

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS DA PLANTA TÓXICA
CHIBATA (*Arrabidaea bilabiata* (SPRAGUE) SANDW.)**

BOLSISTA: MARIA CECÍLIA DE CARVALHO CHAVES, FAPEAM

**MANAUS
2009**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**RELATÓRIO FINAL
PIB-B/0037/2008**

**MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS DA PLANTA TÓXICA
CHIBATA (*Arrabidaea bilabiata* (SPRAGUE) SANDW.)**

BOLSISTA: MARIA CECÍLIA DE CARVALHO CHAVES, FAPEAM

ORIENTADORA: PROF^a DR^a ROZANA DE MEDEIROS SOUSA GALVÃO

**COLABORADORES: PROF. Dr. JOSÉ ODAIR PEREIRA
PROF. Dr. PEDRO DE QUEIROZ COSTA NETO**

MANAUS
2009

RESUMO

Microrganismos que vivem no interior de tecidos e órgãos vegetais sem aparentemente causar danos aos seus hospedeiros são denominados microrganismos endofíticos ou simplesmente endófitos. Os endófitos são potencialmente úteis na agricultura e na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados como vetores para introdução de genes de interesse nas plantas, como agentes inibidores de pragas e patógenos e como fontes de metabólitos primários e secundários de interesse como o taxol, poderoso anticancerígeno; a cryptocandina, lipopeptídeo antimicótico e diversos outros antibióticos. *Arrabidaea bilabiata* (SPRAGUE) SANDW. , é uma planta pertencente à família das Bignoniaceae, é uma trepadeira abundante nas regiões da Bacia Amazônica. É invasora resistente, adaptada a várias condições ambientais. Cresce em solos argilosos ou arenosos tolerando o encharcamento periódico do terreno, locais inundados e raramente, em solos de terra firme em florestas secundárias. Em bovinos causa toxidez com sintomatologia em aproximadamente, 6 a 24 horas após a ingestão da planta. Afeta o funcionamento do coração e causa a morte súbita do gado, principalmente quando se realiza a introdução ou retirada do gado de regiões de várzea. O objetivo deste trabalho foi isolar os microrganismos endofíticos da folha de *A. bilabiata*, quando presentes; descrever a ocorrência de microrganismos endofíticos nas folhas de *A. bilabiata* e identificar os microrganismos mais freqüentes, analisando as estruturas de reprodução sexual e assexual. Foram utilizadas folhas de *A. bilabiata*, aparentemente saudáveis coletadas no município de Autazes. Os endófitos foram cultivados em meio BDA. A identificação dos isolados foi realizada pela análise de suas estruturas de reprodução assexual e sexual. O número total de fungos endofíticos isolados de folhas de *A. bilabiata* coletadas no município de Autazes, após três dias de incubação foi de 112 isolados obtidos de 120 fragmentos inoculados, representando uma frequência de 93,3%. Entre os endófitos isolados foram identificados até nível de gênero: *Colletotrichum*, *Guignardia*, e *Xylaria*.

Palavras-Chave: *Arrabidaea bilabiata*; chibata, endófitos; plantas tóxicas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 Microrganismos Endofíticos.....	7
2.2 A Importância do Estudo dos Endófitos.....	7
2.3 Ocorrência de Fungos Endofíticos.....	7
2.4 Efeitos dos Microrganismos Endofíticos sobre Herbívoros Domésticos.....	8
2.5. Relação dos Endófitos com o Hospedeiro.....	8
2.6 O Hospedeiro <i>A. bilabiata</i> (SPRANGUE) SANDW.....	9
2.7 Plantas Tóxicas.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Material Biológico.....	12
3.2 Meio de Cultura para o Isolamento de Fungos Endofíticos.....	13
3.3 Isolamento dos Fungos Endofíticos.....	13
3.4 Identificação dos Endófitos Isolados.....	14
3.5 Técnicas de Coloração – Lactofenol.....	15
3.6 Técnicas de Armazenamento.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1 Identificação dos microrganismos endofíticos.....	16
4.2 Índice de Infecção.....	17
4.3 O Gênero <i>Colletotrichum</i>	19
4.4 O Gênero <i>Guignardia</i>	20
4.5 O Gênero <i>Xylaria</i>	21
5. CONCLUSÃO.....	23
6. REFERÊNCIAS.....	24

1. INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos são considerados aqueles microseres, principalmente fungos e bactérias no interior das plantas durante todo o seu ciclo de vida ou somente parte dele, sem causar sintomas de doenças (PETRINI, 1991; PEREIRA, 1993; BACON e WHITE, 2000; TAN E ZOU, 2001).

O conhecimento da comunidade de endófitos de cada hospedeiro, bem como o de suas interações, implica em seus isolamentos e caracterizações. É comum o isolamento de dezenas a centenas de microrganismos de um único vegetal e a partir deste, pelo menos uma espécie pode mostrar-se específica, ressaltando e confirmando que os endófitos são um componente importante da diversidade microbiana (TAN e ZOU, 2001; STROBEL E DAISY, 2003).

Os microrganismos endofíticos podem ser estudados a partir do seu isolamento em meios de cultura e sob condições controladas, pela observação direta a partir de técnicas de microscopia ótica ou eletrônica, ou ainda pela detecção direta por técnica molecular de amplificação de DNA (SCHULZ E BOYLE, 2005).

As interações endofíto/planta, ainda não são muito bem compreendidas, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas. Nas interações simbióticas os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólicos 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 (ARAÚJO, 1996; RODRIGO & DIAS FILHO, 1996; PEREIRA, 1993).

A *Arrabidaea bilabiata* (SPRAGUE) SANDW. é uma planta pertencente à família das Bignoniaceae, é uma trepadeira abundante nas regiões da Bacia Amazônica. É invasora resistente, adaptada a várias condições ambientais. Cresce em solos argilosos ou arenosos tolerando o encharcamento periódico do terreno, locais inundados e raramente, em solos de terra firme em florestas secundárias. Em bovinos causa toxidez com sintomatologia em aproximadamente, 6 a 24 horas após a ingestão da planta. Afeta o funcionamento do coração e causa a morte súbita do gado, principalmente quando se realiza a introdução ou retirada do gado de regiões de várzea.

