

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

*“Paulinnia cupana var. sorbilis: hospedeiro de fungos endofíticos na
Amazônia”*

Bolsista: Karen Kelly Carvalho de Oliveira, CNPq

MANAUS
2011

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/-B/0019/2010

*“Paulinnia cupana var. sorbilis: hospedeiro de fungos endofíticos na
Amazônia”*

Bolsista: Karen Kelly Carvalho de Oliveira, CNPq
Orientadora: Profª Drª Rozana de Medeiros Souza Galvão
Colaboradores: Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto
Profª Drª Ágata Cristiane Huppert Giancoli

MANAUS
2011

Lista de Figuras

- Figura 1- *Paullinia cupana* - Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas em Manaus (A) e Fazenda Santa Helena em Maués (B), ambos no Estado do Amazonas.....9
- Figura 2- Fungos endofíticos armazenados em tubo criogênico (A) e caixas de armazenamento dos três isolamentos (B).....11
- Figura 3- Variação encontrada no isolamento de endófitos nas folhas de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) em época seca (junho/2010) e chuvosa (novembro/2010), em Manaus.....12
- Figura 4- Variação encontrada no isolamento de endófitos nos pecíolos de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) em época seca (junho/2010) e chuvosa (novembro/2010), em Manaus.....14
- Figura 5- Variação encontrada nas folhas em época seca e chuvosa, em Maués.....15
- Figura 6 - Variação encontrada nos pecíolos em época seca e chuvosa, em Maués.....15

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Locais de coleta e número de indivíduos coletados.....	9
Tabela 2 - Endófitos isolados e frequência nos diferentes tipos de explantes.....	12

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1 Coleta.....	9
3.2 Meio de Cultura.....	10
3.3 Isolamento de fungos endofíticos.....	10
3.4 Purificação dos Endófitos Isolados.....	10
3.5 Identificação dos Fungos Endofíticos.....	11
3.5.1 Técnica de Coloração – Lactofenol.....	11
3.6 Armazenamento das Culturas.....	11
4. RESULTADOS E DISCUSSAO.....	12
4.1 Manaus.....	13
4.1.1 Folha.....	13
4.1.2 Pecíolo.....	13
4.2 Maués.....	14
4.2.1 Folha.....	14
4.2.2 Pecíolo.....	15
4.3 Caracterização macromorfológica.....	16
5. CONCLUSAO.....	19.
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

1. INTRODUÇÃO

Fungos encontrados no interior de tecidos sadios de vegetais superiores são nomeados de endófitos (PETRINI, 1991). Os microrganismos endofíticos, passam pelo menos uma fase de seu ciclo de vida, colonizando o interior de tecidos vegetais sem causar danos aparentes à planta hospedeira. Eles podem ser isolados de tecidos vegetais desinfestados superficialmente e ou do interior da planta (AZEVEDO et al., 2000).

Os fungos endofíticos habitam mais frequentemente o interior de tecidos aéreos de seus hospedeiros, mas também podem ser encontrados nas raízes dos vegetais, que são, aliás, uma das principais portas de entrada dos mesmos. Eles desempenham variadas e estreitas relações ecológicas sem demonstrar sintomas visíveis. Esta particularidade dificulta a avaliação desses microrganismos, havendo então a necessidade de isolar e cultivar os mesmos em laboratório (AZEVEDO, 1998; ARAÚJO et al., 2002).

Os endofíticos são um novo campo de exploração biotecnológica. Schulz et al. (2002) relataram que são produtores de antibióticos; Strobel et al. (1996) relataram a produção de taxol, um poderoso anticancerígeno, por *Pestalotiopsis microspora*. Além disso, o controle biológico também tem sido uma das aplicações dessa microbiota (ARAÚJO et al., 2001). Assim sendo, estudos com fungos endofíticos são de grande importância científica, não somente para o isolamento de moléculas, mas também para o estudo dos aspectos ecológicos e evolutivos entre estes e as plantas.

Nesta pesquisa a planta selecionada para estudo de seus fungos endofíticos foi o guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Martius) Ducke), o qual pertence à família Sapindaceae. Esta é uma planta de grande importância econômica para o Brasil, e apresenta várias aplicações que vão desde o guaraná em pó (utilizado como energizante) até o xarope de guaraná.

O objetivo deste trabalho foi realizar o levantamento da diversidade de fungos endofíticos do guaranazeiro; isolar, purificar e caracterizar os fungos isolados, além de identificá-los por métodos clássicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O guaranazeiro ocorre naturalmente na Amazônia brasileira, na região compreendida entre os Rios Amazonas, Maués, Paraná dos Ramos e o Negro, no

Estado do Amazonas. Ocorre também na Venezuela, na bacia superior do Rio Orinoco (GONDIM et al., 2001).

O guaranazeiro é atualmente cultivado em seis Estados brasileiros (Amazonas, Acre, Bahia, Mato Grosso, Pará e Rondônia), ocupando uma área de aproximadamente 14.000 ha, dos quais, 12.800 ha encontram-se de forma quase equitativa nos Estados da Bahia e do Amazonas. No Estado do Amazonas, a guaranaicultura é praticada em 24 dos 62 municípios, com predominância, em termos de área explorada, nos municípios de Maués, Urucará, Presidente Figueiredo, Iranduba e Nova Olinda do Norte (PEREIRA, 2007).

