FUNGOS ENDOFÍTICOS DOS HOSPEDEIROS TROPICAIS *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish*

JOSE ODAIR PEREIRA

Biólogo

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LUCIO DE AZEVEDO

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Area de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
agosto - 1993

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

Pereira, José Odair
P436f Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish*. Piracicaba 1993.
105p. ilus.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Banana - Inoculação "in vitro" 2. Banana - Micologia 3. Estilosante - Micologia 4. Fungo endofítico Mutação 5. Fungo endofítico - População - Levantamento I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 589.2

FUNGOS ENDOFíTICOS DOS HOSPEDEIROS TROPICAIS *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish*

JOSE ODAIR PEREIRA

Aprovada em 06 de outubro de 1993

Comissão julgadora:

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo	ESALQ/USP
Prof. Dra Maria Lúcia Carneiro Vieira	ESALQ/USP
Prof. Dr. Hiroshi Kimati	ESALQ/USP
Prof. Dra. Vera Lúcia Bononi	I.BOTANICA
Prof. Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa	BIOLOGIA/USP

Prof. Dr.João Lúcio de Azevedo
orientador

Aos meus pais, Laércio e Maria, aos irmãos Darcy, Oswaldo, Rita, Selma e Paulo,

Ao amigo e orientador Prof. João Lúcio,

À companheira, Suzelei
às filhas
Juliana, Ana Isabel,
Vanessa e Katyana,

dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação segura, pelo incentivo, dedicação, pelo exemplo na conciliação do trabalho com a preservação do relacionamento humano e pelas oportunidades de crescimento profissional, oferecidas ao longo de tantos anos de convivência e amizade.

Ao Dr. Orlando Petrini, do Mikrobiologisches Institut - ETH - ZÜRICH, pelo estímulo, presteza em apresentar valiosas sugestões, auxílio na classificação dos fungos e por nos ter recebido em seu laboratório no início desse trabalho.

À Prof. Maria Lúcia Carneiro Vieira, pelas valiosas sugestões, estímulo e pelas facilidades concedidas durante a execução deste trabalho.

À Dra Nilza Mecelis pelo fornecimento de plantas de campo de *Stylosanthes* para este estudo.

À Prof. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner, pelo estímulo, oportunas discussões e facilidades concedidas para execução deste trabalho.

Aos professores, amigos e colegas, cuja convivência diária que sempre foi marcada por estímulos, sugestões e mútua cooperação, pessoas que do meu ponto de vista, se sentiram comprometidas com este trabalho, apresentando sugestões, fornecendo material, ou que colaboraram na recuperação de parte da literatura, de modo especial: Prof. Dr. Cláudio, Prof.Dr. Geraldo, Gilda, Isabel, João, Prof. Dra. Maria Helena, Marisa, Marcelo, Nirley, Renata, Prof. Rosa Maria, Prof. Sérgio, Rose, Vanessa e Yara.

Ao Adilson, pela dedicação, presteza e cooperação em inúmeras horas de trabalho.

À Adriana, pelo estímulo durante a execução do trabalho, leitura e sugestões na elaboração do manuscrito.

Ao Dr. Luciano, que se dedicou com tanta presteza e competência na elaboração das análises estatísticas.

Aos Professores do Departamento de Genética da ESALQ que participaram da minha formação acadêmica.

À Rosane pelo auxílio na elaboração do "summary".

Aos dedicados funcionários do Departamento de Genética, pela dedicação e cooperação durante todo o tempo de convivência.

Às bibliotecárias da ESALQ, sempre presentes e prestando indispensável e especializado apóio para a realização deste trabalho, de modo especial à Kátia M. Andrade Ferraz pela revisão da bibliografia.

Aos técnicos José Antonio da Silva e Carlos Alberto Oliveira, pela dedicação, competência e responsabilidade.

Aos estagiários Gustavo Maia Souza, Paulo Lacava, Edna e Célia pelo auxílio em partes importantes desse trabalho.

À Suzelei, companheira e amiga, pela solidariedade nos momentos difíceis, pela presteza e dedicação, pelas leituras e sugestões.

Aos Professores, amigos e colegas de trabalho da Universidade do Amazonas(FUAM), principalmente aqueles que me substituiram em funções didáticas e administrativas, possibilitando o meu afastamento.

Às instituições FUAM, CAPES, CNPq e FAPESP pelos auxílios financeiros

SUMARIO

	Página
Lista de figuras	viii
Lista de tabelas	x
Resumo	xii
Summary	xiv
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	3
2.1. Considerações gerais	3
2.2. Importância do estudo dos endofíticos	4
2.2.1. Endofíticos e seus metabólitos secundários	6
2.2.2. Endofíticos como agentes no controle biológico	8
2.2.3. Endofíticos como vetores genéticos	9
2.3. Isolamento de endofíticos	10
2.4. Ocorrência dos endofíticos	13
2.5. Especificidade com o hospedeiro	14
2.6. Tipos de interações com o hospedeiro	16
2.7. Patógenos latentes e endofíticos	18
2.8. Taxonomia dos endofíticos	19
2.9. Hospedeiros utilizados	20
2.9.1. *Musa cavendisch*	20
2.9.2. *Stylosanthes guianensis*	23
2.10. As espécies do gênero *Colletotrichum*	25
2.10.1. Caracterização molecular e estudos genéticos em *Glomerella cingulata*	27
3. Material e métodos	31
3.1. *Stylosanthes guianensis*	31
3.1.1. Locais de coleta	31
3.1.2. Amostras	31
3.1.3. Frequências de infecção	32
3.1.4. Meio de cultura dos fungos	33
3.1.5. Identificação dos fungos	34
3.1.6. Cultura de *Stylosanthes* "in vitro"	34
3.2. *Musa cavendish*	36
3.2.1. Locais de coleta	36
3.2.2. Amostras	36
3.2.3. Frequências de infecção	37

3.2.4. Plantas axênicas de *Musa cavendish* 38
3.3. Frequências de germinação 39
3.4. Obtenção de mutantes 39
3.5. Ensaios de inoculação 40
3.6. Frequencias de infecção "in vitro" 41
3.7. Análises estatísticas 41
4. Resultados e discussão 42
4.1. Fungos endofíticos de *Stylosanthes guianensis* 42
4.2. Fungos endofíticos de *Musa cavendish* 57
4.3. Ensaios com endofíticos mutantes 67
4.3.1. Obtenção de mutantes resistentes ao thiabendazole e benomil 67
4.3.2. Esterilização de fragmentos infectados "in vitro" 73
4.3.3. Ensaios de germinação 74
4.3.4. Ensaios preliminares de infecção 77
4.3.5. Ensaios de infecção 82
5. Conclusões 87
6. Referências bibliográficas 90

LISTA DE FIGURAS

página

FIGURA 1. *Glomerella cingulata*, teleomórfico de *Colletotrichum gloeosporioides*, endofítico isolado de folhas de *Stylosanthes guianensis*. Observar em a, peritécio; em b, asco e ascósporos. 51

FIGURA 2. *Colletotrichum gloeosporioides*, endofítico isolado de *Stylosanthes guianensis*, observar em a, conídios maduros; em b, conídio em formação em um conidióforo típico; em c, acérvulo e em d, seta. 52

FIGURA 3. Gráfico de barras com as porcentagens de fragmentos de *Stylosanthes guianensis* infectados com os endofíticos *G. cingulata* e *Xylaria* sp. As letras maiúsculas na base das colunas indicam a origem dos fungos. P, Piracicaba; NO, Nova Odessa; F, amostras coletadas em fevereiro de 1991; M, folhas maduras; J, folhas jovens; 2, "seedling" com 2 meses; 4, "seedling" com 4 meses; R4, planta regenerada com 4 meses. Por exemplo: R4M, planta regenerada, 4 meses, folhas maduras. 53

FIGURA 4. Conídios de *Colletotricum gloeosporioides* germinando em folhas de *Stylosanthes guianensis*: a, conídios; b, conídios germinando; c, apressório; d, superfície foliar; e, estómatos 54

FIGURA 5. Gráfico de barras ilustrando os endofíticos mais frequentes (*Xylaria* sp, *Glomerella cingulata* e *Cordana musae*) isolados em Registro, Miracatú e Juquiá. Os valores correspondem à % de fragmentos infectados em uma amostra de 800 fragmentos/local. Média geral dos três locais, corresponde à 2400 fragmentos/Vale do Ribeira. 63

FIGURA 6. (A,B). Em A, linhagem selvagem P1 (em cima) de *Colletotrichum musae* e mutantes *tr1* (direita) e *br5* (esquerda). Em B, linhagem selvagem P10 (em cima) e mutantes *tr1* (direita) e *br5* (esquerda), utilizados nos ensaios de inoculação "in vitro". 72

FIGURA 7. Esquema representativo da eficácia da esterilização de folhas, pecíolos e pseudo-caules de bananeira com NaOCl 3%, 4 minutos. As linhagens de fungos utilizadas (P1, P10, *tr1*, *br5* e *f21*) foram inoculadas, por imersão, em uma suspensão de 10^6 conídios/ml. Estão representadas 5 folhas (repetições), sendo cada folha cortada em 5 fragmentos. 73

FIGURA 8. Conídios de *Colletotrichum musae* em folhas axênicas de *Musa cavendish.* a, conídio; b, conídio germinando; c, apressório; d, superfície foliar; e, estómatos 75

FIGURA 9. Distribuição espacial dos endofíticos em folhas de bananeiras inoculadas "in vitro" com quantidades iguais de conídios da linhagem selvagem P1 e com o mutante *tr1*, de *Colletotrichum musae.* Cada conjunto de 5 quadrados, na horizontal, representa uma folha de bananeira. Cada quadrado representa um dos fragmentos em que a folha foi recortada. Estão representadas 11 folhas (repetições). 80

LISTA DE TABELAS

página

TABELA 1. Ocorrência de fungos no folíolo central de *Stylosanthes guianensis*, após 6 diferentes tempos de esterilização com NaOCl 3% (3 folíolos/tempo). 43

TABELA 2. Ocorrência de fungos no folíolo central de *Stylosanthes guianensis*, após 11 diferentes tempos de esterilização com NaOCl 3 % (2-4 folíolos/tempo). 44

TABELA 3. Identificação de fungos isolados do folíolo central de *Stylosanthes guianensis*, após 17 tempos de esterilização com NaOCl 3 % (4 folíolos/tempo). 46

TABELA 4. Percentagem de fungos isolados do folíolo central de *Stylosanthes guianensis*, distribuídos em três diferentes intervalos de tempo de esterilização com NaOCl 3 % 48

TABELA 5. Percentagem de fragmentos infectados por fungos endofíticos em *Stylosanthes guianensis*. 49

TABELA 6. Fungos endofíticos isolados de uma única planta hospedeira de *Stylosanthes guianrensis*. 55

TABELA 7. Ocorrência de fungos em fragmentos de folhas de bananeira submetidos à 16 diferentes tempos de esterilização com NaOCl 3 % 57

TABELA 8. Ocorrência de fungos* em caules, bainhas e folhas de 10 plantas de bananeiras em casa de vegetação, após esterilização** de superfície. 59

TABELA 9. Percentagem de fragmentos de folhas de bananeiras infectados por fungos endofíticos*. 60

TABELA 10. Nº e percentagem de fungos isolados, de folhas de bananeiras, distribuídos por taxon e por local de coleta*. 61

TABELA 11. Determinação da dose mínima de thiabendazole necessária para inibir o crescimento de *Glomerella cingulata* 69

TABELA 12. Caracterização dos mutantes de *Glomerella cingulata*, resistentes ao thiabendazole. 69

TABELA 13. Verificação da ocorrência de resistência cruzada dos mutantes *tr1* e *tr2* de *Glomerella cingulata* com benomil: metil-1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazol-carbamato. 70

TABELA 14. Verificação da ocorrência de resistência cruzada dos mutantes *br1* e *br5*, de *Glomerella cingulata*, com thiabendazole. 70

TABELA 15. Percentagem de germinação* de conídios de *Colletotrichum musae*** em Meio Completo e em folhas axênicas de *Musa cavendish*. 75

TABELA 16. (A,B e C). Análise da variância da percentagem de germinação de conídios de *Colleotrichum musae* em Meio Completo e em folhas axênicas de *Musa cavendish*. 76

TABELA 17. Nº e percentagem* de fragmentos infectados, após inoculação de uma linhagem selvagem (P1) e de um mutante *tr1*, ambas de *Colleotrichum musae*, em folhas axênicas de bananeira (clones VR4, VR7 e L), incubadas em três tempos diferentes (7, 14 e 21 dias), por meio de uma suspensão de 5,4 x 10^6 e 5,5 x 10^6 conídios/ml, para a linhagem P1 e *tr1*, respectivamente. 78

TABELA 18 (A,B e C). Isolamento de *Colletotrichum musae* de folhas de bananeiras (clone VR4), inoculadas com isolados endofíticos, selvagens (P1 e P10) e mutantes (*tr1* e *br5*), após 14 dias de incubação. 84

TABELA 19. Frequências de infecção obtidas após a inoculação, "in vitro", de *Colletotrichum musae** (selvagem P1 e mutantes *tr1* e *br5*), em folhas axênicas de bananeira. 85

RESUMO

FUNGOS ENDOFÍTICOS DOS HOSPEDEIROS TROPICAIS *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish*.

Autor: José Odair Pereira

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Fungos endofíticos foram isolados dos hospedeiros tropicais, *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish*. Os fungos foram isolados de plantas de campo e de casa de vegetação, obtidas a partir de sementes germinadas "in vitro" ou da cultura de tecidos e foram agrupados em 30 *taxa*. *Glomerella cingulata*, o teleomórfico de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Xylaria* sp foram os endofíticos mais frequentes em *S guianensis*, exceto em plantas derivadas da cultura de tecidos e mantidas em casa de vegetação. Fungos endofíticos de *Musa cavendish*, foram isolados de plantas de campo originárias de três locais do Vale do Ribeira, uma região produtora de bananas no Estado de São Paulo e agrupados em 16 *taxa*. Os endofíticos mais frequentes nesse caso foram, *Xylaria* sp, *Glomerella cingulata* e *Cordana musae*. *G. cingulata*, um fungo já isolado em outros hospedeiros tropicais, sendo um possivel patógeno latente de *Musa cavendish*, foi o endofítico escolhido para os ensaios de inoculações em plantas axênicas. As plantas axênicas, obtidas por cultura do meristema apical, isolado de

plantas de campo, foram mantidas sob condições controladas em Laboratório de cultura de tecidos vegetais. Folhas axênicas de um clone de bananeira foram ensaiadas para a introdução de *Colletotrichum musae,* anamórfico de *G. cingulata.* A partir desse isolado, foram obtidos mutantes espontâneos resistentes aos fungicidas thiabendazole e benomil. Esses mutantes, apresentando resistência cruzada, serviram de marcadores genéticos dos fungos durante os ensaios de inoculação, feitos simultaneamente com a linhagem selvagem. A inoculação dos fungos nas folhas das plantas foi obtida com sucesso e um dos mutantes revelou maior capacidade de penetrar no interior das folhas axênicas, quando comparado com a linhagem selvagem.

SUMMARY

ENDOPHYTIC FUNGI OF TROPICAL HOSTS *Stylosanthes guianensis* and *Musa cavendish*

Author: José Odair Pereira
Adviser: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Endophytic fungi were isolated from two tropical host: *Stylosanthes guianensis* and *Musa*. Fungal species isolated from *S. guianensis* plants from the field and plants of the greenhouse, originated from in vitro germination or micropropagation, were grouped in thirty taxa. *Glomerella cingulata*, the teleomorph of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Xylaria* sp were the most frequent endophytes in *S. guianensis*, except in plants regenerated and kept in the greenhouse. Sixteen taxa isolated from *Musa sp.* field plants originated from three differents localities in Vale do Ribeira, a banana producer region in São Paulo State, Brazil. The most frequent endophytes in that case were *Xylaria sp.; Glomerella cingulata* and *Cordana musae*. Out of *Musa* endophytes, *G. cingulata*, a fungus already isolated from other tropical hosts, being a possible latent pathogen of *Musa sp.*,

was selected for the assays of fungal inoculations in axenic plants. The axenic plants, obtained via tissue culture of the apical meristem of field plants, were maintained under controlled conditions in a laboratory of plant tissue culture. . Leaves of clonal plantlets were utilized for inoculations with *Colletotrichum musae* (anomorph of *G. cingulata)* conidia. Spontaneous mutants resistant to the fungicides Thiabendazole and Benomyl were obtained from that isolated. Those mutants, presenting cross resistance, served as genetic markers of the fungus during the assays which were conducted in parallel with the wild strain. Leaf inoculation with the fungi was successfully carried out and one of the mutants revealed superior ability to penetrate in the axenic leaves, when compared with the wild strain.

1. INTRODUÇAO

Endofíticos são aqueles microrganismos isolados do interior dos tecidos ou orgãos vegetais. Vários microrganismos, durante todo o seu ciclo de vida, ou somente parte dele, vivem no interior dos vegetais. Nesse trabalho, serão tratados alguns aspectos relativos aos fungos endofíticos. Usualmente, esses microrganismos vivem em uma associação que embora possa ser antagônica, muita vezes é neutra ou benéfica para o hospedeiro. A natureza dessas associações é diversa e, muitas vezes, exibe vários graus de interdepedência fisiológica e ecológica. Os estudos envolvendo fungos endofíticos foram intensificados a partir dos anos 80 e, cada vez mais, ficou evidente a sua importância, tanto do ponto de vista básico, como aplicado em várias áreas do conhecimento como fisiologia vegetal, microbiologia, genética microbiana e biotecnologia. Em sua grande maioria, esses estudos referem-se a hospedeiros de climas temperados e muito pouco se conhece sobre os endofíticos dos hospedeiros tropicais. Vale ressaltar que a presença dos endofíticos é um fenômeno assintomático, não perceptível para o observador que, para estudá-los necessita isolá-los, à partir dos tecidos vegetais, aparentemente sadios, e cultivá-los em laboratório.

O presente trabalho se aterá ao estudo de fungos endofíticos de hospedeiros tropicais. Foram escolhidos dois hospedeiros para essa finalidade: *Stylosanthes guianensis*, uma leguminosa forrageira, importante como fonte de proteínas e com

potencial para o alargamento da fronteira de criação de rebanhos no Brasil e, *Musa* cavendish, uma das espécies mais populares entre as plantas frutíferas brasileiras. De *S. guianensis*, procurou-se isolar e caracterizar os endofíticos de plantas de campo e de casa de vegetação advindas da micropropagação "in vitro". De *Musa* cavendish, além do isolamento e caracterização dos endofíticos de plantas de campo, procurou-se estudar a colonização das folhas de plantas axênicas, por um dos fungos mais frequentemente isolado e importante para a planta. Procurou-se, ainda, estudar a colonização do hospedeiro por meio de ensaios de inoculação "in vitro", com fungos isolados de campo porém, contendo marcadores genéticos para sua identificação e acompanhamento nos ensaios. O conhecimento adquirido com o estudo da associação fungo/planta será, com certeza, de grande valor para o entendimento do papel que esses microrganismos desempenham em seus hospedeiros. Nos próximos anos, inúmeros trabalhos científicos estarão voltados para a manipulação genética desses microrganismos, associados com ensaios em diferentes hospedeiros, com o objetivo de entender e melhorar a eficiência fisiológica, geral ou específica desses hospedeiros. Os endofíticos se apresentam como importantes alvos de interesse dos biotecnologistas, na busca de vetores alternativos para a introdução de genes em plantas. Desse modo, a pesquisa com os fungos endofíticos apresenta-se como mais um instrumento à disposição daqueles que buscam o incremento da produtividade vegetal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações gerais

Usualmente, a ocorrência de fungos em tecidos vegetais é acompanhada por mudanças visíveis nesses tecidos, tais como, manchas características, necroses ou hipertrofias, ou ainda, os próprios fungos tornam-se visíveis externamente pela presença de hifas ou corpos de frutificações. A ocorrência de infecções assintomáticas em tecidos vegetais aparentemente sadios, contudo, vem sendo intensamente registrada , principalmente nos últimos 15 anos.

A definição do termo endofítico é de BARY (1866), citado por STONE (1986) e foi aplicada `a flora micótica interna dos tecidos vegetais, em casos de infecções assintomáticas ou não e, nos casos de interações antagonísticas ou simbióticas. CARROL (1986) restringiu o uso do termo endofítico para organismos que causam colonizações assintomáticas, excluindo desse conceito fungos patogênicos e fungos mutualísticos tais como os fungos micorrízicos. Com o aumento de investigações na área e com as descobertas de diferentes aspectos da interação dos fungos com os seus hospedeiros, PETRINI (1991) propôs que a definição de CARROL fosse expandida para incluir todos os organismos que, habitando a parte aérea dos orgãos das plantas, fossem capazes de colonizar, em algum tempo de seu ciclo de vida, os tecidos internos dos

BARY, A. de. Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten, und Myxomyceten. Vol.II. Hofmeister's Handbook of Physiological Botany, Leipzig, 1866.

vegetais, sem causar um dano aparente. O próprio CARROL (1988) refere-se ao termo, de modo mais genérico, como fungos que são encontrados mais no interior das plantas que nas suas superfícies. A presença dos endofíticos pode ser demonstrada pelo crescimento de fungos, em meios de cultivo, à partir do interior de fragmentos de plantas que tiveram a superfície previamente esterilizada. Os fungos obtidos desse modo, podem ser cultivados para identificação. Por meio dessa técnica de isolamento, pode-se estimar a extensão da infecção, bem como a composição da micoflora existente em um determinado hospedeiro. Diversos estudos a respeito de fungos endofíticos de numerosos hospedeiros da Europa, América do Norte e América do Sul, feitos nos útimos anos, estão contribuindo para o entendimento do significado desses organismos. A maioria das publicações decorrentes desses estudos tratam principalmente da taxonomia e distribuição das espécies em um grande número de hospedeiros. Somente em poucos casos foram abordados aspectos ecológicos e evolutivos da associação fungo/planta (CARROL, 1988; CLAY, 1988; PETRINI, 1991; TOTI et al. 1992).

