias Endofíticas de Porta-Enxertos de Citros*. Dissertação de Mestrado, ESALQ. Piracicaba, São Paulo. 111pp.

Araújo, W.L.; Lacava, P.T.; Marcon, J.; Lima, A.O.S.; Kuklinsky-Sobral, J.; Pizzirani-Kleiner, A.A.; Azevedo, J.L. 2010. *Guia Prático: Isolamento e Caracterização de Microrganismos Endofíticos*. Piracicaba, CALO, 167p.

Assad, A.L.D. 2000. *Biodiversidade e institucionalização e programas governamentais no Brasil*. Tese de doutorado, Campinas, São Paulo. 200 pp.

Azevedo, J.L. 1998. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico, p. 117-137. In: Melo, I.S. e Azevedo, J.L. *Ecologia Microbiana*. Embrapa CNPMA, Jaguariúna.

Azevedo, J.L.; Junior, W.M.; Pereira, J.O. Araújo, W. L. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Environmental Biotechnology*, 3(1): 40-64.

Azevedo, J.L.; Araújo, W.L. 2007. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Gangulli, B.N; Deshmukh, S.K. (Ed). *Fungi: multifaceted microbes*. Boca Raton, CRC Press, p.189-207.

Bastos, T.X.; Diniz T.D. de A.S. 1982. *Avaliação do clima do estado de Rondônia para o Desenvolvimento agrícola*. Belém: EMBRAPA: CPATU, 28p.

Batista, T.F.C.; Alves, K.F.; Santos-Filho, B.G.; Rodrigues, R.C.; Oliveira, F.C.; Tavares, A.E.B. 2007. Ocorrência de fungos e nematoides fitopatogênicos em áreas reflorestadas pela Petrobrás oriundas da exploração petrolífera no município de Coari (AM). *Revista de Ciências Agrárias*. 47: 163-171.

Benhamou, N.; Brodeur, J. 2000. Evidence for Antibiosis and Induced Host Defense Reactions in the Interaction Between *Verticillium lecanii* and *Penicillium digitatum*, the Causal Agent of Green Mold. *Biochemistry and Cell Biology*, 90(9): 932-943.

Berg, G.; Krechel, A.; Ditz, M.; Sikora, R. A.; Ulrich, A.; Hallmann, J. 2004. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 51: 215-229.

Bernardi-Wenzel, J.; Garcia, A.; Rubin Filho, C.J.; Prioli, J.A.; Pamphile, J.A. 2010. Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). *Biological Research*, 43: 375-384.

Bernardi-Wenzel, J.; Siqueira, A.L.; Burin, F.A.G.; Hein, D.P.R.; Silveira, J.A.; Romani, S. 2012. Isolamento e atividade antagonística de fungos endofíticos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). *Rev. Saúde e Biol.*, 7(3): 86-96.

Biondi, N. et al. 2004. Evaluation of Nostoc strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. *Appl Environ Microbiol*, 70(6), 3313-3320.

Bélanger, R.R.; Labbé, C.; Jarvis, W. R. 1994. Comercial-scala control of rose powdery mildew with a fungal antagonist. *Plant disease*, 78: 420-424.

Benhamou, N.; Garand, C. 2001. Cytological analysis of defense-related mechanisms induced in pea root tissues in response to colonization by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Phytopathology*, 91(8): 730-740.

Bettiol, W. 1991. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. *Controle Biológico de Doenças de Plantas*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA. p.1-5.

Bomfim, G. F. 2010. *Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de cupinzeiros da região da Mata de Cipó, Bahia*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana. 67pp.

Bruggen, A.H.C.; Semenov, A.M. 2000. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, 15: 13-24.

Buddenhagen, I.W., Sequeira, L. and Kelman, A. 1962. Designations of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52: 726.

Cardoso, E.J.B.N.; Tsai, S.M.; Neves, M.C.P. 1992. *Microbiologia do solo*. Sociedade brasileira de ciência do solo. Campinas. 360 pp.

Carrol, G.C. 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N. and VAN DEN HEUVAL (eds.) *Microbiology of the Phyllosphere*, Cambridge University Press, Cambridge, 392 p.

Castellani, A. 1967. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungal in sterile distilled water, for the researches. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Oxford*, 70(8): 181-184.

Chanway, C. P. 1996. Endophytes: they're not just fungi. *Canadian Journal of Botany*, 74: 321-322.