As plantas tóxicas descritas no Brasil englobam 88 espécies, pertencentes a 50 gêneros. Apesar desse grande número de espécies tóxicas, as identificadas como causadoras de perdas econômicas importantes são relativamente poucas. Tokarnia *et al.*, (2000) consideram que as plantas que causam “morte súbita” são responsáveis por aproximadamente 60% de todas as perdas causadas por plantas tóxicas no país, dentre estas, a *Palicourea marcgravii*, é a planta tóxica mais importante do Brasil, ocasionando perdas severas em quase todo o país exceto na região Sul.

Em toda a Região Amazônica são conhecidas até o momento, três plantas responsáveis pela maioria das mortes de bovinos na terra firme: *Palicourea marcgravii* (cafezinho), na várzea do Rio Amazonas *A. bilabiata* (chibata) e na várzea do Rio Branco e seus afluentes *A. japurensis*, Existem ainda outras plantas conhecidas que causam intoxicação nos animais da Amazônia como: *L. camara* e *L. asarifolia* (TOKARNIA *et al.*, 2000). O objetivo deste trabalho foi isolar os microrganismos endofíticos da folha de *A. bilabiata*, quando presentes; descrever a ocorrência de microrganismos endofíticos nas folhas de *A. bilabiata* e identificar os microrganismos mais freqüentes, analisando as estruturas de reprodução sexual e assexual.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microrganismos Endofíticos

Microrganismos que vivem no interior de tecidos e órgãos vegetais sem aparentemente causar danos aos seus hospedeiros são denominados microrganismos endofíticos ou simplesmente endófitos. Acredita-se que esses microrganismos evoluíram com os seus hospedeiros, apresentando, assim, uma íntima interação mutualística onde os microrganismos recebem nutrientes e proteção e conferem ao hospedeiro maior resistência em ambientes com intenso estresse, causado por fatores climáticos ou biológicos. Essa resistência, geralmente, está associada à produção, por parte dos endófitos, de compostos tóxicos aos herbívoros ou aos patógenos (SERAFINI *et al.*, 2002).

2.2. A Importância do Estudo dos Endófitos

Os endófitos são potencialmente úteis na agricultura e na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados como vetores para introdução de genes de interesse nas plantas (FAHEY, 1988; MURRAY *et al.*, 1992); como agentes inibidores de pragas e patógenos (HALLMANN E SIKORA, 1996) e como fontes de metabólitos primários (STAMFORD *et al.*, 1998) e secundários de interesse como o taxol, poderoso anticancerígeno (STIERLE *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 2000), a cryptocandina, lipopeptídeo antimicótico (STROBEL *et al.*, 1999) e diversos outros antibióticos. Relatos como o do taxol, inicialmente isolado de *Taxus brevifolia* e, em seguida, de diversos endófitos desta e de outras plantas que o produzem, sugerem um relacionamento entre planta e microrganismo que deve ser melhor explorado.

2.3. Ocorrência de Fungos Endofíticos

A ocorrência de endófitos no vegetal varia espacialmente, há diferença e especificidade na comunidade entre os tecidos do hospedeiro: raiz, caule, folha, flor e fruto (TEJESVI *et al.*, 2005; GOND *et al.*, 2007). Além disso, a comunidade de

endófitos depende também da interação com microrganismos epifíticos e patogênicos (SANTAMARIA E BAYMAN 2005; OSONO, 2007); da influência do ambiente (PIMENTEL *et al.*, 2006; UNTERSEHER *et al.*, 2007); e idade do hospedeiro (PHOTITA *et al.*, 2001; VUJANOVIC e BRISSON, 2002).

2.4. Efeitos dos Microrganismos Endofíticos sobre Herbívoros Domésticos

O efeito de endófitos sobre herbívoros domésticos ocorre principalmente devido à síntese pelos endófitos de alcalóides e toxinas de outros grupos químicos, quando em associação com a planta hospedeira. A ingestão de plantas, contendo as toxinas produzidas pelos endófitos, pode reduzir o apetite dos animais, resultando em diminuição do peso e em prejuízos para o produtor. Mas os efeitos negativos mais intensos são aqueles observados pela ingestão de plantas contendo neurotoxinas, as quais podem ser total ou parcialmente sintetizadas pelos endófitos (SERAFINI, *et al.*, 2002).

Apesar da imensa diversidade biológica amazônica, as espécies que a compõem e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas, muito menos seus microrganismos e suas interações com outros seres.

Fungos endofíticos podem conferir resistência à planta contra herbivoria por meio de dois mecanismos principais: 1) estímulo direto do vigor da planta e 2) produção de metabólitos que aumentam a resistência a herbivoria.

2.5. Relação dos Endófitos com o Hospedeiro

A relação dos endófitos com o hospedeiro ainda não foi completamente elucidada. Há duas hipóteses principais: a primeira diz respeito ao equilíbrio antagônico e a segunda à simbiose mutualística (FAETH, 2002; RUDGERS *et al.*, 2004; SCHULZ E BOYLE, 2005; KOGEL *et al.*, 2006).

A ocorrência de endófitos e a frequência de infecção variam grandemente de acordo com a espécie hospedeira e a origem geográfica da mesma. Penna (2000) isolou endófitos do interior de sementes de erva-mate, porém a maioria das plantas investigadas não possuía sementes infectadas por microrganismos endofíticos.

