

TIAGO DE SOUZA LEITE

DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS DE SOJA (*Glycine max*) CULTIVADA EM VIÇOSA - MG

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
2010

TIAGO DE SOUZA LEITE

DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS DE SOJA (*Glycine max*) CULTIVADA EM VIÇOSA - MG

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: 27 de julho de 2010.

Prof. Olinto Liparini Pereira
(Co-orientador)

Prof. Sérgio H. Brommonschenkel

Prof^a Maria Catarina Megumi Kasuya

Prof^a Denise Mara Soares Bazzolli

Prof^a Marisa Vieira de Queiroz
(Orientadora)

Aos meus pais, Orlando e Maria Helena.

Ao meu irmão Rodrigo.

“Nada em biologia faz sentido, a não ser sob a luz da evolução”.

Theodosius Dobzhansky

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade da realização deste projeto, que tanto contribuiu para minha formação profissional e pessoal.

Ao CNPq, à Fapemig e à Capes, pelo apoio financeiro.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, pela amizade, compreensão e por ter sempre acreditado em minha capacidade de trabalho, minha eterna gratidão e carinho.

À professora Elza Fernandes de Araújo, companheira de fisioterapia, um obrigado pelas boas conversas e sugestões. Sua ética e disciplina são uma fonte de inspiração.

Ao professor Olinto Liparini Pereira, pelo apoio incondicional no desafio de ousar e por ter acreditado em minha capacidade de trabalho.

À professora Denise Mara Soares Bazzolli, pela amizade, ensinamentos, carinho e boas risadas.

Ao professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel, pelo seqüenciamento das amostras e por ter aceito o convite para participar como membro da banca examinadora de minha dissertação.

Às professoras Andréa Miyasaka de Almeida e Maria Catarina Megumi Kasuya, por terem me ensinado a escrever, a pensar e a agir como pesquisador. Minha gratidão não mede palavras.

Aos professores e aos técnicos do Departamento de Microbiologia, pela amizade, ensinamentos e por nunca nos deixar faltar absolutamente nada.

Aos meus pais, Orlando e Maria Helena, pelo amor puro e incondicional, pelos valores morais, confiança e apoio durante toda a minha vida.

Ao meu irmão Rodrigo, pelo companheirismo, amizade e amor. Valeu, mano!

À minha tia Euda, pelo amor e auxílio a mim e à minha família.

Aos meus avós, Blandina (*in memoriam*) e José Gomes (*in memoriam*), pelo amor, disciplina e valores familiares.

A todos os meus outros familiares, pela amizade, amor e confiança.

Aos meus amigos do alojamento, Elton Alves, Gustavo Simão e Douglas, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos “sempre amigos” do Laboratório de Associações Micorrízicas, que a todo o momento estiveram presentes em minha vida, desde a graduação até o mestrado e agora no doutorado. Bons dias foram aqueles!

A toda a minha família e agregados do Laboratório de Genética Molecular e de Micro-organismos, pela amizade, companheirismo, ensinamentos, paciência, brincadeiras e risos. Vocês são demais!

À Jaqueline e à Regina, pela amizade e pela paciência, além de proporcionarem a mim e à minha família do laboratório a extensão do tempo dedicado à pesquisa.

À Andréia Cnossen, pela amizade e o auxílio durante o desenvolvimento do meu trabalho. Muito obrigado, Andréia!

Ao Dr. Newton Piovesan e o Sr. Paulo Paiva, pelo auxílio na coleta da soja e pelas boas conversas sobre o assunto.

A todos os que me apoiaram e ajudaram na realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

BIOGRAFIA

Tiago de Souza Leite, filho de Orlando Leite e Maria Helena de Souza Leite, nasceu em Ponte Nova, Minas Gerais, no dia 22 de março de 1983. Em 2004, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em Ciências Biológicas em julho de 2008. Em agosto de 2008, iniciou o curso de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. A cultura da soja	13
2.2. Fungos endofíticos	15
2.2.1. Fungos endofíticos do tecido foliar de soja	20
2.2.2. Isolamento e identificação de fungos endofíticos	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Local da realização do trabalho e coleta do material vegetal	25
3.2. Técnicas de isolamento	26
3.2.1. Isolamento pela técnica de fragmentação do tecido	26
3.2.2. Isolamento pela técnica de cultivo por extinção	26
3.3. Caracterização morfológica dos fungos endofíticos	27
3.4. Extração de DNA, amplificação e sequenciamento da região ITS do rDNA	27
3.5. Inferência filogenética utilizando a região ITS do rDNA	29
3.6. Índices de diversidade	30
4. RESULTADOS	31
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXO I - Morfotipos isolados das cultivares de soja Conquista e Monsoy	56
ANEXO II - Identificação dos isolados obtidos pela técnica de fragmentação do tecido e pela técnica de cultivo por extinção utilizando a ferramenta Blastn do GenBank	57
ANEXO III – Espécies de fungos cujas sequências da região ITS foram obtidas a partir do GenBank para serem utilizadas na análise filogenética	62

RESUMO

LEITE, Tiago de Souza, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2010. **Diversidade de fungos endofíticos de folhas de soja (*Glycine max*) cultivada em Viçosa – MG.** Orientador: Marisa Vieira de Queiroz. Co-orientadores: Elza Fernandes de Araújo e Olinto Liparini Pereira.

A soja é uma das mais importantes culturas agrícolas mundiais, sendo utilizada principalmente na alimentação humana e de animais. Os fungos endofíticos são micro-organismos que habitam o interior do tecido vegetal durante alguma fase do seu ciclo de vida, mas sem causar doença aparente ao hospedeiro. Muitos trabalhos têm mostrado o potencial do uso de fungos endofíticos como agentes no controle biológico de doenças e pragas em plantas, na indução de resistência sistêmica e na promoção de crescimento vegetal. O objetivo deste estudo foi isolar e identificar os fungos endofíticos de folhas de soja das cultivares Conquista e Monsoy, utilizando duas técnicas de isolamento, a fragmentação do tecido e a técnica de cultivo por extinção, para determinar a riqueza de espécies e comparar a diversidade de fungos encontrados entre as cultivares. Um total de 188 morfotipos foram obtidos representando 52 taxa identificados pela região ITS do rDNA. O filo Ascomycota foi o dominante, representado por 99 e 96 % dos isolados para as cultivares Monsoy e Conquista, respectivamente, enquanto o filo Basidiomycota foi representado por 1 e 4 % dos isolados, para as mesmas cultivares. A riqueza de espécies para a cultivar Monsoy (31 espécies) e para a cultivar Conquista (37 espécies) foi maior quando ambas as técnicas de isolamento foram utilizadas. A diversidade de fungos endofíticos foi semelhante para ambas as cultivares, utilizando a mesma técnica de isolamento. A utilização das sequências da região ITS para a análise filogenética permitiu o agrupamento dos isolados fúngicos de acordo com a sua respectiva Ordem (quando definida), Classe e Filo. Esse é o primeiro trabalho que utiliza a técnica de cultivo por extinção para o isolamento de fungos endofíticos da soja.

ABSTRACT

LEITE, Tiago de Souza, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2010. **Diversity of endophytic fungi from leaves of soybean (*Glycine max*) grown in Viçosa – MG.** Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-Advisers: Elza Fernandes de Araújo and Olinto Liparini Pereira.

Soybean is one of the most important crops used in human and animals food. Fungal endophytes are microorganisms that live inside the plant tissue at some stage of their life cycle without causing apparent disease to the host. Many studies have shown the use of fungal endophytes as agents of biological control of pests and plants diseases, and to improve the plant growth and induce systemic resistance of plants. The goal of this work was to isolate and identify the endophytic fungi from leaves of soybean cultivars Monsoy and Conquista using two method of isolation (tissue fragmentation and extinction cultivation). Furthermore, was determining the species richness and the diversity of fungi and compared between cultivars. 188 morphologically distinct isolates were obtained representing 52 taxa identified by sequencing the ITS region of rDNA. The phylum Ascomycota was the dominant represented by 99 and 96 % of the isolates to Monsoy and Conquista cultivars respectively. Species richness of cultivars Monsoy (31 species) and Conquista (37 species) was greater when both isolation method were used. Diversity of endophytic fungi was similar for both cultivars using the same isolation methods. The nucleotide sequences of the ITS region was used for phylogenetic analysis and allowed the grouping of fungal isolates according to their respective Order (when present), Class and Phylum. This is one of the first studies using the extinction culturing method for endophytic fungal isolation in soybean.

1. INTRODUÇÃO

O termo endofítico foi introduzido por De Bary em 1866 e era aplicado a qualquer micro-organismo presente dentro do tecido das plantas. Hoje, o conceito mais comumente usado provém de Petrini (1991): “fungos endofíticos são aqueles micro-organismos que habitam o tecido vegetal durante alguma fase do seu ciclo de vida, podendo colonizar o interior da planta, mas sem causar doença no hospedeiro”. O conceito de Schulz e Boyle (2005) reformula o anterior ao acrescentar “fungos cuja colonização nunca resulte em sintomas visíveis de doença no hospedeiro em qualquer momento específico”.

Os fungos endofíticos têm sido isolados das mais diferentes espécies vegetais, desde árvores (Arnold *et al.*, 2003; Arnold e Lutzoni, 2007), palmáceas (Frohlich *et al.*, 2000), gramíneas (Muller e Krauss, 2005) e líquens (Li *et al.*, 2007b). A diversidade de espécies de fungos endofíticos isoladas de um mesmo hospedeiro varia significativamente, e a maior parte dessa variação ocorre devido aos diferentes métodos utilizados em cada estudo (Hyde e Soyong, 2008).

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma das mais importantes culturas agrícolas mundiais, uma vez que é utilizada na alimentação humana e de animais, na produção de biodiesel, desinfetantes, lubrificantes, sabões, cosméticos, entre outros (Sediyama, 2009).

Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), na safra de 2008/2009, os Estados Unidos foram o maior produtor mundial de grãos de soja, com 38 %, e o Brasil, de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), manteve-se como o 2º maior produtor mundial, totalizando 27,11 % da produção mundial.

Um grande número de trabalhos tem mostrado o potencial do uso de fungos endofíticos como agentes no controle biológico de doenças e pragas em plantas, na indução de resistência na planta hospedeira, na promoção de crescimento vegetal, no aumento da tolerância ao estresse pela seca ou calor em gramíneas e na produção de metabólitos secundários de interesse para a saúde humana (Strobel *et al.*, 2001; Araújo *et al.*, 2002; Redman *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2003; Dingle e Mcgee 2003; Li *et al.*, 2007a; Marquez *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2009; Hamayun *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009a).

Os fungos são os principais patógenos que afetam a cultura da soja, e a maioria das medidas de controle destinadas a eles. Desta maneira, algumas medidas para evitar e, ou eliminar os patógenos na lavoura são o uso de sementes saudáveis e tratadas com fungicidas, a aplicação de fungicidas quando do aparecimento do fungo patogênico, o uso de cultivares de soja resistentes a diferentes patógenos, a rotação de culturas e o manejo do solo (Embrapa, 2008b).

Os estudos de diversidade da comunidade cultivável de fungos endofíticos do tecido foliar de plantas são baseados principalmente no uso da técnica de isolamento via fragmentação do tecido hospedeiro (Hata *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Rakotoniriana *et al.*, 2008; Joshee *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009b). Todavia, a composição de espécies obtida ao utilizar esse método é afetada pelo tamanho do fragmento foliar e pela superfície contínua da placa de Petri, que facilita a sobreposição intercolônia e ao mesmo tempo favorece espécies de crescimento rápido e dominantes (Gamboa *et al.*, 2002; Rakotoniriana *et al.*, 2008).

Estudos anteriores referentes ao isolamento e identificação de fungos endofíticos do tecido foliar de soja foram desenvolvidos nos Estados Unidos por Miller e Roy (1982), na Argentina, por Larran e colaboradores (2002), e no Brasil, por Pimentel e colaboradores (2006), tendo sido utilizada em todos eles a técnica de fragmentação do tecido como método de isolamento.

A utilização do método de filtração de partículas associada ao cultivo por extinção (Collado *et al.*, 2007), adaptado por Unterseher e Schnittler (2009), utiliza a trituração do tecido foliar para reduzir o tamanho do fragmento inoculado, logo colonizado, fazendo uso de placas multipoços, que permitem reduzir as interações intercolônias, possibilitando o isolamento de espécies fúngicas de crescimento lento e raras (de baixa ocorrência), ao mesmo tempo promovendo o isolamento de taxa dominantes e de crescimento rápido (Stone *et al.*, 2004).

A taxonomia molecular utilizada amplamente na identificação de fungos de amostras ambientais (sem a necessidade de isolamento) ou a identificação de fungos que não produzem esporos em condições *in vitro* denominados *Mycelia Sterilia* (Lacap *et al.*, 2003) tem facilitado a identificação de espécies previamente caracterizadas por taxonomia clássica, uma vez que um enorme

número de sequências específicas de DNA de espécies fúngicas se encontram depositadas em bancos de dados biológicos.

Desta maneira, o objetivo do presente estudo foi isolar fungos endofíticos do tecido foliar de duas cultivares de soja, utilizando duas técnicas de isolamento (a técnica de fragmentação do tecido e a técnica de cultivo por extinção) para determinar a riqueza de espécies e comparar a diversidade de fungos encontrados entre as cultivares. A identificação desses fungos foi realizada utilizando uma combinação de análises morfológicas para separação de morfotipos e análise molecular, usando a região ITS, incluindo ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA. Uma análise por inferência filogenética permitiu também estabelecer o relacionamento filogenético entre os isolados endofíticos obtidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura da soja

A soja é uma espécie vegetal pertencente à família Fabaceae (Leguminosae), sendo a espécie *Glycine max* (L.) Merrill a mais cultivada, e o gênero *Glycine* apresentando várias outras espécies originárias da África, Ásia Oriental e Austrália, que constituem um banco genético para o gênero (Sedyama, 2009).

A soja é uma das mais importantes culturas agrícolas mundiais pelo fato de seu grão ser rico em óleo, cerca de 20 %, e em proteínas, em torno de 40 %. O óleo é utilizado para a alimentação humana, na produção de biodiesel, desinfetantes, lubrificantes, sabões, cosméticos etc. O farelo resultante da moagem do grão é composto fundamentalmente de proteínas, sendo utilizado na alimentação humana e animal e, também, na manufatura de muitos produtos processados ou semiprocessados, como os sucos de soja. A planta, em sua forma vegetativa, pode também ser utilizada como adubo verde, forragem, silagem, feno e pastagem (Sedyama, 2009).

As cultivares de soja indicadas para produção de grãos apresentam diferentes níveis de resistência a doenças. As mais comuns apresentam resistência à pústula bacteriana, “fogo selvagem”, cancro da haste, mancha “olho de rã”, oídio, míldio, mancha alva, vírus da necrose da haste, vírus do mosaico comum da soja, nematoide de galhas e nematoide de cisto da soja (Embrapa, 2008b; Sedyama, 2009).

Atualmente, no Brasil, apenas uma minoria das cultivares disponíveis para plantio são utilizadas para a obtenção de óleo e farelo. Entre essas cultivares está a cultivar Conquista (MG/BR46), desenvolvida pela parceria entre a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais (Epamig) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja). Essa cultivar pertence ao grupo de maturação semitardio em Minas Gerais, amplamente cultivada em todo país pela sua capacidade de desenvolvimento em condições desfavoráveis a outras culturas, uma vez que a sua semeadura pode ser feita em solos de baixa, média ou alta fertilidade (Sedyama, 2009).

A cultivar M-SOY 6101 (Monsoy), que apresenta algumas características diferentes da cultivar Conquista, foi desenvolvida pela empresa Monsanto do Brasil e pertence ao grupo de maturação semiprecoce (Sedyama, 2009).

Segundo, a Monsanto, esta cultivar apresenta uma ampla época de plantio, adaptação a diferentes graus de fertilidade do solo e alta precocidade, permitindo o desenvolvimento de uma safra de milho após a sua colheita.

Ambas as cultivares, Monsoy e Conquista, apresentam em comum a resistência ao cancro da haste, à mancha “olho de rã” e à pústula bacteriana (Sedyama, 2009), tendo sido indicadas para plantio na safra de 2009/2010 no Estado de Minas Gerais, dadas as suas características culturais (Sedyama, 2009).

