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

IDENTIFICAÇÃO DE ENDÓFITOS DA PLANTA MEDICINAL SACACA (*Croton cajucara* BENTH) EUPHORBIACEA

Bolsista: Márcia Soares Sobreira, CNPq

MANAUS
2009

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

RELATÓRIO FINAL
PIB – B/0036/2008

IDENTIFICAÇÃO DE ENDÓFITOS DA PLANTA MEDICINAL SACACA (*Croton cajucara* BENTH) EUPHORBIACEA

Bolsista: Márcia Soares Sobreira, CNPq
Orientadora: Profª Drª Rozana de Medeiros Souza Galvão
Colaboradores: Prof. Dr. José Odair Pereira
Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto

MANAUS
2009

Identificação de Endófitos na Planta Medicinal Sacaca (*Croton cajucara* Benth).

Márcia Soares Sobreira (Bolsista PIBIC)
Rozana de Medeiros Sousa Galvão (Orientadora)
José Odair Pereira (Colaborador)
Pedro de Queiroz Costa Neto (Colaborador)
Aline Christien. Rondon (Colaborador)
Maria Cecília de Carvalho Chaves (Colaborador)

Resumo

Endófitos são aqueles microrganismos residentes no interior do tecido vegetal, não causando dano ao seu hospedeiro. A sacaca (*Croton cajucara* Benth.) é uma planta popularmente conhecida por suas propriedades medicinais, sendo usada em larga escala tanto nas zonas rurais quanto urbanas. Com intuito de investigar as propriedades farmacológicas desta planta, foi realizado um levantamento bibliográfico sobre seus principais usos, cujas amostras de folhas, galhos e cascas foram coletadas em dois municípios – Manaus e Iranduba, em duas épocas do ano – seca e chuvosa. Este trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização de fungos endofíticos de *Croton cajucara* Benth. As amostras foram inoculadas em meio BDA (Batata – Dextrose – Agar) para isolamento dos microrganismos. De três coletas realizadas em diferentes locais, foram isolados 226 microrganismos de cinco gêneros diferentes, sendo: 130 (57,52%) das folhas, 64 (28,31%) dos galhos e 32 (14,15%) da casca. Estes isolados foram inicialmente agrupados de acordo com as suas características morfológicas e posteriormente caracterizados do ponto de vista citológico (morfologia dos conídios, conidióforos e hifas) e identificados a nível de gênero em: *Colletotrichum,* o qual foi o gênero mais frequente, seguido de *Guignardia, Ceratocystis*, *Botryosphaeria* e *Xylaria.*

Palavras chave: endófitos, sacaca, *Croton cajucara* Benth., plantas medicinais.

Sumário

1 INTRODUÇÃO..... **05**

2 REVISÃO DE LITERATURA..... **07**

3 MATERIAL E MÉTODOS..... **09**

3.1 **Material Biológico**..... **09**

3.2 **Local de Coleta**..... **09**

3.3 **Meio de Cultura**..... **10**

3.4 **Isolamento de Fungos Endofíticos**..... **10**

3.5 **Identificação de Fungos Endofíticos**..... **11**

3.5.1 **Técnica de Coloração - Lactofenol**..... **11**

3.5.2 **Obtenção de culturas monospóricas**..... **12**

3.6 **Técnicas de Armazenamento**..... **12**

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... **13**

4.1 **Índice de infecção dos principais gêneros identificados**..... **14**

4.2 **Índice de infecção nos explantes analisados**..... **18**

4.3 **Armazenamento dos fungos isolados da sacaca**..... **19**

5. CONCLUSÃO..... **20**

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... **22**

1. INTRODUÇÃO

Fungos encontrados no interior de tecidos sadios de vegetais superiores são nomeados de endófitos (PETRINI, 1991). São diferentes dos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais. Endofítos podem ser encontrados não apenas nas partes aéreas dos vegetais, mas inclusive em raízes, que são, aliás, uma das principais portas de entrada, compreendendo um nicho e complexo ecológico distinto de parasitas obrigatórios e saprófitas. Foram encontrados em plantas de todas em espécies examinadas até hoje (ARNOLD, 2000).

