

# **ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS**

**DE MILHO (*Zea mays*)**

**ADILSON CORRÊA DA SILVA**

**Biólogo**

**Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO**

**Dissertação apresentada à Escola Superior de  
Agricultura "Luiz de Queiroz", da  
Universidade de São Paulo, para obtenção do  
Título de Mestre em Agronomia, Área de  
Concentração: Microbiologia Agrícola**

**PIRACICABA**  
**Estado de São Paulo - Brasil**  
**AGOSTO - 1997**

**ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS**  
**DE MILHO (*Zea mays*)**

**ADILSON CORRÊA DA SILVA**

Aprovado em 26. 02.1998

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

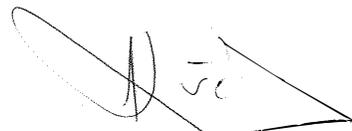
ESALQ/USP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Carneiro

ESALQ/USP

Prof. Dr. Sérgio Pascholati

ESALQ/USP



Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Orientador

## **Ofereço**

**Aos meus pais, Benedicto e Maria,  
aos meus sogros: Leo e Adelia**

**A minha esposa Susette e  
aos meus filhos Adilson Júnior e Tomás**

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. **Dr. João Lúcio de Azevedo**, pela orientação segura, pelo incentivo e dedicação, pelo exemplo na conciliação do trabalho com a preservação do relacionamento humano.

Ao Prof. **Dr. José Odair Pereira**, Universidade Federal do Amazonas, pelo amigo que sempre tem sido, pelo incentivo, pela coorientação, presteza e cooperação em inúmeras horas de trabalho.

Ao Professores **Dr. Frederico Maximiliano Wiendl e Dr. Valter Arthur**, da Seção de Entomologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP, pela amizade e incentivo.

Ao Prof. **Dr. Luiz Gonzaga Prado Filho**, coordenador da Pós-graduação do Curso de Microbiologia Agrícola, pela experiência de vida e paciência com os alunos.

Ao Prof. **Dr. Orlando Petrini**, Mikrobiologisches Institut - ETH - ZURICH, pelo auxílio na identificação dos fungos isolados.

A Profa. **Dra. Elza Aurea de Luna Alves Lima**, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, pelo apoio, carinho e pelo auxílio na identificação dos fungos isolados.

Aos Professores **Dr. Geraldo Antonio Tosello e João Rubéns Zinsly**, Departamento de Genética da ESALQ, por fornecerem as sementes e plantas utilizadas neste trabalho.

A Profa. **Dra. Siu Mui Tsai**, do Laboratório de Microbiologia do Solo do CENA/USP, por fornecer as estirpes das bactérias não patogênicas utilizadas nos ensaios

Ao Laboratório de Microbiologia do **Instituto Biológico de Campinas** - S.P. por fornecer as estirpes das bactérias fitopatogênicas utilizadas nos ensaios.

Ao Laboratório de Microbiologia da **UNIMEP/PIRACICABA** por fornecer a estirpe de bactéria sem importância agrônômica utilizada nos ensaios.

A **PhD Claudia de Mattos Bellato e PhD Lyndel W. Meinhardt**, cientistas visitantes da Universidade da Flórida pelo auxílio na elaboração do "Summary".

Ao Técnico de Laboratório da Seção de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da ESALQ/USP, **José Antonio da Silva (ZEZO)** pela dedicação e responsabilidade.

A **Regina Lúcia de Mello Lourenção** secretária da Seção de Microbiologia Agrícola da ESALQ/USP, pela competência, dedicação e sempre pronta ao atendimento aos alunos

A amiga **Silvana Regina Vicino Sarriés**, sempre pronta nas sugestões e leitura dos manuscritos, e pela amizade sincera demonstrada durante todos os momentos da realização deste trabalho

A Professora de inglês **Sandra Mariza Vicino**, pela revisão do "Summary".

A **Lúcia A. dos Santos (Cris)**, **Clarice Matraia**, **Dra. Neusa de Lima Nogueira**, **Nivaldo Guirado**, **José Carlos (Tchê)**, **Daniela Stuchi**, **Renata M. Cantu**, **Suzineide (Suzi)**, **Adonis**, **Ricardo Paterniani** pelo convívio e incentivo.

Aos amigos **Benedito Herculano e Celso de Aguiar** pelo apoio, amizade e convívio.

Aos **funcionários de Campo e Laboratórios da ESALQ** e do **Centro de Energia Nuclear na Agricultura**, pelo apoio e colaborações importantes na realização deste trabalho.

Aos vigilantes do parque da ESALQ, em especial ao **amigo Carlos Eduardo Bueno**.

A Bibliotecária **Beatriz Helena Giongo**, pelo apoio na revisão bibliográfica.

Aos **Amigos** do Departamento de Genética - ESALQ/USP, pela amizade e colaboração.

A Todos os Amigos de Curso, pela amizade, colaboração e estímulos durante a fase de estudos.

A instituição **CAPES** e pelos auxílios financeiros.

**SUMÁRIO**

	<b>Página</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMO</b>	<b>VIII</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Considerações Gerais</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Importância do Estudo dos Endofíticos</b>	<b>6</b>
<b>2.3. Endofíticos Produtores de Metabólitos</b>	<b>7</b>
<b>2.4. Processo para o Isolamento de Microrganismos Endofíticos</b>	<b>9</b>
<b>2.5. Ocorrência de Fungos Endofíticos em Vegetais</b>	<b>11</b>
<b>2.6. Relação entre Microrganismos Endofíticos e Hospedeiros</b>	<b>16</b>
<b>2.7. Modos da Associação entre Microrganismos Endofíticos e Hospedeiros</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Sementes e Plantas de Milho Utilizadas</b>	<b>20</b>
<b>3.2. Assepsia das Superfícies das Sementes e das Plantas</b>	<b>21</b>
<b>3.3. Coleta das Plantas de Milho Utilizadas no Isolamento dos Fungos Endofíticos</b>	<b>22</b>
<b>3.3.1. Raízes</b>	<b>22</b>
<b>3.3.2. Caules</b>	<b>23</b>
<b>3.3.3. Folhas</b>	<b>23</b>
<b>3.4. Meio de Cultura para Isolamento de Fungos Endofíticos</b>	<b>25</b>
<b>3.5. Identificação dos Fungos Endofíticos Isolados</b>	<b>26</b>
<b>3.6. Produção de Metabólicos Secundários Antagonistas para</b>	

<b>Bactérias</b>	<b>27</b>
<b>3.7. Inibição do Crescimento Bacteriano</b>	<b>28</b>
<b>3.7.1. Meio YM Ágar</b>	<b>30</b>
<b>3.7.2 Meio de Nutriente Ágar</b>	<b>30</b>
<b>3.8. Calculo da Porcentagem do Aparecimento dos Gêneros de Fungos</b>	<b>30</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>31</b>
<b>4.1. Isolamento e Classificação dos Fungos Endofíticos</b>	<b>31</b>
<b>4.2. Teste de Inibição</b>	<b>40</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>44</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>45</b>

**LISTA DE FIGURAS****FIGURAS**

<b>1 Esquema de Isolamento de Fungos Endofíticos</b>	<b>24</b>
<b>2 Modo de Obtenção do Material Fúngico para Testes de Antibiograma</b>	<b>29</b>
<b>3 Três Placas Mostrando Antibiogramas com a Presença de Halos de Inibição</b>	<b>41</b>

**LISTA DE TABELAS****TABELAS**

- |          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Número de Gêneros ou Espécie de Fungos Isolados de Diferentes Partes de Plantas de Milho, Coletadas no Campo Experimental de Sertãozinho</b>  | <b>32</b> |
| <b>2</b> | <b>Número de Gêneros ou Espécie de Fungos Isolados de Diferentes Partes de Plantas de Milho, Coletadas no Campo Experimental de Anhembi</b>  | <b>33</b> |
| <b>3</b> | <b>Porcentagem de Isolados das Diferentes partes das Plantas de Milho Coletados no Campo Experimental de Sertãozinho</b>   | <b>34</b> |
| <b>4</b> | <b>Porcentagem de Isolados das Diferentes partes das Plantas de Milho Coletados no Campo Experimental de Anhembi</b>   | <b>35</b> |
| <b>5</b> | <b>Produção de Halo de Inibição no Crescimento de Bactérias em Relação a Isolados do Gênero <i>Penicillium</i> Obtidos de Dois Locais de Isolamento e Um Controle do Gênero <i>P. chrysogenum</i>.</b> | <b>42</b> |

# ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

## DE MILHO (*Zea mays*)

Autor: ADILSON CORRÊA DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

### RESUMO

Plantas e sementes de milho, variedade PiranãoD2, provenientes de dois campos experimentais em Piracicaba - SP, um localizado em Anhembi e o outro Sertãozinho, foram utilizadas na obtenção de fungos endofíticos. Utilizou-se 150 sementes da safra 1990/91 e 120 plantas inteiras com 52 dias de idade da safra 1991/92 sendo utilizadas sementes, raízes, caules e folhas.

Após a esterilização externa, sementes e outras partes das plantas foram seccionadas e colocadas em meio apropriado para o crescimento dos fungos. Os gêneros de fungos de maior incidência foram *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*. Houve uma maior incidência de fungos de raízes, seguindo-se de fungos de sementes, caules e folhas. Alguns gêneros de fungos já haviam sido descritos como endofíticos de milho. Porém outros foram descritos pela primeira vez, como *Dreschelera*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Phomopsis*, *Rhizopus* e *Syncephalastrum*, os quais possivelmente características de regiões tropicais

Visando determinar a ocorrência de metabolitos com poder bactericida, fungos endofíticos do gênero *Penicillium* foram ensaiados contra bactérias fitopatogênicas ou não. Os resultados indicaram que os isolados da área experimental de Sertãozinho produziram antimicrobianos efetivos contra 5 bactérias analisadas, o mesmo não ocorrendo com fungos isolados na área experimental de Anhembi.

**ISOLAMENT OF ENDOPHYTIC FUNGI**  
**FROM MAIZE (*Zea mays*)**

**Author: ADILSON CORRÊA DA SILVA**

**Adviser: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO**

**SUMMARY:**

Maize plants and seeds (variety Piranão D2) from two experimental fields around Piracicaba, SP, one situated in Anhembi, and the other in Sertãozinho, were used to isolate endophytic fungi. In the experiment, 300 seeds of 1990/1991 crop, and 120 plants (52 days old), 1991/1992) were used.

After external sterilization, seeds and parts of the plants were cut, and each tissue sample was placed into an appropriate media for the development of the fungi. The fungi of major incidences were *Penicillium* spp., *Fusarium* spp, and *Aspergillus* spp.

There was a major incidence of root fungi, followed by fungi of seeds, stems and leaves. Some of the fungi had already been described as endophytic of maize. Others, as *Dreschlera*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Phomopsis*, *Rhizopus* and *Syncephalastrum* were described for the first time, and probably are typical of tropical regions.

In order to determine the occurrence of metabolites with bactericide activity, endophytic fungi of the genus *Penicillium* were tested against pathogenic or not. The results showed that the isolates of fungus from the Sertãozinho area produced antimicrobial compounds against 5 effective bacteria, but the some didn't occur with the fungi isolated from the maize plant Anhembi experimental field.