Na safra de 2008/2009, a produção de soja nos Estados Unidos, maior produtor mundial do grão, foi a 80,5 milhões de toneladas, correspondendo a 38 % da produção mundial, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). O Brasil, de acordo com a Conab (Companhia Nacional de Abastecimento), foi o segundo maior produtor mundial de soja, totalizando 57,1 milhões de toneladas, correspondendo a 27,11 % da produção mundial. O Estado do Mato Grosso é o maior produtor brasileiro, seguido por Paraná e, em sexto lugar, o Estado de Minas Gerais. Acredita-se que nos próximos dez anos o Brasil deverá ultrapassar os Estados Unidos, tornando-se o maior produtor mundial de soja (Lovatelli, 2005).

Embora o Estado das Minas Gerais seja apenas o sexto maior produtor nacional de soja, ele é referência no cenário nacional pelo grande número de instituições atuantes no desenvolvimento de novas cultivares de soja, disponíveis para cultivo em diferente regiões do país. Dentre essas instituições, destaca-se a Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizada na cidade de Viçosa MG, por contribuir com o desenvolvimento de mais do que 70 cultivares de soja, atualmente disponíveis no mercado e também de novas tecnologias para a cultura (Sedyama, 2009).

No ano de 2008, as exportações do complexo agroindustrial brasileiro de soja superaram os dez bilhões de dólares, o que representou cerca de 8 % do total exportado pelo país naquele ano (Embrapa, 2008a).

Na cultura da soja, as plantas em diferentes estágios são colonizadas por vários grupos de micro-organismos, sendo que, aproximadamente, 125 micro-organismos patogênicos à soja são conhecidos no mundo (Sedyama, 2009). Atualmente, com a expansão do cultivo da soja no Brasil, este número corresponde a cerca de 40 e tem aumentado significativamente (Sedyama, 2009).

Uma vez que os fungos são os principais patógenos que afetam a cultura da soja, as medidas de controle para evitar ou eliminar patógenos da cultura são geralmente destinadas a eles. Desta maneira, algumas medidas para evitar e, ou eliminar os patógenos na lavoura são o uso de sementes saudáveis tratadas com fungicidas, o uso de cultivares de soja resistentes a diferentes patógenos, a aplicação de fungicidas quando do aparecimento do fungo patogênico, a rotação de culturas e o manejo do solo (Embrapa, 2008b).

2.2. Fungos endofíticos

O termo endofítico foi primeiramente introduzido por De Bary (1866) e era aplicado a qualquer micro-organismo presente dentro do tecido das plantas. Hoje, o conceito mais comumente usado para fungos endofíticos provém de Petrini (1991): “fungos endofíticos são aqueles micro-organismos que habitam o tecido vegetal durante alguma fase do seu ciclo de vida, podendo colonizar o tecido interno da planta, mas sem causar doença ao hospedeiro”. O conceito de Schulz e Boyle (2005) reformula o antecessor ao acrescentar “fungos cuja colonização nunca resulte em sintomas visíveis de doença no hospedeiro em qualquer momento específico”, ou seja, sob quaisquer condições, não ocorrerá evidência de sintomas de doença causada por um fungo endofítico.

Os fungos endofíticos têm sido isolados das mais diferentes espécies vegetais, desde árvores (Arnold *et al.*, 2003; Arnold e Lutzoni, 2007), palmáceas (Frohlich *et al.*, 2000), gramíneas (Muller e Krauss, 2005) e líquens (Li *et al.*, 2007b). A diversidade de espécies de fungos endofíticos isoladas de um mesmo hospedeiro varia significativamente e a maior parte dessa variação ocorre devido aos diferentes métodos de isolamento utilizados em cada estudo (Hyde e Soyong, 2008).

As fontes de inóculo para a colonização de plantas por fungos endofíticos são os esporos sexuais ou assexuais, veiculados pelo ar e pelas sementes e também os propágulos fúngicos vegetativos, a exemplo de hifas fragmentadas, muitas vezes dispersas por meio de insetos vetores (Carrol, 1988). Após a dispersão dos fungos, ocorrem as etapas de adesão, penetração e colonização do tecido hospedeiro por estratégias consideradas semelhantes às de fungos fitopatogênicos, uma vez que evidências sugerem que fungos

endofíticos teriam evoluído diretamente de fungos patogênicos de plantas (Carrol, 1988).

Os fungos endofíticos habitam folhas, pecíolos, estruturas reprodutivas, galhos, cascas e também raízes de plantas (Faeth e Fagan, 2002; Rodriguez *et al.*, 2009b). A maioria desses fungos pertence ao Filo Ascomycota e seus anamorfos, sendo que em apenas alguns trabalhos foi demonstrada a presença de representantes do Filo Basidiomycota como endofíticos (Arnold, 2008; Hyde e Soyong, 2008; Rungjindamai *et al.*, 2008).

A associação endofítica em plantas, tipicamente mutualista, e mais bem conhecida é a interação de espécies do gênero *Neotyphodium* e seu estágio sexual *Epichlöe* (Família Clavicipitaceae) com muitas gramíneas encontradas em ambientes de clima temperado (Muller e Krauss, 2005). Esta associação é de grande importância econômica e constitui um modelo de estudo de interações biológicas a diferentes níveis tróficos (Muller e Krauss, 2005; Bayman, 2007).

É sugerido que a interação entre o fungo endofítico e a planta ocorre ao longo de um continuum (latim: continuidade) variando do antagonismo balanceado a um mutualismo condicionado, a depender do status de ambos os parceiros. Assim, um fungo endofítico pode tornar-se patogênico, denominado de patógeno latente a depender das condições bióticas e abióticas, bem como das condições fisiológicas da planta hospedeira e de uma propriedade particular do fungo, como, por exemplo, o acúmulo de biomassa o suficiente para induzir o desenvolvimento de sintomas da doença (Saikkonen *et al.*, 1998; Redman *et al.*, 2001; Schulz e Boyle, 2005). Por esta razão, diferentes tipos de simbioses descrevem melhor uma interação planta-fungo, em um particular espaço no tempo, do que a espécie de fungo propriamente dita (Redman *et al.*, 2001; Bayman, 2007; Loayza-Alvarez *et al.*, 2008).

Saikkonen e colaboradores (1998) sugeriram que fungos endofíticos encontrados em gramíneas, com reprodução exclusivamente assexual, colonização sistêmica e modo de transmissão vertical, assumem normalmente uma associação mutualista comparada à maioria dos fungos endofíticos encontrados em herbáceas, arbustos e árvores tropicais ou temperadas, que apresentam reprodução sexual, colonização restrita e transmissão vertical e horizontal ou somente horizontal.

Algumas pesquisas têm explorado o papel de endofíticos como saprófitas, baseando-se na hipótese de que muitas espécies de fungos endofíticos no processo de maturação e decomposição foliar podem alterar sua estratégia ecológica adotando um estilo de vida saprófita (Promputtha *et al.*, 2007; Sieber, 2007). Essa evidência foi demonstrada recentemente por Promputtha e colaboradores (2010) e corroborada pelo fato de alguns ou muitos saprófitas se apresentarem relacionados filogeneticamente aos endofíticos (Sieber, 2007).

Atualmente, os fungos endofíticos têm sido agrupados em quatro classes de acordo com o seu modo de transmissão: o hospedeiro colonizado, o tipo de colonização do hospedeiro, a variação de hospedeiros colonizados e a riqueza de espécies na planta (Rodriguez *et al.*, 2009b). Segundo esses autores, essa nova classificação tende a favorecer uma melhor compreensão da relação ou das relações ecológicas envolvidas na interação entre os fungos endofíticos e a planta hospedeira.

O potencial do uso de fungos endofíticos como agentes no controle biológico de doenças e pragas em plantas, na indução de resistência na planta hospedeira, na promoção de crescimento vegetal, no aumento da tolerância ao estresse pela seca ou calor em gramíneas e na produção de metabólitos secundários de interesse para a saúde humana tem sido demonstrado em diferentes estudos (Strobel *et al.*, 2001; Araújo *et al.*, 2002; Redman *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2003; Dingle e Mcgee, 2003; Li *et al.*, 2007a; Marquez *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2009; Hamayun *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009a).

Um exemplo desse uso é a inoculação de fungos endofíticos, ou do sobrenadante livre de células, em folhas de trigo para a redução do número de pústulas de *Puccinia triticina*, causadora da ferrugem da folha, sendo a indução de resistência na planta hospedeira o mecanismo mais provável no controle da doença (Dingle e Mcgee, 2003). Além desse trabalho, há outros em que a inoculação de folhas jovens de *Theobroma cacao* (cacau) com fungos endofíticos reduziu significativamente a necrose e mortalidade foliar, quando as mudas foram inoculadas com o patógeno *Phytophthora* sp. em condições *in vitro* (Arnold *et al.*, 2003). Além disso, a produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos com atividade nematicida também tem sido demonstrada em experimentos *in vitro* (Li *et al.*, 2007a). Ensaio em campo têm demonstrado o efeito do fungo endofítico *Trichoderma martiale* como

agente de controle biológico da podridão parda em cacau, causada por *Phytophthora palmivora* (Hanada *et al.*, 2008).

Fungos endofíticos também podem atuar diretamente como micoparasitas de patógenos do solo ou de patógenos de porções aéreas da planta. Isto ocorre via produção de enzimas β -1,3- glucanases e quitinases, que degradam a parede celular do fungo parasitado, permitindo posteriormente aos fungos endofíticos perfurar a membrana plasmática do hospedeiro e extrair nutrientes para o seu próprio consumo (Vazquez-Garciduenas *et al.*, 1998, Almeida *et al.*, 2007; Bailey *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2009).

A micofumigação é uma outra estratégia utilizada para o emprego de fungos endofíticos no controle biológico. Ela é caracterizada pelo uso de compostos voláteis produzidos por fungos endofíticos, que podem atuar no manejo de pragas e doenças que afetam a agricultura ou mesmo contra patógenos humanos (Strobel *et al.*, 2001; Strobel, 2006).

Um número significativo de gêneros de fungos entomopatogênicos tem sido isolado como endofíticos em diferentes espécies vegetais (Vega, 2008). Entre os principais fungos endofíticos entomopatogênicos, podem ser citados *Beauveria bassiana*, *Aspergillus* sp., *Paecilomyces* sp. e *Metarhizium* sp., sendo que todos eles têm sido isolados tanto de plantas de clima temperado como tropical (Arnold, 2008). Os mecanismos de ação desses fungos endofíticos incluem o parasitismo de galhas de insetos, a produção de toxinas responsáveis pela defesa da planta contra os insetos, a produção de substâncias repelentes na forma de voláteis e a produção de substâncias que reduzem a palatabilidade do inseto herbívoro em relação à planta hospedeira (Carrol, 1988; Azevedo *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2009a).

A inoculação de mudas de arroz com um isolado endofítico de *Fusarium culmorum* permitiu que a planta disponibilizasse mais eficientemente seus recursos para o crescimento da raiz (Rodriguez *et al.*, 2009a), demonstrando a eficiência desse isolado na promoção de crescimento vegetal. Em soja, a inoculação do fungo endofítico *Scolecobasidium tshawytschae* (isolado P-4-3), produtor de giberelina, aumentou significativamente a altura das plantas e a emissão de brotos, comparada ao controle (Hamayun *et al.*, 2009). A produção de enzimas relacionadas à mineralização de fósforo e nitrogênio e a produção de hormônios vegetais têm sido extensivamente determinados e fortemente

relacionados à promoção de crescimento vegetal (Maccheroni Jr e Azevedo, 1998; Sirrenberg *et al.*, 2007; Hamayun *et al.*, 2009).

A presença de fungos endofíticos em algumas gramíneas tem demonstrado sua eficiência em aumentar a tolerância das plantas à seca, produzindo mais matéria seca e utilizando eficientemente o nitrogênio, comparado às gramíneas sem a presença de fungos endofíticos (Elbersen e West, 1996; Bayat *et al.*, 2009). Além da tolerância à seca, a inoculação do fungo endofítico *Curvularia protuberata* infectado pelo vírus CThTV na espécie vegetal *Dichanthelium lanuginosum* possibilitou a sobrevivência dessa espécie vegetal em altas temperaturas, comparado à plantas não infectadas (Redman *et al.*, 2002; Marquez *et al.*, 2007).

Os fungos endofíticos também têm se mostrado produtores de numerosos compostos antioxidantes durante a colonização do tecido vegetal, o que constitui assim um papel importante no aumento à tolerância ao estresse em plantas hospedeiras (Schulz e Boyle, 2005; White Jr e Torres, 2010). Segundo White Jr e Torres (2010), a seleção de fungos endofíticos altamente produtores de antioxidantes e sua posterior aplicação na agricultura podem aumentar a tolerância das plantas a muitos estresses oxidativos e também aumentar a resistência a patógenos.

A produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos é hoje uma das áreas mais bem estudadas. Desde que Gary Strobel e colaboradores (1993) detectaram que um fungo endofítico isolado da espécie vegetal do gênero *Taxus* era capaz de produzir, em condições *in vitro*, o agente anticancerígeno taxol, foram iniciados numerosos trabalhos na bioprospecção de novos metabólitos secundários de interesse para a indústria farmacêutica. Logo após, os micro-organismos endofíticos tornaram-se alvo de estudos visando à produção de antibióticos, antioxidantes, antivirais, agentes anticancerígenos, compostos antidiabéticos e anti-imunossupressivos (Strobel, 2003; Zhang *et al.*, 2006).

Dentre as substâncias isoladas de fungos endofíticos e provenientes de diferentes vias biossintéticas, encontram-se policetídeos, isoprenoides e derivados de aminoácidos, sendo essas substâncias pertencentes a diversos grupos estruturais como terpenoides, esteroides, xantonas, quinonas, fenóis, isocumarinas, benzopironas, tetralonas, citocalasinas e eniatinas (Schulz *et al.*, 2002).

Um aspecto interessante é que o número de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos é maior do que para qualquer outro grupo de micro-organismos, o que está associado à sua alta frequência de isolamento e à alta diversidade encontrada em plantas, o que favorece ainda mais o seu estudo (Zhang *et al.*, 2006).

2.2.1. Fungos endofíticos do tecido foliar de soja

Estudos anteriores referentes ao isolamento e identificação de fungos endofíticos do tecido foliar de soja foram desenvolvidos nos Estados Unidos por Miller e Roy (1982), na Argentina, por Larran e colaboradores (2002), e no Brasil, por Pimentel e colaboradores (2006), tendo sido em todos eles utilizada a técnica de fragmentação do tecido como método de isolamento. Coincidentemente, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), esses países são os maiores produtores de soja do mundo.

Nos Estados Unidos, as espécies de fungos isoladas foram *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia lunata*, *Epicoccum nigrum*, *Glomerella cingulata*, *Glomerella glycines*, *Nigrospora sphaerica*, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Cephalosporiopsis* sp., *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina*, *Chaetomium globosum*, *Diaporthe phaseolorum*, *Epicoccum purpurascens*, *Geniculisporium* sp., *Helminthosporium* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Mucor* sp., *Mycosphaerella* sp., *Myrothecium roridum*, *Nodulisporium* spp., *Papularia* sp., *Pestalotia* sp., *Phoma* sp., *Pithomyces chartarum*, *Podospora* sp., *Pyricularia grisea*, *Septoria glycines*, *Sordaria fimicola*, *Sporomiella minim*, *Trichoderma* sp. e *Verticillium nigrescens*, perfazendo um total de 33 espécies de fungos (Miller e Roy, 1982).

Na Argentina, foram isolados *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima*, *Bipolaris sorokiniana*, *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia lunata*, *Epicoccum nigrum*, *Glomerella cingulata*, *Glomerella glycines*, *Nigrospora sphaerica*, *Penicillium* sp., *Phomopsis longicolla*, *Phomopsis sojiae*, *Pleospora herbarum* e *Stemphylium* sp., totalizando 15 espécies de fungos (Larran *et al.*, 2002).

No Brasil, foram isoladas sete espécies de fungos endofíticos: *Colletotrichum* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp. e *Paecilomyces* sp. (Pimentel *et al.*, 2006). Entre as espécies de fungos

endofíticos isolados no Brasil, aqueles que estão associados a doenças em soja são *Colletotrichum* sp. e *Fusarium* sp. (Embrapa, 2008b).

Para o isolamento de fungos endofíticos do tecido foliar de plantas, é necessária a utilização de uma técnica eficiente de desinfestação superficial, que permita uma completa eliminação dos fungos epifíticos e saprofíticos presentes, mas que ao mesmo tempo assegure que o tecido hospedeiro não seja danificado.