Os microrganismos habitam a Terra há mais de 4 bilhões de anos, porém menos de 5% são conhecidos, e suas possibilidades de aproveitamento em processos biotecnológicos são pouco conhecidas (MELO, 2002). Os fungos endofíticos foram descritos pela primeira vez na segunda metade do século XIX, sendo devidamente pesquisado a partir da década de 70 do século XX (AZEVEDO, 2002).

A ocorrência dos endófitos nas plantas é assintomática, sem causar doenças e sem produzir estruturas externas visíveis (AZEVEDO, 2000). Para estudá-los é necessário a desinfestação da superfície do tecido vegetal aparentemente sadio e isolar o microrganismo em laboratório (HALLMANN, 1997). A interação endófito-hospedeiro ainda não é muito bem definida, pois a fisiologia dos microrganismos endofiticos não é bem conhecida. Porém, esta relação vem despertando o interesse de diversas áreas da ciência, possibilitando a descoberta de produtos e processos biotecnológicos vantajosos para o homem e o meio ambiente.

Nesta pesquisa, a planta selecionada para estudo de seus fungos endofíticos foi *Croton cajucara* Benth, a sacaca, que é uma planta medicinal tradicionalmente conhecida, de porte arbustivo, pertencente a família Euphorbiacea. O chá, preparado a partir de folhas ou cascas, tem sido empregado para alívio de problemas do fígado e intestino, sendo também usado contra diabetes e na redução do colesterol. Além de ser utilizada como fitoterápico, produz um óleo denominado linalol, componente majoritário, correspondendo a 41%, que poderá ser um substituto ou complementar do óleo originário do pau-rosa (SOUSA, 2003; ABRANTES, 2006).

Portanto, esse trabalho tem como objetivo detectar a ocorrência de fungos endofíticos na sacaca, e com isso identificar em nível de gênero os isolados mais freqüentes, através de suas estruturas de reprodução, comparando a comunidade endofitica das folhas, galhos e cascas. E verificar se há diferenças entre comunidade endofiticas de áreas coletadas e de sazonalidade (período chuvoso e não-chuvoso).

2. REVISÃO DE LITERATURA

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

Microrganismos endofíticos são aqueles que vivem no interior de plantas, habitando, de modo geral, suas partes aéreas como caules e folhas, sem causar, aparentemente, qualquer dano aos seus hospedeiros, distinguindo-se dos patogênicos, que são causadores de doenças e dos epifíticos, que vivem sobre a superfície do tecido. Essa distinção é de natureza apenas didática, já que um endófito pode se tornar um patógeno dependendo das condições do ambiente ou do equilíbrio com outros microrganismos endofiticos (PEIXOTO-NETO, 2002).

Plantas e endófitos possuem uma relação bastante intensa, já que eles podem não apenas ser mediadores da relação da planta com seus competidores, herbívoros e patógenos (CLAY E HOLAH, 1999), como também controlar a estrutura da cadeia alimentar interrompendo a transferência de energia para plantas de maior nível trófico (OMACINI, 2001).

Uma das atuações dos endófitos é conferir resistência à planta contra herbívoria, podendo ser por meio de dois mecanismos: 1) estímulo direto do vigor da planta e 2) produção de metabólitos que aumentam a resistência à herbívora (CLAY *et al*., 1993). Os endófitos colonizam a planta como um todo e o hospedeiro recebe proteção contra herbivoria, pela produção de toxinas e alcalóides produzidos por esses endófitos. Atuam também como agente biológico, por exemplo, ao colonizarem um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos permitem seu uso como agentes de controle biológico. Nesta forma, o endófito não atua diretamente sobre o patógeno, mas induz uma resposta na planta que leva a uma resistência sistêmica (SALERMO*,* 2000).

Microrganismos endofiticos promovem o crescimento vegetal pela síntese de fitormônios, fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fosfato

(PEIXOTO-NETO *et al.*, 2002). WHITE Jr *et. al*., (2002), acreditam que fungos produtores de hormônios de crescimento vegetal o fazem para modificar a fisiologia e estrutura da planta, visando a extração de nutrientes para si.