A frequência e composição de espécies das comunidades microbianas são dependentes das interações entre os fatores bióticos e abióticos inerentes aos seus habitats, uma vez que o habitat associado à planta é um ambiente dinâmico. Há variação espacial nas comunidades endofíticas em diferenças e especificidades da micobiota entre os isolados vegetais: raízes, caules, folhas e frutos. (NALINI *et al.*, 2005; TEJESVI *et al.*, 2005; GOND *et al.*, 2007); dependem das interações com outros microorganismos como patógenos e epifíticos (OSONO, 2007; SANTAMARIA E BAYMAN 2005).

2.6 O Hospedeiro *Arrabidaea bilabiata* (SPRAGUE) SANDW.

Arrabidaea bilabiata (SPRAGUE) SANDW. também conhecida por outros nomes populares como; chibata, gibata, gibata-branca, gibata-roxa, jurará bucha, jurará branco dentre outros, é uma planta arbustiva de hábito lianescente, robusta com folhas lisas, face superior verde lustrosa e inferior verde clara, trifolioladas ou bifoliadas com um folíolo terminal transformado em gavinhas simples. É uma planta invasora resistente, adaptada a várias condições ambientais. Cresce em solos argilosos ou arenosos tolerando o encharcamento periódico do terreno, locais inundados e raramente, em solos de terra firme em florestas secundárias. Há registros desta planta na região norte nos estados do Amazonas, Pará, Roraima e Acre. Em bovinos causa toxidez com sintomatologia em aproximadamente, 6 a 24 horas após a ingestão da planta. Os animais intoxicados ficam em decúbito lateral, passam a fazer movimentos de pedalagem e em certos casos fecham as pálpebras fortemente berrando constantemente, e morrem. O princípio tóxico da planta são glicosídeos do tipo esteróides cardio-ativos TOKARNIA *et al.*, 2000).

Arrabidaea bilabiata, pertencente à família Bignoniaceae, é uma trepadeira escandente abundante em muitas áreas da Bacia Amazônica, (várzeas e restingas) que são inundadas periodicamente durante a “cheia”; sua toxicidade foi descoberta na Venezuela (CORTES, 1969/1971) onde ocorre às margens do rio Orinoco e alguns de seus afluentes.

No Brasil, devido a carência de dados sobre a frequência das causas de mortalidade em diversos estados, é difícil estimar as perdas por morte dos animais ocasionadas pelas plantas tóxicas. Segundo RIET-CORREA E MEDEIROS (2001) em Rio Grande do Sul e Santa Catarina observou-se a mortalidade anual de bovinos de 5% causada por plantas tóxicas, então para um rebanho de 160 milhões de cabeças, podem ser estimadas entre 800.000 e 1.120.000 de bovinos. Relativo a ovinos, no Rio Grande do Sul, a mortalidade por plantas tóxicas representa 7,2%, assim, para um rebanho de cinco milhões de cabeças podem ser estimadas em 54.000 a 72.000 animais. Existem três fatores principais que desencadeiam perdas econômicas por intoxicação de plantas tóxicas na pecuária: 1) Perdas diretas. São aquelas causadas pelas mortes de animais, diminuição dos índices reprodutivos (abortos, infertilidade, malformações), redução da produtividade nos animais sobreviventes e outras alterações devidas a doenças transitórias, enfermidades subclínicas com diminuição da produção de leite, carne ou lã, e aumento à susceptibilidade a outras doenças devido a depressão imunológica. 2. Perdas indiretas. Os custos de controlar as plantas tóxicas nas pastagens, as medidas de manejo para evitar as intoxicações como a utilização de cercas e o pastoreio alternativo, a redução do valor da forragem devido ao atraso na sua utilização, a redução do valor da terra, a compra de gado para substituir os animais mortos, e os gastos associados ao diagnóstico das intoxicações e ao tratamento dos animais afetados (HARAGUCHI, M. 2003).

Apesar do grande número de espécies tóxicas, as identificadas como causadoras de perdas econômicas importantes são relativamente poucas. Na região Norte, a intoxicação por plantas é a principal causa de mortes em bovinos na Amazônia é determinada por *A. bilabiata* (SPRAGUE) SANDW. nas várzeas do rio Amazonas e seus afluentes, e por *Paulicourea marcgravii* St. Hil, na terra firme. Enquanto essa última planta tem sido extensivamente estudada, em relação a *A. bilabiata* há ainda diversos aspectos a serem estabelecidos.

Extratos de *A. bilabiata* no controle de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*, sp. e *Candida albicans* mostraram-se resistentes com exceção a *C. albicans*, sugerindo uma possível atividade antifúngica.

2.7. Plantas Tóxicas

As plantas tóxicas quando ingerida pelos animais domésticos, sob condições naturais, causa danos à saúde ou até a morte. A toxicidade da planta deve ser comprovada experimentalmente.

Existem diversas crendices no Brasil a respeito de plantas tóxicas, o que pode levar a idéias equivocadas. Um exemplo de conceito equivocado é que lactescência está relacionada à toxicidade. A maioria das plantas tóxicas não é lactescente e a maioria das plantas lactescentes não é tóxica. A planta lactescente mais indicada como causa de mortes em bovinos é a *Oxypetalum banksii* (paininha, cipó-de-leite ou timbó), considerada não tóxica experimentalmente por Tokarnia *et al.* (1967).

A grande maioria das plantas tóxicas tem ação remota, isto é, o princípio tóxico não afeta o tubo digestivo, é absorvido pela mucosa gastrintestinal, e através da circulação-portal, é levado ao fígado. Antes de chegar ao fígado, a microflora ruminal pode modificar a toxicidade do que é ingerido, por processos de degradação ou fixação de toxinas. No fígado, a estrutura da toxina pode sofrer processos de oxidação, redução e desdobramentos, e só então cai na corrente sanguínea geral, alcançando tecidos e órgãos.

Uma crença comum é de que quantidades mínimas de plantas tóxicas seriam suficientes para causar a morte de um animal. Mesmo as plantas mais tóxicas, como *Baccharis coridifolia* (mio-mio) e *P. marcgravii* (erva-de-rato) precisam ser ingeridas em doses de 0,25 e 0,6g por kg de peso animal, respectivamente. Isto é, um bovino de 300 kg tem que comer pelo menos 180 g de folhas erva-de-rato para intoxicar-se, massa equivalente a mais de 150 folhas.