As técnicas de desinfestação superficial do tecido foliar utilizam diferentes tempos e concentrações de hipoclorito de sódio, até encontrar um valor de tempo de tratamento e uma concentração ideal de hipoclorito, no qual se verifica a ausência completa de crescimento fúngico, a partir dos fragmentos foliares, o que indica a eficiência do tratamento (Pereira, 1993; Suryanarayanan *et al.*, 2005). Uma observação atenta da alteração da comunidade de fungos epifíticos a endofíticos durante os diferentes tempos e concentrações de hipoclorito pode ser utilizada para um melhor esclarecimento nos resultados obtidos, utilizando esta técnica (Pereira, 1993).

Shulz e colaboradores (1999) introduziram uma nova metodologia para avaliar o método de desinfestação superficial. Essa metodologia consiste em pressionar a porção adaxial do tecido foliar, previamente desinfestado, na superfície do meio de cultura e, em seguida, observar o crescimento de fungos. Se nenhum fungo cresce, a técnica é julgada eficiente (Schulz *et al.*, 1999). Sánchez Márquez e colaboradores (2007) concluíram que este é um excelente teste para verificação do método de desinfestação empregado no isolamento de fungos endofíticos, devendo ser utilizado em todos os futuros trabalhos de isolamento de fungos endofíticos.

Outra técnica para testar a eficiência do método de desinfestação superficial é o plaqueamento de alíquotas da última água de lavagem do tecido foliar (Pereira, 1993). Essa técnica é considerada pouco efetiva, pois esporos de epifíticos ou saprófitas podem ficar protegidos por estruturas vegetais durante o processo de desinfestação e, além disso, os esporos podem apresentar-se diluídos na solução de lavagem e não serem coletados como parte integrante da alíquota plaqueada.

2.2.2. Isolamento e identificação de fungos endofíticos

Os estudos de diversidade da comunidade cultivável de fungos endofíticos do tecido foliar de plantas são baseados principalmente no isolamento via fragmentação do tecido hospedeiro e cultivo em meio de cultura apropriado (Hata *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Rakotoniriana *et al.*, 2008; Joshee *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009b). Todavia, a composição de espécies observada ao utilizar esse método é afetada pelo tamanho do fragmento foliar, favorecendo espécies dominantes e de crescimento rápido (Gamboa *et al.*, 2002; Rakotoniriana *et al.*, 2008).

A maioria dos estudos de isolamento de fungos endofíticos do tecido foliar tem usado fragmentos muito grandes e se esses estudos fossem repetidos, usando fragmentos de tamanho pequeno, outras espécies fúngicas poderiam ser reveladas, o que permitiria um melhor entendimento da diversidade real de fungos endofíticos (Gamboa *et al.*, 2002). Assim, novas metodologias de isolamento têm sido exploradas para a obtenção de melhores resultados.

Entre essas metodologias está o método de filtração de partículas utilizado primeiramente no isolamento de fungos da serrapilheira (Bills *et al.*, 2004). Esse método permite mensurar uma maior diversidade de isolados fúngicos, uma vez que ocorre a separação dos fragmentos da serrapilheira em partículas pequenas, o que permite isolar espécies raras, dado que o número de espécies aumenta substancialmente com a diminuição da densidade do tecido colonizado. Essas partículas geralmente são plaqueadas em um meio de cultivo contendo antibióticos para retardar o crescimento de bactérias e de fungos de crescimento rápido, o que favorece então a obtenção de espécies (Paulus *et al.*, 2003; Bills *et al.*, 2004; Collado *et al.*, 2007).

A utilização do método de filtração de partículas associada ao cultivo por extinção (Collado *et al.*, 2007), adaptado por Unterseher e Schnittler (2009), visando ao isolamento de fungos endofíticos, explora o fato de que a diversidade de espécies cultiváveis aumenta com a redução da densidade de inóculo associada a uma extinção, no sentido comum de redução do número de partículas que são plaqueadas e na redução da área plaqueada. Desta maneira, o cultivo por extinção em placas multipoços distribui as partículas sobre uma superfície de cultivo particionada, o que permite a redução das

interações intercolônias quando do início do crescimento dos propágulos fúngicos.

O método de filtração de partículas associado ao cultivo por extinção tende a substituir o uso de placas de Petri como meio de cultivo, uma vez que criam uma superfície contínua quando da distribuição de partículas, facilitando assim a sobreposição de partículas e, logo, de colônias fúngicas recém-emergidas, dificultando o isolamento de espécies de crescimento lento. As placas multipoços, que apresentam uma separação espacial de câmaras quando inoculadas com um menor número de partículas, têm sido utilizadas para criar esta superfície particionada de crescimento (Collado *et al.*, 2007). Nesse caso, o uso de placas multipoços permite reduzir as interações intercolônias, aumentando a possibilidade de detecção de espécies de crescimento lento e raras (de baixa ocorrência), permitindo, ao mesmo tempo, o isolamento de taxa dominantes e de crescimento rápido (Stone *et al.*, 2004).

Após a avaliação do crescimento das colônias fúngicas utilizando as diferentes técnicas de isolamento, elas são cultivadas em condições otimizadas para sua posterior identificação, usando taxonomia clássica e, ou molecular.

Na identificação por taxonomia clássica, as colônias de morfotipos diferentes passam por uma etapa de purificação monospórica em meio de cultura apropriada, sendo a descrição final associada comumente a características morfológicas dos esporos, quando eles estão presentes, e por características da colônia com base na taxa de crescimento do fungo (mensuração do diâmetro da colônia), na forma da colônia, sua coloração (acima e abaixo do meio de cultura), a elevação, a textura, o tipo de micélio, a forma marginal, densidade da colônia e efeitos do fungo no meio de cultura (Lacap *et al.*, 2003; Arnold, 2007).

Por outro lado, a taxonomia molecular utilizada amplamente na identificação de fungos de amostras ambientais (sem a necessidade de isolamento) ou a identificação de fungos que não produzem esporos em condições *in vitro* denominados *Mycelia Sterilia* (Lacap *et al.*, 2003) tem facilitado a determinação de espécies previamente caracterizadas por taxonomia clássica, uma vez que um enorme número de sequências específicas de DNA de espécies fúngicas se encontram depositadas em bancos de dados biológicos.

Entre as sequências de DNA mais utilizadas para identificação de espécies de fungos e que se encontram em maior número, por espécie, depositadas no GenBank e acessadas no National Center for Biotechnology (NCBI), está a sequência nucleotídica que corresponde ao espaçador interno transcrito (ITS) do rDNA (Guo *et al.*, 2000; Lacap *et al.*, 2003; Nilsson *et al.*, 2008). O espaçador interno transcrito, mais conhecido como a região ITS, constitui uma região multicópia, compreendendo nos eucariotos uma região não codificante (ITS1-internal transcribed spacer 1), uma região codificadora do rRNA 5,8S e uma outra região não codificante (ITS2-internal transcribed spacer 2). Essa região, que apresenta aproximadamente 550 pb, combina a vantagem de resolução em várias escalas: ITS1, que evolui rapidamente; 5,8S, que é muito conservada; e ITS2, que possui uma taxa de substituição de moderada a rápida (Hershkovitz e Lewis, 1996; Nilsson *et al.*, 2008). Assim, existe a facilidade de amplificação de uma região multicópia, cuja variabilidade da sequência total auxilia na resolução no processo de identificação.

No estudo de fungos endofíticos, a sequência da região ITS é muito utilizada, pois provê uma excelente resolução de isolados fúngicos abaixo da categoria espécie para alguns dos taxa endofíticos mais comuns (Arnold, 2007). Além disso, há muitos trabalhos utilizando a região ITS em análises filogenéticas para a determinação do relacionamento filogenético entre diferentes isolados (Arnold, 2007; Arnold e Lutzoni 2007).

A identificação das espécies pela sequência da região ITS é de grande valia, mas pode obscurecer espécies crípticas, isto é, espécies com a mesma morfologia, cujo banco de dados é ainda incompleto para uma identificação molecular precisa e, além disso, a variação dentro e entre espécies pode não ser consistente fazendo-se necessária uma análise filogenética, utilizando múltiplos loci informativos (Arnold e Lutzoni, 2007; Nilsson *et al.*, 2008; Nilsson *et al.*, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local da realização do trabalho e coleta do material vegetal

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular e de Micro-Organismos, do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro), no Campus da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Amostras sadias do tecido foliar de soja das cultivares Conquista e Monsoy (M-SOY 6101) foram coletadas no estágio reprodutivo R2 (floração plena), nas mesmas condições edafoclimáticas, no Campo Experimental da Agronomia, no Campus da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa - MG, Brasil. Em seguida, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Genética Molecular e de Micro-Organismos.

O total de 30 a 40 folhas coletadas de plantas distintas pertencentes ao mesmo cultivar analisado foram imediatamente lavadas em água corrente para retirada de resíduos de solo e poeira. Em seguida, foram transferidas para uma solução de etanol 70 %, contendo duas gotas de Tween 80 para cada 100 mL de solução, na qual permaneceram submersas por 1 min. Logo após, as folhas foram transferidas para uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) contendo 2 a 2,5 % de cloro ativo (água sanitária comercial Q-Boa), permanecendo por um período de 3,5 min. As folhas foram então lavadas duas vezes em solução esterilizada de NaCl 0,85 % (p/v), por 2 min a cada lavagem, para a remoção de resíduos de cloro.

Após a etapa de desinfestação, as folhas foram seccionadas. Os fragmentos foliares resultantes foram utilizados para testar a eficiência do método de desinfestação superficial, pressionando-se a porção adaxial das folhas sobre o meio de cultura de isolamento, onde não foi observado qualquer crescimento de colônias fúngicas durante o período avaliado. Em ensaios anteriores, o tempo de exposição do tecido foliar e a concentração de hipoclorito de sódio foram adequados à etapa de desinfestação para a confirmação de que os isolados eram realmente endofíticos.

As folhas remanescentes foram acondicionadas em placas de Petri de 90 mm de diâmetro para prosseguimento à técnica de isolamento. A metade das folhas referentes a cada cultivar (15 a 20 folhas) foi utilizada para o

isolamento pela técnica de fragmentação e a outra porção para o isolamento pela técnica de filtração de partículas associada ao cultivo por extinção.

3.2. Técnicas de isolamento

3.2.1. Isolamento pela técnica de fragmentação do tecido

Na técnica de isolamento por fragmentação, 15 a 20 folhas, previamente desinfestadas superficialmente, foram seccionadas em fragmentos de aproximadamente 0,25 cm². Em seguida, cerca de 240 fragmentos foliares foram adicionados em cinco placas multipoços (Greiner Bio-One). Cada uma das placas continha 48 poços preenchidos com 1 mL do meio YMC (extrato de malte, 10 g; extrato de levedura, 2 g; ágar, 13 g; água destilada, completar para 1 L) com o pH ajustado para 6,0 (Bills *et al.*, 2004; Stone *et al.*, 2004; Collado *et al.*, 2007), adicionado dos antibióticos tetraciclina (50 mg/L) e estreptomicina (50 mg/L), para inibir o crescimento de bactérias. Em seguida, as placas multipoços foram incubadas por 16 dias, sob temperatura de 22 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h.

3.2.2. Isolamento pela técnica de cultivo por extinção

Um total de 15 a 20 folhas desinfestadas foram processadas utilizando a técnica de cultivo por extinção, conforme o protocolo descrito por Paulus e colaboradores (2003) e Collado e colaboradores (2007), adaptado por Unterseher e Schnittler (2009) para o isolamento de fungos endofíticos. As folhas foram mergulhadas em 300 mL solução esterilizada de NaCl 0,85 % (p/v) e homogeneizadas em um liquidificador (por cerca de 60 s em alta velocidade). As partículas foliares resultantes da homogeneização foram subsequentemente separadas por tamanho com o uso de três diferentes peneiras, 500 µm, 212 µm e 106 µm, sendo que as partículas cujo tamanho variavam de 107 a 211 µm foram retidas e ressuspensas em 20 mL de solução de NaCl 0,85 % (p/v). Posteriormente, a suspensão com as partículas foi centrifugada a 2200 g por 5 min. em temperatura ambiente.

Após a centrifugação e descarte do sobrenadante, 15 mL de carboximetil celulose (CMC) 0,1 % (p/v) foram adicionados ao precipitado e novamente a suspensão com as partículas foi centrifugada a 2200 g por 15 min. em temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, e uma nova solução de 20 mL de CMC 0,1 % (p/v) foi acrescida. Essa suspensão final

representou a concentração 1x de partículas foliares. A partir dessa concentração, uma diluição em CMC 0,1 % (p/v) foi realizada para o estabelecimento de uma concentração de 1: 2x. Assim, as concentrações de partículas foliares utilizadas foram 1x e 1:2x. Essas concentrações foram determinadas por análises anteriores com o plaqueamento de diferentes concentrações de partículas foliares (1x, 1:2x, 1:4x, 1:8x, 1:16x e 1:64x).

O volume de 40 µL de cada uma das respectivas concentrações 1x e 1:2x foi inoculado nos poços de um total de 10 placas (cinco placas multipoços para cada concentração).

Para permitir a evaporação do excesso de água compondo o inóculo dentro dos poços, as placas foram mantidas semiabertas na câmara de fluxo laminar por cerca de 30 a 60 min. antes do completo fechamento da tampa. Em seguida, as placas multipoços foram seladas e incubadas por quatro semanas, sob temperatura de 22 °C ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h.

3.3. Caracterização morfológica dos fungos endofíticos

Após uma primeira avaliação da morfologia das colônias dentro das placas multipoços, as colônias de morfotipos diferentes foram transferidas para placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo o meio YMC suplementado com antibióticos. Em seguida, essas colônias passaram por uma etapa de purificação monospórica. A determinação do morfotipo das colônias foi realizada com base na taxa de crescimento do fungo, na forma da colônia, sua coloração e efeitos do fungo no meio de cultura (Lacap *et al.*, 2003; Arnold 2007).

3.4. Extração de DNA, amplificação e sequenciamento da região ITS do rDNA

Os isolados fúngicos foram repicados em meio YMC, sem adição de antibióticos, e após sete dias de crescimento, cerca de 200 mg de micélio fúngico foram coletados, e o DNA extraído utilizando o UltraClean DNA Microbial Isolation Kit (Mobio Laboratories).

Na identificação molecular dos isolados de fungos endofíticos, os oligonucleotídeos iniciadores ITS 1F (5' CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3') (Gardes e Bruns, 1993) e ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White *et al.*, 1990) foram utilizados e o fragmento correspondendo à região ITS1-5,8s-

ITS2 foi amplificado pela técnica de PCR, utilizando o termociclador Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Germany), programado para realizar uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 min., seguido de 39 ciclos a 95 °C por 1 min., 50 °C por 1 min. e 72 °C por 1 min., sendo que após os ciclos houve uma extensão final a 72 °C por 7 min. A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 25 µL contendo 5 µL do tampão Colorless Go Taq® Flexi Buffer [5x] (Promega, Madison USA); 2,5 µL de MgCl₂ [25 mM] (Promega, Madison USA); 1,0 µL de dNTPs [2,5 mM cada dNTP]; 1,0 µL do oligonucleotídeo ITS1F [5 µM]; 1,0 µL do oligonucleotídeo ITS4 [5 µM]; 0,25 µL de Go Taq® DNA Polymerase [5 U/µL] (Promega, Madison USA), 5 µL de DNA genômico [1,75 ng/µL] e 9,25 µL de água ultrapura autoclavada. Após a amplificação, os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2 %.

O produto de cada uma das reações da PCR (cerca de 15 µL) foi purificado utilizando o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison USA) e eluído para um volume final de 20 µL. Os produtos purificados foram enviados para sequenciamento no Laboratório de Genômica, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro).

A leitura das amostras foi realizada em sequenciador automático MegaBACETM 1000 de 96 capilares (GE Healthcare), sendo que cada uma das fitas dos produtos da amplificação foi sequenciada com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação inicial. Os produtos do sequenciamento de ambas as fitas de DNA foram agrupados em contíguos, alinhados e corrigidos manualmente, utilizando o programa Sequencher versão 4.1.4 (Genecodes Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA). As sequências nucleotídicas, que, após o processamento apresentaram 100 % de identidade com outras sequências analisadas, foram consideradas pertencentes ao mesmo isolado fúngico. Todavia, o número de isolados idênticos foi incluído para os cálculos de diversidade.

Uma busca comparativa de identidade das sequências nucleotídicas obtidas dos isolados fúngicos em relação ao banco de dados do GenBank foi realizada usando um algoritmo de alinhamento local para sequências nucleotídicas (Blastn). As sequências do banco de dados que apresentaram maior identidade, maior cobertura (query), maior score e um menor e-value em comparação às sequências desse estudo, permitiram a identificação dos

isolados fúngicos como pertencentes àquela espécie ou gênero, em correspondência ao banco de dados.