Clay, K. 1988. Fungal Endophytes of Grasses: a Defensive Mutualism Between Plants and Fungi. *Ecology*, 69: 10-16.

Cook, R. J.; Baker, K. F. 1983. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. St. Paul, APS, 539p.

Corrado, M.; Rodrigues, K. F. 2004. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. *Journal of Basic Microbiology*, 44(2): 157-160.

Cordeiro Neto, F.; Dietrich, S. M. C. 1992. Phytoalexin Induction by Leaf-Surface Fungi of Tropical Rubiaceae. *Ciência e Cultura*, 44(45): 342-344.

Corrêa, A. da S. 2008. *Avaliação da microbiota endofítica de citros com potencial antagonico no controle biológico de Guinardia citricarpa*. Dissertação de mestrado em fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio grande do Sul. 46 pp.

Coutinho, T.A. 2000. First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on eucalypts in South Africa. *For. Pathol.* 30: 205-210.

Dai, W.L.; Tao W.Y. 2008. Preliminary study on fermentation conditions of taxol producing endophytic fungus. *Chem Ind Eng Prog*, 27: 883–886.

Denny, T.P. 2005. A short history of biochemical and genetic research on *Ralstonia solanacearum* pathogenesis. *In: Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex* ed. Allen, C.P., Prior, P. and Hayward, A.C. pp. 323-334. St, Paul, Mn: Aps press.

D'Mello, J. P. F.; Macdonald, A. M. C. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 69: 155-166.

Duijff, B.J.; Gianinazzi-Pearsonand, V.; Lemanceau, P. 1997. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytologist*, 135: 325-334.

Faeth, S. H.; Fagan, W. 2002. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrated and Composition Biology*, 42: 360-368.

Figueiredo, J.A.G. 2006. *Bioprospecção, caracterização morfológica e molecular de Maytenus ilicifolia, com ênfase em Pestalotiopsis ssp.* Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.

Fisher, P.J.; Anson, A.E.; Petrini, O. 1984. Novel antibiotic activity of an endophyte *Cryptosporiopsis* sp isolated from *Vaccinium myrtillus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 83: 145-148.

Fisher, P.J.; Anson, A.E.; Petrini, O. 1986. Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. *Transactions of the British Mycological Society*, 86: 153-156.

Garcia, B.G. 2009. *Diversidade de isolados brasileiros de Ralstonia solanacearum da biovar 2*. Dissertação de mestrado, Universidade católica de Brasília, Brasília, Distrito Federal. 90 pp.

Genin, S.; Boucher, C. 2002. Pathogen Profile: *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant Pathol*, 33: 111-118.

Glienke, C. 1995. *Variabilidade genética no fungo endófito Guignardia citricarpa Kiely detectada por RAPD*. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 115 pp.

Gonzalez, E. T.; Allen, C. 2003. Characterization of a *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galacturonic acid. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 536-544.

Grey, B.E.; Steck, T.R. 2001. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3866-3872.

Hallmann, J. Quadet-Hallmann, A. Mahaffee, W.F., Kloepper, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agriculture crops. *Canadian Journal of microbiology*, 43: 895-914.

Hanlin, R.T.; Menezes, M. 1996. *Gênero ilustrados de Actinomicetos*. Universidade Rural de Pernambuco, Recife, 274 p.

Hayward, A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 29: 65-87.

Hayward, A.C., 1994. *The hosts of Pseudomonas solanacearum*, in: Hayward, A.C., Hartman, G.L. (Eds.), *Bacterial Wilt: The disease and its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. CABI, Wallingford, UK. 25-34 pp.

Hunter-cevera, J.C. 1998. The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology*, 1: 278-285.

Javier, E.Q., Foreword, in Hayward, A.C., Hartman, G.L. (Eds), *Bacterial wilt, the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CABI, Wallingford, U.K. 11pp.

Kawamoto, S. O.; Lorbeer, J. W. 1976. Protection of Onion Seedling from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* by Seed and Soil Infestation with *Pseudomonas cepacia*. *Plant Dis.*, 60: 189–191.

Lima, A.M. 2007. *Estudo da atividade de fungos endofíticos e extratos de piper aduncum L. (Piperaceae) sobre o Mycobacterium tuberculosis*. Manaus, UFAM. Dissertação – (Mestrado em patologia tropical) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.

