

TAIDES TAVARES DOS SANTOS

**FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Phaseolus vulgaris*
EXIBEM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
POTENCIAL PARA CONTROLE DE FITOPATÓGENOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S237f
2014 Santos, Taides Tavares dos, 1990-
Fungos endofíticos de *Phaseolus vulgaris* exibem atividade
antimicrobiana e potencial para controle de fitopatógenos /
Taides Tavares dos Santos. – Viçosa, MG, 2014.
x, 96f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marisa Vieira de Queiroz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Fungos endofíticos. 2. Controle de fitopatógenos.
3. Variabilidade genética. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-graduação em
Microbiologia Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 579.51785

TAIDES TAVARES DOS SANTOS

**FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Phaseolus vulgaris*
EXIBEM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
POTENCIAL PARA CONTROLE DE FITOPATÓGENOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de fevereiro de 2014.

Humberto Josué de Oliveira Ramos

Olinto Liparini Pereira
(Coorientador)

Marisa Vieira de Queiroz
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Ao autor da vida, Deus, por ter me guiado, dado forças e capacidade para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Edson e Maria José, pelo apoio incondicional, pela paciência e compreensão que me dedicaram, que foram cruciais para que eu pudesse vencer mais essa etapa da vida.

Aos meus irmãos, Elson, Elcia e Taisa, que sempre estiveram ao meu lado, fossem quais fossem as circunstâncias.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, por me possibilitarem a realização desse curso de mestrado.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo suporte financeiro a essa pesquisa.

À minha orientadora, Prof^a. Marisa Vieira de Queiroz, por ter aceitado me orientar nesse curso de mestrado; agradeço por toda a paciência e empenho dedicado, que foram muito importantes para a realização deste trabalho.

Aos meus coorientadores, Prof^a. Elza Fernandes de Araújo, Prof. Leandro Licursi de Oliveira e Prof. Olinto Liparini Pereira, por todo o apoio e cooperação.

À Prof^a. Maria Cristina Dantas Vanetti, por possibilitar que parte dos experimentos dessa dissertação pudessem ser realizados em seu laboratório.

Aos componentes da banca, Prof. Humberto Josué de Oliveira Ramos e Prof. Olinto Liparini Pereira, por terem aceitado o convite para participar da defesa dessa dissertação e por todas as contribuições para a melhoria deste trabalho.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da UFV, em especial a Edmo Rodrigues, Mariana Alvim, Conrado Vieira, Leonardo Lourenço, Felipe de Almeida e Pricila Palla, pela parceria e incentivo durante esse período de convivência. Agradecimento especial ao Conrado, pelo auxílio na análise estatística dos dados.

A todos os colegas do Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos, que foram pessoas importantes para que eu pudesse chegar até aqui.

Um agradecimento especial aos colegas de laboratório Tiago Leite, Augusto Velozo, Naira Borges e Casley Queiroz, por terem cooperado na execução de experimentos e discussões de resultados desse trabalho. Obrigado pela paciência, disponibilidade e parceria.

Aos amigos de república: Antonio Xavier, Edmo Rodrigues, Sérgio de Carvalho e Tércia Vargas. Vocês foram a extensão da minha família em Viçosa.

A todos os integrantes do Grupo de Oração Universitário Imaculado Coração de Maria, pela amizade, incentivo e companheirismo durante essa jornada.

Aos professores do Departamento de Microbiologia da UFV, por todos os ensinamentos nas disciplinas, pelo incentivo e apoio.

Aos profissionais técnicos do Departamento de Microbiologia da UFV, que sempre estiveram disponíveis, nos bastidores, contribuindo para a que as pesquisas desse departamento continuem sempre indo adiante.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse realizado, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

TAIDES TAVARES DOS SANTOS, filho de Edson Tavares dos Santos e Maria José dos Santos, nasceu em 27 de junho de 1990, em Araguaína, no Estado do Tocantins.

Em fevereiro de 2008, iniciou o curso de Farmácia Generalista no Instituto Tocantinense Presidente Antônio Carlos, graduando-se como Bacharel em janeiro de 2012.

Em fevereiro de 2012, ingressou no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, no nível de Mestrado, defendendo sua dissertação em fevereiro de 2014.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	01
CAPÍTULO I: Aplicações biotecnológicas e benefícios da interação entre fungos endofíticos e seus hospedeiros.....	03
1. Conceito e abrangência do termo “fungo endofítico” e desenvolvimento da interação entre esses micro-organismos e vegetais.....	03
2. Isolamento de fungos endofíticos.....	04
3. Benefícios que os fungos endofíticos podem proporcionar aos hospedeiros.....	05
4. Metabólitos secundários de interesse biotecnológico, produzidos por fungos endofíticos.....	06
5. Fungos endofíticos como agentes de controle biológico de fitopatógenos.....	09
6. Considerações finais.....	09
7. Referências.....	09
CAPÍTULO II: Antagonismo a fitopatógenos e atividade antimicrobiana de fungos endofíticos do feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	19
1. Introdução.....	20
2. Material e métodos.....	23
2.1. Micro-organismos.....	23
2.2. Ensaio de cultura dupla (fungos endofíticos x fitopatógenos).....	25
2.3. Obtenção de extratos brutos de metabólitos fúngicos por meio de fermentação no estado sólido.....	26
2.4. Avaliação de atividade antibacteriana dos extratos de metabólitos...	27
2.5. Avaliação de atividade antifúngica dos extratos de metabólitos.....	28
3. Resultados.....	29
4. Discussão.....	38
5. Agradecimentos.....	43

6. Referências.....	44
CAPÍTULO III: Variabilidade genética de fungos do gênero <i>Diaporthe</i>	
isolados como endofíticos de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	53
1. Introdução.....	54
2. Material e métodos.....	57
2.1. Micro-organismos.....	57
2.2. Morfologia da colônia e avaliação do crescimento micelial de fungos do gênero <i>Diaporthe</i>	57
2.3. Extração de DNA, amplificação e sequenciamento.....	58
2.4. Análise filogenética.....	60
2.5. <i>Fingerprinting</i> baseado nos marcadores IRAP e REMAP.....	64
3. Resultados.....	65
4. Discussão.....	73
5. Agradecimentos.....	77
6. Referências.....	78
CONCLUSÕES GERAIS.....	85

RESUMO

SANTOS, Taides Tavares dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Fungos endofíticos de *Phaseolus vulgaris* exibem atividade antimicrobiana e potencial para controle de fitopatógenos.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Coorientadores: Elza Fernandes de Araújo, Leandro Licursi de Oliveira e Olinto Liparini Pereira.

Fungos endofíticos são aqueles que vivem, em pelo menos uma parte de seu ciclo de vida, no interior de tecidos vegetais, sem causar aparentemente qualquer dano a seus hospedeiros. Esses micro-organismos têm sido estudados em relação à capacidade de produzirem metabólitos secundários de interesse biotecnológico e quanto ao potencial de controle biológico de fitopatógenos. Fungos endofíticos já foram isolados de uma ampla variedade de espécies vegetais, incluindo culturas agrícolas como o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). O gênero *Diaporthe* foi um dos mais abundantes na comunidade endofítica dessa leguminosa. Os objetivos do presente estudo foram avaliar a atividade antimicrobiana e o potencial de uso de fungos endofíticos de *P. vulgaris* no controle de fitopatógenos da cultura do feijoeiro e analisar as relações filogenéticas e a variabilidade genética de fungos endofíticos do gênero *Diaporthe* isolados de *P. vulgaris*. Ensaio de cultura dupla entre 90 isolados endofíticos e quatro fungos fitopatogênicos (*Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*) foram realizados para verificar a capacidade dos isolados endofíticos inibirem o crescimento dos fitopatógenos. Os isolados que foram capazes de inibir os quatro fitopatógenos testados foram selecionados para cultivo e obtenção de extratos brutos de metabólitos. Esses extratos foram avaliados quanto à atividade antibacteriana e antifúngica. As sequências da região ITS do rDNA dos isolados do gênero *Diaporthe* do feijoeiro, juntamente com as sequências parciais dos genes codificam o fator de alongação da tradução 1- α , β -tubulina e calmodulina, foram utilizadas para o estudo das relações filogenéticas desses isolados. Marcadores moleculares baseados em sequências de retrotransposons, IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) e REMAP (*Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*), foram utilizados para a análise de variabilidade genética. Foi constatado que os fungos

endofíticos do feijoeiro comum são capazes de inibir o crescimento *in vitro* de fungos fitopatogênicos e, que extratos brutos de metabólitos de isolados endofíticos exibem atividade antimicrobiana significativa, principalmente em relação à atividade inibitória sobre bactérias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis* e *Staphylococcus aureus*). Por meio de análise filogenética multilocus, verificou-se que *Diaporthe* sp., *D. infecunda*, *D. melonis* e *D. phaseolorum* são integrantes da comunidade fúngica endofítica do feijoeiro comum. A análise de agrupamento, realizada com os dados dos marcadores IRAP e REMAP em conjunto, foi coerente em relação ao que foi verificado na filogenia multilocus e, revelou a existência de grande variabilidade genética, sobretudo entre os isolados de *D. infecunda*. Concluiu-se que extratos brutos de metabólitos de fungos endofíticos do feijoeiro exibem atividade antimicrobiana promissora; que fungos endofíticos utilizados neste estudo apresentam potencial para controle de fitopatógenos que acometem a cultura do feijoeiro; que a abordagem filogenética multilocus foi mais efetiva que análise individual de sequências de ITS no estudo das relações filogenéticas de fungos endofíticos do gênero *Diaporthe* do feijoeiro e que marcadores IRAP e REMAP podem ser empregados no estudo de variabilidade genética de fungos desse gênero.

ABSTRACT

SANTOS, Taides Tavares dos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Endophytic fungi of *Phaseolus vulgaris* exhibit antimicrobial activity and potential for control of phytopathogens.** Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-advisers: Elza Fernandes de Araújo, Leandro Licursi de Oliveira and Olinto Liparini Pereira.

Endophytic fungi are those living at least a part of their life cycle within plant tissue, apparently without causing any damage to their hosts. These microorganisms have been studied for their capacity to produce secondary metabolites of biotechnological interest, and also for their ability for biological control of phytopathogens. Endophytic fungi have been isolated from a wide variety of plant species, including crops such as common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Fungi from the genus *Diaporthe* were abundant in the endophytic community of this legume. The objectives of this study were to evaluate the antimicrobial activity and the potential use of endophytic fungi of *P. vulgaris* in the control of phytopathogens of bean, and to analyze phylogenetic relationships and genetic variability of endophytic fungi of the genus *Diaporthe* isolated from *P. vulgaris*. Dual culture assays were performed between ninety endophytic fungi and four phytopathogenic fungi (*Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*) to assess for the ability of endophytic fungi inhibit the growth of phytopathogens. The isolates that were able to inhibit the four phytopathogens tested were selected for cultivation and obtention of metabolites crude extracts. These extracts were evaluated for antibacterial and antifungal activity. The sequences of the ITS region of rDNA of the isolates of the genus *Diaporthe* from common bean, along with the partial sequences of the genes encoding translation elongation factor 1- α , β -tubulin and calmodulin were used for the study of the phylogenetic relationships of these isolates. Molecular markers based on sequences of retrotransposons, IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) and REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism), were used for the analysis of genetic variability. It was found that endophytic fungi of common bean are able to inhibit the *in vitro* growth of phytopathogenic fungi and that metabolites crude extracts of endophytic exhibit significant antimicrobial

activity especially regarding the inhibitory activity against Gram-positive bacteria (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis* and *Staphylococcus aureus*). *Diaporthe* sp., *D. infecunda*, *D. melonis* and *D. phaseolorum* are members of the endophytic fungal community in the common bean as verified by multilocus phylogenetic analysis. Cluster analysis, conducted with pooled data from IRAP and REMAP markers, was consistent regarding what was observed in multilocus phylogeny and revealed the existence of high genetic variability, particularly among isolates of *D. infecunda*. It was concluded that the metabolites crude extracts of endophytic fungi of common bean exhibit promising antimicrobial activity; that endophytic fungi used in this study have the potential to control phytopathogens that affect the bean crop; the multilocus phylogenetic approach was more effective than individual analysis of ITS sequences in the study of phylogenetic relationships of endophytic fungi of the genus *Diaporthe* from common bean and that IRAP and REMAP markers can be employed in the study of genetic variability of this genus of fungi.

INTRODUÇÃO GERAL

Micro-organismos endofíticos foram mencionados, pela primeira vez, no início do século XIX. Entretanto, foi apenas em 1866 que o micologista De Bary estabeleceu um delineamento de diferenças entre esses micro-organismos e os patógenos de plantas. Após um século, por volta de 1970, os fungos e as bactérias endofíticas começaram a ser tratados com maior ênfase em trabalhos científicos e suas bases conceituais foram estabelecidas.

Há muitos aspectos já esclarecidos sobre os fungos endofíticos. Contudo, há muito ainda a ser desvendado a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na interação fungo endofítico – hospedeiro. Compreender o desenvolvimento dessa interação é importante para se partir para uma perspectiva aplicada de exploração desses micro-organismos. É instigador, por exemplo, entender em detalhes a interface em que se dá a produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos em um ecossistema natural, uma vez que múltiplos fatores, favoráveis e desfavoráveis, estão atuando.

Os objetivos que aqui foram propostos visaram contribuir para avanço do conhecimento das aplicações biotecnológicas de fungos endofíticos numa perspectiva ousada de desenvolvimento de produtos e processos biotecnológicos de interesse para a agricultura e para a indústria farmacêutica.

No capítulo I, “Aplicações biotecnológicas e benefícios da interação entre fungos endofíticos e seus hospedeiros”, é apresentado um breve panorama sobre os benefícios da interação entre fungos endofíticos e seus hospedeiros e, potenciais aplicações biotecnológicas desses micro-organismos.

No capítulo II, “Antagonismo a fitopatógenos e atividade antimicrobiana de fungos endofíticos do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.)”, é descrita a aplicação de uma metodologia de triagem, chamada ensaio de cultura dupla, que visou avaliar o potencial de fungos endofíticos isolados dos tecidos foliares do feijoeiro comum inibirem o crescimento de fungos

fitopatogênicos que acometem a cultura do feijoeiro. Os isolados endofíticos que apresentaram as melhores atividades antagônicas nessa triagem foram selecionados para cultivo e obtenção de extratos brutos de metabólitos, extratos estes, que foram avaliados em relação às atividades antibacteriana e antifúngica.

E, no capítulo III, “Variabilidade genética de fungos do gênero *Diaporthe* isolados como endofíticos de *Phaseolus vulgaris* L.”, é descrita uma avaliação filogenética de fungos endofíticos do gênero *Diaporthe* e é proposta a utilização de marcadores moleculares, IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) e REMAP (*Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*) para avaliar a variabilidade genética de fungos desse gênero.

CAPÍTULO I

APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS E BENEFÍCIOS DA INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS ENDOFÍTICOS E SEUS HOSPEDEIROS

1. Conceito e abrangência do termo “fungo endofítico” e desenvolvimento da interação entre esses micro-organismos e vegetais

Há divergência entre autores em relação ao conceito mais apropriado para fungo endofítico. Todavia, o conceito mais aceito pela comunidade científica é que os fungos endofíticos são àqueles, que vivem, em pelo menos uma parte de seu ciclo de vida, no interior de tecidos vegetais, sem causar aparentemente qualquer dano a seus hospedeiros (Petrini, 1991; Cabral *et al.*, 1993). Assim, diferenciam-se dos fungos fitopatogênicos, que são prejudiciais às plantas e causam-lhes doenças e distinguem-se também dos fungos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais (Azevedo, 1998; Souza *et al.*, 2004).

Os fungos e outros micro-organismos endofíticos penetram no tecido vegetal por aberturas naturais, como estômatos e hidatódios, por meio de ferimentos e também pelas raízes, onde podem existir aberturas decorrentes da emergência de raízes laterais ou abrasões decorrentes do próprio crescimento ao penetrar no solo (Azevedo, 1998; Peixoto Neto *et al.*, 2002). Além disso, fungos endofíticos podem penetrar por aberturas causadas por insetos e, até mesmo, fazendo uso de apressórios, que são estruturas usadas por fungos fitopatogênicos para penetrar no tecido do hospedeiro (Carroll, 1988; Azevedo, 1998).

Há muitos estudos demonstrando que existe uma importante interação simbiótica entre fungos endofíticos e seus hospedeiros. Essa interação envolve vantagens para ambos os parceiros, uma vez que os fungos podem exercer funções que favorecem a adaptação da planta ao meio ambiente, tais como proteção contra doenças (Clarke *et al.*, 2006; Hanada *et al.*, 2008; Ownley *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2010) e promoção de crescimento vegetal (Hamayun *et al.*, 2009b; Khan *et al.*, 2012), e, ao

mesmo tempo, encontram na planta um habitat rico em nutrientes e que os favorecem em relação a outros micro-organismos (Peixoto Neto *et al.*, 2004).

2. Isolamento de fungos endofíticos

As plantas, de maneira geral, possuem uma microbiota endofítica característica, importante para sua sanidade e manutenção (Azevedo, 1999). Alguns fatores interferem qualitativa e quantitativamente na biodiversidade dessa microbiota. Entre esses fatores, destacam-se a idade da planta, o tecido ou órgão da planta utilizado para estudo e os métodos de isolamento empregados (Peixoto Neto *et al.*, 2004; Hyde e Soyong, 2008).

Uma enorme riqueza de fungos, a maioria deles pertencente ao Filo Ascomycota, tem sido detectada como endofítica (Hyde e Soyong, 2008). Uma flutuação espacial e sazonal de fungos endofíticos em espécies vegetais tem sido observada. Ou seja, a mesma espécie de fungo endofítico pode ocorrer ou não em uma mesma espécie vegetal, dependendo do local de cultivo, das condições ambientais e do estágio fenológico da planta. Além disso, em isolamentos efetuados a partir de diferentes espécies vegetais hospedeiras, podem ser encontradas as mesmas espécies de fungos endofíticos (Gao *et al.*, 2005; Mussi-Dias *et al.*, 2012).

Os fungos endofíticos podem habitar folhas, pecíolos, estruturas reprodutivas, galhos, cascas e raízes de plantas (Rodriguez *et al.*, 2009). Assim, eles já foram isolados a partir de diferentes órgãos de uma ampla diversidade de espécies vegetais, variando desde gramíneas (Müller e Krauss, 2005; Márquez *et al.*, 2012) a espécies arbóreas (Arnold *et al.*, 2003; Arnold e Lutzoni, 2007), abrangendo plantas medicinais (Radu e Kqueen, 2002; Borges e Pupo, 2006; Huang *et al.*, 2007; Mussi-Dias *et al.*, 2012), plantas tóxicas (Souza *et al.*, 2004; Cafêu *et al.*, 2005) e culturas de interesse econômico como o cacau (Rubini *et al.*, 2005; Mejía *et al.*, 2008; Hanada *et al.*, 2010), o café (Santamaría e Bayman, 2005; Sette *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2009; Vega *et al.*, 2010), a cana-de-açúcar (Stuart *et al.*, 2010; Leme *et al.*, 2013), o milho (Fisher *et al.*, 1992; Orole e Adejumo,

2011), a soja (Pimentel *et al.*, 2006; Hamayun *et al.*, 2009a; Leite *et al.*, 2013) e o trigo (Larran *et al.*, 2007).

3. Benefícios que os fungos endofíticos podem proporcionar aos hospedeiros

Entre os diversos papéis benéficos desempenhados pelos fungos endofíticos na interação com seus hospedeiros, um dos principais é a proteção da planta contra doenças, por meio da competição com fitopatógenos por sítios de colonização e nutrientes e pela produção de antibióticos (Azevedo *et al.*, 2000; Strobel *et al.*, 2001; Arnold *et al.*, 2003; Peixoto Neto *et al.*, 2004; Clarke *et al.*, 2006; Ownley *et al.*, 2010).

Outra atividade que tem sido atribuída aos fungos endofíticos é a proteção das plantas contra o ataque de insetos herbívoros por meio da produção de toxinas (Raps e Vidal, 1998). Inúmeras pesquisas têm demonstrado que fungos endofíticos podem influenciar na preferência e na performance de insetos herbívoros, dado que foi demonstrado que a presença desses micro-organismos reduz os danos causados por fitófagos (Raps e Vidal, 1998; Meister *et al.*, 2006; Akello *et al.*, 2007; Oki *et al.*, 2009; Crawford *et al.*, 2010; Gange *et al.*, 2012).

A promoção de crescimento vegetal, por meio da síntese de fitohormônios e/ou por meio do aumento da tolerância aos estresses abióticos, têm sido estudada (Peixoto Neto *et al.*, 2002; Redman *et al.*, 2002; Bae *et al.*, 2009; Hamayun *et al.*, 2009b; Khan *et al.*, 2011, 2012) e constitui uma importante atividade desempenhada pelos fungos endofíticos em prol de seus hospedeiros. Essa capacidade de estimular o crescimento vegetal é de extrema relevância e pode ser explorada em práticas agrícolas, uma vez que a utilização de micro-organismos promotores de crescimento vegetal é uma das alternativas para a agricultura moderna enfrentar o desafio de promover o aumento da produção de culturas gerando sustentabilidade (Luz *et al.*, 2006).

No Brasil, estudos envolvendo o uso dos fungos endofíticos e que apresentaram resultados promissores na promoção de crescimento vegetal

já foram realizados com a cultura do milho (*Zea mays*) e do fumo (*Nicotiana tabacum*) (Varma *et al.*, 1999), da hortelã pimenta (*Mentha piperita*) (Mucciarelli *et al.*, 2003), do maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis*) (Luz *et al.*, 2006) e da pinha (*Annona squamosa*) (Silva *et al.*, 2006). Entre as espécies de fungos endofíticos empregadas na promoção de crescimento vegetal, uma das mais estudadas é *Piriformospora indica*, um basidiomiceto que coloniza endofiticamente raízes de inúmeras espécies vegetais, aumentando o seu crescimento (Varma *et al.*, 1999; Peixoto Neto *et al.*, 2002; Camehl *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2011).

Outro aspecto interessante em relação aos fungos endofíticos é que eles podem produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários (Schulz *et al.*, 2002; Strobel e Daisy, 2003; Suryanarayanan *et al.*, 2009; Kaul *et al.*, 2012; Rönnsberg *et al.*, 2013), que diferentemente dos primários, desempenham um papel importante nos processos fisiológicos de micro-organismos no ambiente, sendo produzidos por razões específicas, sociais ou predatórias, estando, assim, relacionadas com a ecologia dos organismos produtores (Braga *et al.*, 1999; Conti *et al.*, 2012).

Além de toda importância ecológica, os metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos vêm se destacando como uma fonte de produtos naturais, bioativos e quimicamente novos, para a exploração em diversas áreas (Strobel e Daisy, 2003; Tejesvi *et al.*, 2007; Suryanarayanan *et al.*, 2009; Kaul *et al.*, 2012; Kumar e Kaushik, 2012; Rönnsberg *et al.*, 2013).

4. Metabólitos secundários de interesse biotecnológico, produzidos por fungos endofíticos

No contexto da prospecção de produtos naturais, os micro-organismos estão sendo cada vez mais apontados como excelentes produtores de substâncias químicas com propriedades bioativas desejáveis e grande potencial de aplicação na indústria farmacêutica (Suryanarayanan *et al.*, 2009; Conti *et al.*, 2012; Kumar e Kaushik, 2012). Neste aspecto, os fungos se destacam pela quantidade de produtos farmacêuticos de uso

corrente na medicina, como os antimicrobianos, e, além disso, têm sido bastante utilizados como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico, tais como enzimas, vitaminas, aminoácidos e esteróides (Braga *et al.*, 1999; Cafêu *et al.*, 2005; Marinho *et al.*, 2009; Suryanarayanan *et al.*, 2012; Teiten *et al.*, 2013; Bara *et al.*, 2013).