Os isolados fúngicos da mesma espécie, segundo o GenBank, cujas sequências nucleotídicas foram comparadas uma a uma e que apresentaram uma identidade na região ITS acima de 95 %, foram considerados pertencentes àquela espécie. Essa porcentagem foi selecionada com base nos estudos de Nilsson e colaboradores (2008), que relataram uma variação intraespecífica na região ITS de 1,96 % (S= 3,73) e de 3,33 % (S= 5.62), para os Filos Ascomycota e Basidiomycota, respectivamente. Estudos anteriores também delimitaram o valor de 95 % de identidade na região ITS para a identificação de isolados ao nível de espécie (Arnold e Lutzoni, 2007). Todavia, os isolados da mesma espécie, segundo o GenBank, que apresentaram uma identidade de sequências abaixo de 95 %, foram considerados isolados distintos e nomeados de isolado 1, 2 e 3; mas mantendo o mesmo nome da espécie do banco de dados, cuja sequência apresentou o maior score. Essa denominação foi necessária, uma vez que foi usada somente a região ITS como parâmetro molecular para a identificação dos isolados.

3.5. Inferência filogenética utilizando a região ITS do rDNA

O alinhamento manual das sequências nucleotídicas referentes à região ITS dos isolados de cada uma das cultivares e de sequências referenciais retiradas do banco de dados foi realizado no programa Mega 4.0 (Tamura *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2008). Estas sequências foram agrupadas por cultivar para a realização da inferência filogenética mediante o uso da Análise Bayesiana (Yang e Rannala, 1997)

A análise Bayesiana foi realizada utilizando o programa MrBayes 3.1 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001), sendo o modelo de evolução SYM + I + G selecionado pelo programa MrModeltest v2 (Nylander, 2004) para ambas as cultivares. No MrBayes 3.1, duas corridas independentes com quatro Cadeias Markovianas Monte Carlo (MCMC) foram rodadas por 10 milhões de gerações, e as árvores amostradas e retidas a cada 1000ª geração. As primeiras amostras de árvores, neste caso 1 milhão de gerações, foram descartadas na fase de burnin, e as árvores permanentes sumarizadas para gerar uma árvore consenso da maioria.

3.6. Índices de diversidade

A diversidade de espécies dos fungos endofíticos foi mensurada usando os índices de diversidade que utilizam a riqueza de espécies e sua abundância relativa como parâmetros. A equitabilidade de espécies, que avalia a contribuição dos indivíduos em relação à comunidade, também foi calculada.

Os índices de diversidade utilizados foram o Shannon Wiener (H') (fórmula: $\sum [(n_i/n) \ln (n_i/n)]$), o índice de diversidade de Simpson ($1-D$) (fórmula: $1 - [D = \sum (n_i/n)^2]$) e a dominância de Simpson (D), em que n_i é o número de espécie (i) distintas e (n) é a abundância de cada espécie na comunidade. A equitabilidade de Shannon Wiener foi calculada pela fórmula $E = H'/H_{max}$, em que H' é o índice de Shannon Wiener e H_{max} é \ln do valor de n_i . As análises de diversidade foram realizadas usando o programa Past versão 2.01 (Hammer *et al.*, 2001).

4. RESULTADOS

Das 432 unidades formadoras de colônia (UFC) obtidas utilizando a técnica de fragmentação do tecido e das 110 UFC referentes às concentrações 1x e 1:2x usando a técnica de cultivo por extinção, 188 morfotipos foram analisados e identificados 97 indivíduos referentes à cultivar Conquista e 91 à cultivar Monsoy (**ANEXO I**). Entre os morfotipos, foram encontradas 37 espécies distintas para a cultivar Conquista e 31 para a cultivar Monsoy. A identificação dos isolados fúngicos ao nível de espécie ou gênero (taxa) foi realizada utilizando a ferramenta Blastn do GenBank (**ANEXO II**). Desses isolados, foram distinguidos 52 taxa (**Tabela 1**).

O Filo Ascomycota foi representado neste estudo pela Classe dos Dothideomycetes (Ordens: Botryosphaerales, Capnodiales e Pleosporales) e pela Classe dos Sordariomycetes (Ordens: Diaporthales, Hypocreales, Magnaporthales, Sordariales, Trichosphaerales e Xylariales). Os Dothideomycetes e os Sordariomycetes compreendem, respectivamente, 29 % e 69 % dos isolados obtidos da cultivar Monsoy, e 28 % e 67 % da cultivar Conquista. O Filo Basidiomycota foi representado por isolados do subfilo Pucciniomycotina com uma porcentagem relativa de 1 % e 4 % dos isolados obtidos da cultivar Monsoy e Conquista, respectivamente.

Os três gêneros mais frequentemente isolados da cultivar Monsoy foram *Colletotrichum* (47 %), *Cochliobolus* (9,8 %) e *Fusarium* (7,6 %). Para a cultivar Conquista, o gênero *Colletotrichum* foi também o mais abundante com 46 % e, em seguida, os gêneros *Xylaria* e *Phoma* com 7,2 % e 6,1 %, respectivamente. Os outros gêneros foram raramente isolados, tendo a frequência de ocorrência variado de 0 a 6 %, dependendo da cultivar analisada. A distribuição dos isolados dentre os 52 taxa identificados demonstra essa ocorrência de muitos taxa comuns e poucos taxa raros (**Figura 1**).

Tabela 1 – Espécies de fungos endofíticos isolados das duas cultivares de soja, Conquista ou Monsoy, a partir de diferentes técnicas de isolamento, bem como a abundância relativa e a abundância acumulada dos isolados por cultivar.

Espécies	Monsoy		Conquista		Monsoy Total	Conquista Total
	Fragmentação	Extinção	Fragmentação	Extinção		
<i>Alternaria arborescens</i>	0	1	1	0	1	1
<i>Alternaria dauci</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Alternaria macrospora</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Alternaria</i> sp	0	1	0	0	1	0
<i>Ampelomyces</i> sp.	1	0	2	0	1	2
<i>Annulohypoxyton stygium</i>	3	0	0	0	3	0
<i>Arthrinium phaeospermum</i>	0	0	0	1	0	1
<i>Cercospora zebrinae</i>	0	0	0	1	0	1
<i>Chaetomium</i> sp.	0	0	1	0	0	1
<i>Clados. cladosporioides</i>	1	0	2	0	1	2
<i>Cladosporium colocasiae</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Cochliobolus lunatus</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Cochliobolus sativus</i>	9	0	1	2	9	3
<i>Colletotrichum boninense</i>	5	7	2	2	12	4
<i>Colletotrichum capsici</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Colletotrichum fragariae</i>	1	0	0	0	1	0
<i>C. gloeosporioides 1</i>	8	0	3	0	8	3
<i>C. gloeosporioides 2</i>	13	2	18	13	15	31
<i>C. gloeosporioides 3</i>	1	0	0	0	1	0
<i>Colletotrichum lupini</i>	1	0	0	0	1	0
<i>Colletotrichum truncatum</i>	5	0	7	0	5	7
<i>Davidiella tassiana</i>	2	0	3	0	2	3
<i>Diaporthe helianthi</i>	2	0	3	0	2	3
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	4	0	1	0	4	1
<i>Didymella bryoniae</i>	3	0	0	1	3	1
<i>Epicoccum nigrum</i>	0	1	0	0	1	0
<i>Eutypella scoparia</i>	0	1	0	0	1	0
<i>Fusarium equiseti</i>	2	3	1	0	5	1
<i>Fusarium proliferatum</i>	1	0	0	0	1	0
<i>Guignardia mangiferae</i>	1	0	0	0	1	0
<i>Guignardia vaccinii</i>	1	0	0	0	1	0
<i>Hypoxyton</i> sp.	1	0	0	0	1	0
<i>Leptospora rubella</i>	0	0	0	1	0	1
<i>Magnaporthe grisea</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Myrothecium inundatum</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Nectria mauritiicola</i>	1	0	0	0	1	0
<i>Neofusicoccum</i> sp.	2	0	0	0	2	0
<i>Nigrospora sphaerica</i>	0	2	0	0	2	0
<i>Ophiognomonina</i> sp.	0	0	0	1	0	1
<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp. 1	0	1	1	1	1	2
<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp. 2	0	0	0	1	0	1
<i>Phoma glomerata</i>	1	0	1	0	1	1
<i>Phoma herbarum 1</i>	0	0	1	1	0	2
<i>Phoma herbarum 2</i>	0	0	3	0	0	3
<i>Phoma</i> sp.	1	1	0	0	2	0
<i>Phomopsis</i> sp.	0	0	1	0	0	1
<i>Podospora didyma</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Rhodotorula ingeniosa</i>	1	0	0	0	1	0
<i>Rhodotorula</i> sp.	0	0	1	0	0	1
<i>Sporobolomyces oryzicola</i>	0	0	2	1	0	3
<i>Stemphylium solani</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Xylaria berteri</i>	0	0	6	0	0	6
<i>Xylaria ianthinovelutina</i>	0	0	1	0	0	1

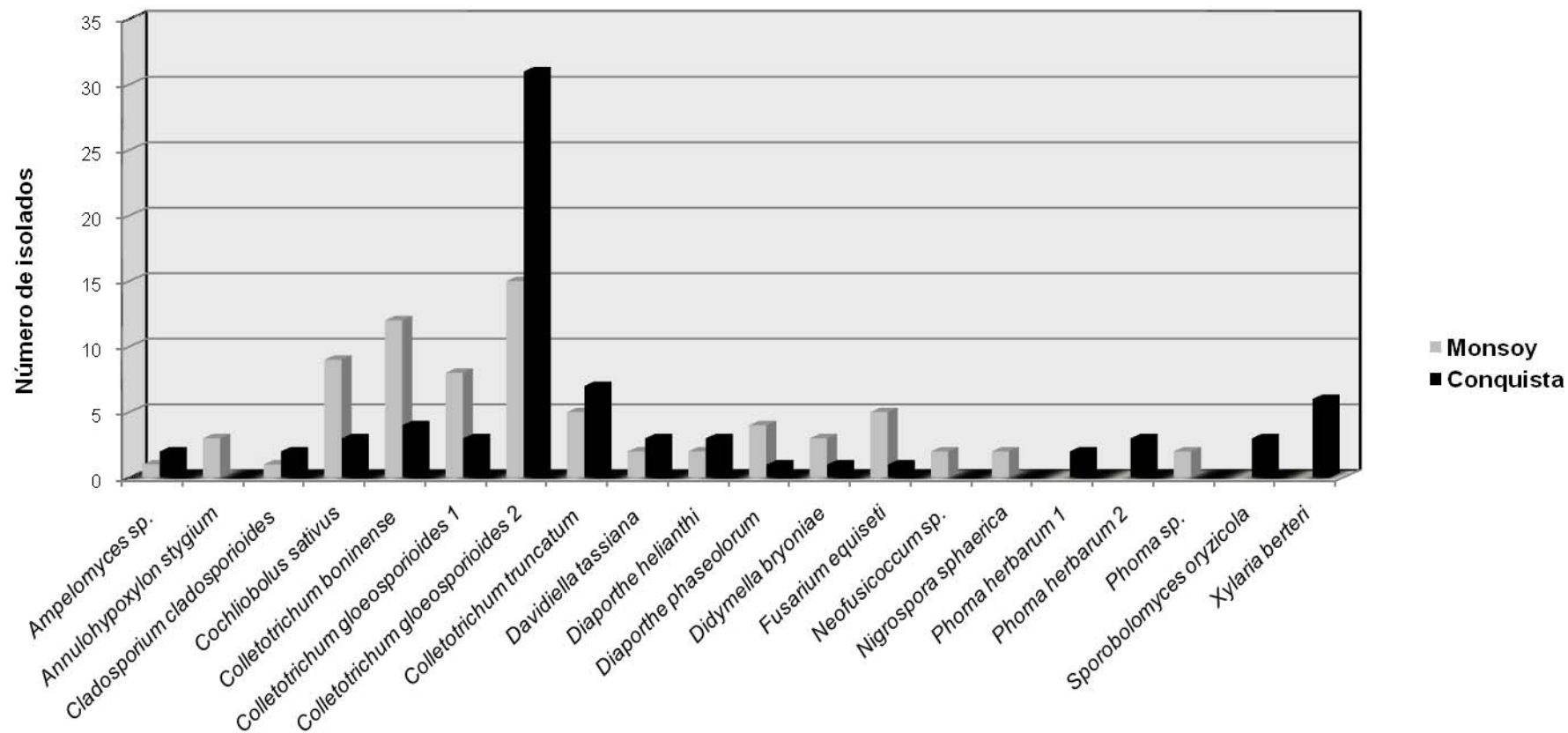


Figura 1. Número de isolados e seus respectivos taxa para as cultivares de soja Monsoy e Conquista analisadas. Foram incluídos apenas os taxa que apresentaram dois isolados ou mais para uma das cultivares.

O relacionamento filogenético dos isolados endofíticos é representado pela árvore consenso da maioria gerada pela análise Bayesiana para as cultivares Conquista (**Figura 2**) e Monsoy (**Figura 3**). Todos os isolados de fungos endofíticos encontrados para ambas as cultivares analisadas foram agrupados de acordo com a sua respectiva Ordem (quando definida), Classe e Filo.

O índice de diversidade de Shannon Wiener, o índice de diversidade de Simpson, a dominância de Simpson e a equitabilidade são evidenciados na **Tabela 2**. De acordo com os valores do índice de diversidade de Shannon Wiener, para a técnica de fragmentação do tecido não há diferença entre as cultivares Monsoy e Conquista, considerando os valores do desvio padrão. O mesmo resultado foi encontrado ao usarmos a técnica de cultivo por extinção para ambas as cultivares.

A riqueza de espécies encontradas usando a técnica de fragmentação do tecido foi maior do que a riqueza de espécies encontradas com a técnica de cultivo por extinção para as cultivares Monsoy ($25 > 10$) e Conquista ($31 > 12$) (**Tabela 2**). Todavia, a riqueza de espécies encontrada com uma única técnica de isolamento não foi equivalente à riqueza total de espécies para as cultivares analisadas.

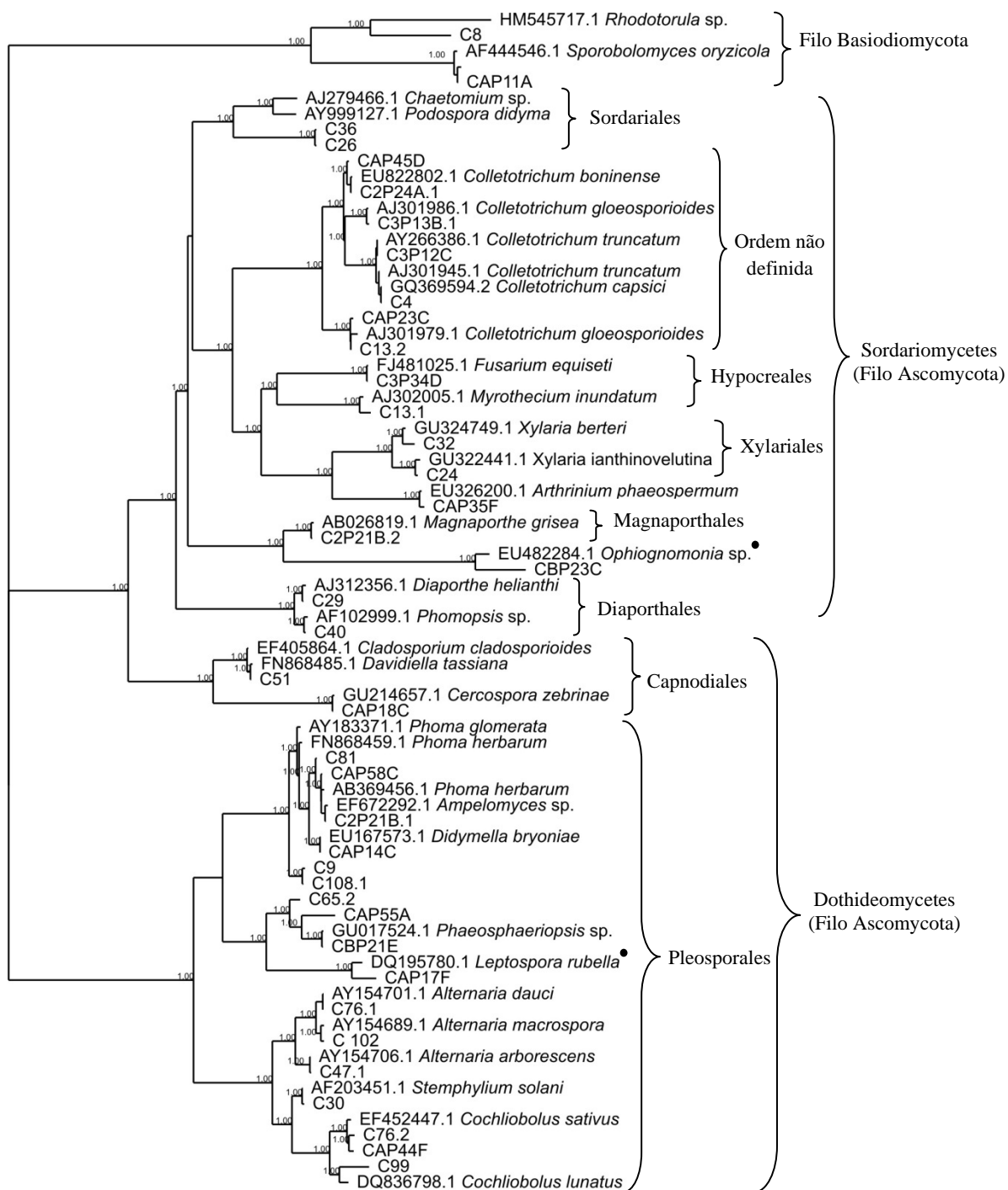
Uma vez que os valores referentes ao índice de diversidade de Simpson e à Dominância de Simpson foram mascarados pelos altos números de morfotipos obtidos utilizando a técnica de fragmentação do tecido para ambas as cultivares, não foi possível estabelecer uma comparação dessa técnica com a técnica de cultivo por extinção.