2.2. Importância do estudo dos endofíticos

Apesar de devidamente comprovada a existência da comunidade dos fungos endofíticos, muitas pesquisas ainda deverão ser feitas a respeito de aspectos ecológicos, genéticos e

fisiológicos dessa interação fungo/planta. Existe uma série de razões para que se aprofundem os estudos com os fungos endofíticos. Primeiro, porque faltam informações para elucidar a base biológica dessas interações. Segundo, porque os endofíticos são potencialmente vantajosos em diversos aspectos, entre os quais se destacam: a) vários endofíticos são capazes de produzir antibióticos quando cultivados "in vitro", fato que os tornam alvos na busca desses produtos ou de outros metabólitos secundários de interesse farmacológico; b) poderiam servir como bioindicadores de vitalidade (HELANDER & RANTIO-LEHTIMÄKI, 1990); c) poderiam ser utilizados como agentes no controle biológico de pragas; d) poderiam ser utilizados como agentes para incompatibilizar o desenvolvimento de patógenos (WHITE & COLE, 1985); e) poderiam ser utilizados como micoherbicidas no controle de hervas daninhas (CERKAUSKAS, 1988); f) poderiam servir de vetores para a introdução de genes em plantas hospedeiras. A análise de alguns desses itens, que será feita a seguir, revela aspectos importantes que estão sendo conhecidos sobre o potencial dos fungos endofíticos em suas interações com os hospedeiros vegetais.

Apesar de não ser assunto abordado nesta pesquisa, as bactérias, também, são frequentemente encontradas colonizando tecidos sadios dos vegetais, e podem trazer notáveis vantagens para o hospedeiro. Como exemplo, GILLIS et al. (1989), demostraram que a ocorrência de bactérias endofíticas, fixadoras de nitrogênio nos vasos de cana de açucar, trazem benefício para a planta.

2.2.1. Endofíticos e seus metabólitos secundários

A possibilidade de exploração dos fungos endofíticos, como produtores de metabólitos para diversos fins, foi aventada por alguns pesquisadores e comprovada em certos casos.

FISHER et al. (1984b) detectaram atividade antibiótica em 10 dos 24 isolados de fungos endofíticos obtidos de 5 espécies de Ericaceae. Os fungos produziram os metabólitos quando cultivados em culturas líquidas em agitação. Entre os 10 isolados, 5 apresentaram atividades antifúngicas e antibacterianas ao mesmo tempo. FISHER et al. (1986) ensaiaram 25 isolados do hospedeiro *Ulex europeus* e *U. gallii* e encontraram atividade antibiótica em 4 desses isolados cultivados em meio líquido com agitação. Os isolados de *Coniothyrium* spp, produziram uma ampla faixa de atividade antibiótica em ambos os ensaios. Em nenhum dos ensaios descritos, houve preocupação de se verificar de forma exaustiva a produção de antibióticos pelos isolados endofíticos, mas ambos confirmam a hipótese de que os endofíticos estariam aptos a competirem com antagonistas (FISHER et al., 1984a).

BILLS & POLLISHOOK (1991) fizeram algumas interessantes considerações a respeito do potencial de alguns endofíticos. Apesar de não darem destaque especial a qualquer fungo, os autores afirmaram que esses microrganismos, em relação

às suas aplicações biotecnológicas, poderiam ser encontrados não entre os endofíticios mais frequentes mas entre os mais especializados, raros e restritos a certos hospedeiros.

Um exemplo de destaque que merece alguns comentários refere-se `a produção de taxol, um promissor agente anti tumor de seio e de ovário. Taxol é um derivado diterpenóide cuja extração é feita a partir da região abaixo da casca (floema/tecido cambial) de *Taxus brevifolia*, uma árvore de crescimento lento, e que ocorre próxima aos riachos e lagos no Noroeste do Pacífico. Considerando-se que duas gramas de taxol são necessárias para um tratamento e que somente 0,01 `a 0,03% do peso seco do floema é taxol, fica evidente a dificuldade de suprimento dessa droga que, vem apresentando uma demanda cada vez mais intensa. Um fato novo, contudo, pode reverter toda a situação, já que *Taxomyces andreanae*, um fungo endofítico isolado do floema de *Taxis brevifolia*, quando cultivado em meio semi-sintético, produziu taxol e outros componentes relacionados (STIERLE et al., 1993). Ensaios com precursores radioativos evidenciaram que o taxol produzido por *T. andreanae* segue uma via metabólica diferente do taxol produzido por *T. brevifolia*. Contudo, os ensaios biológicos de atividade revelaram que ambos tem atividades semelhantes quanto à citotoxidade de carcinomas. Ficou comprovado que o taxol isolado das culturas do fungo faz parte do metabolismo desse organismo e se apresenta como uma fonte alternativa desse fármaco.

2.2.2. Endofíticos como agentes no controle biológico

Quando os fungos estão integrados com seus hospedeiros, possivelmente devido a um longo processo de coevolução, eles podem se constituir em potenciais agentes de controle biológico. A associação de endofíticos com forrageiras é um dos exemplos que, desde que foi descoberta, vem recebendo constante atenção de vários pesquisadores (LATCH et al. ,1984; WHITE & COLE, 1985; WHITE & COLE, 1986; WHITE, 1987; CLAY, 1988 e 1989; BACON, 1990; SCHARDL et al., 1991; MURRAY et al., 1992). Um grande número de espécies forrageiras está associado com endofíticos, sendo que algumas dessas são de importância econômica (*Lolium perene* L. e *Festuca arundinacea* Schreb.). Esses endofíticos ganharam importância quando se associou a ocorrência de metabólitos tóxicos em forrageiras com a presença dos fungos (especialmente o gênero *Epichloë* da família Clavicipitaceae e seu anamórfico *Acremonium coenophialum* Morgan-Jones & Gans). As pesquisas foram desenvolvidas não somente para verificar as causas da toxidez, mas também para estudar os aspectos ecológicos da associação que foi denominada de simbiose mutualística. Observou-se que as forrageiras infectadas ficavam livres da ação de insetos herbívoros, eram mais tolerantes`a seca, mais competitivas e produziam mais matéria seca qua as forrageiras não infectadas. A literatura sobre esses endossimbiontes é bastante extensa, porém, BACON (1990) afirmou

que as investigações sobre os fungos endofíticos "in vivo" e "in vitro" ainda estão em sua infância, sendo que tópicos importantes como respostas e efeitos do ambiente, interações simbióticas e os aspectos fisiológicos, genéticos e bioquímicos dessas interações permanecem virtualmente intocados. Outros exemplos onde os endofíticos poderiam atuar no controle biológico de insetos que causam danos à agricultura foram relatados por CLARK et al. (1989) e por PETRINI et al. (1989).

2.2.3. Endofíticos como vetores genéticos

A associação endofíticos/planta tem despertado o interesse dos biotecnologistas devido ao intrínsico potencial que apresenta. Os endofíticos geneticamente modificados, poderiam servir como vetores para a introdução de genes, de resistência ou outros, em espécies de plantas economicamente importantes, conforme preconizaram vários autores (SIEGEL et al. 1987; SIEGEL et al. 1989; PETRINI,1991). FAHEY (1988) apresentou o primeiro relato de aproveitamento de um organismo endofítico geneticamente modificado. No caso, tratava-se de uma bactéria isolada do xilema de uma planta não cultivada, que foi transformada e introduzida em plantas de milho, para controle da broca do colmo. A bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* passou a expressar, no hospedeiro, o gene da endotoxina delta que recebeu de *Bacillus thuringiensis*. Recentemente, MURRAY et al. (1992) estabeleceram condições para a transformação, em alta

frequência, de uma linhagem do fungo endofítico *Acremonium* (700-800 transformantes/µg de DNA). Ambas formas, linear e circular do plasmídio pAN7-1, resistentes `a higromicina (*hph*), foram introduzidas no fungo. No mesmo trabalho, também foi introduzido o gene da ß-glucuronidase (*uidA*) por co-transformação de pNOM-2 com pAN7-1. A atividade da ß glucuronidase foi confirmada "in vitro" e "in vivo" após os transformantes serem reintroduzidos na planta hospedeira. Esse fato marca o início de um processo definitivo no sentido de se utilizar o *Acremonium* para a introdução de genes em forrageiras. No caso específico das forrageiras, o método de reinfeção das plantas com fungo de campo (selvagem) já havia sido descrito por LATCH & CHRISTENSEN (1985). Uma vez que o fungo transformado é reintroduzido no hospedeiro, todos os genes que carrega passariam facilmente para as próximas gerações da planta, por herança materna via invasão das hifas do endofítico nos tecidos das sementes em desenvolvimento. O estudo dos endofíticos de forrageiras, representa um modelo para entendimento do papel desses microrganismos na biologia das plantas superiores e, a utilização de técnicas de biologia molecular amplia as possibilidades de aproveitamento desses simbiontes na agricultura.

2.3. Isolamento de endofíticos

A melhor maneira de se estudar os fungos endofíticos é por meio de seu isolamento e cultivo em laboratorio.

Para que o isolamento seja possível, é preciso eliminar todos os microrganismos que vivem na superfície externa dos hospedeiros, também chamados de epifíticos. A eliminação dos epifíticos se dá por meio da esterilização da superfície desses hospedeiros. O processo de esterilização e os tempos necessários para tal, variam de hospedeiro para hospedeiro e dependem basicamente da espessura da cutícula e da epiderme dos tecidos. Quando os tempos de esterilização são insuficientes, também crescerão os organismos da superfície externa. Por outro lado, se a solução esterilizante penetrar no interior dos tecidos vegetais, poderá eliminar os endofíticos. A eficácia da esterilização de superfície foi verificada em vários trabalhos anteriores. Em alguns casos o processo de esterilização utilizado não é eficaz e de acordo com CARROL (1986) e PETRINI (1986), permite que alguns conhecidos saprófitas epifíticos, como *Cladosporium* spp., *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud, e *Epicoccum purpurascens* Ehrh. ex Schlect, sejam isolados após a esterilização da superfície das plantas.

SPURR & WELTY (1975) ensaiaram métodos de esterilização empregando discos de 9 mm de folhas de tabaco cultivados em casa de vegetação e discos semelhantes de papel de filtro. Sobre ambos os discos foi feita aspersão de uma suspensão de esporos de *Alternaria*. Posteriormente os discos foram submetidos a diferentes tratamentos com hipoclorito de sódio, variando-se ora o tempo de exposição ao cloro, ora a sua concentração. Simultaneamente foram utilizados discos de folhas

de tabaco coletadas em campo, os quais foram submetidos `a agitação com NaOCl 1% em uma ampla faixa de tempo, que variava de 0,5 até 30 minutos. Após cada um dos tratamentos, os discos foram colocados em meios adequados para o desenvolvimento de fungos. O tratamento foi efetivo com 1% de NaOCl por 120 segundos. Quanto aos discos coletados de folhas de campo, a frequência de fungos isolados diminuía com o aumento do tempo de exposição ao NaOCl 1%. Contudo, *Alternaria* e *Cladosporium* consistentemente cresciam a partir de tecidos tratados por 10 minutos com NaOCl 1%.

PETRINI (1986) confirmou a existência de técnicas efetivas para a esterilização de superfície, onde são apresentadas diferentes condições para a esterilização de Liquens, Briófitas, Pteridófitas, Gimnospermas, Monocotiledôneas e Dicotiledôneas, variando-se ora o tempo de exposição, ora a concentração de NaOCl. O autor afirmou, ainda, ser possível que um pequeno número de esporos ou fragmentos de hifas possa sobreviver aos procedimentos de esterilização. Os resultados publicados por CABRAL (1985) e LEGAUT et al. (1989a, 1989b) confirmaram que, algumas vezes, fungos que habitam a superficie externa das folhas podem colonizar o interior de orgãos de plantas, principalmete quando há um decréscimo de espécies endofíticas após o inicio do processo de senilização dos tecidos. Tais fungos, denominados por PETRINI (1986) de endofíticos facultativos, estão relacionados com a decomposição de matéria orgânica e são mais frequentemente isolados de tecidos velhos.

2.4. Ocorrência dos endofíticos

A ocorrência desses microrganismos endofíticos deve ser de âmbito geral e, passou a ser registrada em todo hospedeiro submetido `a investigação. PETRINI (1991) afirmou que pelo menos 300 espécies de plantas tiveram o registro de fungos assintomáticos em seus tecidos aéreos. Os endofíticos tem sido encontrados em plantas inferiores, como liquens, musgos, samambaias (PETERSON et al. 1981; DREYFUSS & PETRINI, 1984) , coníferas (CARROL & CARROL, 1978; PETRINI & MÜLLER, 1979; PETRINI & CARROL, 1981), monocotiledôneas (RIESEN & SIEBER, 1985), dicotiledôneas (WIDLER & MÜLLER, 1984), em espécies tropicais (PETRINI & DREYFUSS, 1981; DREYFUSS & PETRINI 1984; RODRIGUES, 1992; RODRIGUES & SAMUELS, 1990) e em forrageiras (SIEGEL et al. 1987; CLAY 1988; BACON, 1990). A análise desses dados revela que a comunidade dos endofíticos é composta de fungos pertencentes a vários taxa, contudo, na maioria dos casos há predominância de uma ou poucas espécies de fungos em um determinado hospedeiro. A composição das espécies pode variar em relação `a distribuição geográfica dos hospedeiros, idade das plantas, condições ecológicas e sazonais (BERNSTEIN & CARROL, 1977; PETRINI et al. 1982; CARROL & CARROL, 1978; PETRINI, 1991).

Os endofíticos podem ser transmitidos de uma geração para outra por meio das sementes dos hospedeiros, ou por

propágulos vegetativos desses hospedeiros, sendo que a maioria dos endofíticos aparentemente são transmitidos de uma planta para a outra por meio de esporos (CARROL, 1988).

2.5. Especificidade com o hospedeiro

Nas famílias de plantas em que os endofíticos foram mais intensivamente estudados, as Pinaceae, Cupressaceae, Ericaceae e Graminea, sempre houve uma associação entre a micoflora e um determinado hospedeiro. Usualmente, um ou dois taxa são relativamente específicos para o hospedeiro e são isolados em frequências mais altas do que um grande número de espécies acidentais e comuns a vários outros hospedeiros. Entre os gêneros de fungos considerados ubíquos, que ocorrem em hospedeiros pertencentes a diferentes famílias de plantas, estão, segundo PETRINI (1986): *Geniculosporium*, *Phyllosticta*, *Phomopsis* e *Cryptocline*. Por outro lado, muitas espécies de fungos usualmente estão presentes em um determinado gênero ou família de um hospedeiro em particular. Para exemplificar, *Acremonium coenophialum* Morgan-Jones & W. Gams, anamórfico de *Epichloë tyfina* (Pers.) Tul., é conhecido somente em gramíneas forrageiras (CLAY, 1986). *Chloroscypha chloromela* (Phill. & Hark.) é conhecido somente em *Sequoia sempervirens* (STONE, 1986). *Phyllosticta pyrolae* (Ellis & Everth.) e *P. vaccinii* são restritos para hospedeiros Ericales (PETRINI, 1986). Contrariamente, *Phomopsis*

spp. já foi isolado tanto de espécies perenes (PETRINI et al. 1982) como de espécies anuais (KULICK 1984).

Aparentemente, a especificidade dos endofíticos a seus hospedeiros é bastante estreita. PETRINI (1991), citando vários autores, afirmou que são necessárias várias enzimas extracelulares (amilases, celulases, esterases, lipases, ligninases, pectinases proteases) para a penetração e colonização da planta pelo fungo. O autor afirma que, quando diferentes isolados são obtidos de um mesmo hospedeiro, apresentam um padrão homogêneo de atividade enzimática, sugerindo a existência de algum mecanismo de especificidade. Dados mais recentes indicam que a especificidade entre o endofítico e seu hospedeiro pode chegar ao nivel de espécie (LEUCHTMANN & CLAY, 1990; SIEBER-CANAVESI; PETRINI & SIEBER 1991). CHAPELA et al. (1990) descreveram um mecanismo de reconhecimento entre as xilarias e seus hospedeiros logo no início do contato entre o fungo e a planta. TOTI et al. 1992 descreveram um mecanismo de aderência entre conídios do endofítico *Discula umbrinella* (Berk & BR.) Morelet, em superfícies do hospedeiro e de não hospedeiros. Constatou-se a presença de uma delicada bainha contendo polissacarídeo na superfície do conídio que, aparentemente, está envolvida no processo de aderência. Segundo os autores trata-se de um mecanismo bastante específico com, possivelmente, dois fatores envolvidos: um termo-lábil e outro não protéico e altamente específico no reconhecimento de uma única espécie de hospedeiro. A aderência de esporos na superfície de hospedeiros tem sido estudada para fungos

fitopatogênicos (HAMER et al., 1988). A produção de enzimas extracelulares, responsáveis pela infecção e colonização das plantas, assim como a produção de fatores de crescimento, produzidos pelos fungos endofíticos, indicam que estes sofreram, possivelmente, coevolução com seus hospedeiros e estão bem adaptados aos seus ambientes, uma situação já bastante conhecida para os fungos fitopatogênicos (PETRINI, 1991).

2.6. Tipos de interações com o hospedeiro

Segundo STONE (1986), as simbioses entre fungos e plantas são caracterizadas como mutualísticas ou antagonísticas, dependendo se ocorre benefício ou dano na planta hospedeira, respectivamente. A condição de neutralidade, onde ocorre um balanço entre benefícios e danos, é rara e de difícil comprovação. Quando o dano se limita `a perda de nutrientes da planta para o fungo, mesmo que em quantidades não mensuráveis, trata-se de um caso de parasitismo. Desse modo, o mutualismo implica na existência de algum fator que compense o custo metabólico do fungo para com o hospedeiro autotrófico. O balanço entre benefícios e danos, que irá delimitar a existência de mutualismo ou parasitismo nem sempre é muito clara

O simples fato de se encontrar fungos endofíticos com aparente falta de patogenicidade não significa que esteja ocorrendo um caso de simbiose, apesar de dar margem para se especular nesse sentido. CARROL & CARROL (1978) sugeriram que

os endofíticos poderiam servir como antagonistas de patógenos verdadeiros, de fungos saprófitas ou de insetos herbívoras. Essas possibilidades vêm sendo comprovadas com o aumento das investigações sobre os endofíticos. CARROL (1988) apresentou uma série de exemplos onde os endofíticos simbiontes atuam contra insetos herbívoros ou antagonistas de patógenos microbianos. O autor definiu duas estratégias de mutualismo entre os endofíticos. O primeiro caso é definido como mutualismo constitutivo e o exemplo típico ocorre com os endofíticos das forrageiras, os quais são transmitidos pelas sementes e desenvolvem uma infecção sistemática em toda a parte aérea da planta, produzindo substancial biomassa do fungo. Neste caso, as toxinas produzidas pelo fungo são capazes de deter os insetos herbívoros que, por sua vez, tem preferência por plantas não infectadas. Nesse caso, o benefício para o hospedeiro é imediato e direto, apesar do custo metabólico para o hospedeiro ser elevado, envolvendo energia para o metabolismo do fungo. A segunda estratégia, definida por CARROL (1988), envolve uma associação mais livre entre o endofítico e seu hospedeiro, onde a abundância do endofítico pode variar bastante com a distribuição geográfica e condições fisiológicas do hospedeiro. Nesse caso, o fungo vive em tecidos senilizados ou metabolicamente inativos, como as cascas ou epidermes das árvores, e colonizam tecidos vitais somente em casos de lesões ou estresse causados por insetos ou patógenos. O simbionte atuaria mais como fonte de inóculo, agindo somente em partes específicas do hospedeiro, diminuindo o ataque de insetos ou competindo com

patógenos. O autor cita, como exemplo de mutualismo induzido, os endofíticos das coníferas. Nesse caso, fica mais difícil avaliar o benefício direto do endofítico.

Na maioria das vezes os endofíticos que dão alguma proteção aos hospedeiros, o fazem por meio da produção de diversos metabólitos secundários, efetivos contra insetos herbívoros (WEBBER, 1981 e WEBBER & GIBBIS, 1984). Os endofíticos tambem podem ser produtores de metabólitos antifúngicos ou antibacterianos conforme demonstraram FISHER et al. (1984 a,b) e WHITE & COLE (1985).

2.7. Patógenos latentes e endofíticos

CARROL (1988) afirmou que, na agricultura, a distinção entre patógenos latentes e certos endofíticos é confusa. Os fungos que causam infeções latentes são responsáveis por podridão e perda da produção pós-colheita. Muitos patógenos de folhas, que infectam o hospedeiro logo que folhas jovens emergem, somente irão causar lesões meses mais tarde. O equilíbrio entre endofíticos e hospedeiros pode ser rompido com o intensivo uso de defensivos agrícolas, favorecendo determinados endofíticos a se tornarem possíveis patógenos. Segundo CARROL (1988), existem evidências taxonômicas sobre as relações estreitas entre patógenos e endofíticos onde, frequentemente, os endofíticos são espécies próximas de patógenos virulentos em um mesmo hospedeiro, ou em hospedeiros relacionados. Fungos pré-adaptados

ao mutualismo, segundo o autor, incluiriam patógenos latentes e produtores de micotoxinas.