Entre os micro-organismos que vêm sendo prospectados em busca de produtos naturais com aplicações biotecnológicas, destacam-se os fungos endofíticos. Os metabólitos secundários produzidos por esses fungos têm sido motivo de interesse em diversos estudos e vêm representando uma fonte promissora para bioprospecção de novas moléculas com potencial de aplicação nas áreas farmacêutica e de defensivos agrícolas (Strobel e Daisy, 2003; Tejesvi *et al.*, 2007; You *et al.*, 2009; Amaral e Rodrigues-Filho, 2010; Arunpanichlert *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2011; Kumar e Kaushik, 2013; Talontsi *et al.*, 2013).

Os fungos endofíticos apresentam uma distribuição ubíqua (Rodriguez *et al.*, 2009). Assim, há uma excelente possibilidade de encontrar novas espécies de micro-organismos endofíticos, presentes nas plantas que compõem os diferentes ecossistemas (Strobel e Daisy, 2003), o que amplia a diversidade de metabólitos ainda a ser explorada do ponto de vista biotecnológico.

O relato mais marcante da produção de metabólitos, por fungos endofíticos, com propriedades bioativas é o do anticancerígeno taxol, que inicialmente era produzido a partir da planta *Taxus brevifolia*. A produção desse composto por um fungo endofítico foi demonstrada pela primeira vez por meio dos estudos de Stierle *et al.* (1993), em que se evidenciou que o fungo endofítico *Taxomyces andreanea*, encontrado no interior da planta *Taxus brevifolia*, era capaz de produzir taxol *in vitro* (Stierle *et al.*, 1993).

Posteriormente, outros trabalhos também demonstraram que diferentes espécies de fungos endofíticos eram capazes de produzir taxol. É o caso de *Pestalotiopsis microspora*, isolado de *Taxus wallachiana* (Strobel *et al.*, 1996), *Tubercularia* sp., isolado de *Taxus mairei* (Wang *et al.*, 2000), *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de *Justicia gendarussa* (Gangadevi e Muthumary, 2008), *Pestalotiopsis terminaliae*, isolado de *Terminalia arjuna* (Gangadevi e Muthumary, 2009), *Gliocladium* sp., isolado de *Taxus baccata*

(Sreekanth *et al.*, 2009), *Guignardia mangiferae*, isolado de *Taxus media* (Xiong *et al.*, 2013), entre outras.

Após a descoberta de que fungos endofíticos também podem produzir o taxol, emergiu a possibilidade de utilizar um novo processo, mais eficiente e menos dispendioso, para a produção daquele importante fármaco, que seria o cultivo de fungos em laboratório, dispensando a necessidade da extração desse composto a partir de *Taxus brevifolia* ou de outras espécies vegetais produtoras (Peixoto Neto *et al.*, 2002). Essa é uma das vantagens da prospecção de metabólitos secundários de origem fúngica em relação a outras fontes, pois os micro-organismos podem ser cultivados em larga escala em fermentadores, e não geram prejuízo ao ecossistema, como pode ocorrer com a retirada de plantas de áreas naturais e, minimiza-se, também, o perigo de extinção de algumas espécies vegetais, que são coletadas para a extração de produtos medicinais (Peixoto Neto *et al.*, 2002; Takahashi e Lucas, 2008).

Além do taxol, muitos outros relatos de metabólitos secundários, produzidos por fungos endofíticos, apresentando atividades de interesse biotecnológico, têm sido feitos na literatura científica (Marinho *et al.*, 2005; Borges e Pupo, 2006; Pastre *et al.*, 2007, Momesso *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2010; Kaul *et al.*, 2012; Budhiraja *et al.*, 2013), sendo que uma das principais aplicações dos produtos naturais advindos desses fungos é como agentes inibidores de organismos patogênicos (Idris *et al.*, 2013). Como exemplo, pode-se citar o metabólito denominado phomopsichalasina, produzido pelo fungo endofítico *Phomopsis* sp., que apresenta atividade antibacteriana (Horn *et al.*, 1995); o metabólito cryptocandina, produzido pelo fungo endofítico *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*, que possui atividade antifúngica (Strobel *et al.*, 1999); a cercosporina, uma substância com ação antiparasitária produzida pelo fungo endofítico *Mycosphaerella* sp. (Moreno *et al.*, 2011) e as citocalasinas, que são substâncias produzidas pelos fungos endofíticos *Chaetomium globosum* (Momesso *et al.*, 2008) e *Xylaria* sp. (Silva *et al.*, 2010) e que apresentam diversas atividades biológicas incluindo ação citotóxica.

5. Fungos endofíticos como agentes de controle biológico de fitopatógenos

Controle biológico de fitopatógenos refere-se ao uso de micro-organismos que reduzem a atividade ou a sobrevivência dos agentes causadoras de doenças em plantas (Ownley *et al.*, 2010). Entre os mecanismos de biocontrole descritos, destacam-se a antibiose, a competição por espaço, ferro e outros nutrientes, o parasitismo e a indução de resistência no hospedeiro (Mariano *et al.*, 2004; Bailey *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2009; Ownley *et al.*, 2010).

Os fungos endofíticos tem sido estudados em relação à capacidade de atuarem como agentes inibidores de outros micro-organismos, na perspectiva de aplicar esses fungos como agentes de biocontrole como uma alternativa ao controle químico, sendo que eles podem ser utilizados de forma direta, na qual são aplicados vivos e atuam como antagonista; ou indireta, por meio do emprego de seus metabólitos (Lazzaretti e Bettiol, 1997; Grigoletti Júnior *et al.*, 2000; Di Piero e Garda, 2008; Morandi e Bettiol, 2009).

6. Considerações finais

Diante de tudo o que fora exposto, torna-se evidente a importância dos fungos endofíticos para seus hospedeiros e a relevância de prosseguirem os estudos focados no isolamento e identificação desses organismos, bem como na prospecção de compostos de interesse biotecnológico a partir de seus metabólitos.

7. Referências

Akello J, Dubois T, Gold CS, Coyne D, Nakavuma J, Paparu P (2007). *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). *Journal of Invertebrate Pathology* 96: 34-42.

Amaral LS, Rodrigues-Filho E (2010). Two novel eremophilane sesquiterpenes from an endophytic Xylariaceous fungus isolated from leaves of *Cupressus lusitanica*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 21(8): 1446-1450.

Arnold AE, Lutzoni F (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88(3): 541-549.

Arnold AE, Mejia LC, Kylo D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 100(26): 15649-15654.

Arunpanichlert J, Rukachaisirikul V, Sukpondma Y, Phongpaichit S, Tewtrakul S, Rungjindamai N, Sakayaroj J (2010). Azaphilone and isocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 58(8): 1033-1036.

Azevedo JL (1998). *Microrganismos endofíticos*. In: Melo IS, Azevedo JL. (Ed.) *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: EMBRAPA, p. 117-137.

Azevedo JL (1999). Botânica: uma ciência básica ou aplicada? *Revista brasileira de Botânica* 22(2): 225-229.

Azevedo JL, Maccheroni Junior W, Pereira JO, Araújo WL (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 3(1): 40-65.

Bae H, Sicher RC, Kim MS, Kim SH, Strem MD, Melnick RL, Bailey BA (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany* 60(11): 3279–3295.

Bailey BA, Bae H, Strem MD, Crozier J, Thomas SE, Samuels GJ, Vinyard BT, Holmes KA (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control* 46: 24–35.

Bara R, Aly AH, Wray V, Lin W, Proksch P, Debbab A (2013). Talaromins A and B, new cyclic peptides from the endophytic fungus *Talaromyces wortmannii*. *Tetrahedron Letters* 54(13): 1686–1689.

Borges WS, Pupo MT (2006). Novel anthraquinone derivatives produced by *Phoma sorghina*, an endophyte found in association with the medicinal plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 17(5): 929-934.

Braga GUL, Destéfano RHR, Messias CL (1999). Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. *Revista de Microbiologia* 30(2): 107-113.

Budhiraja A, Nepali K, Sapra S, Gupta S, Kumar S, Dhar KL (2013). Bioactive metabolites from an endophytic fungus of *Aspergillus* species isolated from seeds of *Gloriosa superba* Linn. *Medicinal Chemistry Research* 22(1): 323–329.

Cabral D, Stone JK, Carroll GC (1993). The internal mycobiota of *Juncus* spp.: microscopic and cultural observations of infection patterns. *Mycological Research* 97(3): 367-376.

Cafêu MC, Silva GH, Teles HL, Bolzani VS, Araújo AR, Young MCM, Pfenning LH (2005). Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Química Nova* 28(6): 991-995.

Camehl I, Drzewiecki C, Vadassery J, Shahollari B, Sherameti I, Forzani C, Munnik T, Hirt H, Oelmüller R (2011). The OXI1 Kinase Pathway Mediates *Piriformospora indica*-Induced Growth Promotion in Arabidopsis. *PLoS Pathogens* 7(5): 1-11.

Cao R, Liu X, Gao K, Mendgen K, Kang Z, Gao J, Dai Y, Wang X (2009). Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes *in vitro*. *Current Microbiology* 59: 584–592.

Carrol G (1988). Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualist symbiont. *Ecology* 69(1): 2–9.

Clarke BB, White Jr JF, Hurley RH, Torres MS, Sun S, Huff DR (2006). Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. *Plant Disease* 90: 994–998.

Conti R, Guimaraes DO, Pupo MT (2012). Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. *Ciência e Cultura* 64(3): 43-47.

Crawford KM, Land JM, Rudgers JA (2010). Fungal endophytes of native grasses decrease insect herbivore preference and performance. *Oecologia* 164(2): 431–444.

Di Piero RM, Garda MV (2008). Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 43(9): 1121-1128.

Ding T, Jiang T, Zhou J, Xu L, Gao ZM (2010). Evaluation of antimicrobial activity of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). *Genetics and Molecular Research* 9(4): 2104- 2112.

Fernandes MRV, Silva TAC, Pfenning LH, Costa-Neto CM, Heinrich TA, Alencar SM, Lima MA, Ikegaki M (2009). Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 45(4): 677-685.

Fisher PJ, Petrini O, Scott HML (1992). The distribution of some fungal and bacterial endophytes in Maize (*Zea mays* L). *New Phytologist* 122: 299–305.

Gangadevi V, Muthumary J (2008). Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. *Mycologia Balcanica* 5: 1–4.

Gangadevi V, Muthumary J (2009). Taxol production by *Pestalotiopsis terminaliae*, an endophytic fungus of *Terminalia arjuna* (arjun tree). *Biotechnology and Applied Biochemistry* 52: 9–15.

Gange AC, Eschen R, Wearn JA, Thawer A, Sutton BC (2012). Differential effects of foliar endophytic fungi on insect herbivores attacking a herbaceous plant. *Oecologia* 168(4): 1023–1031.

Gao F, Dai C, Liu X (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research* 4(13): 1346–1351.

Gao XX, Zhou H, Xu D-Y, Yu C-H, Chen Y-Q, Qu L-H (2005). High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. *FEMS Microbiology Letters* 249: 255-266.

Grigoletti Junior A, Santos AF, Auer CG (2000). Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. *Floresta* 30: 155-165.

Hamayun M, Khan S, Ahmad N, Tang DS, Kang SM, Na CI, Sohn EY, Hwang YH, Shin DH, Lee BH, Kim JG, Lee IJ (2009a). *Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.). Merr. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 25(4): 627-632.

Hamayun M, Khan SA, Kim HY, Chaudhary MF, Hwang YH, Shin DH, Kim IK, Lee BH, Lee IJ (2009b). Gibberellin production and plant growth enhancement by newly isolated strain of *Scolecobasidium tshawytschae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(6): 560-565.

Hanada RE, Jorge Souza T, Pomella AWV, Hebbar KP, Pereira JO, Ismaiel A, Samuels GJ (2008). *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. *Mycological Research* 112: 1335–1343.

Hanada RE, Pomella AWW, Costa HS, Bezerra JL, Loguercio LL, Pereira JO (2010). Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal Biology* 114(11-12): 901–910.

Horn WS, Simmonds MSJ, Schwartz RE, Blaney WM (1995). Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. *Tetrahedron* 51(14): 3969–3978.

Huang W-Y, Cai Y-Z, Xing J, Corke H, Sun M (2007). A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. *Economic Botany* 61(1): 14-30.

Hyde KD, Soyong K (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 33: 163-173.

Idris A, Al-tahir I, Idris E (2013). Antibacterial activity of endophytic fungi extracts from the medicinal plant *Kigelia africana*. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences* 5(1): 1-9.

Kaul S, Gupta S, Ahmed M, Dhar MK (2012). Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry Reviews* 11(4): 487-505.

Khan AL, Hamayun M, Ahmad N, Hussain J, Kang SM, Kim YH, Adnan M, Tang DS, Waqas M, Radhakrishnan R, Hwang YH, Lee IJ (2011). Salinity Stress Resistance Offered by Endophytic Fungal Interaction Between *Penicillium minioluteum* LHL09 and Glycine max. L. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 893–902.

Khan AL, Hamayun M, Kang SM, Kim YH, Jung HY, Lee JH, Lee IJ (2012). Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC Microbiology* 12: 1-14.

Kumar S, Kaushik N (2012). Metabolites of endophytic fungi as novel source of biofungicide: a review. *Phytochemistry Review* 11, 507–522.

Kumar S, Kaushik N (2013). Endophytic Fungi Isolated from Oil-Seed Crop *Jatropha curcas* Produces Oil and Exhibit Antifungal Activity. *Plos One* 8(2):1-8.

Kumar V, Sahai V, Bisaria VS (2011). High-density spore production of *Piriformospora indica*, a plant growth-promoting endophyte, by optimization of nutritional and cultural parameters. *Bioresource Technology* 102: 3169–3175.

Larran S, Perello A, Simon MR, Moreno V (2007). The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). *World Journal Microbiology and Biotechnology* 23: 565-572.

Lazzaretti E, Bettiol W (1997). Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. *Scientia Agricola* 54(1-2): 89-96.

Leite TS, Cnossen-Fassoni A, Pereira OL, Mizubuti ESG, Araújo EF, Queiroz MV (2013). Novel and Highly Diverse Fungal Endophytes in Soybean Revealed by the Consortium of Two Different Techniques. *Journal of Microbiology* 51(1): 56–69.

Leme AC, Bevilaqua MRR, Rhoden SA, Mangolin CA, Machado MFPS, Pamphile JA (2013). Molecular characterization of endophytes isolated from *Saccharum* spp based on esterase and ribosomal DNA (ITS1-5.8S-ITS2) analyses. *Genetics and Molecular Research*, 12(3): 4095–105.

Luz JS, Silva RLO, Silveira EB, Cavalcante UMT (2006). Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. *Revista Caatinga* 19(2): 128-134.

Mariano RLR, Silveira EB, Assis SMP, Gomes AMA, Nascimento ARP, Donato VMTS (2004). Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica* 1: 89-111.

Marinho AMR, Marinho PSB, Rodrigues Filho E (2009). Esteroides produzidos por *Penicillium herquei*, um fungo endofítico isolado dos frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae), *Química Nova* 32(7): 1710-1712.

Marinho AMR, Rodrigues-Filho E, Moitinho MLR, Santos LS (2005). Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16(2): 280-283.

Márquez SS, Bills GF, Herrero N, Zabalgogezcoa Í (2012). Non-systemic fungal endophytes of grasses. *Fungal Ecology* 5: 289-297.

Meister B, Krauss J, Härrä SA, Schneider MV, Muller CB (2006). Fungal endosymbionts affect aphid population size by reduction of adult life span and fecundity. *Basic and Applied Ecology* 7: 244- 252.

Mejía LC, Rojas EI, Maynard Z, Bael SV, Arnold AE, Hebbar P, Samuels GJ, Robbins N, Herre EA (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control* 46: 4–14.

Momesso LS, Kawano CY, Ribeiro PH, Nomizo A, Goldman GH, Pupo MT (2008). Chaetoglobosinas produzidas por *Chaetomium globosum*, fungo endofítico associado a *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae). *Química Nova* 31(7): 1680-1685.

Morandi MAB, Bettiol W (2009). *Controle biológico de doenças de plantas no Brasil*. In: Bettiol W, Morandi MAB (Ed.) (2009). *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Embrapa Meio Ambiente, 341 p.

Moreno E, Varughese T, Spadafora C, Arnold E, Coley PD, Kursar TA, Gerwick WH, Cubilla-Riosa L (2011). Chemical Constituents of the New Endophytic Fungus *Mycosphaerella* sp. nov. and Their Anti-Parasitic Activity. *Natural Product Communications* 6: 835-840.

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

Müller CB, Krauss J (2005). Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current Opinion in Plant Biology* 8 (4): 450-456.

Mussi-Dias V, Araújo ACO, Silveira SF, Rocabado JMA, Araújo KL (2012). Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 14(2): 261-266.

Oki Y, Soares N, Belmiro MS, Corrêa Jr. A, Fernandes GW (2009). Influência dos fungos endofíticos sobre os herbívoros de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). *Neotropical Biology and Conservation* 4(2): 83-88.

Orole OO, Adejumo TO (2011). Bacterial and fungal endophytes associated with grains and roots of maize. *Journal of Ecology and The Natural Environment*. 3: 298-303.

Ownley BH, Griffin MR, Klingeman WE, Gwinn KD, Moulton JK, Pereira RM (2008). *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology* 98(3): 267-270.

Ownley BH, Gwinn KD, Vega FE (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl* 55: 113-128.

Pastre R, Marinho AMR, Rodrigues-Filho E, Souza AQL, Pereira JO (2007). Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. *Química Nova* 30(8): 1867-1871.

Peixoto Neto PAS, Azevedo JL, Araújo WL (2002). Microrganismos endofíticos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 29: 62-77.

Peixoto Neto PAS, Azevedo JL, Caetano LC (2004). Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 3(4): 69-72.

Petrini O (1991). *Fungal endophytes of tree leaves*. In: Andrews JH, Hirano SS (eds) *Microbial ecology of leaves*. Springer-Verlag, New York, pp 179-197.

Pimentel IC, Glienke-Blanco C, Gabardo J, Stuart RM, Azevedo JL (2006). Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) merril) under different environmental conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49(5): 705-711.

Radu S, Kqueen CY (2002). Preliminary screening of endophytic fungi from medicinal plants in malaysia for antimicrobial and antitumor activity. *Malaysian Journal of Medical Sciences* 9(2): 23-33.

Raps A, Vidal S (1998). Indirect effects of an unspecialized endophytic fungus on specialized plant – herbivorous insect interactions. *Oecologia* 114: 541-547.

Redman RS, Sheehan KB, Stout TG, Rodriguez RJ, Henson JM (2002). Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* 298: 1581.

Rodriguez RJ, White Junior JF, Arnold AE, Redman RS (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *The New Phytologist* 182(2), 314–330.

Rönsberg D, Debbab A, Mándi A, Wray V, Dai H, Kurtán T, Proksch P, Aly AH (2013). Secondary metabolites from the endophytic fungus *Pestalotiopsis virgatula* isolated from the mangrove plant *Sonneratia caseolaris*. *Tetrahedron Letters* 54(25): 3256–3259.

Rubini MR, Silva-Ribeiro RT, Pomella AWW, Maki CS, Araújo WL, Santos DR, Azevedo JL (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences* 1: 24-33.

Santamaría J, Bayman P (2005). Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology* 50: 1-8.

Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert A, Krohn K (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106: 996-1004.

Sette LD, Passarini MRZ, Delarmelina C, Salati F, Duarte MCT (2006). Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 22: 1185–1195.

Silva GH, Oliveira CM, Teles HL, Bolzani VS, Araujo AR, Pfenning LH, Young MCM, Costa-Neto CM, Haddad R, Eberlin MN (2010). Citocalasinas produzidas por *Xylaria* sp., um fungo endofítico de *Piper aduncum* (piperaceae). *Química Nova* 33(10): 2038-2041.

Silva RLO, Luz JS, Silveira EB, Cavalcante UMT (2006). Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do

crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.) *Acta Botânica Brasílica* 20(3): 649-655.

Souza AQL, Souza ADL, Astolfi Filho S, Belém Pinheiro ML, Sarquis MIM, Pereira JO (2004). Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica* 34(2): 185-195.

Sreekanth D, Syed A, Sarkar S, Sarkar D, Santhakumari B, Ahmad A, Khan MI (2009). Production, purification, and characterization of Taxol and 10-DABIII from a new Endophytic Fungus *Gliocladium* sp. Isolated from the Indian Yew Tree, *Taxus baccata*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(11): 1342–1347.

Stierle A, Strobel G, Stierle D (1993). Taxol and taxane production by *taxomyces andreanae* an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 260: 214-216.

Strobel G, Daisy B (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4): 491-502.

Strobel G, Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu RS, Hess WM (1996). Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology* 142: 435-440.

Strobel GA, Dirkse E, Sears J, Markworth C (2001). Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* 147: 2943–2950.

Strobel GA, Miller RV, Martinezmiller C, Condrón MM, Teplow DB, Hess WM (1999). Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Microbiology* 145: 1919-1926.

Stuart RM, Romão AS, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL, Araújo WL (2010). Culturable endophytic filamentous fungi from leaves of transgenic imidazolinone-tolerant sugarcane and its non-transgenic isolines. *Archives of Microbiology* 192(4): 307–313.

Sun Z, Zhang M, Zhang J, Feng J (2011). Antifungal and cytotoxic activities of the secondary metabolites from endophytic fungus *Massaria* sp. *Phytomedicine* 18: 859– 862.

Suryanarayanan TS, Thirunavukkarasu N, Govindarajulu MB, Golapan V (2012). Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. *Fungal Diversity* 54(1): 19–30.

Suryanarayanan TS, Thirunavukkarasu N, Govindarajulu MB, Sasse F, Jansen R, Murali TS (2009). Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews* 23: 9–19.

Takahashi JÁ, Lucas EMF (2008). Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. *Química Nova* 31(7): 1807-1813.

Talontsi FM, Dittrich B, Schöffler A, Sun H, Laatsch H (2013). Epicoccolides: Antimicrobial and Antifungal Polyketides from an Endophytic Fungus *Epicoccum* sp. Associated with *Theobroma cacao*. *European Journal of Organic Chemistry* 2013(15): 3174–3180.

Teiten M-H, Mack F, Debbab A, Aly AH, Dicato M, Proksch P, Diederich M (2013). Anticancer effect of altersolanol A, a metabolite produced by the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*, mediated by its pro-apoptotic and anti-invasive potential via the inhibition of NF-κB activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21(13): 3850–3858.

Tejesvi MV, Nalini MS, Mahesh B, Prakash HS, Kini KR, Shetty HS, Subbiah V (2007). New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. *Boletín de la Sociedad Química de México* 1(1): 19-26.

Varma A, Verma S, Sudah SN, Franken P (1999). *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth promoting root endophyte. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2741-2744.

Vega FE, Simpkins A, Aime MC, Posada F, Peterson SW, Rehner SA, Infante F, Castillo A, Arnold AE (2010). Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. *Fungal ecology* 3: 122-138.

Wang J, Li G, Lu H, Zheng Z, Huang Y, Su W (2000). Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. *FEMS Microbiology Letters* 193(2): 249-253.

Xiong ZQ, Yang YY, Zhao N, Wang Y (2013). Diversity of endophytic fungi and screening of fungal paclitaxel producer from *Angiojap yew*, *Taxus x media*. *BMC Microbiology* 13(1): 1-10.

You F, Han T, Wu J, Huang B, Qin L (2009). Antifungal secondary metabolites from endophytic *Verticillium* sp. *Biochemical Systematics and Ecology* 37: 162–165.