O gênero *Paullinia* pertence à família Sapindaceae e engloba cerca de 170 espécies, incluindo a *P. cupana*, conhecida popularmente como guaranazeiro. Este tem uma grande procura porque sempre esteve relacionado com suas propriedades e efeitos medicinais, tais como: estimulante, regulador intestinal, antiblenorrágico, sudorífero, tônico cardiovascular, retardador de fadiga e, até mesmo, afrodisíaco (SILVA, 2005).

Há uma variedade de produtos oriundos do guaraná, dentre os quais se destacam refrigerantes gaseificados, extratos fluidos e secos, xarope, guaraná em pó e bebidas energéticas, para os quais existe elevada demanda tanto no mercado nacional quanto internacional (ATROCH, 2001; ATROCH, 2002). E, segundo Bentes (2004), o único produtor de guaraná em escala comercial no mundo é o Brasil.

Porém, esta cultura tem grandes prejuízos econômicos ocasionados pela antracnose, doença causada pelo fungo *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque. Ela ocorre em todas as fases de desenvolvimento da planta. Nas folhas mais jovens, determina deformações e enrolamento da lâmina foliar. Nas adultas, há o crestamento das margens e, em casos mais severos, o secamento total. A incidência aumenta no período de maior umidade, pois a mesma favorece a disseminação e germinação dos esporos. No Amazonas, esse período compreende os meses de fevereiro, março e abril, de chuvas abundantes (ALBUQUERQUE, 1960; DUARTE et al., 1995).

Duarte (1999) citou que no Estado do Amazonas, principalmente no município de Maués, a antracnose do guaranazeiro seja endêmica nas zonas de origem da planta. Epidemias severas foram registradas em 1959, quando se observou o alastramento generalizado da doença naquele município. Segundo o mesmo autor o fator contribuinte para isto foi o estímulo ao monocultivo em áreas extensas e contíguas.

Fungos são organismos eucariontes podendo apresentar um ou mais núcleos por célula. Produzem enzimas que degradam substratos e absorvem os compostos mais simples, e quanto à estrutura celular podem ser unicelulares como as leveduras ou pluricelulares como os fungos filamentosos formando hifas e micélio (BONONI e GRANDI, 1998). Eles exercem um papel de grande relevância nos diferentes ecossistemas que integram.

As interações endófito/planta, ainda não são muito bem compreendidas, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas (neste caso, estudadas pela fitopatologia). Nas interações simbióticas os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta tais como: diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (ARAÚJO, 1996; RODRIGUES e DIAS FILHO, 1996; PEREIRA, 1993).

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 (VOLKSCH et al., 1992; HALLMANN e SIKORA, 1996) e outros.

Um dos meios de aumentar a produção agrícola é o uso de microrganismos promotores de crescimento vegetal. Essa capacidade tem sido atribuída a mecanismos diretos, como a fixação de nitrogênio, produção de fitohormônios e também por mecanismos indiretos, como o antagonismo em relação a microrganismos patogênicos. Isso tudo acaba levando ao aumento na taxa de germinação, crescimento das raízes e parte aérea, número de folhas e flores, área foliar, consequentemente aumentando o rendimento das culturas. Silveira (2001) atribuiu essas características às bactérias, porém resultados promissores têm sido descritos com a utilização de fungos na promoção do crescimento de plantas em várias culturas como o algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) (GASONI e GURFINFEI, 1997), hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) (MUCCIARELLI et al., 2003), milho (*Zea mays* L.) e fumo (*Nicotiana tabacum* L.) (FRANKEN et al., 1998).

Estudos envolvendo fungos endofíticos de fruteiras são poucos no Brasil, tendo sido relatados isolamento de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) (RODRIGUES, 1994), bananeira (*Musa acuminata* Colla) (PEREIRA et al., 1999), coqueiro (*Cocus nucifera* L.) (MARIANO et al., 1997), cajá (*Spondias mombin* L.)

(RODRIGUES e SAMUELS, 1999), pinha e graviola (*Annona* spp.) (SILVA et al., 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta

As plantas selecionadas não apresentavam sintomas de doença. Folhas e ramos foram coletados em dois locais: na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, em Manaus, e em Maués, na Fazenda Santa Helena – AMBEV (American Beverage Company). As coletas foram realizadas da seguinte forma:

Tabela 1 – Locais de coleta e número de indivíduos coletados

Local/Época	Nº de plantas
Manaus/junho, 2010	5
Maués /junho, 2010	5
Manaus/novembro, 2010	5
Maués/março, 2011	5

As amostras foram processadas no Laboratório de Genética de Microrganismos (LaGeM) da Universidade Federal do Amazonas, onde o isolamento foi realizado.



Figura 1 – *Paullinia cupana* - Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas em Manaus (A) e Fazenda Santa Helena em Maués (B), ambos no Estado do Amazonas. (FONTE: Karen Oliveira e José Mendes, 2010)

3.2 Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado para o isolamento foi o Batata-Dextrose-Ágar - BDA (200g de extrato de Batata, 15g de Dextrose e 15g de Ágar, para cada 1000 mL de água destilada– pH 6,8). O meio foi suplementado com os antibióticos cloranfenicol 100 µg/mL e estreptomicina 100 µg/mL.