A equitabilidade encontrada para ambas as cultivares, independentemente da técnica utilizada, foi relativamente elevada, uma vez que os valores ficaram próximos a 1 (sendo 1, a equitabilidade máxima, quando há uma proporção similar de todas as espécies).

Tabela 2 – Número de morfotipos, riqueza de espécies e índices de diversidade utilizando as diferentes técnicas de isolamento para as cultivares Monsoy e Conquista.

Técnica de isolamento	Morfotipos (n)	Riqueza de espécies (i)	Equitabilidade ($E=H/H_{max}$)	Índice de Shannon Wiener (H)	Índice de Diversidade de Simpson (1- D)	Dominância de Simpson (D)
Fragmentação do tecido (M)	71	25	0,87	2,80 (S=0,11)	0,91	0,08 (S=0,01)
Fragmentação do tecido (C)	71	31	0,85	2,92 (S=0,14)	0,90	0,09 (S=0,02)
Cultivo por Extinção (M)	20	10	0,87	2,01 (S=0,20)	0,82	0,18 (S=0,05)
Cultivo por Extinção (C)	26	12	0,75	1,87 (S=0,24)	0,72	0,27 (S=0,08)
Monsoy Total	91	31	0,86	2,95 (S=0,10)	0,92	0,07 (S=0,01)
Conquista Total	97	37	0,80	2,90 (S=0,14)	0,87	0,12 (S=0,02)

Os números entre parênteses representam o desvio padrão dos dados. O desvio padrão do índice de diversidade de Simpson acompanha a variação dos valores da dominância de Simpson (D) dada pela fórmula (1-D).



0.1

Figura 2: Árvore filogenética obtida pela análise bayesiana usando a sequência nucleotídica da região ITS do rDNA de 38 isolados da cultivar Conquista e de 35 fungos depositados no GenBank (**ANEXO III**). Ao lado de cada nó ancestral é evidenciado, da esquerda para a direita, o valor de probabilidade a posteriori encontrado na árvore consenso da maioria. Os organismos assinalados com um círculo fechado (•) não apresentam sua ordem ainda definida, assim como os outros isolados. Os ramos que não apresentaram evidenciados seus valores de probabilidade são porque eram baixos, logo, foram omitidos.

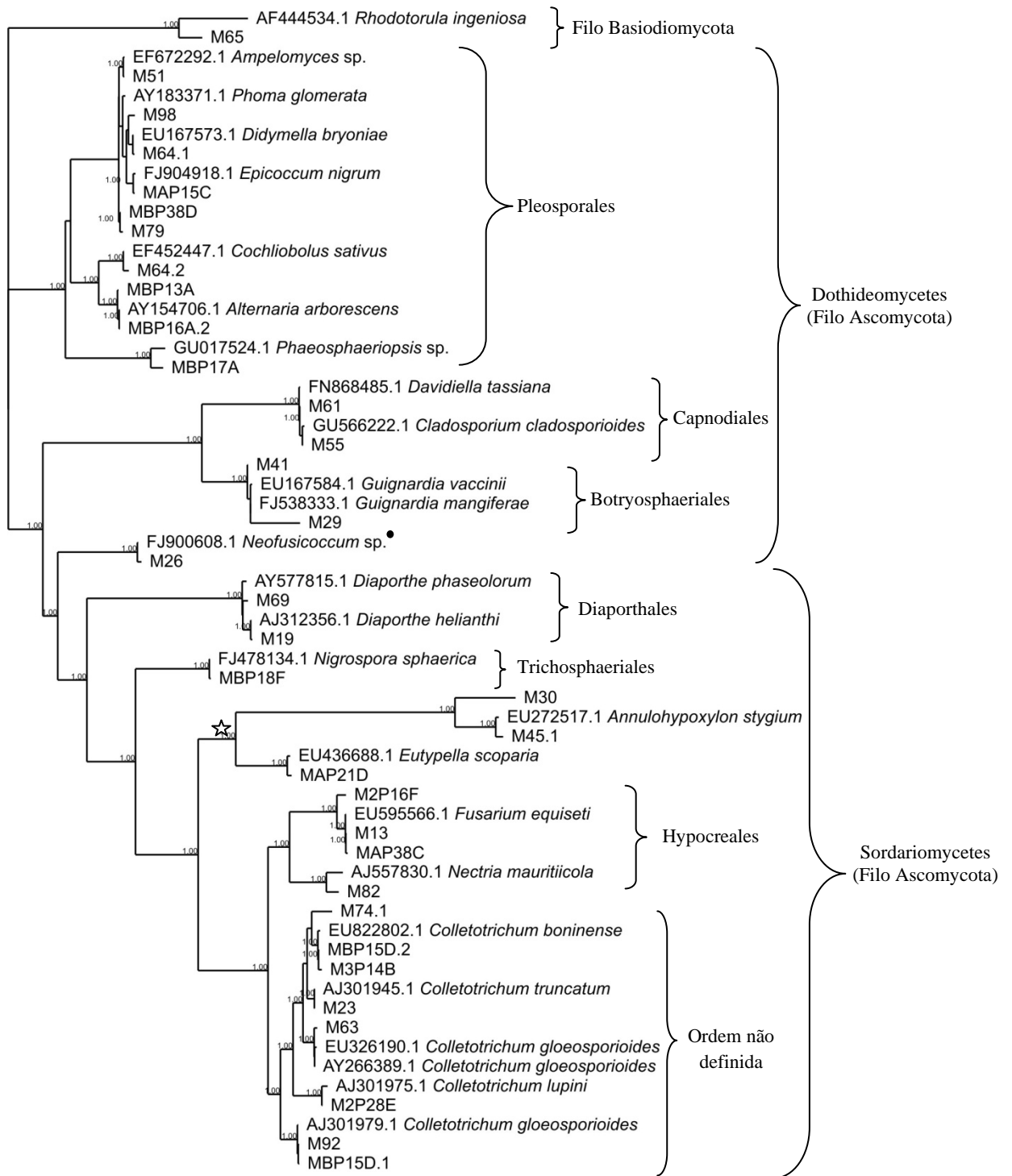


Figura 3: Árvore filogenética obtida pela análise bayesiana usando a sequência nucleotídica da região ITS do rDNA de 34 isolados da cultivar Monsoy e de 26 fungos retirados do GenBank (**ANEXO III**). Ao lado de cada nó ancestral é evidenciado, da esquerda para a direita, o valor de probabilidade a posteriori encontrado na árvore consenso da maioria. Os organismos assinalados com um círculo fechado (●) não apresentam sua ordem ainda definida, assim como os outros isolados. Os ramos que não apresentaram evidenciados seus valores de probabilidade são porque eram baixos, logo, foram omitidos. A estrela (☆) está inserida no ramo dos isolados que compõem a Ordem Xylariales.

5. DISCUSSÃO

A equitabilidade encontrada para ambas as cultivares foi elevada, uma vez que os valores ficaram próximos a 1, mesmo com a ocorrência de um pequeno número de espécies dominantes e um elevado número de espécies representadas por poucos isolados. Entretanto, a baixa equitabilidade na distribuição das espécies é um fenômeno comum a vários sistemas biológicos e é também comum na interação planta hospedeira e micro-organismo (Magurran, 1988; Frohlich *et al.*, 2000).

Isoladamente, nenhuma das duas técnicas conseguiu recuperar a riqueza de espécies total encontrada para ambas as cultivares Monsoy (31 espécies) e Conquista (37 espécies) (**Tabela 2**). Isto pode ser explicado pela presença de espécies representadas uma única vez (singletons), em que a ocorrência é meramente ao acaso, independentemente, da técnica utilizada.

O consórcio das técnicas de isolamento, como demonstrado no presente estudo e no trabalho de Unterseher e Schnittler (2009), parece ser o mais adequado para o isolamento de uma maior riqueza de espécies fúngicas, uma vez que as técnicas isoladamente não permitiram a recuperação da riqueza de espécies observada, em comparação quando as mesmas eram realizadas em conjunto.

De acordo com os valores encontrados para o índice de diversidade de Shannon Wiener, não há diferença no uso da técnica de fragmentação do tecido e da técnica de cultivo por extinção no isolamento de espécies de fungos endofíticos de folhas das cultivares Monsoy e Conquista. Esse resultado demonstra que os experimentos foram bem homogêneos quanto à sua amostragem e ao procedimento de isolamento para ambas as cultivares analisadas.

Entre as vantagens do uso de placas multipoços concomitante ao uso da técnica de cultivo por extinção, podemos citar: requer só uma única inspeção para a obtenção da colônia no final do período de incubação; a retenção das colônias em pequenos poços permite que o tempo de incubação seja estendido para revelar espécies de crescimento lento; a economia de tempo, uma vez que uma única placa permite uma observação rápida de centenas de colônias e uma razoável seleção de morfotipos; e a economia de recursos financeiros, uma vez que cada litro de meio de cultura preenche cerca de 20 placas multipoços e a prevenção da contaminação cruzada por fungos de crescimento

rápido (Collado *et al.*, 2007; Unterseher e Schnittler, 2009). Entretanto, para impedir essa contaminação cruzada, o tempo de incubação deve ser curto ou se faz necessário o uso de substâncias capazes de retardar o crescimento de fungos, como a ciclosporina A, dicloran e o rosa bengala (Bills *et al.*, 2004; Collado *et al.*, 2007).

A economia de recursos financeiros e a retenção das colônias em poços que impedem a contaminação cruzada também são uma vantagem da técnica de fragmentação do tecido feita em placas multipoços.

Nesse estudo, a taxa de colonização das placas multipoços, usando a técnica de cultivo por extinção, variou de 10 a 20 % de colonização, sendo os singletons os principais contribuidores para esta taxa. Esse valor foi inferior ao valor de 20 a 30 % do total de poços sugerido como sendo ótimo por Collado e colaboradores (2007). Isto significa que a técnica de cultivo por extinção tem a capacidade de obter uma comunidade menos similar e mais diversa de fungos endofíticos do tecido foliar, se compararmos a taxa de colonização usando a técnica de fragmentação do tecido, que, em nosso estudo, chegou ao valor de 90 % de colonização.

Este é um dos primeiros estudos a utilizar a técnica de cultivo por extinção para a obtenção da diversidade de fungos endofíticos. Todavia, apesar de o cultivo por extinção ser o melhor método para obter a maioria dos fungos saprófitas da serrapilheira de *Elaeocarpus dentatus* (Collado *et al.*, 2007), claramente são necessários novos estudos para padronizar a técnica. Esses estudos deveriam focar a modificação do meio de cultivo (primário x seletivo; rico x pobre), dado que a riqueza de espécies e sua abundância são afetadas pelo tipo de meio de cultura, o que influencia a interpretação na biodiversidade dos fungos endofíticos (Unterseher e Schnittler, 2009).

Novos testes devem ser conduzidos para a otimização da técnica de cultivo por extinção utilizando substâncias que retardam o crescimento de fungos ou a retirada completa do poço da placa multipoço contendo a espécie fúngica de crescimento rápido em meio de cultivo sem agente inibidor e, ou o uso de diferentes meios de cultura na obtenção de fungos endofíticos. Entretanto, o uso de agentes inibidores pode não somente retardar o crescimento de fungos, mas também selecionar os grupos de fungos endofíticos mais raros, omitindo as espécies dominantes (Arnold e Lutzoni 2007; Arnold, 2008).

Uma proporção desconhecida dos fungos endofíticos ainda não pode ser cultivada ou é somente obtida utilizando técnicas moleculares na análise de amostras ambientais. Essas espécies não cultiváveis podem incluir simbiontes obrigatórios, competidores pobres ou fungos que não conseguem explorar um meio de cultura em particular ou que os métodos atuais não conseguem isolar (Arnold 2007 e 2008).

Entre os gêneros de espécies isolados neste estudo, *Sporobolomyces*, *Xylaria*, *Phaeosphaeriopsis*, *Magnaporthe*, *Rhodotorula*, *Ampelomyces*, *Annulohyphoxylon*, *Hypoxylon*, *Cochliobolus (Bipolaris)*, *Guignardia*, *Leptospora* e *Ophiognomonina* nunca foram relacionados como ocorrendo endofiticamente e, ou encontrados em flores, folhas, caule ou sementes de soja. Entretanto, as outras espécies já foram relatadas (Miller e Roy, 1982; Sinclair, 1991; Roy *et al.*, 2001; Larran *et al.*, 2002; Pimentel *et al.*, 2006).

As espécies identificadas nesse estudo, que potencialmente poderiam causar doença na soja cultivada em território Brasileiro são: *Alternaria* sp. (mancha foliar de alternária), *Cercospora* sp. (crestamento foliar de cercóspera, mancha púrpura da semente, mancha “olho de rã”), *Colletotrichum truncatum* (antracnose), *Diaporthe phaseolorum* (cancro da haste), *Phomopsis* sp. (seca da haste e da vagem da soja), *Fusarium* spp. (seca da vagem e podridão vermelha da raiz), *Myrothecium* sp. (mancha foliar de mirotécio) e *Guignardia* sp. (anamorfo: *Phyllosticta*) (mancha foliar de filosticta) (Kimati *et al.*, 1997; Embrapa, 2008b). Apesar, de essas taxa serem relacionados a patógenos, isto não significa que eles sejam realmente patogênicos, uma vez que os postulados de Koch não foram testados.

Um estreito relacionamento filogenético é suportado por evidências taxonômicas entre endofíticos e patógenos. Frequentemente, os endofíticos são considerados espécies irmãs dos fitopatógenos em um mesmo hospedeiro ou dos fitopatógenos de uma espécie vegetal próxima (Carrol 1988; Rodriguez *et al.*, 2009b).

Um aspecto interessante do presente trabalho é a relativa ocorrência de isolamento dos mesmos taxa em ambas as cultivares. Essa ocorrência confirma o padrão de colonização preferencial do hospedeiro bem mais comum do que a exclusividade de ocorrência ou especificidade do endófito em relação ao hospedeiro (Lodge *et al.*, 1996; Zhou e Hyde 2001).

Os resultados encontrados corroboram o trabalho de Arnold e Lutzoni (2007), uma vez que as classes dos Dothideomycetes e dos Sordariomycetes representantes do Filo Ascomycota foram as mais abundantes. De acordo com os autores, essas Classes contêm mais do que 75 % dos fungos endofíticos encontrados em ambientes que variam do ártico à região tropical, embora sua abundância relativa em relação a outras Classes se altere em função da latitude.

Neste estudo, os gêneros *Rhodothorula* e *Sporobolomyces*, representantes do subfilo Pucciniomycotina, foram isolados pela primeira vez como endofíticos de soja. Embora pouco frequentes, alguns membros do Filo Basidiomycota, pertencentes aos subfilos Agaricomycotina, Pucciniomycotina e Ustilaginomycotina, também são relatados como endofíticos (Arnold, 2008; Hyde e Soyong, 2008; Rungjindamai *et al.*, 2008).