CAPÍTULO II:

**ANTAGONISMO A FITOPATÓGENOS E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO FEIJOEIRO COMUM
(*Phaseolus vulgaris* L.)**

Taides Tavares dos Santos, Elza Fernandes de Araújo,
Marisa Vieira de Queiroz*

***Corresponding Author:** Department of Microbiology/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Avenue Peter Henry Rolfs, s/n Campus Universitário, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. Zip Code: 36570-900. Phone number: +55 (31) 3899 2975 Fax: +55 (31) 3899 2573. E-mail: <mvqueiro@ufv.br>

Resumo

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um grão nutricionalmente rico, de importância sócio-econômica inquestionável para o Brasil, uma vez que este país configura-se como um dos maiores produtores mundiais dessa leguminosa e apresenta um elevado consumo per-cápita da mesma. A produção brasileira de feijão tem apresentado oscilações no decorrer dos anos, com queda na produtividade e consequentes prejuízos econômicos. Isso se deve a diversos fatores, entre os quais, os fitopatógenos que acometem a cultura. Esses micro-organismos são tradicionalmente controlados por meio da aplicação de produtos químicos e, sabe-se que o uso indiscriminado de defensivos agrícolas pode ter efeitos deletérios sobre o meio ambiente e a saúde humana. Sendo assim, é eminente a necessidade de desenvolvimento de formas alternativas eficientes para o combate desses patógenos, tais como o controle biológico por meio de antagonistas endofíticos. Fungos endofíticos já foram isolados do feijoeiro comum, mas ainda não tinham sido explorados para fins de aplicação biotecnológica, seja para utilização na agricultura ou para a prospecção de produtos naturais bioativos de interesse para a indústria farmacêutica, como já ocorreu com fungos endofíticos oriundos de outras culturas agrícolas. Assim, o presente estudo objetivou investigar o potencial de uso de fungos endofíticos do feijoeiro comum no controle de fitopatógenos da cultura do feijoeiro e sua atividade antimicrobiana contra fungos fitopatogênicos e patógenos bacterianos de origem alimentar e de importância médica. A utilização da metodologia de ensaio de cultura dupla permitiu constatar que fungos endofíticos do feijoeiro comum são capazes de inibir o crescimento *in vitro* de fungos fitopatogênicos (*Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*) que acometem a cultura do feijoeiro e, ao avaliar a atividade antimicrobiana de extratos brutos de metabólitos de fungos endofíticos, resultados significativos foram detectados, com destaque para a atividade inibitória sobre bactérias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis* e *Staphylococcus aureus*). Concluiu-se, portanto, que fungos endofíticos do feijoeiro comum apresentam potencial de controle de fitopatógenos e

produzem metabólitos promissores, devem ser explorados de forma ainda mais aprofundada para fins de aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: antagonismo microbiano; atividade antimicrobiana; feijoeiro comum; fungos endofíticos.

1. Introdução

A utilização de micro-organismos no controle biológico de doenças em plantas é uma medida que pode contribuir para a redução do uso de agrotóxicos (Grigoletti Júnior *et al.*, 2000; Morandi e Bettiol, 2009) e é apontada como uma alternativa viável, ecológica e economicamente sustentável para sistemas de produção agrícola (Compant *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2009). Além disso, o uso de micro-organismos biocontroladores pode ser uma solução para várias doenças de plantas consideradas de difícil controle (Moura *et al.*, 1998; Benchimol *et al.*, 2000; Rubini *et al.*, 2005; Shiomi *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2008; Barretti *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2009; Hanada *et al.*, 2010).

Fungos que vivem em pelo menos uma parte de seu ciclo de vida no interior de tecidos vegetais, sem causar aparentemente qualquer dano a seu hospedeiro, são chamados de fungos endofíticos (Petrini, 1991; Cabral *et al.*, 1993). Esses micro-organismos são capazes de atuar na defesa das plantas contra o ataque de insetos herbívoros (Raps e Vidal, 1998; Azevedo *et al.*, 2000; Oki *et al.*, 2009; Crawford *et al.*, 2010; Gange *et al.*, 2012) e contra patógenos (Azevedo, 1998; Peixoto Neto *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2003; Clarke *et al.*, 2006). Resultados promissores têm sido demonstrados quanto à perspectiva de uso desses micro-organismos no controle biológico de fitopatógenos (Rubini *et al.*, 2005; Campanile *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2009; Lahlali e Hijri, 2010; Ownley *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2011; Dolatabadi *et al.*, 2012).

Fungos endofíticos podem ainda produzir fitohormônios e conferir à planta maior tolerância às condições de estresses abióticos (Azevedo, 1999; Hamayun *et al.*, 2009b; Khan *et al.*, 2012; You *et al.*, 2012), bem como produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários, que são fisiológico e ecologicamente importantes para os organismos produtores

(Strobel e Daisy, 2003; Conti *et al.*, 2012; Kaul *et al.*, 2012). Os metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos têm sido o foco de vários estudos por representarem uma fonte muito promissora para bioprospecção de novas moléculas com potencial de aplicação em diversas áreas, sobretudo na farmacêutica (Schulz *et al.*, 2002; Strobel e Daisy, 2003; Tejesvi *et al.*, 2007; Suryanarayanan *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2011; Kumar e Kaushik, 2013; Bara *et al.*, 2013). Como exemplos de metabólitos de origem endofítica, cita-se a phomopsichalasina, uma substância produzida pelo fungo endofítico *Phomopsis* sp., que apresenta atividade antibacteriana (Horn *et al.*, 1995); o metabólito cryptocandina, produzido pelo fungo endofítico *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*, que possui atividade antifúngica (Strobel *et al.*, 1999); a cercosporina, que é um agente com ação antiparasitária produzido pelo fungo endofítico *Mycosphaerella* sp. (Moreno *et al.*, 2011) e as citocalasinas, substâncias que apresentam diversas atividades biológicas incluindo ação citotóxica e que são produzidas pelos fungos endofíticos *Chaetomium globosum* (Momesso *et al.*, 2008) e *Xylaria* sp. (Silva *et al.*, 2010).

Os fungos endofíticos apresentam uma distribuição ubíqua, ou seja, todas as plantas em ecossistemas naturais possuem fungos endofíticos associados a elas (Rodriguez *et al.*, 2009). Desta maneira, há uma alta probabilidade de encontrar novas espécies de fungos interagindo com as plantas que compõem os vários ecossistemas e cada um destes fungos apresentando um potencial único para exploração de compostos de interesse biotecnológico (Strobel e Daisy, 2003).

Isolamentos de fungos endofíticos já foram realizados a partir de uma ampla variedade de espécies vegetais, desde gramíneas (Müller e Krauss, 2005; Márquez *et al.*, 2012) a espécies arbóreas (Arnold *et al.*, 2003; Arnold e Lutzoni, 2007), abrangendo plantas medicinais (Radu e Kqueen, 2002; Borges e Pupo, 2006; Huang *et al.*, 2007; Mussi-Dias *et al.*, 2012), plantas tóxicas (Souza *et al.*, 2004; Cafêu *et al.*, 2005) e culturas de interesse econômico como o cacau (Rubini *et al.*, 2005; Mejía *et al.*, 2008; Hanada *et al.*, 2010), o café (Santamaría e Bayman, 2005; Sette *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2009; Vega *et al.*, 2010), a cana-de-açúcar (Stuart *et al.*, 2010; Leme *et al.*, 2013), o milho (Fisher *et al.*, 1992; Orole e Adejumo, 2011), a soja

(Pimentel *et al.*, 2006; Hamayun *et al.*, 2009a; Leite *et al.*, 2013) e o trigo (Larran *et al.*, 2007).

Em 2010, foi realizado por Gonzaga e Queiroz o isolamento de fungos endofíticos de tecidos foliares do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). O feijoeiro comum é uma planta muito cultivada no Brasil e seu grão, o feijão, é um alimento rico em proteínas e ferro e faz parte da dieta alimentar da maioria dos países latino-americanos (Azevedo *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2007). Essa cultura tem importância sócio-econômica inquestionável para o Brasil, tendo em vista que esse país é um dos maiores produtores mundiais e apresenta um alto consumo per capita desse alimento (Embrapa, 1994; Brackmann *et al.*, 2002; Azevedo *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2007).

Apesar do destaque como um dos maiores produtores de grãos de feijão do mundo, a produção brasileira tem sofrido variações no decorrer dos anos. Em 2010, ela foi aproximadamente 3,1 milhões de toneladas; em 2011, foi aproximadamente 3,4 milhões de toneladas, enquanto que em 2012 ocorreu um decréscimo, sendo aproximadamente 2,8 milhões de toneladas. Em 2013, apresentou-se um discreto incremento, sendo a produção obtida de aproximadamente 2,9 milhões de toneladas (IBGE, 2013). A diminuição da produtividade na cultura do feijoeiro e, conseqüentemente, os prejuízos econômicos, são decorrentes, em parte, das doenças que acometem essa cultura. Entre os principais agentes microbianos causadores de doenças no feijoeiro destacam-se os fungos *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib., responsável pela antracnose (Bailey e Deverall, 1971); *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* (Schl.) Kend. & Snyder, causador da fusariose ou murcha-de-fusarium (Kendrick e Snyder, 1942); *Rhizoctonia solani* Kuhn, agente etiológico da mela ou murcha-da-teia-micélica (Brown e McCarter, 1976); e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, agente causal do mofo branco (Purdy, 1979).

No cenário brasileiro, dada à importância econômica e social do feijoeiro comum, há uma necessidade eminente de desenvolvimento de formas alternativas eficientes para o combate das doenças que acometem essa cultura. Assim, ao considerarmos, que os fungos endofíticos podem produzir uma ampla variedade de metabólitos secundários, que desempenham importantes papéis fisiológicos e de defesa da planta e que

podem ser biotecnologicamente aplicáveis, o presente estudo objetivou avaliar a atividade antimicrobiana e o potencial de uso de fungos endofíticos do feijoeiro comum no controle de fitopatógenos desta cultura.

2. Material e métodos

Os ensaios desse estudo foram conduzidos no Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos e no Laboratório de Patógenos Alimentares, que pertencem ao Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

2.1. Micro-organismos

Os fungos endofíticos utilizados (90 isolados, no total), listados na **Tabela 1**, foram isolados das folhas de duas cultivares (Ouro Negro e Talismã) do feijoeiro comum e identificados com base em caracteres morfológicos e pelo sequenciamento da região do espaçador interno transcrito (ITS do rDNA) e da região D1/D2 da subunidade maior do ribossomo (LSU do rDNA), por Gonzaga e Queiroz (2010).

Tabela 1. Fungos endofíticos isolados do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizados neste estudo.

Código do isolado	Espécie	Código do isolado	Espécie	Código do isolado	Espécie
CMON 03	<i>Cercospora</i> sp.	CMON 43	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CMT 37	<i>Fusarium</i> sp.
CMON 05	Não identificada	CMON 44	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CMT 38	<i>Phomopsis</i> sp.
CMON 08	<i>Cochliobolus sativus</i>	CMON 45	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CMT 39	<i>Colletotrichum boninense</i>
CMON 09	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CMON 46	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CMT 40	<i>Colletotrichum boninense</i>
CMON 10	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	CMON 47	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CMT 41	<i>Phomopsis</i> sp.
CMON 11	<i>Cercospora</i> sp.	CMON 48	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CMT 42	<i>Colletotrichum boninense</i>
CMON 12	<i>Cochliobolus sativus</i>	CMON 49	<i>Crinipellis</i> sp.	CMT 43	<i>Phomopsis</i> sp.
CMON 13	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CMON 51	<i>Magnaporthe grisea</i>	CMT 44	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
CMON 14	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CMON 53	<i>Cochliobolus</i> sp.	CMT 45	<i>Colletotrichum boninense</i>
CMON 15	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CMON 58	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CMT 46	<i>Colletotrichum boninense</i>
CMON 16	<i>Cochliobolus sativus</i>	CMT 01	<i>Cladosporium</i> sp.	CMT 47	<i>Cochliobolus sativus</i>
CMON 18	<i>Penicillium brevicompactum</i>	CMT 03	<i>Fusarium oxysporum</i>	CMT 50	<i>Phomopsis</i> sp.
CMON 19	Não identificada	CMT 04	<i>Fusarium oxysporum</i>	CMT 51	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
CMON 20	<i>Phomopsis</i> sp.	CMT 05	<i>Fusarium oxysporum</i>	CMT 53	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
CMON 21	Não identificada	CMT 06	<i>Fusarium oxysporum</i>	CMT 55	<i>Colletotrichum boninense</i>
CMON 23	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CMT 07	<i>Fusarium oxysporum</i>	CMT 59	<i>Cercospora kikuchii</i>
CMON 24	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CMT 09	<i>Cochliobolus kusanoi</i>	CMT 60	<i>Phomopsis</i> sp.
CMON 25	<i>Cochliobolus sativus</i>	CMT 10	Não identificada	CMT 61	<i>Phomopsis</i> sp.
CMON 26	<i>Colletotrichum boninense</i>	CMT 12	<i>Cochliobolus kusanoi</i>	CMT 62	Não identificada
CMON 27	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	CMT 13	<i>Cladophialophora</i> sp.	CMT 63	<i>Cercospora kikuchii</i>
CMON 28	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	CMT 17	<i>Colletotrichum boninense</i>	CMT 65	<i>Cercospora kikuchii</i>
CMON 29	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CMT 18	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	CMT 66	<i>Cercospora kikuchii</i>
CMON 33	<i>Cochliobolus kusanoi</i>	CMT 19	<i>Colletotrichum boninense</i>	CMT 68	<i>Bipolaris sorokiniana</i>
CMON 35	<i>Cladosporium</i> sp.	CMT 20	<i>Phomopsis</i> sp.	CMT 69	<i>Fusarium oxysporum</i>
CMON 36	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CMT 27	<i>Cercospora zebrinae</i>	CMT 70	<i>Phomopsis</i> sp.
CMON 37	<i>Colletotrichum</i> sp.	CMT 31	<i>Cochliobolus kusanoi</i>	CMT 71	<i>Phomopsis</i> sp.
CMON 39	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	CMT 32	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CMT 72	<i>Colletotrichum boninense</i>
CMON 40	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	CMT 34	<i>Colletotrichum</i> sp.	CMT 73	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
CMON 41	<i>Cytospora</i> sp.	CMT 35	<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	CMT 74	<i>Colletotrichum boninense</i>
CMON 42	<i>Cochliobolus</i> sp.	CMT 36	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CMT 75	Não identificada

As siglas: CMON, Cultura pura da cultivar Ouro Negro e CMT, Cultura pura da cultivar Talismã.

Os fungos fitopatogênicos utilizados foram *Colletotrichum lindemuthianum* raça 89, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. À exceção do fungo *C. lindemuthianum*, presente na micoteca do Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos, os outros fungos pertencem ao Laboratório de Patologia de Sementes e de Pós-Colheita do Departamento de Fitopatologia da UFV.

As bactérias *Bacillus subtilis* ATCC 23857, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25238 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 são pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Genética Molecular de Micro-organismos e as bactérias *Bacillus cereus* ATCC 4904, *Escherichia coli* ATCC 29214 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 são pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Patógenos Alimentares da mesma instituição e foram utilizadas como linhagens-teste.

2.2. Ensaio de cultura dupla (fungos endofíticos x fitopatógenos)

Nesse ensaio, 90 isolados endofíticos foram contrastados com quatro fungos fitopatogênicos (*C. lindemuthianum*, *F. oxysporum*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*). O ensaio foi estruturado conforme proposto por Campanile *et al.* (2007), mas sujeito a pequenas modificações. Placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo 20 mL do meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) foram inoculadas com um disco de micélio de 6 mm de diâmetro do fitopatógeno. No lado oposto da placa, as mesmas foram inoculadas com um disco do isolado endofítico a ser avaliado. A placa testemunha continha um disco de micélio do fitopatógeno e em seu lado oposto, um disco ágar-água, sem fungo. As placas foram incubadas à temperatura de 22 °C, quando o fitopatógeno era *C. lindemuthianum* e a 28 °C quando eram *F. oxysporum*, *R. solani* ou *S. sclerotiorum*, sendo em ambos os casos, em condições de fotoperíodo de 12 horas.

Primeiramente, os resultados das interações “fungos endofíticos x fitopatógenos” foram registrados de maneira qualitativa, recebendo uma classificação simbólica: “-”, quando o isolado endofítico não apresentou atividade antagônica e “+”, quando o isolado endofítico apresentou alguma atividade antagônica. A atividade antagônica apresentada pelos fungos

endofíticos foi registrada seguindo a classificação proposta por Mejía *et al.* (2008), mas sujeita a modificações: “antibiose”, quando a inibição do crescimento do fitopatógeno foi determinada pela presença de uma zona de inibição, ou “competição pelo substrato”, quando houve maior crescimento do fungo endofítico em relação ao patógeno, sem a presença de uma zona de inibição.

Os fungos endofíticos que tiveram suas interações com os quatro fungos fitopatogênicos testadas e classificadas como “+” foram selecionados para uma análise quantitativa, que visou calcular o percentual de inibição do crescimento de fitopatógenos, em virtude da presença de fungos endofíticos antagonistas. Nessa análise, o crescimento das colônias dos fungos fitopatogênicos foi registrado por meio da medição do diâmetro da colônia, com auxílio de um paquímetro, em intervalos de 1 dia, por tempo suficiente para que o controle negativo (testemunha) crescesse por toda a placa. O percentual de inibição do crescimento radial do fitopatógeno foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $(DM - dm) / DM \times 100$, onde DM = diâmetro médio das colônias das três replicatas do controle negativo (fitopatógeno na ausência do fungo endofítico antagonista) e dm= diâmetro médio das colônias das três replicatas do tratamento (fitopatógeno na presença do fungo endofítico antagonista).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. A Análise de Variância (ANOVA) e a comparação de média pelo teste Tukey a 5 % de significância foram realizadas utilizando o programa R (versão 3.0.0).

2.3. Obtenção de extratos brutos de metabólitos fúngicos por meio de fermentação no estado sólido

Para a realização da Fermentação no Estado Sólido (FES), o substrato de escolha foi o farelo de trigo. Assim, 100 g desse substrato, adquirido em mercado local, foi adicionado a um frasco Erlenmeyer de 1000 mL, que continha previamente 100 mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada e esterilizada em autoclave (121 °C, 30 min.). Um pré-inóculo, que consistiu na inoculação de 10 discos de micélio fresco, de 6 mm

de diâmetro, do fungo previamente cultivado em BDA, em caldo ME (extrato de malte) a 2 % (m/v), e incubação em plataforma oscilatória, a 25°C e 150 rpm, por 24 horas. Após esse período, o pré-inóculo foi adicionado ao frasco Erlenmeyer de 1000 mL contendo o farelo de trigo, seguido por incubação em repouso a 25 °C, por 10 dias. Após o período de incubação, foi realizada extração com o solvente orgânico acetato de etila. Desta maneira, adicionou-se 100 mL de acetato de etila no frasco da FES e este foi mantido em repouso, em temperatura ambiente, por 24 h. Após esse período, o solvente foi coletado e outra alíquota de 100 mL foi adicionada ao frasco, que foi mantido em repouso por igual período. As duas frações de solvente resultantes foram reunidas e sulfato de sódio anidro foi adicionado para a remoção de resquícios de água que estivessem presentes. Em seguida, foi realizada a concentração dessas frações em evaporador rotativo a 45 °C e a massa final foi determinada, dissolvida em Dimetilsufóxido (DMSO), filtro-esterilizada por meio de membrana Millipore® de 0,22 µm e armazenada no escuro a 4 °C.

2.4. Avaliação de atividade antibacteriana dos extratos de metabólitos

Os inóculos contendo as linhagens-teste foram preparados de acordo com as recomendações da norma M7-A6 do manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003), disponibilizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Assim, com o auxílio de um *swab* estéril, foi realizado o espalhamento superficial do inóculo de bactérias em placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Muller-Hinton. Em seguida foram removidos pedaços de ágar de 5 mm de diâmetro de cada uma das placas, onde foram inoculadas as linhagens-teste. Nos locais da remoção dos pedaços de ágar foram observados poços e nestes foram adicionados os extratos brutos de metabólitos fúngicos em avaliação. Após a adição dos extratos aos poços, as placas foram mantidas em temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica na temperatura apropriada para cada bactéria (linhagem-teste), por um período de 24 a 48 horas. O extrato do farelo de trigo e o DMSO foram utilizados

como controle negativo e também adicionados aos poços ao invés do extrato bruto de metabólitos fúngicos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata utilizando o delineamento experimental do tipo inteiramente casualizado. Os resultados foram obtidos pela mensuração dos halos de inibição apresentados pelos extratos. Análise de variância (ANOVA) e comparação de média pelo teste Tukey a 5 % de significância foram realizadas utilizando o programa R (versão 3.0.0).

2.5. Avaliação de atividade antifúngica dos extratos de metabólitos

A atividade antifúngica dos extratos de metabólitos de fungos endofíticos foi avaliada por meio da metodologia "*Poisoned Food*", também chamada de diluição em ágar (Ali-Shtayeh e Ghdeib, 1999; Chutia *et al.*, 2009). Os fitopatógenos-alvos foram os mesmos utilizados no ensaio de cultura dupla. Assim, cada um dos extratos de metabólitos dos fungos endofíticos foram adicionados em quantidade suficiente, para a obtenção da concentração de interesse, em meio BDA fundido, previamente esterilizado. A mistura foi agitada e, em seguida, transferida para placas de Petri de 90 mm de diâmetro para solidificação. O extrato do farelo de trigo e o DMSO foram dissolvidos separadamente em meio BDA, para utilização como controles negativos. Uma vez preparadas as combinações, adicionou-se no centro de cada placa de Petri, um disco de micélio fresco, de 6 mm de diâmetro, do fitopatógeno a ser testado, que foi previamente cultivado em BDA, e procedeu-se à incubação na temperatura ideal para o crescimento do fitopatógeno em avaliação. O diâmetro de cada fitopatógeno foi mensurado, em quatro direções diferentes, a cada 24 horas. O ensaio foi encerrado no momento em que os fitopatógenos inoculados nos controles negativos cresceram até atingir a borda das placas. A inibição do crescimento foi calculada em porcentagem, de acordo com a seguinte fórmula, que considera a inibição do crescimento em relação ao controle: $(D_c - D_t / D_c) \times 100$, onde D_c = Diâmetro médio das colônias das três replicatas do controle negativo e D_t = Diâmetro médio das colônias das três replicatas do tratamento, ou seja, na presença de extratos de metabólitos. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. A Análise

de Variância (ANOVA) e a comparação de média pelo teste Tukey a 5 % de significância foram realizadas utilizando o programa R (versão 3.0.0).

3. Resultados

A metodologia de triagem chamada ensaio de cultura dupla foi empregada com o intuito de verificar a capacidade dos 90 isolados endofíticos interagirem, direta ou indiretamente, com fungos fitopatogênicos (*C. lindemuthianum*, *F. oxysporum*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*) e inibirem o crescimento dos mesmos. Os resultados da análise qualitativa desse ensaio estão descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Avaliação da atividade antagônica de fungos endofíticos do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) por meio de cultivo pareado com fungos fitopatogênicos.