3.3 Isolamento de fungos endofíticos

Foram isolados fungos endofíticos de 20 (vinte) plantas, aparentemente sadias, de acordo com a metodologia descrita por Pereira et al. (1993).

O material vegetal foi lavado em água corrente com detergente neutro e superficialmente desinfestado pela imersão em álcool 70% por um minuto, imersão em hipoclorito de sódio 3% por três minutos, seguido de lavagem com álcool 70% por 30 segundos e lavagem em água destilada autoclavada por duas vezes, sendo retiradas alíquotas de 100 µL para realizar o controle de assepsia. Após a assepsia, pequenos fragmentos das folhas e pecíolos (8-12 mm) foram cortados assepticamente com bisturi e transferidos, em ordem seriada, para placas de Petri contendo meio de cultura. Foram dispostos sete fragmentos de folha e dez fragmentos de pecíolo por placa, e estas foram incubadas em BOD, a 28 °C (Fig. 4).

As placas foram observadas diariamente e após o crescimento do fungo, pequenos fragmentos de micélio foram repicados para tubos de ensaio, previamente identificados com o número da planta, tipo de explante (folha ou pecíolo) e localidade (Manaus ou Maués). Os tubos foram incubados à temperatura ambiente até esporulação das colônias.

3.4 Purificação dos endófitos isolados

A purificação foi realizada por dois métodos: repiques sucessivos até o crescimento de uma única colônia e pelo método da diluição seriada, que consiste na diluição progressiva da suspensão de esporos do fungo. Foi preparada uma suspensão de esporos em tubo de ensaio contendo 2,5 mL de solução tween 80%. O tubo foi submetido à agitação por determinado tempo e 1 mL desta suspensão foi transferida para tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina 0,9%. Este tubo foi agitado por alguns segundos. Foram realizadas quatro diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-4}). Das diluições 10^{-3} e 10^{-4} , foram plaqueados 100 µL em placa com meio BDA com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram

incubadas a 28 °C por 24 h, quando então foram verificadas, e as colônias crescidas separadamente foram repicadas para uma nova placa com meio BDA.

3.5 Identificação dos Fungos Endofíticos

Para a identificação, os fungos foram crescidos em diferentes meios: BDA, Ágar-água (15 g ágar/L) e aveia-ágar (60 g aveia; 15 g ágar e 0,5 g de extrato de levedura para cada 1000 mL de água destilada).

A identificação dos endófitos foi realizada primeiramente por meio de análises de características macromorfológicas, tais como coloração, textura e formas das colônias. Após a descrição macroscópica, os isolados mesmos foram identificados por meio de observações microscópicas dos microcultivos corados com lactofenol cotoon-blue, observando-se preferencialmente as estruturas vegetativas e reprodutivas assexuais e sexuais seguindo a literatura para identificação (ELLIS, 1971; BARNETT e HUNTER, 1972; ARX, 1957; PETRINI, 1986; ROSSMAN et al., 1987; DUARTE, 1999).

3.5.1 Técnica de Coloração – Lactofenol

Fragmentos de endofíticos 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 Armazenamento das culturas

Os isolados foram armazenados em água destilada segundo Castellani (1967), em duplicata.

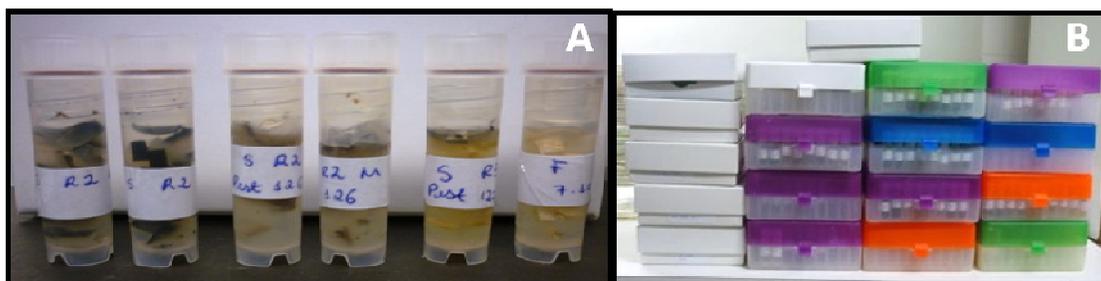


Figura 2 – Fungos endofíticos armazenados em tubo criogênico (A) e caixas de armazenamento dos três isolamentos (B)

4. RESULTADOS E DISCUSSAO

O guaranazeiro alberga fungos endófitos. Das partes investigadas, folhas e pecíolos, foram obtidos 623 isolados. Onde:

Pestalotiopsis spp. – 155 isolados (29,03% folhas e 70,97% ramos);

Colletotrichum spp. – 72 isolados (66,67% folhas e 33,33%);

Guignardia spp. – 52 isolados (88,46% folhas e 11,64% ramos);

Xylaria spp. - 27 isolados (62,96% folhas e 37,04% ramos);

Aspergillus spp. – 2 isolados (50% folhas e 50% ramos);

Penicillium spp. – 3 isolados (33,33% folhas e 66,67% ramos);

Trichoderma spp. – 2 isolados (100% ramos).