## 1. INTRODUÇÃO

Topograficamente, um fungo pode viver sobre ou dentro de seu hospedeiro. Microorganismos que vivem sobre a superfície de seu hospedeiro são denominados epifíticos, enquanto aqueles que vivem no interior dos tecidos das plantas são chamados de endofíticos. Na prática, contudo, essa delimitação nem sempre é muito clara.

São considerados endofíticos, os fungos que vivem todo o seu ciclo de vida ou parte dele no interior dos tecidos vegetais especialmente na parte aérea das plantas, sem aparentemente produzirem qualquer efeito em seus hospedeiros. Esses fungos vivem em mutualismo, antagonismo ou em simbiose neutra comum a uma ampla faixa de organismos autotróficos. A natureza dessas associações é diversa exibindo vários graus de interdependência nutricional.

A ecologia, taxonomia e distribuição dos fungos fitopatogênicos que causam sintomas típicos, assim como as interações das micorrizas com seus hospedeiros, tem

sido amplamente estudadas. Como os fungos endofíticos, no entanto, causam infecções assintomáticas (o termo endofítico vem sendo mais precisamente empregado nesse sentido) e sua presença no hospedeiro não pode ser detectada por uma simples inspeção, a melhor maneira de estudá-los é por meio de isolamentos e cultivo em laboratório. Acredita-se, atualmente, que toda planta viva seja hospedeira de fungos endofíticos, bem como de outros microrganismos e que os tecidos sadios das plantas, ao contrário do que se pensava, não estão livres de fungos, o que nos leva a concluir que a sua presença é um fenômeno geral e comum.

Os microrganismos endofíticos tem recebido atenção nos últimos anos por terem sido relacionados com a proteção do hospedeiro contra patógenos e pragas, produzirem metabólitos importantes e poderem ser submetidos a transformação genética, introduzindo-se nos mesmos genes, como os que determinam a produção de toxinas contra insetos, o que confere às plantas que os contém, resistência a pragas. Assim, a manipulação genética dos microrganismos endofíticos apresenta uma série de vantagens podendo desta forma ser mais um fator que proporciona incremento na produção agrícola.

O presente trabalho teve como objetivo isolar, identificar e verificar a frequência de fungos endofíticos, a partir de sementes, raízes, caules e folhas de milho. Foi utilizado o milho, por ser um dos vegetais mais importantes do ponto de vista econômico e social, sendo uma das quatro espécies de plantas mais consumidas como alimento em todo o mundo. Além do mais, não há ainda estudos sobre a microbiota fúngica endofítica do milho no Brasil; como o milho é largamente estudado do ponto de

vista genético e de seu melhoramento, o conhecimento dos fungos endofíticos dessa espécie pode auxiliar futuros estudos, especialmente visando a resistência à moléstias e pragas. Os estudos foram conduzidos utilizando-se a variedade Piranhã D2, provenientes de dois campos experimentais da região de Piracicaba. Foi verificado também, se estes isolados endofíticos produzem alguma substância inibidora ao crescimento de bactérias, incluindo as fitopatogênicas.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Considerações gerais**

Normalmente, tecidos contaminados por fungos apresentam diferenças quando comparados com tecidos sadios, por existirem manchas características, necrose ou hipertrofia, além da presença de hifas ou corpos de frutificações dos próprios agentes contaminantes. Porém, podem ocorrer infecções assintomáticas, onde embora, os fungos estejam presentes, o tecido continua a existir um aspecto sadio.

Esse tipo de contaminação por infecções assintomáticas em tecidos aparentemente sadios foi definida como endofítica por DE BARY (1886), sendo aplicado à microbiota interna dos tecidos vegetais, tanto nos casos de infecções assintomáticas ou não e nos casos de interações antagônicas ou simbióticas. Em 1986, o termo microrganismo endofítico tornou-se mais restrito, sendo apenas usado para organismos

que causam colonização assintomática, excluindo desse conceito fungos patogênicos e fungos mutualísticos, como os micorrízicos (CARROLL, 1986).

As investigações nesta área vêm adquirindo cada vez mais importância; por exemplo PETRINI (1991) propôs que a definição citada por Carroll abrangesse também os organismos que, habitando a parte aérea dos órgãos das plantas, fossem capazes de colonizar, em algum tempo de seu ciclo de vida, os tecidos internos dos vegetais, sem causar dano aparente. O próprio CARROLL (1988) referiu-se ao termo, de modo mais genérico, como fungos que são localizados mais especificamente no interior das plantas do que em suas superfícies.

Pode ser detectada a presença de fungos endofíticos observando-se o crescimento de fungos em meio de cultivo, a partir de fragmentos de plantas que tiveram a superfície previamente esterilizada. Os fungos obtidos desse modo, podem ser cultivados para serem identificados. Usando essa técnica de isolamento pode se fazer uma estimativa da extensão da infecção e também da composição da microbiota fúngica que existe em um determinado hospedeiro.

Foram feitos diversos estudos nos últimos anos a respeito de fungos endofíticos obtidos de diferentes hospedeiros, especialmente na Europa e América do Norte (REDLIN & CARRIS, 1996). Esses estudos, na maioria dos casos, têm abordado principalmente a taxonomia e a distribuição das espécies endofíticas de fungos em um grande número de hospedeiros. Mais recentemente, começaram a ser estudados aspectos ecológicos e evolutivos da associação existente entre o fungo e a planta (CARROLL,

1988; CLAY, 1988; PETRINI, 1991; TOTI *et al.* , 1992; FISHER *et al.*, 1992; PEREIRA *et al.*, 1993; HELANDER *et al.*, 1996).

## 2.2 Importância do Estudo dos Endofíticos

Já foi extensivamente comprovada a existência de fungos endofíticos, em todas as espécies vegetais até o momento estudadas (REDLIN e CARRIS, 1996). Entretanto, ainda se faz necessário mais pesquisas relacionadas aos aspectos ecológicos, genéticos e fisiológicos dessa interação entre os fungos e as plantas, para um maior conhecimento dessas infecções assintomáticas. O aprofundamento nos estudos com os fungos endofíticos para a obtenção de informações esclarecendo a base biológica dessas interações é muito importante, pois vários endofíticos apresentam produção de substâncias como por exemplo, antibióticos, tornando-se assim, alvos na busca desses produtos e de outros metabólitos secundários de interesse farmacológico (SILVA *et al.*, 1992). Estes fungos poderiam ainda ser usados como bioindicadores de alterações ecológicas causadas pelo homem (HELANDER & RANTIO-LEHTIMÄKI, 1990, HELANDER *et al.*, 1996), como agentes no controle biológico de pragas e de doenças (WHITE & COLE, 1985), como indicadores de deficiências nutricionais de plantas (SILVA *et al.*, 1997), ou servindo como vetores para a introdução de genes em plantas hospedeiras (MURRAY *et al.*, 1992).

Os aspectos citados acima demonstram a importância de estudos com microrganismos endofíticos, deixando claro o potencial dos fungos endofíticos nas interações com os hospedeiros vegetais. Além dos fungos, Actinomicetos (SARDI *et al.*, 1992; BOSCO *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 1995) e bactérias em geral colonizando tecidos saudáveis dos vegetais, podem trazer vantagens para o hospedeiro. É o caso de bactérias, que atuam como fixadoras de nitrogênio nos vasos de cana-de-açúcar, com benefícios para a planta (PAULA *et al.*, 1991).

### **2.3 Endofíticos Produtores de Metabólitos**

Pesquisadores demonstraram a possibilidade da exploração dos fungos endofíticos como produtores de metabólitos para fins diversos. FISHER *et al.* (1984b) detectaram atividade antibiótica em 10 dos 24 isolados de fungos endofíticos obtidos de 5 espécies de *Ericaceae*. Os fungos produziram os metabólitos quando cultivados em culturas líquidas em agitação. Dos 10 isolados, 5 apresentaram atividades antifúngica e antibacteriana ao mesmo tempo. FISHER *et al.* (1986) ensaiaram 25 isolados do hospedeiro *Ulex europeus* e *U. gallii* e encontraram atividade antibiótica em 4 deles, quando isolados e cultivados em meio líquido com agitação. Os isolados de *Coniothyrium* produziram uma ampla faixa de atividade antibiótica em ambos os ensaios. Em nenhum dos experimentos acima, houve preocupação de se quantificar de forma exaustiva a produção de antibióticos pelos isolados endofíticos, mas ambos confirmam a

hipótese de que os endofíticos estariam aptos a competirem com antagonistas (FISHER *et al.*, 1984a).

BILLS & POLLISHOOK (1991) fizeram algumas considerações sobre o potencial de alguns microrganismos endofíticos afirmando que os mesmos, especialmente os menos freqüentemente encontrados e restritos a certos hospedeiros, poderiam ter aplicações biotecnológicas as mais diversas. Um exemplo é a produção de taxol, um agente anti-tumor de seio e de ovário de mulheres. Taxol é um derivado diterpenóide que tem a extração feita a partir da região abaixo da casca (floema/tecido cambial) de *Taxus brevifolia*, uma árvore de crescimento lento e que ocorre nos Estados Unidos, próxima a riachos e lagos na costa norte e nordeste do Pacífico. Considerando-se que duas gramas de taxol são necessárias para tratamento e que somente 0,01 à 0,03% do peso seco do floema é taxol, fica evidente a dificuldade de suprimento dessa droga. O fungo endofítico *Taxomyces andreane* isolado do floema de *Taxus brevifolia*, pode modificar toda esta situação, pois, sendo cultivado em meio semi-sintético, produz este metabólito bem como outras substâncias relacionadas (STIERLE *et al.*, 1993). Testes com precursores radioativos mostraram que o taxol produzido por *T. andreane* segue uma via metabólica diferente do taxol produzido por *T. brevifolia*. Entretanto, os testes de atividade biológica mostraram que ambos, exibem atividades semelhantes quanto a citotoxicidade de carcinomas. Ficou comprovado que o taxol isolado das culturas do fungo faz parte do metabolismo do fungo e se mostra como uma fonte alternativa desse fármaco. Mais recentemente, taxol foi também isolado de outros fungos endofíticos (STROBEL *et al.*, 1996).

Há uma interação entre fungos endofíticos e hospedeiros, devido ao processo de coevolução, podendo os fungos atuarem como agentes no controle biológico. Um bom exemplo, é a associação de endofíticos com forrageiras. Desde sua descoberta, essa associação endofitos-hospedeiro, tem merecido constante atenção (LATCH *et al.*, 1984 e 1985; WHITE & COLE, 1985; WHITE, 1987; CLAY, 1988 e 1989, BACON, 1990; SCHARDL *et al.*, 1992), sendo que algumas espécies vegetais que apresentam essa associação são de importância econômica, tais como *Lolium perene* e *Festuca arundinacea*. Esses endofíticos ganharam importância quando se associou a ocorrência de metabólitos tóxicos em forrageiras com a presença dos fungos do gênero *Epichloa*. Foram desenvolvidas pesquisas para se verificar os aspectos ecológicos dessa associação de simbiose mutualística, sendo que as forrageiras infectadas ficaram livres da ação de insetos e mamíferos herbívoros, além de se tornarem mais tolerantes à seca que as forrageiras não infectadas. Outros exemplos de interações simbióticas entre fungos endofíticos e hospedeiras podem ser encontrados na literatura (CLARK *et al.*, 1989; BACON, 1990 ; AZEVEDO, 1998a e 1998b).