Plantas medicinais são habitadas por microrganismos endofíticos, sugerindo que a ação antibacteriana ou antifúngica poderia estar no endófito e não na planta, ou provavelmente na sua interação. No Brasil vários autores mostraram a produção de fármacos por endófitos como *Xylaria* sp., *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp. e também *Phomopsis* sp (GOMES, 2008).

Croton cajucara Benth (sacaca), pertencente à família Euphorbiaceae, é uma planta aromática e medicinal muito conhecida por suas propriedades farmacológicas, é também denominada popularmente de casca-sacaca, muirá-sacaca, caá-juçara e cajuçara. São utilizadas pela população a casca e as folhas, na forma de infuso, óleo, cápsulas, pílulas e extratos, e muitas vezes também são usadas as raízes. A sacaca apresenta indicações terapêuticas principalmente para diabetes, distúrbios hepáticos e renais, perdas ponderais, como hipoglicemiante, controle da colesterolemia, antiinflamatório, antimicrobiano entre outras. Também apresentada como uma alternativa na extração do linalol, óleo essencial para a fixação de perfumes, que antigamente era extraído do pau-rosa de forma predatória, já que era necessário derrubar a arvore para extrair o óleo, e na sacaca este óleo esta presente nas folhas, alternativa ecologicamente correta.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Biológico

Foram utilizados folhas, galhos e cascas da sacaca, aparentemente jovens e sadios.

As amostras foram lavadas superficialmente, em água corrente, com uma esponja virgem e um pouco de detergente. Os melhores fragmentos foram selecionados para o isolamento. Essas foram coletadas em campo e colocadas em sacos de papel, protegidas do calor e encaminhadas ao laboratório onde foram processadas em menos de 12 horas após a coleta.

Figura 1 - Croton cajucara Benth -Universidade Federal do Amazonas – Zona Sul (Foto: Márcia Sobreira)

3.2 Local de Coleta

Coletados em Manaus, em diferentes localidades – Conjunto Eldorado e Campus Universitário Zona Sul - e épocas – de agosto a dezembro e no município de Iranduba.

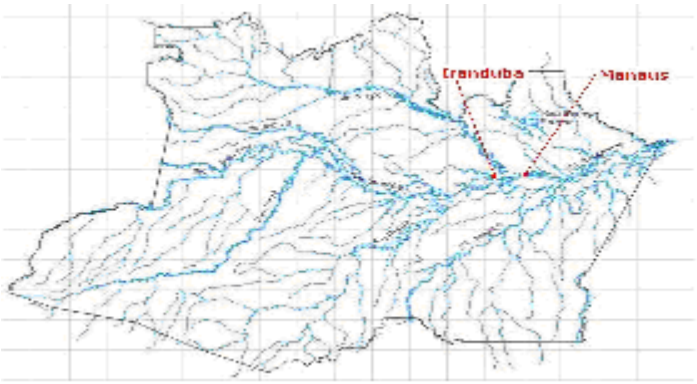

Figura 2 - Mapa da localização dos Municípios de Manaus e Iranduba no Estado do Amazonas.

3.3 Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado foi o BDA (200g de extrato de Batata, 15g de Dextrose e 15g de Agar – pH 6,8). É adicionado água até completar 1000mL. Acrescido ao meio Terramicina 50mg/mL.

3.4 Isolamento de fungos endofíticos

Utilizou-se a sacaca como planta hospedeira para verificação da diversidade de fungos endofíticos encontradas em seus tecidos. Foram inoculados, em meios de cultivo para isolamento de fungos, seis fragmentos de cada explante das plantas.

Foram isolados fungos endofíticos de duas plantas, aparentemente sadias, de acordo com a metodologia descrita por Petrini; Muller (1986) e Pereira (1993). As folhas e os galhos foram lavados em água corrente com detergente e superficialmente desinfestados pela imersão em etanol 70% por um minuto, imersão em NaOCl 3% por três minutos, posterior lavagem com etanol 70% por 30 segundos e por mais três minutos em água destilada autoclavada. As cascas passaram apenas pelo processo de desinfestação.

Após a desinfestação externa, foram cortados assepticamente em fragmentos (5-7 mm) e estes transferidos, em ordem seriada, para placas de Petri contendo BDA, acrescido de Terramicina (50 µg/µL). Seis fragmentos foram dispostos em cada placa de Petri. Todas as placas foram incubadas a 18°C (GUIMARÃES, 1998), em ausência de luz. Foi inoculado 100µL da água

destilada autoclavada, em BDA e incubado a 18 °C, para comprovação da desinfestação superficial.