Isolados endofíticos	Fungos fitopatogênicos-teste			
	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
CMON 03	-	-	-	-
CMON 05	-	-	-	-
CMON 08	-	-	-	-
CMON 09	-	-	-	-
CMON 10	+	+	+	+
CMON 11	+	+	-	-
CMON 12	+	-	-	+
CMON 13	-	-	-	-
CMON 14	-	-	-	-
CMON 15	-	-	-	-
CMON 16	-	-	-	-
CMON 18	-	-	-	-
CMON 19	-	-	-	-
CMON 20	+	+	+	+
CMON 21	-	-	-	-
CMON 23	+	-	-	-
CMON 24	-	-	-	-
CMON 25	+	+	+	+
CMON 26	-	-	-	-
CMON 27	+	+	+	+
CMON 28	+	+	+	+
CMON 29	+	-	-	-
CMON 33	+	-	-	-

Tabela 2. Continuação

CMON 35	+	-	-	+
CMON 36	+	+	-	+
CMON 37	-	-	-	-
CMON 39	-	-	-	-
CMON 40	-	-	-	-
CMON 41	-	-	-	-
CMON 42	-	-	-	-
CMON 43	+	+	+	+
CMON 44	-	-	-	-
CMON 45	+	+	+	+
CMON 46	+	-	-	-
CMON 47	+	+	-	-
CMON 48	+	+	-	-
CMON 49	-	-	-	-
CMON 51	-	-	-	-
CMON 53	+	+	+	+
CMON 58	-	-	-	-
CMT 01	-	-	-	-
CMT 03	+	+	+	+
CMT 04	+	+	-	-
CMT 05	+	+	-	-
CMT 06	+	-	-	+
CMT 07	-	-	-	-
CMT 09	+	+	-	+
CMT 10	-	-	-	-
CMT 12	-	-	-	-
CMT 13	-	-	-	-
CMT 17	+	-	-	-
CMT 18	-	+	-	+
CMT 19	+	+	-	-
CMT 20	+	+	-	-
CMT 27	-	+	-	-
CMT 31	-	+	-	-
CMT 32	-	-	-	-
CMT 34	-	-	-	-
CMT 35	+	-	-	+
CMT 36	+	-	-	-
CMT 37	+	+	+	+
CMT 38	+	-	-	+
CMT 39	-	-	-	+
CMT 40	+	+	-	-
CMT 41	+	+	+	+
CMT 42	+	-	-	-
CMT 43	+	+	-	-
CMT 44	-	-	-	-
CMT 45	-	+	-	-
CMT 46	+	+	-	-

Tabela 2. Continuação				
CMT 47	-	-	-	-
CMT 50	+	+	+	+
CMT 51	-	-	-	-
CMT 53	-	-	-	-
CMT 55	-	-	-	-
CMT 59	+	+	+	+
CMT 60	+	+	-	-
CMT 61	+	-	-	-
CMT 62	-	-	-	-
CMT 63	+	-	-	+
CMT 65	-	-	-	-
CMT 66	-	-	-	-
CMT 68	+	+	+	+
CMT 69	+	+	+	+
CMT 70	-	-	-	-
CMT 71	+	-	-	-
CMT 72	+	-	-	-
CMT 73	-	-	-	-
CMT 74	+	+	-	-
CMT 75	-	-	-	-
Total de isolados com atividade*	45/90 (50, 0 %)	33/90 (36, 7 %)	15/90 (16, 7 %)	25/90 (27, 8 %)

*Os símbolos: (+), isolado endofítico que apresentou atividade antagônica; (-), isolado endofítico que não apresentou atividade antagônica.

Todas as interações entre os isolados endofíticos e *C. lindemuthianum* classificadas como “+”, tiveram suas atividades antagônicas classificadas como “competição pelo substrato”. O mesmo ocorreu com as interações “+” entre os isolados endofíticos e *F. oxysporum*. Das interações classificadas como “+” entre *R. solani* e isolados endofíticos, 86,7 % (13/15) delas foram classificadas como “antibiose”; o restante, 13,3 % (2/15), receberam a classificação “competição pelo substrato”. O total de 88,0 % (22/25) das interações “+” entre *S. sclerotiorum* e isolados endofíticos foram classificadas como “antibiose”, enquanto 12,0 % (3/25) foram classificadas como “competição pelo substrato”. Na **Figura 1**, são apresentados três exemplos de interações entre fungos endofíticos do feijoeiro e o fitopatógeno *S. sclerotiorum*, classificadas como “+” e, simultaneamente, como “antibiose”.

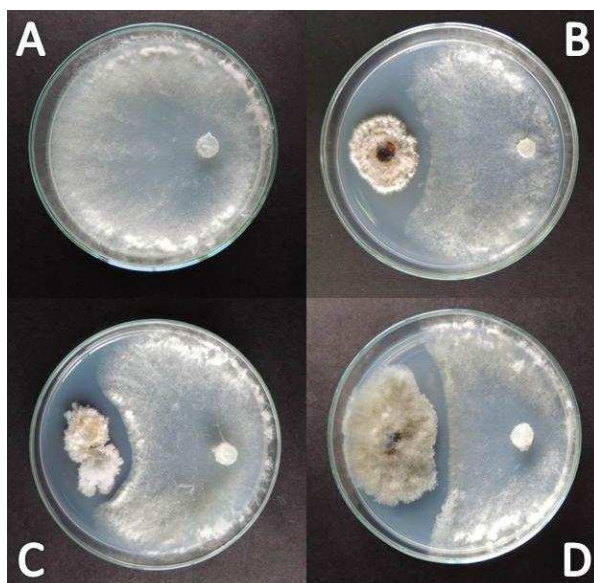


Figura 1. Ensaio de cultura dupla entre o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (S.s.) e fungos endofíticos, após sete dias de crescimento a 28 °C. O fitopatógeno está posicionado no canto direito da placa de Petri, enquanto os isolados endofíticos, quando presentes, no canto esquerdo. Em (A) ausência de antagonistas; (B) presença do fungo endofítico *Bipolaris sorokiniana* (CMON 28); (C) presença de *Fusarium* sp. (CMT 37) e (D) presença de outro isolado de *B. sorokiniana* (CMT 68).

Um total de 15 isolados (16, 7 %) foi capaz de antagonizar o crescimento micelial dos quatro fungos fitopatogênicos testados. Assim, para uma melhor caracterização do potencial antagônico desses 15 isolados, foram realizados novamente ensaios de cultura pareada e uma análise quantitativa visando ao cálculo do percentual de inibição do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos, em virtude da presença desses fungos endofíticos antagonistas. Os resultados dessa análise estão sumarizados na **Tabela 3.**

Tabela 3. Crescimento e porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* em ensaio de cultura dupla com isolados endofíticos do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.).

Isolados	Crescimento micelial (mm)				Inibição do crescimento micelial (%)			
	C. l.	F. o.	R. s.	S. s.	C. l.	F. o.	R. s.	S. s.
Controle	86,8 a	84,0 a	88,5 a	86,2 a				
CMON 10	26,0 fgh	45,0 cde	54,7 e	54,7 bc	70,0	46,4	38,2	36,5
CMON 20	21,4 h	43,0 cde	84,7 a	45,7 e	75,3	48,8	4,3	47,0
CMON 25	34,3 cd	54,7 b	46,7 f	45,0 e	60,5	34,8	47,2	47,8
CMON 27	25,0 fgh	39,7 e	52,0 e	46,7 de	71,2	52,7	41,2	45,8
CMON 28	30,7 defg	43,0 cde	56,4 de	56,6 bc	64,6	48,8	36,3	34,3
CMON 43	31,3 def	44,0 cde	65,7 b	51,7 bcde	63,9	47,6	25,8	40,0
CMON 45	34,0 cd	49,0 bcd	61,7 bcd	53,0 bcd	60,8	41,7	30,3	38,5
CMON 53	44,3 b	49,7 bc	63,7 b	58,0 b	49,0	40,8	28,0	32,7
CMT 03	24,6 gh	39,8 e	67,3 b	57,3 bc	71,7	52,6	24,0	33,5
CMT 37	43,7 b	44,3 cde	62,7 bc	47,0 de	49,7	47,3	29,2	45,5
CMT 41	21,7 h	39,0 e	57,0 cde	45,7 e	75,0	53,6	35,6	47,0
CMT 50	32,7 de	42,7 cde	54,0 e	54,7 bc	62,3	49,2	39,0	36,5
CMT 59	26,4 efgh	40,6 de	67,0 b	53,7 bcd	69,6	51,7	24,3	37,7
CMT 68	39,3 bc	42,3 cde	55,3 e	50,3 cde	54,7	49,6	37,5	41,6
CMT 69	42,3 b	45,0 cde	55,0 e	54,7 bc	51,3	46,4	37,9	36,5

As médias seguidas pela mesma letra, em uma mesma coluna, não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey a 5 % de significância. As siglas: C.l., *Colletotrichum lindemuthianum*; F.o., *Fusarium oxysporum*; R.s., *Rhizoctonia solani* e S.s., *Sclerotinia sclerotiorum*.

Após verificado que esses 15 isolados endofíticos eram capazes de inibir fungos fitopatogênicos *in vitro* e, com o intuito de investigar essa capacidade de inibição de outros micro-organismos de uma forma mais aprofundada, esses 15 isolados foram selecionados para fermentação no estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato, e obtenção de extratos brutos de metabólitos, extratos estes, que foram avaliados em relação à atividade antibacteriana e antifúngica.

Em relação à avaliação dos extratos quanto à atividade antibacteriana, na **Figura 2** podem ser evidenciados halos de inibição do crescimento das bactérias *B. subtilis* ATCC 23857 e *S. aureus* ATCC 6538 formados pela presença do extrato bruto de metabólitos, neste caso do fungo endofítico *Cochliobolus* sp. (CMON 53).

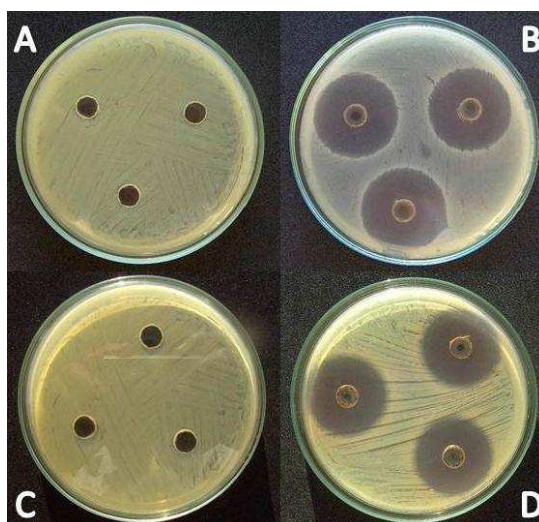


Figura 2. Representação dos halos de inibição de crescimento de bactérias na presença de extratos brutos de metabólitos de fungos endofíticos. Em (A), a placa controle, inoculada com a bactéria *Bacillus subtilis* e em (B), os halos de inibição do crescimento de *B. subtilis* na presença do extrato bruto de *Cochliobolus* sp. (CMON 53). Em (C), a placa controle, inoculada com a bactéria *Staphylococcus aureus* e em (D), os halos de inibição do crescimento de *S. aureus* na presença do extrato bruto de *Cochliobolus* sp. (CMON 53). Em ambas as placas controle, o DMSO foi utilizado como controle negativo.

Na **Tabela 4** estão descritos os resultados dos ensaios de atividade antibacteriana. Apesar das bactérias Gram-negativas testadas não terem sido inibidas por qualquer dos extratos brutos de metabólitos avaliados,

todas as bactérias Gram-positivas foram significativamente inibidas por pelo menos um dos extratos.

Os resultados da atividade antifúngica dos extratos brutos de metabólitos de fungos endofíticos estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 4. Atividade antibacteriana de extratos brutos de metabólitos de fungos endofíticos do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.).

Extrato bruto	Linhagens-teste					
	B. c.	B. s.	E. c.	L. m.	P. a.	S. a.
CMON 10	2,0 ijk $\pm$ 0,0	3,7 cde $\pm$ 0,6	0,0	2,0 gh $\pm$ 0,0	0,0	0,0 g
CMON 20	4,7 fg $\pm$ 0,6	1,7 ef $\pm$ 0,6	0,0	1,3 h $\pm$ 0,6	0,0	2,0 f $\pm$ 0,0
CMON 25	2,3 hij $\pm$ 0,6	3,0 cde $\pm$ 1,0	0,0	0,0 i	0,0	0,0 g
CMON 27	5,0 fg $\pm$ 0,0	5,3 c $\pm$ 0,6	0,0	7,7 e $\pm$ 0,6	0,0	10,7 c $\pm$ 0,6
CMON 28	5,7 ef $\pm$ 1,1	2,7 cdef $\pm$ 0,6	0,0	10,0 d $\pm$ 0,0	0,0	6,0 d $\pm$ 1,0
CMON 43	1,3 jk $\pm$ 0,6	2,3 def $\pm$ 0,6	0,0	2,7 g $\pm$ 0,6	0,0	2,3 f $\pm$ 0,6
CMON 45	7,3 de $\pm$ 0,6	29,7 a $\pm$ 0,6	0,0	25,7 a $\pm$ 0,6	0,0	13,3 b $\pm$ 0,6
CMON 53	14,3 a $\pm$ 0,6	31,3 a $\pm$ 2,5	0,0	18,7 c $\pm$ 0,6	0,0	19,6 a $\pm$ 0,6
CMT 03	2,3 hij $\pm$ 0,6	5,0 cd $\pm$ 0,0	0,0	4,3 f $\pm$ 0,6	0,0	5,0 de $\pm$ 0,0
CMT 37	12,0 b $\pm$ 1,7	12,3 b $\pm$ 1,2	0,0	20,3 b $\pm$ 0,6	0,0	12,7 b $\pm$ 0,6
CMT 41	4,3 fgh $\pm$ 0,6	2,0 ef $\pm$ 0,0	0,0	4,0 f $\pm$ 0,0	0,0	1,0 fg $\pm$ 0,0
CMT 50	3,7 fghi $\pm$ 0,6	1,3 ef $\pm$ 0,6	0,0	2,0 gh $\pm$ 0,0	0,0	1,7 f $\pm$ 0,6
CMT 59	10,7 bc $\pm$ 0,6	9,7 b $\pm$ 0,6	0,0	7,3 e $\pm$ 0,6	0,0	4,3 e $\pm$ 0,6
CMT 68	3,0 ghij $\pm$ 1,0	3,7 cde $\pm$ 0,6	0,0	1,3 h $\pm$ 0,6	0,0	2,0 f $\pm$ 0,0
CMT 69	8,7 cd $\pm$ 0,6	11,0 b $\pm$ 1,0	0,0	10,0 d $\pm$ 0,0	0,0	5,0 de $\pm$ 0,0
DMSO	0,0 k	0,0 f	0,0	0,0 i	0,0	0,0 g

Os valores em mm dos halos de inibição são a média de três replicatas, seguido pelo desvio padrão. As médias seguidas pela mesma letra, em uma mesma coluna, não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey a 5 % de significância. Os extratos brutos foram testados na concentração de 100 mg.mL⁻¹. DMSO e extrato de farelo de trigo foram utilizados como controles negativos. Os controles contendo extrato de farelo de trigo não apresentaram halo de inibição para as linhagens em teste (suprimido da tabela). As siglas: B.c., *Bacillus cereus*; B.s., *Bacillus subtilis*; E.c., *Escherichia coli*; L.m., *Listeria monocytogenes*; P.a., *Pseudomonas aeruginosa* e S.a., *Staphylococcus aureus*.

Tabela 5. Atividade antifúngica de extratos brutos de metabólitos de fungos endofíticos do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.).

Crescimento micelial (mm)					Inibição do crescimento micelial (%)			
Extratos	C. l.	F. o.	R. s.	S. s.	C. l.	F. o.	R. s.	S. s.
DMSO	88,0 a	88,0 a	89,0 a	88,7 a				
CMON 10	84,1 abc	82,5 cd	76,3 b	61,1 fgh	4,4	6,3	13,8	31,1
CMON 20	81,0 abcd	81,0 d	65,4 fgh	64,9 efg	8,0	8,0	26,5	26,8
CMON 25	77,0 def	78,0 e	68,4 ef	58,9 gh	12,5	11,4	23,1	33,6
CMON 27	77,2 def	68,0 fg	75,1 bc	59,3 gh	12,3	22,7	15,6	33,1
CMON 28	85,1 ab	82,8 cd	71,9 cde	74,4 bcd	3,3	5,9	19,2	16,1
CMON 43	71,1 fg	85,7 ab	71,9 cde	78,0 b	19,2	2,6	19,2	12,1
CMON 45	63,1 h	84,5 bc	64,2 gh	56,6 h	28,3	4,0	27,9	36,2
CMON 53	62,4 h	64,4 h	68,5 ef	74,8 bc	29,1	26,8	23,0	15,7
CMT 03	63,6 h	61,7 i	73,4 bcd	63,7 efgh	27,7	22,9	17,5	28,2
CMT 37	67,9 gh	69,6 f	68,2 efg	61,5 fgh	22,8	20,9	23,4	30,7
CMT 41	74,7 efg	76,0 e	62,2 h	75,2 bc	15,1	13,6	30,1	15,2
CMT 50	77,7 cdef	83,7 bcd	69,4 def	67,4 def	11,7	4,9	22,0	24,0
CMT 59	76,7 ef	86,3 ab	63,6 h	74,7 bc	12,8	1,9	28,5	15,8
CMT 68	83,4 abcd	63,7 hi	77,2 b	62,6 fgh	5,2	27,6	13,3	29,4
CMT 69	72,5 fg	66,2 gh	68,4 ef	70,1 cde	17,6	24,8	23,1	21,0

Os valores em mm dos diâmetros das colônias são a média de três replicatas. Os extratos brutos foram testados na concentração de 100 mg.L⁻¹. DMSO e extrato de farelo de trigo foram utilizados como controles negativos. Os controles contendo extrato de farelo de trigo não exibiram inibição para isolados em teste (suprimido da tabela). As médias seguidas pela mesma letra, em uma mesma coluna, não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey a 5 % de significância. As siglas: C.l., *Colletotrichum lindemuthianum*; F.o., *Fusarium oxysporum*; R.s., *Rhizoctonia solani* e S.s., *Sclerotinia sclerotiorum*.

4. Discussão

A cultura do feijoeiro comum pode ser acometida por uma série de doenças que comprometem sua produção e, conseqüentemente, geram prejuízos econômicos. Entre os principais fungos fitopatogênicos causadores de danos a essa cultura, destacam-se *C. lindemuthianum*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*, que tradicionalmente são controlados por meio da aplicação de produtos químicos (Bolton *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2011; Pedro *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2013). Além de levar à seleção de fitopatógenos resistentes, o uso indiscriminado de defensivos agrícolas pode ter efeitos deletérios sobre o meio ambiente e a saúde humana (Grigoletti Júnior *et al.*, 2000; Morandi e Bettiol, 2009). Diante da importância da cultura do feijoeiro comum, evidencia-se a necessidade eminente de desenvolvimento de medidas alternativas, como controle biológico, que sejam viáveis tanto do ponto de vista econômico como ecológico, para o controle dos patógenos que acometem essa cultura.

No presente estudo, adotou-se a metodologia de triagem “ensaio de cultura dupla”, também chamado de “cultura pareada” e de “confronto direto” (Bell *et al.*, 1982; Campanile *et al.*, 2007) com o intuito de analisar o potencial de fungos endofíticos isolados dos tecidos foliares do feijoeiro comum atuarem como antagonistas a fungos fitopatogênicos. Essa metodologia é interessante, pois, possibilita estudar um grande número de potenciais antagonistas e selecionar aqueles que apresentam as características de interesse (Mariano, 1993).

Por meio da análise qualitativa do ensaio de cultura dupla realizado neste estudo, verificou-se que 50 % (45/90) dos isolados endofíticos foram considerados capazes de inibir o crescimento de *C. lindemuthianum* e 36,7 % (33/90) de *F. oxysporum*. Um percentual menor de isolados, neste caso 16,7 % (15/90) e 27,8 % (25/90), apresentaram atividade antagônica a *R. solani* e *S. sclerotiorum*, respectivamente. Em relação à classificação da atividade antagônica de acordo com a escala proposta por Mejía *et al.* (2008), as interações “+” entre os fitopatógenos *C. lindemuthianum* e *F. oxysporum* e os isolados endofíticos foram classificadas como competição pelo substrato, enquanto que a maioria das interações “+” entre os fungos

fitopatogênicos *R. solani* e *S. sclerotiorum* e os fungos endofíticos foi classificada como antibiose. Além das duas possíveis classificações consideradas em nosso estudo, Mejía *et al.* (2008) ainda propuseram uma terceira, chamada micoparasitismo, que se tratava da verificação de parasitismo direto do fungo endofítico sob a hifa do fitopatógeno. Nós não a consideramos em nosso estudo em virtude de não ter sido verificado a sobreposição do crescimento de qualquer dos fungos endofíticos sobre os fitopatógenos.

Observou-se que *R. solani*, um basidiomiceto que provoca a mela ou murcha-da-teia micélica no feijoeiro comum, foi o patógeno que teve o crescimento afetado pela menor quantidade de fungos endofíticos do feijoeiro. Esse fitopatógeno já foi confrontado por meio de ensaio de cultura dupla com fungos endofíticos de outras espécies vegetais. Foi o caso do estudo desenvolvido por Kumar e Kaushik (2013), onde culturas pareadas foram realizadas entre nove fungos endofíticos, isolados do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), e os patógenos *F. oxysporum*, *R. solani* e *S. sclerotiorum*. Foi verificado que os isolados endofíticos eram capazes de inibir satisfatoriamente o crescimento de *S. sclerotiorum* e/ou *F. oxysporum*, mas nenhum deles foi efetivo contra *R. solani*. Diante desses achados e dos resultados de nosso estudo, é perceptível que *R. solani* é um fungo que merece ainda mais estudos em busca de medidas efetivas de seu controle, quer sejam por meio da prospecção de antagonistas endofíticos, quer sejam por outras medidas alternativas.

As plantas fornecem um micro-sistema complexo com uma ampla variedade de nichos, oferecendo ambientes adequados para a coexistência e interação de diversos micro-organismos, tanto em seus tecidos internos como nos externos (Leme *et al.*, 2013). Diante disso, depreende-se que, em um ecossistema natural, uma planta potencialmente estará interagindo com mais de um fitopatógeno em simultâneo. Partindo do pressuposto de que, para um fungo endofítico ser selecionado para emprego em controle biológico, ele deve ter sido capaz de inibir o crescimento de diferentes fitopatógenos *in vitro*, somente os isolados (15, no total) que, na análise qualitativa do ensaio de cultura dupla, tiveram suas interações com os quatro

fungos fitopatogênicos utilizados neste estudo classificadas como “+”, foram selecionados para os ensaios posteriores.

A análise quantitativa do ensaio de cultura dupla realizado entre os quatro fitopatógenos e os 15 isolados endofíticos anteriormente citados, revelou uma variação significativa, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$), no crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos, a depender do endofítico que estava presente. Maiores percentuais de inibição foram verificados para o agente da antracnose do feijoeiro comum, *C. lindemuthianum*, que variaram entre 49,0 e 75,3 %, seguido pelo agente da fusariose, com inibições variando entre 34,8 e 53,6 %. A inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* variou entre 32,7 e 47,8 %, ao passo que as inibições de *R. solani* foram desde 4,3 % até, no máximo, 47,2 %.

Os resultados de nossa investigação são coerentes com os registros encontrados na literatura. Rocha *et al.* (2009), por meio de metodologia equânime à utilizada neste estudo, confrontaram 12 fungos endofíticos isolados de *Symphytum officinale* L. com o patógeno *S. sclerotiorum*. Quatro isolados endofíticos tiveram melhor atividade antagônica, resultando em redução do crescimento do fitopatógeno entre 46,7 % e 50,0 %, percentuais semelhantes aos detectados em nosso estudo. Lahlali e Hijri (2010), também por ensaio de cultura dupla, antagonizaram seis fungos endofíticos, isolados de plantas de batata ou de bordo norueguês, com um isolado de *R. solani*. Os seis isolados foram capazes de inibir o fitopatógeno, com inibições variando entre 11,4 e 81,8 %.