Tabela 2 – Endófitos isolados de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) e frequência nos diferentes tipos de explantes

Gêneros	Total de isolados	Nº de isolados da folha	Nº de plantas com o fungo isolado da folha	Nº de isolados do pecíolo	Nº de plantas com o fungo isolado do pecíolo
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	155	45	14	110	16
<i>Colletotrichum</i> spp.	72	48	13	24	6
<i>Guignardia</i> spp.	52	46	12	6	1
<i>Xylaria</i> spp.	27	17	8	10	3
<i>Aspergillus</i> spp.	2	1	3	1	1
<i>Penicillium</i> spp.	3	1	1	2	1
<i>Trichoderma</i> spp.	2	0	0	2	1
Não identificados	310	169	-	141	-
Total	623	327	-	296	-

Observando a Tabela 1 podemos notar algumas particularidades:

- O gênero *Pestalotiopsis* spp. não tem especificidade quanto ao tipo de explante;
- *Colletotrichum* spp. é mais freqüente nas folhas;
- *Guignardia* spp. parece ser específico das folhas;
- *Xylaria* spp. é mais freqüente nas folhas, mas não parece ser específico para tal explante;
- Devido a baixa frequência de isolamento, não podemos afirmar que *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Trichoderma* spp. sejam endófitos do guaranazeiro.

Abaixo os resultados serão mostrados e discutidos por local e por tipo explante.

4.1 Manaus

Foram isolados 143 fungos da época seca (72 das folhas e 63 dos ramos) e 217 da época chuvosa (121 das folhas e 96 dos ramos), totalizando 360 isolados.

4.1.1 Folha

Houve variação no número de plantas de acordo com a época do isolamento em relação aos seis gêneros isolados.

Na figura 3, podemos observar que *Pestalotiopsis* spp. foi isolado de 100% das plantas coletadas em junho, enquanto em novembro ele foi isolado apenas em 40%. *Colletotrichum* spp. apresentou pouca variação, sendo isolado em 80% das plantas em junho e 100% em novembro. Em contrapartida o gênero *Guignardia* spp. foi isolado de 40% em junho, e 100% das plantas em novembro.

Xylaria spp., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. foram isolados somente em junho. Desse modo, ficou evidenciado que em relação a esses sete gêneros, a diversidade foi maior em junho (época seca). Porém, vale lembrar que ainda há um grande n° de isolados não identificados.

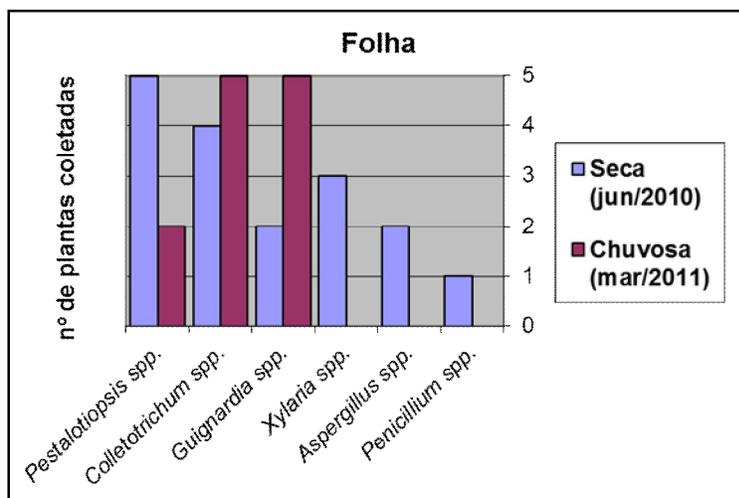


Figura 3 – Variação encontrada no isolamento de endófitos nas folhas de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) em época seca (junho/2010) e chuvosa (novembro/2010), em Manaus

4.1.2 Pecíolo

Como pode ser observado na figura 4, houve maior diversidade no isolamento de novembro. Entre os quatro gêneros isolados dos indivíduos de Maués, dois deles não foram isolados na época seca: *Guignardia* spp. e *Penicillium* spp.

Quanto ao isolamento de *Pestalotiopsis* spp. e *Colletotrichum* spp. não houve grandes variações.

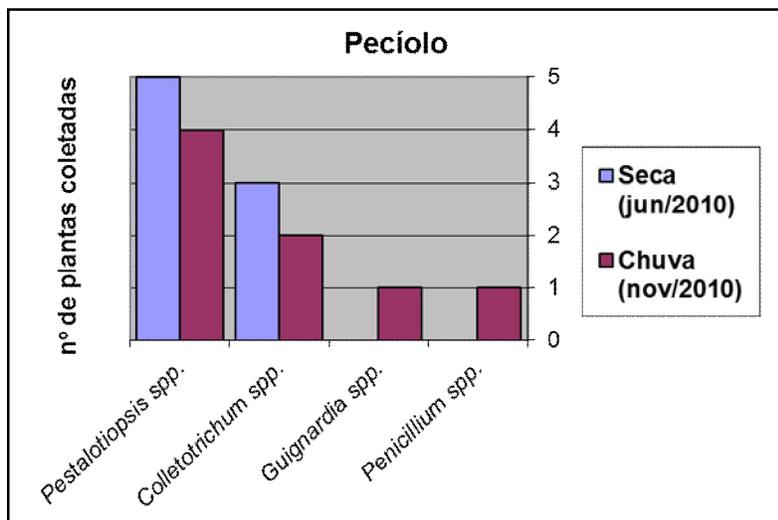


Figura 4- Variação encontrada no isolamento de endófitos nos pecíolos de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) em época seca (junho/2010) e chuvosa (novembro/2010), em Manaus

4.2 Maués

Foram isolados 111 fungos da época seca (52 das folhas e 59 dos ramos) e 152 da época chuvosa (79 das folhas e 73 dos ramos), totalizando 263 isolados.