Espécies patogênicas são isoladas frequentemente como endofíticas. *Didymella exitialis* (Morini) Müller e *Phaeosphaeria nodorum* (Müller) Hedj., patógenos do trigo, podem apresentar infecções assintomáticas (PETRINI, 1986; SIEBER et al. 1988) assim como, *Naemacyclus minor* Butin (CARROL & CARROL, 1978), *Lophodermium* spp. (COSTONIS et al. 1970), patógenos das coníferas. De acordo com STONE (1986), os endodíticos são, "na pior das hipóteses", parasitas fracos que ocorrem naturalmente em tecidos senilizados, citando como exemplo *Phomopsis sojae* Lehm., encontrado em tecidos sadios de *Glycine max*.

2.8. Taxonomia dos endofíticos

A identificação dos fungos endofíticos, segundo PETRINI (1986), é extremamente dificil devido `a falta de informações relativas ao cultivo de espécies já descritas, bem como pela escassez de informações sobre o microhabitat peculiar dos tecidos vegetais. A maioria dos endofíticos são Ascomicetos distribuidos dentro de Loculomicetos, Discomicetos ou Pirenomicetos. Basidiomicetos, Deuteromicetos e Oomicetos também já foram descritos entre os isolados endofíticos. Segundo o autor, o registro da ocorrência de Basidiomicetos é raro e pode ser atribuído, pelo menos em parte, ao uso de meios inespecíficos de cultivo os quais não fornecem nutrientes necessários para

fungos de crescimento mais lento. Os fungos que formam o seu teleomórfico em cultivo, podem ser facilmente identificados como Ascomicetos ou Basidiomicetos. Por outro lado, quanto aos Deuteromicetos, existe dificuldade de identificá-los, porque além da falta de descrições confiáveis de espécies já conhecidas, existem alterações pleomórficas que ocorrem dentro de uma única espécie. PETRINI (1986) afirmou que algumas linhagens de Coelomicetos ou Hifomicetos mostram uma faixa de variação na forma e tamanho de conidióforos e conídios em meios de cultura que são diferentes daquelas usualmente encontradas em seus hospedeiros. Segundo o autor, a distinção entre um acérvulo e um esporodóquio, fácil de ser feita sobre o hospedeiro, é quase impossivel em meios de cultivo. Especialmente entre os Coelomicetos, um grande número de espécies e gêneros descritos em seus hospedeiros são praticamente indistinguíveis quando cultivados em laboratório.

2.9. Hospedeiros utilizados

2.9.1. *Musa cavendish*

A banana é uma das principais frutas de consumo genuinamente popular que ocupa uma parte importante da dieta nos países tropicais do terceiro mundo, sendo o único fruto tropical

exportado em grandes quantidades. As bananeiras (*Musa* spp) são originárias das regiões tropicais úmidas do Sudeste da Asia e atualmente crescem em todas as regiões tropicais do mundo (THRURSTON, 1984). Os países que se destacam como maiores produtores estão concentrados na América Tropical, os quais exportam o produto para a América do Norte, Europa e Japão. A principal variedade até 1960, era Gros Michel, que foi introduzida na América por volta de 1820. Entretanto, esta variedade se mostrou altamente susceptível ao mal do Panamá, doença causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, sendo substituída por cultivares resistentes do grupo Cavendish (SLABAUGH et al. 1982). Apesar de ter características agronômicas superiores à Gros Michel, as novas variedades introduzidas são mais sujeitas à danos físicos durante o seu manejo e transporte. A podridão da coroa é o mais sério problema pós-colheita nas bananas comerciais. Essa doença não era problema até a conversão do carregamento dos frutos em cachos para carregamentos em palmas removidas dos cachos e embaladas em caixas onde ficam mais protegidas de danos físicos. Por outro lado, o tempo e as condições do transporte favorecem muito o aparecimento de doenças pós-colheita. O transporte pode durar de 5-20 dias à temperatura de 13 - 14 ºC e em seguida os frutos ficam de 2-7 dias em temperaturas mais elevadas durante o amadurecimento e comercialização. Todo esse procedimento acaba levando, também ao aparecimento de podridão nos frutos, pedicelo, engaço e tecidos adjacentes (GREENE & GOOS, 1963; MARTINEZ, 1982).

O controle desse tipo de podridão é dificultado pela complexidade das interações que os patógenos desenvolvem com os hospedeiros e pela dificuldade de se atingir os focos potenciais de infecção com um fungicida efetivo. Esporos dos patógenos, em meio líquido, podem penetrar, de modo profundo (vários milímetros, segundo ECKERT & OGAWA,1985), nos elementos vasculares dos tecidos cortados e os focos de infecção ficam protegidos da ação dos fungicidas aplicados superficialmente. Consequentemente, vários fungos patogênicos podem ser isolados de tecidos em processos de deterioração, por exemplo: *Cephalosporium* sp, *Verticillium theobromae*, *Fusarium roseum*, *F. moniliforme*, *Botryodiplodia theobromae*, *Colletotrichum musae*, *Gloeosporium musarum*, *Deightoniella* sp e *Acremonium* sp. Restos de folhas e brácteas usualmente comuns nas plantações se constituem em fontes de inóculos dos fungos para novas infecções. De modo especial *Colletotrichum musae* é o principal responsável pela podridrão nos pedicelos que sofreram cortes ou esfoladuras, e pelas manchas escuras nos frutos (SLABAUGH & GROVE, 1982). Segundo ECKERT & OGAVA (1985), essa podridão causada por *Colletotrichum* não caracteriza antracnose latente. Segundo MUIRHEAD & DEVERALL (1981), as infecções latentes de *Colletotrichum* surgem de apressórios situados na superfície da cutícula. Apressórios que se aderem na superfície da planta e produzem um ou mais pontos de infecção são considerados estruturas chaves na latência de *Colletotrichum* spp.

2.9.2. *Stylosanthes guianensis*

Stylosanthes Sw.(Leguminosae, Papilionoideae, Aschinomeneae) é um gênero de leguminosas amplamente distribuido nas regiões tropicais e subtropicais do continente Sul Americano. O interesse científico pelo gênero tem aumentado nas últimas duas décadas pela descoberta de muitas espécies potencialmene importantes como forrageiras para áreas tropicais. Aproximadamente 30 espécies do gênero são conhecidas no mundo (WILLIAM et al. , 1984), sendo pelo menos 25 delas nativas de regiões brasileiras (FERREIRA & COSTA, 1979). Esse número contrasta com as poucas e restritas espécies africanas. Contudo, REIS & MARTINS (1989) afirmaram que, para a quase totalidade das espécies brasileiras, não existem pesquisas para identificar-lhes caracteres de valor adaptativo. Informações sobre taxonomia de *Stylosanthes* foram apresentadas por MANETJE (1984) e para as espécies brasileiras por COSTA & FERREIRA (1984). No Brasil, MARTINS (1984) e MARTINS & VELLO (1981) apresentaram valiosas informações sobre aspectos da biologia populacional e variabilidade de caracteres agronômicos, respectivamente. Espécies brasileiras do gênero foram estudadas do ponto de vista da citogenética por VIEIRA (1988). Tecnologia de cultivo "in vitro", também já foi fornecidada por MEIJER & SZABADOS (1990), enquanto que a obtenção de plantas a partir de protoplastos de *S. guianensis*, *S. scabra*, e *S. macrocephala* foi estudada por VIEIRA et al. (1991). As duas mais importantes espécies são *S. guianensis* e

S. humilis, ambas usadas como leguminosas forrageiras no Brasil e na Austrália. Alguns cultivares de *S. guianensis* são bem adaptados e tolerantes à ampla faixa de condições tropicais de pastagens, o que reflete a alta variabilidade genética dentro da espécie. No Brasil, boa parte da população de gado concentra-se em áreas de cerrados, com solos de baixa fertilidade e com altas concentrações de alumínio. O uso de leguminosas, em associação com gramíneas forrageiras, pode ser uma maneira de melhorar a qualidade e obter um melhor aproveitamento das pastagens naturais. Além de fornecer suprimento de proteínas para a dieta animal, as leguminosas contribuem com a fixação de nitrogênio no solo, beneficiando, indiretamente, as gramíneas forrageiras (HYMOWITZ, 1971).

Uma das mais importantes doenças de fungos de *Stylosanthes* é a antracnose, causada por *Colletotrichum* spp., mais especificamente por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc. (LENNÉ & CALDERON, 1984; CHAKRABORTY et al., 1991). Antracnose é, frequentemente, o fator limitante nas culturas de *Stylosanthes* na Austrália e na América Latina (IRWIN et al., 1984).

Aparentemente a antracnose em *Stylosanthes* se manifesta até a maturidade reprodutiva e senilidade da planta, conforme observações em avaliações de campo (DAVIS et al., 1987). Contudo, segundo OGLE et al. (1986) e DAVIS et al., (1987) faltam evidências definitivas para que os resultados encontrados, a respeito da doença, sejam caracterizados como infecção latente.

2.10. As espécies do gênero *Colletotrichum*

O gênero tem sido objeto de inúmeros estudos, porém existem lacunas na literatura que precisam ser preenchidas. A nomenclatura, caracterização dos isolados, o conhecimento do processo de latência, o desenvolvimento de doenças, aspectos das interações com os hospedeiros e com outros fungos, merecem maiores esclarecimentos.

Usualmente, cada fungo encontrado parasitando determinada planta, era tido como uma espécie e, como tal , denominado segundo a planta hospedeira. Entretando, observou-se que muitos fungos tidos como especializados também podiam ser encontrados em outros hospedeiros. Esse fato foi comprovado inúmeras vezes, para diferentes gêneros, por meio de cuidadosos experimentos de inoculação. A classificação de *Colletotrichum*, também, seguiu o mesmo caminho de outros gêneros resultando em denominações dadas de acordo com o hospedeiro, chegando a ser conhecido por mais de 600 nomes segundo ARX (1957). No entanto, assim como nos outros casos, foi observado que as inúmeras espécies descritas não apresentavam diferenças marcantes em suas características morfológicas e, portanto, elas poderiam ser agrupadas. ARX (1957, 1970) propôs, assim, reduzir as centenas de espécies conhecidas para apenas 13. *Colletotrichum gloeosporioides* (forma anamórfica ou imperfeita) foi escolhido para representar o estágio conidial de *Glomerella cingulata* (forma

pleomórfica ou perfeita). O mesmo autor admite, contudo, que algumas formas de *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld & Schrenk (Ascomiceto) são de certa forma especializadas e manteve o nome original. Entre essas encontra-se o *Colletotrichum musae* (Berk. et Curt.) v. Arx. *Glomerella cingulata* divide-se em raças e linhagens, de acordo com suas características fisiológicas, biológicas e sexuais.

As espécies de *Colletotrichum* são conhecidas como agentes responsáveis por doenças em ampla faixa de hospedeiros em inúmeros locais. Os problemas causados por *Colletotrichum* vão, desde as perdas da produção agrícola em fase de pré-colheita, à perdas pós-colheita, no armazenamento e comercialização. De modo particular nos trópicos, as espécies de *Colletotrichum* ou *Glomerella* são os mais importantes patógenos responsáveis pela infecção latente, que não se manifesta até que os frutos amadureçam. JEFFRIES & DODD (1990), citaram dados de SIMMONDS (1941), em experimentos com banana, onde o período de latência se extendeu por mais de 5 anos.

As relações entre isolados de *C. gloeosporioides,* anamórficos e teleomórficos, de leguminosas tropicais foram estudadas por OGLE et al (1986). Os autores descreveram morfologicamente ambos isolados e determinaram as condições ótimas para o seu cultivo em laboratório. Na mesma pesquisa, foram observadas as condições para a formação de apressórios e sua penetração em folhas de *Stylosanthes guianensis.*

2.10.1 Caracterização molecular e estudos genéticos em *Glomerella cingulata*.

Estudos sobre heterocariose, parassexualidade, análises de proteínas e de DNA ainda são necessários dentro do gênero *Colletotrichum*. Esses estudos também são importantes para esclarecer e determinar a heterogeneidade fenotípica dentro das espécies do gênero. Muitos isolados de *Colletotrichum*, frequentemente, apresentam variantes ou setores quando cultivados "in vitro", gerando uma ampla variabilidade que pode ser resultado de mutações que ocorrem com regularidade, conforme já registrou ARX (1957). O número de núcleos nos conídios, de *Colletotrichum* spp, também, pode sofrer alterações. TEBESST e t al. (1989) observaram que 98% dos conídios em cultura sólida são uninucleados e poucos são binucleados. A alteração das condições de cultivo, por exemplo em culturas líquidas, aumenta a heterogeneidade nuclear. Nessas condições, os binucleados podem aumentar para 17% e surgem até 3,5% de trinucleados, em algumas espécies. Informações importantes foram obtidas quando diversos isolados de *Colletotrichum* foram estudados com respeito aos seus sistemas isoenzimáticos. BONDE et al. (1991) analisaram padrões enzimáticos de micélios para a identificação de espécies de *Colletotrichum* patogênicas de morango. Foram ensaiados 13 sistemas sendo que cada isolado produziu à exceção de Malato desidrogenase (MDH), uma única banda por atividade enzimática no gel. Os resultados com MDH foram mais difíceis de serem

interpretados, porém, permitiram que fossem levantadas várias hipóteses: ocorrência de alelos múltiplos, parassexualidade, modificações enzimáticas pós-transcricionais ou existência de um segundo locus, este no DNA mitocondrial. Em alguns casos, contudo, a análise de isoenzimas não foi suficiente para detectar a variabilidade existente. DALE et al. (1988) ensaiaram 14 isolados de *C. gloeosporioides* de *Stylosanthes guianensis* na Austrália. Os autores analisaram as proteínas dos conídios por meio de padrões eletroforéticos e concluíram que os isolados eram praticamente idênticos. Contudo, foram encontradas diferenças no padrão de RNA de dupla fita, o qual foi correlacionado com diferentes graus de patogenicidade do fungo. Em outra pesquisa, LENNE & BURDON (1990) ensaiaram 69 isolados de *C. gloeosporioides* de populações naturais de *Stylosanthes guianensis* em 4 sistemas enzimáticos. Os autores observaram que a diversidade enzimática foi limitada, quando comparada com a diversidade fenotípica da virulência e concluíram que não houve associação entre virulência e caracteres enzimáticos. Por outro lado, BONDE et al. (1991) concluíram que a técnica de isozimas pode ser usada para identificar espécies de *Colletotrichum* e pode ser empregada para espécies de diferentes hospedeiros. A atividade enzimática (esterase) também já foi utilizada como um marcador genético diretamente associado com os processos de esporulação das linhagens de *Colletotrichum*. Nesse caso havia interesse em se monitorar o processo de esporulação sob ponto de vista industrial na produção da cultura do fungo, em

larga escala, para ser usado como herbicida (CUNNINGHAM & KUIACK, 1989).

O número e tamanho dos cromossomos de *Colletotrichum gloeosporioides* foram estudados por meio de cariótipos eletroforéticos em isolados obtidos de *Stylosanthes* spp (MASEL et al. 1990). Em um primeiro estudo os autores concluíram que os rearranjos cromossômicos podem estar envolvidos na geração de variabilidade no fungo e os processos responsáveis podem estar ativos, durante o crescimento somático ou, por meio da recombinação parassexual neste fungo "presumivelmente haplóide". Posteriormente, MASEL et al. (1993) isolaram, por meio dessa técnica, minicromossomos de 1,2 Mb em duas raças independentes de *G. gloeosporioides*, causando um tipo específico de antracnose em *Stylosanthes guianensis* cv. Graham, na Austrália. Os autores observaram que a origem desse minicromossomo estava relacionada com mutações tipo adição e perda de DNA em grande escala. A análise molecular desses minicromossomos revelou que eles não continham material genético repetido nos demais cromossomos, sugerindo a adição de DNA de linhagens geneticamente distintas.

A regeneração do fungo a partir de protoplastos foi estudada por diversas vezes: TEBEEST & WEIDEMANN (1985); KUNOH et al. (1986); RODRIGUES & YODER (1987); PANACCIONE et al. (1988); TEBEEST & WEIDEMANN (1990). Em sua maioria, as linhagens ensaiadas eram patogênicas de diferentes hospedeiros e, os estudos abordaram aspectos específicos sobre as metodologias

empregadas. Além da obtenção dos protoplastos, alguns autores estudaram, também, a transformação genética nas linhagens. PANACCIONE et al. (1988) transformaram *C. graminicola*, isolado de milho, com genes homólogos e heterólogos para resistência ao benomil e observaram que a patogenicidade das linhagens foi mantida. RODRIGUES & YODER (1987) transformaram *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum*), com gene de *Escherichia coli* (*hygB*) que confere resistência à higromicina B. No mesmo trabalho, os autores utilizaram gene de *Aspergillus nidulans* (*amdS*) que permite o crescimento em acetamida como única fonte de carbono. Nesses experimentos, foi observado que os transformantes eram homocarióticos e não perderam a capacidade de infectar *Phaseolus vulgaris*, mantendo, portanto, a patogenicidade da linhagem. Sistemas de transformação da célula total, visando analisar aspectos determinantes da virulência, também já foram descritos para *Colletotrichum trifolii* (DICKMAN, 1988).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. *Stylosanthes guianensis*

3.1.1 Locais de coleta

As amostras de campo de *Stylosanthes guianensis* foram coletadas na área do Campus da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), em Piracicaba-SP, e na área da Estação Experimental do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa-SP, em Nova Odessa-SP. Plantas oriundas de casa de vegetação, do Departamento de Genética da ESALQ, também foram utilizadas.

3.1.2. Amostras

Em Piracicaba, as coletas de campo foram feitas em dois lotes sendo cada um de 70 folhas. Um dos lotes foi composto de folhas maduras e outro somente de folhas jovens. Em Nova Odessa, as folhas foram coletadas em plantas de aproximadamente 3 anos de idade. De cada planta, dois tipos de folhas foram coletadas, folhas maduras e folhas jovens. Em ambos os locais, as folhas maduras tinham aproximadamente 35 mm de comprimento e coloração verde escura e as folhas jovens,

aproximadamente 25 mm de comprimento e coloração verde clara. Ao todo, 250 plantas de campo foram utilizadas nos isolamentos. As folhas de *Stylosanthes* são compostas de 3 folíolos sendo que somente o folíolo central de cada folha foi utilizado nos ensaios.

Em casa de vegetação, as amostras foram coletadas de plantas provenientes da germinação "in vitro", e de plantas regeneradas a partir da cultura de tecidos. Em cada caso foram usados 30 indivíduos. Todos os folíolos coletados (de campo e de casa de vegetação) foram colocados em sacos plásticos, levados ao laboratório e processados dentro de 8 horas após a coleta. Cada uma das amostras foi examinada a olho nú e foram selecionados somente aqueles folíolos com aparência sadia, provenientes de plantas, também, com aparência sadia.

3.1.3. Frequências de infecção

As frequências de infecção foram determinadas após os isolamentos dos fungos do interior de fragmentos dos tecidos dos folíolos. Todos os folíolos sofreram esterilização de superfície por meio da imersão em etanol 96% por 1 minuto, seguindo-se tratamento com NaOCl 3% por 4 minutos e posterior lavagem com etanol 96% por 30 segundos (PETRINI & MÜLLER, 1986). A seguir, os folíolos foram cortados assepticamente em 5 pequenos fragmentos (5-7 mm) e transferidos em ordem seriada para placas de Petri (100 mm) contendo meio completo (MC) adicionado de terramicina (100µg/ml), para impedir o crescimento

bacteriano. As placas foram incubadas a 28 ºC durante 3-7 dias e observadas diariamente quanto ao crescimento de fungos. Logo que os fungos iniciavam o seu crescimento nas placas, pequenos fragmentos de ágar, contendo pontas de hifas de cada fungo, foram transferidos para tubos com MC inclinado. Os tubos foram incubados à 28 ºC, para crescimento dos fungos, pelo tempo necessário e posterior identificação. As frequências de infecção dos folíolos foram calculadas de acordo com o número de fungos isolados por fragmento. Nos ensaios preliminares, os tempos de esterilização de superfície variaram de 0 a 10 minutos em NaOCl 3%.

3.1.4. Meio de cultura dos fungos

O isolamento e o cultivo dos fungos, em laboratório, foi feito em meio completo (MC), conhecido como meio de Pontecorvo, modificado por AZEVEDO E COSTA (1973), contendo 1% de glicose, 0,2% de peptona, 0,05% de extrato de levedura, 0,15% de caseina hidrolizada, 0,6% de $NaNO_3$, 0,05% de KCl, 0,15% de KH_2PO_4, 0,05% de $MgSO_4.7H_2O$, 0,1% de solução de vitaminas, 0,0001% de $ZnSO_4$ e de $FeSO_4$. O pH do meio foi ajustado para 6,8. A solução de vitaminas que foi adicionada ao MC continha 0,1% de ácido nicotínico, 0,01% de ácido p-aminobenzóico, 0,05% de tiamina, 0,0002% de biotina, 0,05% de piridoxina e 0,1% de riboflavina.