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 e localização do fragmento disposto na placa, para obtenção da freqüência de infecção. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente até esporulação das colônias. Para estimular a esporulação, as colônias foram submetidas à fotoperíodo de 12 horas sob luz fluorescente.

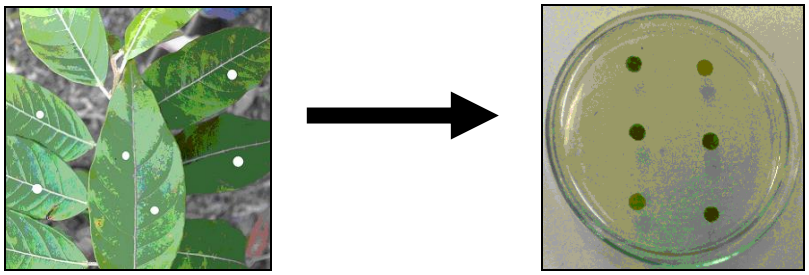

Figura 3 - Esquema de inoculação.

3.5 Identificação dos Fungos Endofíticos

A identificação destes endófitos foi realizada primeiramente por meio de análises de características macro morfológicas, como coloração, textura e formas de estruturas observadas. Após a discriminação macroscópica dos isolados, os mesmos foram identificados por meio de análises microscópicas.

A identificação dos isolados foi realizada pela análise de suas estruturas de reprodução sexual e assexual (Ellis, 1971; Barnett e Hunter, 1972; Arx, 1974; Petrini, 1986; Rossman *et al*., 1987).

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.

3.5.2 Obtenção de culturas monospóricas

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; 1:10.000).

Foram distribuídos em 100µL, em duplicata, de cada uma das duas últimas diluições em placa 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 28ºC, pelo tempo necessário para o crescimento da colônia.

3.6 Técnicas de armazenamento

Os isolados foram armazenados em água destilada segundo Castelani (1967).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de 288 fragmentos de três explantes de sacaca, coletados nas duas épocas, houve crescimento de fungos endofíticos em 179 fragmentos, isolando-se 226 colônias, mostrando que houve crescimento de mais de um fungo endofítico num mesmo fragmento. Isto resultou em uma frequência de 62,15% do total de isolados.

Em contrapartida 109 fragmentos não apresentaram qualquer sinal de infecção por fungos, ou foram contaminados por bactérias, estas se mostrando resistentes ao antibiótico. Em todos os tipos de explantes (casca, folhas e galhos) do hospedeiro foram detectados fungos endofíticos.

Identificaram-se os seguintes gêneros: *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Ceratocystis, Xylaria* e *Botryosphaeria*. Além destes gêneros, em alguns isolados não foi possível a identificação e em outros não se observou a presença de estruturas reprodutivas.

Tabela 1 – Quantidade e índice de infecção de fungos endofíticos isolados da planta medicinal sacaca.

Gêneros Identificados	Total de Isolados	Nº. de Fragmentos Infectados	% de Infecção	Nº. de Plantas com o fungo	% de Plantas Infectadas
Colletotrichum sp.	72	61	21,18	3	100
Guignardia sp.	46	34	11,81	3	100
Ceratocystis sp.	23	19	6,59	3	100
Botryosphaeria sp.	20	13	4,51	2	66,67
Xylaria sp.	12	12	4,18	1	33,33
GNI*	23	18	6,25	3	100
GSE*	30	22	7,63	3	100
Total	**226**	**179**	**62,15**		

*GNI = endófitos não identificados. *GSE = endófitos sem esporos.

O endófito isolado em maior freqüência no hospedeiro foi *Colletotrichum sp*. Os quatros gêneros de fungos endofíticos mais frequentes isolados da

planta medicinal *Croton cajucara* Benth. estão na Figura 4. O maior índice de infecção foi apresentado pelo gênero *Colletotrichum* (21,18), seguido por *Guignardia* (11,81), *Ceratocystis* (6,59) e *Botryosphaeria* (4,51). Os 18,06% restantes ficaram distribuídos entre o fungo menos frequente, os que não foram identificados (GNI) e aqueles que não apresentaram estruturas reprodutivas (GSE). Pereira *et al.* (1993) afirmaram que o gênero representantes de *Colletotrichum* é usualmente frequente em hospedeiros tropicais.