4.2.1 Folha

Maior diversidade pôde ser observada no isolamento de março de 2011, onde ocorreram cinco, dos sete gêneros detectados no guaranazeiro, enquanto em junho houveram três, conforme figura 5.

Colletotrichum spp. e *Xylaria* spp. foram mais frequentes em época chuvosa, ao contrário de *Pestalotiopsis* spp. que foi mais frequente em época seca, sendo isolado de 100% das plantas.

Guignardia spp. foi isolado de 100% das plantas em época chuvosa, porém este não foi isolado em época seca.

Apesar da baixa frequência, *Aspergillus* spp. foi isolado especificamente na época chuvosa.

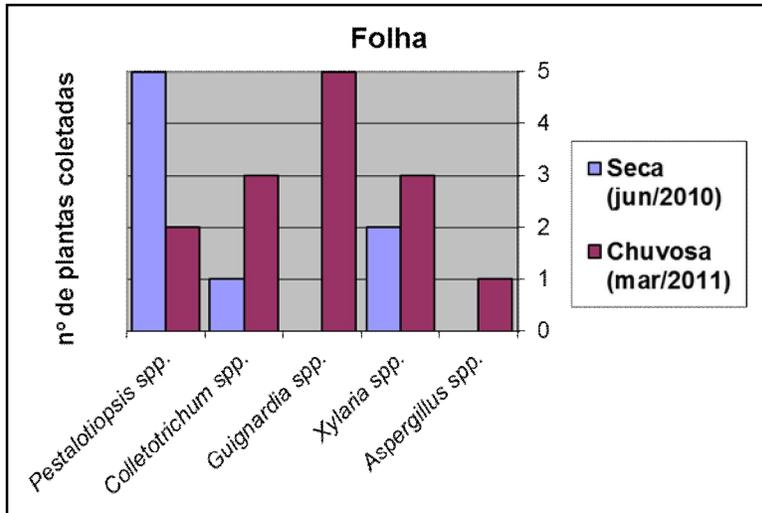


Figura 5 – Variação encontrada nas folhas em época seca e chuvosa, em Maués

4.2.1 Pecíolo

- *Pestalotiopsis* spp. foi isolado de 100% das plantas em época seca e 40% em época chuvosa.
- O gênero *Guignardia* spp. não foi isolado em nenhuma das coletas.
- *Colletotrichum* spp. e *Trichoderma* spp. foram isolados apenas em época seca, enquanto *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. foram isolados somente em época chuvosa.

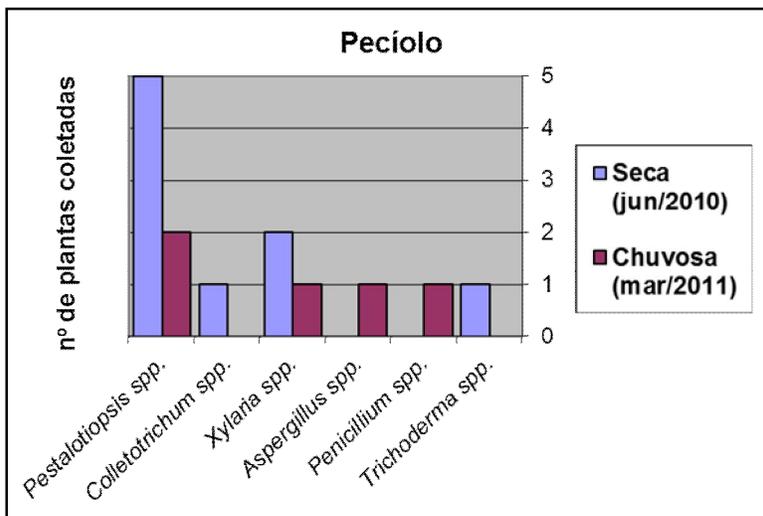


Figura 6 – Variação encontrada nos pecíolos em época seca e chuvosa, em Maués

Os endofíticos são um novo campo de exploração e de descobertas biotecnológicas.

Considerando que seis, em cada vinte antibióticos têm origem fúngica (SCHULZ et al., 2002), a diversidade de fungos é importante pois eles surgem como um enorme potencial na descoberta de novos produtos (PHOTITA et al., 2001; KUMARESAN e SURYANARYANAN, 2001).

O controle biológico tem sido também, uma das aplicações dessa microbiota (ARAÚJO et al., 2001). Nesse contexto a biodiversidade também se faz importante, pois o número de microrganismos patogênicos é grande. Um grande número de fungos precisa ser testado até descoberta de um fungo antagônico a estes microrganismos patogênicos.