3.1.5. Identificação dos fungos

A identificação dos fungos foi feita por meio da análise de suas estruturas de reprodução (sexual e assexual), de acordo com literatura especializada (ELLIS, 1971, 1976; BARNETT & HUNTER, 1972; von ARX, 1974; PETRINI, 1986; ROSSMAN et al.,1987;) ou, pessoalmente, pelo Dr. Orlando Petrini do ETH, Mikrobiologisches Institut - Zürich, Switzerland. Para acelerar a esporulação dos fungos, eles foram expostos à luz ultra-violeta longa, pelo tempo necessário (uma semana a três ou quatro meses), à temperatura de 12 ºC. Os fungos que, mesmo nessas condições, permaneceram somente na forma micelial, não puderam ser identificados e foram considerados estéreis (não necessariamente *Mycelia sterilia*). Fragmentos dos fungos, preparados no momento do uso, foram fixados e corados em lactofenol (20% de cristais de fenol, 20% de ácido lático, 40% de glicerol e 0,05% de azul algodão) e analisados em microscópio ótico (Olympus BH-2). Os conídios foram observados germinando, sobre folhas axênicas de *Stylosanthes*, 8 horas após a inoculação. Nesses casos , também utilizou-se lactofenol com 0,05% de azul algodão.

3.1.6. Cultura de tecido de *Stylosanthes*

Plantas axênicas de *Stylosanthes guianensis* foram obtidas de explantes de campo a partir da esterilização de folíolos intermediários. Folíolos jovens foram imersos em etanol

96% por 1 minuto, em seguida, em NaOCl 2% com agitação por 18 minutos e etanol 96% por 30 segundos. Todos os folíolos esterilizados foram incubados para regeneração em meio MURASCHIGE & SKOOG (MS) suplementado com 2mg/l de 6-benzilaminopurina (BAP). Após 50-60 dias, os brotos originários a partir dos calos foram transferidos para meio de alongamento (MS/2). As plantas originárias após 20-40 dias de alongamento foram transferidas, individualmente, para meio fresco para crescimento. Plantas com 30 dias de crescimento foram cortadas em pequenos fragmentos (20-30 fragmenos /planta) que foram espalhados e incubados (10 dias, a 28ºC) em placas de Petri contendo MC, para controle da condição axênica. As plantas regeneradas foram transferidas para casa de vegetação em solo esterilizado. Folíolos de plantas com 4 meses em casa de vegetação, foram ensaiados para observação da frequência de endofíticos.

Plantas axênicas de *Stylosanthes guianensis*, também, foram obtidas por meio da germinação "in vitro". Nesse caso, foram utilizadas sementes escarificadas e esterilizadas na seguinte sequência de banhos, com agitação: H2SO4, 5 minutos; água esterilizada, 5 banhos; etanol 96%, 40 segundos; NaOCl 3%, 15 minutos; etanol 96%, 30 segundos. Posteriormente, as sementes germinaram e cresceram em meio MS/2 livre de hormônios (30-40 dias). O controle da condição axênica dessas plantas foi feito do mesmo modo já descrito para as plantas regeneradas. As plantas germinadas "in vitro", com 2 e 4 meses em casa de vegetação,

também, foram utilizadas nos ensaios de isolamentos de fungos endofíticos.

3.2. *Musa cavendish*

3.2.1. Locais de coleta

As amostras de bananeira foram coletadas no campo experimental da ESALQ (40 plantas) e em três locais,: Juquiá, Miracatú e Registro, no Vale do Ribeira-SP (40 plantas por local). Nos ensaios preliminares, também, foram utilizadas plantas oriundas de micropropagação de 2 a 4 meses, em fase de aclimatação, em casa de vegetação.

3.2.2. Amostras

As amostras de bananeira foram coletadas de plantas aparentemente sadias. Dessas plantas, foram selecionadas folhas íntegras, jovens (coloração verde claro), sem qualquer tipo de pigmentação ou sintoma de doenças. De cada planta, somente uma folha foi utilizada. De um dos lados da nervura principal da folha, na posição mediana, foi retirado um fragmento de aproximadamente 5x5 cm. Todos os fragmentos foram colocados em sacos plásticos, levados para o laboratório e processados dentro de 8 horas após a coleta. As amostras de Registro permaneceram em

refrigerador (aproximadamente 4ºC), por 24 horas antes do processamento. Todas as coletas foram feitas de plantas adultas, em fase de produção de frutos. Em Piracicaba, também, foram feitas coletas em um pomar de plantas jovens, em fase de crescinto.

3.2.3. Frequências de infecção

As frequências de infecção foram determinadas após o isolamento dos fungos do interior dos fragmentos das folhas. No laboratório, todas as amostras de campo foram cortadas em fragmentos de 4x4cm, os quais sofreram esterilização de superfície do mesmo modo que já foi descrito anteriormente no item 3.1.3. Após a esterilização, os fragmentos de folhas foram cortados, em condições assépticas, inicialmente, em 5 tiras (aproximadamente 8x40 mm cada), as quais foram novamente cortadas em 5 fragmentos menores, quadrados (aproximadamente 8x8 mm). Os fragmentos foram colocados de modo seriado na superfície dos meios, em placas de Petri contendo MC adicionado de terramicina (100 µg/ml), para impedir o crescimento bacteriano. As placas de Petri foram incubadas (28ºC por 3 a 7 dias) e as frequências de endofíticos calculadas do mesmo modo já descrito no item 3.1.3. A identificação dos fungos isolados de bananeira foi feita do mesmo modo já descrito no item 3.1.5.

3.2.4. Plantas axênicas de *Musa cavendish*

Plantas axênicas de bananeiras foram obtidas por meio da regeneração "in vitro", de meristemas apicais de plantas de campo. Brotos de 20 a 60 cm de altura, foram coletados, lavados em água corrente, cortados em pedaços de 5 a 7 cm de comprimento por aproximadamente 6 cm de diâmetro, contendo no centro o meristema apical. Os pedaços de tecidos foram esterilizados em solução de NaOCl 3% por 2 horas. Posteriormente, as camadas que envolvem os meristemas foram cuidadosamente removidas. Os meristemas foram obtidos em condições assépticas em câmaras de fluxo laminar horizontal e inoculados em meios de cultura MS, suplementado com 5,0 mg/l de BAP. No decorrer dos ensaios o método foi modificado. O tempo de exposição ao NaOCl e a concentração de BAP foram reduzidos pela metade.

As plantas micropropagadas foram mantidas em sala de cultivo do laboratório de cultura de tecidos vegetais do Departamento de Genética da ESALQ. Os brotos produzidos sucessivamente a partir de um meristema, constituíram clones que sofreram transferências mensais para meio fresco. O controle da qualidade axênica das plantas foi feito à semelhança do descrito no item 3.1.6.

3.3. Frequências de germinação

Os ensaios de germinação foram feitos em placas com MC e em folhas axênicas de bananeira. Em ambos os casos, as inoculações foram feitas a partir de uma suspensão de conídios (10^5 conídios/ml) em solução dispersante de tween 80. A porcentagem de germinação foi calculada por meio da observação direta, com auxílio de microscópio ótico. Aproximadamente 1000 conídios foram espalhados tanto na superfície do MC sólido como na superfície das folhas. Os ensaios em superfície foliar foram feitos em folhas destacadas de plantas axênicas. As folhas foram colocadas sobre a superfície úmida de papel de filtro, em placas de Petri. Os conídios foram espalhados sobre as superfícies das folhas, as placas foram vedadas com fita adesiva e incubadas por 8 horas, à 28ºC. No caso da germinação em MC, os conídios foram espalhados diretamente na superfície do meio, as placas, também, foram vedadas e incubadas a 28 ºC, por 8 horas. As observações nas folhas foram feitas imediatamente após a fixação e coloração do material com lactofenol contendo 0,05% de azul algodão. Em MC as observações foram feitas com material fresco.

3.4. Obtenção de mutantes

Foram obtidos mutantes de *Colletotrichum musae* resistentes ao fungicida thiabendazole: 2-(4' tiazolil)-benzimidazol e ao fungicida benomil: metil-butil-carbamoil-2-

benzimidazol carbamato. Inicialmente, foram determinadas as doses mínimas inibitórias, para cada um dos fungicidas. Para tal, conídios dos fungos foram colocados para germinar em MC contendo concentrações crescentes dos fungicidas. Os mutantes, todos espontâneos, foram obtidos por inoculação de uma suspensão de conídios (10^6 conídios/ml) em meio seletivo, ou seja, capaz de inibir o crescimento de indivíduos selvagens. As colônias que se desenvolveram nesse meio foram selecionadas como mutantes resistentes. Para verificação da ocorrência de resistência cruzada, os mutantes resistentes a um dos fungicidas foram ensaiados em meios seletivos contendo doses crescentes do segundo fungicida.

3.5. Ensaios de inoculação

Os ensaios de inoculação foram feitos com linhagens selvages de *C. musae* e com os mutantes resistentes aos fungicidas thiabendazole e benomil. Uma suspensão de conídios, em solução de tween 80 (0,1%), foi utilizada em cada ensaio. Os conídios foram inoculados na superfície de folhas de bananeiras axênicas com auxílio em uma micropipeta. Em cada folha foram colocados 3µl de uma suspensão de 10^6 conídios/ml. Antes de cada inoculação as plantas axênicas foram transferidas para meios frescos (MS + 2,5 % de BAP). Em cada frasco foram colocadas 2 plantas de modo que, no mínimo, 4 folhas estavam disponíveis para a inoculação. Após cada inoculação, os frascos permaneceram fechados durante 14 dias, `a temperatura ambiente.

3.6. Frequência de infecção "in vitro"

A frequência de infecção, foi calculada após o reisolamento dos fungos a partir dos fragmentos das folhas de bananeiras inoculadas "in vitro". Decorridos 14 dias da inoculação, as folhas foram retiradas e esterilizadas de acordo com a descrição do item 3.1.3. Posteriormente as folhas foram cortadas assepticamente e distribuídadas de modo seriado em placas de Petri contendo MC. Os fungos isolados foram ensaiados para verificação da presença das marcas de resistência.

3.7. Análises estatísticas

A frequência de colonização das folhas pelos fungos foi definida como o número total de fragmentos de folhas contendo um determinado fungo, em relação ao número total de fragmentos analisados. Os dados foram apresentados em porcentagens.

Os dados de frequência de colonização para as amostras de bananeiras foram analisados pelo teste de Friedmam SIEGEL (1956). As médias das frequências de infecção nos ensaios de laboratório foram comparadas pelo teste t. A porcentagem de germinação dos conídios foi descrita com a apresentação das respectivas médias e variâncias dos dados transformados em arco seno.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Stylosanthes guianensis*

No período 1990-1991, foram isolados fungos endofíticos de folhas de *Stylosanthes guianensis*, obtidas na Estação Experimental de Zootecnia em Nova Odessa-SP, e de plantas de casa de vegetação, provenientes da germinação"in vitro", ou da cultura de tecidos e, mantidas no Departamento de Genética da ESALQ em Piracicaba-SP. Os resultados apresentados nas Tabelas 1,2,3 ilustram o efeito da esterilização de superfície nos folíolos intermediários das folhas de *Stylosanthes guianensis*, tratadas com NaOCl 3%.

A Tabela 1 mostra que, no tempo zero, ou seja, sem o tratamento com hipoclorito de sódio, há grande ocorrência de fungos, possivelmente, pertencentes `a população epifítica global dos folíolos. Tais fungos estão representados por uma população de 5 a 8 tipos, com diferentes padrões morfológicos e com diferentes intensidades de crescimento. Com o aumento do tempo de esterilização, a população epifítica vai desaparecendo e a partir de 4 minutos de tratamento, não se observou qualquer crescimento de fungos, o que sugere tratar-se de uma amostra com baixa densidade de colonização.

TABELA 1- Ocorrência de fungos no folíolo central de *Stylosanthes guianensis*, após 6 diferentes tempos de esterilização com NaOCl 3% (3 folíolos/tempo).

tempo (min.)	nº do folíolo	ocorrência de fungos
0	1	+++
	2	+++
	3	+++
2	4	+
	5	++
	6	-
4	7	+
	8	-
	9	-
6	10	-
	11	-
	12	-
8	13	-
	14	-
	15	-
10	16	-
	17	-
	18	-

+++ = crescimento intenso de 5 ou mais tipos de fungos. ++ = crescimento intenso de 3 a 4 tipos de fungos. + = crescimento de 1 a 2 tipos de fungos. - = ausência de crescimento. As plantas utilizadas no ensaio eram provenientes da germinação "in vitro", foram transplantadas para solo esterilizado e ficaram 4 meses em casa de vegetação.

Quando foram ensaiados outros tempos de esterilização (2 a 10 minutos com NaOCl 3%), em plantas com 6 a 8 meses em casa de vegetação, os resultados foram ligeiramente diferentes. Neste caso, eles indicaram que as amostras do hospedeiro eram portadoras de endofíticos, os quais podiam ser detectados a partir de 3,5 minutos de esterilização. O padrão morfológico e o número de fungos que cresciam a partir desse tempo de esterilização, era diferente daquele apresentado por fungos que cresciam em tempos anteriores, ou mesmo no tempo zero, como já mencionado anteriormente.

TABELA 2- Ocorrência de fungos no folíolo central de *Stylosanthes guianensis*, após 11 diferentes tempos de esterilização com NaOCl 3% (2-4 folíolos/tempo).

tempos (min.)	nº do folíolo	ocorrência de fungos
2,0	1	++
	2	++
2,5	3	-
	4	-
	5	-
3,0	6	-
	7	+
3,5	8	+
	9	-
4,0*	10	+
	11	-
	12	-
	13	+
4,5	14	-
	15	-
	16	+
5,0	17	-
	18	-
5,5	19	+
	20	+
6,0	21	-
	22	-
	23	+
	24	-
8,0	25	-
	26	+
	27	+
	28	+
10,0	29	+
	30	+

*= fungos com diferentes padrões morfológicos acima deste tempo de esterilizção. ++ = crescimento intenso de 5 ou mais tipos de fungos. + = crescimento de 1 ou 2 tipos de fungos. - = ausência de crescimento. As plantas foram germinadas "in vitro", transplantadas para solo esterilizado e ficaram de 6 a 8 meses em casa de vegetação.

Em outro ensaio , utilizando-se 200 fragmentos de folíolos, com tempos de esterilização de zero a 9 minutos, observaram-se resultados semelhantes aos apresentados na Tabela 2, indicando que alguns fungos persistiam apesar da esterilização da superfície externa.

A relação dos fungos isolados em uma série de 17 tempos de esterilização, pode ser observada na Tabela 3. Os resultados evidenciam a ocorrência de alguns fungos tipicamente epifíticos como *Nigrospora oryzae*. Outros fungos, tais como *Nodulisporium* sp, *Guigniardia* sp e *Drechslera* sp, somente cresceram após um determinado tempo de esterilização. *Glomerella cingulata* (Figura 1), anamórfico de *Colletotrichum gloeosporioides* (Figura 2), *Alternaria* sp e *Xylaria* sp foram mais frequentemente isolados após um determinado tempo de esterilização da superfície da amostra. *Xylaria* sp e *C. gloeosporioides*, de acordo com os dados da Tabela 3, apresentam-se como endofíticos típicos, os quais tiveram oportunidade de crescer após a eliminação de epifíticos de crescimento rápido como, por exemplo, *N. oryzae*, que impede ou dificulta o isolamento de endofíticos de crescimento mais lento, que surgem do interior dos tecidos vegetais, em direção ao meio de cultivo.

TABELA 3- Identificação de fungos isolados do folíolo central de *Stylosanthes guianensis* após 17 diferentes tempos de esterilização com NaOCl 3% (4 folíolos/tempo).

tempos (minutos)	taxon	nº de isolados
0	*Nigrospora oryzae*	11
	Aspergillus sp	5
	estéril	2
0,5	*N. oryzae*	10
	estéril	1
1,0	*N. oryzae*	5
	Alternaria sp	1
	levedura não identificada	1
	estéril	3
1,5	*N. oryzae*	2
	Penicillium sp	1
	levedura não identificada	1
	estéril	2
2,0	*Alternaria* sp	2
	Glomerella cingulata	1
	N. oryzae	1
	Xylaria sp	1
	estéril	2
2,5	*Alternaria* sp	5
	Colletotrichum gloeosporioides	1
	G. cingulata	1
	estéril	4
3,0	*G. cingulata*	4
	Alternaria sp	3
	Drechslera sp	1
	Xylaria sp	1
	estéril	3
3,5	*Alternaria* sp	3
	C. gloeosporioides	1
	estéril	1
4,0	*Alternaria* sp	5
	Guigniardia sp	1
	C. gloeosporioides	1
	Xylaria sp	1
	estéril	2
4,5	*Nodulisporium* sp	1
	estéril	4
5,0	*G. cingulata*	1
	C. gloeosporioides	1
	levedura não identificada	1
	Xylaria sp	2
	estéril	1
	Alternaria sp	3

5,5	*G. cingulata*	4
	Xylaria sp	2
	estéril	2
6,0	*Alternaria* sp	2
	estéril	3
7,0	*Xylaria* sp	1
	estéril	2
8,0	*Xylaria* sp	1
	estéril	1
9,0	*G. cingulata*	1
	Xylaria sp	2
	estéril	3
10	*Xylaria* sp	1

estéril*= micélio que não produziu qualquer tipo de estrutura de reprodução (sexual ou assexual), não sendo possível sua identificação.

Os isolados podem ser melhor visualizados na Tabela 4, onde os fungos foram agrupados por intervalos de tempos de esterilização. Nesse caso, os fungos isolados a partir de 3,5 minutos podem, em princípio, ser considerados endofíticos. Observa-se na mesma tabela que *Alternaria* sp está presente tanto na superfície externa, como no interior dos tecidos do hospedeiro. Este fato está de acordo com informações de RIESEN & SIEBER (1985), os quais afirmaram que epifíticos usualmente encontrados nas folhas, como *Aureobasidium pullulans*, *Alternaria* spp, *Cladosporium* spp e *Epicoccum purpurascens*, tornam-se endofíticos em folhas jovens e sadias para se protegerem da desidratação e irradiação. *Alternaria* spp juntamente com *Cladosporium* spp e *E. purpurascens* são considerados vigorosos invasores, capazes de penetrarem na epiderme dos hospedeiros. *Alternaria* spp pode crescer intercelularmente por um curto período de tempo ou, como já foi observado por O' DONNELL & DICKINSON (1980), em *Phaseolus vulgaris*, permanecer em estado latente na cavidade subestomatal.

TABELA 4- Porcentagem de fungos isolados do folíolo central de *Stylosanthes guianensis*, distribuidos em três diferentes intervalos de tempo de esterilização com NaOCl 3%.

	intervalos de tempo (minutos)		
taxon	0-2,5	3-5,5	6-10
Alternaria sp	12,7	28,6	11,8
Aspergillus sp	7,9	0,0	0,0
Drechslera sp	0,0	2,0	0,0
Glomerella cingulata	4,8	24,5	5,9
Guigniardia sp	0,0	2,0	0,0
Nigrospora oryzae	46,0	0,0	0,0
Nodulisporium sp	0,0	2,0	0,0
Penicillium sp	1,6	0,0	0,0
Xylaria sp	1,6	12,2	29,4
leveduras não identificadas	3,2	2,0	0,0
esteril	22,2	26,5	52,9

Quando os tempos de esterilização foram superiores a 5,5 minutos, observou-se diminuição da frequência de isolamento de alguns fungos, possivelmente pelo fato de que o NaOCl começou a penetrar no interior dos tecidos vegetais eliminando, parcial ou totalmente, também os endofíticos (PETRINI & MULLER, 1986). Esse fato não foi observado com *Xylaria* spp que, provavelmente, estava alojada em tecidos mais profundos e ficou protegido da ação do agente esterilizante.

Com base nas informações de literatura (RIESEN & SIEBER, 1985; PETRINI & MULLER, 1986; PETRINI, 1986; WELTY et al., 1986) e pelas observações do presente trabalho, optou-se pela escolha do tempo de 4 minutos de esterilização com NaOCl 3%, para isolamento dos fungos endofíticos de *S. guianensis* .

Treze espécies endofíticas foram isoladas de folhas de *S. guianensis* , PEREIRA et al. (1993). Na Tabela 5

encontram-se todos os isolados, apresentados por frequência de fragmentos infectados em relação `a origem das amostras. Ao todo foram analisados 600 fragmentos do folíolo central do hospedeiro.

TABELA 5- Porcentagem de fragmentos infectados por fungos endofíticos em *Stylosanthes guianensis*.

taxon	PJ	PM	NOJ	NOM	NOF	P2M	P4J	P4M	R4M
	(70)	(70)	(80)	(80)	(60)	(60)	(60)	(60)	(60)
Alternaria sp	0,3	1,4	0,3	7,8	0	3,5	0	6,5	0
Colletotrichum dematium (Pers.:Fr.)Grove	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0
Curvularia sp	0	0	0,3	1,3	0	0	0	0	0
Drechslera sp	0	0	0	0,8	0	0	0	0	0
Glomerella cingulata (Stonem.) Spauld. et Schrenk	3,1	15,4	0	0	2,5	0	2	2,5	0
Glomerella sp	0	1,7	0	0	0	0	0	2	0
Guigniardia sp	0	0	0	0	0	0	0	0,5	2
Nigrospora oryzae (Berk. et Br.) Petch	0	1,7	0	0	0	1,5	0	0	0
Nodulisporium sp	0	0	0	0	0	0	0	0,5	0
Periconia anam. *Didymosphaeria igniaria* (Booth)	1,4	0,9	0,3	0,5	2	0	0	0	0
Phomopsis sp	0	0,3	0,3	4	0	2	0	0	0
Sporormiella minima (Auersw.) Ahmed et Cain	0,3	1,1	0	0	0	0	0	0	0
Xylaria sp	1,7	6,3	0	0,5	4	0	0	7,5	0
estéril	5,7	8,3	0	7	3	13	0	11,5	9
Total	12,5	37,1	1,2	17,9	12	20	2	31	11

As letras maiúsculas no início das colunas indicam a origem dos fungos. P, Piracicaba; NO, Nova Odessa; F, amostras coletadas em fevereiro de 1991; M, folhas maduras; J, folhas jovens; 2, "seedling" com 2 meses; 4, "seedling" com 4 meses; R4, plantas regeneradas com 4 meses. Por exemplo: R4M, planta regenerada, 4 meses, folhas maduras. Entre parênteses encontra-se o nº de folíolos analisados. Micélio estéreil (sem estruturas de reprodução sexual ou assexual) não foram identificados.