#### **2.4 Processos para o Isolamento de Microrganismos Endofíticos**

O isolamento e o cultivo de fungos endofíticos em laboratório possibilita o estudo dos mesmos. Para a realização do isolamento é necessária, a eliminação de todos os microrganismos epifíticos que estiverem na superfície dos

hospedeiros. Para uma completa eliminação desses microrganismos, tempo e agente esterilizador devem ser bem determinados. O tempo de esterilização varia de acordo com os hospedeiros e depende da espessura da cutícula e da epiderme dos tecidos. Quando houver, apesar da esterilização, a proliferação de organismos na superfície externa isso significa que o tempo de esterilização foi insuficiente. Mas também deve ser considerado que, se a solução esterilizante penetrar no interior dos tecidos vegetais, ela poderá eliminar também os endofíticos. Foi estudada, em vários trabalhos, a eficácia da esterilização de superfície; em alguns casos o processo de esterilização utilizado não impediu o aparecimento de alguns saprófitas epifíticos (PETRINI, 1986; LEGAUT *et al.* 1989a; 1989b).

SPURR & WELTY (1975) experimentaram métodos de esterilização utilizando discos de 9 mm de folhas de fumo e discos do mesmo tamanho de papel filtro. Sobre os dois discos foi feita a aspersão de uma suspensão de esporos do fungo *Alternaria*. Após a aspersão, os discos foram tratados com hipoclorito de sódio, variando-se, ora o tempo de exposição, ora a sua concentração. Da solução foram utilizados simultaneamente discos de folhas de fumo coletados em campo, sendo mantidas em agitação com NaOCl 1% em uma faixa de períodos de tempo que variava de 0,5 até 30 minutos. Após cada um dos tratamentos, os discos foram colocados em meios propícios para o desenvolvimento de fungos. O tratamento teve resultados positivos com 1% de NaOCl por 2 minutos. Quanto aos discos coletados de folhas de campo, a frequência de fungos isolados diminuiu com o aumento do tempo de exposição ao NaOCl 1%. Os fungos *Alternaria* e

*Cladosporium* consistentemente continuavam a crescer a partir de tecidos tratados por 10 minutos com NaOCl 1% .

Técnicas efetivas para se esterilizar superfícies foram descritas por PETRINI (1986), sendo apresentadas diferentes condições para a esterilização de líquens, briófitas, pteridófitas, gimnospermas, monocotiledôneas e dicotiledôneas, levando-se em consideração variações tanto no tempo de exposição como na concentração de NaOCl. Verificou-se que microrganismos endofíticos são muito mais freqüentemente encontrados nos vegetais do que se imaginava, bastando uma análise mais aprofundada para que sejam observados esses tipos de fungos até mesmo em plantas inferiores, como líquens, musgos e samambaias (PETERSON *et al.*, 1981; DREYFUSS & PETRINI, 1984), coníferas (CARROLL & CARROLL, 1978; PETRINI & CARROLL, 1981), monocotiledôneas (RIESEN & SIEBER, 1985; SILVA *et al.*, 1992; PAMPHILE *et al.*, 1995, dicotiledôneas (WIDLER & MÜLLER, 1984; GLIENKE, 1995), em espécies tropicais (PETRINI & DREYFUSS, 1981; DREYFUSS & PETRINI, 1984; RODRIGUES & SAMUELS, 1990; RODRIGUES, 1992; PEREIRA, 1993; LONGO, 1996,, RODRIGUES, 1996) e em forrageiras (SIEGEL *et al.*, 1987; CLAY, 1988; BACON, 1990; PEREIRA *et al.*, 1993).

## **2.5 Ocorrência de Fungos Endofíticos**

A ocorrência desses microrganismos como já citado, é de âmbito geral, pois os mesmos foram encontrados em todos os hospedeiros submetidos até o momento à

investigação. Pelo menos, 300 espécies de plantas tiveram registro de fungos assintomáticos em seus tecidos aéreos (PETRINI, 1991). A comunidade de endofíticos é composta por fungos pertencentes à vários taxa, havendo uma predominância de uma ou poucas espécies de fungos em um determinado hospedeiro. A composição dessa comunidade fúngica, pode variar de acordo com a distribuição geográfica dos hospedeiros, idade das plantas, condições ecológicas e sazonais (BERNSTEIN & CARROLL, 1977; CARROLL & CARROLL 1978; PETRINI *et al.*, 1982; PETRINI, 1991). Existe uma certa correlação entre determinados fungos endofíticos e hospedeiros; em determinadas plantas, a ocorrência acaba sendo repetida muitas vezes na observação e estudos desses vegetais.

As próprias sementes dos hospedeiros ou propágulos vegetais podem ser responsáveis pela transmissão dos endofíticos; na maioria das plantas, os endofíticos são transmitidos via semente, por esporos (CARROLL, 1988).

As Pinaceae, Cupressaceae, Ericaceae e Gramineae são famílias de plantas em que microrganismos endofíticos foram mais intensamente estudadas e pode ser verificada nesses casos, uma associação entre determinadas microbiotas e hospedeiros. Geralmente, um ou dois taxa são específicos para um determinado hospedeiro e são isolados com uma frequência mais alta do que um grande número de espécies acidentais e comuns à vários outros hospedeiros.

Existem fungos que são considerados ubíquos, ocorrendo em hospedeiros diversos, isto é, hospedeiros pertencentes a diferentes famílias de plantas. Segundo PETRINI (1986), são considerados ubíquos, entre outros os seguintes fungos,

*Geniculosporium*, *Phyllosticta*, *Phomopsis* e *Cryptocline*. Existem espécies de fungos que estão sempre em um determinado gênero ou família de um hospedeiro em particular. MORGAN-JONES & GAMS (1982) citam como exemplo, o fungo *Acremonium coenophialum*, anamórfico de *Epichloë tyfina*, encontrado somente em gramíneas forrageiras. *Phyllosticta pyrolae* e *P.vaccinii* são restritos para hospedeiros *Ericales* (PETRINI, 1986), embora o fungo *Phomopsis* spp. já tenha sido isolado tanto de espécies perenes (PETRINI *et al.*, 1982), como de espécies anuais (KULICK, 1984).

O milho, sendo um dos 4 principais alimentos vegetais, juntamente com o trigo, arroz e a batata, não poderia deixar de ter sido estudado do ponto de vista de sua microbiota endofítica. A maioria dos trabalhos com o milho nesse sentido, é feita a partir da microbiota bacteriana. São várias as pesquisas referentes a este assunto, bem como revisões sobre isolamento, caracterização e aplicações de bactérias endofíticas de milho. Cerca de 50 diferentes espécies de bactérias já foram encontradas como endofíticas em milho (DI FIORI & DEL GALLO, 1995; SILVA *et al.*, 1995; SOUZA, 1996, AZEVEDO, 1998a). Estudos relacionados principalmente com bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio tem sido desenvolvidos pelo grupo de Döbereiner no Rio de Janeiro (DÖBEREINER, 1992; DÖBEREINER, *et al.*, 1993; DÖBEREINER, *et al.* 1995). Entretanto, os fungos endofíticos de milho tem sido bem menos estudados. LESLIE *et al.* (1990) foram os primeiros a isolar um endofítico do gênero *Fusarium* de milho; discutiram também a possibilidade dos fungos isolados serem apenas endofíticos, ou então, patogênicos ou patogênicos latentes. FISHER *et al.* (1992) fizeram um estudo mais aprofundado da microbiota do milho isolando bactérias e fungos endofíticos de

plantas cultivadas na região de Devon, Grã-Bretanha. Encontraram 23 espécies de fungos endofíticos sendo que 13 delas habitavam o interior do caule, 13 a epiderme do caule e 8 espécies foram encontradas nas folhas. As espécies e gêneros mais comumente encontradas foram *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Acremonium strictum*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Epicoccum purpurascens*, *Fusarium*, *Microdochium bolleyi*, *Trichoderma harzianum* e *Ustilago*. Fungos foram também isolados de sementes, principalmente os pertencentes aos gêneros *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Verticillium*. Esses fungos não foram praticamente encontrados em sementes novas. Apenas sementes após estocagem continham fungos, localizados principalmente nos embriões da planta.

BING & LEWIS (1993) estudaram em milho, a interação entre o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* atuando como endofítico neste hospedeiro. A interação entre esse fungo e o hospedeiro mostrou-se eficiente em eliminar até 84% dos danos causados por larvas de *Ostrinia nubilalis*, a broca do milho européia.

Pesquisas com fungos endofíticos de milho em países de clima tropical como o Brasil, são ainda praticamente inexistentes. A partir de fungos do gênero *Penicillium* isolados no presente trabalho cujos resultados já foram apresentados em congresso (DA SILVA *et al.* 1992), RIBEIRO (1995) fez um estudo sobre a variabilidade genética dos mesmos por meio de técnicas conhecidas pela sigla RAPD, envolvendo marcadores moleculares do DNA. Dezesete isolados pertencentes a 4 espécies foram caracterizadas por meio de marcadores de RAPD separando os fungos analisados em grupos que coincidiram com a classificação taxonômica elaborada pela

análise morfológica. A nível interespecífico houve grande variabilidade genética e, como esperado, a variabilidade genética intraespecífica foi bem menor.

KEDERA *et al.* (1994) relataram a recuperação constante de *Fusarium moniliforme* e sugerem que este fungo é sistêmico em milho, sendo a semente a principal fonte de inóculo. Por outro lado, AMOAH *et al.* (1996) sugeriram os possíveis caminhos pelo qual o milho poderia ser infectado por *Fusarium* em condições de campo, as sementes sendo a principal porta de entrada do fungo.

PAMPHILE (1997) isolou fungos endofíticos de duas linhagens de milho (BR-105 e BR- 106) plantados em dois locais na região de Piracicaba, Estado de São Paulo. Obteve uma alta frequência de fungos do gênero *Fusarium*, a partir de sementes, obtendo também fungos dos gêneros *Penicillium* e *Acremonium*. Com a espécie *Fusarium moniliforme* estudou a variabilidade genética analisada pela técnica de RAPD e verificou que os isolados poderiam ser divididos em dois grupos que correspondem aos dois locais de isolamento. Realizou também um sistema de transformação em *F. moniliforme* baseado no gene de nitrato redutase de *Fusarium oxysporium* obtendo 30 a 60 transformantes por µg de DNA. Ainda no mesmo trabalho, objetivando um futuro monitoramento de linhagens endofíticas em milho, obteve linhagens endofíticas de *F. moniliforme* marcadas com o gene GUS que se expressou dentro da raiz de milho. Observou também a transposição de elementos móveis transponíveis de *F. oxysporium* para *F. moniliforme*.

## 2.6 Relação entre Microrganismos Endofíticos e Hospedeiros

Existe uma relação muito grande entre a especificidade dos endofíticos e seus hospedeiros. PETRINI (1991) relata em sua revisão diversos casos onde são necessárias várias enzimas extracelulares, como amilases, celulases, esterases, lipases, ligninases, pectinases, proteases para a penetração e colonização da planta pelo fungo. O autor afirma que é encontrado o mesmo padrão de atividade enzimática quando os diferentes isolados são provenientes de um mesmo tipo de hospedeiro, sugerindo com isso a existência de algum mecanismo de especificidade.