Há possibilidade de que isolados de fungos endofíticos do presente estudo incluam gêneros epifíticos, uma vez que a comunidade endofítica pode incluir espécies classificadas como epifíticas, como *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Epicoccum purpurascens*, entre outras, que, facultativamente, entram no tecido foliar durante o processo de senescência (Petrini, 1991).

Em ambas as cultivares, o gênero endofítico dominante foi *Colletotrichum*, seguido por *Cochliobolus* e *Fusarium* para a cultivar Monsoy e *Xylaria* e *Phoma* para a cultivar Conquista. A presença desses gêneros como dominantes são bem suportados em muitos trabalhos, nos quais os gêneros de fungos endofíticos largamente generalistas em plantas tropicais são *Colletotrichum*, *Xylaria*, *Phomopsis* e *Fusarium* (Arnold e Lutzoni, 2007), que tipicamente crescem de forma rápida e competitiva em meios não seletivos ou meios baseados em plantas, como é o caso do meio ágar, extrato de malte, utilizado em nosso estudo.

Gamboa e colaboradores (2002) evidenciaram que os gêneros de fungos endofíticos, isolados de cinco espécies vegetais de diferentes famílias, que dominavam as culturas, foram *Xylaria*, *Colletotrichum*, *Glomerella* e *Phomopsis*. Em plantas de café em Porto Rico, Santamaría e Bayman (2005) encontraram os gêneros *Colletotrichum*, *Xylaria* e *Guignardia*, como os dominantes.

Na Argentina, os fungos endofíticos do tecido foliar de soja encontrados com maior frequência foram as espécies *Alternaria alternata* e *Glomerella cingulata* (anamorfo: *Colletotrichum gloesporioides*), mas também foram isolados em menor frequência *Phomopsis sojae*, *Phomopsis* sp. e *Phomopsis longicolla* (Larran *et al.*, 2002).

As espécies do gênero *Colletotrichum* são normalmente classificadas como patógenos comuns, embora diferentes espécies possam expressar um estilo de vida mutualista em uma gama de plantas hospedeiras de clima tropical (Guo *et al.*, 2000). Os benefícios mutualistas conferidos pelas espécies de *Colletotrichum* incluem indução de resistência sistêmica a patógenos, a promoção de crescimento vegetal e uma maior tolerância à seca (Redman *et al.*, 1999; Redman *et al.*, 2001).

Xylaria é um gênero comum de decompositores de madeira largamente distribuído pelo mundo, sendo também comumente encontrado como endofítico (Lodge *et al.*, 1996; Frohlich *et al.*, 2000; Gamboa *et al.*, 2002; Santamaría e Bayman, 2005).

O gênero *Cochliobolus* (*Bipolaris*) é representado por espécies causadoras de doenças em trigo, cevada e milho (Kimati *et al.*, 1997). Por outro lado, os gêneros *Fusarium* e *Phoma* incluem espécies patogênicas, causadoras de um enorme número de doenças em plantas cultivadas e ao mesmo tempo apresentam espécies não patogênicas (Kimati *et al.*, 1997).

Na identificação dos isolados de fungos endofíticos encontrados nesse estudo e na realização da análise filogenética, foram utilizadas as sequências nucleotídicas referentes à região ITS do genoma desses organismos.

Em ambas as árvores filogenéticas evidenciadas neste estudo (**Figuras 2 e 3**), os nós ancestrais são robustos e sustentados pelo maior valor de probabilidade a posteriori, 1; sendo todos os isolados de fungos endofíticos, encontrados para ambas as cultivares analisadas, agrupados de acordo com a sua respectiva Ordem (quando definida), Classe e Filo em acordo com outros trabalhos que utilizam da região ITS para a análise filogenética (Arnold e Lutzoni, 2007; Huang *et al.*, 2009 ; Gazis e Chaverri, 2010).

Em micologia, a região ITS é a mais comumente sequenciada para a identificação de fungos ao nível de espécie, uma vez que mais de 100 000 sequências referentes à região ITS de fungos têm sido depositadas no GenBank desde os anos 90 (Nilsson *et al.*, 2009).

No estudo de fungos endofíticos, a sequência da região ITS é muito utilizada, pois provê uma excelente resolução de isolados fúngicos abaixo da categoria espécie para alguns dos taxa endofíticos mais comuns. Além disso, a facilidade com a qual a sequência da região ITS pode ser obtida e a existência de um amplo banco de dados da região ITS para isolados endofíticos da região ártica à tropical ressalvam a utilidade desta região para prover uma primeira aproximação da diferença genotípica entre os isolados endofíticos das mais distintas famílias de espécies vegetais ao redor do mundo (Arnold, 2007).

A identificação das espécies pela sequência da região ITS é de grande valia, mas pode obscurecer espécies crípticas, isto é, espécies com a mesma morfologia, cujo banco de dados é ainda incompleto para uma identificação molecular precisa e, além disso, as variações dentro e entre espécies podem não ser consistentes fazendo-se necessária uma análise filogenética utilizando múltiplos loci informativos (Arnold e Lutzoni, 2007; Nilsson *et al.*, 2008; Nilsson *et al.*, 2009).

O uso de fungos endofíticos como agentes para o controle biológico tem recebido atualmente bastante atenção (Bailey *et al.*, 2008; Hanada *et al.*, 2008; Mejía *et al.*, 2008). A soja, como verificado neste trabalho e em outros (Miller e Roy, 1982; Sinclair, 1991; Roy *et al.*, 2001; Larran *et al.*, 2002; Pimentel *et al.*, 2006), comporta uma alta diversidade morfológica de fungos endofíticos, o que sugere uma interação ecológica bastante complexa entre a soja e os fungos endofíticos.

A maioria das espécies encontradas neste estudo é conhecida como patógenos de plantas, saprófitas e como mutualistas “em potencial”. Independentemente da relação ecológica, todas elas podem ser testadas futuramente como agentes de controle biológico na indução de resistência sistêmica em plantas e na promoção de crescimento vegetal.

Entre as espécies de fungos endofíticos, que potencialmente poderiam ser utilizados no controle biológico de patógenos em soja, estão *Ampelomyces*, *Chaetomium* e *Phoma glomerata*.

Ampelomyces é um gênero que contém espécies consideradas micoparasitas de míldio pulverulento e já têm sido descritas como endofíticas de plantas (Aly *et al.*, 2008). A espécie mais comum é *Ampelomyces quisqualis*, cujo isolado denominado M-10 tem sido formulado como micofungicida, sendo muito comercializado para o controle de míldio

pulverulento em pepino, cenoura e manga (Sundheim, 1982; Paulitz e Bélanger, 2001; Kiss, 2003; Kaewchai *et al.*, 2009). Uma vez que a espécie de míldio pulverulento *Microsphaera diffusa* (anamorfo: *Oidium* sp) é um patógeno importante na cultura da soja no Brasil (Kimati *et al.*, 1997; Embrapa, 2008b), a utilização do gênero *Ampelomyces* como agente de controle biológico, isolado como endofítico nesse estudo, pode ser uma excelente alternativa.

As espécies de *Chaetomium* são encontradas normalmente no solo e em compostos orgânicos (Soytong *et al.*, 2001), sendo relatadas como antagonistas de vários patógenos de plantas, especialmente de patógenos do solo e patógenos veiculados pelas sementes (Dhingra *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005). No Brasil, a espécie *Chaetomium globosum* foi testada no controle do fitopatógeno de soja *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (agente causal do cancro da haste), tendo apresentado excelentes resultados (Dhingra *et al.*, 2003).

De modo similar à espécies do gênero *Ampelomyces*, a espécie *Phoma glomerata* tem sido identificada como micoparasita de míldio pulverulento em carvalho (Sullivan e White, 2000) e, além disso, produtora de epoxydon, uma substância capaz de controlar o patógeno de solo *Plasmodiophora brassicae*, agente causal da hérnia ou potra, em espécies da família Brassicaceae (Arie *et al.*, 1998).

Esse é o primeiro trabalho que utiliza a técnica de cultivo por extinção para o isolamento de fungos endofíticos de folhas de soja, contribuindo assim para o desenvolvimento e aprimoramento do uso dessa técnica em trabalhos futuros de isolamento de endofíticos.

6. CONCLUSÕES

- A Classe dos Dothideomycetes e a dos Sordariomycetes, representantes do Filo Ascomycota, contêm fungos endofíticos frequentes nas folhas de soja das cultivares Monsoy e Conquista. Por outro lado, representantes do Filo Basidiomycota são bastante raros, correspondendo a menos de 5 % dos isolados obtidos;
- Pelo menos 52 taxa de fungos são endofíticos de folha de soja;
- *Colletotrichum*, *Cochliobolus* e *Fusarium* são os três gêneros de fungos endofíticos mais frequentemente isolados da cultivar Monsoy, enquanto para a cultivar Conquista, os gêneros mais comuns são *Colletotrichum*, *Xylaria* e *Phoma*;
- A riqueza de espécies é maior quando se utilizam ambas as técnicas de isolamento para as cultivares Conquista e Monsoy;
- A diversidade de fungos endofíticos é semelhante para ambas as cultivares, utilizando a mesma técnica de isolamento;
- As espécies de fungos endofíticos representadas uma única vez (singletons) são as principais contribuidoras para a riqueza de espécies, independentemente da técnica de isolamento utilizada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida F, Cerqueira FM, Silva RDN, Ulhoa CJ, Lima AL (2007) Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: Evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters* 29 (8):1189-1193.
- Aly AH, Edrada-Ebel R, Wray V, Muller WE, Kozytska S, Hentschel U, Proksch P, Ebel R (2008) Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. *Phytochemistry* 69 (8):1716-1725.
- Araújo WL, Lima AOS, Azevedo JL, Marcon J, Kuklinsky-Sobral J, Lacava P (2002) Manual: Isolamento de microrganismos endofíticos. Esalq, Piracicaba, p. 86.
- Arie, Kobayashi, Okada, Kono, Yamaguchi (1998) Control of soilborne clubroot disease of cruciferous plants by epoxydon from *Phoma glomerata*. *Plant Pathology* 47 (6):743-748.
- Arnold AE (2007) Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: Progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* 21 (2-3):51-66.
- Arnold AE (2008) Endophytic fungi: Hidden components of tropical community ecology. In: Schnitzer SA, Carson WP (eds) Tropical forest community ecology Blackwell Scientific, pp 254-271.
- 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, Kyllö 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, Maccheroni Jr 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.
- 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 (1):24-35.
- Bayat F, Mirlohi A, Khodambashi M (2009) Effects of endophytic fungi on some drought tolerance mechanisms of tall fescue in a hydroponics culture. *Russian Journal of Plant Physiology* 56 (4):510-516.
- Bayman P (ed) (2007) Fungal endophytes. Environmental and microbial relationships - the Mycota iv, 2 edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Bills GF, Christensen M, Powell M, Thorn G (eds) (2004) Saprobic soil fungi. Biodiversity of fungi - Inventory and monitoring methods Elsevier Academic Press, Oxford.
- 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 (6) 584-592.
- Carrol G (1988) Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualist symbiont. *Ecology* 69 (1):2-9.
- Collado J, Platas G, Paulus B, Bills GF (2007) High-throughput culturing of fungi from plant litter by a dilution-to-extinction technique. *Fems Microbiology Ecology* 60 (3):521-533.
- Dhingra OD, Mizubuti ESG, Santana FM (2003) *Chaetomium globosum* for reducing primary inoculum of *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* in soil-surface soybean stubble in field conditions. *Biological Control* 26 (3):302-310.
- Dingle J, Mcgee PA (2003) Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in wheat. *Mycological Research* 107 (3):310-316.
- Elbersen HW, West CP (1996) Growth and water relations of field-grown tall fescue as influenced by drought and endophyte. *Grass & Forage Science* 51 (4):333-342.
- Embrapa (2008a) Tecnologias de produção de soja - Região Central do Brasil 2008 - Sistema de produção 12. Embrapa Soja, Londrina.
- Embrapa (2008b) Tecnologias de produção de soja - Região Central do Brasil 2009 e 2010 - Sistema de produção 13. Embrapa Soja, Londrina.

- Faeth SH, Fagan WF (2002) Fungal endophytes: Common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrative and Comparative Biology* 42 (2):360-368.
- Frohlich J, Hyde KD, Petrini O (2000) Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research* 104:1202-1212.
- Gamboa MA, Laureano S, Bayman P (2002) Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? *Mycopathologia* 156 (1):41-45.
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers enhanced specificity for Basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2:113-118.
- Gazis R, Chaverri P (2010) Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal Ecology* 3 (3):240-254.
- Guo LD, Hyde KD, Liew ECY (2000) Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytologist* 147 (3):617-630.
- Hamayun M, Khan SA, Kim HY, Chaudhary MF, Hwang YH, Shin DH, Kim IK, Lee BH, Lee IJ (2009) Gibberellin production and plant growth enhancement by newly isolated strain of *Scolecobasidium tshawytschae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (6):560-565.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4 (1):1-9.
- Hanada RE, de Jorge Souza T, Pomella AWW, Hebbbar 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 (11):1335-1343.
- Hata K, Atari R, Sone K (2002) Isolation of endophytic fungi from leaves of *Pasania edulis* and their within-leaf distributions. *Mycoscience* 43 (5):369-373.
- Hershkovitz MA, Lewis LA (1996) Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. *Molecular Biology and Evolution* 13 (9):1276-1295.

- Huang WJ, Cai YZ, Surveswaran S, Hyde KD, Corke H, Sun M (2009) Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. *Fungal Diversity* 36:69-88
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17 (8):754-755.
- Hyde KD, Soyong K (2008) The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 33:163-173.
- Joshee S, Paulus BC, Park D, Johnston PR (2009) Diversity and distribution of fungal foliar endophytes in New Zealand Podocarpaceae. *Mycological Research* 113:1003-1015.
- Kaewchai S, Soyong K, Hyde KD (2009) Mycofungicides and fungal biofertilizers. *Fungal Diversity* 38 (25-50).
- Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM (1997) Manual de fitopatologia vol 2: Doenças da plantas cultivadas. 3ª ed. Editora Agronômica Ceres., São Paulo -SP.
- Kiss L (2003) A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. *Pest Management Science* 59 (4):475-483.
- Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K (2008) Mega: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9 (4):299-306.
- Lacap DC, Hyde KD, Liew ECY (2003) An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity* 12:53-66.
- Larran S, Rollán C, Bruno Ángeles H, Alippi HE, Urrutia MI (2002) Nota corta: Endophytic fungi in healthy soybean leaves. *Invest Agr: Prod Veg* 17 (1):173-178.
- Li GH, Yu ZF, Li X, Wang XB, Zheng LJ, Zhang KQ (2007a) Nematicidal metabolites produced by the endophytic fungus *Geotrichum* sp. AI4. *Chemistry & Biodiversity* 4 (7):1520-1524.
- Li WC, Zhou J, Guo SY, Guo LD (2007b) Endophytic fungi associated with lichens in *Baihua mountain* of Beijing, China. *Fungal Diversity* 25:69-80.
- Lin X, Lu CH, Huang YJ, Zheng ZH, Su WJ, Shen YM (2007) Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: Isolation,

- identification and bioactivity. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 23 (7):1037-1040.
- Loayza-Alvarez P, White Jr JF, Gil N, Svenning J-C, Balslev H, Kristiansen T (2008) Light converts endosymbiotic fungus to pathogen, influencing seedling survival and host tree recruitment. *Nature Precedings*: hdl:10101/npre. 2008.1908.1: Posted 22 May 2008..
- Lodge DJ, Fisher PJ, Sutton BC (1996) Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia* 88 (5):733-738.
- Lovatelli C (2005) Perspectivas para soja em 2020. Palestra apresentada no Congresso IASC Mumbai. Abiove - Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais.
- Maccheroni Jr W, Azevedo JL (1998) Synthesis and secretion of phosphatases by endophytic isolates of *Colletotrichum musae* grown under conditions of nutritional starvation. *The Journal of General Applied Microbiology* 44 (6):381-387.
- Magurran AE (1988) Ecological diversity and its measurement . Princeton University Press, Princeton.
- Marquez LM, Redman RS, Rodriguez RJ, Roossinck MJ (2007) A virus in a fungus in a plant: Three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* 315 (5811):513-515.
- 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 (1):4-14.
- Miller WA, Roy KW (1982) Mycoflora of soybean leaves, pods and seeds in mississippi. *Canadian Journal of Botany* 60:2716-2723.
- Muller CB, Krauss J (2005) Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current Opinion in Plant Biology* 8 (4):450-456.
- Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson K, shy, Henrik (2008) Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics* 2008 (4):193-201.
- Nilsson RH, Ryberg M, Abarenkov K, Sjakvist E, Kristiansson E (2009) The ITS region as a target for characterization of fungal communities using

- emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiology Letters* 296 (1):97-101.
- Nylander JAA (2004) Mrmodeltestv2. Program distributed by the author. . Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden.
- Park J-H, Choi GJ, Jang KS, Lim HK, Kim HT, Cho KY, Kim J-C (2005) Antifungal activity against plant pathogenic fungi of chaetoviridins isolated from *Chaetomium globosum*. *FEMS Microbiology Letters* 252 (2):309-313.
- Paulitz TC, Bélanger RR (2001) Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology* 39 (1):103-133.
- Paulus B, Gadek P, Hyde KD (2003) Estimation of microfungal diversity in tropical rainforest leaf litter using particle filtration: The effects of leaf storage and surface treatment. *Mycological Research* 107 (6):748-756.
- Pereira JO (1993) Fungos endofíticos de hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish*. Esalq/USP, Piracicaba, p. 105.
- Petrini O (1991) Fungal endophytes of tree leaves. Microbial ecology of leaves. Springer Verlag, New York.
- Pimentel IC, Glienke-Blanco C, Gabardo J, Stuart RM, Azevedo JL (2006) Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49 (5):705-711.
- Prompttha I, Hyde K, McKenzie E, Peberdy J, Lumyong S (2010) Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes? *Fungal Diversity* 41 (1):89-99.
- Prompttha I, Lumyong S, Dhanasekaran V, McKenzie EH, Hyde KD, Jeewon R (2007) A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology* 53 (4):579-590.
- Rakotoniriana EF, Munaut F, Decock C, Randriamampionona D, Andriambololoniaina M, Rakotomalala T, Rakotonirina EJ, Rabemanantsoa C, Cheuk K, Ratsimamanga SU, Mahillon J, El-Jaziri M, Quetin-Leclercq J, Corbisier AM (2008) Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: Occurrence and potential interactions within leaves. *Antonie Van Leeuwenhoek* 93 (1-2):27-36.