4.1 Índice de infecção dos principais gêneros identificados

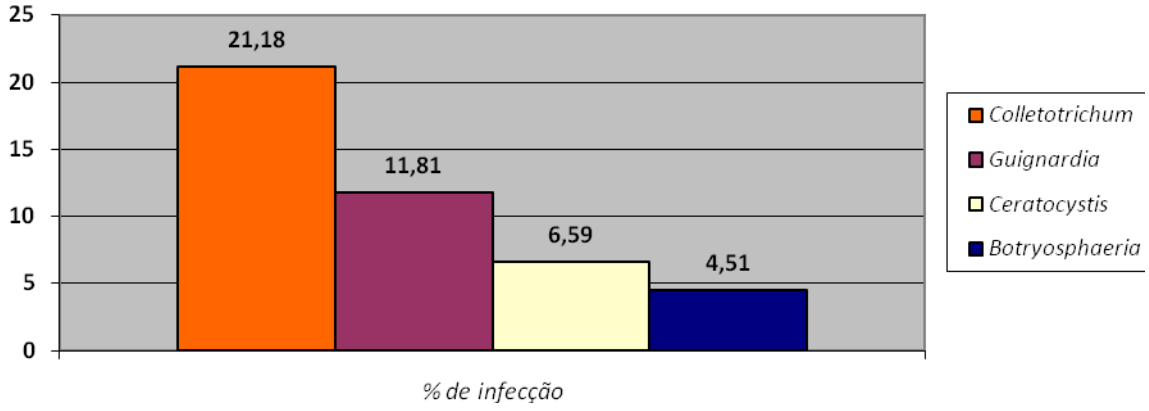

Figura 4 - Índice de infecção dos quatro principais gêneros.

Ao observar macroscopicamente a colônia de *Colletotrichum*, verificou-se a presença da massa conidial de coloração laranja, o que corresponde com as descrições realizadas por Galli *et al.* (1978) e Smith (1990). A presença e a coloração dessa massa é um ponto quase que determinante para a identificação correta deste microrganismo (ALEXOPOULOS *et al.,* 1996). Na observação microscópica, foi notada a presença do acérvulo em forma circular, com uma longa seta, bem como seus conídios de forma cilíndrica, com suas extremidades arredondadas, correspondendo às observações feitas por Barnett & Hunter (1972); Arx (1981) e Alexopoulos *et al.* (1996).

Colletotrichum é um fungo mitospórico, ou seja, ausência de uma forma de reprodução sexuada conhecida. Esse tipo de fungo é conhecido como fungo imperfeito ou anamorfo, pertence à classe Coelomycetes. Quando a forma de reprodução sexuada é descoberta para um fungo mitospórico, o nome que

passa a ter prioridade é o da teleomorfa, ou fase perfeita que é sempre um Ascomycota ou Basidiomycota. A forma sexuada do *Colletotrichum* é a *Glomerella* (BARRETO, 2002).

Este microrganismo é citado como o agente causal da antracnose em várias plantas, como por exemplo, na mandioca, causada por *C. manihotis* (CONCEIÇÃO *et al.*, 1979); no guaraná, causada por *C. guaranicola*, no cajueiro, causada por *Glomerella cingulata* (PITEIRA *et al.,* 2002), entre outras.

Figura 5 - Conídios de *Colletotrichum.*

As colônias de *Guignardia* observadas macroscopicamente, apresentavam coloração escura, com micélio formando uma crosta que penetra no meio de cultura, sem alterar sua coloração. Tsai (1981) e Robbs & Bittencourt (1995) constataram a patogenicidade deste microrganismo em plantações de *Citrus*, causando a mancha preta, tendo como agente causal *G. citricarpa*. A *Guignardia* é a forma telemorfa de várias espécies de *Phyllosticta* (ARX, 1981).