Uma vez verificado que fungos endofíticos do feijoeiro comum eram capazes de inibir o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos e, que essa atividade inibitória se deu tanto por competição pelo substrato, como por antibiose, procurou-se investigar a capacidade de inibição de outros micro-organismos de maneira ainda mais aprofundada. Assim, os 15 isolados endofíticos selecionados foram submetidos a cultivo, pelo método de fermentação no estado sólido, para a obtenção de extratos brutos de metabólitos. Na fermentação em estado sólido, emprega-se um substrato natural como fonte de carbono (nesse estudo foi utilizado o farelo de trigo), em presença de uma quantidade mínima de água. Esse tipo de fermentação tem sido considerada vantajosa em relação a outros métodos, como a

fermentação submersa, em virtude de promover um crescimento fúngico mais rápido e possibilitar uma produção diferenciada de metabólitos secundários (Takahashi e Lucas, 2008). Além disso, o uso de um substrato natural como fonte de carbono e energia para o fungo durante a fermentação possibilita o aproveitamento de resíduos da agroindústria, como bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, resíduos de processamento do sisal, entre outros, o que é muito interessante, tanto do ponto de vista econômico como ecológico.

Micro-organismos, assim como as plantas, são considerados importantes fontes de produtos naturais bioativos com propriedades biotecnológicas (Suryanarayanan *et al.*, 2009; Conti *et al.*, 2012). Entre esses micro-organismos, podemos destacar os fungos endofíticos. Aqui, avaliamos a atividade antimicrobiana dos extratos brutos de metabólitos de fungos endofíticos isolados do feijoeiro contra fungos fitopatogênicos e patógenos bacterianos de origem alimentar e de importância médica.

Em relação à atividade antibacteriana, observou-se uma atividade inibitória significativa em relação às bactérias Gram-positivas, uma vez que todas as bactérias testadas foram inibidas. Halos de inibição de até $14,3 \pm 0,6$ mm foram observados para *B. cereus*, de $31,3 \pm 0,6$ para *B. subtilis*, de $25,7 \pm 0,6$ para *L. monocytogenes* e de até $19,6 \pm 0,6$ para *S. aureus*. Esses resultados são coerentes com os de Idris *et al.* (2013), que avaliaram a atividade antibacteriana de extratos brutos de metabólitos de fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Kigelia africana* (Lam) Benth. contra *B. subtilis*, *S. aureus* e *E. coli*, tendo observado halos de inibição para essas bactérias variando entre 14,0 e 37,0 mm.

Entre as bactérias Gram-positivas utilizadas neste estudo e que tiveram seu crescimento inibido em virtude da presença de extratos brutos de metabólitos de fungos endofíticos do feijoeiro, está *L. monocytogenes*. Esse patógeno de origem alimentar é considerado de grande preocupação devido à sua capacidade de sobreviver e crescer em uma ampla variedade de substratos alimentares e condições ambientais, incluindo refrigeração (Gálvez *et al.*, 2010).

Nenhuma das bactérias Gram-negativas utilizadas neste estudo (*E. coli* e *P. aeruginosa*) foram inibidas pelos extratos brutos de metabólitos de

fungos endofíticos. Resultados semelhantes foram observados por Radu e Kqueen (2002) e por Phongpaichit *et al.* (2006). Radu e Kqueen (2002), ao avaliar a atividade antibacteriana de extratos de fungos endofíticos, isolados de diferentes plantas medicinais, contra *B. subtilis* (bactéria Gram-positiva) e *Salmonella typhimurium* (bactéria Gram-negativa), não detectaram qualquer extrato efetivo contra a bactéria Gram-negativa. Já no estudo de Phongpaichit *et al.* (2006), foi avaliada a atividade inibitória de extratos fermentados de fungos endofíticos isolados de espécies de *Garcinia* sp. contra diferentes micro-organismos, entre eles *E. coli* e *P. aeruginosa*. Apesar de terem detectado extratos efetivos contra *S. aureus*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, nenhum extrato mostrou efetividade contra as bactérias Gram-negativas testadas.

As bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa como constituinte de suas paredes celulares, que atua como uma barreira de permeabilidade, impedindo a difusão de compostos nocivos a elas (Nikaido, 2003; Tortora *et al.*, 2012). Provavelmente, as membranas externas das bactérias utilizadas nesta investigação são impermeáveis aos metabólitos antimicrobianos presentes nos extratos utilizados.

Já em relação à atividade antifúngica, a máxima inibição do crescimento de *C. lindemuthianum* verificada foi de 29,1 %, enquanto que para *F. oxysporum* foi de 27,6 %. Para *R. solani* e *S. sclerotiorum*, foram verificadas inibições um pouco maiores, de 30,1 % e, 36, 2 %. Apesar da inibição do crescimento micelial pelos extratos de metabólitos dos fungos endofíticos ter sido menor que a inibição promovida pela presença do fungo em si, ainda assim é uma inibição significativa e que vai de encontro ao mecanismo atribuído à atividade antagônica promovida pelos fungos endofíticos utilizados neste estudo, seguindo a classificação de Mejía *et al.* (2008), que propuseram classificar a atividade antagônica dos fungos em ensaios de cultura dupla como sendo do tipo “antibiose”, que era assim caracterizada quando se verificava a presença de halos de inibição e, “competição pelo substrato”, quando havia o maior crescimento do fungo endofítico em relação ao fungo fitopatogênico, sem a presença de uma zona de inibição. Como já mencionado anteriormente, a atividade antagônica atribuída aos endofíticos quando em interação com *C. lindemuthianum* e *F.*

oxysporum foi competição pelo substrato, enquanto que para *R. solani* e *S. sclerotiorum* foi principalmente antibiose. Assim, era de se esperar que a inibição promovida pelos extratos dos fungos endofíticos aos agentes etiológicos da antracnose e da fusariose fossem menores que as inibições de *S. sclerotiorum* e *R. solani*, como realmente ocorreu.

Entre os isolados endofíticos do feijoeiro comum cujos extratos promoveram maiores inibições do crescimento das bactérias testadas e, também apresentaram atividades antagônicas significativas aos fungos fitopatogênicos, podemos destacar os isolados *Colletotrichum gloeosporioides* (CMON 45) e *Cochliobolus* sp. (CMON 53). Isolados desses gêneros já foram detectados como endofíticos de outras espécies vegetais (Rodrigues e Menezes, 2002; Wang *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 2013) e alguns inclusive como fitopatogênicos.

Novos esforços devem ser empreendidos com a finalidade de caracterizar quimicamente os constituintes dos extratos fermentados utilizados neste estudo, sobretudo a(s) molécula(s) responsável(is) pelo efeito antimicrobiano. Tais moléculas poderão servir como protótipos para o desenvolvimento de agroquímicos ou antimicrobianos, empregáveis em práticas agrícolas e na área médica e/ou médica veterinária.

Conclui-se que fungos endofíticos do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) apresentam potencial de controle de fitopatógenos e produzem metabólitos antimicrobianos promissores, que devem ser explorados de forma ainda mais aprofundada para fins biotecnológicos.

5. Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

6. Referências

- Ali-Shtayeh MS, Ghdeib SIA (1999). Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses* 42: 665-672.
- Arnold AE, Lutzoni F (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88 (3):541-549.
- Arnold AE, Mejia LC, Kylo D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 100(26): 15649-15654.
- Azevedo JL (1998). *Microorganismos endofíticos*. In: Melo IS, Azevedo JL. (Ed.) *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: EMBRAPA, p. 117-137.
- Azevedo JL (1999). Botânica: uma ciência básica ou aplicada? *Revista brasileira de Botânica* 22(2): 225-229.
- Azevedo JL, Maccheroni Junior W, Pereira JO, Araújo WL (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 3(1): 40-65.
- Azevedo L, Gomes JC, Stringheta PC, Gontijo ÁMMC, Padovani CR, Ribeiro LR, Salvadori DMF (2003). Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. *Food and Chemical Toxicology* 41: 1671–1676.
- Bailey JA, Deverall BJ (1971). Formation and activity of phaseollin in the interaction between bean hypocotyls (*Phaseolus vulgaris*) and physiological races of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 1: 435-439.
- Bara R, Aly AH, Wray V, Lin W, Proksch P, Debbab A (2013). Talaromins A and B, new cyclic peptides from the endophytic fungus *Talaromyces wortmannii*. *Tetrahedron Letters*, 54(13): 1686–1689.
- Barretti PB, Romeiro RS, Mizubuti ESG, Souza JT (2009). Seleção de bactérias endofíticas de tomateiro como potenciais agentes de biocontrole e de promoção de crescimento. *Ciência e Agrotecnologia* 33: 2038-2044.
- Bell DK, Wells HD, Markham CR (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72: 379-382.
- Benchimol RL, Chu EY, Yuitimuto R, Dias-Filho MB (2000). Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas: sobrevivência e respostas morfofisiológicas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35(7): 1343-1348.

Bolton MD, Thomma BPHJ, Nelson BD (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology* 7(1): 1–16.

Borges WS, Pupo MT (2006). Novel anthraquinone derivatives produced by *Phoma sorghina*, an endophyte found in association with the medicinal plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 17(5): 929-934.

Brackmann A, Neuwald DA, Ribeiro ND, Freitas ST (2002). Conservação de três genótipos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do grupo carioca em armazenamento refrigerado e em atmosfera controlada. *Ciência Rural* 32(6): 911-915.

Brown EA, McCarter SM (1976). Effect of a seedling disease caused by *Rhizoctonia solani* on subsequent growth and yield of cotton. *Phytopathology* 66: 111-115.

Cabral D, Stone JK, Carroll GC (1993). The internal mycobiota of *Juncus* spp.: microscopic and cultural observations of infection patterns. *Mycological Research* 97(3): 367-376.

Cafêu MC, Silva GH, Teles HL, Bolzani VS, Araújo AR, Young MCM, Pfenning LH (2005). Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Química Nova* 28(6): 991-995.

Campanile G, Ruscelli A, Luisi N (2007). Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by *in vitro* and *in planta* tests. *European Journal of Plant Pathology* 117(3): 237–246.

Carvalho AJ, Andrade MJB, Guimarães RJ (2007). Sistemas de produção de feijão intercalado com cafeeiro adensado recém-plantado. *Ciência e Agrotecnologia* 31(1): 133-139.

Carvalho DDC, Mello SCM, Lobo Júnior M, Silva MC (2011). Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. *Tropical Plant Pathology* 36(1): 28–34.

Chutia M, Deka BP, Pathak MG, Sarma TC, Boruah P (2009). Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT - Food Science and Technology* 42(3), 777–780.

Clarke BB, White Jr JF, Hurley RH, Torres MS, Sun S, Huff DR (2006). Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. *Plant Disease* 90: 994–998.

CLSI. M7-A6 (2003). *Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada* – Sexta Edição. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne.

Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, Barka EA (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9): 4951-4959.

Conti R, Guimaraes DO, Pupo MT (2012). Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. *Ciência e Cultura* 64(3): 43-47.

Crawford KM, Land JM, Rudgers JA (2010). Fungal endophytes of native grasses decrease insect herbivore preference and performance. *Oecologia* 164(2): 431–444.

Dias PP, Berbara RLL, Fernandes MCA (2013). Controle de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* por biopreparados de isolados de *Trichoderma* spp. *Summa Phytopathologica* 39(4): 258–262.

Dolatabadi HK, Goltapeh EM, Mohammadi N, Rabiey M, Rohani N, Varma A (2012). Biocontrol Potential of Root Endophytic Fungi and *Trichoderma* Species Against *Fusarium* Wilt of Lentil Under *In vitro* and Greenhouse Conditions. *Journal of Agricultural Science and Technology* 14: 407–420.

Embrapa (1994). *O cultivo do feijão: recomendações técnicas*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa / Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão – CNPAF, 83p.

Fernandes MRV, Silva TAC, Pfenning LH, Costa-Neto CM, Heinrich TA, Alencar SM, Lima MA, Ikegaki M (2009). Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 45(4): 677-685.

Fisher PJ, Petrini O, Lappin Scott HM (1992). The distribution of some fungal and bacterial endophytes in Maize (*Zea mays* L). *New Phytologist* 122: 299–305.

Gálvez A, Abriouel H, Benomar N, Lucas R. (2010). Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. *Current Opinion in Biotechnology* 21: 142-148.

Gange AC, Eschen R, Wearn JA, Thawer A, Sutton BC (2012). Differential effects of foliar endophytic fungi on insect herbivores attacking a herbaceous plant. *Oecologia* 168(4): 1023–1031.

Gonzaga LL, Queiroz MV (2010). *Isolamento e Identificação de Fungos Endofíticos do Tecido Foliar de Feijão (Phaseolus vulgaris L.) da Zona da Mata Mineira*. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Viçosa.

Grigoletti Junior A, Santos AF, Auer CG (2000). Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. *Floresta* 30: 155-165.

Hamayun M, Khan S, Ahmad N, Tang DS, Kang SM, Na CI, Sohn EY, Hwang YH, Shin DH, Lee BH, Kim JG, Lee IJ (2009a). *Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.). Merr. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 25(4): 627-632.

Hamayun M, Khan SA, Kim HY, Chaudhary MF, Hwang YH, Shin DH, Kim IK, Lee BH, Lee IJ (2009b). Gibberellin production and plant growth enhancement by newly isolated strain of *Scolecobasidium tshawytschae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(6): 560-565.

Hanada RE, Pomella AWW, Costa HS, Bezerra JL, Loguercio LL, Pereira JO (2010). Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal Biology* 114(11-12): 901–910.

Horn WS, Simmonds MSJ, Schwartz RE, Blaney WM (1995). Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. *Tetrahedron* 51 (14):3969–3978.

Huang W-Y, Cai Y-Z, Xing J, Corke H, Sun M (2007). A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. *Economic Botany* 61(1): 14-30.

IBGE (2013). *Indicadores IBGE: Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, dezembro de 2013*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 119 p.

Idris A, Al-tahir I, Idris E (2013). Antibacterial activity of endophytic fungi extracts from the medicinal plant *Kigelia africana*. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences* 5(1): 1-9.

Kaul S, Gupta S, Ahmed M, Dhar MK (2012). Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. *Phytochemistry Reviews* 11(4): 487-505.

Kendrick JB, Snyder WC (1942). *Fusarium* yellows of Beans. *Phytopathology* 32(11): 1010-1014.

Khan AL, Hamayun M, Kang SM, Kim YH, Jung HY, Lee JH, Lee IJ (2012). Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can

improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC Microbiology* 12: 1-14.

Kumar S, Kaushik N (2013). Endophytic Fungi Isolated from Oil-Seed Crop *Jatropha curcas* Produces Oil and Exhibit Antifungal Activity. *Plos One* 8(2):1-8.

Lahlali R, Hijri M (2010). Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. *FEMS Microbiology Letters* 311: 152-159.

Larran S, Perello A, Simon MR, Moreno V (2007). The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). *World Journal Microbiology and Biotechnology* 23: 565-572.

Leite TS, Cnossen-Fassoni A, Pereira OL, Mizubuti ESG, Araújo EF, Queiroz MV (2013). Novel and Highly Diverse Fungal Endophytes in Soybean Revealed by the Consortium of Two Different Techniques. *Journal of Microbiology* 51(1): 56–69.

Leme AC, Bevilaqua MRR, Rhoden SA, Mangolin CA, Machado MFPS, Pamphile JA (2013). Molecular characterization of endophytes isolated from *Saccharum* spp based on esterase and ribosomal DNA (ITS1-5.8S-ITS2) analyses. *Genetics and Molecular Research* 12(3): 4095–105.

Mariano RLR (1993). Métodos de seleção “*in vitro*” para controle microbiológico. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 1: 369–409.

Márquez SS, Bills GF, Herrero N, Zabalgogezcoa Í (2012). Non-systemic fungal endophytes of grasses. *Fungal ecology* 5: 289-297.

Mejía LC, Rojas EI, Maynard Z, Bael SV, Arnold AE, Hebbar P, Samuels GJ, Robbins N, Herre EA (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control* 46: 4–14.

Momesso LS, Kawano CY, Ribeiro PH, Nomizo A, Goldman GH, Pupo MT (2008). Chaetoglobosinas produzidas por *Chaetomium globosum*, fungo endofítico associado a *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae). *Química Nova* 31(7): 1680-1685.

Morandi MAB, Bettiol W (2009). *Controle biológico de doenças de plantas no Brasil*. In: Bettiol W, Morandi MAB (Ed.) (2009). *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Embrapa Meio Ambiente, 341 p.

Moreno E, Varughese T, Spadafora C, Arnold E, Coley PD, Kursar TA, Gerwick WH, Cubilla-Riosa L (2011). Chemical Constituents of the New Endophytic Fungus *Mycosphaerella* sp. nov. and Their Anti-Parasitic Activity. *Natural Product Communications* 6: 835-840.

Moura AB, Romeiro RS, Neves MCP (1998). Bioensaio para avaliação massal de actinomicetos antagonistas a *Ralstonia solanacearum*, em tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 33(12): 2065-2072.

Müller CB, Krauss J (2005). Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current Opinion in Plant Biology* 8 (4): 450-456.

Mussi-Dias V, Araújo ACO, Silveira SF, Rocabado JMA, Araújo KL (2012). Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 14(2): 261-266.

Nikaido H (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4): 593-656.

Oki Y, Soares N, Belmiro MS, Corrêa Jr. A, Fernandes GW (2009). Influência dos fungos endofíticos sobre os herbívoros de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). *Neotropical Biology and Conservation* 4(2): 83-88.

Orole OO, Adejumo TO (2011). Bacterial and fungal endophytes associated with grains and roots of maize. *Journal of Ecology and The Natural Environment*. 3: 298-303.

Ownley BH, Gwinn KD, Vega FE (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl* 55: 113–128.

Pedro EAS, Harakava R, Lucon CMM, Guzzo SD (2012). Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 47(11): 1589–1595.

Peixoto Neto PAS, Azevedo JL, Araújo WL (2002). Microrganismos endofíticos. *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento* 29: 62-77.

Petrini O (1991). *Fungal endophytes of tree leaves*. In: Andrews JH, Hirano SS (eds) *Microbial ecology of leaves*. Springer-Verlag, New York, pp 179-197.

Phongpaichit S, Rungjindamai N, Rukachaisirikul V, Sakayaroj J (2006). Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 48(3): 367–372.

Pimentel IC, Glienke-Blanco C, Gabardo J, Stuart RM, Azevedo JL (2006). Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) merril) under different environmental conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49(5): 705-711.

Purdy LH (1979). *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology* 69: 875–880.

Radu S, Kqueen CY (2002). Preliminary screening of endophytic fungi from medicinal plants in malaysia for antimicrobial and antitumor activity. *Malaysian Journal of Medical Sciences* 9(2): 23-33.

Raps A, Vidal S (1998). Indirect effects of an unspecialized endophytic fungus on specialized plant – herbivorous insect interactions. *Oecologia* 114: 541-547.

Rocha ACS, Garcia D, Uetanabaro APT, Carneiro RTO, Araújo IS, Mattos CRR, Góes-Neto A (2011). Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonism on *Microcyclus ulei*. *Fungal Diversity* 47: 75–84.

Rocha R, Luz DE, Engels C, Pileggi SAV, Jaccoud Filho DS, Matiello RR, Pileggi M (2009). Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for *in vitro* biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). *Brazilian Journal of Microbiology* 40(1): 73-78.

Rodrigues AAC, Menezes M (2002). Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de Serra Talhada e de Caruaru, Estado do Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira* 27(5): 532–537.

Rodriguez RJ, White Junior JF, Arnold AE, Redman RS (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *The New phytologist* 182(2), 314–330.

Rubini MR, Silva-Ribeiro RT, Pomella AWW, Maki CS, Araújo WL, Santos DR, Azevedo JL (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*a, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences* 1: 24-33.

Santamaría J, Bayman P (2005). Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology* 50:1-8.

Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert A, Krohn K (2002). Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106: 996-1004.

Sette LD, Passarini MRZ, Delarmelina C, Salati F, Duarte MCT (2006). Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 22: 1185–1195.

Shiomi HF, Silva HSA, Melo IS, Nunes FV, Bettiol W (2006). Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Scientia Agrícola* 63(1): 32-39.

Silva GH, Oliveira CM, Teles HL, Bolzani VS, Araujo AR, Pfenning LH, Young MCM, Costa-Neto CM, Haddad R, Eberlin MN (2010). Citocalasinas produzidas por *Xylaria* sp., um fungo endofítico de *Piper aduncum* (piperaceae). *Química Nova* 33(10): 2038-2041.

Silva JRC, Souza RM, Zacarone AB, Silva LHCP, Castro MAS (2008). Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. *Ciência e agrotecnologia* 32(4): 1062-1072.

Sousa CS, Soares ACF, Garrido MS (2009). Produção de mudas de tomateiro em substrato orgânico inoculado e incubado com estreptomicetos. *Bragantia* 68(1): 195-203.

Souza AQL, Souza ADL, Astolfi Filho S, Belém Pinheiro ML, Sarquis MIM, Pereira JO (2004). Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica* 34(2): 185-195.

Strobel G, Daisy B (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4): 491-502.

Strobel GA, Miller RV, Martinezmiller C, Condrón MM, Teplow DB, Hess WM (1999). Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Microbiology* 145: 1919-1926.

Stuart RM, Romão AS, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL, Araújo WL (2010). Culturable endophytic filamentous fungi from leaves of transgenic imidazolinone-tolerant sugarcane and its non-transgenic isolines. *Archives of Microbiology* 192(4): 307–13.

Sun Z, Zhang M, Zhang J, Feng J (2011). Antifungal and cytotoxic activities of the secondary metabolites from endophytic fungus *Massrison* sp. *Phytomedicine* 18: 859– 862.

Suryanarayanan TS, Thirunavukkarasu N, Govindarajulu MB, Sasse F, Jansen R, Murali TS (2009). Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews* 23: 9–19.

Takahashi JA, Lucas EMF (2008). Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. *Química Nova* 31(7): 1807-1813.

Tejesvi MV, Nalini MS, Mahesh B, Prakash HS, Kini KR, Shetty HS, Subbiah V (2007). New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. *Boletín de la Sociedad Química de México* 1(1): 19-26.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2012). *Microbiologia*, 10. ed. Porto Alegre, Artmed.

Vega FE, Simpkins A, Aime MC, Posada F, Peterson SW, Rehner SA, Infante F, Castillo A, Arnold AE (2010). Fungal endophyte diversity in coffee

plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. *Fungal Ecology* 3: 122-138.

Wang Y, Lo H, Wang P (2008). Endophytic fungi from *Taxus mairei* in Taiwan: first report of *Colletotrichum gloeosporioides* as an endophyte of *Taxus mairei*. *Botanical Studies* 49: 39-43.

You YH, Yoon H, Kang SM, Shin JH, Choo YS, Lee IJ, Lee JM, Kim JG (2012). Fungal Diversity and Plant Growth Promotion of Endophytic Fungi from Six Halophytes in Suncheon Bay. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 22(11): 1549–1556.