Quando se fala em dose letal, para a maioria das plantas tóxicas, essa dose se refere à quantidade a ser ingerida durante um dia. No caso das plantas cianogênicas, cujo princípio tóxico é absorvido rapidamente, o prazo para ingestão da dose letal é de aproximadamente uma hora. Há ainda, plantas que precisam ser ingeridas durante períodos prolongados para causar efeitos nocivos. *Pteridium aquilinum* (samambaia), por exemplo, para causar quadro de intoxicação aguda, precisa ser ingerida pelos bovinos em doses acima de 10 g/kg por dia, por pelo menos um ano.

As plantas tóxicas causam impactos negativos nos sistemas de produção pecuários, e como há poucos tratamentos recomendados para animais intoxicados, medidas profiláticas são de suma importância. Garantir fornecimento adequado de forragem aos animais ao longo do ano é uma importante medida preventiva. Além disso, investir na cultura forrageira visando maximizar sua produção significa favorecer o capim no processo competitivo com as daninhas, reduzindo o risco de intoxicações.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Biológico

Foram utilizadas folhas de *A. bilabiata*, aparentemente saudáveis coletadas no município de Autazes. Foram coletadas 20 plantas (Figura 01). As coletas foram feitas a partir de tecidos saudáveis de plantas isentas de manchas ou lesões. As amostras vegetais foram coletadas em campo e colocadas em sacos de papel, protegidas do calor e encaminhadas ao laboratório onde foram processadas em menos de doze horas após a coleta.



Figura 01 – Aspecto geral de *Arrabidaea bilabiata* (SPRAGUE) SANDW.

3.2. Meio de Cultura para o Isolamento de Fungos Endofíticos

O meio de cultura utilizado foi: BDA (Extrato de 200g de Batata, 15 g de Dextrose, 15 g de Ágar e água até completar 1000 mL). pH 6,8. Acrescido ao meio Amoxicilina 50 mg/mL.

3.3. Isolamento dos Fungos Endofíticos

As folhas coletadas foram lavadas com detergente líquido em água corrente.

Para a remoção de microrganismos epifíticos foi feita, em câmara asséptica, uma esterilização superficial, segundo PETRINI (1986) e PEREIRA (1993).

1) Colocar os pedaços de folha dentro de um recipiente contendo álcool 70% e, agitar por um minuto para quebrar a tensão superficial.

2) Transferir pedaços para outro recipiente que continha NaOCl 3% (Hipoclorito de Sódio), sob leve agitação, por três minutos para promover a esterilização.

3) Colocar os fragmentos em álcool 70% por mais 30 segundos, para retirar o excesso de NaOCl.

4) Transferir os pedaços de folhas para o recipiente que continha água destilada autoclavada por mais quatro minutos.

Após o processo de esterilização, as folhas foram cortadas em seis fragmentos de 3 - 4 mm e colocados de forma seriada em placas de Petri contendo Meio BDA, acrescido de Amoxicilina 50 mg/mL. Os fragmentos foram dispostos em duas linhas, sendo que cada uma tinha três fragmentos Figura 02. Todas as placas contendo os isolados fúngicos foram identificadas e incubadas a 18°C (GUIMARÃES, 1998).

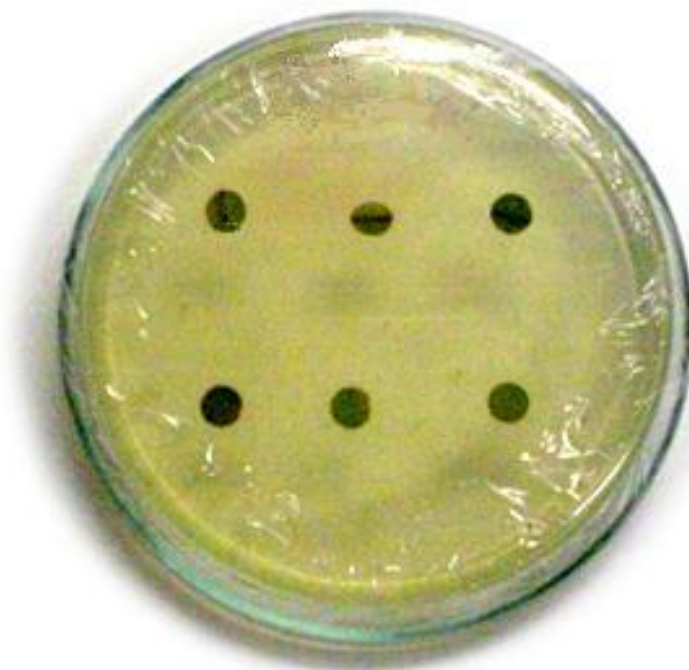


Figura 02 – Disposição dos fragmentos da *Arrabidaea bilabiata* em meio BDA na placa de Petri.

3.4. Identificação dos Endófitos Isolados

A identificação dos isolados foi realizada pela análise de suas estruturas de reprodução assexual e sexual (ELLIS, 1971; BARNETT & HUNTER, 1972; ARX, 1957; PETRINI, 1986; ROSSMAN *et al.*, 1987; DUARTE, 1999). Essas estruturas foram fixadas com Azul de Lactofenol de acordo com as técnicas de coloração (ARX, 1974; PUNITHALINGAM, 1974; SIVANESAM, 1984; VAN DER A. A. 1973) e observados em microscópio óptico. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas (ICB/UFAM).

Após o isolamento das culturas foram obtidas culturas monospóricas por meio de diluição seriada.