Existem também dados que indicam que a especificidade entre o microrganismo endofítico e seu hospedeiro pode chegar ao nível de espécie (LEUCHTMANN & CLAY 1990; SIEBER-CANAVESI *et al.* 1991). CHAPELA *et al.* (1990) descreveram um mecanismo de reconhecimento entre as xilariáceas e seus hospedeiros já no início do contato entre o fungo e a planta. Foi descrito por TOTI *et al.* (1992) o mecanismo de aderência entre conídios do endofítico *Discula umbriella* em superfícies de hospedeiros e não hospedeiros. Neste estudo foi detectada a presença, na superfície dos conídios, de uma bainha contendo polissacarídeos, constatando-se que essa formação estava envolvida no processo de aderência. De acordo com os autores, trata-se de um mecanismo muito específico com o envolvimento de um composto termolábil e outro não protéico, altamente específicos no reconhecimento de uma única espécie de hospedeiro. Também nos fungos fitopatogênicos, tem sido estudada a aderência de esporos na superfície de hospedeiros (HAMER *et al.* 1988). De acordo com PETRINI

(1991) e como já mencionado anteriormente, deve ter ocorrido uma coevolução entre fungos endofíticos e seus hospedeiros. Isso foi deduzido, a partir da observação da produção de enzimas extracelulares, responsáveis pela infecção e colonização das plantas, e a produção de fatores de crescimento produzidos por esses fungos.

## **2.7 Modos da Associação entre Microrganismos Endofíticos e Hospedeiros**

Quando existe simbiose entre fungos e plantas, dependendo se ocorre benefícios ou danos à planta hospedeira, essa associação é caracterizada como mutualística ou antagonística (PETRINI, 1986). A neutralidade dessa associação onde ocorre equilíbrio entre danos e benefícios é rara e de difícil comprovação. Quando ocorre perda de nutrientes da planta para o fungo, mesmo em pequenas quantidades, trata-se de parasitismo. No mutualismo ocorre o oposto, havendo algum fator que compense o custo metabólico do fungo para com o hospedeiro autotrófico. Esse equilíbrio entre danos e benefícios é que vai caracterizar se está havendo um parasitismo ou mutualismo. Foi sugerido por CARROLL & CARROLL (1978) que os endofíticos poderiam servir como antagonistas de patógenos verdadeiros, de fungos saprófitas ou de insetos herbívoros. Posteriormente, exemplos de fungos endofíticos simbiotes que atuam contra insetos herbívoros ou antagônicos a patógenos microbianos foram evidenciados por CARROLL (1988). O autor ainda define duas estratégias de mutualismo entre os endofíticos, ou seja,

dois tipos de associações. Na primeira, o mutualismo se apresenta como constitutivo, tendo como exemplo típico os endofíticos das forrageiras que desenvolvem uma infecção sistemática que ocorre em toda parte aérea da planta, produzindo uma substancial biomassa do fungo. Havendo nessa associação a produção de toxinas produzidas pelo fungo, a planta se beneficia por deter herbívoros que têm preferência pelas plantas não infectadas. A transmissão dos fungos pode ser feita através das sementes, havendo benefício ao hospedeiro, imediato e direto, apesar do custo metabólico para o hospedeiro ser elevado, envolvendo energia para o metabolismo do fungo.

Na segunda estratégia, vai haver uma associação mais livre entre o endofítico e seu hospedeiro. Nesse caso, o fungo vive em tecidos metabolicamente inativos ou senilizados sem manifestar e interferir nos tecidos vitais das plantas. Apenas quando houver lesões ou estresse no hospedeiro é que o fungo vai atacar essas partes vitais. Estaria nesse caso havendo uma simbiose devido a atuação desse fungo apenas na parte inativa. O hospedeiro se beneficia pela diminuição do ataque de insetos ou, ainda devido a competição entre endofíticos e patógenos. Esses fungos endofíticos que dão proteção ao hospedeiro devido à produção de metabólitos secundários, são eficientes na eliminação do ataque de insetos herbívoros (WEBBER, 1981 e WEBBER & GIBBIS, 1984). FISHER *et al.*, (1984 a, b) e WHITE & COLE (1985) demonstraram que alguns fungos endofíticos produzem metabólitos que atuam como antifúngicos ou antibacterianos.

Na agricultura muitas vezes, torna-se difícil e confusa a distinção entre patógenos latentes e certos endofíticos (CARROLL, 1988). É possível diferenciar os

fungos que causam infecções latentes pelo aparecimento de podridão e perda da produção pós-colheita. O equilíbrio entre os microrganismos endofíticos hospedeiros é necessário para que o endofítico não se torne um possível patógeno, já que o uso indiscriminado de defensivos agrícolas pode favorecer determinados endofíticos a se tornarem patógenos (CARROLL, 1988).

Freqüentemente são isoladas espécies patogênicas como endofíticos. *Didymella exitialis* e *Phaeosphaeria nodorum*, patógenos do trigo, podem apresentar infecções assintomáticas (PETRINI, 1986; SIEBER *et al.*, 1988), assim como *Naemacyclus minor* (CARROLL & CARROLL, 1978) e *Lophodermium* spp. (COSTONIS *et al.*, 1970), patógenos das coníferas.

A classificação dos endofíticos é uma tarefa difícil sendo poucas as informações relativas ao cultivo das espécies já descritas (REDLIN & CARRIS, 1996). A maioria dos endofíticos são Ascomicetos distribuídos dentro de Loculomicetos, Discomicetos ou Pirenomicetos. Os Basidiomicetos, Deuteromicetos e Oomicetos também já foram encontrados entre os isolados endofíticos. Segundo PETRINI (1986), endofíticos classificados como Basidiomicetos são mais raramente encontrados e para seu isolamento é necessário o uso de meios específicos de cultivo que fornecem nutrientes para fungos de crescimento mais lento. Entre os Deuteromicetos, existe uma certa dificuldade na identificação devido a falta de material descrito a respeito de espécies já conhecidas e também devido ao fato de haver muita diversidade dentro de uma mesma espécie.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Sementes e Plantas de Milho Utilizadas**

As sementes e plantas de milho, variedade Piranão D2, utilizadas na presente pesquisa foram cedidas pelos Professores Geraldo Antonio Tosello e João Rubens Zinsly. O material vegetal foi coletado nos campos experimentais do Distrito de Anhembi e bairro Sertãozinho, município de Piracicaba, Estado de São Paulo, utilizados pelo Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / USP para pesquisas de melhoramento genético. Para os experimentos utilizou-se um total de 150 sementes de milho safra 90/91 e 120 plantas de milho safra 91/92 provenientes de cada um dos locais de plantio.

### 3.2. Assepsia das Superfícies das Sementes

Utilizou-se para o experimento, sementes de milho sem tratamento químico e que não apresentavam qualquer tipo aparente de dano devido ao ataque de insetos ou durante seu beneficiamento na ocasião da colheita, para que não ocorressem dúvidas quando ao aparecimento de possíveis fungos endofíticos nelas existentes. Todas as sementes foram submetidas ao tratamento prévio de esterilização (PETRINI & MÜLLER, 1986), que consistiu em:

- imersão em álcool 70%, pelo período de 1 minuto, para que ocorresse a quebra da tensão superficial existente, consequentemente ajudando na assepsia de possíveis fungos epifíticos ali existentes;
- imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% de cloro ativo (v/v), durante 4 minutos, o qual teve como função a assepsia do material; em seguida, novamente lavagem do material em álcool 70%, durante 30 segundos;

Após a esterilização, as sementes foram colocadas em placas de Petri previamente esterilizadas, contendo em seu interior aproximadamente 20 ml de meio MC (ver item 3.4). Adicionou-se a este meio de cultura, 100 µg/ml da solução do antibiótico terramicina para impedir o crescimento de possíveis bactérias endofíticas. Em condições assépticas, colocou-se um total de 5 sementes por placa distribuindo-as sobre a superfície do meio de cultura (Fig. 1).

### **3.3. Coleta das Plantas de Milho Utilizadas no Isolamento dos Fungos Endofíticos**

Plantas de milho da variedade Piranão D2 foram coletadas nas áreas de plantio experimental nos Distritos de Anhembi e Sertãozinho em Piracicaba. Com o auxílio de um enxadão fez-se um corte profundo no solo a uma distância de aproximadamente 30 cm ao redor de cada planta evitando-se que as mesmas se danificassem e que ocorresse uma possível contaminação por microrganismos oportunistas presentes na ferramenta e no solo. As plantas foram coletadas com aproximadamente 52 dias de idade e transportadas ao Departamento de Genética da ESLQ/USP. Somente as plantas que não apresentavam qualquer tipo de lesão externa em seus tecidos e que também não apresentavam qualquer tipo de dano pós coleta foram utilizadas no experimentos (Fig. 1).

#### **3.3.1. Raízes**

Foi utilizado um total de 4 raízes adventícias por planta (5-8 cm de comprimento), as quais passaram pelo mesmo tratamento de assepsia já descrito no item 3.2. Após a assepsia, cortou-se aproximadamente 3 mm das duas extremidades com um bisturi, evitando-se que a solução utilizada na assepsia se distribuísse nos vasos capilares destruindo os fungos endofíticos ali existentes. Posteriormente, estas raízes adventícias foram subdivididas em 5 fragmentos de aproximadamente 5-7 mm cada um, sendo esses

fragmentos dispostos linearmente no interior das placas de Petri contendo meio de cultura (ver item 3.4 e Fig. 1).

### **3.3.2. Caules**

As plantas de milho foram desfolhadas para a visualização do caule, de onde retirou-se um pedaço correspondente aos três últimos internódios. A parte selecionada sofreu o mesmo método de esterilização já citado no item 3.2. Após a esterilização, os internódios das extremidades foram eliminados sendo utilizado apenas o internódio central que foi cortado transversalmente em 5 pedaços com aproximadamente 5 mm de espessura cada um e distribuídos na superfície das placas de Petri, contendo meio de cultura (ver item 3.4 e Fig. 1).

### **3.3.3. Folhas**

Foi utilizada de cada planta a terceira folha, no sentido ápice/raiz. Da parte mediana de cada folha foi retirado um fragmento com o auxílio de um vazador metálico inoxidável retangular medindo 4 x 2 cm. Após o corte, estes pedaços foram submetidos ao mesmo tratamento citado no item 3.2. Após, cada fragmento foi subdividido em 5 fragmentos menores (aproximadamente 5 mm), os quais foram distribuídos em ordem seriada na superfície das placas de Petri contendo meio de cultura (item 3.4). Como nos casos anteriores, dos fragmentos foliares foram retiradas bordas de 1 mm aproximadamente, que poderiam ter absorvido a solução utilizada na assepsia (Fig. 1).