A maioria dessas espécies constituem-se em raros isolados e somente *Glomerella cingulata* e *Xylaria* sp, que estão presentes em frequências altas, serão discutidos. Por outro

lado, um grande número de isolados com distintos caracteres morfológicos e provavelmente pertencendo a distintos taxa, permaneceram estéreis após exposição `a luz ultra-violeta. A frequência de infecção dos folíolos, como era de se esperar, aumentou com a idade da folha e com a maturidade da planta, o que está de acordo com outros resultados da literatura (PETRINI, 1991). Possivelmente, os fungos migram continuamente para dentro dos tecidos das plantas e, dentro do hospedeiro, tendem a espalhar-se para vários tecidos, sendo que um mesmo talo do fungo pode ser isolado de diferentes fragmentos. Por outro lado, análises de DNA de isolados de *Apiognomonia errabunda* (Rob.) von Hühnel mostraram que mais de um indivíduo pode colonizar uma mesma folha do hospedeiro (HÄMMERLI et al., 1992).

Xylaria sp está distribuída entre folhas jovens e velhas em uma faixa de 0-7,5 % de todos os fragmentos investigados (Figura 3). *Xylaria* spp tem sido encontrada com maior frequência entre os isolados endofíticos de hospedeiros tropicais (RODRIGUES & SAMUELS, 1990; RODRIGUES, 1992), que em hospedeiros de regiões temperadas. O significado da presença de *Xylaria* sp para este hospedeiro não está totalmente explicado e não se conhece qualquer sintoma de doença causado por *Xylaria* em *Stylosanthes*. Por outro lado, Xylariacae são capazes de utilizar celulose e lignina e poderiam ser patógenos latentes ou agir, após a morte dos tecidos vegetais, como decompositores (CARROL & PETRINI, 1983).

Alternaria sp, outro fungo isolado com certa frequência, não será objeto de discussão por não apresentar, conforme já mencionado anteriormente, um habitat totalmente definido.

Glomerella cingulata o teleomórfico de *Colletotrichum gloeosporioides*, (FIGURA 1 e 2) é um fungo ubíquo, sendo frequentemente isolado como endofítico de diferentes hospedeiros (RODRIGUES, 1992). Este fungo estava presente em plantas coletadas no campo e em casa de vegetação (Tabela 5 e Figura 3).

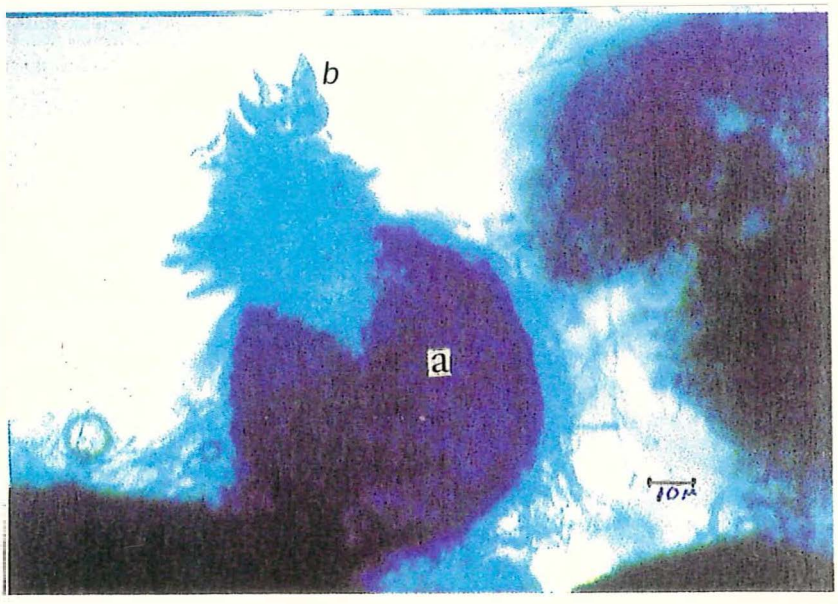


FIGURA 1 - *Glomerella cingulata*, teleomórfico de *Colletotrichum gloeosporioides*, endofítico isolado de folhas de *Stylosanthes guianensis*. Observar em a, peritécio; em b, asco e ascósporos.

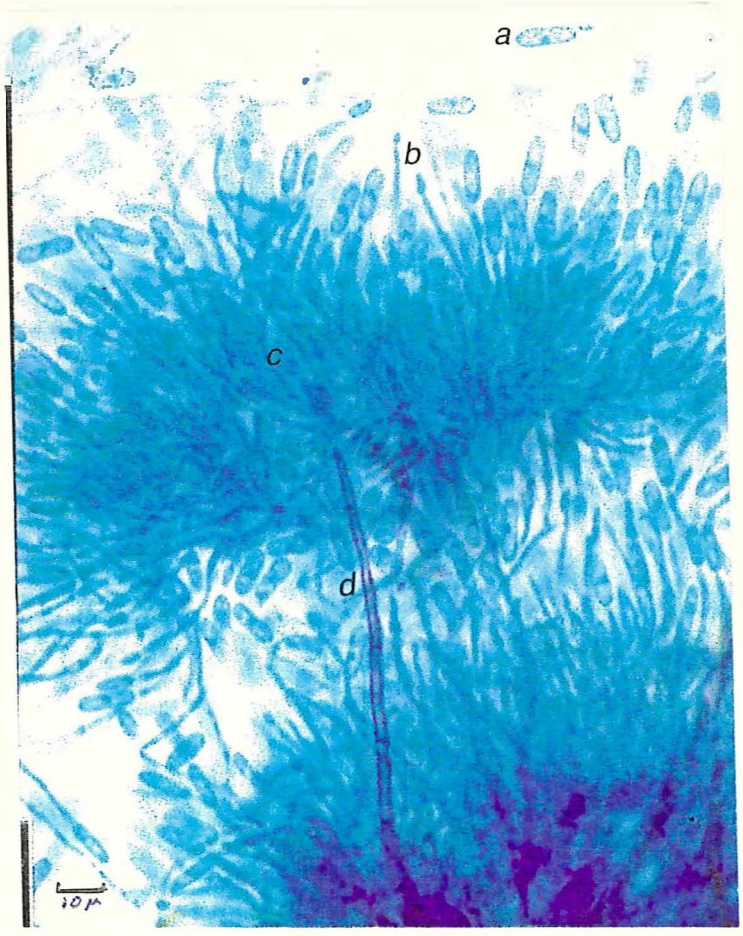


FIGURA 2 -A: ***Colletotrichum gloeosporioides,*** **endofítico isolado de** ***Stylosanthes guianensis*** **, observar em a, conídios maduros; em b, conídio em formação em um conidióforo típico; em c acérvulo em d, seta.**

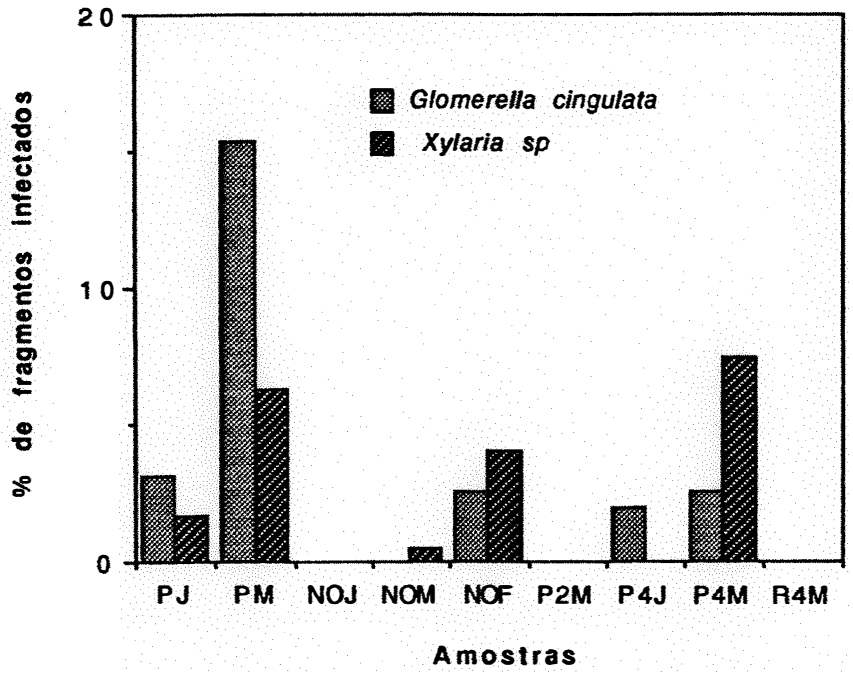


FIGURA 3- Gráfico de barras com as porcentagens de fragmentos de *Stylosanthes guianensis* infectados com os endofíticos *G. cingulata* e *Xylaria* sp. As letras maiúsculas na base das colunas indicam a origem dos fungos. P, Piracicaba; NO, Nova Odessa; F, amostras coletadas em fevereiro de 1991; M, folhas maduras; J, folhas jovens; 2, "seedling" com 2 meses; 4, "seedling" com 4 meses; R4, plantas regeneradas com 4 meses. Por exemplo: R4M, planta regenerada, 4 meses, folhas maduras.

A germinação dos conídios de *C. gloeosporioides* foi observada em folhas axênicas de *S. guianensis*, onde o fungo produziu apressórios, que são estruturas especializadas, responsáveis pelo processo de penetração nos tecidos do hospedeiro (Figura 4).

FIGURA 4-Conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* germinando em folhas de *Stylosanthes guianensis*: a, conídios; b, conídios germinando; c, apressório; d, superfície foliar; e, estómatos.

A possibilidade de que os isolados de *G. cingulata* obtidos neste estudo sejam não patogênicos ou de baixa patogenicidade não deve ser excluída, já que nas condições observadas não ficou provada a patogenicidade dos isolados. Deve ser lembrado, contudo, que todos os isolados foram provenientes de plantas com aparência sadia e de folhas, também, de aparência sadia.

Folhas de plantas regeneradas de cultura de calos não apresentaram *G. cingulata* em sua forma latente, o que sugere a possibilidade de uso de plantas regeneradas como um meio de se eliminar ou, pelo menos, diminuir parcialmente a quantidade de patógenos latentes em populações dessa planta. Quanto a esse aspecto, um fato importante deve ser considerado já que a transmissão do fungo ocorre facilmente no sentido horizontal e, fontes naturais de inóculo poderiam infectar, em campo, plantas inicialmente livres do fungo. Entre essas fontes de inóculos, merece destaque algumas plantas do mesmo hospedeiro com alto índice de infestação. Um experimento com uma única planta, com aparência sadia (Tabela 6), mostrou que em alguns casos, um único hospedeiro pode se constituir em um grande potencial de inóculos para outros hospedeiros.

TABELA 6- Fungos endofíticos isolados de uma única planta hospedeira de *Stylosanthes guianensis*.

	nº de isolados		
taxon	FM*	FJ**	total
Glomerella cingulata	54	7	61
Xylaria sp	22	6	28
Nigrospora oryzae	6	-	6
Glomerella sp	6	-	6
Alternaria sp	5	1	6
Sporormiella minima	4	1	5
Periconia sp	3	5	8
Phomopsis sp	1	-	1
esteril***	29	20	49
total	130	40	170

FM*= foram analisados 300 fragmentos de folhas maduras; FJ**= foram analisados 400 fragmentos de folhas jovens. ***= micélio que não produziu qualquer tipo de estrutura de reprodução (sexual ou assexual), não sendo possivel a sua identificação.

Existem outros exemplos que comprovam o isolamento de possíveis patógenos latentes, vivendo como endofíticos, em hospedeiros sadios (RIESEN & SIEBER ,1985). A presença desses conhecidos patógenos foi discutida por CARROL (1988), que não descartou a possibilidade de estar ocorrendo algum efeito mutualístico com algumas vantagens para o hospedeiro. Endofíticos podem atuar como antagonistas de patógenos verdadeiros (WHITE & COLE, 1985), bem como podem interagir ativamente no metabolismo das plantas (SMITH et al., 1985 e CHEPLICK et al, 1989), produzir substâncias importantes do ponto de vista farmacológico (STIRLE et al. 1993), ou constituirem-se, ainda, em vetores potenciais para a introdução de genes nos hospedeiros (MURRAY et al. 1992).

4.2. Fungos Endofíticos de *Musa cavendish*

Musa sp é um típico hospedeiro tropical, e por esse fato foi escolhida, nesta pesquisa, como uma das plantas hospedeiras, para o estudo de endofíticos.

Em decorrência da experiência adquirida com *S. guianensis*, tendo por base a literatura já citada anteriormente e, pela análise dos dados apresentados na Tabela 7, constatou-se que seria possivel isolar fungos endofíticos de folhas de bananeiras, também, após 4 minutos de esterilização com NaOCl 3%.

TABELA 7- Ocorrência de fungos em fragmentos de folhas de bananeira submetidos `a 16 diferentes tempos de esterilização com NaOCl 3%.

tempo (minutos)	nº de fragmentos analisados	ocorrência de fungos
0	25	+++
1,0	25	+++
1,5	20	+++
2,0	15	++
2,5	5	++
3,0	25	++
3,5	25	+
4,0	10	+
4,5	10	+
5,0	25	+
5,5	15	+
6,0	15	+
6,5	15	+
7,0	15	+
7,5	20	-
8,0	10	-

+++= crescimento de 5 ou mais tipos de fungos; ++= crescimento de 3 a 4 tipos de fungos; += crescimento de 1 ou 2 tipos de fungos- = ausência de crescimento

Os resultados apresentados na Tabela 7 são de plantas de campo, da área experimental da ESALQ. Esses resultados foram coletados de folhas jovens, de um bananal em fase de produção de frutos, formado de plantas adultas com 2 a 3 metros de altura. Nesse ensaio, os tempos de exposição ao hipoclorito de sódio 3%, variaram de 0 a 8 minutos e os fungos isolados não foram classificados; porém o ensaio evidencia a sua presença em tempos elevados de exposição ao NaOCl.

Em outro ensaio, procurou-se verificar a ocorrência de fungos em plantas de bananeira provenientes da micropropagação "in vitro". As plantas selecionadas tinham de 10 à 25 cm de altura e apresentavam aparência sadia. Todas as plantas estavam em casa de vegetação em fase de aclimatação e recebiam água em abundância. Neste ensaio, fragmentos de caules, bainhas e folhas foram esterilizados por processo ligeiramente modificado conforme pode ser visto na Tabela 8. Ficou evidente, no ensaio, a presença de fungos no interior dos três orgãos da planta. Provavelmente, o tempo de 2 meses, que as plantas permaneceram em casa de vegetação, foi suficiente para permitir que fossem colonizadas por fungos do ambiente.

TABELA 8- Ocorrência de fungos* em caules, bainhas e folhas de 10 plantas de bananeiras em casa de vegetação, após esterilização de superfície.**

taxon	caules (30)	bainhas (30)	folhas (35)
Alternaria sp	+	+	+
Aspergillus sp	+	-	-
Curvularia sp	-	-	+
Epicoccum sp	-	-	+
Trichoderma sp	+	-	-
estéril***	+	+	+

*= Isolamentos feitos em BDA + 100ug/ml de terramicina e incubados `a 28ºC por 7 dias. **= Detergente San Pic 5%, 20 minutos; NaOCl 3%, 10 minutos. Entre parênteses encontra-se o nº de fragmentos analisados. += ocorrência de fungos; -= ausência de fungos. *** Micélio não identificado, sem estruturas de reprodução (sexual ou assexual).

Contudo, conforme será discutido mais adiante (Figura 6), caules e bainhas de bananeira podem apresentar resultados falsos, em relação `a ocorrência de endofíticos, devido, possivelmente, `a presença abundante de latex e às sucessivas camadas característica da formação de pseudo caules das bananeiras.

A Tabela 9 apresenta os dados de isolamento de endofíticos de um bananal recém formado, composto de plantas jovens com altura de 1 a 1,5 metros. Dessas plantas, foram colhidas amostras de folhas parcialmente enroladas, muito jovens e de coloração verde claro. Como era esperado, a porcentagem de fragmentos infectados foi baixa (0-1,5%), porém, já evidencia a presença de conhecidos endofíticos, conforme será observado mais adiante (Tabela 10).

TABELA 9- Porcentagem de fragmentos de folhas de bananeiras infectados por fungos endofíticos*.

taxon	% de fragmentos com fungos
Alternaria sp	0,5
Fusarium sp	1,0
Humicola sp	0,5
Nigrospora oryzae	0,5
Penicillium sp	0,5
Periconia sp	0,5
Sporormiella minima	0,5
Xylaria sp	1,5
ascomiceto não identificado	0,5
estéril**	1,5

* amostra de 40 plantas jovens na ESALQ (20 fragmentos/planta). A esterilização foi feita com NaOCl 3% por 4 minutos. ** Micélio não identificado, sem estruturas de reprodução (sexual ou assexual).

A Tabela 10 apresenta uma relação dos fungos endofíticos isolados de plantas do Vale do Ribeira-SP. As amostras utilizadas nos ensaios foram colhidas de três locais diferentes do Vale: Miracatú, Juquiá e Registro. Esses municípios estão distribuidos ao longo da Rodovia Br 116. O Vale do Ribeira é conhecido como região produtora de bananas no Estado de São Paulo. Ao todo, 16 taxa foram isolados e identificados entre os 2400 fragmentos obtidos a partir de 120 plantas hospedeiras. Na soma dos isolados nas três regiões, destacam-se *Xylaria* sp, *Glomerella cingulata* e *Cordana musae* como os endofíticos de maior importância, com 172, 140 e 124 isolados respectivamente. *Xylaria* sp foi mais isolado em Miracatú, *G. cingulata* em Registro, enquanto que *Cordana musae* foi o endofítico mais isolado em Juquiá. A análise dos dados pelo teste de Friedman não revelou diferença entre os três locais. O nº de espécies isoladas, por local, variou de 9 a 13 e o nº de espécie por planta, de 1,6 a 2,8.

As plantações de banana estão sujeitas a uma ampla faixa de doenças e pragas (STOVER, 1980, SLABAUGH & GROVE, 1982). Entre as mais importantes doenças destaca-se o mal do Panamá causado pelo fungo *Fusarium oxysporium* f. sp. cubense (E.F.Sm.) Synd. & Hans. É importante registrar que em nenhum dos fragmentos ensaiados observou-se qualquer isolado desse patógeno.

TABELA 10- Nº e percentagem de fungos isolados, distribuidos por taxon e por local de coleta[1].

Taxon	Registro		Miracatú		Juquiá		total	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
Xylaria sp	(17)	2,1	(88)	11,0	(67)	8.4	(172)	7,2
G. cingulata	(46)	5,7	(32)	4,0	(62)	7,7	(140)	5,8
Cordana musae	(25)	3,1	(10)	1,2	(89)	11,1	(124)	5,2
N. orizae	(10)	1,2	(17)	2,1	(35)	4,4	(62)	2,6
E. purpurascens	(35)	4,4	(0)	0,0	(0)	0,0	(35)	1,4
Guigniardia sp[2]	(6)	0,7	(1)	0,1	(23)	2,9	(30)	1,2
S. minima	(14)	1,7	(3)	0,4	(7)	0,8	(24)	1,0
Drechslera sp	(21)	2,6	(0)	0,0	(2)	0,2	(23)	0,9
Fusarium sp	(13)	1,6	(0)	0,0	(1)	0,1	(14)	0,6
Curvularia sp	(4)	0,5	(1)	0,1	(4)	0,5	(9)	0,4
Phomopsis sp	(2)	0,2	(5)	0,6	(1)	0,1	(8)	0,3
Periconia sp	(0)	0,0	(0)	0,0	(6)	0,7	(6)	0,2
Aspergillus sp	(0)	0,0	(2)	0,2	(0)	0,0	(2)	0,08
Alternaria sp	(2)	0,2	(0)	0,0	(0)	0,0	(2)	0,08
Humicola sp	(0)	0,0	(0)	0,0	(1)	0,1	(1)	0,04
Trichoderma sp	(0)	0,0	(0)	0,0	(1)	0,1	(1)	0,04
ascomiceto não identificado	(1)	0,1	(0)	0,0	(0)	0,0	(1)	0,04
levedura não identificada	(0)	0,0	(1)	0,1	(0)	0,0	(1)	0,04
estéril	(47)	5,9	(23)	2,9	(18)	2,2	(88)	3,7
Total	(243)	30,0	(183)	22,8	(317)	39,3	(743)	30,9

1=Foram analisadas 40 plantas/local. De cada planta foram analisados 20 fragmentos, com um total de 800 fragmentos/local e 2400 ao todo, no Vale do Ribeira-SP.
2= Cultura bastante característica de *Guigniardia* sp (Petrini comunicação pessoal), e possivelmente trata-se *Guigniardia musae*, aguardando confirmação.