CAPÍTULO III:

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE FUNGOS DO GÊNERO *Diaporthe*
ISOLADOS COMO ENDOFÍTICOS DE *Phaseolus vulgaris* L.**

Taides Tavares dos Santos; Tiago de Souza Leite; Casley Borges de Queiroz; Elza Fernandes de Araújo; Olinto Liparini Pereira; Marisa Vieira de Queiroz*

***Corresponding Author:** Department of Microbiology/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Avenue Peter Henry Rolfs, s/n Campus Universitário, Viçosa, Minas Gerais, Brazil. Zip Code: 36570-900. Phone number: +55 (31) 3899 2975 Fax: +55 (31) 3899 2573. E-mail: <mvqueiro@ufv.br>

Resumo

Fungos do gênero *Diaporthe* apresentam ampla distribuição geográfica e são descritos como fitopatogênicos, endofíticos e saprofíticos, além de já terem sido relatados como causadores de doenças em humanos e em outros mamíferos. Historicamente, o reconhecimento de espécies desse gênero baseou-se principalmente em afiliação ao hospedeiro. Mudanças na taxonomia de fungos desse gênero ocorreram e, atualmente, pressupõe-se que apenas por meio do uso de técnicas moleculares é possível a identificação acurada ao nível de espécie. O gênero *Diaporthe* foi relatado como um dos mais abundantes na comunidade fúngica endofítica do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Os objetivos do presente estudo foram comparar a efetividade da análise individual e concatenada de genes/locus gênicos na identificação de isolados endofíticos do gênero *Diaporthe* de *P. vulgaris* e na avaliação de suas relações filogenéticas e avaliar a variabilidade genética desses isolados por meio de marcadores moleculares. As sequências da região ITS do rDNA dos isolados do gênero *Diaporthe* do feijoeiro, juntamente com as sequências parciais dos genes que codificam o fator de alongação da tradução 1- α , β -tubulina e calmodulina, foram utilizados para o estudo das relações filogenéticas, enquanto que marcadores IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) e REMAP (*Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*) foram utilizados na análise de variabilidade genética. Apesar de diferirem significativamente entre si em relação ao crescimento micelial e à morfologia da colônia, todos os isolados deste estudo foram identificados como pertencentes ao gênero *Diaporthe* e, mais da metade deles, como pertencentes à mesma espécie, quando se considerou os resultados do sequenciamento da região ITS do rDNA isoladamente. Por meio de filogenia multilocus, foi possível inferir a identidade dos isolados como *Diaporthe* sp., *D. infecunda*, *D. melonis* e *D. phaseolorum*. A análise de agrupamento, realizada com os dados dos marcadores IRAP e REMAP em conjunto, mostrou-se muito coerente em relação ao que foi verificado na filogenia multilocus e, revelou a existência de grande variabilidade genética, sobretudo entre os isolados de *D. infecunda*. Concluiu-se que a abordagem filogenética multilocus foi mais efetiva que análise individual de sequências

de ITS no estudo das relações filogenéticas de fungos endofíticos do gênero *Diaporthe* do feijoeiro e que marcadores moleculares do tipo IRAP e REMAP podem ser empregados no estudo de variabilidade genética de fungos desse gênero.

Palavras-chave: Fungo endofítico; Filogenia multilocus; IRAP; REMAP; *Diaporthe*.

1. Introdução

O gênero *Diaporthe* (anamorfo: *Phomopsis*) apresenta uma ampla distribuição ao redor do mundo e uma grande variedade de hospedeiros. Espécies desse gênero podem ser fitopatogênicas, saprofíticas, ou ainda, assumirem um estilo de vida simbiote e ocorrerem como endofíticas (Uecker, 1988; Rossman *et al.*, 2007; Udayanga *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2013), isto é, viverem no interior de tecidos vegetais, em pelo menos uma parte de seu ciclo de vida, sem aparentemente causar qualquer dano a seus hospedeiros (Petrini, 1991; Cabral *et al.*, 1993).

Fungos do gênero *Diaporthe* já foram isolados como endofíticos de uma ampla variedade de hospedeiros, tanto de regiões de clima temperado quanto tropical (Pereira *et al.*, 1999; Gamboa-Gaitán *et al.*, 2005; Botella e Diez, 2011; González e Tello, 2011; Rocha *et al.*, 2011), o que inclui isolamentos a partir de culturas agrícolas de grande interesse econômico, como plantas de cacau (Rubini *et al.*, 2005), de café (Vega *et al.*, 2010), de soja (Leite *et al.*, 2013) e de feijão comum (Gonzaga e Queiroz, 2010).

O reconhecimento de espécies no gênero *Diaporthe* baseou-se historicamente em morfologia de estruturas vegetativas e reprodutivas, características culturais e, principalmente, no hospedeiro (Rehner e Uecker, 1994). Com a comprovação de que espécies de *Phomopsis* podem ter mais que um hospedeiro (Wehmeyer, 1933; van Niekirk *et al.*, 2005), mudanças na taxonomia de fungos desse gênero ocorreram e vários estudos baseados na região ITS do rDNA, na sequência parcial do fator de elongação da tradução 1- α , nos genes do *mating-type*, entre outros, foram desenvolvidos visando a identificação mais acurada das espécies desse gênero (Zhang *et al.*, 1997, 1999; van Niekirk *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2010, 2011). Atualmente, pressupõe-se que somente com o uso técnicas moleculares

pode-se alcançar a identificação dos isolados ao nível de espécie (Santos e Phillips, 2009; Santos *et al.*, 2010; Udayanga *et al.*, 2012).

O método de Reconhecimento de Espécies Filogenéticas baseado em Concordância Genealógica (GCPSR) tem fornecido uma resolução mais acurada para espécies em comparação com a identificação de espécies baseada em morfologia ou em critérios de compatibilidade reprodutiva (Taylor *et al.*, 2000; Dettman *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2011; Udayanga *et al.*, 2012). Dessa forma, por meio de uma análise de sequências multilocus, na qual sequências de dois ou mais genes são analisados ao mesmo tempo, a concordância na genealogia prover a resolução da identidade ao nível de espécie, o que é muito útil, sobretudo quando a identificação baseada em taxonomia clássica é praticamente inviabilizada em virtude da carência de caracteres morfológicos suficientemente distinguíveis (Rokas *et al.*, 2003; Lumbsch *et al.*, 2005; van der Merwe *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2011; Udayanga *et al.*, 2012).

Vários marcadores moleculares têm sido descritos na literatura como alternativas para se avaliar a variabilidade genética intra e/ou interespecífica de fungos, cada um deles com suas vantagens e desvantagens. Entre esses marcadores, cita-se RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Hulbert *et al.*, 1988; Flood *et al.*, 1992), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Arnau *et al.*, 1994; Talamini *et al.*, 2006), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Majer *et al.*, 1996; Ansari *et al.*, 2004) e marcadores baseados em sequências repetidas intergênicas curtas dispersas no genoma (*Repetitive Extragenic Palindromic* – REP; *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* - ERIC e elementos BOX) (Edel *et al.*, 1995; Arora *et al.*, 1996; Ash *et al.*, 2010).

Recentemente, novos marcadores moleculares têm sido utilizados nos estudos de variabilidade genética em fungos, com destaque para os marcadores moleculares baseados em elementos transponíveis: o IRAP (*Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism*) (Kalendar *et al.*, 1999), que detecta polimorfismo pela amplificação de regiões entre dois retrotransposons vizinhos, e o REMAP (*Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*) (Kalendar *et al.*, 1999), que detecta polimorfismos por amplificação de regiões entre retrotransposons e microsatélites. Os

polimorfismos gerados pela presença ou ausência do retrotransposon em determinado *locus* podem ser usados como marcas para *fingerprinting* (Grzebelus, 2006). Os marcadores IRAP e REMAP, além de terem sido usados para avaliação de variabilidade genética de fungos (Branco *et al.*, 2007; Zein *et al.*, 2010; Santana *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2012; Santana *et al.*, 2013), podem ser empregados no mapeamento genético (Manninen *et al.*, 2000) e na identificação de isolados (Zein *et al.*, 2010).

Em 2012, Santos e colaboradores desenvolveram e aplicaram os marcadores IRAP e REMAP para avaliar a diversidade genética intra e interespecífica de espécies do gênero *Colletotrichum* (Santos *et al.*, 2012). No ano seguinte, Santana *et al.* (2013) utilizaram os mesmos marcadores em 27 espécies de fungos, de 11 ordens diferentes, e evidenciaram que os marcadores IRAP e REMAP utilizados em seu trabalho também poderiam ser aplicados para analisar a variabilidade genética de outros gêneros de fungos, mesmo que estes não possuam o genoma sequenciado, como é o caso do gênero *Diaporthe*.

Entre os fungos endofíticos isolados do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), o gênero *Diaporthe* foi um dos mais abundantes, correspondendo a 11,5 % do total de isolados (Gonzaga e Queiroz, 2010). Esse gênero de fungos merece ser estudado por várias razões: 1) o gênero não possui um bom marcador morfológico que possibilite a caracterização ao nível de espécie por meio da taxonomia clássica; 2) as espécies desse gênero têm sido comumente encontradas como fitopatogênicas ou endofíticas de uma ampla variedade de espécies vegetais (van Niekerk *et al.*, 2005; Udayanga *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2013) e 3) fungos do gênero *Phomopsis* têm sido relatados como produtores de diferentes compostos de interesse biotecnológico (Horn *et al.*, 1995; Wagenaar e Clardy, 2001; Dai *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005; Pornpakakul *et al.*, 2007; Rukachaisirikul *et al.*, 2008). Diante disso, é instigante o desenvolvimento de trabalhos visando analisar e melhor caracterizar a variabilidade genética desse gênero de fungos.

Assim, o presente trabalho objetivou comparar a efetividade da análise individual e concatenada de genes/locus gênicos na identificação e no estudo das relações filogenéticas de isolados endofíticos do gênero

Diaporthe de *P. vulgaris* e avaliar a variabilidade genética desses isolados por meio de marcadores moleculares baseados em elementos transponíveis (IRAP e REMAP).

2. Material e métodos

2.1. Micro-organismos

Neste estudo foram utilizados nove isolados do gênero *Diaporthe*, que foram isolados por Gonzaga e Queiroz (2010), a partir de folhas sadias das cultivares Ouro Negro e Talismã de feijoeiro comum (*P. vulgaris* L.). O isolado do gênero *Diaporthe* representante da cultivar Ouro Negro é o CMON 20, enquanto os isolados da cultivar Talismã são: CMT 20, CMT 38, CMT 41, CMT 43, CMT 50, CMT 60, CMT 70 e CMT 71.

2.2. Morfologia da colônia e avaliação do crescimento micelial de fungos do gênero *Diaporthe*

A morfologia das colônias dos nove isolados de *Diaporthe* foi avaliada após sete dias de crescimento em três meios de cultura distintos: 1) BDA (Himedia[®]); 2) Sabourad Dextrose Agar (Himedia[®]) e 3) YMC [composição: extrato de levedura, 10,0 g (Himedia[®]); extrato de malte, 2,0 g (Himedia[®]); ágar, 15,0 g (Himedia[®]) e água destilada em quantidade suficiente para completar para 1 L]. Desta maneira, os fungos foram repicados, em triplicata, nos três meios de cultivo, para avaliação do crescimento micelial. Os resultados foram registrados pela medição do diâmetro da colônia (em milímetros), em quatro direções diferentes, com auxílio de um paquímetro, considerando-se os valores médios de três replicatas. A Análise de Variância (ANOVA) e a comparação das médias pelo teste Tukey a 5 % de significância foi realizada utilizando o programa R (versão 3.0.0).

2.3. Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Os nove isolados do gênero *Diaporthe* foram repicados em meio de cultura BDA e após 5 a 7 dias de crescimento, uma porção de micélio foi coletado para extração de DNA por meio do Kit “Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation” da MoBio Laboratories seguindo o protocolo indicado pelo fabricante.

Os oligonucleotídios iniciadores utilizados na amplificação dos diferentes genes ou *locus* dos fungos endofíticos do gênero *Diaporthe*, bem como as condições de amplificação da PCR estão descritas na **Tabela 1**.

O produto de cada uma das reações da PCR variando em torno de 300 a 650 pb foi purificado utilizando o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison USA) e sequenciados pelo método de terminação da cadeia por dideoxinucleotídeos (Sanger *et al.*, 1977), utilizando o kit “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing”. O sequenciamento foi realizado pela empresa Macrogen, localizada na Coreia do Sul (<http://dna.macrogen.com>).

Os produtos do sequenciamento de ambas as fitas de DNA foram agrupados em contíguos, alinhados e corrigidos automaticamente, utilizando o programa DNA Baser Sequence Assembler v3.x 2012 (Heracle BioSoft SRL Romania, <http://www.DnaBaser.com>). Uma busca comparativa da identidade das sequências nucleotídicas obtidas dos isolados endofíticos deste estudo em contraposição ao banco de dados do GenBank foi realizada usando um algoritmo de alinhamento local para sequências nucleotídicas (Blastn) (Altschul *et al.*, 1990).

Tabela 1. Genes ou *locus* utilizados na análise multilocus de fungos do gênero *Diaporthe* com os respectivos oligonucleotídeos iniciadores e as condições de amplificação da PCR.

Gene/loci	Identificação	Sequência 5' – 3'	Referência	Condições de amplificação
ITS	ITS1F ITS4	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA TCCTCCGCTTATTGATATGC	Gardes e Bruns, 1993 White et al., 1990	95 °C: 2 min.; (95° C 1 min., 51 °C, 1 min., 72° C, 1 min) x 36 ciclos; 72 °C, 7 min., mantido no final a 4 °C
EF 1- α	EF1-728F EF1-986R	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG TACTTGAAGGAACCCTTACC	Carbone e Kohn, 1999 Carbone e Kohn, 1999	95 °C: 2 min.; (95° C 1 min., 55 °C, 1 min., 72° C, 1 min) x 36 ciclos; 72 °C, 7 min., mantido no final a 4 °C
TUB	Bt2a Bt2b	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Glass e Donaldson, 1995 Glass e Donaldson, 1995	95 °C: 2 min.; (95° C 1 min., 65 °C, 1 min., 72° C, 1 min) x 36 ciclos; 72 °C, 7 min., mantido no final a 4 °C
CAL	CAL228F CAL737R	GAGTCCAAGGAGGCCTTCTCCC CATCTTTCTGGCCATCATGG	Carbone e Kohn, 1999 Carbone e Kohn, 1999	95 °C: 2 min.; (95° C 1 min., 55 °C, 1 min., 72° C, 1 min) x 36 ciclos; 72 °C, 7 min., mantido no final a 4 °C

As siglas: ITS, região espaçadora interna transcrita do rDNA; EF 1- α , sequência parcial do gene que codifica o fator de alongação da tradução 1- α ; TUB, sequência parcial do gene que codifica a β -tubulina e CAL, sequência parcial do gene que codifica a calmodulina.

2.4. Análise filogenética

Um teste de homogeneidade dos dados particionados (PHT) foi aplicado como implementado em Paup 4b10 (Swofford *et al.*, 2001) para avaliar a possibilidade de concatenar o conjunto dos dados: ITS, EF 1- α , TUB e CAL. No total, cinco matrizes de dados foram analisadas sendo comparadas somente a matriz dos dados de ITS e a matriz de dados dos 4 genes ou *locus* concatenados.

A análise filogenética individual da região ITS do rDNA e a análise concatenada das regiões ITS, EF 1- α , TUB e CAL, ou seja, a análise multilocus foram realizadas por meio da Inferência Bayesiana utilizando o programa MrBayes 3.2.1 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001), sendo que previamente o melhor modelo evolutivo foi escolhido para cada partição (gene ou *locus*) usando o programa MrModeltest v2.3 (Nylander, 2004). Duas corridas independentes com quatro cadeias Markovianas Monte Carlo (MCMC) foram rodadas por 10.000.000 de gerações e as árvores foram amostradas e retidas a cada 1000^a geração. As primeiras amostras de árvores neste caso 1.000.000 das mesmas foram descartadas na fase de burnin e as árvores permanentes foram sumarizadas para gerar uma árvore consenso da maioria.

Os ramos das árvores cujos valores de bootstrap e, ou, de probabilidade à *posteriori* estivessem abaixo de 80 % foram omitidos. O motivo para tal é que valores abaixo de 80 % indicam uma baixa confiabilidade dos dados com pouco suporte estatístico (Harada *et al.*, 1995).

Os isolados *Phomopsis vaccinii* (CBS 160.32) e *Diaporthe vaccinii* (CBS 122114) foram utilizados como grupo externo. Outras sequências de DNA de culturas ex-type do GenBank foram utilizadas nas análises filogenéticas (**Tabela 2**).

As sequências de DNA da região ITS, EF 1- α , TUB e CAL dos isolados deste estudo serão depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e o alinhamento e as árvores filogenéticas serão depositados no TreeBase (www.treebase.org).

O alinhamento de sequências concatenadas e manualmente ajustadas dos genes ou locus (ITS, EF 1- α , TUB e CAL), na realização da Inferência Bayesiana, continha 22 sequências de DNA de isolados fúngicos, sendo nove isolados deste estudo e 13 isolados do GenBank (**Tabela 2**). O número de caracteres utilizados na análise filogenética foram 1601 para a análise concatenada e 473 para a região ITS do rDNA.

Tabela 2. Fungos do gênero *Phomopsis*/*Diaporthe* utilizados neste trabalho.

Código do isolado	Identidade	Hospedeiro	País de origem	Coletor	Número de acesso no GenBank			
					ITS	EF 1- α	TUB	CAL
CMON 20	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brazil	L Gonzaga	-	-	-	-
CMT 20	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brazil	L Gonzaga	-	-	-	-
CMT 38	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brazil	L Gonzaga	-	-	-	-
CMT 41	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brazil	L Gonzaga	-	-	-	-
CMT 43	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brazil	L Gonzaga	-	-	-	-
CMT 50	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brazil	L Gonzaga	-	-	-	-
CMT 60	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brazil	L Gonzaga	-	-	-	-
CMT 70	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brazil	L Gonzaga	-	-	-	-
CMT 71	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brazil	L Gonzaga	-	-	-	-
CBS 592.81	<i>Diaporthe helianthi</i>	<i>Helianthus annuus</i>	Serbia	M Muntanola Cvetkovic	AY705842	GQ250308	JX275465	JX197454
CBS 344.94	<i>Diaporthe helianthi</i>	<i>Helianthus annuus</i> , seed	n.d.	n.d.	KC343114	KC343840	KC344082	KC343356
CBS 435.87	<i>Diaporthe melonis</i>	<i>Glycine soja</i>	Indonesia	H Vermeulen	KC343141	KC343867	KC344109	KC343383
CBS 507.78	<i>Diaporthe melonis</i>	<i>Cucumis melo</i>	USA	L Berha	FJ889447	GQ250314	JX275423	JX197417
CBS 116020	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	<i>Aster exilis</i>	USA: Mississippi	A Mengistu	KC343176	KC343902	KC344144	KC343418

Tabela 2. (continuação).

Código do isolado	Identidade	Hospedeiro	País de origem	Coletor	Número de acesso no GenBank			
					ITS	EF 1- α	TUB	CAL
CBS 116019	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	<i>Caperonia palustris</i>	USA: Mississippi	A Mengistu	KC343175	KC343901	KC344143	KC343417
MFLUCC 10- 0608	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	<i>Hylocerus undatus</i>	Thailand	D Udayanga	JQ619875	JX275389	JX275424	JX197418
LGMF908	<i>Diaporthe infecunda</i>	<i>Schinus terebinthifolius</i> , endophytic in leaf	Brazil	J Lima	KC343127	KC343853	KC344095	KC343369
LGMF912	<i>Diaporthe infecunda</i>	<i>Schinus terebinthifolius</i> , endophytic in leaf	Brazil	J Lima	KC343128	KC343854	KC344096	KC343370
MFLUCC 10- 0582	<i>Diaporthe</i> sp.	<i>Aeschynanthus radicans</i>	Thailand	SC Karunarathna	JQ619885	JX275399	JX275433	JX197426
MFLUCC 10- 0570	<i>Diaporthe</i> sp.	Dead wood-unknown	Thailand	D Udayanga	JQ619877	JX275391	JX275428	JX197421
CBS 122114	<i>Diaporthe vaccinii</i>	<i>Vaccinium corymbosum</i>	USA: Michigan	D C Ramsdell	KC343225	KC343951	KC344193	KC343467
CBS 160.32	<i>Phomopsis vaccinii</i>	<i>Oxycoccus macrocarpus</i>	USA	HF Bain	AF317578	GQ250326	JX275436	n.d.

As siglas referentes aos códigos dos isolados: CBS - CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; LGMF - Culture Collection of Laboratory of Genetics of Microorganisms, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil; MFLUCC - Mae Fah Luang University Culture Collection; CMON, Cultura pura da cultivar Ouro Negro; CMT, Cultura pura da cultivar Talismã. As siglas referentes aos genes amplificados: ITS, região espaçadora interna transcrita do rDNA; EF 1- α , sequência parcial do gene, que codifica o fator de elongação da tradução 1- α ; TUB, sequência parcial do gene, que codifica a β -tubulina e CAL, sequência parcial do gene, que codifica a calmodulina.

2.5. *Fingerprinting* baseado nos marcadores IRAP e REMAP

As combinações de oligonucleotídeos iniciadores utilizadas nas análises IRAP e REMAP estão descritas na **Tabela 3**.

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores e combinações utilizadas na reação de PCR para as análises de IRAP e REMAP de isolados endofíticos do gênero *Diaporthe*.

Técnica	Identificação	Sequência 5' – 3'	Referência
IRAP (I)	CLIRAP1	CGTACGGAACACGCTACAGA	Santos <i>et al.</i> , 2012
	CLIRAP4	CTTTTGACGAGGCCATGC	Santos <i>et al.</i> , 2012
IRAP (II)	CLIRAP2	AATAACGTCTCGGCCTTCAG	Santana <i>et al.</i> , 2013
	CLIRAP4	CTTTTGACGAGGCCATGC	Santos <i>et al.</i> , 2012
REMAP	CLIRAP4	CTTTTGACGAGGCCATGC	Santos <i>et al.</i> , 2012
	MS1	GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCT	Santana <i>et al.</i> , 2012

As reações e as condições de amplificação foram realizados em nove isolados como descrito por Santos *et al.* (2012). Os amplicons foram separados em eletroforese gel de agarose 1,5 % (m/v) contendo brometo de etídeo (0,2 µg/mL) em tampão TBE 1X. O marcador de massa molecular utilizado foi o 1 Kb DNA Ladder (Promega, Madison USA).

As bandas de cada combinação de oligonucleotídeos iniciadores utilizadas na amplificação foram classificadas com número um (presença) ou zero (ausência) entre os diferentes isolados. A reprodutibilidade dos perfis de bandas foi testada por três repetições da PCR com todos os isolados e primers utilizados. Somente bandas reprodutíveis foram usadas nas análises. O número de locus amplificados e o percentual de polimorfismos foram calculados no programa POPGENE versão 1.32 (Yeh *et al.*, 1999). Um dedrograma (com bootstrap de 1000 replicatas) foi construído pelo método de agrupamento não ponderado (UPGMA) usando o *pvclust* implementado no pacote R versão 3.0.0 (R development Core Team 2007).

3. Resultados

A partir dos resultados do sequenciamento da região ITS do rDNA, os nove isolados deste estudo foram identificados como pertencentes ao mesmo gênero (*Diaporthe*) e, mais da metade deles, CMON 20, CMT 20, CMT 43, CMT 50 e CMT 60, como pertencentes à mesma espécie (*Diaporthe helianthi*).

Apesar das semelhanças verificadas nas sequências de nucleotídeos que compõem a região ITS desses isolados, quando se partiu para uma caracterização morfológica, observou-se que esses isolados diferem entre si em relação ao crescimento micelial, de acordo com o teste de Tukey a 5 % de significância (**Tabela 4**), uma vez que uns crescem mais rapidamente do que outros, mesmo estando sob as mesmas condições de temperatura, atmosfera e disponibilidade de nutrientes. Além disso, eles diferem também em relação à morfologia da colônia, como pode ser verificado na **Figura 1**.

Tabela 4. Crescimento micelial de isolados endofíticos do gênero *Diaporthe*, após um período de sete dias em meio BDA.

Isolado	Diâmetro médio (mm)
CMT 70	79,2 a
CMT 43	72,9 b
CMT 41	71,8 b
CMT 20	67,6 c
CMT 50	65,8 cd
CMON 20	62,4 de
CMT 71	60,2 e
CMT 60	41,5 f
CMT 38	39,2 f

Valores médios seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey a 5 % de significância.