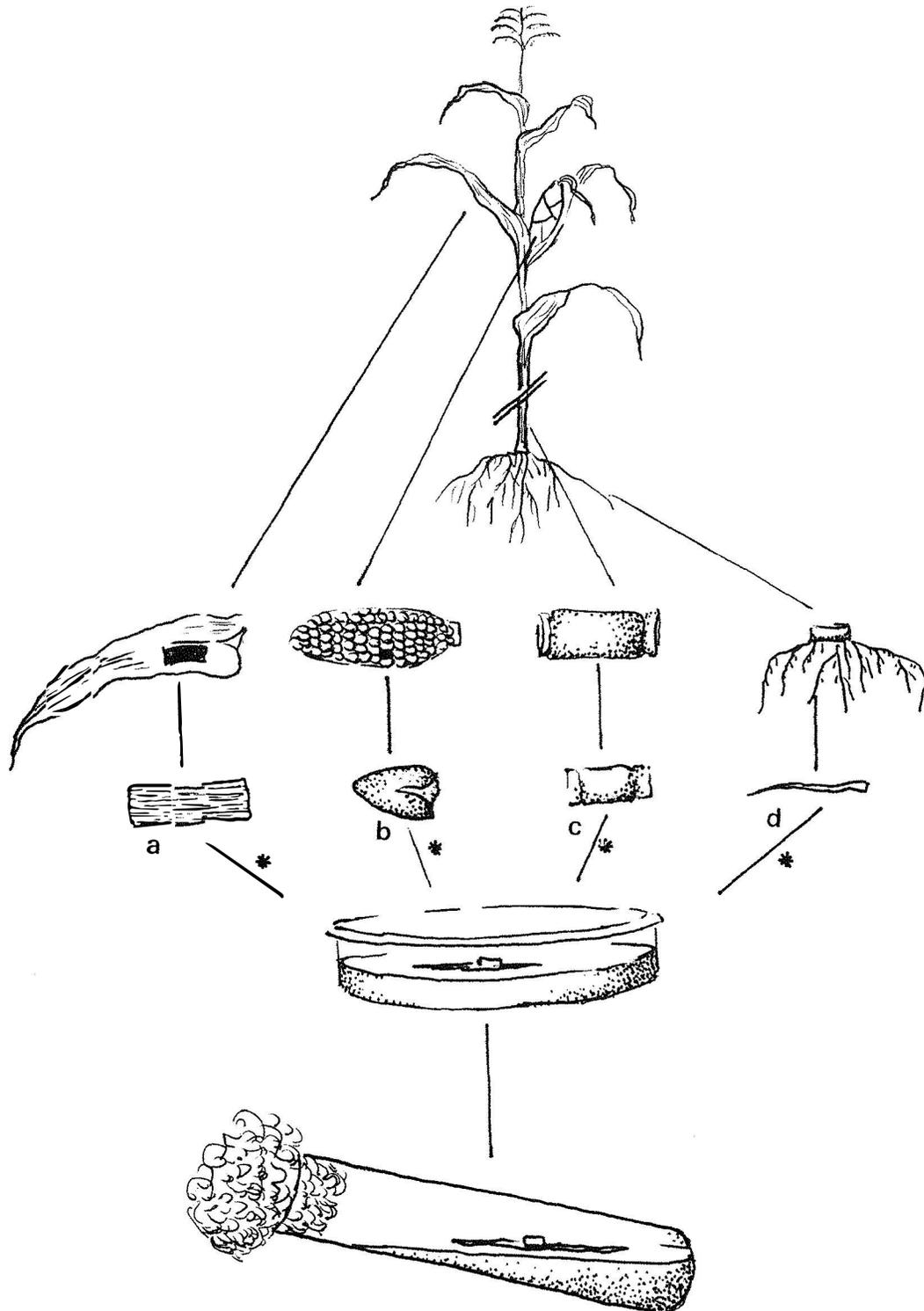


Figura 1 - Esquema do isolamento de fungos endofíticos utilizando folhas (a), sementes (b), caules (c) e raízes (d) de milho \* Etapa envolvendo esterilização do material vegetal.

### 3.4. Meio de Cultura para Isolamento de Fungos Endofíticos

O isolamento e cultivo dos fungos foi efetuado em meio, designado de meio completo ou MC (PONTECORVO *et al.*, 1953), modificado por AZEVEDO e COSTA, (1973), constituído por:

NaNO <sub>3</sub> .....	6,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,5 g
KCl .....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,5 g
ZnSO <sub>4</sub> .....	0,01 g
FeSO <sub>4</sub> .....	0,01 g
Glicose .....	10,0 g
Ágar .....	15,0 g
Extrato de levedura .....	2,0 g
Caseína hidrolizada .....	1,5 g
Peptona .....	2,0 g
Solução de vitaminas .....	1,0 ml
Água destilada .....	1000 ml

O pH foi ajustado para 6,8 com solução de NaOH 4% (p/v).

A solução de vitaminas adicionada ao MC era composta por:

Ácido nicotínico .....	100,0 mg
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico .....	10,0 mg
Tiamina .....	50,0 mg
Biotina .....	0,2 mg
Piridoxina .....	50,0 mg
Riboflavina .....	100,0 mg
Água destilada esterilizada	100,0 ml

A solução foi esterilizada por filtração e mantida no refrigerador, em

frasco escuro.

### 3.5. Identificação dos Fungos Endofíticos Isolados

Todas as placas contendo sementes e partes das plantas de milho foram incubadas à 28°C, com ausência de luz e examinadas ao longo de 7 dias consecutivos. Com o aparecimento de micélio sobre o meio de cultura, estes foram purificados e transferidos, com parte do meio de cultura e com auxílio de uma alça de platina, para tubos contendo 10 ml de meio de cultura sólido e inclinado. Os tubos com os micélios foram novamente incubados a 28°C, no escuro durante 4 dias para posterior identificação dos fungos. Caso não ocorresse a esporulação, os tubos contendo o micélio já desenvolvido eram levados a outra incubadora que continha em seu interior luz ultravioleta de ondas longas, sob temperatura de 12°C pelo tempo necessário (de uma semana, até 3 ou 4 meses), para o aparecimento de alguma estrutura de reprodução que permitisse a sua identificação. Os fungos que, mesmo nessas condições, permaneceram somente na forma micelial, não puderam ser identificados e foram enquadrados no grupo *Mycelia sterilia* (*Agonomycetes*).

Para a maioria dos fungos a esporulação deu-se entre o 4º e o 7º dia de incubação. Destes tubos retiravam-se fragmentos da superfície com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, a qual trazia consigo esporos e/ou micélio com as estruturas reprodutivas. O material foi fixado e corado sobre uma lâmina juntamente com uma gota de lactofenol (20% de cristais de fenol, 20% de ácido láctico, 40% de glicerol e 0,05% de azul algodão) e observado sob microscópio óptico (Olympus BH-2).

Para a identificação dos fungos foi utilizada literatura especializada de ELLIS (1971, 1976); BARNETT & HUNTER (1972); AINSWORTH (1973); ARX (1974); WEBSTER (1980); PETRINI (1986) ou, quando não foi possível sua identificação ou em casos de dúvida, enviados para Dr. Orlando Petrini no Mikrobiologisches Institut em Zurich, ETH Switzerland, Suíça e Dra. Elza Aúrea de Luna Alves Lima do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco - Recife, Brasil.

### **3.6. Produção de Metábolitos Secundários Antagonistas para Bactérias**

Para se verificar a existência da atividade bactericida *in vitro* de isolados do *Penicillium* sp, foram escolhidos 3 deles de cada local de coleta das plantas de milho, tendo como padrão *Penicillium chrysogenum*. Os isolados foram ensaiados contra bactérias fitopatogênicas de milho *Erwinea carotovora* subsp *carotovora*, *E. chrysanthemi*, *Pseudomonas rubrisulbaticans*, *P. fluorescens* e contra bactérias não fitopatogênicas, como *Rhizobium* sp, obtida de plantas de feijão e *Bradyrhizobium* sp, obtida de plantas de soja e também contra com uma bactéria cosmopolita saprófita, o *Micrococcus lútea*.

As amostras de bactérias fitopatogênicas *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. chrysanthemi*, *P. rubrisulbaticans* e *P. fluorescens* foram provenientes da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico - Estação Experimental de

Campinas, catalogadas sob os números 779, 231, 235 e 740, respectivamente. As estirpes de bactérias não fitopatogênicas de importância agrônômica *Rhizobium sp.* e *Bradyrhizobium sp.* foram provenientes da coleção pertencente à Seção de Microbiologia do Solo do Centro de Energia Nuclear da Agricultura - Campus "Luis de Queiroz" - USP e a estirpe da bactéria cosmopolita *M. lútea*, utilizada como padrão nos antibiogramas, foi proveniente da coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Metodista de Piracicaba, SP. A linhagem de *P. chrysogenum* foi proveniente da coleção de microrganismos do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

### **3.7. Inibição do Crescimento Bacteriano**

Para o desenvolvimento das estirpes de bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* utilizou-se meio de cultura específico conhecido como "Yeast Malt Ágar" (YM) (ver item 3.8.1) e para as demais estirpes bacterianas o meio Nutriente Ágar (NA) (ver item 3.8.2), segundo DIFICO MANUAL (1984). O sistema utilizado para se verificar a ação dos metabólitos com atividade antimicrobiana, foi o do "pocinho", descrita por LACAZ em 1969 (Figura 2).

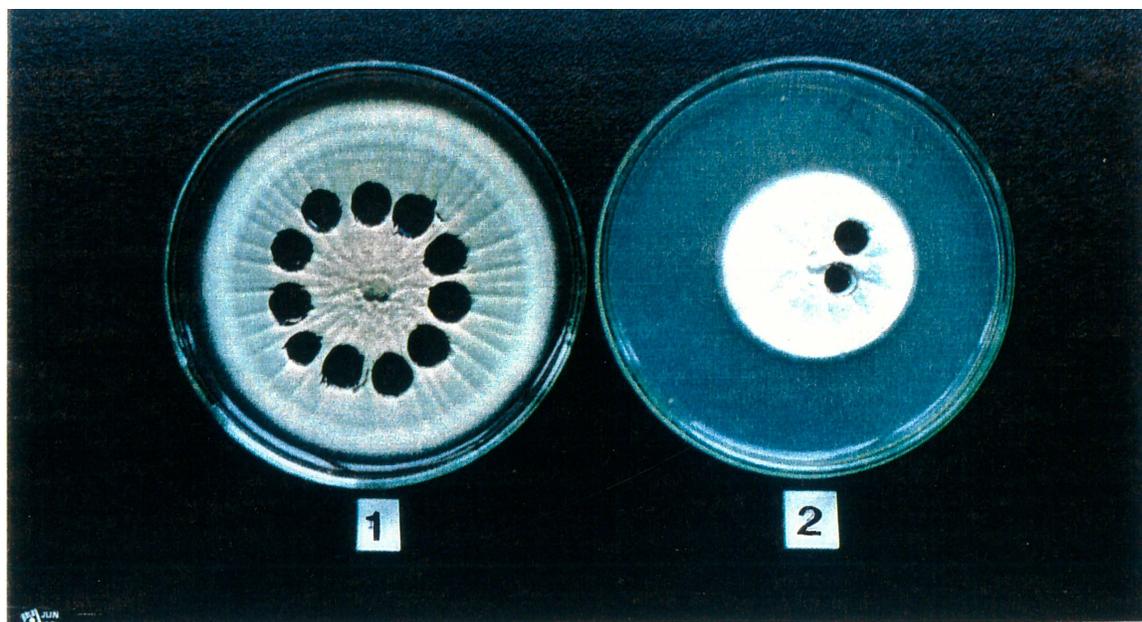


Figura 2. Modo de obtenção de material fúngico para testes de antibiograma (Técnica do pocinho). 1 - *Penicillium* sp. isolado do campo experimental de Anhembi e 2 - *Penicillium chysogenum*.