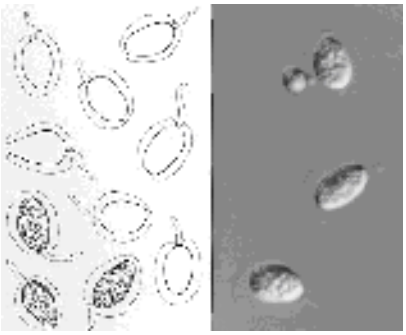

Figura 6 – Conídios do gênero *Guignardia.*

As colônias de *Ceratocystis* apresentaram-se com crescimento radial, branca com alguns setores escuros, onde a maior concentração de estruturas de reprodução estava ao centro da placa.

Botryosphaeria está presente em mais de 500 hospedeiros como fitopatógeno, aqui incluídos um grande número de frutas tropicais tais como cajueiro, coqueiro, goiabeira, gravioleira, mamoeiro, videira, tamareira, etc. (MEDEIROS-GALVÃO, 1998). Tem sido relatado com frequência como um fitopatógeno com distribuição mundial, causando doenças em diversas plantas de importância econômica.

O gênero *Botryosphaeria* pertence ao Domínio: Eucariota; Reino: Fungi; Filo Ascomycota; Classe: Pyrenomycetes ou Loculoascomycetes; Ordem: Dothideales; Família: Botryosphaeriaceae (GUARRO, GENÉ e STCHIGEL, 1999).

Apresenta um estroma preto, multiloculado, às vezes uniloculado, ostiolado, pescoço curto, agregado e irrompente através do tecido. Apresentam parede ascomal espessa, pseudoparenquimatosa, células externas de paredes espessas, marrom escuro, e as internas menores, hialinas e paredes delgadas. Ascósporos hialinos e unicelulares, tornando-se marrom e septados em algumas espécies; ovóides, fusoides a elipsóide, inequilateral; mais largos no meio, lisos, ocasionalmente verrugosos, às vezes com uma camada gelatinosa fina (HANLIN, 1996).

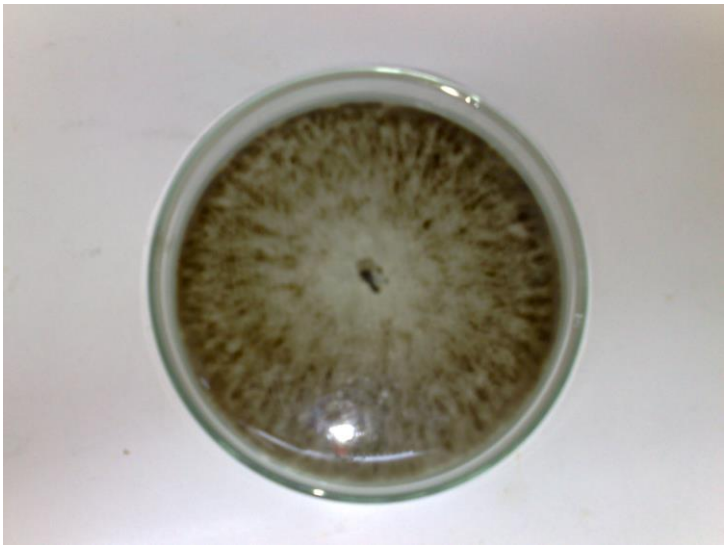

Figura 7 - Colônia de *Botryosphaeria* sp.

Figura 8 - Crescimento da colônia em tubos de ensaio. **(A)** Gênero não identificado com pigmentação. **(B)** Colônia de *Botryosphaeria* sp. **(C)** Colônia de *Xylaria* sp. **(D)** Colônia de *Colletotrichum* sp. com estruturas reprodutivas pigmentadas na cor laranja.

4.2 Índice de infecção nos explantes analisados

O índice de infecção por tipo de explante analisado, em função do número total de fragmentos infectados, está ilustrado na Figura 10. As folhas apresentaram o maior índice de infecção com 57,52%, seguida dos galhos com 28,31% e da casca com 14,15%. Os gêneros que se desenvolveram nos explantes, assim como o número de seus registros, variaram em cada um dos diferentes órgãos vegetais.