Caso se confirme, a presença de *Guigniardia sp*, possivelmente *Guigniardia musae* Raciborski, estaríamos diante de um possivel agente causador de manchas em banana, segundo PETRINI (comunicação pessoal).

Outra doença de importância econômica é causada por *Mycosphaerella musicola* (teleomórfico de *Cercospora musae*), responsável por manchas escuras características nas folhas, o mal de Sigatoka. Assim como no caso anterior, não se observou a presença do patógeno nas amostras ensaiadas. Estes resultados , em parte, são diferentes daqueles encontrados por SIEBER et al. (1988), quando estudaram 4 cultivares de trigo, e observaram que entre os isolados, um grupo era composto de patógenos conhecidos e economicamente importantes para o trigo.

O endofítico isolado com maior frequência em bananeiras foi *Xylaria* sp, principalmente em Miracatú e Juquiá (Figura 5). Neste caso, são válidas as mesmas observações já feitas anteriormente para o hospedeiro *S. guianensis* no item 4.1, ou seja, *Xylaria* sp é um endofítico isolado com frequência em hospedeiros de origem tropical (RODRIGUES & SAMUELS, 1990; RODRIGUES, 1992), capaz de utilizar tanto celulose como lignina (CARROL & PETRINI, 1983), sendo considerado um poderoso decompositor de matéria orgânica, provavelmente após a morte da planta.

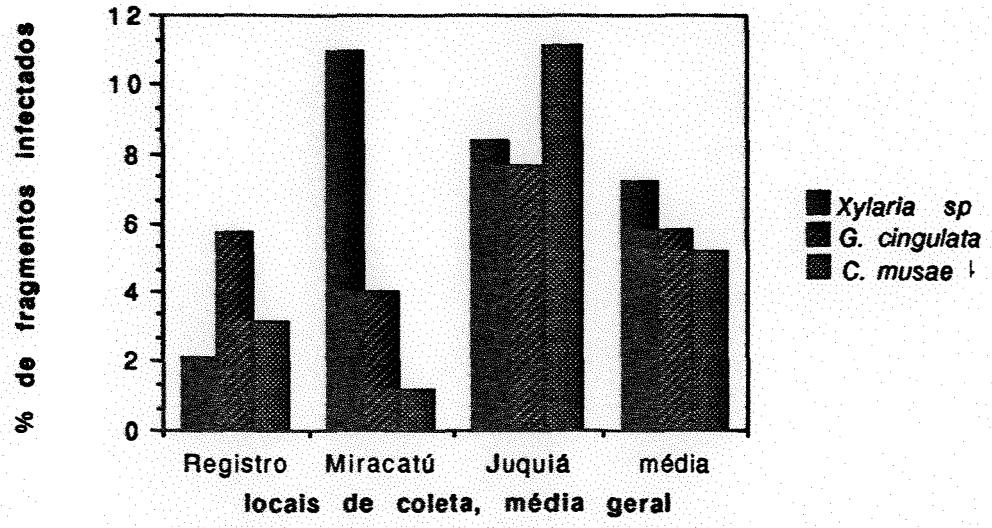


FIGURA 5- Gráfico de barras ilustrando os endofíticos mais frequentes (*Xylaria* sp, *Glomerella cingulata* e *Cordana musae*) isolados em Registro, Miracatú e Juquiá. Os valores correspondem `a % de fragmentos infectados em uma amostra de 800 fragmentos/local. Média geral dos três locais, corresponde `a 2400 fragmentos/Vale do Ribeira.

Segundo PETRINI & PETRINI (1985), a atividade da maioria dos fungos pertencentes ao grupo Xylariacae, ainda é obscura. A maioria deles é coletada de angiospermas mortas e algumas gimnospermas. O grupo das Xylariacae é conhecido principalmente pelas espécies saprófitas, embora, algumas espécies sejam consideradas parasitas fracos podendo causar danos em alguns hospedeiros (ROGERS, 1979). Existem outros registros na literatura em que espécies do grupo são descritas como endofíticas, vivendo sem apresentar sintomas em tecidos de plantas vivas, aparentemente sadias (PETRINI E MÜELLER, 1979). Quanto `a *G. cingulata*, o significado de sua presença em bananeiras demanda uma discussão mais detalhada. *G. cingulata* apresenta-se regularmente frequente nos três locais. Ele foi o segundo

endofítico mais frequente porém, não é considerado agente causal de doenças de importância econômica para o hospedeiro, mas é responsável pelo aparecimento de manchas escuras no fruto, no momento da comercialização. É comum observar-se a cor alaranjada, característica da esporulação do *C. gloeosporioides*, sobre manchas escuras em frutos muito amadurecidos. Provavelmente os frutos já saem contaminados do campo, por meio da migração do endofítico no interior dos tecidos vegetais. A comparação, por meio da análise de DNA, dos isolados endofíticos com aqueles isolados de manchas do fruto torna-se necessária para distinguir se trata-se de um mesmo talo ou não. A ocorrência de *C. gloeosporioides* entre os endofíticos de bananeira vem dar suporte `a ideia de que este endofítico é frequente em espécies tropicais (RODRIGUES, 1992; DREYFUSS & PETRINI, 1984). Sobre *Cordana musae*, o terceiro endofítico mais frequente, particularmente muito frequente em Juquiá (11,1%), pouco há que se possa comentar. Aparentemente não há registro de danos causados por esse fungo no hospedeiro, mas trata-se de um endofítico típico, assintomático e relativamente frequente, merecendo mais atenção em estudos posteriores sobre sua relação e significado em hospedeiros sadios. Outras informações sobre o gênero podem ser obtidas em HUGHES (1955).

O método utilizado para isolamento de endofíticos já foi ensaiado em vários outros trabalhos, PETRINI (1986, 1991) ou FISHER et al. (1992) sendo particularmente adequado para tecidos vegetais com superfícies lisas. Desse modo os fungos

isolados são representativos da população de bananeiras dos locais estudados. Contudo, uma ressalva deve ser feita com relação ao meio de cultivo empregado. O meio selecionado para o isolamento de endofíticos pode influenciar a frequência de recuperação de determinados endofíticos. Um grande número de meios se apresenta adequado para o isolamento (PETRINI,1986 e WELTY,1986) . Neste caso foi utilizado o Meio Completo de Pontecorvo (MC) PONTECORVO et al. (1953), um meio rico em nutrientes e adequado ao cultivo de um grande número de fungos. Alguns fungos, contudo, apresentam crescimento mais lento e podem ficar mascarados pelo crescimento dos fungos de crescimento mais rápido. BILLS & POLISHOOK (1991), em um trabalho de isolamento de fungos de *Carpinus caroliniana*, conseguiram diferentes números de isolados ao empregarem diferentes meios para o isolamento. Um dos meios empregados pelos autores era adequado para o isolamento de um maior número de endofíticos por planta, outros meios contendo diferentes combinações de nutrientes, ou algum agente de inibição permitiam o crescimento de alguns fungos raros. Contudo, um maior número de espécies/planta foi obtido com a combinação dos vários meios. Provavelmente, um número maior de isolados teria sido isolado caso outros meios também fossem utilizados nesse trabalho. Para diminuir outras fontes de variação no processo de isolamento dos endofíticos de bananeiras, todo o trabalho foi executado com soluções preparadas na hora e as amostras sempre foram processadas no menor tempo possível, após a coleta em campo. Esse procedimento é recomendado em outras referências de

literatura, porém, materiais considerados frescos são analisados com 24 horas após a coleta (FISHER et al., 1986, PETRINI e PETRINI 1989); ou até mesmo com 48 horas (STONE,1986).

4.3. ENSAIOS COM ENDOFÍTICO MUTANTE:

G. cingulata (Colletotrichum musae) foi escolhido, entre os endofíticos mais frequentes, isolados de folhas de bananeiras, para a realização de ensaios de infecção de plantas oriundas da cultura de tecido (plantas axênicas). Para que fosse possivel acompanhar e controlar esses ensaios, foram obtidos mutantes espontâneos, resistentes à fungicidas, a partir de um dos isolados selvagens,

4.3.1. Obtenção de mutantes de *C. musae* resistentes ao thiabendazole e ao benomil

Na Tabela 11, estão os dados do ensaio para determinação da dose mínima inibitória de thiabendazole ou 2-(4'-tiazolil) - benzimidazol, capaz de inibir o crescimento de *C. musae*. Conforme pode ser observado, a partir de 0,7 ug/ml do produto, já não há crescimento do fungo. Posteriormente, foram obtidos mutantes espontâneos resistentes ao fungicida. Os mutantes resistentes ao thiabendazole (*tr1* e *tr2*) foram facilmente obtidos quando uma concentração de 6,4 x10^6 conídios/ml foi colocada em uma placa de Petri contendo MC mais 1,4 µg/ml do fungicida. Na Tabela 12, os mutantes *tr1* e *tr2* foram ensaiados para doses maiores de thiabendazole. Ambos os mutantes apresentaram crescimento vigoroso até 5,0 ug/ml, que foi a dose mais elevada. Aparentemente trata-se de um excelente marcador genético,

devido ao contraste que apresenta com a linhagem selvagem. Na Tabela 13, os mutantes *tr1* e *tr2* foram ensaiados para verificação da ocorrência de resistência cruzada com Benomil, o que foi confirmado pela análise dos dados apresentados. Os mutantes *tr1* e *tr2* apresentaram níveis de resistência 100 vezes superior ao selvagem. Mutantes espontâneos de *G. cingulata* resistentes ao benomil, também foram obtidos. Nesse caso, empregou-se meio seletivo contendo 0.8 ug do produto por ml de meio de cultivo. A concentração de conídios utilizada foi de 4.4 x 10^7 conídios/ml para a linhagem selvagem P1 e 5.1 x 10^7 para a linhagem P10. Foram isolados 11 mutantes, a partir do isolado selvagem P10, os quais foram denominados de *br1* até *br11*. Por outro lado, não foi obtido nenhum mutante com a linhagem P1 quando submetida `as mesmas condições de seleção. Na Tabela 14, encontram-se os dados relativos `a resistência cruzada, onde os mutantes *br1* e *br5* também apresentaram-se resistentes ao thiabendazole. Mutantes resistentes foram escolhidos pela facilidade que apresentam para ser isolados e porque, usualmente, são bons marcadores genéticos. Todos os mutantes obtidos foram estáveis sendo que as marcas de resistência persistiram por inúmeras repicagens e por vários meses de estoque, tanto em placas ou tubos como em água destilada. Desse modo, alguns desses mutantes (*tr1* , *br5*), foram selecionados juntamente com as linhagens selvagens (P1 e P10), como marcadores nos ensaios de inoculação em laboratório. Os mutantes *tr1* e *br5* são morfologicamente semelhantes.

TABELA 11- Determinação da dose mínima de thiabendazole necessária para inibir o crescimento* de *Glomerella cingulata*.

doses µg/ml											
0,0	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6
++++	++++	++++	+++-	+++-	++--	----	----	----	----	----	----

++++ = crescimento intenso; +++ = crescimento menos intenso que o anterior; ++-- = pouco crescimento; ---- = ausência de crescimento.

TABELA 12- Caracterização dos mutantes de *Glomerella cingulata* ao thiabendazole.

	doses µg/ml						
	0,0	1,5	2,0	2,5	3,0	4,0	5,0
P1	++++	-	-	-	_	-	-
tr1	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
tr2	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

++++ = crescimento vigoroso do fungo; - = ausência de crescimento

TABELA 13- Verificação da ocorrência de resistência cruzada dos mutantes tr1 e tr2 de *Glomerella cingulata* com benomil: metil-1-(butilcarbamoil)-2-benzimidazol-carbamato.

	doses de benomil µg/ml									
	0,0	0,02	0,04	0,06	0,1	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
P 1	+ + + +	+ + + +	+ + - -	-	-	-	-	-	-	-
tr 1	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
tr 2	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +

++++ = crescimento vigoroso do fungo; ++ = crescimento fraco; - = ausência de crescimento.

TABELA 14- Verificação da ocorrência de resistência cruzada dos mutantes *b r 1* e *b r 5* de *Glomerella cingulata*, com thiabendazole.

	doses de thiabendazole µgml			
	0,0	1,0	3,0	5,0
br 1	+	+	+	+
br 5	+	+	+	+
P1 e P10	-	-	-	-

+ = crescimento do fungo; - = ausência de crescimento

Os mutantes foram selecionados com o objetivo de se verificar o efeito de um único gene, de resistência, na capacidade de penetração do endofítico nos tecidos vegetais. Nos ensaios de infecção, as linhagens selvagens, P1 e P10, foram utilizadas como controle. A linhagem P1 é morfologicamente distinta dos mutantes *tr1* e *br5*, e foi utilizada para facilitar a triagem dos isolados nos ensaios de inoculação/reisolamento (Figura 6 A). Por outro lado, apesar de facilitar o trabalho de laboratório, a linhagem P1 estava introduzindo uma nova variável nos ensaios, que era justamente a diferença morfológica com a linhagem controle. Por esse motivo, a linhagem selvagem P10, morfologicamente não distinguível dos mutantes *tr1* e *br5* (Figura 6 B) também foi selecionada como controle nos ensaios de inoculação "in vitro".

Os ensaios de inoculação foram precedidos por dois experimentos para controle do processo. Primeiro, sobre a eficiência do processo de esterilização nas condições do ensaio em laboratório (item 4.3.2.) Nesse caso, procurou-se verificar se o pseudo-caule, pecíolo e a folhas da planta, seriam eficazmente esterilizados após a inoculação de grande quantidade de inóculo (10^6 conídios/ml). O outro controle, foi sobre a percentagem de germinação dos conídios de todas as linhagens envolvidas nos ensaios de inoculação (item 4.3.3.).

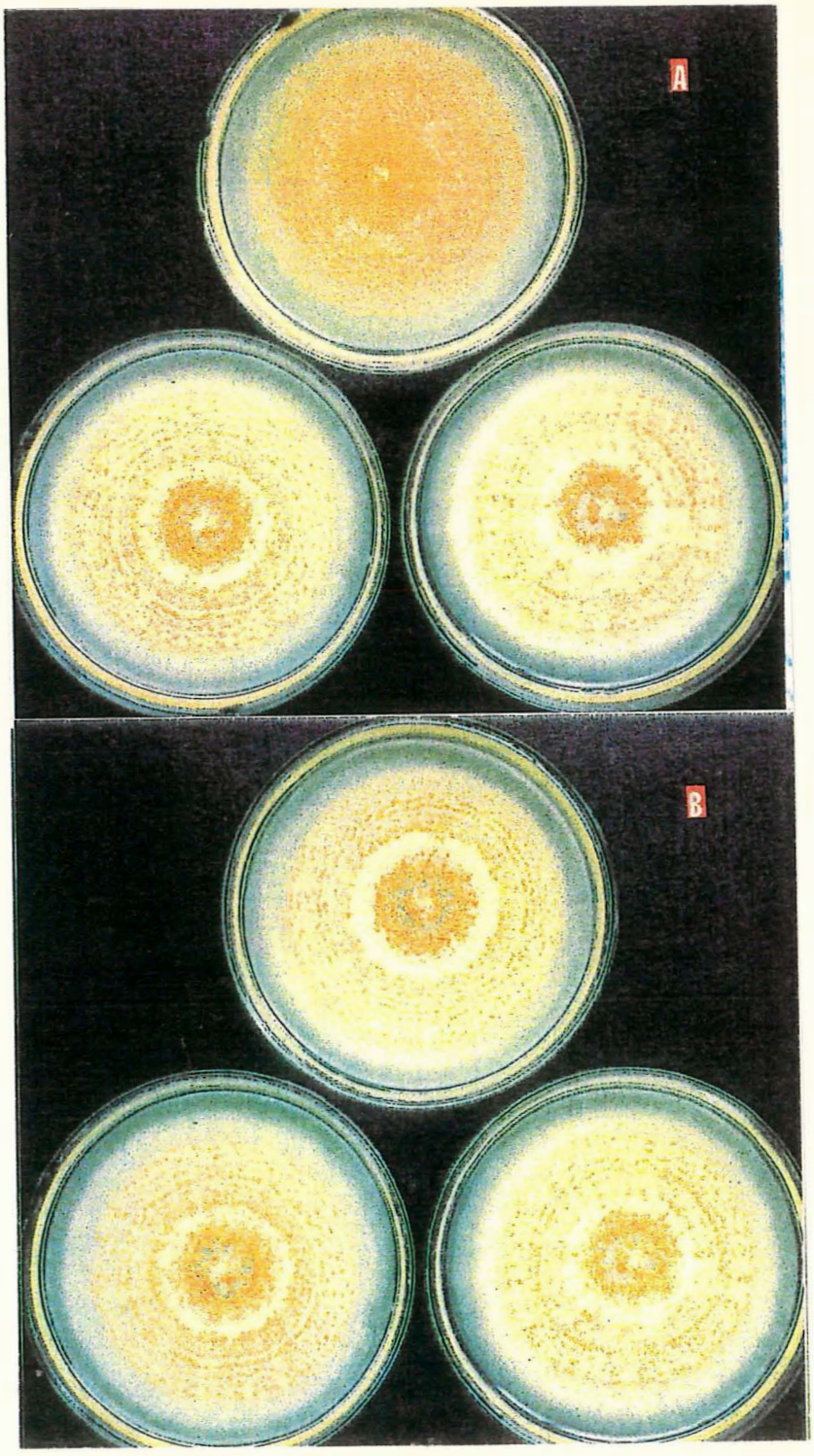


FIGURA 6. (A, B). Em A, linhagem selvagem P1 (em cima) de *C. musae* e mutantes *tr1* (direita), e *br5* (esquerda). Em B, linhagem selvagem P10 (em cima) e mutantes *tr1* (direita) e *br5* (esquerda), utilizadas nos ensaios de inoculação "in vitro".

4.3.2. Esterilização de fragmentos infectados in "vitro"

O controle da esterilização de superfície, dos fragmentos inoculados "in vitro", foi feito com todas as linhagens utilizadas nos ensaios, P1, P10, *tr1* , *br5* mais um mutante morfológico, *f2l*. Os diferentes tecidos de bananeira foram banhados com uma suspensão de conídios dos fungos, esterilizados superficialmente dentro de 1 a 4 horas após a inoculação, cortados em 5 fragmentos e distribuidos, em série, na superfície de placas de petri, contendo MC (Figura 7).

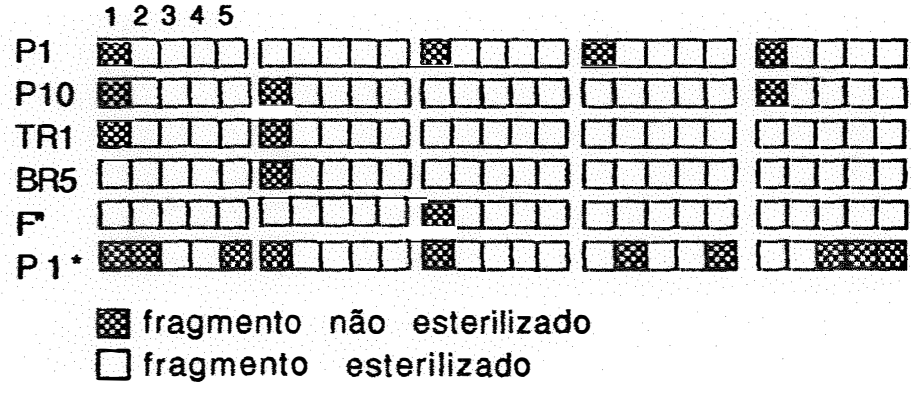


FIGURA 7. Esquema representativo da eficácia da esterilização de folhas, pecíolos e pseudo-caules de bananeira com NaOCl 3%, 4 minutos. As linhagens de fungos utilizadas (P1, P10, *tr1*, *br5*, *f2l*), foram inoculadas, por imersão, em uma suspensão de 10^6 conídios/ml. Estão representadas 5 folhas (repetições), sendo cada folha cortada em 5 fragmentos.

A Figura 7, apresenta um esquema com os resultados desse ensaio. No caso, a folha da bananeira está representada pelo conjunto de 5 quadrados, os quais foram subdivididos, na horizontal, em 5 pequenos fragmentos. O fragmento 1, corresponde à extremidade da folha contendo parte do pecíolo, e o fragmento 5, corresponde à extremidade distal ao pecíolo. Para cada linhagem do fungo, está representado um ensaio com 5 folhas. Em P1*, as folhas foram substituídas por pseudo-caules. O processo de esterilização não foi eficaz para os fragmentos que continham parte do pecíolo (fragmento nº1). O crescimento do fungo a partir da extremidade do pecíolo indica que, de alguma forma, o exudato produzido por esse fragmento pode proteger os conídios da ação do NaOCl. Aparentemente o mesmo ocorre na linha P1*, onde empregou-se pseudo-caules, que além de produzirem quantidade abundante de exudatos, também são formados por camadas laminares que podem abrigar os conídios e protegê-los da ação do cloro. ECKERT & OGAVA (1985), já haviam registrado que conídios de fungos podem penetrar vários milímetros no elementos vasculares de tecidos de bananeiras.