4.3 Caracterização macromorfológica

Identificação	Gênero	Características Macromorfológicas
S F1 D	Não identificado	Colônia apresenta coloração amarela e branca (frente e verso), borda irregular e aspecto feltroso e pulverulento nas bordas.
S F2 D	Não identificado	Colônia apresenta coloração branco e bege (frente) e amarelo (verso), borda irregular com aspecto lanoso.
S R1 O	Não identificado	Colônia apresenta coloração branco e rosa claro (frente) e rosa claro (verso), borda circular e aspecto cotonoso.
S R2 E	Não identificado	Colônia apresenta coloração branca com traços pretos (frente) e bege (verso) e aspecto lanoso.
1.A.1 II-3	Não identificado	Colônia apresenta coloração verde, amarela e branco (frente e verso), com borda irregular e aspecto feltroso.
2.A.1 II-1	Não identificado	Colônia apresenta coloração amarela (frente e verso) com pigmento amarelado difuso no meio, além de borda circular e aspecto aveludado.
4.A.1 III-11	Não identificado	Colônia apresenta coloração branca e esclerócios pretos (frente e verso), borda irregular.
5.A.1 IV-4	Não identificado	Colônia apresenta coloração branca, verde e preta (frente) e verde (verso), borda irregular e aspecto feltroso.
S F2 M D	Não identificado	Colônia apresenta coloração preta (frente) e amarela e preta (verso), borda circular e aspecto terroso.
S F3 M D	Não identificado	Colônia apresenta coloração branca e amarela-clara (frente e verso) e aspecto feltroso.
S R3 M U	Não identificado	Colônia apresenta coloração preta e cinza clara (frente e verso), borda irregular e aspecto floculoso.
4.B.2 III-3	Não identificado	Colônia apresenta coloração branca, bege e marrom (frente) e bege a marrom (verso), borda irregular e aspecto feltroso
S R3 M R	Não identificado	Colônia apresenta coloração branca e bege (frente) e marrom e amarela (verso) com pigmento amarelado difuso no meio, além de borda circular e aspecto cotonoso.
1.B.2 I-6	Não identificado	Colônia apresenta coloração branca, amarela e preto

		(frente e verso), borda circular e aspecto feltroso.
2.A.2 I-6	Não identificado	Colônia apresenta coloração branca e cinza escuro (frente) e amarelo, preto e branco, com pigmento de cor amarela difuso no meio, borda irregular e aspecto feltroso e aveludado nas bordas.
3.A.2 I-1	Não identificado	Colônia apresenta coloração branca, amarela e traços de verde escuro (frente) e bege e amarelo (verso), borda irregular e aspecto feltroso.
S R1 M D	<i>Trichoderma</i> spp.	Colônia apresenta coloração branca e verde (frente) e branca (verso), e aspecto feltroso e pulverulento.
S R1 M E	<i>Trichoderma</i> spp.	Colônia apresenta coloração preta, marrom e cinza escuro (frente) e branco (verso) e aspecto pulverulento.
S F5 M K12	<i>Colletotrichum</i> spp.	Colônia apresenta coloração bege e esclerócios e exsudado alaranjados (frente e verso), e aspecto molhado
2.A.2 II-3	<i>Colletotrichum</i> spp.	Colônia apresenta coloração branca (frente e verso) e aspecto aveludado.
2.A.1 I-8	<i>Colletotrichum</i> spp.	Colônia apresenta coloração branca e verde escura (frente), branca e esclerócios pretos, borda circular e aspecto feltroso.
4.A.1 II-4	<i>Colletotrichum</i> spp.	Colônia apresenta coloração preta e branca com esclerócios e exsudado alaranjados (frente e verso), borda irregular e aspecto feltroso.
2.A.1 I-14	<i>Colletotrichum</i> spp.	Colônia apresenta coloração cinza claro, cinza escuro, branca (frente) e preta e cinza (verso), borda circular e aspecto cotonoso.
3.A.1 II-4	<i>Colletotrichum</i> spp.	Colônia apresenta coloração cinza, branco, esclerócios pretos e exsudado laranja (frente) e preto, cinza e branco (verso), borda irregular e aspecto aveludado.
3.A.1 IV-3	<i>Colletotrichum</i> spp.	Colônia apresenta coloração branco e cinza com esclerócios preto e exsudado laranja (frente) e preto e branco (verso) e aspecto aveludado.
5.A.1 III-5	<i>Colletotrichum</i> spp.	Colônia apresenta coloração branca, com traços laranja e cinza (frente) e branco, laranja (verso) e aspecto aveludado
3.B.1 II-1	<i>Colletotrichum</i> spp.	Colônia apresenta coloração preta e branca (frente e verso), borda circular e aspecto cotonoso.
3.B.1 II-5	<i>Colletotrichum</i> spp.	Colônia apresenta coloração branca com traços cinza-escuro (frente e verso), borda irregular e aspecto cotonoso.
4.B.1 II-7	<i>Colletotrichum</i> spp.	Colônia apresenta coloração preta com traços brancos com exsudado alaranjado (frente) e preta (verso), borda circular e aspecto cotonoso.
4.B.1 IV-5	<i>Colletotrichum</i> spp.	Colônia apresenta coloração cinza escuro e cinza claro e exsudado laranja (frente e verso) e aspecto cotonoso.
2.A.2 II-3	<i>Colletotrichum</i> spp.	Colônia apresenta coloração branca (frente e verso) e aspecto aveludado.
5.A.2 I-6	<i>Colletotrichum</i> spp.	Colônia apresenta coloração branca com esclerócios pretos (frente e verso), com borda irregular e aspecto feltroso.
1.A.2 III-1	<i>Colletotrichum</i> spp.	Colônia apresenta coloração cinza claro, cinza escuro, branca (frente) e preto (verso), com borda irregular e aspecto floculoso.
S F1 C	<i>Xylaria</i> spp.	Colônia apresenta coloração branca, marrom (frente e verso), borda irregular e aspecto cotonoso.