Em câmara de fluxo laminar, as estruturas reprodutivas dos fungos foram raspadas com auxílio de uma alça de platina flambada. Preparou-se uma suspensão de conídios em tubos de ensaio contendo 2,5 mL de solução Tween-80 0,1%. Os tubos foram submetidos à agitação, por um minuto, em agitador Vortex e 1 mL da suspensão em Tween-80 foi transferida para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina 0,9%. A nova suspensão foi agitada, por alguns segundos, em agitador Vortex. Foram realizadas quatro diluições seriadas (1:10; 1:100; 1:1000 e 1: 10000).

Foram distribuídos 100 µL, em duplicata, de cada uma das duas últimas diluições em placas de Petri contendo meio BDA. Após a germinação dos esporos, foi transferido, de cada placa, um fragmento do meio BDA contendo uma ponta de hifa produzida a partir da germinação de um único esporo. O fragmento foi transferido para uma nova placa de Petri com meio BDA a qual foi mantida em Câmara Incubadora à 28°C, pelo tempo necessário para o crescimento da colônia.

3.5. Técnica de coloração – Lactofenol

Os fragmentos de endófitos foram corados e fixados em Lactofenol (ONIONS *et al.*, 1981), objetivando a análise em microscópio óptico das características morfológicas apresentadas pelas suas estruturas reprodutivas.

3.6. Técnicas de Armazenamento

Os isolados foram armazenados em água destilada segundo Castelani (1967) e mantido a temperatura ambiente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação dos microrganismos endofíticos

O número total de fungos endofíticos isolados de folhas de *A. bilabiata* coletadas no município de Autazes, após três dias de incubação foi de 112 isolados obtidos de 120 fragmentos inoculados, representando uma frequência de 93,3%.

A completa identificação dos microrganismos endofíticos não é tarefa fácil devido à deficiência de especialistas em taxonomia das diferentes espécies.

Foram identificados até o nível de gênero: *Colletotrichum*, *Guignardia*, e *Xylaria* (Figura 03). Os fungos que não apresentaram estruturas reprodutivas não foram identificados.

Endófitos destes gêneros foram isolados de outras plantas tropicais tais como *Theobroma grandiflorum*, *Pueraria phaseoloides* e *Scleria pterota* (MEDEIROS-GALVÃO, 1998). Similarmente Guimarães, (1998) isolou de *Paulinia cupana* var. *sorbilis* *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Xylaria* entre outros fungos endofíticos. Fungos endofíticos de plantas tóxicas (*Paucicourea marcgravii* e *Strychnos cogens*) foram isolados por Souza *et. al.* (2004) onde foram isolados os gêneros *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Aspergillus* *Phomopsis*, *Glomerella* e *Xylaria* semelhante aos isolados neste trabalho.

Apesar dos representantes dos gêneros *Colletotrichum*, *Guignardia* serem considerados fitopatógenos, estes isolados foram obtidos a partir de plantas sadias sem qualquer doença aparente.

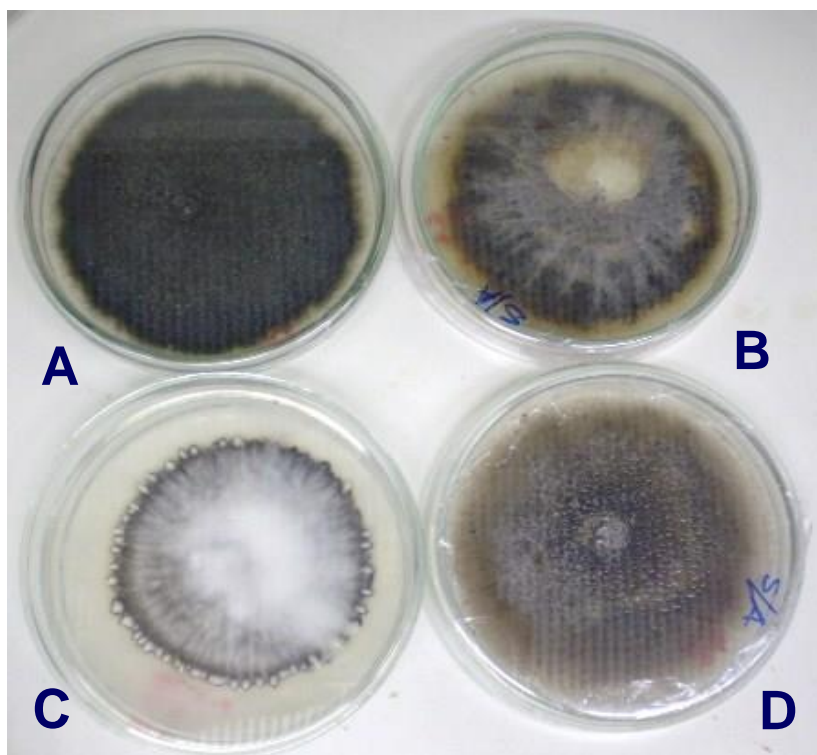


Figura 03 - Colônias Monospóricas. **A)** *Guignardia* sp.; **B)** *Colletotrichum* sp.; **C)** *Xylaria* sp. **D)** *Colletotrichum* sp.

4.2. Índice de Infecção

Foram inoculados 120 fragmentos de folhas de *A. bilabiata*, onde foram isoladas 112 colônias de fungos endofíticos, correspondendo em uma frequência de 93,3% do total dos isolados (Tabela 01). De acordo com o método utilizado para identificação dos endófitos por meio da análise das estruturas macro e microscópicas as estruturas de reprodução sexual e assexual, os gêneros isolados das folhas de *A. bilabiata* foram: *Colletotrichum*, *Guignardia* e *Xylaria* (Figura 04).

Tabela 01 – Quantidade e Índice de Infecção de Fungos Endofíticos Isolados de *A. bilabiata*.