Lopes, C.A. 1994. Ecologia de *Pseudomonas solanacearum*. In *Taller sobre enfermidades bacterianas de La papa 1*. Brasília: Memórias, Brasília: Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças/ EMBRAPA. p 17-22.

Lopes, C.A., Takatsu, A. 1997. Controle da murcha bacteriana. *Fitopatol. Bras.* 22, 224-225.

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

Magalhães, W. C.S.; Missagia, R. V.; Costa, F.A.F.; Costa, M.C.M. 2008. Diversidade de fungos endofíticos em candeia *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish. *Cerne*, 14(3): 267-273.

Marcon, J. 2002. *Isolamento e caracterização genética de actinomicetos endofíticos de Citrus sp. e interação com Xylella fastidiosa*. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo.

Mariano, R.L.R. 1993. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 1: 369-409.

M'Piga, P., Belanger, R.R., Paulitz, T.C., Benhamou, N., 1997. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas yuorescens* strain 63-28. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50: 301-320.

Melo, I.S.; Azevedo, J.L. 2008. *Microbiologia ambiental*. Ver. Ampl. Jaguariuna, Embrapa meio ambiente. 647pp.

Misaghi, I.J.; Donndelinger, C.R. 1990. Endophytic bacteria in symptomfree cotton plants. *Phytopathology*. 80: 808-811.

Moreira, M.S.F.; Siqueira, J.O. 2002. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Editora UFLA. 626p.

Moreira, G.M.; Pereira, V.M.; Mendes, M.C. 2009. Diversidade de fungos endofíticos associados a mamona (*ricinus Communis*). *Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil*, São Lourenço, Minas Gerais.

- Okane, I.; Nakagiri, A.; Ito, T. 1998. Endophytic fungi in leaves of ericaceous plants. *Canadian Journal of Botany*, 76: 657-663.
- Oliveira, J.S.R.L. 2008. *Estudo da Caesalpinia ferrea na obtenção de bioativos antagônicos aos agentes da tuberculose e candidíase*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.
- Pandey, B.; Ghimire, P.; Agarwal, V.P. 2004. Studies on the antibacterial activity of the Actinomycetes isolated from the Khumbu region of Nepal. *J. Biol. Sci.*, 23: 44-53.
- Peixoto Neto, P.A. de S.; Azevedo, J.L.; Araújo, W.L. de. 2002. Microrganismos endofíticos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 29: 62-77.
- Peixoto Neto, P.A.S.; Azevedo de, J.L.; Caetano, L.C. 2004. Microorganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. *BLACPMA*, 3: 69-72.
- Peláez, F.; Collado, J.; Arenal, F.; Basilio, A.; Cabello, A.; Diéz Matas, M. T.; García, J. B.; González Del Val, A.; GONZÁLEZ, V.; Gorrochategui, J.; Hernández, P.; Martín, I.; Platas, G.; Vicente, F. 1998. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. *Mycological Research*, 102(6): 775-761.
- Pereira, J.O. 1993. *Fungos Endofíticos dos Hospedeiros Tropicais*. Tese de Doutorado, ESALQ. Piracicaba, São Paulo. 104p.
- Pereira, R.S.; Sumita, T.C.; FURLAN, M.R.; JOGE, A.O.C.; UENO, M. 2004. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. *Rev.Saúde Púplica*. 38(2): 326-328.

Petrini, O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi of arial plant tissues. *In*: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J. (Eds.) *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambrige University Press, p.175-187.

Pileggi, S.A.V. 2006. *Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico*. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 141pp.

Prince, K.A. 2008. *Determinação da atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* de metabólitos bioativos de fungos endofíticos empregando a técnica do MABA*. Dissertação de mestrado, Faculdade de Odontologia, UNESP, São Paulo. 70 pp.

Radu, S; YOKE, C. 2002. Preliminary screening of Endophytic Fungi from Medicinal Plants in Malaysia for Antimicrobial and Antitumor Activity. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. 9(2): 23-33.

Rajkumar, M.; Lee W. H.; Lee K.J. 2005. Screening of bacterial antagonists for biological control of Phytophthora blight of pepper. *J Basic Microbiol*, 45(1), 55-63.

Ramasamy, K.; Lim, S.M.; Bakar, H.A.; Ismail, N.; Ismail, M.S.; Ali, M.F.; Weber, J.F.F.; Cole, A.L.J. 2010. Antimicrobial and Cytotoxic activities of Malaysian Endophytes. *Phytoteraphy research*, Disponível em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/122401164/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>. Acesso: 6/03/2010.