4.3.3. Ensaios de germinação

As percentagens de germinação dos conídios de todas as linhagens em estudo, foram ensaiadas em placas de Petri contendo MC e em folhas axênicas, destacadas de plantas cultivadas "in vitro". Os resultados desses ensaios estão na

Tabelas15 e 16 (A,B e C). A Figura 8, ilustra a germinação dos conídios de *C. musae* em folhas axênicas de *M. cavendish*..

Tabela 15. Percentagem de germinação* de conídios de *Colletotrichum musae* em MC e em folhas axênicas de *Musa cavendish*.**

linhagens	média em placas	média em folhas
P1	98,6 a	85,6 cd
P10	98,7 a	83,4 d
TR1	99,0 a	90,3 bc
BR5	94,6 ab	92,1 b

* Foram ensaiadas 10 amostras contendo 100 conídios por amostra. ** Linhagens selvagens (P1 e P10) e mutantes (*tr1* e *br5*) do isolado endofítico. DMS= 6,43. Os valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente.

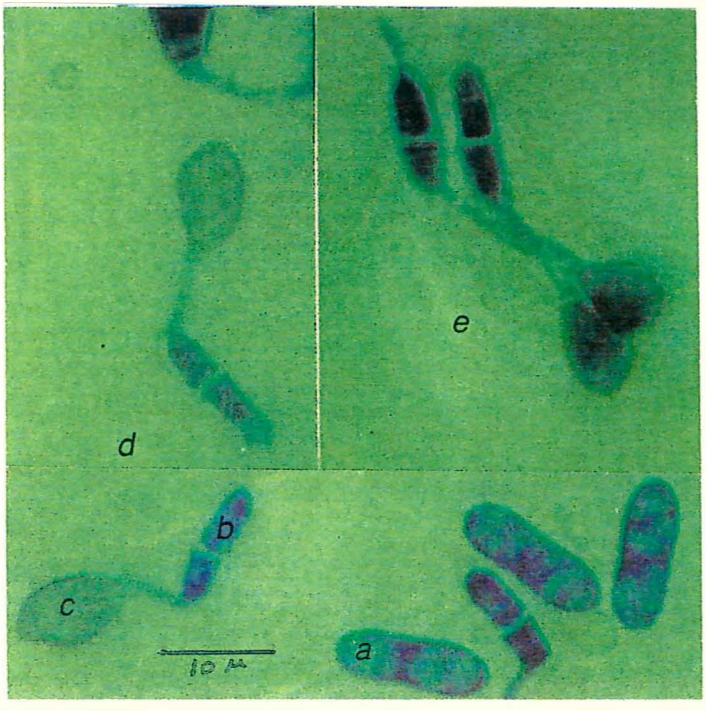


Figura 8. Conídios de *Colletotrichum musae* em folhas axênicas de *Musa cavendish*. a, conídio; b, conídio germinando; c, apressório; d, superfície foliar; e, estómatos.

Tabela 16 (A,B e C). Análise da variância da percentagem de germinação de conídios de *Colletotrichum musae* em MC e em folhas axênicas de *Musa cavendish*.

16.A.Análise da variância.

FV	GL	QM
Tratamentos	7	580,796**
Fungo (F)	3	68,219 *
Meio (M)	1	3210,844**
FxM	3	216,691**
Resíduo	72	

16.B. Primeiro desdobramento.

FV	GL	QM
Tratamento	7	580,7963**
Fungo	3	68,2189 *
Meio/P1	1	1240,2022**
Meio/P10	1	1670,7554**
Meio/TR1	1	896,8087**
Meio/BR5	1	53,1510n.s.
Resíduo	72	21,1209

16.C. Segundo desdobramento.

FV	GL	QM
Tratamentos	7	580,7963**
Fungo/Folha	3	124,7307**
Fungo/Placa	3	160,1793**
Meio	1	3210,8441**
Resíduo	72	21,1209

*= 5%, **= 1% de significância

4.3.4. Ensaios preliminares de infecção

Os ensaios preliminares de inoculação foram realizados para observação do tempo necessário para que as hifas de *C. musae* penetrassem nos tecidos vegetais. Desse modo foram feitos ensaios onde as plantas inoculadas permaneceram incubadas por 7, 14 e 21 dias. Com 7 dias (Tabela 17), já foi possível notar a presença da linhagem selvagem P1, em todos os três genótipos ensaiados. O mutante *tr1* também foi observado no interior dos clones VR4 e VR7. Com 14 dias de incubação, tanto a linhagem selvagem como o mutante *tr1* foram encontradas nos três genótipos ensaiados. Após 21 dias de incubação, os fungos continuavam no interior dos tecidos das plantas porém, houve dificuldade em identificar quais folhas foram previamente inoculadas. O crescimento intenso do fungo nos frascos de ensaio, algumas vezes, encobriu as folhas inoculadas, prejudicando a interpretação dos resultados. Como pode ser observado na Tabela 17 (com 21 dias de incubação), o número de folhas analisadas foi sempre menor que o de folhas inoculadas. Quando foram observadas as percentagens de infecção, os valores para 21 dias chegaram a ser menores em relação aos de 14 dias de incubação, provavelmente, devido ao erro na identificação da folha ensaiada. A interpretação desses resultados preliminares contribuíram para que fosse definido o tempo de 14 dias de incubação para os demais ensaios.

TABELA 17- Número e percentagem* de fragmentos infectados, após Inoculação de uma linhagen selvagem (P1) e de uma mutante *tr1*, ambas de *Colletotrichum musae*, em folhas axênicas de bananeira (clones VR4,VR7 e L), incubadas em três tempos diferentes (7, 14 e 21 dias), por meio de uma suspensão de 5,4 x 10^6 e 5,5 x 10^6 conídios/ml, para a linhagem P1 e *tr1* respectivamente.

tempo	7 dias						14 dias						21 dias					
genótipo	VR4		VR7		L		VR4		VR7		L		VR4		VR7		L	
nº de frag.**	20	{20}	20	{20}	20	{10}	20	{20}	20	{20}	20	{15}	20	{5}	20	{15}	20	{15}
P1	(3)	15,0	(3)	15,0	(2)	20,0	(3)	15,0	(5)	25,0	(8)	53,3	(2)	40,0	(2)	13,3	(6)	40,0
tr1	(2)	10,0	(2)	10,0	(0)	0,0	(11)	55,0	(12)	60,0	(6)	40,0	(3)	60,0	(4)	26.6	(8)	53,3
Total	(5)	25,0	(4)	20,0	(2)	20,0	(12)	60,0	(15)	75,0	(11)	73,3	(4)	80,0	(6)	40,0	(12)	80,0
			(a)				(b)		(b)		(c)		(a)				(b)	

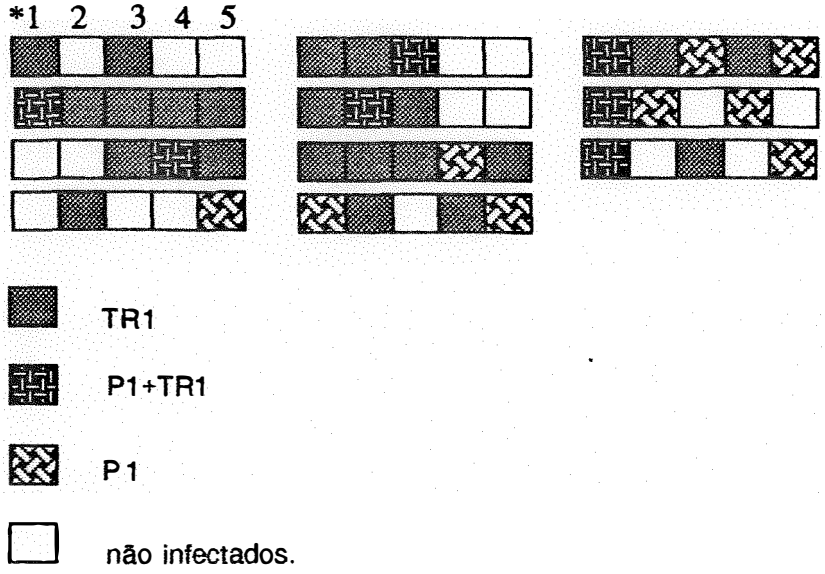
*= percentagem de fragmentos calculada em relação ao nº de fragmentos analizados. **=nº de fragmentos inoculados seguido do nº de fragmentos analisados (entre chaves), quanto `a presença ou ausência de endofíticos. a= um dos fragmentos continha as duas linhagens do fungo; b=dois dos fragmentos continham as duas linhagens do fungo; c=três dos fragmentos continham as duas linhagens do fungo;

A percentagem de fragmentos infectados "in vitro" (Tabela 17) foi visivelmente maior que os valores observados para as plantas de campo (Tabela 10), onde a maior percentagem foi observada em plantas de Juquiá com 7,7% de fragmentos infectados.

Vários fatores podem estar contribuindo para a obtenção de um grande nº de fragmentos infectados no laboratório; primeiro, o fato de que os fragmentos ensaiados "in vitro", foram maiores que os das plantas de campo, fato que, a princípio, dificulta ou impede a comparação entre as duas amostras. As plantas "in vitro" tiveram as folhas destacadas, as quais foram, cortadas por inteiro e inoculadas na superfície do MC. Algumas vezes, essas folhas tinham área foliar 2 a 3 vezes maior que a área dos fragmentos de campo; segundo, as condições "in vitro", com umidade relativa próxima de 100%, favorecem a germinação dos conídios e o desenvolvimento dos fungos; terceiro, a total falta de competição com outros microrganismos, nos ensaios de laboratório, certamente favoreceu o estabelecimento da infecção. Outro fator determinante no processo de infecção foi o potencial de inóculo utilizado (uma suspensão de 10^6 conídios/ml de tween 0,1%). O controle da germinação dos conídios, em MC e sobre folhas de bananeiras, também foi ensaiado e será discutido no item 4.3.3.

A distribuição espacial das duas linhagens dos fungos, no interior dos tecidos das folhas de bananeira, pode ser observada na Figura 9 que representa, de modo esquemático, os resultados correspondentes a 14 dias de inoculação localizados na

Tabela 17. Considerando-se que as folhas foram cortadas e distribuídas de modo seriado, na superfície do MC, foi possível mapear a exata posição de cada um dos isolados, após a esterilização da superfície das folhas.



* o fragmento 1 está localizado próximo ao pecíolo e o fragmento 5 é o distal em relação ao pecíolo. Inóculo= 5,4 x 10^6 e 5,5 x 10^6 para P1 e TR1 respectivamente.

FIGURA 9- Distribuição espacial dos endofíticos em folhas de bananeiras inoculadas "in vitro" com quantidades iguais de conídios da linhagem selvagem P1 e com o mutante *tr1*, de *Colletotrichum musae*. Cada conjunto de 5 quadrados, na horizontal, representa uma folha de bananeira. Cada quadrado representa um dos fragmentos em que a folha foi recortada. Estão representadas 11 folhas (repetições).

A Figura 9 foi escolhida para ilustrar os fatos mencionados na Tabela 16, onde mais de um fungo pode ser isolado a partir de um mesmo fragmento. A identificação individual de cada um dos fragmentos auxilia o acompanhamento, passo a passo, do processo de colonização dos tecidos do hospedeiro, inicialmente axênico. Este procedimento, muito simples, poderá ser utilisado para a triagem de um determinado microrganismo, capaz de produzir uma colonização efetiva da planta e que possa ser empregado em ensaios de vetores genéticos. Um esquema semelhante ao da Figura 9, foi apresentado por ESPINOSA-GARCIA & LANGENHEIM (1990), em um estudo sobre os endofíticos de *Sequoia sempervirens* (D. Don ex Lamb.) Endl. na California Central, USA. No caso, tratava-se de um padrão de distribuição natural dos fungos, determinado por fatores múltiplos, tais como, microclima, infecções prévias, alterações químicas no hospedeiro além de outros eventos ao acaso. O padrão da distribuição dos fungos é um fator muito importante na interação da planta com herbívoros e patógenos. Algumas vezes, o resultado da interação resulta em vantagens seletivas ora para a planta (conforme amplamente demonstrado para *Lolium* e *Festuca* entre outras), ora para os herbívoros (KIRFMAN et al., 1986) ou patógenos (WHITE & COLE, 1985), determinando especificidade nas interações. ESPINOSA -GARCIA & LANGENHEIM (1990) afirmaram que os endofíticos, transformando a planta em um verdadeiro mosáico de substrato, podem modificar favoravel ou desfavoravelmente a qualidade da folha para seus consumidores. Parece evidente que este fato, tem influência direta no

metabolismo do hospedeiro, modificando-o ou induzindo modificações nos mais variados aspectos que se queira analizar (controle biológico, produção de fármacos, nutrição, balanço energético entre outros).

4.3.5. Ensaios de infecção

A frequência de infecção de folhas de bananeiras, "in vitro", foi obtida em ensaios envolvendo linhagens selvagens (P1 e P10) e mutantes (*tr1* e *br5*), ambas de *Colletotrichum musae*, endofítico isolado de folhas de bananeiras coletadas no Vale do Ribeira. O mutante *tr1* , foi ensaiado, em competição, com a linhagen selvagem P1 (Tabela 18.A). O ensaio foi feito em 11 frascos (repetições), onde quatro folhas foram inoculadas em cada frasco. Após a inoculação e incubação por 14 dias, cada folha foi cortada em 20 fragmentos, os quais foram analizados quanto à presença das duas linhagens do fungo. O mesmo procedimento foi feito nos ensaios entre a linhagem selvagem P10 e o mutante *tr1* (Tabela 18.B) e entre P10 e o mutante *br5* (Tabela 18.C). Os resultados apresentados nas Tabelas 18.A e 18.B, indicam a superioridade do mutante *tr1* , em relação às linhagens selvagens, quanto à capacidade de colonizar a planta hospedeira. O mutante foi recuperado mais frequentemente entre os isolados que penetraram nas folhas do hospedeiro. A linhagen selvagem P1 (Figura 6 A), é ligeiramente distinta da linhagem mutante *tr1* . Por esse motivo o ensaio de competição entre essas duas linhagens (Tabela 18.A), foi

repetido, utilizando-se a linhagem selvagem P10 (Figura 6 B), morfologicamente não distinguível do mutante *tr1* (Tabela 18.B). Todas as linhagens empregadas nos ensaios são originárias de um único isolado (*Glomerella cingulata*, isolado nº 17 do local Registro, Tabela 10). A confirmação da vantagem apresentada pelo mutante *tr1* , morfologicamente idêntico à linhagem controle, descarta a possibilidade de ocorrência de interferência morfológica nos ensaios. Possivelmente, por efeito pleiotrópico do gene para resistência, o fungicida thiabendazole selecionou, também, uma linhagem mais agressiva quanto à capacidade de penetração no hospedeiro. A maior agressividade do mutante *tr1* , se confirmada em ensaios de campo, poderá selecionar patógenos resistentes e mais agressivos aos seus hospedeiros. O mutante *br5*, apesar de apresentar resistência cruzada com *tr1* , não apresentou vantagem sobre a linhagem selvagem P10 (Tabela 18.C). Os valores médios das frequências de infecção, comparados pelo teste t, estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 1% (A,B e C). Isolamento de *Colletotrichum musae* de folhas de bananeiras (clone VR4), inoculadas com isolados endofíticos, selvagens (P1 e P10) e mutantes (*tr1* e *br5*), após 14 dias de incubação. As inoculações foram feitas, em folhas axênicas, com 3µl de uma mistura de duas linhagens; em A, P1+*tr1* em B, P10+*tr1* e em C, P10+*br5* Em seguida ao número encontra-se, entre parênteses, a percentagem de fragmentos infectados com as respectivas linhagens.

A) Concentração de conídios por ml, P1 = 9.55 x 10^6; *tr1* = 9,50 x 10^6

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Total
P1	4 (20)	1 (5)	1(5)	1(5)	3(15)	2 (10)	4 (20)	3(15)	1(5)	1(5)	1(5)	22(10)
TR1	7 (35)	11(55)	4(20)	6(30)	3(15)	10(50)	19(95)	6(30)	2(10)	6(30)	9(45)	83(37.7)
Total	11(55)	12(60)	5(25)	7(35)	6(30)	12(60)	23 (115)	9(45)	3(15)	7(35)	10(50)	105(47.7

B) Concentração de conídios por ml, P10 = 7,97 x 10^6; *tr1* = 7,75 x 10^6

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Total
P10	3 (15)	5 (25)	5 (25)	2(10)	13(65)	5(25)	1(5)	4(20)	12(60)	9 (45)	6 (30)	65(29.5)
tr1	15(75)	23(115)	9 (45)	6(30)	6 (30)	8(40)	8(40)	2(10)	14(70)	9 (45)	13(65)	113(51.3
Total	18(90)	28(140)	14(70)	8(40)	19(95)	13(65)	9(45)	6(30)	26 (130)	18(90)	19(95)	193(87.7

C) Concentração de conídios por ml, P10 = 7,97 x 10^6; *br5* = 7,67 x 10^6

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Total
P10	6(30)	4(20)	8 (40)	5 (25)	4(20)	7(35)	12(60)	6 (30)	2(10)	8 (40)	9 (45)	71(32.3)
br5	3(15	2(10)	2 (10)	5 (25)	5(25)	1(5)	4 (20)	7 (35)	4(20)	9 (45)	6 (30)	48(21.8)
Total	9(45)	6(30)	10(50)	10(50)	9(45)	8(40)	16 (80)	13(65)	6(30)	17(85)	15(75)	71(32.3)

Tabela 19. Frequências de infecção obtidas após a inoculação, "in vitro", de *Colletotrichum musae (linhagem selvagem P1 e mutantes *tr1* e *br5*), em folhas axênicas de bananeira.**

Linhagem do fungo e inóculo*	Média** n = 11	t	nível de significância
P1 (9.55 x 10^6)	2,000 ± 1,265	{3,764	0,001
tr1 (9,50 x 10^6)	7,543 ± 4,719		
P10 (7,97 x 10^6)	5,909 ± 3,885	{2,100	0,049
tr1 (7,75 x 10^6)	10,273 ± 5,694		
P10 (7,97 x 10^6)	6,455 ± 2,770	{1,900	0,072
br5 (7,67 x 10^6)	4,364 ± 2,378		

* Foram inoculados 3 µl da suspensão de conídios, entre parenteses, por folha ensaiada. Cada uma das 11 repetições foi composta de 4 folhas. Cada folha foi dividida em 5 fragmentos num total de 20 fragmentos por repetição. ** Nº de fragmentos com fungo, em relação aos 20 fragmentos ensaiados em cada repetição.

Os fungicidas do grupo benzimidazol apresentam aplicação cada vez mais ampla na agricultura. O modo de ação desses fungicidas assemelha-se `a colchicina, um metabólito secundário de plantas. Esses compostos atuam nas divisões celulares ligando-se `a tubulina, o maior componente dos microtúbulos. Desse modo, ocorre a inibição da formação do fuso que é composto de microtúbulos, e consequentemente desorganizam as divisões celulares . O mecanismo de resistência aos fungicidas

benzimidazois foi bem estudado em *Aspergillus nidulans*. Nesse fungo, três loci estão envolvidos com a resistência: *benA*, *benB* e *benC* (DAVIDSE, 1986). Microtúbulos, juntamente com filamentos intermediários, microfilamentos ou microfilamentos de actina, são os maiores componentes do citoesqueleto, uma característica das células eucarióticas. O mutante *trl* provavelmente teve algum tipo de alteração, funcional ou estrutural, dando como consequência alguma alteração na capacidade de aderência dos conídios na superfície celular, ou na capacidade de penetração no interior dos tecidos vegetais, quer seja por meio de maior eficiência de ação mecânica ao nivel de apressórios, quer seja por ação química produzindo moléculas específicas ou, excretando enzimas envolvidas nos processos de aderência e penetração dos conídios no hospedeiro. Os tecidos vegetais são colonizados pelos fungos após uma sequência de passos complexos que incluem o reconhecimento do hospedeiro pelo fungo invasor, aderência na superfície do hospedeiro, germinação dos esporos, penetração na epiderme e colonização dos tecidos. Muitos desses processos tem sido estudados para uma série de fungos fitopatogênicos (JONES & AYRES, 1974; BOURETT & HOWARD, 1990) ou micorrízicos. Todas as etapas da colonização, em maior ou menor extensão segundo TOTI et al. (1992) determinam a especificidade na interação fungo /planta, porém para a grande maioria dos casos, o processo é desconhecido, sendo necessários novos experimentos de germinação e infecção com mutantes específicos para um melhor entendimento dos vários aspectos envolvidos.

5. CONCLUSOES

1. Constatou-se a presença de fungos endofíticos nos dois hospedeiros tropicais ensaiados, *Stylosanthes guianensis* e *Musae cavendish*, sendo que, em ambos os hospedeiros, poucos endofíticos predominaram entre os demais isolados, encontrados em frequências baixas.

2. *Colletotrichum gloeosporioides*, teleomórfico de *Glomerella cingulata*, o agente causal de antracnose em *Stylosanthes guianensis*, foi encontrado como um fungo endofítico em folhas sadias, coletadas de plantas com ausência de sintomas de doença.

3. *Colletotrichum musae*, teleomórfico de *Glomerella cingulata*, um fungo fitopatogênico de bananeiras e responsável pelo aparecimento de manchas pretas nos frutos e tecidos adjacentes, aparece regularmente distribuído entre as plantas sadias de Registro, Juquiá e Miracatú, cidades localizadas no Vale do Ribeira, uma região produtora de bananas do Estado de São Paulo.