Gêneros	Total de Isolados	Índice de Infecção	Nº de plantas infectadas	% de Plantas Infectadas
<i>Colletotrichum</i>	29	24,1	20	100
<i>Guignardia</i>	22	18,3	15	75
<i>Xylaria</i>	17	14,2	5	25
NI*	44	36,7	20	100
Total	112	93,3		

* Não Identificados

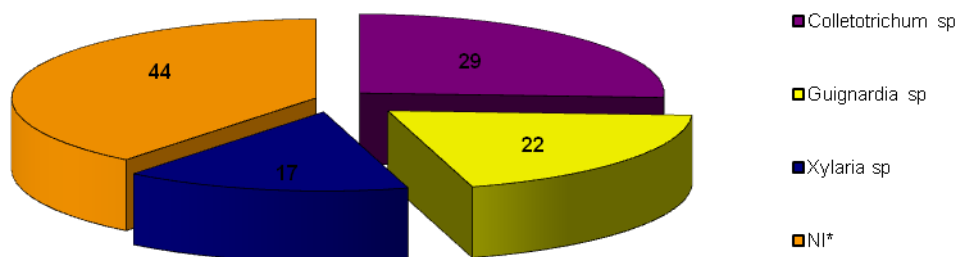


Figura 04 – Porcentagem de Infecção por Endófitos em *A. bilabiata*.

Guimarães (1998), estudando *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (guaranazeiro), em três populações, isolou representantes de quatro gêneros mais frequentes: *Guignardia*, *Phomopsis*, *Glomerella*, e *Xylaria*.

Medeiros-Galvão (1998), ao trabalhar com *Theobroma grandiflorum*, *Pueraria phaseoloides* e *Scleria pterota*, isolou de *T. grandiflorum* a *Guignardia* com 16,3% de infecção. Para *P. phaseoloides* o gênero *Phomopsis* com 12,5% e *Guignardia* com 3,5% de infecção, enquanto que para *S. pterota* a comunidade endofítica também foi representada por *Phomopsis* sp. com 31,5% de infecção.

4.3. O Gênero *Colletotrichum*

O gênero *Colletotrichum*, (anamorfo de *Glomerella cingulata*) apresenta conídios de formato cilíndrico com as extremidades arredondadas, presença de setas longas em alguns acérvulos segundo Holliday, 1980 e Alexopoulos *et. al.* (1996) Apresenta massa conidial com coloração variando de róseo a laranja segundo a descrição de Smith (1990) e Galli (1978) (Figura 05).

Espécies de *Colletotrichum* estão relacionadas à pinta preta e à antracnose do guaraná.



Figura 05- Aspecto Macro Morfológico de *Colletotrichum* sp.

4.4. O Gênero *Guignardia*

O gênero *Guignardia* é a forma pleomórfica de várias espécies de gênero *Phyllostica* e de alguns outros fungos imperfeitos, os quais geralmente são saprófitas ou semiparasitas de folhas. É causador de podridão de videira e causa graves prejuízos à cultura de citrus. (Figura 06).

Espécies do gênero *Guignardia* são citadas como os agentes da podridão da videira e da doença "mancha negra" nas culturas de citros (GLIENKE-BLANCO, 1999), causando grandes perdas econômicas. Diferenças morfológicas neste grupo já haviam sido descritas por Glienke-Blanco (1999) para um período de crescimento de 3-4 semanas e meio de cultura diferente Meio Completo (MC).

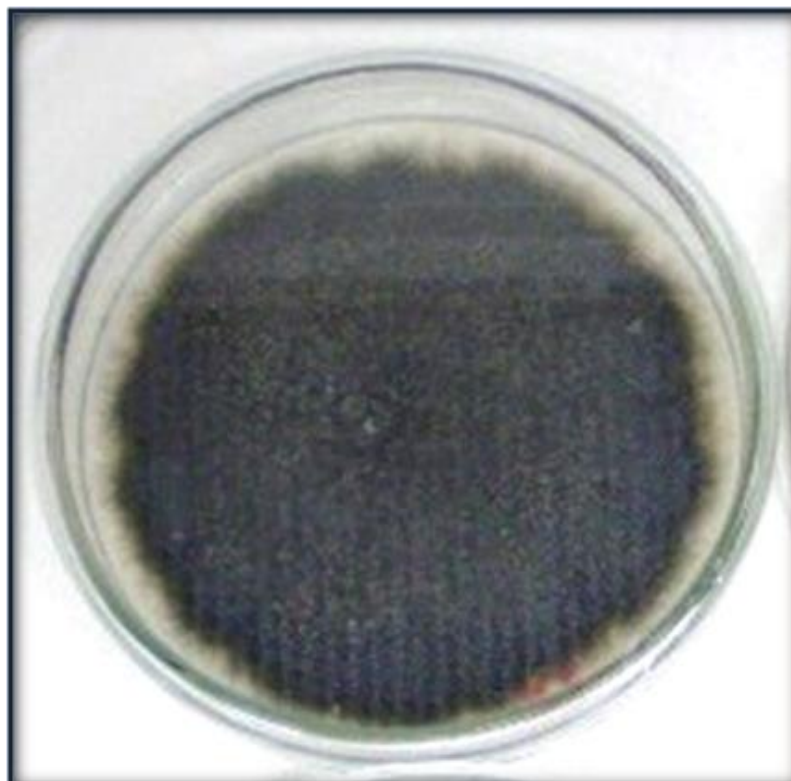


Figura 06- Aspecto Macro Morfológico de *Guignardia* sp.

4.5. O Gênero *Xylaria*

O *Xylaria*, é um fungo sapróbio de madeira, desenvolve seu peritécio embutido num estroma bem desenvolvido, sendo ereto, clavado, ou ramificado. (Figura 07). Causa canchros, em árvores e podridão da madeira (BERGAMIN *et. al.*, 1995; AGRIOS, 1997). É importante para metabólitos secundários, pois em cada dez espécies de *Xylaria* identificadas como endofíticas cerca de oito são produtoras de metabólitos secundários (PEREIRA, 1993).