Rodrigues, K.f.; Dias-Filho, M.B. 1996. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. *Pesq. Agropec. Bras*, 31(12): 905-909.

Rodrigues, K. F.; Petrini, O. 1997. Biodiversity of endophytic fungi in tropical

regions. In: HYDE, K. D. *Diversity of Tropical Microfungi*. Hong Kong, University of Hong Kong Press. p. 57-69.

Rodrigues, K.F.; Hesse, M.; Werner, C. 2000. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombim*. *Journal of basic Microbiology*, 40(4): 261-267.

Rodrigues, K. F.; Samuels, G.J. 1999. Fungal endophytes of *Spondias mombim* leaves in Brazil. *Journal Basic of Microbiology*, 2: 131-135.

Roobs, C.F. 1998. *Algumas estratégias de controle à murcha bacteriana (Pseudomonas solanacearum) em eucaliptos*, in: Técnico, C. (Ed.), EMBRAPA, Jaguariúna, São Paulo, p.

Rubini, M. R. et al. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of witches broom disease. *International Journal of Biological Sciences*. 1: 24-33.

Sala, V.M.R.; Feitas, S. dos S., Silveira, A.P.D. 2007. Interação de fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em trigo. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 42: 1593-1600.

Santos, P.S.; et al. 1976. Vitamin B12 and antibiotic activities of actinomycetes isolated by a selective method from soil samples. *Phillip Journal of Science*, 103: 208-220.

Schutz, B.; Boyle, C.; Draeger, S.; Römmert, A.K.; Krohn, K. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Cambridge University Press*, 106: 996-1004.

Schutz, B.; Boyle, C. The Endophytic Continuum. 2005. *Mycological Research*, 6: 661-686.

Scrugli, A.; Cogoni, A.; Melis, G. V.; Deidda, D.; Pompei, R. 2000. Attivita biologica di funghi endofitici di Orchidaceae spontanee della Sardegna. Biologic activity of endophytic fungi isolated from sardinian orchid roots. *Micologia Italiana*, 29(2): 29-37.

Silva, R.L.O.; Luz, J.S.; Silveira, E.B.; Cavalcante, U.M.T. 2006. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). *Acta Botanica Brasílica*, 20(3): 649-655.

Silveira, J.R.O., Duarte, V.; Moraes, M.G.; Oliveira, A.M.R., Barni, V.; Maciel, J.L.N. 2005. Caracterização de estirpes de *Ralstonia solanaceum* isoladas de plantas de batata com murcha bacteriana, por PCR-Rep e RAPD. *Fitopatol Bras* 30: 615-622.

Souza, A.O.; Pamphile, J.A.; Rocha, C.L.M.S.C.; Azevedo, J.L. 2004. Plant-microbe interactions between maize (*Zea mays* L.) and endophytic microorganisms observed by Scanning Electron Microscopy. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, Maringá, 26(3): 357-359.

Souza, C.M.C. de O. 2009. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Biotecnológicos. 75 pp.

Stamford, T. L. M.; Araújo, J. M.; Stamford, N. P. 1998. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 18: 382-385.

Stamford, T.L.M.; Stamford, N.P.; Coelho, L.C.B.B.; Araujo, J.M. 2001. Production and characterization of a thermostable α -amylase from *Nocardopsis* sp. endophyte of yam bean. *Bioresource Technology*, 76: 137-141.

Stamford, T.L.M.; Stamford, N.P.; Coelho, L.C.B.B.; Araujo, J.M. 2002. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. *Bioresource Technology*, 83: 105-109.

Stamford, N.P.; Stamford, T.L.M.; Andrade, D.E.G.T.; Michereff, S.J. 2007. Microbiota de solos tropicais. p.21-37. In: Silveira, A.P.D. da; Freitas, S.S. (Eds.). *Microbiota do solo e qualidade ambiental*. Campinas: Instituto Agronômico.

Stinson, M.; Ezra, D.; Hess, W.M.; Sears, J.; Strobel, G. 2003. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. *Plant Science*, 165: 913-922.

Strobel, G. 2002. Rainforest endophytes and Bioactive Products. *Critical Reviews of Biotechnology*, 22(4): 315-333.

Strobel, G. A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, 5: 535-544, 2003.