1.A.2 I-2	<i>Xylaria</i> spp.	Colônia apresenta coloração branca e cinza (frente) e marrom (verso), borda irregular e aspecto floculoso.
5.A.2 I-4	<i>Xylaria</i> spp.	Colônia apresenta coloração branca e cinza (frente) e preta, branca e amarela (verso), com pigmento amarelado difuso no meio, com borda irregular e aspecto floculoso.
2.A.2 III-3	<i>Xylaria</i> spp.	Colônia apresenta coloração cinza, branco, verde musgo nas bordas (frente) e preto (verso), borda irregular e aspecto floculoso.
1.A.2 III-4	<i>Xylaria</i> spp.	Colônia apresenta coloração branca e preta (frente e verso) com corpos de frutificação brancos, bordas irregulares e aspecto floculoso.
2.A.2 IV-1	<i>Xylaria</i> spp.	Colônia apresenta coloração branca e cinza (frente) e preto e amarelo (verso), bordas irregulares e aspecto floculoso.
2.B.2 I-2	<i>Xylaria</i> spp.	Colônia apresenta coloração branca e cinza (frente) e preto e amarelo (verso), bordas irregulares e aspecto floculoso.
2.B.2 III-14	<i>Xylaria</i> spp.	Colônia apresenta coloração branca e cinza (frente) e preto e amarelo (verso), bordas irregulares e aspecto floculoso.
1.B.1 I-5	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	Colônia apresenta coloração branca (frente e verso), borda irregular e aspecto cotonoso.
4.B.1 III-2	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	Colônia apresenta coloração branca com esclerócios de cor preta (frente) e amarelo e preto (verso) com pigmento amarelado difuso no meio e aspecto feltroso.
1.B.1 I-2	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	Colônia apresenta coloração branca e preto com formação de setores (frente e verso), com borda circular e aspecto cotonoso e pulverulento.
1.B.1 I-4	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	Colônia apresenta coloração branca (frente e verso) com esclerócios pretos, com borda circular e aspecto cotonoso e pulverulento.
1.B.1 IV-1	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	Colônia apresenta coloração branca e preta com formação de setores (frente e verso), com borda circular e aspecto cotonoso e pulverulento.
F1 H	<i>Aspergillus</i> spp.	Colônia apresenta coloração preta (frente e verso), borda irregular e aspecto pulverulento.
3.A.2 III-2	<i>Aspergillus</i> spp.	Colônia apresenta coloração amarela (frente) e salmão (verso), borda irregular e aspecto pulverulento.
1.B.1 IV-3	<i>Penicillium</i> spp.	Colônia apresenta coloração verde escura com bordas brancas (frente) e amarelo (verso), com bordas irregulares e aspecto pulverulento.
3.A.1 I-9	<i>Guignardia</i> spp.	Colônia apresenta coloração preta (frente e verso), com esclerócios brancos (somente na superfície), bordas irregulares e aspecto terroso.
3.A.1 IV-10	<i>Guignardia</i> spp.	Colônia apresenta coloração preta (frente e verso) com esclerócios brancos (somente na superfície), com borda irregular e aspecto terroso.

5. CONCLUSÃO

Pôde ser observado que há diferença na quantidade e diversidade de isolados, considerando-se os explantes folhas e pecíolos.

Em relação ao isolamento realizado em junho, houve uma maior diversidade de gêneros identificados quando comparado aos isolamentos de novembro/2010 e março/2011. Porém, devido à quantidade de fungos não-identificados nestes dois isolamentos não é possível afirmar que, de fato, a época seca apresenta maior diversidade.

Os resultados obtidos com os sete gêneros podem servir de base para estudos posteriores destes endófitos. Isso graças à informação quanto à época, explante e localidade de cada gênero.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque, F.C. Antracnose do guaraná. Belém: Boletim técnico do Instituto Agrônômico do Norte. p.1-33, 1960.

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

Araújo, W. L. et al. Variability and interactions between endophytic Bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.

Araújo, W.L et al. Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: CalQ, p 86, 2002.

Arx, J.A. von. The genera of sporulating in pure culture. 2nd ed., J. Cramer, Vaduz, p. 351, 1974

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

Atroch, A.L. Aspectos gerais da cultura do guaraná. *Foods and food ingredients Journal of Japan*, n.204, p.53-59, 2002

Azevedo, J.L. 1998. Microrganismos endofíticos. Pp. 117-137. In: I.S. Melo & J.L. Azevedo (eds.). *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna, Embrapa-CNPMA.