De cada placa de Petri contendo o fungo *Penicillium* era retirado, com o auxílio de um vazador metálico de 1 cm de diâmetro, um bloco cilíndrico com meio de cultura contendo o fungo na superfície. Esse cilindro foi colocado em uma placa contendo meio de cultura onde havia sido semeada a bactéria a ser ensaiada; dessa placa foi retirado um bloco cilíndrico de mesmo tamanho que o anterior de tal modo que o cilindro de meio de cultura mais fungo fosse colocado nesse local. Desta forma, com a difusão do metabólito produzido pelo fungo para o meio, foi possível a visualização do halo de inibição de crescimento nas placas contendo as bactérias sensíveis ao metabólito quando este era produzido.

### 3.7.1 Meio YM Ágar

Extrato de malte .....	3,0	g
Peptona .....	5,0	g
Dextrose .....	10,0	g
Ágar .....	20,0	g
Água destilada .....	1000,0	ml

O pH foi corrigido para 7,0 quando necessário, com solução de NaOH 4% (p/v)

### 3.7.2 Meio de Nutriente Ágar

Peptona.....	5,0	g
Extrato de carne .....	3,0	g
Ágar.....	12,0	g
Água destilada .....	1000,0	ml

O pH foi corrigido para 7,0 quando necessário, com solução de NaOH 4% (p/v)

## 3.8 Cálculo da Porcentagem do Aparecimento dos Gêneros de Fungos

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

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Isolamento e Classificação dos Fungos Endofíticos

As Tabelas 1 e 2 apresentam o número total de fungos isolados, distribuídos pelos diferentes gêneros ou espécies encontradas. A partir desses dados foi possível calcular a porcentagem dos isolados, conforme explicado no item 3.8. (Tabelas 3 e 4). Pela observação das Tabelas 1 e 2 pode-se verificar que considerando-se o número de isolados, não houve praticamente diferenças marcantes entre os dois locais de coleta do material exceto com relação às sementes quando uma quantidade quase três vezes maior de isolados foram obtidos do campo experimental de Sertãozinho em relação ao campo experimental de Anhembi. Isso, entretanto deveu-se a um grande número de isolados dos gêneros *Fusarium* e *Acremonium* e de leveduras encontradas em Sertãozinho, em contraste com os isolados de sementes de Anhembi onde foram encontrados principalmente fungos dos gêneros *Fusarium*, mas em menor quantidade que no outro local, e *Aspergillus*.

TABELA 1. Número de gêneros ou espécie de fungos isolados de diferentes partes de plantas de milho, coletadas no campo experimental de Sertãozinho localizada no município de Piracicaba, Estado de São Paulo \*.

FUNGOS	RAIZ	CAULE	FOLHA	SEMENTE
<i>Acremonium</i> sp.	-	-	-	20
<i>Alternaria</i> sp.	-	-	1	-
<i>Aspergillus</i> sp.	52	6	1	1
<i>Colletotrichum</i> sp.	3	-	1	-
<i>Dreschlera</i> sp.	1	-	3	-
<i>Fusarium</i> sp.	56	39	3	52
<i>Glomerella cingulata</i>	-	-	1	-
<i>Humicola</i> sp.	2	1	-	-
<i>Periconia</i> sp.	-	-	1	-
<i>Penicillium</i> sp.	65	3	2	4
<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	7	-
<i>Rhizopus</i> sp.	20	2	1	-
<i>Syncephalastrum</i> sp.	7	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.	2	8	-	-
<i>Xylaria</i> sp.	1	-	3	-
Levedura não identificada	1	9	-	19
<i>Mycelia sterilia</i> **	35	10	11	-
Total	243	78	35	96

\*Foram analisadas 150 sementes e plantas/local. De cada planta foram analisados 20 fragmentos de raiz (total de 3000), 5 fragmentos de caule (total de 750) e 20 fragmentos de folhas (total de 3000).

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

TABELA 2. Número e gêneros ou espécie de fungos isolados de diferentes partes da planta de milho, coletados no campo experimental de Anhembi, localizado no município de Piracicaba, Estado de São Paulo \*.

FUNGOS	RAIZ	CAULE	FOLHA	SEMENTE
<i>Acremonium</i> sp.	12	3	-	-
<i>Aspergillus</i> sp.	68	6	-	13
<i>Colletotrichum</i> sp.	-	-	3	-
<i>Curvularia</i> sp.	-	-	1	-
<i>Fusarium</i> sp.	27	7	10	20
<i>Glomerella cingulata</i>	-	-	1	-
<i>Humicola</i> sp.	1	-	-	-
<i>Periconia</i> sp.	-	-	1	-
<i>Penicillium</i> sp.	93	9	4	-
<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	5	-
<i>Rhizopus</i> sp.	12	1	-	-
<i>Syncephalastrum</i> sp.	1	-	1	-
<i>Trichoderma</i> sp.	-	-	1	-
Levedura não identificada	-	53	-	3
<i>Mycelia sterilia</i> **	35	10	11	-
Total	249	89	38	36

\* Foram analisadas 150 sementes e plantas/local. De cada planta foram analisados 20 fragmentos de raiz (total de 3000), 5 fragmentos de caule (total de 750) e 20 fragmentos de folhas (total de 3000).

\*\**Mycelia sterilia* = micélio que não produziu qualquer tipo de estrutura de reprodução (sexual ou assexual), não sendo possível a sua identificação

TABELA 3. Porcentagem de isolados das diferentes partes das plantas de milho coletadas no campo experimental de Sertãozinho, localizado no Município de Piracicaba, Estado de São Paulo.

FUNGOS	PORCENTAGENS*			
	CAULE	FOLHA	SEMENTE	
<i>Acremonium</i> sp.	0	0	0	13,30
<i>Alternaria</i> sp.	0	0	0,03	0
<i>Aspergillus</i> sp.	1,73	0,8	0,03	0,60
<i>Colletotrichum</i> sp.	0,10	0	0,03	0
<i>Drechslera</i> sp.	0,03	0	0,10	0
<i>Fusarium</i> sp.	1,86	5,2	0,10	34,6
<i>Glomerella cingulata</i>	0	0	0,03	0
<i>Humicola</i> sp.	0,06	0,13	0	0
<i>Periconia</i> sp.	0	0	0,03	0
<i>Penicillium</i> sp.	0,16	0,40	0,06	2,60
<i>Phomopsis</i> sp.	0	0	0,02	0
<i>Rhizopus</i> sp.	0,66	0,27	0,03	0
<i>Syncephalastrum</i> sp.	0,23	0	0	0
<i>Trichoderma</i> sp.	0,06	1,06	0	0
<i>Xylaria</i> sp.	0,03	0	0,10	0
Levedura não identificada	0,03	1,2	0	12,60
<i>Mycelium sterilia</i> **	1,16	1,33	0,36	0
TOTAL	5,88	10,39	0,89	60,70

\*Foram analisadas 150 sementes e plantas/local. De cada planta foram analisados 20 fragmentos de raiz (total de 3000), 5 fragmentos de caule (total de 750), 20 fragmentos de folhas (total 3000).

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

TABELA 4. Porcentagem de isolados das diferentes partes das plantas de milho coletadas no campo experimental de Anhembi, localizada no Município de Piracicaba, Estado de São Paulo

FUNGOS	PÓRCENTAGENS **			
	RAIZ	CAULE	FOLHA	SEMENTE
<i>Acremonium</i> sp.	0,40	0,4	0	0
<i>Aspergillus</i> sp.	2,26	0,8	0,03	8,60
<i>Colletotrichum</i> sp.	0	0	0,10	0
<i>Curvularia</i> sp.	0	0	0,03	0
<i>Fusarium</i> sp.	0,90	0,93	0,33	13,3
<i>Glomerella cingulata</i>	0	0	0,03	0
<i>Humicola</i> sp.	0,03	0	0	0
<i>Periconia</i> sp.	0	0	0,03	0
<i>Penicillium</i> sp.	3,10	1,2	0,13	0
<i>Phomopsis</i> sp.	0	0	0,16	0
<i>Rhizopus</i> sp.	0,40	0,13	0	0
<i>Syncephalastrum</i> sp.	0,40	0	0,03	0
<i>Trichoderma</i> sp.	0	0	0,03	0
Levedura não identificada	0	7,06	0	2,00
<i>Mycelia sterilia</i> **	0,36	1,33	0,36	0
<b>TOTAL</b>	<b>7,88</b>	<b>11,85</b>	<b>0,90</b>	<b>27,20</b>

\* Foram analisadas 150 sementes e plantas/local. De cada planta foram analisados 20 fragmentos de raiz (total de 3000), 5 fragmentos de caule (total de 750), 20 fragmentos de folhas (total 3000).

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

Esses dados devem refletir o aparecimento de infestações locais. Com relação ao número e porcentagem de isolados de raiz, caule e folha verificou-se uma maior quantidade de isolados a partir das raízes de milho. O maior número de isolados de raízes pode ser explicado, em primeiro lugar devido ao desenvolvimento do vegetal com conseqüente aumento de exudação de determinadas substâncias que propiciam o crescimento de outras formas de vida. Também, o contato íntimo com o solo e a facilidade de penetração de microrganismos por ferimentos em raízes durante seu atrito com o solo ou na emergência de raízes adventícias, deve ter influenciado a alta incidência de endófitos. A menor presença de fungos nas folhas estaria relacionada com a facilidade maior de limpeza de sua superfície em relação às outras partes estudadas, bem como a maior facilidade de penetração dos materiais utilizados na esterilização externa, podendo talvez ter eliminando também microrganismos endofíticos.

Os endofíticos isolados em maior porcentagem nos dois locais de plantio foram *Fusarium* sp, *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., sendo que os fungos do gênero *Penicillium* foram mais freqüentemente isolados a partir da raiz, enquanto os fungos do gênero *Fusarium* foram mais encontrados nas partes aéreas e nas sementes (Tabelas 3 e 4). Fungos do gênero *Fusarium* podem ser fitopatogênicos, causando fusariose em milho e, portanto, sua existência nas sementes deve facilitar a disseminação do mesmo. Já fungos do gênero *Penicillium* são considerados saprófitas, sendo razoável que ocorram com maior freqüência na raiz onde há maior concentração de exudados. Não foi feito no presente trabalho, testes para se verificar se os isolados do gênero *Fusarium* eram patogênicos. Fungos que, mesmo nas condições impostas para induzir a

esporulação, permaneceram somente na forma micelial, não puderam ser identificados sendo então enquadrados no grupo *Mycelia sterilia* (*Agnomycetes*).