Espécies de *Xylaria* são naturalmente encontradas em árvores mortas como saprófitas. Espécies de *Xylaria* são isoladas de plantas tropicais com maior frequência que de plantas de clima temperado, sendo capazes de sintetizar celulases e ligninases e podendo atuar como patógenos latentes ou como decompositores.

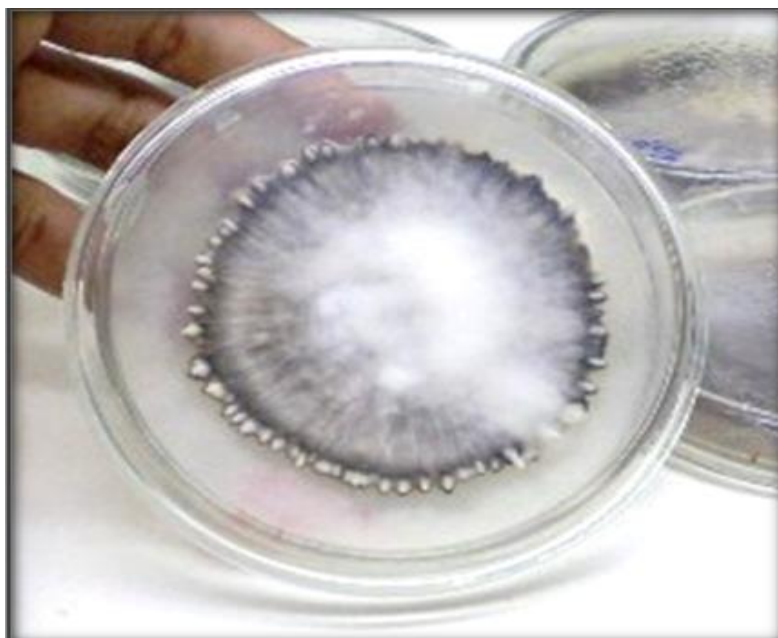


Figura 07 - Aspecto Macro Morfológico de *Xylaria* sp.

Vários estudos comprovam a infecção em diversos hospedeiros vegetais por microrganismos endofíticos.

Rodrigues e Dias-Filho (1996), realizando um levantamento de fungos endofíticos em duas espécies de *Brachiaria*, verificaram que os endófitos mais

frequentes em *B. brizantha* foram *Acremonium* sp., *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium* sp., *Phoma* sp. e, dentre outros. Havendo maior infecção na folha, em ambas as espécies trabalhadas.

Assim, vemos a necessidade de se estudar estes microrganismos endofíticos, habitantes de tantas espécies vegetais, principalmente as tropicais.

5. CONCLUSÃO

- A microbiota fúngica isolada de folhas de plantas adultas de *A. bilabiata* pode ser caracterizada como endofítica, pois as plantas não apresentam nenhum sintoma visual de patogenicidade.

- De acordo com os resultados obtidos neste estudo podemos considerar que *Colletotrichum* sp *Guignardia* sp e *Xylaria* sp foram os endófitos que apresentaram maior índice de infecção em *A. bilabiata*

6. REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. 1997. Plant Pathology. 4^a Ed. Califórnia/U.S.A. :Academy Press, 635p.
- ALEXPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. 1996. Introductory mycology. 40^a ed., John Wiley e Sons Inc. (Ed.), New York, 869p.
- ARAÚJO, W.L. 1996. ***Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de Citros.*** Piracicaba: ESALQ/USP, 91p. Dissertação de Mestrado.
- ARX, J.A. von. 1957. Die arten des Gattung *Colletotrichum* Cda. Phytopathologisch Zeitschrift, Berlin, n. 29, p. 413-468.
- ARX, J.A. von. 1974. The genera of sporulating in pure culture. 2^o ed., J. Cramer, Vaduz, 351p.
- BACON, C.W.; WHITE Jr., J.F. 2000. Microbial endofhytes. New York: Marcel Dekker, 487p.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. 3th ed., Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota, USA, 241p.
- BERGAMIN, A. F. ; KIMATI, H. E AMORIN, L. 1995. Manual de Fitopatologia. 3^a. Ed. São Paulo: Agronômica CERES. v.1, 919p. ; il.
- CORTES, P. R. 1969/1971. Uma etiologia de la borrachera del llano. Revta. Ganagrínco, Caracas, 4(18), 5(19,20,21,22), 6(23,24).
- DUARTE, M.L.R. 1999. Doenças de plantas no trópico úmido brasileiro. In: I. Plantas industriais. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 296p.
- ELLIS, M. B. 1971. Dematiaceous – Hypomycetes. England: CMI. p. 59 – 61.
- FAETH, S.H. 2002. Are endofhytic fungi defensive plant mutualists? Oikos, v. 98, p. 25-36.
- FAHEY, J.W. 1988. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. ACS SYMP. SER in: Biologically Active Natural Products: Potential use Agriculture, Hanover, v. 380, p.120-8.