Azevedo, J.L.; Maccheroni JR. W.; Pereira, J.O.; Araújo, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Eletronic. Journal Biotechnology* [online]. April 15th.

(<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue1/full/4/index.html>). ISSN 0717-3458. 2000.

Barnett, H. L.; Hunter, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. 3° ed., Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota, U. S.A. p. 241, 1972.

Bentes, J.L.S.; Barreto, R.W. Reavaliação taxonômica de *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque agente causal da antracnose do guaranazeiro. Acta Amazônica. 34(1): 129-131, 2004.

Bononi, V.L. R.; Grandi, R. A. P. In: BONONI, V.L. R (Org). Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. Instituto de botânica, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo p.13-5, 1998.

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

Duarte, M.L.R. Doenças de plantas do trópico úmido brasileiro e plantas industriais. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 1999.

Ellis, B. M. Dematiaceous hyphomycetes. Surrey, Commonwealth Mycological Institute, Kew, p. 608, 1971.

Fahey, J. W. Endophytic Bacteria for the Delivery of Agrochemicals to Plants. In: Cutler, H. O. (Ed.) Biologically Active Natural Products. Potential Use in Agriculture. American Chemical Society Symposium Ser, Washington. p.120-128, 1988.

Franken, P.; Butehorn, B.; Varma, A. *Piriformospora indica*, a cultivable root cell-infecting fungus promotes the growth of a broad range of plant species. In: International Conference on Mycorrhiza. 2, Swenden. 1998.

Gasoni, L. & Gurfinkel, B.S. The endophyte *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton roots: phosphorus uptake and host growth. Mycological Research 101(7): 867-870, 1997.

Gondim, T.M.S.; Amaral, E.F.; Araújo, E.A. Aptidão para o cultivo do guaranazeiro no Estado do Acre. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Comunicado técnico. Rio Branco. 2001.

Hallmann, J.; Sikora, R.A. Toxicity of Fungal Endophyte Secondary Metabolites to Plant Parasitic Nematodes and Soil-Borne Plant Pathogenic Fungi. European Journal of Plant Pathology, 102: 155-162. 1996.

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

Mariano, R.L.R et al. Levantamento de fungos endofíticos e epifíticos em folhas de coqueiro no Nordeste do Brasil. I. Frequência da população fúngica e efeito da hospedeira. Agrotópica 9(3): 127-134. 1997.

Mucciarelli, M. et al. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. New Phytologist 158: 579-591. 2003.

Murray, F.R.; Latch, G.C. M.; Scott, D.B. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. Molecular General Genetics, 233: 1-9. 1992.

- Onions, A.H.S.: Allsopp, D.; Eggins, H.O.W. Smith's introduction to industrial mycology. 7a ed., Edward Arnold, London, p. 398, 1981.
- Pereira, J.O., Azevedo, J.L.; Petrini, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: 1993 A first report. *Mycologia*, v. 85, p. 362 – 364, 1993.
- Pereira, J.O.; Carneiro-Vieira, M.L.; Azevedo, J.L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15: 37-40. 1999.
- Pereira, J.C.R. Pesquisa com guaranazeiro na EMBRAPA Amazônia Ocidental: status atual e perspectivas. Manaus: EMBRAPA Amazônia Ocidental, p. 246, 2007.
- Petrini, L.E.; Müller, E. Haupt-und Nebenfruchtformen Europaischer Hypoxylon-Arten (Xylariaceae, Sphaeriales) und verwandter Pilze. *Mycologia*. 1986.
- Petrini, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.H. & HIRANO, S. (eds.) *Microbial ecology of leaves*. Springer-Verlag, New York, p.179-97, 1991.
- Photita, W.; Lumyong, S.; Lumyong, P.; Hyde, D. Endophyte fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycology Research*, v. 105, n. 12 p. 1508-1513, 2001.
- Rodrigues, K.F. The foliar endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia* 86 (3): 376-385. 1994.
- Rodrigues, K.F.; Dias-Filho, M.B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. *Pesq. Agropec. Bras*, 31(12): 905-909. 1996.
- Rodrigues, K.F.; Samuels, G.J. Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. *Journal of Basic Microbiology* 39(2): 131-135. 1999.
- Rossmann, A. Y.; Palm, M. E.; Ppielman, L. J. A Literature guide for the identification of plant pathogenic fungi. APS Press, St. Paul, p. 252, 1987.
- Schulz, B. et al. Endophyte fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.
- Silva, S.; Tassara, H. *Frutas Brasil Frutas*. 1ª ed. São Paulo: Empresa de Artes, 2005.
- Silva, R.L.O. et al. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). *Acta bot. bras.* 20(3): 649-655. 2006.
- Silveira, E.B. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: R. Barros & S.J. Michereff. *Proteção de plantas na agricultura sustentável*. Recife, Imprensa Universitária da UFRPE. p. 71-100, 2001.
- Strobel, G. et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*, 142, 435-440. 1996
- Volksch, B.; Ullrich, M.; Fritsche, W. Identification and population dynamics of bacteria in leaf spots of soybean. *Microbial Ecology*, 24: 305-311. 1992.