Diferentes trabalhos tem mostrado a presença de fungos endofíticos em plantas medicinais. Alguns destes endófitos também foram relatados como fitopatógenos de diferentes culturas, no entanto, na condição endofítica, apresentaram propriedades antimicrobianas. Rodrigues *et al*. (2000) isolaram os fungos endofíticos *Guignardia sp*., *Phomopsis sp*. e *Pestalotiopsis guepinii* da planta medicinal *Spondias mombin L*. (Anacardiaceae).

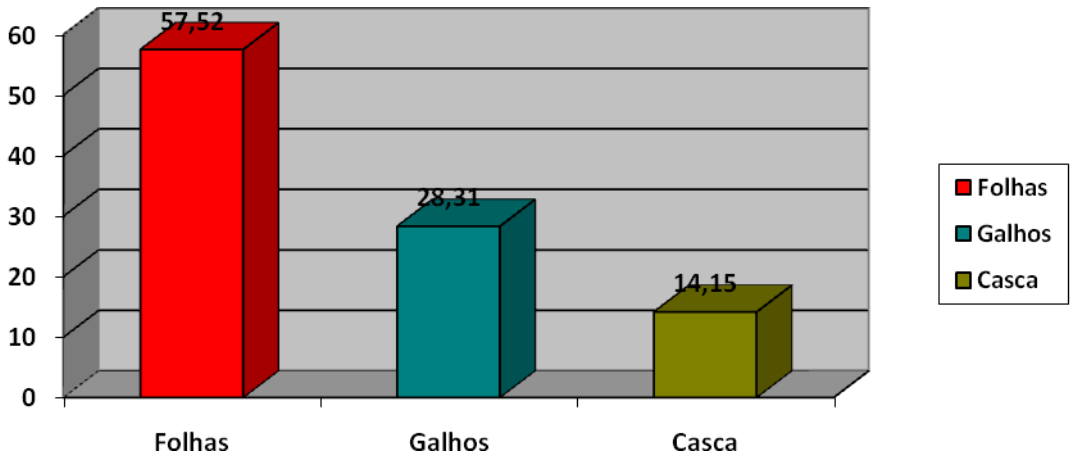

Figura 9 - Porcentagem de infecção dos órgãos da sacaca infectados por fungos endofíticos.

Com base em todas as pesquisas supracitadas, nota-se a presença marcante, em quase todas as espécies tropicais, de *Colletotrichum* e *Guignardia*, comuns em hospedeiros tropicais.

Assim, tem-se a necessidade de estudar estes microrganismos endofíticos, habitantes de tantas espécies vegetais, principalmente as tropicais, pelo fato de apresentarem, em cada hospedeiro, uma especificidade quanto à adaptação, coloração de suas colônias, metabólitos produzidos e necessidades por eles desenvolvidas e demonstradas. A ampliação dos estudos também irão auxiliar na otimização e no aperfeiçoamento de novas técnicas e processos, tanto para o isolamento quanto para a estocagem destes microrganismos.

4.3 Armazenamento dos fungos isolados da sacaca

Os fungos endofíticos isolados da sacaca encontram-se armazenados em tubos de vidro transparentes, com fragmentos do meio de cultura contendo pedaços da colônia imersos em água esterilizada, devidamente lacrados, com tampa de borracha e lacre metálico, em temperatura ambiente no laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Federal do Amazonas (LAGEM).

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, podemos considerar que:

- a diversidade morfológica observada para os isolados de fungos endofíticos de sacaca é considerável;
- foram identificados cinco gêneros: *Colletotrichum*, *Guignardia*, *Ceratocystis* e *Botryosphaeria* e *Xylaria;*
- *Cronton cajucara* Benth. mostrou-se uma planta com boa diversidade microbiana a partir do isolamento dos fungos endofíticos das mesmas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, J. S. 2006. **Bio (sócio) Diversidade e empreendedorismo ambiental na Amazônia**. Rio de Janeiro:Garamond,127p.

ALEXOUPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. ;BLACKWELL, M. 1996. **Introductory Mycology.** 4ª ed.John Wiley & Sons, INC, New York, U.S.A., 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.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKLINSKY – SOBRAL, J.; LACAVA, P. T . 2002. **Manual: Isolamento de Microrganismos Endofíticos.** Departamento de Genética. Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz" – Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo, 86p.