Alguns gêneros foram encontrados em apenas um dos locais pesquisados, como é o caso de *Curvularia* encontrado apenas em Anhembi e *Alternaria*, *Dreschsreia* e *Xylaria* encontrados apenas em Sertãozinho. Entretanto, o número de isolados destes gêneros foi muito pequeno; essas diferenças não devem ser consideradas portanto como características dos dois locais pesquisados. Pode-se considerar então que, embora diferenças quantitativas entre isolados possam existir entre os dois locais, como será discutido, foi encontrada praticamente a mesma microbiota fúngica em ambos os locais estudados. Isto era de certa forma esperado uma vez que os dois campos experimentais são próximos no município de Piracicaba e a mesma variedade de milho foi analisada em ambos os locais. Há entretanto, como mencionado, diferenças quantitativas entre os dois locais e entre as diferentes partes das plantas estudadas. O gênero *Acremonium*, por exemplo, embora existente em plantas dos dois locais analisados, é encontrado em raiz e caule de um dos locais e só em sementes no outro. *Fusarium* é encontrado em raiz, caule, folha e sementes de ambos locais pesquisados, mas a quantidade de isolados é maior no campo experimental de Sertãozinho, quando comparado com os dados de Anhembi. Quantidade bem diferente de leveduras foi encontrada também em caule de plantas de uma das localidades (Anhembi) em relação a outra, onde as sementes contiveram maior número de leveduras. Fica difícil saber se essas diferenças tem algum significado, como por exemplo, o relacionado com certas condições de solo, microclima ou outras. Para tal seriam necessárias repetições do experimento em

anos subsequentes. Convêm salientar que FISHER *et al.* (1992) isolaram 6 gêneros de fungos de sementes de milho, sendo, como no presente trabalho, o gênero *Fusarium* bem mais freqüente, seguindo-se os gêneros *Penicillium* e *Verticillium*, o primeiro deles também encontrado em sementes analisadas no presente trabalho. Por outro lado, PAMPHILE (1997) isolou fungos endofíticos de sementes de milho também em Piracicaba, encontrando em algumas linhagens de milho pesquisadas, praticamente em toda as sementes, fungos do gênero *Fusarium*, seguindo-se os gêneros *Penicillium* e *Acremonium*, ambos também isolados de sementes do milho no presente trabalho.

Quando se comparam os fungos endofíticos por nós isolados de folha e caule com os de FISHER *et al.* (1992) que também isolaram endofíticos de caule e folhas de milho, verifica-se que alguns dos gêneros encontrados na presente pesquisa já foram descritos como endofíticos de milho. É o caso de *Alternaria*, *Acremonium*, *Fusarium* e *Trichoderma*, também encontrados por FISHER *et al.* (1992). *Fusarium* também já havida sido descrito como endofítico por LESLIE *et al.* (1990) e foi recentemente isolado de sementes de milho por PAMPHILE (1997) em Piracicaba, São Paulo. Entretanto, outros gêneros encontrados nas plantas analisadas no presente estudo, foram pela primeira vez isolados como endofíticos de folha ou caule de milho; esse é o caso, por exemplo, de *Dreschlera*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Phomopsis*, *Rhizopus*, *Syncephalastrum* e uma levedura não identificada, embora todos, com um pequeno número de isolados. Nesses casos, vai ser necessário um estudo posterior para saber se realmente eles fazem parte da microbiota endofítica do milho ou se são fungos epífíticos que, eventualmente conseguem penetrar nos tecidos internos da planta escapando assim

da esterilização das partes externas do vegetal. Possivelmente, esse pode ser também o caso dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, isolados por nós mas que são considerados por outros autores como habitando as partes externas e, eventualmente, penetrando nos vegetais (ver revisões de AZEVEDO, 1998a e 1998b).

O isolamento de fungos de raízes, não pôde ser comparado com outros, uma vez que não foram encontrados na literatura dados relativos ao isolamento de fungos endofíticos de raízes de milho. Como já mencionado, o número de fragmentos de raízes contendo fungo, após esterilização das partes externas das mesmas, foi bastante alto, superando o número de fragmentos de raiz e caule infectados . As possíveis razões para estas diferenças também já foram discutidas acima.

A identificação e a quantificação de fungos endofíticos de uma planta cultivada como o milho, é de grande importância, tendo em vista a possibilidade de utilização de tais fungos como vetores de genes de importância agrônômica (MURRAY *et al.* 1992), como causando proteção de plantas à pragas e moléstias ( BING e LEWIS 1993), como indicadores de alterações ambientais antropogênicas (HELANDER *et al.*, 1996) e na detecção de patógenos latentes (SINCLAIR & CERKAUSAS 1996) e produção de compostos de importância econômica (STROBEL *et al.* 1996), entre outras aplicações. Atualmente, o uso abusivo e indiscriminado de agroquímicos tem causado desequilíbrio de diversos tipos e o surgimento de novas doenças em plantas pode ter como causa esses desequilíbrio (CHABOUSSOU, 1987). Desta maneira, o conhecimento da microbiota endofítica de uma espécie de planta cultivada como o milho que ainda não

foi estudada sob esse aspecto em um clima tropical, poderá servir para estas e outras aplicações.

Devido ao número significativo de fungos endofíticos isolados, a metodologia empregada parece ser apropriada para a esterilização da superfície das diferentes partes das plantas de milho

#### **4.2 Testes de Inibição**

Como já mencionado anteriormente, vários fungo endofíticos produzem substâncias de interesse biotecnológico tais como fármacos, entre eles antibióticos e outros inibidores. Esses produtos também devem ter interesse na inibição de outros microrganismos inclusive bactérias fitopatogênicas, atuando então como verdadeiros controladores biológicos.

Um dos gêneros de fungos mais frequentemente isolado no presente estudo foi o *Penicillium*. Uma vez que muitas espécies deste gênero são conhecidas como produtoras de antibióticos, alguns isolados de *Penicillium* foram então escolhidos para verificar se os mesmos produziam antibióticos capazes de inibir o crescimento de bactérias tanto fitopatogênicas como fixadoras de nitrogênio atmosférico e inibir outras bactérias, usadas normalmente como controle em antibiogramas. Três isolados de milho, plantados no campo experimental de Anhembi e três do campo experimental de Sertãozinho foram usados, além de *Penicillium chrysogenum* empregado como controle. Os resultados podem ser encontrados na Tabela 5 e visualizados na Figura 3, que apresenta três placas de Petri com antibiogramas obtidos. Os resultados mostraram que, apenas isolados de *Penicillium* do campo experimental de Sertãozinho inibiram bactérias empregadas no teste. Os isolados do campo experimental de Anhembi, por outro lado, não apresentaram

qualquer efeito nas sete bactérias empregadas. Todos os isolados do campo experimental de Sertãozinho comportavam-se do mesmo modo, inibindo igualmente 5 das 7 bactérias ensaiadas. O fungo *P. chrysogenum*, usado como controle, inibiu apenas a espécie *Micrococcus lutea* como aliás seria esperado, pois a penicilina produzida pelo mesmo, é eficiente apenas contra bactérias gram-positivas.

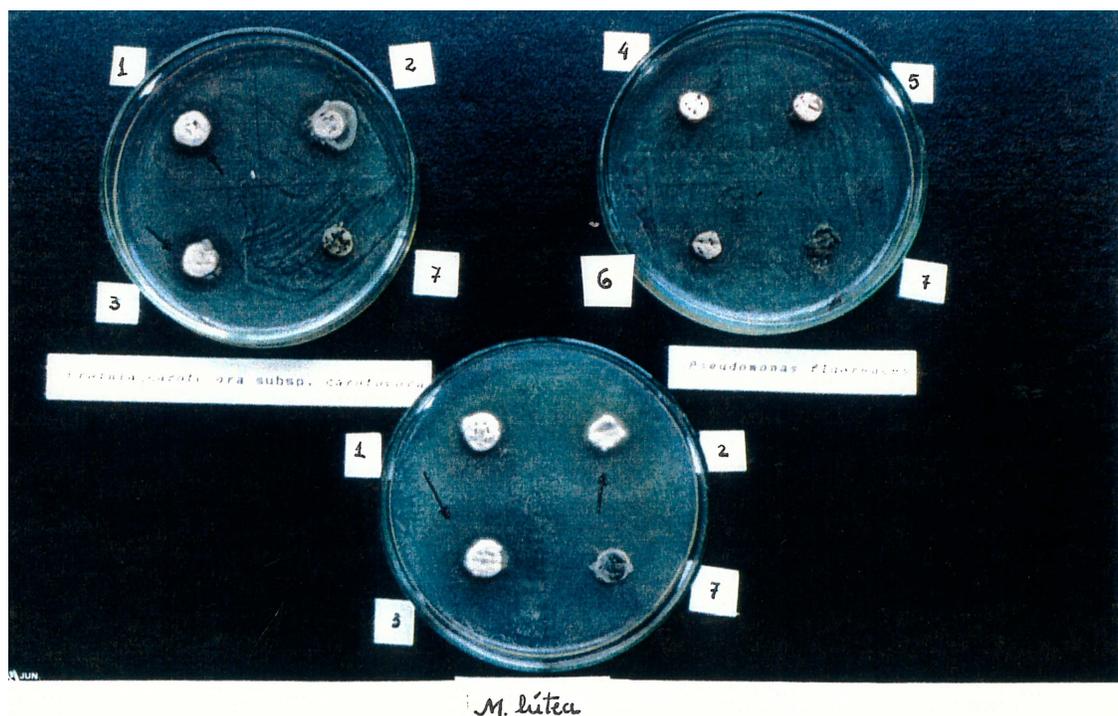


Figura 3. Três placas mostrando antibiogramas com a presença de halos de inibição. Placa superior a esquerda, com os isolados 1, 2 e 3 isolados do campo experimental de Sertãozinho e 7 *P. chrysogenum*, ensaiados contra a bactéria *E. carotovora*. Placa superior a direita, com os isolados 4, 5 e 6 do campo experimental de Anhembi e 7 *P. chrysogenum*, ensaiados contra a bactéria *P. fluorescens*. Placa inferior com os mesmos isolados do campo experimental de Sertãozinho, ensaiados contra a bactéria *M. lutea*.

TABELA 5. Produção de halo de inibição no crescimento de bactérias em relação a isolados do gênero *Penicillium*, obtidos de dois locais de isolamento e *P. chrysogenum*, como controle.