4. Plantas originadas de senentes germinadas "in vitro", assim como plantas regeneradas em cultura de tecidos, mesmo, a partir de folhas jovens, coletadas em campo, de hospedeiros com alta infestação de endofíticos são totalmente axênicas, sendo, no entanto, passíveis de reinfecção por vários fungos do ambiente de casa de vegetação ou de campo.

5. *Xylaria* sp, encontrado entres isolados de *Stylosanthes* e *Musa,* é frequente entre os endofíticos de hospedeiros tropicais.

6. Foi possivel infectar as plantas axênicas, obtidas por meio de micropropagação, com a linhagem selvagem de *Colletotrichum musae,* isolada de campo e com mutantes espontâneos obtidos a partir da linhagem selvagem.

7. Os mutantes espontâneos, apresentando resistência cruzada aos fungicidas thiabendazole e benomil, não apresentaram os mesmos resultados em ensaios de infecção realizados "in vitro".

8. O fato de um dos mutantes resistente à fungicida ser mais eficiente que o isolado selvagem, quanto à capacidade de penetração e colonização dos tecidos das plantas, sugere a existência de um gene de resistência, de efeito pleiotrópico.

9. Ensaios de campo, com mutantes resistentes à fungicidas são necessários para observação da possibilidade de seleção de linhagens, fitopatogênicas ou não, porém, mais eficientes na colonização da planta.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ARX, J. A. von. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. Phytopatologische Zeitschrift, Berlin, 29 (4): 413-68, 1957.

ARX, J. A. von. A revision of the fungi described as *Gloeosporium*. Vaduz, J. Cramer, 1970. 203p.

ARX, J. A. von. The genera of fungi sporulating in pure culture. Vaduz, J. Cramer, 1974. 315p.

AZEVEDO, J. L. & COSTA, S. O. P. Exercícios práticos de genética. São Paulo, Nacional, 1973. 288p.

BACON, C. W. Isolation, culture, and maintenance of endophytic fungi of grasses. In: LABEDA, D. P. Isolation of biotechnological organisms from nature. New York, Mac Graw-Hill, 1990. cap.10, p.259-82.

BARNETT, H. C. & HUNTER, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. 3º ed. Mineapolis, Burgess Publ., 1972. 241p.

BERNSTEIN, M. E. & CARROL, G. C. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 55: 644-53, 1977.

BILLS, G. F. & POLLISHOOK, J. D. Microfungi from *Carpinus caroliniana*. Canadiam Journal of Botany, Ottawa, 69: 1477-82, 1991.

BONDE, M. R. ; PETERSON, G. L. ; MAAS, J. L. Isozyme comparisions for *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. Phytopathology, Lancaster, 81:1523-8,1991.

BOURETT, T. M. & HOWARD, R. J. In vitro development of penetration structures of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 68: 329-42, 1990.

CABRAL, D. Phyllosphere of *Eucalyptus viminalus*: dynamics of fungal populations. Transactions of the Britisch Mycological Society, London, 85: 501-11, 1985.

CARROL, G. C. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N. J. & HEUVEL, J. van den., ed. Microbiology of phyllosphere. London, Cambridge University Press, 1986. p. 205-22.

CARROL, G. C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. Ecology, Brooklyn, 69: 2-9, 1988.

CARROL, G. C. & CARROL, F. E. Studies on the incidance of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. Canadian Journal of Botany, Otawa, 56: 3132-43, 1978.

CARROL, G. C. & PETRINI, O. Patterns of substrate utilization by some endophytes from coniferous foliage. Mycologia, Lancaster, 75: 53-63, 1983.

CERKAUSKAS, R. F. Latent colonization by *Colletotrichum* spp.: epidemiological considerations and implications for mycoherbicides. Canadiam Journal of Plant Pathology, Otawa, 10: 297-310, 1988.

CHAKRABORTY, S.; PETTITT, A. N.; CAMERON, D. F.; IRWIN, J. A. G.; DAVIS, R. D. Anthracnose development in pure and mixed

stands of the pasture legume *Stylosanthes scabra*. Phytopathology, Lancaster, 81: 788-93, 1991.

CHAPELA, I. H.; PETRINI, O.; PETRINI, L. E. Unusual ascospore germination in *Hypoxylon fragiforme*: first steps in the establishment of an endophytic symbiosis. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 68: 2571-5, 1990.

CHEPLICK, G. P.; CLAY, K.; MARKS, S. Interactions between infection by endophytic fingi and nutrient limitation in grasses *Lolium perene* and *Festuca arundinaceae*. New Phytologist, Cambridge, 111: 89-97, 1989.

CLARK, C. L.; MILLER, J. D.; WHITNEY, N. J. Toxicity of conifer needle endophytes to spruce budworm. Mycological Research, Cambridge, 93: 508-12, 1989.

CLAY, K. Grass endophytes. In: FOKKEMA, N. J. & HEUVEL, J. van den., ed. Microbiology of phyllosphere. London, Cambridge University Press, 1986. p.188-204.

CLAY, K. Clavicipitaceous fungal endophytes of grasses: coevolution and the change from parasitism to mutualism. In: PIROZYNSKI, K. A. & HAWKSWORTH, D. L., ed. Coevolution of fungi with plants and animals. London, Academic Press, 1988. p.79-105.

CLAY, K. Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potencial as biocontrol agents. Mycological Research, Cambridge, 92: 1-12, 1989.

COSTA, N. M. S. & FERREIRA, M. B. Some braziliam species of *Stylosanthes*. In: STACE, H. M. & EDYE, L. A. ed. The biology

and agronomy of *Stylosanthes*. Sydney, Academic Press, 1984. p. 23-48.

COSTONIS, A. C.; SINCLAIR, W. A.; ZYCHA, H. Infection of detached needles of *Pinus strobus* and *P. sylvestris* by *Lophodermium pinastri*. Phytopathology, Lancaster, 67: 352-60, 1970.

CUNNINGHAM, J. E. & KUIACK, C. Esterase activity as a marker for sporulation in Colletotrichum gloesporioides f. sp. *malvae* in submerged culture. Mycological Research, Cambridge, 93: 236-9, 1989.

DALE, J. L.; MANNERS, J, M.; IRWIN, J. A. G. *Colletotrichum gloesporioides* isolates causing different anthracnose diseases on *Stylosanthes* in Australia carry distinct double-stranded RNAs. Transactions of the British Mycological Society, London, 91: 671-6, 1988.

DAVIDSE, L. C. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, 24: 43-65, 1986.

DAVIS, R. D.; IRWIN, J. A. G.; SHEPHERD, R. K.; CAMERON, D. F. Yield losses caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in three species of *Stylosanthes*. Australian Journal Experimental Agriculture, East Melbourne, 27, 67-72, 1987.

DICKMAN, M. B. Whole cell transformation of the alfafa fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. Current Genetics, Berlin, 14: 241-6, 1988.

DREYFUSS, M. & PETRINI, O. Further investigations on the occurrence and distribution of endophytic fungi in tropical plants. Botanica Helvetica, Basel, 94: 33-40, 1984.

ECKERT, J. W. & OGAWA, J. M. The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. Annual Review of phytopathology, Palo Alto, 23: 421-54, 1985.

ELLIS, M. B. Dematiaceous hyphomycetes. Surrey, Commonwealth Mycological Institut, 1971. 608p.

ELLIS, M. B. More dematiaceous hyphomycetes. Surrey, Commonwelth Mycological Institut, 1976. 507p.

ESPINOSA-GARCIA, F. J. & LANGENHEIM, J. H. The endophytic fungal community in leaves of a coastal redwood population-diversity and spatial patterns. New Phytologist, Cambridge, 116: 89-97, 1990.

FAHEY, J. W. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. in: Cutler, H. O., ed. Biologically active natural products: potential use agriculture. Washington, ACS Symposium Ser., 380, 1988. p.120-8.

FERREIRA, M. B. & COSTA, N. M. S. O gênero *Stylosanthes* no Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte, EPAMIG, 1977. 38p.

FISHER, P. J.; ANSON, A. E.; PETRINI, O. Antibiotic activity of some endophytic fungi from ericaceous plants. Botanica Helvetica, Basel, 94: 249-53, 1984a.

FISHER, P. J.; ANSON, A. E.; PETRINI, O. Novel antibiotic activity of an endophyte *Cryptoporiopsis* sp isolated from *Vaccinium*

myrtillus. Transactions of the British Mycological Society, London, 83: 145-8, 1984b.

FISHER, P. J.; ANSON, A. E.; PETRINI, O. Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. Transactions of the British Mycological Society, London, 86: 153-6, 1986.

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

GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPENSTEDT, R. M.; STEPHEN, M. P.; TEIXEIRA, K. R. S.; DÖBEREINER, L.; DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen acetic bacterium associated with sugarcane. International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, 39: 361-4, 1989.

GREENE, G. L. & GOOS, R. D. Fungi associated with crown rot of boxed bananas. Phytopathology, Lancaster, 53: 271-5, 1963.

HAMER, J. E.; HOWARD, R. J.; CHUMLEY, F. G.; VALENT, B. A mecanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. Science, Washington, 239: 288-90, 1988.

HÄMMERLI, U. A.; BRÄNDLE, U.E.; PETRINI, O.; McDERMOTT, J. M. Differentiation of isolates of *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomonia errabunda*) from beech, chestnut and oak using RAPD markers. Molecular Plant-Microbe Interactions,St. Paul, 5: 479-83, 1992.

HELANDER, M. L. & RANTIO-LEHTIMÄKI. Effects of watering and simulated acid rain on quantity of phyllosphere fungi of Birch leaves. Microbial Ecology, New York, 19: 119-25, 1990.

HUGHES, S. J. Microfungi I. *Cordana*, *Brachysporium*, *Phragmocephala*. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 33: 259-268, 1955.

HYMOWITZ, T. Collection and evaluation of tropical and subtropical Brazilian forage legumes. Tropical Agriculture, London, 48: 309-15, 1971.

IRWIN, J. A. G.; CAMERON, D. F.; LENNE, J. M. Responses of *Stylosanthes* to antracnose. In: STACE, H. M. & EDYE, L. A., ed. The biology and agronomy of *Stylosanthes*. Sydney, Academic Press, 1984. p.295-310.

JEFFRIES, P. & DODD, J. C. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. Plant Pathology, London, 39: 343-66, 1990.

JONES, P. & AYRES, P. G. Rhynchosporium leaf blotch of barley studied during the subcuticular phase by electron microscopy. Physiological Plant Pathology, London, 4: 229-33, 1974.

KIRFMAN, G. W.; BRANDENBURG, R. L.; GARNER, G. B. Relationship between insect abundance and endophyte infestation level in tall fescue in Missouri. Journal of Kansas Entomological Society, Manhattan, 59: 552-4, 1986.

KULICK, M. M. Symptomless infection, persistence, and production of pycnidia in host and non-host plants by *Phomopsis batatae*, *Phomopsis phaseoli*, and *Phomopsis sojae* and taxonomic implication. Mycologia, Lancaster, 76: 274-91,1984.

KUNOH, H.; MATSUZAKI, N.; YAMAOKA, N.; ISHIZAKI, N. Several factors affecting regeneration and reversion of protoplast of

Colletoctricum lagenarium . Transaction. of the Mycological Society Japan, Tokyo, 27: 247-56, 1986.

LATCH, G. C. M. & CHRISTENSEN, M. J. Artificial infection of grasses with endophytes. Annals of Applied Biology, Wellesbourne, 107: 17-24, 1985.

LATCH ,G. C. M.; CHRISTENSEN, M. J.; SAMUELS, G. J. Five endophytes of *Lolium* and *Festuca* in New Zealand. Mycotaxon, Ithaca, 20, 535-50, 1984.

LEGAUT, D.; DESSUREAUT, M.; LAFLAMME, G. Mycoflore des aiguilles de *Pinus banksiana* et *Pinus resinosa*. I. Champignons endophytes. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 67: 2052-60, 1989a.

LEGAUT, D.; DESSUREAUT, M; LAFLAME, G. Mycoflora of *Pinus banksiana* and *Pinus resinosa* needles. II. Epiphytic fungi. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 67: 2061-65, 1989b.

LENNÉ J. M. & BURDON, J. J. Preliminary study of virulence and isozymic variation in natural populations of *Colletoctrichum gloesporioides* from *Stylosanthes guianensis*. Phytopathology, Lancaster, 80: 728-31, 1990.

LENNÉ, J.M. & CALDERON, M. A. Disease and pest problems of *Stylosanthes*. In: STACE, H. M. & EDYE, L. A. ed. The biology and agronomy of *Stylosanthes*. Sydney, Academic Press, 1984. p.279-93.

LEUCHTMANN, A. & CLAY, K. Isozyme variation in the *Acremonium epichloë* fungal endophyte complex. Phytophatology, Lancaster, 80: 1133-9, 1990.

MANNETJE, L. Consideration on the taxonomy of the genus *Stylosanthes*. In: STACE, H. M. & EDYE, L. A. ed. The biology and agronomy of *Stylosanthes*. Sydney, Academic Press, 1984. p.1-12.

MARTINEZ, J. A. Doenças da bananeira; Treinamento sobre bananicultura. Carpina, EMBRAPA, 1982. 69p.

MARTINS, P. S. Aspectos da biologia de populações de leguminosas herbáceas brasileiras. In: AGUIAR-PERECIN, M.L.R.; MARTINS, P. S.;BANDEL, G. ed. Tópicos de citogenética e evolução de plantas. Piracicaba, Sociedade Brasileira de Genética, 1984. p.173-84.

MARTINS, P. S. & VELLO, N. A. Performance and variability of agronomic characters in populations of *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) SW. In: International Grassland Congress, 14, Lexington, 1981. Proceedings. Kentucky, 1981. p.196-8.

MASEL, A. M.; IRWING, J. A. G.; MANNERS, J. M. DNA addition or deletion is associated with a major karyotype polymorphism in the fungal phytopathogen *Colletoctrichum gloeosporioides*. Molecular General. Genetics. Berlin, 237: 73-80 , 1993.

MASEL, A. M.; BRAITHWAITE, J. K.; IRWIN, J.; MANNERS, J. Highly variable molecular karyotypes in the plant pathogen *Colletotrichum gloesporioides*. Current Genetics. New York, 18: 81-6, 1990.

MEIJER, E. G. M. & SZABADOS, L. Cell and tissue culture of *Stylosanthes* spp. In: BAJAJ, Y. P. S. Legumes and oilseed crops I. London, Springer Verlag, 1990. p. 312-22. (Biotecnology in Agriculture and Forestry, 10).

MUIRHEAD, I. F. & DEVERALL, B. J. Role of appressoria in latent infection of banana fruits by *Colletotrichum musae*. Physiological Plant Pathology, London, 19 : 77-84 ,1981.

MURASHIGE , T. & SKOOG, F. A revised method for rapid growth and bioassays with tobaco tissue cultures. Physiologia Plantarum, Kobenhayn, 15: 473-9, 1962.

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, Berlin, 233: 1-9 ,1992.

O' DONNELL, J. & DICKINSON, C.H. Pathogenicity of *Alternaria* and *Cladosporium* isolates on *Phaseolus*. Transaction of the British Mycological Society, London, 74: 335-42, 1980.

OGLE, H. J.; IRWIN ,J. A. G.; CAMERON, D.F. Biology of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from tropical pasture legumes. Australian Journal of Botany, East Melbourne, 34: 537-50 , 1986.

PANACCIONE, D. G. ; MCKIERNAN, M.; MANAU, R.M. *Colletotrichum graminicola* Transformed with Homologous and Heterologous Benomyl- Resistance Genes Retains Expected Pathogenicity to Corn. Molecular Plant- Microbe Interactions, St. Paul, 3: 113-20, 1988 .

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes* : a first report. Mycologia, Lancaster, 85: 362-4, 1993.

PETERSON, R. L.; HOWARTH, M. J.; WHITTIER D. P. Interactions between a fungal endophyte and gametophyte cells in *Psilotum nudum*. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 59: 711-20, 1981.

PETRINI, L. E, & PETRINI, O. Xylariaceous fungi as endophytes, Sydowia, Horn, 38: 216-34, 1985.

PETRINI, L. E. & PETRINI, O. Recovery of endophytes of Abies balsameae from needles and galls of *Paradiplosis tumiflex*. Phytoprotection, Montreal, 70: 97-103, 1989.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKEMA, N. J. & HEUVEL, J. van den., ed. Microbiology of the phyllosphere. London, Cambridge University Press, 1986. P.157-87.

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

PETRINI, O. & CARROL, G. Endophitic fungi in foliage of some *Cupressaceae* in Oregon. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 59: 629-36,1981.

PETRINI, O. & DREYFUS, M. Endophytische Pilze in epiphytischen Araceae, Bromeliaceae, und Orchiaceae. Sydowia, Horn, 34: 135-48,1981.

PETRINI, O. & MÜLLER, E. Haupt- und Nebenfruchtformen Europäischer Pilze. Mycologia Helvetica, Basel, 1: 501-627, 1986.

PETRINI, O.; PETRINI, L. E.; QUELLETE, G. B. Recovery of endophytes of Abies balsamea from nedles and galls of Paradiplosis tumiflex. Phytoprotection, Montreal, 70: 97-103, 1989.

PETRINI, O.; STONE, J. K.; CARROL,F. E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 60: 789-96, 1982.

REIS, M. S. & MARTINS, P. S. Caracterização morfológica do fruto de espécies de *Stylosanthes* e controle da produção mensal de sementes. Revista Ceres, Viçosa, 36: 336-47, 1989.

RIESEN, T. & SIEBER, T. Endophytic fungi in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Endophytische Pilze von Winterweizen (*Triticum estivum* L.). Zürich, 1985. (PhD). Eidgemössische Techmische Hochshule (ETH).

RODRIGUES, K. F. Endophytic fungi in tropical palm *Euterpe oleracea* Mart. New York, 1992. (PhD). City University of New York.

RODRIGUES, K. F. & SAMUELS, G. J. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. Mycological Research, Cambridge, 94: 827-30, 1990.

RODRIGUES, R. J. & YODER, O. C. Selectable genes for transformation of the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* f. sp. phaseoli (*Colletotrichum lindemuthianum*). Gene, Amsterdan, 54: 73-81, 1987.

ROGERS, J. D. The *Xylaliacea*: systematic, biological and evolutionary aspects. Mycologia, Lancaster, 71: 1-42, 1979.

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

SCHARDL, C. L.; LIU, J.; WHITE, J. F,; FINKEL, R. A.;AN, Z.; SIEGEL, M. Molecular phylogenetic relationships of nonpathogenic grass mycosymbionts and clavicipitaceous plant pathogens. Plant Systematics and Evolution, Vienna, 178: 27-41, 1991.

SIEBER-CANAVESI, F.; PETRINI, O.; SIEBER, T. N. Endophytic leptostroma species on *Picea abies, Abies alba*, and *Abies balsamea*: a cultural, biochemical, and numerical study. Mycologia, Lancaster, 83: 89-96, 1991.

SIEBER, T. N.; SIEBER -CANAVESI, F.; DORWORTH, C. E. Endophytic fungi of red alder (*Almus rubra*) leaves and twigs in British Columbia. Canadian Journal of Botany, Ottawa, 69: 407-11, 1991.

SIEBER, T.; RIESEN, T. K.; MÜLLER, E.; FRIED, P. M. Endophytic fungi in four winter wheat cultivaras (*Triticum aestivum* L.) differing in resistance against *Stagonospora nodorum* (Berck.) Cast. & Germ. = *Septoria nodorum* (Berck.) Berck. Journal Phytopathology, Berlin, 122: 289-306, 1988.

SIEGEL, M.R. DAHLMAN, D. L.; BUSH, L. P. The role of endophytic fungi in grasses: new approaches to biological control of pests. In: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Integrated pest management for turfgrass and ornamentals. Washington, 1989. p.169-86.

TEBEEST, D. O. & WEIDEMANN, G. J. Preparation and regeneration of protoplasts of *Colletotrichum gloesporioides* f. aschynomene. Mycologia, Lancaster, 82: 249-55, 1990.

TEBESST, D. O.; SHILLING, C. W.; RILEY, H. L.; WEIDEMANN, G. J. The number of nuclei in spores of three species of *Colletotrichum*. Mycologia, Lancaster, 81: 147-49, 1989.

THRURSTON, H. D. Tropical plant diseases. St. Paul, APS, 1984. 208p.

TOTI, L.; VIRET, O.; CHAPELA, I. H.; PETRINI, O. Differential attachment by conidia of the endophyte, *Discula umbrinella* (Berk. & Br.) Morelet, to host and non-host surfaces. New Phytologist, Cambridge, 121: 469-75, 1992.

VIEIRA, M. L. C. Estudo citotaxonômico de espécies brasileiras do gênero *Stylosanthes*. Piracicaba. 1988. 135p. (Doutorado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz/USP.

VIEIRA, M. L. C.; JONES, B.; COCKING, E. C.; DAVEY, M. R. Plant regeneration from protoplasts isolated from seedling cotyledon of *Stylosanthes guianensis*, *S. scabra* and *S. macrocephala*. Plant Cell Peport, New York, 9: 289-92, 1991.

WEBBER, J. A natural control of Dutch elm disease. Nature, London, 292: 449-51, 1981.

WEBBER, J. & GIBBIS, J. N. Colonization of elm bark by *Phomopsis oblonga*. Transactions of the British Mycological Society, London, 82: 348-52, 1984.

WELTY, R. E.; AZEVEDO, M. D.; COOK, K. L. Detecting viable *Acremonium* endophytes in leaf sheaths and meristems of tall