- Redman RS, Dunigan DD, Rodriguez RJ (2001) Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: Who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist* 151 (3):705-716.
- Redman RS, Ranson JC, Rodriguez RJ (1999) Conversion of the pathogenic fungus *Colletotrichum magna* to a nonpathogenic, endophytic mutualist by gene disruption. *Molecular Plant Microbe Interactions* 12 (11):969-975.
- Redman RS, Sheehan KB, Stout RG, Rodriguez RJ, Henson JM (2002) Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* 298 (5598):1581-1581.
- Rodriguez RJ, Freeman DC, McArthur ED, Kim YO, Redman RS (2009a) Symbiotic regulation of plant growth, development and reproduction. *Communicative & Integrative Biology* 2 (2):141-143.
- Rodriguez RJ, Jr JFW, Arnold AE, Redman RS (2009b) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182 (2):314-330.
- Roy KW, Baird RE, Abney TS (2001) A review of soybean (*Glycine max*) seed, pod, and flower mycofloras in North America, with methods and a key for identification of selected fungi. *Mycopathologia* 150 (1):15-27.
- Rungjindamai N, Pinruan U, Choeyklin R, Hattori T, Jones EBG (2008) Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*, in Thailand. *Fungal Diversity* 33:133-161.
- Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan TJ (1998) Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29 (1):319-343.
- Sánchez Marquéz S, Bills GF, Zabalgoageazcoa I (2007) The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Diversity* 27:171-195.
- Santamaría J, Bayman P (2005) Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology* 50:1-8.
- Schulz B, Boyle C (2005) The endophytic continuum. *Mycological Research* 109 (6):661-686.

- Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert A-K, Krohn K (2002) Endophytic fungi: A source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106 (09):996-1004.
- Schulz B, Römmert A-K, Dammann U, Aust H-J, Strack D (1999) The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research* 103 (10):1275-1283.
- Sediyama T (2009) Tecnologias de produção e usos da soja. Editora Mecnas, Londrina, p. 314.
- Sieber TN (2007) Endophytic fungi in forest trees: Are they mutualists? *Fungal Biology Reviews* 21 (2-3):75-89.
- Sinclair JB (1991) Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. *Plant Disease* 75 (3):220-224.
- Sirrenberg A, Gobel C, Grond S, Czempinski N, Ratzinger A, Karlovsky P, Santos P, Feussner I, Pawlowski K (2007) *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. *Physiologia Plantarum* 131 (4):581-589.
- Soytong K, kanokmedhakul S, Kukongviriyapan V, Isobe M (2001) Application of *Chaetomium* species (ketomium®) as a new broad spectrum biological fungicide for plant disease control: A review article. *Fungal Diversity* 7:1-15.
- Stone JK, Polishook JD, White-Jr JF (eds) (2004) Endophytic fungi Biodiversity of fungi - Inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press, Oxford.
- Strobel GA (2003) Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection* 5 (6):535-544.
- Strobel GA (2006) Harnessing endophytes for industrial microbiology. *Current Opinion in Microbiology* 9 (3):240-244.
- Strobel GA, Dirkse E, Sears J, Markworth C (2001) Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology-Sgm* 147:2943-2950.
- Sullivan RF, White JF, Jr. (2000) *Phoma glomerata* as a mycoparasite of powdery mildew. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (1):425-427.

- Sundheim L (1982) Control of cucumber powdery mildew by the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* and fungicides. *Plant Pathology* 31 (3):209-214.
- Suryanarayanan TS, Wittlinger SK, Faeth SH (2005) Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. *Mycological Research* 109 (5):635-639.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) Mega4: Molecular evolutionary genetics analysis (Mega) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24 (8):1596-1599.
- Unterseher M, Schnittler M (2009) Dilution to extinction cultivation of leaf inhabiting endophytic fungi in beech (*Fagus sylvatica* L.) - different cultivation techniques influence fungal biodiversity assessment. *Mycological Research* 113 (5):645-654.
- Vazquez-Garciduenas S, Leal-Morales CA, Herrera-Estrella A (1998) Analysis of the beta -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (4):1442-1446.
- Vega FE (2008) Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 98 (3):277-279.
- Wang B, Priest MJ, Davidson A, Brubaker CL, Woods MJ, Burdon JJ (2007) Fungal endophytes of native *Gossypium* species in Australia. *Mycological Research* 111 (3):347-354.
- White Jr JF, Torres MS (2010) Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? *Physiologia Plantarum* 138 (4):440-446.
- White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, New York.
- Yang Z, Rannala B (1997) Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: A Markov Chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution* 14 (7):717-724.
- Zhang DX, Nagabhyru P, Schardl CL (2009a) Regulation of a chemical defense against herbivory produced by symbiotic fungi in grass plants. *Plant Physiology* 150 (2):1072-1082.
- Zhang HW, Song YC, Tan RX (2006) Biology and chemistry of endophytes. *Nature Product Reports* 23 (5):753-771.

Zhang Y, Mu J, Feng Y, Kang Y, Zhang J, Gu PJ, Wang Y, Ma LF, Zhu YH (2009b) Broad-spectrum antimicrobial epiphytic and endophytic fungi from marine organisms: Isolation, bioassay and taxonomy. *Marine Drugs* 7 (2):97-112.

Zhou D, Hyde KD (2001) Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. *Mycological Research* 105 (12):1449-1457.

ANEXO I - Morfotipos isolados das cultivares de soja Conquista e Monsoy

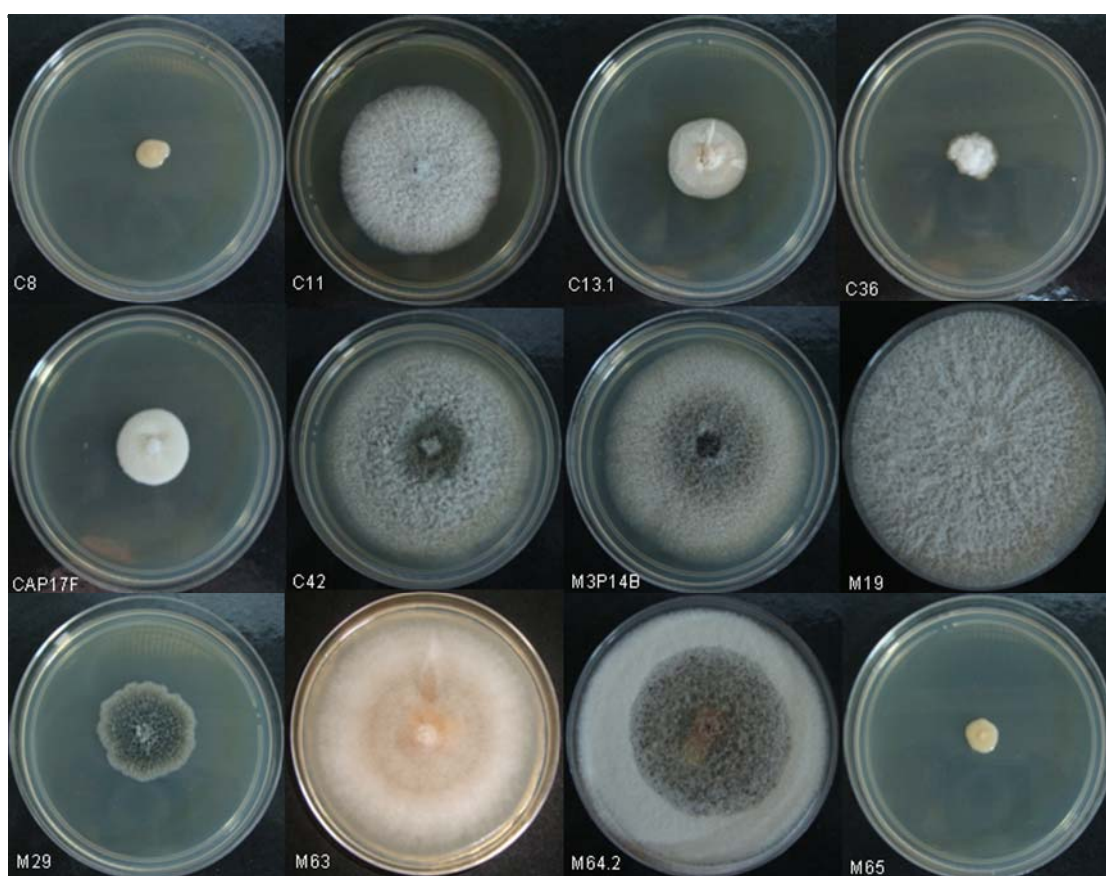


Figura 1A. Morfotipos isolados das cultivares Conquista e Monsoy crescidos por 12 dias em meio YMC. De C8 a C42, morfotipos da cultivar Conquista (C8 - *Rhodotorula* sp.; C11 - *Colletotrichum truncatum*; C13.1 - *Myrothecium inundatum*; C36 - *Chaetomium* sp.; CAP17F - *Leptospora rubella* e C42 - *Colletotrichum gloeosporioides*). De M3P14B a M65, morfotipos da cultivar Monsoy (M3P14B - *Colletotrichum boninense*; M19 - *Diaporthe helianthi*; M29 - *Guignardia mangiferae*; M63 - *Colletotrichum gloeosporioides*; M64.2 - *Cochliobolus sativus* e M65 - *Rhodotorula ingeniosa*).

ANEXO II - Identificação dos isolados obtidos pela técnica de fragmentação do tecido e pela técnica de cultivo por extinção utilizando a ferramenta Blastn do GenBank

1A. Identificação dos isolados das cultivares Monsoy e Conquista obtidos pela técnica de fragmentação do tecido utilizando a ferramenta

Isolados fúngicos	Cobertura	Identidade	Número de Acesso no GenBank
<i>arborescens</i> C47.1	99%	99%	<i>Alternaria arborescens</i> AY154706.1
<i>dauci</i> C76.1	98%	99%	<i>Alternaria dauci</i> AY154701.1
<i>macrospora</i> C102	99%	98%	<i>Alternaria macrospora</i> AY154689.1
<i>ampelomyces</i> sp. C81	95%	99%	<i>Ampelomyces</i> sp. EF672292.1
<i>ampelomyces</i> sp. C34	96%	99%	<i>Ampelomyces</i> EF672292.1
<i>chaetomium</i> sp. C36	98%	83%	<i>Chaetomium</i> sp. AJ279466.1
<i>cladosporioides</i> C3P53A	99%	98%	<i>Cladosporium cladosporioides</i> EF405864.1
<i>cladosporioides</i> C15	99%	99%	<i>Cladosporium cladosporioides</i> EF405864.1
<i>colocasiae</i> C48	98%	99%	<i>Cladosporium colocasiae</i> FJ216453.1
<i>cochliobolus</i> C99	98%	94%	<i>Cochliobolus lunatus</i> DQ836798.1
<i>cochliobolus</i> C76.2	96%	98%	<i>Cochliobolus sativus</i> EF452447.1
<i>boninense</i> C2P21F	99%	99%	<i>Colletotrichum boninense</i> EU822802.1
<i>boninense</i> C2P24A.1	100%	99%	<i>Colletotrichum boninense</i> EU822802.1
<i>capsici</i> C3P12C	99%	100%	<i>Colletotrichum capsici</i> GQ369594.2
<i>gloeosporioides</i> C13.2	100%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> C14	100%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> C19	100%	100%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> C35	100%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> C3P13B.1	99%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301986.1
<i>gloeosporioides</i> C3P33F	99%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> C3P47C	100%	98%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> C42	99%	98%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> C43	99%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301986.1
<i>gloeosporioides</i> C44.1	99%	97%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> C44.2	98%	98%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> C53	100%	98%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> C54	100%	98%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> C60	99%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> C94	82%	98%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> C96	99%	98%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> C1	100%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301986.1
<i>gloeosporioides</i> C7	98%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> C88.1	99%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> C88.2	99%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> C91.1	100%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>truncatum</i> C11	98%	98%	<i>Colletotrichum truncatum</i> AJ301945.1
<i>truncatum</i> C3P14A	100%	99%	<i>Colletotrichum truncatum</i> AJ301945.1
<i>truncatum</i> C3P17A	100%	98%	<i>Colletotrichum truncatum</i> AJ301945.1
<i>truncatum</i> C3P24D	99%	99%	<i>Colletotrichum truncatum</i> AY266386.1
<i>truncatum</i> C4	100%	100%	<i>Colletotrichum truncatum</i> AJ301945.1
<i>truncatum</i> C89	100%	98%	<i>Colletotrichum truncatum</i> AJ301945.1
<i>truncatum</i> C3P36D	99%	99%	<i>Colletotrichum truncatum</i> AJ301945.1