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

AZEVEDO, J.L; MACCHERONI FR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. 2002. Endophytic Microrganisms: A review on insect control and recent advantages on tropical plants. **Eletronic Journal of Biotechnology,** 3:1.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. 1972. **Illustrated genera of imperfect fungi.** 3° ed., Burgess Publishing Co.,Mineapoles, Minnesota, U. S.A, 241p.

BONONI, V.L. R.; GRANDI, R. A. P.1998. *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.

CLAY, K. 1998. Clavicitaceous fungal endophytes of grasses: coevolution and the change from paratism to mutualism, In: **Coevolution of fungi with plants and animals.** Pirozynski, K.A. & Hawksworth, D.L. (ed.). Academic Press, London, p.79-105.

MELO, I.S. 2002. Recursos genéticos microbianos. Cap.1. *In:* **Recursos genéticos e melhoramento – microrganismos.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. Melo, I.S.; Valadares-Inglis, M.C.; Nass, L.L.; Valois, A.C.C. 2002., p.1-48.

CONCEIÇÃO, D.M.; BIDOIA, E.D.; ANGELIS, D.A.; ANGELIS, D.F. 2001. Degradação de amido por fungos filamentosos isolados do Rio Atibaia, região de Paulínia. **14ª Reunião Annual do Instituto Biológico, Área Ambiental.** São Paulo, v.68 (supl.). Disponível no site **www.biologico.com.br/arquivos/v68.** Acessado em 14/09/02.

ELLIS, B. M. 1971. **Dematiaceous hyphomycetes.** Surry, Commonwealth Mycological Institute, Kew, 608p.

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.

GALLI, G. 1978. **Manual de Fitopatologia.** São Paulo. Ed. Ceres. V.1. p.373.

GUARRO, J. ; GENÉ, J. ; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 3, p. 454-500, Jul. 1999

GUIMARÃES, V. C. 1998. **Isolamento de fungos endofíticos do hospedeiro** *Paullinia cupana* **H.B.K. var** *sorbilis* **(Mart.) Ducke e análise de variedade genética, detectada por marcadores RAPD, no endófito** *G**lomerella cingulata.*** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos/Universidade do Amazonas, São Carlos, São Paulo, 123p.

HANLIN, R. T. Gêneros ilustrados de ascomicetos/Recife: **Imprensa da Universidade Federal Rural de Pernambuco**, 274p. : il. 1996

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

PEIXOTO-NETO et. al., 2002. **Microrganismos endofíticos. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento.** Brasília, nº 29. Disponível em: http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/micro.asp Acessado em: 14/04/2008.

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

PETRINI, O. 1991. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.H. & HIRANO, S. (eds.) **Microbial ecology of leaves.** Spring-Verlag, New York, p.179-97.

PETRINI, L. E. & MÜLLER, E. 1986. **Haupt-und Nebenfrunchtformen Europaishcher Hypoxylon-Arten (Xylariaceae, Sphaeriales) und verwandter Pilze.** Mycologia.

PITEIRA, M.; VÁRZEA, V.; RODRIGUES JÚNIOR, C. 2002. **Grupos de compatibilidade vegetativa entre isolamento de *Colletotrichum gloeosporioides* obtidos de cajueiro.** XVI Congresso Brasileiro de Fruticultura, Fortaleza, CE.

ROBBS, C.F & BITTENCOURT, A.M. 1995. **A mancha preta dos frutos um dos fatores limitantes à produção crtrícola do Estado do Rio de Janeiro.** Comunidade Técnico, CTAA-EMBRAPA, n.19, p.1-5.

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

SALERMO, M. I.; GIANINAZZI-PEARSON, V. (2000). Effect on grownth and comparison of root tissue colonization patterns off Eucalyptus viminalis by pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum.* **New Phytopathology,**146: 317-324.

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

SOUSA J. N. 2003. **Produção de mudas de sacaca (*Croton Cajuçara* Benth.)**. Manaus, AM: Comunicado Técnico Nº19.

TSAI, Y.P. 1981. Citrus Black spot control in Taiwan. **Procedings International Society Citriculture,** v.1, p. 344-6.