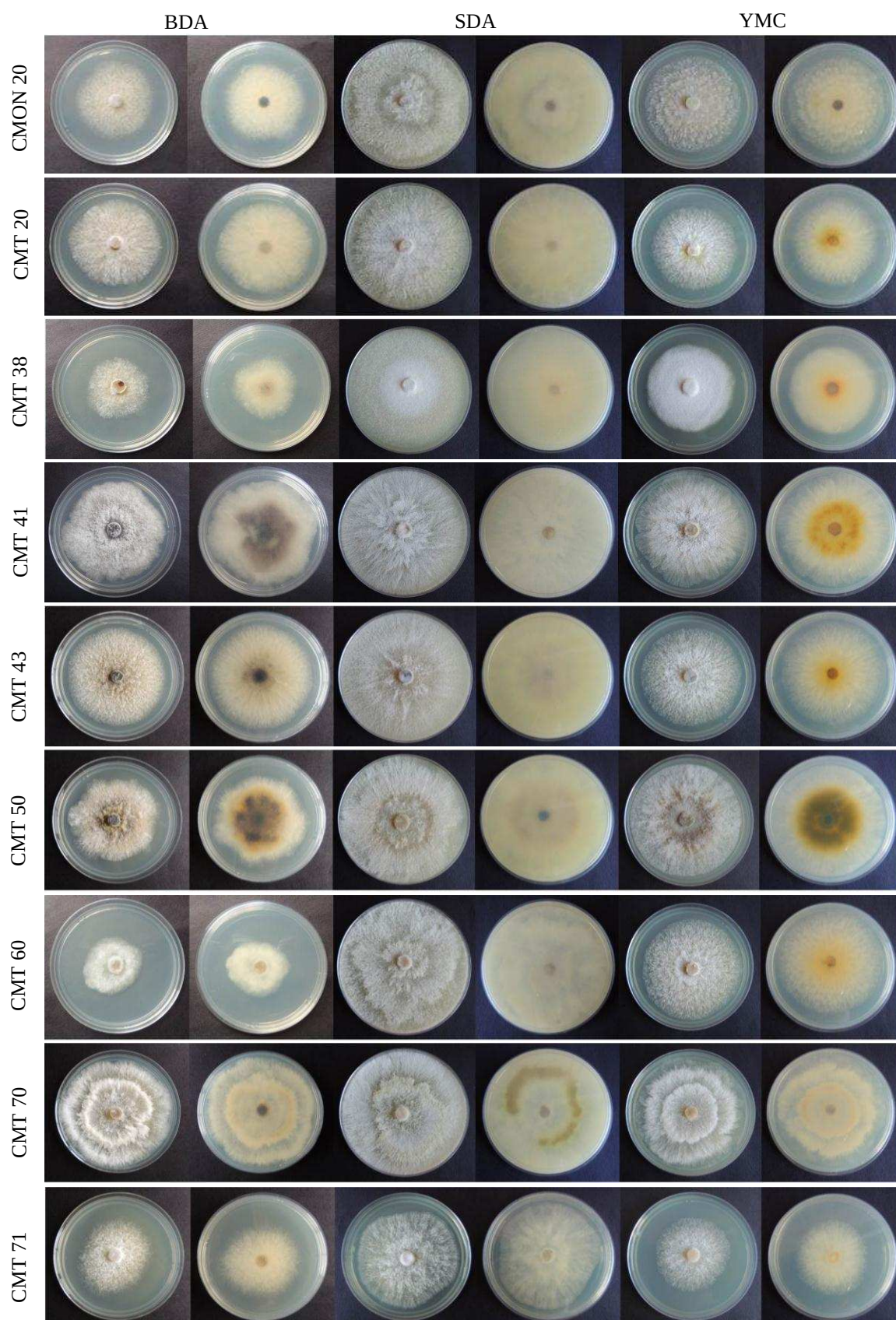


Figura 1. Morfologia de colônias de isolados endofíticos do gênero *Diaporthe* (CMON 20, CMT 20, CMT 38, CMT 41, CMT 43, CMT 50, CMT 60, CMT 70 e CMT 71), em três meios de cultura (BDA, Sabourad Dextrose Agar – SDA e YMC), após sete dias de crescimento a 25 °C e em condições de fotoperíodo de 12 horas.

Por meio do sequenciamento parcial do gene que codifica o fator de alongação da tradução 1- α (abreviado como EF 1- α), do que codifica a β -tubulina (TUB) e do que codifica a calmodulina (CAL) de cada um dos nove isolados, foi possível estudar o relacionamento filogenético dos mesmos com base em Análise Filogenética Multilocus. O relacionamento filogenético baseado somente na região ITS do rDNA dos isolados desse estudo com outros isolados linhagens-tipo do GenBank está representado na **Figura 2**. Já na **Figura 3**, é representado o relacionamento filogenético dos isolados deste estudo pela árvore consenso da maioria, gerada pela Inferência Bayesiana para a região ITS do rDNA e para os genes ou locus: ITS, EF 1- α , TUB e CAL.

Como se pode verificar, a utilização da região ITS do rDNA individualmente para a delimitação de espécies gênero *Diaporthe* (**Figura 2**), não foi suficiente, quando comparado com a Análise Filogenética Multilocus (**Figura 3**), que demonstrou uma identificação mais robusta ao nível de espécie ou gênero dos isolados de estudo com os isolados de linhagens-tipo do GenBank.

Na árvore representativa da região ITS do rDNA os nós ancestrais, no geral, são pouco sustentados pelos valores de probabilidade à *posteriori*. Um exemplo é o clado comum a ambas as árvores filogenéticas, que continham os isolados: CMON 20, CMT 50, CMT 60, CMT 20, CMT 43, LGMF 908 e LGMF 912. Neste caso, na árvore multilocus os valores de probabilidade à *posteriori* foram bem mais robustos, quando comparada à árvore de ITS, o que confirma, realmente, que estes isolados são pertencentes à espécie *D. infecunda*.

Na árvore multilocus, os isolados CMT 70 e CMT 38 foram agrupados robustamente com isolados da espécie *D. phaseolorum*, enquanto somente CMT 70 agrupou-se com isolados de *D. phaseolorum* na árvore da região ITS do rDNA. Além disso, os isolados CMT 41 e CMT 71, que se apresentavam dispersos na árvore de ITS foram agrupados na árvore multilocus com isolados da espécie *D. melonis* e com *Diaporthe* sp., respectivamente.

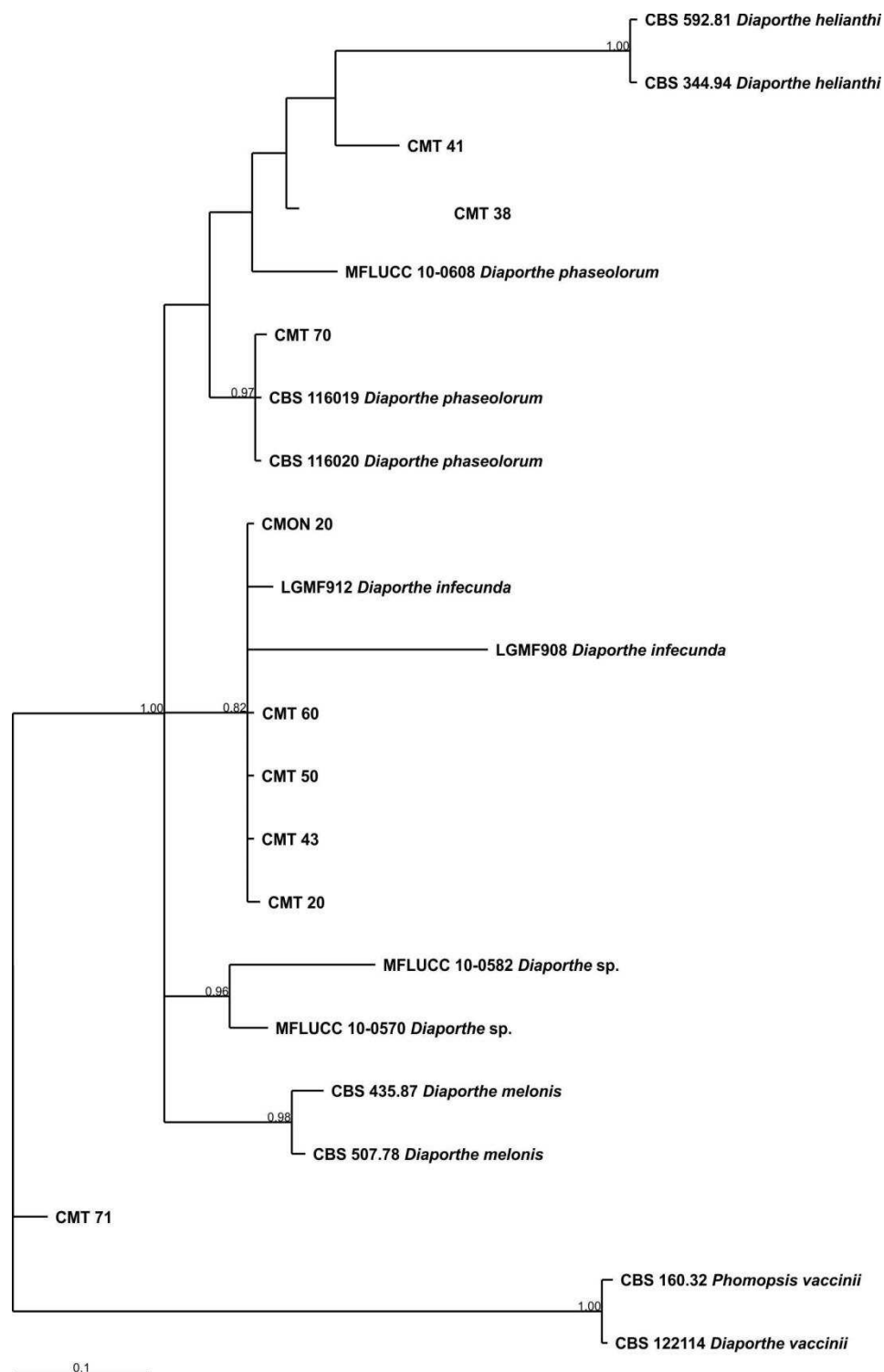


Figura 2. Árvore filogenética obtida pela Inferência Bayesiana (IB) usando a sequência nucleotídica da região ITS do rDNA sendo 9 isolados deste estudo e 13 isolados do GenBank. Ao lado de cada nó ancestral é evidenciado da esquerda para a direita o valor de probabilidade à *posteriori*. Valores de probabilidade à *posteriori* abaixo de 80 % foram omitidos.

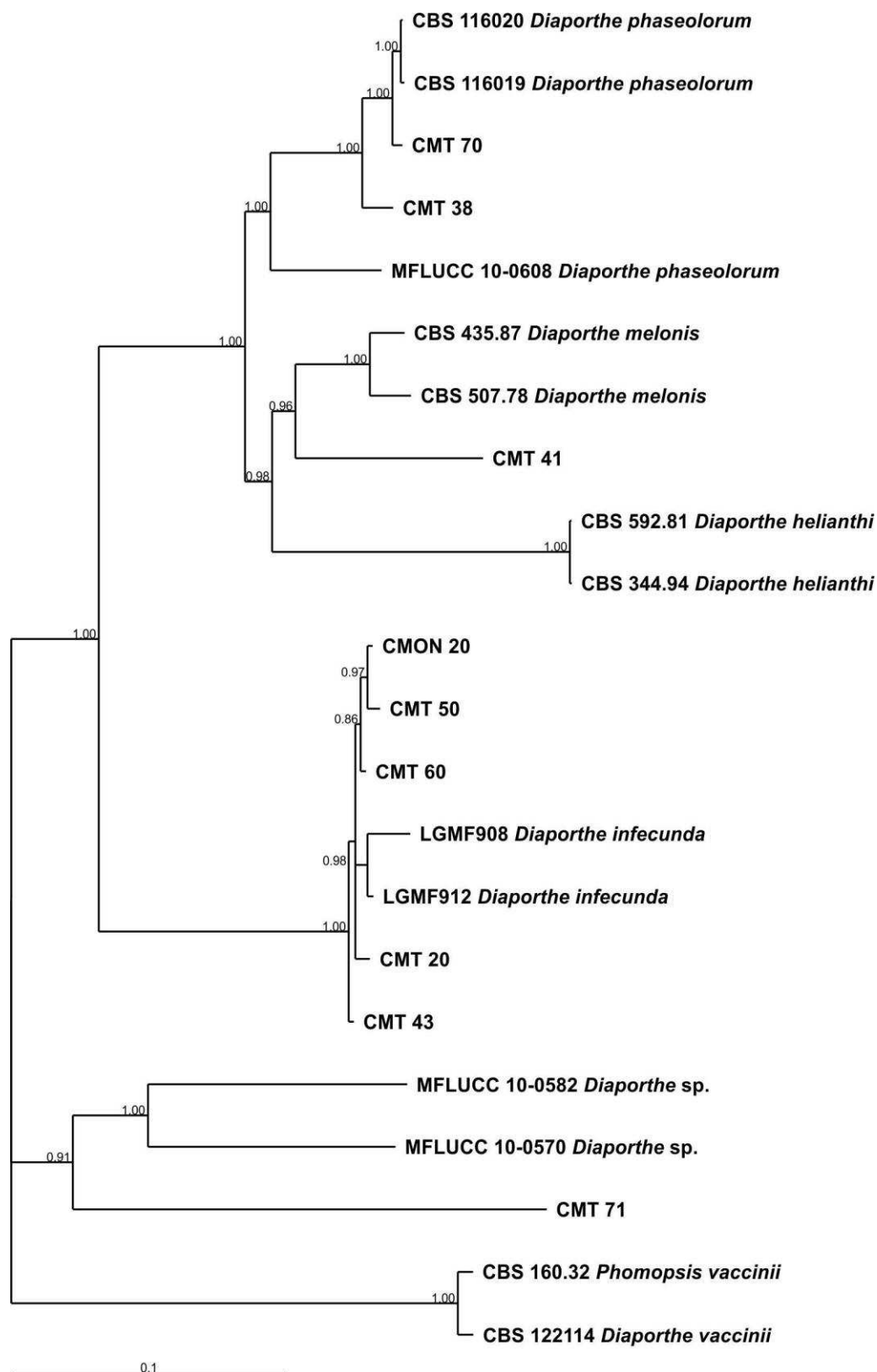


Figura 3. Árvore filogenética multilocus obtida pela Inferência Bayesiana (IB) usando a sequência nucleotídica concatenada da região ITS do rDNA, EF 1- α , TUB e CAL sendo 9 isolados deste estudo e 13 isolados do GenBank. Ao lado de cada nó ancestral é evidenciado da esquerda para a direita o valor de probabilidade à *posteriori*.

Em relação à análise de variabilidade genética realizada com os marcadores IRAP e REMAP, os nove isolados apresentaram amplicons com alto grau de reprodutibilidade para todas as combinações de oligonucleotídeos. Um total de 74 loci foi amplificado, sendo 100 % polimórficos. A combinação dos oligonucleotídeos iniciadores CLIRAP1 e CLIRAP4 amplificou 30 loci, enquanto que a combinação CLIRAP2 e CLIRAP4 amplificou 26. A combinação CLIRAP4 e MS1 gerou 18 loci (**Figura 4**).

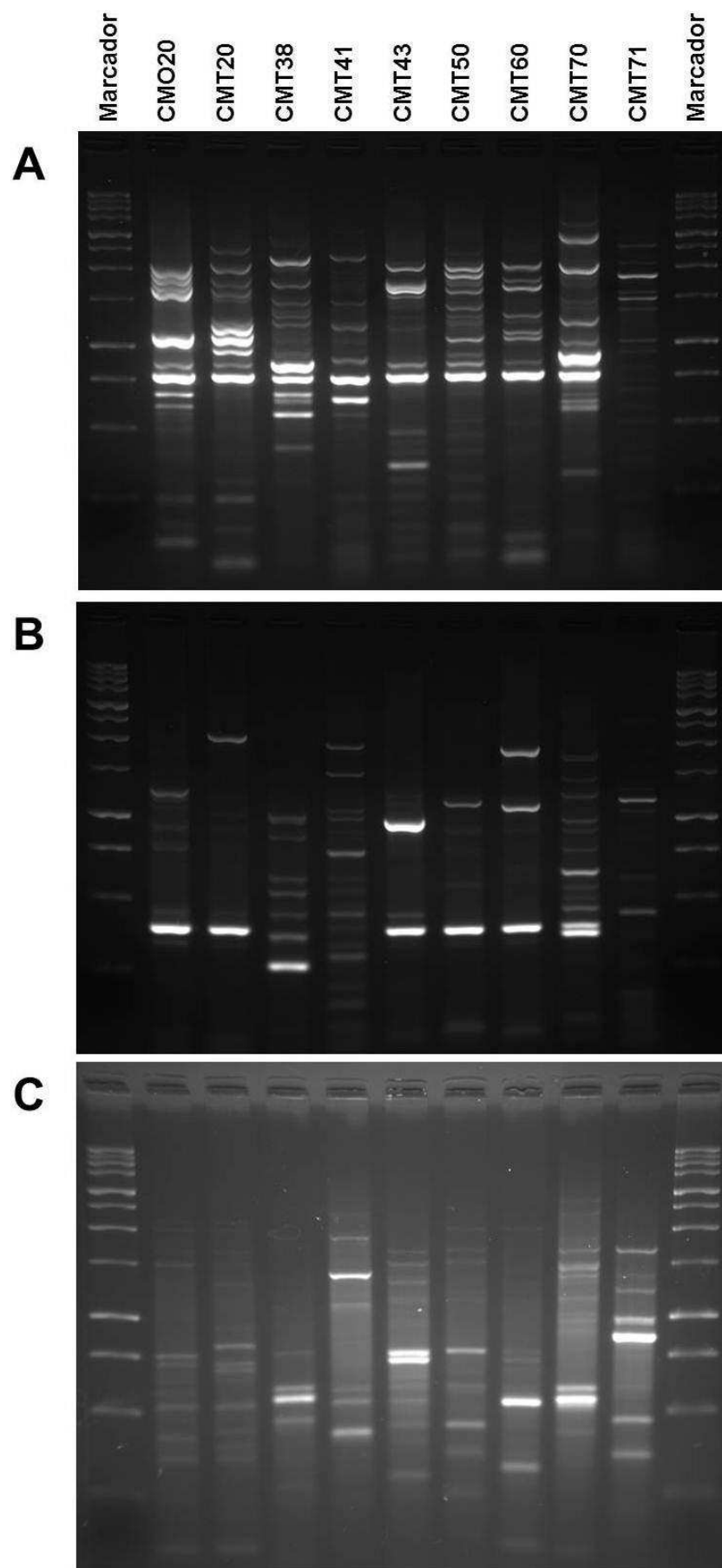


Figura 4. Perfil eletroforético de amplificação do DNA de nove isolados de *Diaporthe* sp. gerado por meio das técnicas IRAP (A e B) e REMAP (C).

Na análise de agrupamento, observa-se a formação de três grupos principais (**Figura 5**), sendo o primeiro grupo composto pelos isolados CMT 41 e CMT 71; o segundo pelos isolados CMON 20, CMT 20, CMT 43, CMT 50 e CMT 60; e, o terceiro pelos isolados CMT 38 e CMT 70.

Interessantemente, todos os isolados que foram confirmados pela análise filogenética multilocus como pertencentes à espécie *D. infecunda*, ficaram agrupados em um mesmo grupo, o segundo grupo. O isolado CMON 20, que é originado de uma cultivar de feijoeiro comum distinta (Ouro Negro), agrupou-se conjuntamente com isolados da cultivar Talismã. Apesar de esses cinco isolados pertencerem à mesma espécie e não terem se agrupado com isolados de outras espécies nesta análise, ainda é possível visualizar a formação de dois subgrupos, sendo um constituído pelos isolados CMT 20 e CMT 43 e o outro pelos isolados CMT 50 com CMT 60.

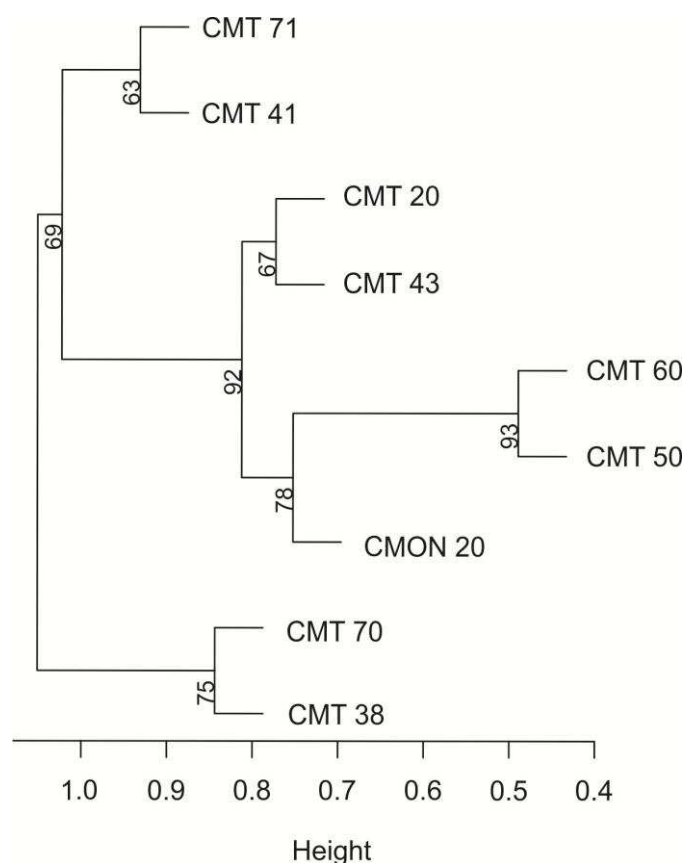


Figura 5. Dendrograma de distância genética de nove isolados do gênero *Diaporthe*. A distância genética foi baseada nos *locus* obtidos por meio de IRAP e REMAP. Os valores de bootstrap foram obtidos com 1000 replicatas; somente valores acima de 63 foram mostrados. O dendrograma foi construído pelo método UPGMA.

4. Discussão

O gênero *Diaporthe*, que historicamente teve sua taxonomia baseada, sobretudo, em afiliação ao hospedeiro (Uecker, 1988), é um gênero muito interessante de ser estudado do ponto de vista de variabilidade genética. Fungos integrantes desse gênero apresentam uma ampla distribuição geográfica e compreendem desde espécies fitopatogênicas, a espécies saprófitas, endofíticas e até mesmo espécies patogênicas a humanos e outros mamíferos (Uecker, 1988; Sutton *et al.*, 1999; Rossman *et al.*, 2007; Garcia-Reyne *et al.*, 2011; Udayanga *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2013).

Neste estudo, nós investigamos a variabilidade genética de fungos do gênero *Diaporthe* isolados como endofíticos do feijoeiro comum. A força motriz dessa pesquisa veio primeiramente da constatação de que esse gênero foi um dos mais abundantes na comunidade fúngica endofítica do feijoeiro (Gonzaga e Queiroz, 2010). Somou a isso, o interesse de melhor compreender os relacionamentos filogenéticos dos isolados obtidos como endofíticos de *P. vulgaris* L. tendo em vista a variedade de interações que os fungos desse gênero podem estabelecer com seus hospedeiros, além dos relatos na literatura científica de que espécies endofíticas do gênero são produtoras de compostos de interesse biotecnológico (Horn *et al.*, 1995; Silva *et al.*, 2005; Rukachaisirikul *et al.*, 2008).