2A. Identificação dos isolados das cultivares Monsoy e Conquista obtidos pela técnica de fragmentação do tecido utilizando a ferramenta			
Isolados fúngicos	Cobertura	Identidade	Número de Acesso no GenBank
<i>Davidiella tassiana</i> C51	98%	99%	<i>Davidiella tassiana</i> FN868485.1
<i>Davidiella tassiana</i> C2P35A	99%	99%	<i>Davidiella tassiana</i> FN868485.1
<i>Davidiella tassiana</i> C23	99%	99%	<i>Davidiella tassiana</i> FN868485.1
<i>Diaporthe helianthi</i> C29	97%	99%	<i>Diaporthe helianthi</i> AJ312356.1
<i>Diaporthe helianthi</i> C6	98%	98%	<i>Diaporthe helianthi</i> AJ312356.1
<i>Diaporthe helianthi</i> C62	97%	97%	<i>Diaporthe helianthi</i> AJ312356.1
<i>Diaporthe phaseolorum</i> C3P17B	98%	98%	<i>Diaporthe phaseolorum</i> FJ441609.1
<i>Fusarium equiseti</i> C3P34D	98%	99%	<i>Fusarium equiseti</i> FJ481025.1
<i>Magnaporthe grisea</i> C2P21B.2	98%	98%	<i>Magnaporthe grisea</i> AB026819.1
<i>Myrothecium inundatum</i> C13.1	99%	93%	<i>Myrothecium inundatum</i> AJ302005.1
<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.C65.2	97%	92%	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.GU017524.1
<i>Phoma glomerata</i> C9	99%	95%	<i>Phoma glomerata</i> AY183371.1
<i>Phoma herbarum</i> C108.1	100%	95%	<i>Phoma herbarum</i> FN868459.1
<i>Phoma herbarum</i> C28.4	99%	95%	<i>Phoma herbarum</i> FN868459.1
<i>Phoma herbarum</i> C2P21B.1	95%	99%	<i>Phoma herbarum</i> AB369456.1
<i>Phoma herbarum</i> C61	98%	95%	<i>Phoma herbarum</i> FN868459.1
<i>Phomopsis</i> sp. C40	98%	99%	<i>Phomopsis</i> sp. AF102999.1
<i>Podospora didyma</i> C26	99%	83%	<i>Podospora didyma</i> AY999127.1
<i>Rhodotorula</i> sp.C8	80%	83%	<i>Rhodotorula</i> sp.HM545717.1
<i>Sporobolomyces oryzicola</i> C18	96%	98%	<i>Sporobolomyces oryzicola</i> AF444546.1
<i>Sporobolomyces oryzicola</i> C67	95%	99%	<i>Sporobolomyces oryzicola</i> AF444546.1
<i>Stemphylium solani</i> C30	96%	99%	<i>Stemphylium solani</i> AF203451.1
<i>Xylaria berteri</i> C28	95%	98%	<i>Xylaria berteri</i> GU324749.1
<i>Xylaria berteri</i> C28.1	95%	98%	<i>Xylaria berteri</i> GU324749.1
<i>Xylaria berteri</i> C2P24A.2	94%	96%	<i>Xylaria berteri</i> GU324749.1
<i>Xylaria berteri</i> C32	94%	98%	<i>Xylaria berteri</i> GU324749.1
<i>Xylaria berteri</i> C80	95%	98%	<i>Xylaria berteri</i> GU324749.1
<i>Xylaria berteri</i> C86	92%	97%	<i>Xylaria berteri</i> GU324749.1
<i>Xylaria ianthinovelutina</i> C24	95%	97%	<i>Xylaria ianthinovelutina</i> GU322441.1
<i>Ampelomyces</i> sp.M51	96%	99%	<i>Ampelomyces</i> sp.EF672292.1
<i>Annulohypoxyton stygium</i> M45	92%	98%	<i>Annulohypoxyton stygium</i> EU272517.1
<i>Annulohypoxyton stygium</i> M60	86%	97%	<i>Annulohypoxyton stygium</i> EU272517.1
<i>Annulohypoxyton stygium</i> M78.2	95%	95%	<i>Annulohypoxyton stygium</i> EU272517.1
<i>Cladosporium cladosporioides</i> M61	95%	100%	<i>Cladosporium cladosporioides</i> GU566222.1
<i>Cochliobolus sativus</i> M15	96%	95%	<i>Cochliobolus sativus</i> EF452447.1
<i>Cochliobolus sativus</i> M20	97%	97%	<i>Cochliobolus sativus</i> EF452447.1
<i>Cochliobolus sativus</i> M21	97%	97%	<i>Cochliobolus sativus</i> EF452447.1
<i>Cochliobolus sativus</i> M54	98%	96%	<i>Cochliobolus sativus</i> EF452447.1
<i>Cochliobolus sativus</i> M64.2	97%	97%	<i>Cochliobolus sativus</i> EF452447.1
<i>Cochliobolus sativus</i> M73	97%	97%	<i>Cochliobolus sativus</i> EF452447.1
<i>Cochliobolus sativus</i> M8.2	97%	97%	<i>Cochliobolus sativus</i> EF452447.1
<i>Cochliobolus sativus</i> M90	95%	97%	<i>Cochliobolus sativus</i> EF452447.1
<i>Cochliobolus sativus</i> M94	96%	96%	<i>Cochliobolus sativus</i> EF452447.1
<i>Colletotrichum boninense</i> M25	100%	99%	<i>Colletotrichum boninense</i> EU822802.1
<i>Colletotrichum boninense</i> M36	99%	99%	<i>Colletotrichum boninense</i> EU822802.1
<i>Colletotrichum boninense</i> M3P11A	99%	98%	<i>Colletotrichum boninense</i> EU822802.1

3A. Identificação dos isolados das cultivares Monsoy e Conquista obtidos pela técnica de fragmentação do tecido utilizando a ferramenta

Isolados fúngicos	Cobertura	Identidade	Número de Acesso no GenBank
<i>boninense</i> M3P14B	100%	100%	<i>Colletotrichum boninense</i> EU822802.1
<i>boninense</i> M45	100%	98%	<i>Colletotrichum boninense</i> EU822802.1
<i>fragariae</i> M43	98%	95%	<i>Colletotrichum fragariae</i> AJ301912.1
<i>gloeosporioides</i> M10	98%	98%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> M100	99%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> M101	99%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> M31	98%	100%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> M32.1	97%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301986.1
<i>gloeosporioides</i> M37	98%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> M3P46F	100%	100%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301986.1
<i>gloeosporioides</i> M3P52A.1	99%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> M45	100%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301986.1
<i>gloeosporioides</i> M47	98%	98%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> EU326190.1
<i>gloeosporioides</i> M56	94%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> M6	99%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> M63	99%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AY266389.1
<i>gloeosporioides</i> M66	99%	98%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AY266389.1
<i>gloeosporioides</i> M68.1	97%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> M68.2	98%	98%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> M74.1	98%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AY266402.1
<i>gloeosporioides</i> M80	100%	98%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301986.1
<i>gloeosporioides</i> M86	98%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301986.1
<i>gloeosporioides</i> M88	98%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> M92	100%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>gloeosporioides</i> M93	98%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>lupini</i> M2P28E	100%	99%	<i>Colletotrichum lupini</i> AJ301975.1
<i>truncatum</i> M23	98%	100%	<i>Colletotrichum truncatum</i> AY266386.1
<i>truncatum</i> M2P13E	99%	99%	<i>Colletotrichum truncatum</i> AJ301945.1
<i>truncatum</i> M2P53F	99%	98%	<i>Colletotrichum truncatum</i> AJ301945.1
<i>truncatum</i> M3P55F	97%	99%	<i>Colletotrichum truncatum</i> AJ301945.1
<i>truncatum</i> M85	99%	99%	<i>Colletotrichum truncatum</i> AJ301945.1
<i>tassiana</i> M44	100%	98%	<i>Davidiella tassiana</i> FN868485.1
<i>tassiana</i> M55	99%	99%	<i>Davidiella tassiana</i> FN868485.1
<i>helianthi</i> M19	95%	99%	<i>Diaporthe helianthi</i> AJ312356.1
<i>helianthi</i> M48.1	81%	95%	<i>Diaporthe helianthi</i> AJ312366.1
<i>phaseolorum</i> M39	99%	96%	<i>Diaporthe phaseolorum</i> AY577815.1
<i>phaseolorum</i> M3P22C	99%	97%	<i>Diaporthe phaseolorum</i> AY577815.1
<i>phaseolorum</i> M40	98%	97%	<i>Diaporthe phaseolorum</i> AY577815.1
<i>phaseolorum</i> M69	98%	98%	<i>Diaporthe phaseolorum</i> AY577815.1
<i>bryoniae</i> M64.1	100%	99%	<i>Didymella bryoniae</i> EU167573.1
<i>bryoniae</i> M62	97%	99%	<i>Didymella bryoniae</i> EU167573.1
<i>bryoniae</i> M89	98%	99%	<i>Didymella bryoniae</i> EU167573.1
<i>equiseti</i> M13	99%	99%	<i>Fusarium equiseti</i> EU595566.1
<i>proliferatum</i> M2P16F	99%	98%	<i>Fusarium proliferatum</i> FN868470.1
<i>equiseti</i> M42	99%	99%	<i>Fusarium equiseti</i> EU595566.1
<i>guignardia mangiferae</i> M29	94%	99%	<i>Guignardia mangiferae</i> FJ538333.1

4A. Identificação dos isolados das cultivares Monsoy e Conquista obtidos pela técnica de fragmentação do tecido utilizando a ferramenta

s fúngicos	Cobertura	Identidade	Número de Acesso no GenBank
<i>Guignardia vaccinii</i> M41	99%	98%	<i>Guignardia vaccinii</i> EU167584.1
<i>Hypoxylon</i> sp.M30	97%	88%	<i>Hypoxylon</i> sp.AB462753.1
<i>Nectria mauritiicola</i> M82	100%	91%	<i>Nectria mauritiicola</i> AJ557830.1
<i>Neofusicoccum</i> sp.M26	77%	99%	<i>Neofusicoccum</i> sp.FJ900608.1
<i>Neofusicoccum</i> sp.M28	76%	99%	<i>Neofusicoccum</i> sp.FJ900608.1
<i>Phoma glomerata</i> M98	98%	96%	<i>Phoma glomerata</i> AY183371.1
<i>Phoma</i> sp. M79	99%	98%	<i>Phoma</i> sp. FJ450059.1
<i>Rhodotorula ingeniosa</i> M65	95%	82%	<i>Rhodotorula ingeniosa</i> AF444534.1

Tabela 5A. Identificação dos isolados das cultivares Monsoy e Conquista obtidos pela técnica de cultivo por extinção utilizando a ferramenta BLAST

Isolados fúngicos	Cobertura	Identidade	Número de Acesso no GenBank
<i>Cercospora zebrinae</i> CAP18C	100%	99%	<i>Cercospora zebrinae</i> GU214657.1
<i>Cochliobolus sativus</i> CAP33B	96%	96%	<i>Cochliobolus sativus</i> EF452447.1
<i>Cochliobolus sativus</i> CAP44F	97%	97%	<i>Cochliobolus sativus</i> EF452447.1
<i>Colletotrichum boninense</i> CAP44C	100%	99%	<i>Colletotrichum boninense</i> EU822802.1
<i>Colletotrichum boninense</i> CAP45D	100%	99%	<i>Colletotrichum boninense</i> EU822802.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CAP21B	100%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CAP22B	99%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CAP23B	98%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CAP23C	100%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CAP23F	98%	98%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CAP27B	100%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CAP38F	99%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CAP42B	100%	98%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CAP46D	99%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CAP53D	98%	98%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CAP55D	99%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CBP28C	100%	99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> CBP55A	100%	98%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> AJ301979.1
<i>Didymella bryoniae</i> CAP14C	98%	99%	<i>Didymella bryoniae</i> EU167573.1
<i>Leptospora rubella</i> CAP17F	89%	92%	<i>Leptospora rubella</i> DQ195780.1
<i>Ophiognomonium sp.</i> CBP23C	89%	90%	<i>Ophiognomonium sp.</i> EU482284.1
<i>Phaeosphaeriopsis sp.</i> CAP55A	96%	92%	<i>Phaeosphaeriopsis sp.</i> GU017524.1
<i>Phaeosphaeriopsis sp.</i> CBP21E	98%	99%	<i>Phaeosphaeriopsis sp.</i> GU017524.1
<i>Phoma herbarum</i> CAP58C	89%	99%	<i>Phoma herbarum</i> AB369456.1
<i>Sporobolomyces oryzae</i> CAP11A	95%	99%	<i>Sporobolomyces oryzae</i> AF444546.1
<i>Alternaria arborescens</i> MBP16A.2	99%	99%	<i>Alternaria arborescens</i> AY154706.1
<i>Alternaria sp.</i> MBP13A	100%	100%	<i>Alternaria sp.</i> AY154699.1
<i>Colletotrichum boninense</i> MBP15D.2	100%	99%	<i>Colletotrichum boninense</i> EU822802.1
<i>Colletotrichum boninense</i> MBP16C.1	99%	99%	<i>Colletotrichum boninense</i> EU822802.1
<i>Colletotrichum boninense</i> MBP16C.2	99%	99%	<i>Colletotrichum boninense</i> EU822802.1
<i>Colletotrichum boninense</i> MBP17D	100%	99%	<i>Colletotrichum boninense</i> EU822802.1
<i>Colletotrichum boninense</i> MBP53A	100%	98%	<i>Colletotrichum boninense</i> EU822802.1
<i>Colletotrichum boninense</i> MBP55A	99%	99%	<i>Colletotrichum boninense</i> EU822802.1
<i>Colletotrichum boninense</i> MBP56B	99%	99%	<i>Colletotrichum boninense</i> EU822802.1
<i>Colletotrichum boninense</i> MBP15D.1	99%	99%	<i>Colletotrichum boninense</i> AJ301979.1
<i>Colletotrichum boninense</i> MBP18C	99%	98%	<i>Colletotrichum boninense</i> AJ301979.1
<i>Epicoccum nigrum</i> MAP15C	99%	99%	<i>Epicoccum nigrum</i> FJ904918.1
<i>Eutypella scoparia</i> MAP21D	99%	97%	<i>Eutypella scoparia</i> EU436688.1
<i>Fusarium equiseti</i> MAP35C	98%	99%	<i>Fusarium equiseti</i> EU595566.1
<i>Fusarium equiseti</i> MAP38C	100%	99%	<i>Fusarium equiseti</i> EU595566.1
<i>Fusarium equiseti</i> MBP21D	99%	99%	<i>Fusarium equiseti</i> FJ481025.1
<i>Nigrospora sphaerica</i> MBP13D	97%	99%	<i>Nigrospora sphaerica</i> FJ478134.1
<i>Nigrospora sphaerica</i> MBP18F	98%	99%	<i>Nigrospora sphaerica</i> FJ478134.1
<i>Phaeosphaeriopsis sp.</i> MBP17A	97%	92%	<i>Phaeosphaeriopsis sp.</i> GU017524.1
<i>Phoma sp.</i> MBP38D	100%	98%	<i>Phoma sp.</i> FJ450059.1

ANEXO III – Espécies de fungos cujas sequências da região ITS foram obtidas a partir do GenBank para serem utilizadas na análise filogenética

Tabela 6A. Espécies de fungos cujas sequências da região ITS foram retiradas do GenBank para a análise filogenética.

Espécie ou gêneros	Número de Acesso do GenBank	Espécie ou gêneros	Número de Acesso do GenBank
<i>Alternaria arborescens</i>	AY154706.1	<i>Fusarium proliferatum</i>	FN868470.1
<i>Alternaria dauci</i>	AY154701.1	<i>Guignardia mangiferae</i>	FJ538333.1
<i>Alternaria macrospora</i>	AY154689.1	<i>Guignardia vaccinii</i>	EU167584.1
<i>Alternaria</i> sp.	AY154699.1	<i>Hypoxyylon</i> sp.	AB462753.1
<i>Ampelomyces</i> sp.	EF672292.1	<i>Leptospora rubella</i>	DQ195780.1
<i>Annulohypoxyylon stygium</i>	EU272517.1	<i>Magnaporthe grisea</i>	AB026819.1
<i>Arthrinium phaeospermum</i>	EU326200.1	<i>Myrothecium inundatum</i>	AJ302005.1
<i>Cercospora zebrinae</i>	GU214657.1	<i>Nectria mauritiicola</i>	AJ557830.1
<i>Chaetomium</i> sp.	AJ279466.1	<i>Neofusicoccum</i> sp.	FJ900608.1
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	GU566222.1	<i>Nigrospora sphaerica</i>	FJ478134.1
<i>Cochliobolus lunatus</i>	DQ836798.1	<i>Ophiognomonina</i> sp.	EU482284.1
<i>Cochliobolus sativus</i>	EF452447.1	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.	GU017524.1
<i>Colletotrichum boninense</i>	EU822802.1	<i>Phoma glomerata</i>	AY183371.1
<i>Colletotrichum capsici</i>	GQ369594.2	<i>Phoma herbarum</i>	AB369456.1, FN868459.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	EU326190.1, AY266389.1, AJ301979.1	<i>Phoma</i> sp.	FJ450059.1
<i>Colletotrichum lupini</i>	AJ301975.1	<i>Phomopsis</i> sp.	AF102999.1
<i>Colletotrichum truncatum</i>	AJ301945.1	<i>Podospora didyma</i>	AY999127.1
<i>Davidiella tassiana</i>	FN868485.1	<i>Rhodotorula ingeniosa</i>	AF444534.1
<i>Diaporthe helianthi</i>	AJ312356.1	<i>Rhodotorula</i> sp.	HM545717.1
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	AY577815.1	<i>Sporobolomyces oryzae</i>	AF444546.1
<i>Didymella bryoniae</i>	EU167573.1	<i>Stemphylium solani</i>	AF203451.1
<i>Epicoccum nigrum</i>	FJ904918.1	<i>Xylaria berteri</i>	GU324749.1
<i>Eutypella scoparia</i>	EU436688.1	<i>Xylaria ianthinovelutina</i>	GU322441.1
<i>Fusarium equiseti</i>	EU595566.1		