Suto, M.; Takebayashi, M.; Saito, K.; Tanaka, M.; Yokota, A.; Tomita, F. 2002. Endophytes as producers of xylanase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(1): 88-90.

Swanson, J.K., Yao, J., Tans-Kersten, J. and Allen, C. 2005. Behavior of *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2 during latent and active infection of geranium. *Phytopathology* 95: 136-143.

Tan, R.; Zou, W. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural products reports*, 18: 448-459.

Tan, R.; Zou, W. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural products reports*, 18, 448-459.

Tans-Kersten, J., Brown, D. and Allen, C. 2004. Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by FlhDC and the plant host environment. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 686-695.

Takatsu, A.; Lopes, C.A. 1997. Murcha-bacteriana em hortaliças: avanços científicos e perspectivas de controle. *Horticultura Brasileira*, 15:170-177.

Texeira, M.F.S.; Silva, T. de A.; Palheta, R.A.; Carneiro, A.L.B.; Atayde, H.M. 2011. *Fungos da Amazônia uma riqueza inexplorada (Aplicações biotecnológicas)*. Manaus, Edua. 255 pp.

Turco, R.F.; Kennedy, A.C.; Jawson, M.D. 1994. Microbial indicators of soil quality. p.73-90. In: Doran, J.W.; Coleman, D.C.; Bezdicek, D.F.; Stewart, B.A. (eds.) *Defining soil quality for a sustainable environment*. Madison, Soil Science Society of America.

Uetanabaro, A.P.T. 2004. Taxonomia e triagem da atividade antimicrobiana e antitumoral de actinomicetos raros isolados de *Tocoyena formosa* (Cham. et Sch.) K. Shun. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 130 pp.

Vieira, M.L.A.; Hughes, A.F.S.; Gil, V.B.; Vaz, A.B.M.; Alves, T.M.A; Zani, C.L.; Rosa, C.A; Rosa, L.H. 2012. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). *Canadian Journal of Microbiology*, 58: 54-66.

Vila-aiub, M.; Gundel, P. E.; Ghera, C. M. 2005. Fungal endophyte infection changes growth attributes in *Lolium multiflorum* Lam. *Australian Ecology*. 30: 49-57.

Volksch, B.; Ullrich, M.; Fritsche, W. 1992. Identification and population dynamics of bacteria in leaf spots of soybean. *Microbial Ecology*, 24: 305-311.

Yue, Q.; Miller, C. J.; White, J. F. Jr.; Richardson, M. D. 2000. Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloë festucae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 4687-4692.

Zou, W. X.; Meng, J. C.; Lu, H.; Chen, G. X.; Shi, G. X.; Zhang, T. Y.; Tan, R. X. 2000. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *Journal of Natural Products*, 63(11): 1529-1530.

Wagner, B.L.; Lewis, L.C. 2000. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3468-3473.

Weber, R.W.S.; Kappe, R.; Paululat, T.; Mosker, E.; Anke, H. 2007. Anti-Candida metabolites from endophytic fungi. *Phytochemistry*, 68: 886–892.

White JR, J.F.; Cole, G.T. 1985. Endophyte-host associations in forage grasses. I. Distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*. *Mycologia, Lawrence*, 77: 323-327.

ANEXOS

QUADRO DE ANÁLISE

Anexo 01: Análise de variância entre os fatores, fungo, biovar e tempo em esquema fatorial.

| | FV | GL | SQ | QM | F |
|-------------|-----|-----------|----------|------------|---|
| Fator1(F1) | 9 | 106.00082 | 11.77787 | 25.4739 ** | |
| Fator2(F2) | 2 | 63.53621 | 31.76810 | 68.7100 ** | |
| Fator3(F3) | 1 | 44.58894 | 44.58894 | 96.4397 ** | |
| Int. F1xF2 | 18 | 23.71833 | 1.31768 | 2.8500 ** | |
| Int. F1xF3 | 9 | 21.16038 | 2.35115 | 5.0852 ** | |
| Int. F2xF3 | 2 | 3.39825 | 1.69913 | 3.6750 * | |
| Int.F1x2x3 | 18 | 24.32992 | 1.35166 | 2.9235 ** | |
| Tratamentos | 59 | 286.73285 | 4.85988 | 10.5112 ** | |
| Resíduo | 120 | 55.48208 | 0.46235 | | |
| Total | 179 | 342.21493 | | | |

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)