Após o advento das ferramentas moleculares, o sequenciamento de genes e/ou regiões intergênicas tem sido usado para identificar espécies ou adicionar peso as avaliações ou reavaliações taxonômicas de fungos (Ash *et al.*, 2010). Diferentes genes e regiões intergênicas foram descritas como sendo sequências *barcode* para a identificação de fungos. Entre elas, a que mais se destaca e que tem sido bastante utilizada é a região ITS do rDNA (Gardes e Bruns, 1993; Schoch *et al.*, 2012). A partir do sequenciamento dessa região genômica, os isolados cujas sequências nucleotídicas, comparadas uma a uma (Blastn), apresentam uma identidade na região ITS acima de 95,0 %, são considerados pertencentes àquele gênero e/ou espécie (Arnold e Lutzoni, 2007). Os isolados deste estudo foram inicialmente identificados especialmente com base no sequenciamento

dessa região, uma vez que não foi possível à observação dos conídios desses isolados endofíticos, considerados *Mycelia sterilia* (Naik, 2009).

Assim, apesar dos isolados desse estudo diferirem significativamente em relação ao crescimento micelial e pela morfologia da colônia, com o sequenciamento da região ITS do rDNA, todos eles foram identificados como pertencentes ao gênero *Diaporthe* e cinco deles como sendo de uma mesma espécie, no caso *Diaporthe helianthi*, espécie esta que é relatada como agente etiológico do cancro-da-haste em girassol (*Helianthus annuus*) (Muntañola-Cvetković *et al.*, 1981).

Para melhor investigar o relacionamento filogenético dos isolados do gênero *Diaporthe* detectados como endofíticos de *P. vulgaris* e procurando obter uma identificação mais acurada dos isolados ao nível de espécie, foi realizado o sequenciamento de outras regiões do genoma (EF 1- α , TUB e CAL), indicadas em estudos prévios como bons marcadores para o estudo de relações filogenéticas de fungos desse gênero (Udayanga *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2013).

Comparando a análise filogenética que se baseou em sequências de ITS do rDNA isoladamente com a que utilizou ITS concatenado às sequências parciais dos genes EF 1- α , TUB e CAL, foi perceptível que aquela que utilizou sequências concatenadas, isto é, a análise de sequências multilocus, mostrou-se muito mais satisfatória na delimitação de espécies do gênero *Diaporthe*, assim como ocorreu nos estudos de Udayanga *et al.* (2012) e de Gomes *et al.* (2013).

Por meio da análise filogenética multilocus, confirmou-se que a maioria dos isolados do feijoeiro comum são representantes da espécie *D. infecunda*. Essa espécie foi ineditamente descrita por Gomes *et al.* (2013), em um estudo que procurava resolver a taxonomia e filogenia de uma coleção de *Diaporthe*, cujos isolados foram obtidos a partir de diversos hospedeiros, exercendo interações patogênicas, saprofíticas ou endofíticas. *Diaporthe infecunda* foi isolado especificamente como endofítico das folhas da aroeirinha (*Schinus terebinthifolius*) e teve concordância genealógico com cinco de nossos isolados (CMON 20, CMT 20, CMT 43, CMT 50 e CMT 60), que também são endofíticos isolados de folhas.

Dois de nossos isolados tiveram identidade confirmada como *D. phaseolorum*. Essa espécie é há tempos conhecida como o agente causal de doenças em soja, denominadas queima da haste e da vagem e cancro-da-haste, e também podem provocar podridão de sementes (Hobbs e Phillips, 1985; Pioli *et al.*, 2003). A espécie *D. phaseolorum* foi relatada como endofítica pela primeira vez no estudo de Cheng *et al.* (2008), a partir de isolamentos realizados da planta de mangue *Kandelia candel*.

O isolado CMT 41, que não apresentou qualquer relacionamento filogenético na árvore construída unicamente com as sequências de ITS, foi identificado como *D. melonis* por meio da análise multilocus. *Diaporthe melonis* foi descrito nos estudos de Behara e O'Brien (1979). Até onde sabemos, este é o primeiro relato dessa espécie como endofítica.

Marcadores moleculares já foram empregados em estudos prévios para a análise de variabilidade genética de isolados do gênero *Diaporthe* (Zhang *et al.*, 1998; Nozaki *et al.*, 2006; Ash *et al.*, 2010). Entretanto, nenhum deles envolveu o emprego de marcadores moleculares baseados em elementos transponíveis. Zhang *et al.* (1998) empregaram PCR-RFLP para estudar a variabilidade genética de *D. phaseolorum* e *Phomopsis longicolla* isolados de soja; Nozaki *et al.* (2006), utilizaram marcadores do tipo AFLP para a caracterização isolados do patógeno *D. citri*, isolados de plantas cítricas; e, no estudo de Ash *et al.* (2010), REP, ERIC e BOX-PCR foram empregados para estudar a variabilidade de *Phomopsis* sp. coletados da erva-daninha *Carthamus lanatus*.

Os marcadores IRAP e REMAP utilizados em nosso estudo, que foram originalmente desenvolvidos para avaliar a variabilidade genética de fungos do gênero *Colletotrichum* (Santos *et al.*, 2012), foram eficientes em analisar a variabilidade genética também do gênero *Diaporthe*, uma vez que os amplicons reprodutíveis foram gerados para todos os isolados, em todas as combinações de oligonucleotídeos iniciadores propostas. Isso se deve ao fato de que esses marcadores anelam em regiões LTR de retrotransposons, que são regiões muito conservadas. Além disso, retrotransposons apresentam grande dispersão, abundância e ubiquidade nos genomas dos organismos eucariotos (Kalendar *et al.*, 1999).

Os resultados obtidos com esses marcadores para os fungos do gênero *Diaporthe* demonstraram que esses fungos, apesar de terem sido isolados como endofíticos do mesmo órgão (folha), da mesma espécie vegetal (*P. vulgaris*), no mesmo espaço temporal e da mesma localização geográfica de coleta (Zona da Mata Mineira), possuem uma alta variabilidade genética. Essa variabilidade genética revelada pelos marcadores IRAP e REMAP não é possível de ser acessada simplesmente pelo sequenciamento da região ITS do rDNA, e provavelmente de alguma outra sequência *barcode* tal como a subunidade maior do ribossomo (LSU) do rDNA, que também é utilizada para a identificação de isolados fúngicos (Botella e Diez, 2011), o que reforça a relevância do uso dos marcadores moleculares nos estudos de variabilidade genética interespecífica de fungos.

A análise de agrupamento realizada com os dados dos marcadores IRAP e REMAP em conjunto revelou que os isolados deste estudo apresentam uma alta variabilidade genética, formando diferentes *clusters* na análise de agrupamento. Esses resultados são condizentes com as relações filogenéticas inferidas por meio da análise multilocus. Três grupos puderam ser verificados com o uso dos marcadores moleculares e dois deles são formados por indivíduos confirmados como sendo da mesma espécie por meio da análise multilocus. É o caso do segundo grupo, formado exclusivamente por isolados de *D. infecunda*, e do terceiro, formado por isolados de *D. phaseolorum*.

Dos isolados de nosso estudo, CMT 71 foi o único que permaneceu identificado apenas como *Diaporthe* sp. mesmo com a abordagem de análise multilocus. CMT 41 e CMT 71, apesar de terem apresentado concordâncias genealógicas diferentes, formaram um único grupo quando analisados por meio dos marcadores IRAP e REMAP.

Os marcadores moleculares utilizados neste estudo são vantajosos em relação a outros anteriormente empregados no estudo de variabilidade genética de *Diaporthe* pelo fato de que eles baseam-se em elementos transponíveis e, marcadores desse tipo são capazes de detectar grandes mudanças no genoma (Kalendar e Schulman, 2006), mudanças estas que são relacionadas com atividades de transposição, pois cada evento de

transposição gera um polimorfismo, que pode ser detectado por meio do uso de ferramentas moleculares como estas (Grzebeleus, 2006).

A atividade de elementos transponíveis pode induzir uma variedade de modificações no genoma fúngico, como mutações, quebras e rearranjos cromossômicos e é um dos processos conhecidos como geradores de variabilidade genética em fungos (Ikeda *et al.*, 2001; Daboussi e Capy, 2003). No caso dos isolados que compõem o segundo grupo do dendrograma, IRAP e REMAP revelaram uma variabilidade genética que não pôde ser acessada nem mesmo por meio de uma análise de sequências multilocus. O conhecimento da existência dessa variabilidade genética, possibilitada somente por meio do uso de marcadores moleculares, como os utilizados neste estudo, é muito interessante, por exemplo, na triagem de isolados para exploração biotecnológica, pois, estudos que considerassem apenas as informações relacionadas à identificação do isolado ao nível de espécie e não empregassem outras ferramentas moleculares para avaliar a variabilidade genética existente e, até esse ponto, crítica, poderiam precipitadamente cair no erro de considerar esses isolados como sendo iguais, sendo que, na verdade, eles apresentam características genéticas diferentes e possivelmente também apresentam potenciais de utilização em aplicações biotecnológicas diferentes. Neste contexto, sugere-se o emprego de ferramentas moleculares, como os marcadores baseados retrotransposons utilizados neste estudo, como um passo a mais na triagem de isolados para exploração biotecnológica.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro.

6. Referências

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Ansari KI, Palacios N, Araya C, Langin T, Egan D, Doohan FM (2004). Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum lindemuthianum* isolates of different geographic origins. *Plant Pathology* 53: 635–642.
- Arnau J, Housego AP, Oliver RP (1994). The use of RAPD markers in the genetic analysis of the plant pathogenic fungus *Cladosporium fulvum*. *Current Genetics* 25(5): 438–44.
- Arnold AE, Lutzoni F (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88 (3):541-549.
- Arora DK, Hirsch PR, Kerry BR (1996). PCR-based molecular discrimination of *Verticillium chlamydosporium* isolates. *Mycological Research* 100(7): 801–809.
- Ash GJ, Stodart B, Sakuanrungsirikul S, Anschaw E, Crump N, Hailstones D, Harper JDI (2010). Genetic characterization of a novel *Phomopsis* sp., a putative biocontrol agent for *Carthamus lanatus*. *Mycologia* 102(1): 54–61.
- Beraha L, O'Brien MJ (1979). *Diaporthe melonis* new species a new soft rot of market cantaloupes. *Journal of Phytopathology* 94(3): 199–207.
- Botella L, Diez J (2011). Phylogenic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Diversity* 47 (1):9-18.
- Branco CJS, Vieira EA, Malone G, Kopp MM, Malone E, Bernardes A, Mistura CC, Carvalho FIF, Oliveira CA (2007). IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice. *Journal of Applied Genetics* 48 (2):107-113.
- Cabral D, Stone JK, Carroll GC (1993). The internal mycobiota of *Juncus* spp.: microscopic and cultural observations of infection patterns. *Mycological Research* 97(3): 367-376.
- Cai L, Giraud T, Zhang N, Begerow D, Cai G, Shivas RG (2011). The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. *Fungal Diversity* 50(1): 121–133.
- Carbone I, Kohn L (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91(3): 553–556.

Cheng Z, Tang W, Xu S, Sun S, Huang B-Y, Yan X, Qi-jin C, Lin, Y-C (2008). First report of an endophyte (*Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*) from *Kandelia candel*. *Journal of Forestry Research* 19(4): 277–282.

Daboussi MJ, Capy P (2003). Transposable elements in filamentous fungi. *Annual Review of Microbiology* 57: 275–299.

Dai J, Krohn K, Gehle D, Kock I, Flörke U, Aust H-J, Draeger S, Schulz B, Rheinheimer J (2005). New Oblongolides Isolated from the Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. From *Melilotus dentata* from the Shores of the Baltic Sea. *European Journal of Organic Chemistry* 2005(18): 4009–4016.

Dettman JR, Jacobson DJ, Taylor JW (2003). A multilocus genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*. *Evolution* 57(12): 2703–2720.

Edel V, Steinberg C, Avelange I, Laguerre G, Alabouvette C (1995). Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology* 85: 579–585.

Farr DF, Castlebury LA, Rossman AY (2002). Morphological and molecular characterization of *Phomopsis vaccinii* and additional isolates of *Phomopsis* from blueberry and cranberry in the eastern United States. *Mycologia* 94(3): 494–504.

Flood J, Whitehead DS, Cooper RM (1992). Vegetative compatibility and DNA polymorphisms in *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis* and their relationship to isolate virulence and origin. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41(3): 201–215.

Gamboa-Gaitán MA, Laureano S, Bayman P (2005). Endophytic *Phomopsis* strains from leaves of *Guarea guidonia* (Meliaceae). *Caribbean Journal of Science* 41(2): 1–10.

Garcia-Reyne A, López-Medrano F, Morales JM, García Esteban C, Martín I, Eraña I, Meije Y, Lalueza A, Alastruey-Izquierdo A, Rodríguez-Tudela JL, Aguado JM (2011). Cutaneous infection by *Phomopsis longicolla* in a renal transplant recipient from Guinea: first report of human infection by this fungus. *Transplant Infectious Disease* 13(2): 204–207.

Gardes M, Bruns T (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113–118.

Glass NL, Donaldson GC (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61(4): 1323–30.

Gomes RR, Glienke C, Videira SIR, Lombard L, Groenewald JZ, Crous PW (2013). *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia* 31(1): 1–41.

Gonzaga LL, Queiroz MV (2010). *Isolamento e Identificação de Fungos Endofíticos do Tecido Foliar de Feijão (Phaseolus vulgaris L.) da Zona da Mata Mineira*. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Viçosa.

González V, Tello ML (2011). The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity* 47(1): 29–42.

Grzebeleus D (2006). Transposon insertion polymorphism as a new source of molecular markers. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 14: 21–29.

Harada ML, Schneider H, Schneider MP, Sampaio I, Czelusniak J, Goodman M (1995). DNA evidence on the phylogenetic systematics of New World monkeys: support for the sister-grouping of Cebus and Saimiri from two unlinked nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4: 331–349.

Hobbs TW, Phillips DV (1985). A identification of *Diaporthe* and *Phomopsis* isolates from soybean. *Phytopathology* 75: 500.

Horn WS, Simmonds MSJ, Schwartz RE, Blaney WM (1995). Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. *Tetrahedron* 51(14): 3969–3978.

Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.

Hulbert S, Illott T, Legg E, Lincoln SE, Lander ES, Michelmore RW (1988). Genetic analysis of the fungus, *Bremia lactucae*, using restriction fragment length polymorphisms. *Genetics* 120: 947–958.

Ikeda K, Nakayashiki H, Takagi M, Tosa Y, Mayama S (2001). Heat shock, copper sulfate and oxidative stress activate the retrotransposon MAGGY resident in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Genetics and Genomics* 266: 318–325.

Kalendar R, Grob T, Regina M, Suoniemi A, Schulman A (1999). IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 704–711.

Kalendar R, Schulman AH (2006). IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols* 1(5): 2478–84.

Leite TS, Cnossen-Fassoni A, Pereira OL, Mizubuti ESG, Araújo EF, Queiroz MV (2013). Novel and Highly Diverse Fungal Endophytes in Soybean

Revealed by the Consortium of Two Different Techniques. *Journal of Microbiology* 51(1): 56–69.

Lumbsch HT, Schmitt I, Lindemuth R, Miller A, Mangold A, Fernandez F, Huhndorf S (2005). Performance of four ribosomal DNA regions to infer higher-level phylogenetic relationships of inoperculate euascomycetes (Leotiomyceta). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34(3): 512–24.

Majer D, Mithen R, Lewis BG, Vos P, Oliver RP (1996). The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycological Research* 100(9): 1107–1111.

Manninen O, Kalendar R, Robinson J, Schulman AH (2000). Application of BARE-1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley. *Molecular Genetics and Genomics* 264 (3): 325–334.

Muntanõla-Cvetkovic M, Mihaljcevic M, Petrov M. (1981). On the identity of the causative agent of a serious *Phomopsis-Diaporthe* disease in sunflower plants. *Nova Hedwigia* 34(3/4): 417–435.

Naik BS (2009). Taxonomic placement for mycelia sterilia in endophytic fungal research: a molecular approach. *Current Science* 97(9): 1276–1277.

Nei M (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 70: 3321–3323.

Nozaki MDH, Camargo M, Lemos EGM, Aukar APA, Barreto M. (2006). Caracterização molecular através da técnica fAFLP de isolados de *Diaporthe citri*. *Summa Phytopathologica* 32(2): 147–150.

Nylander JAA (2004). MrModeltestv2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden.

Pereira JO, Vieira MLC, Azevedo JL (1999). Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15: 37–40.

Petrini O (1991). *Fungal endophytes of tree leaves*. In: Andrews JH, Hirano SS (eds) *Microbial ecology of leaves*. Spring-Verlag, New York, pp 179–197.

Pioli RN, Morandi EN, Martínez MC, Lucca F, Tozzini A, Bisaro V, Hopp HE (2003). Morphologic, Molecular, and Pathogenic Characterization of *Diaporthe phaseolorum* Variability in the Core Soybean-Producing Area of Argentina. *Phytopathology* 93(2): 136–146.

Pornpakakul S, Roengsumran S, Deechangvipart S, Petsom A, Muangsin N, Ngamrojanavanich N, Nongluksna S, Narongsak C, Ohta, T. (2007). Diaporthichalasin, a novel CYP3A4 inhibitor from an endophytic *Diaporthe* sp. *Tetrahedron Letters* 48(4): 651–655.

R development Core Team (2007) R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

Rehner SA, Uecker FA (1994). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. *Canadian Journal of Botany* 72(11): 1666–1674.

Rocha ACS, Garcia D, Uetanabaro APT, Carneiro RTO, Araújo IS, Mattos CRR, Góes-Neto A (2011). Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonism on *Microcyclus ulei*. *Fungal Diversity* 47: 75–84.

Rokas A, Williams BL, King N, Carroll SB (2003). Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* 425(6960): 798–804.

Rossman AY, Farr DF, Castlebury LA (2007). A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. *Mycoscience* 48: 135–144.

Rubini MR, Silva-Ribeiro RT, Pomella AWW, Maki CS, Araújo WL, Santos DR, Azevedo JL (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences* 1: 24-33.

Rukachaisirikul V, Sommart U, Phongpaichit S, Sakayaroj J, Kirtikara K (2008). Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. *Phytochemistry* 69(3): 783–787.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 74, 5463-5467.

Santana MF, Araújo EF, Souza JT, Mizubuti ESG, Queiroz MV (2012). Development of molecular markers based on retrotransposons for the analysis of genetic variability in *Moniliophthora pernicioso*. *European Journal of Plant Pathology* 134: 497–507.

Santana MF, Batista AD, Ribeiro LE, Araújo EF, Queiroz MV (2013). Terminal repeat retrotransposons as DNA markers in fungi. *Journal of Basic Microbiology* 1–5.

Santos JM, Correia VG, Phillips AJL (2010). Primers for mating-type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction *in vitro* and biological species definition. *Fungal Biology* 114(2-3): 255–270.

Santos JM, Phillips AJL (2009). Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. *Fungal Diversity* 34: 111–125.

Santos JM, Vrandečić K, Cosić J, Duvnjak T, Phillips AJL (2011). Resolving the *Diaporthe* species occurring on soybean in Croatia. *Persoonia* 27: 9–19.

Santos LV, Queiroz MV, Santana MF, Soares MA, Barros EG, Araújo EF, Langin T (2012). Development of new molecular markers for the *Colletotrichum* genus using RetroCl1 sequences. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 28(3): 1087–1095.

Schoch C, Seifert K, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Consortium, Fungal Barcoding (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 109(16): 1–6.

Silva GH, Teles HL, Trevisan HC, Bolzani VS, Young MCM, Pfenning LH, Eberlin MN, Haddad R, Costa-Neto CM, Araújo ÂR. (2005). New Bioactive Metabolites Produced by *Phomopsis cassiae*, an Endophytic Fungus in *Cassia spectabilis*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16(6B): 1463–1466.

Sutton DA, Timm WD, Morgan-Jones G, Rinaldi MG (1999). Human phaeohyphomycotic osteomyelitis caused by the coelomycete *Phomopsis saccardo* 1905: criteria for identification, case history, and therapy. *Journal of Clinical Microbiology* 37(3): 807–811.

Swofford DL, Waddell PJ, Huelsenbeck JP, Foster PG, Lewis PO, Rogers JS (2001). Bias in phylogenetic estimation and its relevance to the choice between parsimony and likelihood methods. *Systematic Biology* 50, 525–539.

Talamini V, Souza EA, Pozza EA, Silva GF, Ishikawa FH, Júnior OAC (2006). Genetic Divergence Among and Within *Colletotrichum lindemuthianum* Races Assessed by RAPD. *Fitopatologia Brasileira* 31(6): 545–550.

Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31(1): 21–32.

Udayanga D, Liu X, Crous PW, McKenzie EHC, Chukeatirote E, Hyde KD (2012). A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). *Fungal Diversity* 56(1): 157–171.

Udayanga D, Liu X, McKenzie EHC, Chukeatirote E, Bahkali AHA, Hyde KD (2011). The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Diversity* 50(1): 189–225.

Uecker FA (1988). A world list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. *Mycol Mem*, 13.

van der Merwe, NA, Gryzenhout M, Steenkamp ET, Wingfield BD, Wingfield MJ (2010). Multigene phylogenetic and population differentiation data confirm the existence of a cryptic species within *Chrysosporthe cubensis*. *Fungal Biology* 114(11-12): 966–79.

van Niekerk J, Groenewald J, Farr DF, Fourie PH, Halleen F, Crous PW (2005). Reassessment of *Phomopsis* species on grapevines. *Australasian Plant Pathology* 34: 27–39.

Vega FE, Simpkins A, Aime MC, Posada F, Peterson SW, Rehner SA, Infante F, Castillo A, Arnold AE (2010). Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. *Fungal ecology* 3: 122-138.

Wagenaar MM, Clardy J (2001). Dicerandrols, new antibiotic and cytotoxic dimers produced by the fungus *Phomopsis longicolla* isolated from an endangered mint. *Journal of Natural Products* 64(8): 1006–1009.

Wehmeyer LE (1933). The genus *Diaporthe* Nitsche and its segregates. Ann Arbor: Univ Michigan Press. 349 p.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). *PCR Protocols*. Academic Press, pp 315-322.

Yeh FC, Yang R, Boyle T (1999). POPGENE. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. Release 1.31. Edmonton: University of Alberta, Canada.

Zein I, Jawhar M, Arabi MIE (2010). Efficiency of IRAP and ITS-RFLP marker systems in accessing genetic variation of *Pyrenophora graminea*. *Genetics and Molecular Biology* 33: 328-332.

Zhan AW, Riccioni L, Pedersen WL, Kollipara KP, Hartman GL (1998). Molecular identification and phylogenetic grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* isolates from soybean. *Phytopathology* 88: 1306-1314.

Zhang AW, Hartman GL, Curio-Penny B, Pedersen WL, Becker KB (1999). Molecular Detection of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from Soybean Seeds. *Phytopathology* 89(9): 796–804.

Zhang AW, Hartman GL, Riccioni L, Chen WD, Ma RZ, Pedersen WL (1997). Using PCR to Distinguish *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from Other Soybean Fungal Pathogens and to Detect Them in Soybean Tissues. *Plant Disease* 81: 1143–1149.

CONCLUSÕES GERAIS

- Fungos endofíticos isolados de tecidos foliares do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) apresentam potencial para controle de fitopatógenos que afetam a cultura do feijoeiro;
- Extratos brutos de metabólitos de fungos endofíticos do feijoeiro exibem atividade antimicrobiana promissora;
- A abordagem filogenética multilocus foi efetiva na identificação e no estudo das relações filogenéticas de fungos do gênero *Diaporthe* isolados do feijoeiro;
- Marcadores moleculares IRAP e REMAP podem ser empregados em estudos de variabilidade genética de fungos do gênero *Diaporthe*.