- GALLI, G. 1978, Manual de Fitopatologia. São Paulo. Ed. CERES. v 1. p. 373.
- GLIENKE-BLANCO, C. 1999. *Guignardia citricarpa* Kiely: **Análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro**. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 200p.
- GOND, S.K.; VERMA, V.C.; KUMAR, A. 2007. Study of endophytic fungal community from different parts of Argle marmelos *Correae* (Rutaceae) from Varanasi (India). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, p. 1371-1375.
- GUIMARÃES, V.C. 1998. **Isolamento de fungos endofíticos do hospedeiro *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke e análise da variabilidade genética, detectada por marcadores RAPD, no endófito *Glomerella cingulata***. São Carlos: Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Genética e Evolução pela Universidade Federal de São Carlos/SP, 123p.
- HALLMANN, J.; SIKORA, R.A. 1996. Toxicity of fungal endofhyte metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, v. 102, p. 155-162.
- HARAGUCHI, M. 2003. Plantas Tóxicas de Interesse na Agropecuária. *Biológico*, São Paulo, v.65, n.1/2, p.37-39, jan./dez.
- HOLLIDAY, P. 1980. *Funfus diseases of tropical crops*. Cambridge: Cambridge University Press, 607p.
- KOGEL, K.H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. 2006. Endophyte or parasite – what decides? *Current Opinion in Plant Biology*, v. 9, p. 358-363.
- MEDEIROS-GALVÃO, R.S., 1998. **Variabilidade Genética Detectada por RAPD em *Glomerella cingulata*, um dos fungos endofíticos mais frequentes, isolados de *Theobroma grandiflorum*, *Pueraria phaseoloides* e *Scleria pterota***. Dissertação de Mestrado, UFSCar/UFAM. Manaus, Amazonas. 151p.
- MURRAY, F.R.; LATCH, G.C.M. & SCOTT, D.B. 1992. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. *Molecular Genetics*, v. 233, 1-9p.
- NALINI, M.S.; MAHESH, B.; TEJESVI, M.V.; PRAKASH, S.H.; SUBBAIAH, V. KINI, K.R.; SHETTY, H. 2005. Fungal endofhytes from the three-leaved caper, *Crataeva magna* (Lour.) D.C. (Capparidaceae). *Mycopathologia*, v. 159, p. 245-249.
- ONIONS, A.H.S.; ALLSOPP, D.; EGGINS, H.O.W. 1981. *Smith's introduction to industrial mycology*. 7ª ed., Edward Arnold, London, 398p.

OSONO, T. 2007. Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*) in British Columbia. *Mycosciense*, v. 48, p. 47-52.

PENNA, E.B. da S. 2000. ***Microrganismos endofíticos em erva-mate (Ilex paraguariensis, ST. HIL.) e variabilidade genética em Phyllosticta sp. por RAPD.*** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 130p.

PEREIRA, J.O. 1993. ***Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais Stylosanthes guianenses e Musa cavendish.*** Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 105p.

PETRINI, O. 1986. Taxonomy of endopfytic fungi of aerial tissues. In: *Microbiology of the Phyllosphere*. FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J. van den (Ed.), Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, p. 175-87.

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

PIMENTEL, I.C.; KUCKKOWSKY, F.R.; CHIME, A.M.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI Jr, A. 2006. Fungos endofíticos em folha de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). *Floresta Curitiba*, v.36, p. 123-128.

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

PUNITHALINGAM, E. 1974 Studies on Shaeropsidales in culture II. *Mycological Papers*, v. 136, p. 1-9.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T. 2001. Intoxicação por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. *Pesq.Vet.Bras.*, v. 21, p.38-42.

RODRIGUES, K. F. E DIAS-FILHO, M. 1996. Fungal endophytes in the Tropical Grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v. 31, n. 12, p. 905-909.

ROSSMAN, A.Y.; PALM, M.E.; SPIELMAN, L.J. 1987. A Literature guide for the identification of plant pathogenic fungi. APS Press, St. Paul, p.252.

RUDGERS, J.A.; KOSLOW, J.; CLAY, K. 2004. Endofhytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. *Ecology Letters*, v. 7, p. 42-51.

SANTAMARIA, J.; BAYMAN, P. 2005. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology*, v. 50, p. 1-8.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research*, v. 109, p. 661-686.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J.L. 2002. *Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. Caxias do Sul:Educs. p.433.

SILVANESAN, A. 1984. The bitunicate Ascomycetes and the anamorphus. *J. Cramer.* , Germany, p. 701.

SMITH, B. J. 1990. Morphological, Cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. *Plant Disease*. St. Paul, 74(1): 69-76.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S. BELÉM-PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham. *Acta Amaz.* vol. 34(2): 185-195.

STAMFORD, T.L.; ARAÚJO, J.M.; STAMFORD, N.P. 1998. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciênc.Tecnol.Aliment.*18(4): 382-385p.

STIERLE, A. STROBEL, G.; STIERLE, D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreane*, an endofhytic fungus of Pacific yew. *Science*, Washington, v. 260, p. 214-216.

STROBEL, G.A.; FORD, E.; LI, J.Y.; SEARS, J.; SIDHU, R.S.; HESS, W.M. 1999. *Seimatoantlerium tepuiense* gen. Nov. an unique endophytic fungus producing taxol from the Venezuelan-Guayana System. *Applied Microbiology*, v. 22, p. 426-433.

STROBEL, G.; DAYSE, B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endofhytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (04): 491-502.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, 18(4): 448-459.

TEJESVI, V.M.; MAHESH, B.; NALINI, M.S.; PRAKASH, H.S.; KIMI, K.R.; SUBBIAH, V.; SHETTY, H.S. 2005. Endofhytic fungal assemblages from inner bark and twig of *Terminalia arjuna* W. & A. (Combretaceae). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 21, p. 1535-1540.

TOKARNIA C. H., CANELLA C.F. & DOBEREINER J. 1967. Experimentos com plantas suspeitas de serem tóxicas realizados em bovinos, que resultaram negativos ou em perturbações leves passageiras. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2:343-351.

TOKARNIA, C.H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P.V. 2000. *Plantas tóxicas do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Helianthus, 310p.

UNTERSEHER, M.; REIHER, A.; FINSTERMEIER, K.; OTTO, P.; MORAWETZ, W. 2007. Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endofhytic fungi in a temperate forest canopy. *Mycological Progress*, v. 6, p. 201-212.

VAN DER A. A. H. A. 1973. Studies in *Phyllosticta* I. *Studies in Mycology*, 5: 1-110.

VUJANOVIC, V.; BRISSON, J. 2002. A comparative study of endofhytic mycobiota in leaves of *Acer saccharum* in eastern North America. *Mycological Progress*, v. 1, p. 147-154.

WANG, J.; LI, G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SU, W. 2000. Taxol from *Tubercularia* sp. Strain TF5, an endofhytic fungus of *Taxus mairei*. *FEMS-Microbiology Letters*, 193:249-253p.