	Local de Isolamento*						
	Anhembi			Sertãozinho			Controle
Bactérias	1	2	3	4	5	6	7
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	-	-	-	+	+	+	-
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	-	-	-	++	++	++	-
<i>Pseudomonas rubrisulbaticans</i>	-	-	-	++	++	++	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bradyrhizobium</i> sp	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizobium</i> sp	-	-	-	++	++	++	-
<i>Micrococcus lútea</i>	-	-	-	++	++	++	++

1, 2, 3 - *Penicillium* sp. - Anhembi - raiz\*

4, 5, 6- *Penicillium* sp. - Sertãozinho - raiz

7- *Penicillium chrysogenum* - Padrão

- = ausência de halo, + = halo com menos de 2,0 cm de diâmetro, ++ = halo com mais de 2,0 cm de diâmetro\*\*

O fato de que os três isolados de Anhembi não produziram inibidores contra as bactérias ensaiadas, enquanto que os três isolados de Sertãozinho forneceram resultados positivos, pode ser interpretado pela utilização de possivelmente apenas três isolados de um mesmo clone, de cada local. De fato, a grande maioria das espécies isoladas de Anhembi foram de *P. spinulosum*. De 17 isolados dessa localidade, 13 foram classificadas como *P. spinulosum* (RIBEIRO, 1995) e mostraram não possuir

variabilidade estimada por meio de testes de RAPD e de eletroforese isoenzimática (RIBEIRO, 1995). Os três isolados ensaiados no presente trabalho provenientes de Anhembi pertenciam, como verificado mais tarde, a espécie *P. spinulosum* e comportaram-se igualmente, neste caso, não produzindo antibióticos contra as bactérias ensaiadas. Por outro lado, os três isolados do campo experimental de Sertãozinho não foram classificados até espécie; entretanto a pequena variabilidade morfológica observada entre os isolados desse local fazem supor que também apenas um clone tenha sido analisado. Desta maneira, deve ter sido empregado um clone de Anhembi não produtor de antibiótico e outro de Sertãozinho, produtor de substância antimicrobiana contra as bactérias empregadas. Apenas estudos posteriores poderão dizer se uma variabilidade maior entre isolados das duas localidades, com relação à produção de antibióticos, pode ser encontrada. Também não foi pesquisada a natureza do inibidor produzido pelos isolados de *Penicillium* de Sertãozinho. De qualquer maneira, embora os estudos por nós realizados tenham sido muito preliminares, eles revelaram, como aliás esperado, a existência de isolados capazes de inibir bactérias, algumas de importância agrícola, o que pode apresentar implicações referentes ao controle biológico de bactérias fitopatogênicas por fungos endofíticos. Estes endofíticos uma vez eliminados pelo uso de fungicidas agrícolas permitem mais facilmente o aparecimento de doenças causadas por bactérias. Também deve ser considerado o fato dos mesmos inibirem bactérias fixadoras de nitrogênio, o que pode tornar uma inoculação ineficaz.

## 5. CONCLUSÕES

1. Foi detectada a presença de fungos endofíticos em todas as partes das plantas estudadas, isto é, raízes, sementes, caules e folhas.

2. Isolados fúngicos de folha, caule e raiz variaram pouco com relação a localização da cultura; a ocorrência de isolados em diferentes partes da planta demonstrou que existe um gradiente de frequência na ordem: raiz > semente > caule > folha.

3. Determinados gêneros de fungos endofíticos encontrados, também já foram constatados em regiões temperadas. Os fungos mais frequentemente encontrados foram *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.. Pela primeira vez fungos dos gêneros *Dreschlera*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Phomopsis*, *Rhizopus* e *Syncephalastrum* foram encontrados como endofíticos em milho e possivelmente mostraram-se como características de regiões tropicais;

4. Três dos seis isolados de *Penicillium* produziram antimicrobianos contra bactérias tanto fitopatogênicas como fixadoras de nitrogênio atmosférico. Esses isolados poderiam ser explorados no controle biológico de doenças e também alterar os efeitos de bactérias que fixam o nitrogênio atmosférico.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMOAHI, B. K.; MacDONALD, M. V., REZANOR, N.; NICHOLSON, P. The use of random amplified polymorphic DNA technique to identify mating groups in the *Fusarium* section Liseola. **Plant Pathology**, v. 45, p 115-125, 1996
- AINSWORTH, G. C. SPARROW, F. K. & SUSSMAN, A.S. The fungi, Vol IV A & IV B. Academic Press., 1973
- ARX, J. A. von. **The genera of fungi sporulating in pure culture**. Vaduz: J. Cramer, 1974. 315p.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos . In **Ecologia Microbiana**. Ed. I. S. Melo; J. L. Azevedo, Ed. EMBRAPA, CNPMA, Jaguariúna, 20 pp, 1998a (no prelo).
- AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi and their roles mainly in tropical plants. **Seventh International Symposium on Microbial Ecology**, Santos, 14 pp, 1998b (no prelo).

- AZEVEDO, J. L.; COSTA, S. O. P. **Exercícios práticos de Genética**. São Paulo: Nacional, 288p., 1973.
- BACON, C. W. Isolation, culture, and maintenance of endophytic fungi of grasses. In: LABEDA, D. P. **Isolation of biotechnological organisms from nature**. New York: MacGraw-Hill, cap. 10, p. 259-82, 1990.
- BARNETT, H. C.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**, 31 ed. Mineapolis: Burgess Publ., 241p., 1972.
- BERNSTEIN, M. E.; CARROLL, G. C. International fungi in old-growth Douglas for foliage. **Canadian Journal of Botany**, v. 55, p.644-53, 1977.
- BILLS, G. F.; POLLISHOOK, J. D. Microfungi from *Carpinus caroliniana*. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.1477-82, 1991.
- BING, L. A.; LEWIS, L. C. Occurrence of the entomopathogenic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in different tillage regimes in *Zea mays* L. and virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hubner) **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 45:147-156, 1993.
- BOSCO, M.; FERNANDEZ, M. P.; PASCAL, S.; RICCARDO, M.; PHILIPPE, N. Evidence that some *Frankia* sp. strains are able to cross boundaries between *Alnus* and *Elaeagnus* host specificity groups. **Applied and Environmental Microbiology**, p.1569-76, 1992.
- CARROLL, G. C. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N. J.; HEUVEL, J. van den., ed. **Microbiology of phyllosphere**. London: Cambridge University Press. p. 205-22, 1986.

- CARROLL, G. C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, p.2-9, 1988.
- CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, v. 56, p.3132-43, 1978.
- CHABOUSSOU, F. Plantas doentes pelo uso de agrotóxicos. L&PM Editores, Porto Alegre, 253 pp. 1987.
- CHAPELA, I. H.; PETRINI, O.; PETRINI, L. E. Unusual ascospore germination in *Hypoxylon fragiforme*: first steps in the establishment of an endophytic symbiosis. **Canadian Journal of Botany**, v.68, p.2571-5, 1990.
- CLARK, C.L.; MILLER, J. D.; WHITNEY, N. J. Toxicity of conifer needle endophytes to spruce budworm. **Mycological Research**, v.93, p.508-12, 1989.
- CLAY, K. Clavicipitaceous fungal endophytes of grasses: coevolution and the change from parasitism to mutualism. In: PIROZYNISKI, K, A.; HAWKSWORTH, D. L., ed. **Coevolution of fungi with plants and animals**. London, Academic Press, 1988. p. 79-105.
- CLAY, K. Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potencial as biocontrol agents. **Mycological Research**, v.92, p.1-12, 1989.
- COSTONIS, A. C.; SINCLAIR, W. A.; ZYCHA, H. Infection of detached needles of *Pinus strobus* and *P. sylvestris* by *Lophodermium pinastri*. **Phytopathology**, St. Paul, v.67, p. 352-60, 1970.

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

DIFCO MANUAL. Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology, Difco Laboratories, Michigan, 100 ed. 1155 p. 1984.

DI FIORE, S.; DEL GALLO, M. Endophytic bacteria: Their possible role in host plants. In ***Azospirillum VI and related microorganisms*** Ed. I. Fendrik; M. Del Gallo, J. Vanderleyden; M. de Zamaroczy. p. 169-187, NATO ASI Series number 37, Berlin, Springer-Verlag, 1995.

DÖBEREINER, J. Recent changes in the concept of plant-bacteria interactions: endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v. 44:310-313, 1992.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In ***Azospirillum VI and related microorganisms***, Ed. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden; M. de Zamaroczy. p. 3-14. NATO ASI Series Number 37 Berlin, Springer-Verlag, 1993.

DÖBEREINER, J.; REIS, V. M.; PAULA, M. A.; OLIVARES, F. Endophytic diazotrophic in sugarcane, cereals and tuber plants. In ***New horizons in nitrogen fixation***. Ed. R. Palacios, J. Mora; W. F. Newton, p. 671-676, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1993.

DREYFUSS, M.; PETRINI, O. Further investigations on the occurrence and distribution of endophytic fungi in tropical plants. **Botanica Helvetica**, v. 94, p.33-40, 1984.

- ELLIS, M. B. **Dematiaceous hyphomycetes**, Surrey, Commonwealth Mycological Institut, 608p., 1971
- FAHEY, J. W. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. In: Cutler, H. O., ed. **Biologically active natural products: potential use agriculture**. Washington: ACS Symposium Ser., 380, p. 120-8, 1988
- FISHER, P. J.; ANSON, A. E.; PETRINI, O. Antibiotic activity of some endophytic fungi from *Cericeous* plants. **Botanica Helvetica**, v. 94, p.249-53, 1984a.
- FISHER, P. J.; ANSON, A. E.; PETRINI, O. Novel antibiotic activity of an endophyte *Cryptoporiopsis* sp isolated from *Vaccinium myrtillus*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 83, p.145-8, 1984b.
- FISHER, P. J.; ANSON, A. E.; PETRINI, O. Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 86, p.153-6, 1986.
- FISHER, P. J.; PETRINI, O. ; LAPPIN SCOTT, H. M. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, v.122, p. 299-305, 1992.
- GLIENKE, C. Variabilidade genética no fungo endofito *Guinardia citricarpa* Kieli detectada por RAPD. Curitiba, 1995, 115p. Dissertação. (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.
- HAMER, J. E.; HOWARD, R. J.; CHUMLEY, F. G.; VALENT, B. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. **Science**, Washington, v.239, p.288-90, 1988.

- HELANDER, M. L. & RANTIO-LEHTIMÄKI. Effects of watering and simulated acid rain on quantity of phyllosphere fungi of Birch leaves. **Microbial Ecology**, v. 19, p.119-25, 1990.
- HELANDER , M.; RANTA, H.; NEUVONEN, S. Ecology of endophytic fungi: Effects of anthropogenic environmental changes. In **Endophytic fungi in grasses and woody plants**. Ed. S. C. Redlin; L. M. Carris p. 197-207, APS Press, St. Paul, 1996.
- KEDERA, C. J.; LESLIE, J. F.; CLAFLIN, L. E. *Fusarium moniliforme* in maize, an endophytic ? In **Fifth International Mycological Congress**. Vancouver, Canada 1994 (Abstracts) p. 106.
- KULICK, M. M. Symptomless infection, persistence, and production of pycnidia in host and non-host plants by *Phomopsis batatae*, *Phomopsis phaseoli*, and *Phomopsis sojiae* and taxonomic implication. **Mycologia**, v. 76, p. 274-91, 1984.
- LACAZ, C. S. **Antibióticos**. 2ª ed. EDUSP, 609 p.,1969
- LATCH, G. C. M. & CHRISTENSEN, M. J. Artificial infection of grasses with endophytes. **Annals of Applied Biology**, v. 107, p.17-24, 1985.
- LATCH, G. C. M.; CHRISTENSEN, M. J.; SAMUELS, G.J. Five endophytes of *Lolium* and *Festuca* in New Zealand. **Mycotaxon**, v. 20, p.535-50, 1984.
- LEGAUT, D.; DESSUREAUT, M.; LAFLAME, G. Mycoflore des aiguilles de *Pinus banksiana* et *Pinus resinosa*. I. Champignons endophytes. **Canadian Journal of Botany**, v. 67, p.2052-60, 1989a.

- LEGAUT, D.; DESSUREAUT, M.; LAFLAME, G. Mycoflora of *Pinus banksiana* and *Pinus resinosa* needles. II. Epiphytic fungi. **Canadian Journal of Botany**, v 67, p.2061-65, 1989b.
- LESLIE, J. F.; PEARSON, C. A. S.; NELSON, P. E. TOUSSON, T. A. *Fusarium* spp. from corn, sorghum and soybean fields in the central na eastern United States. **Phytopathology**, v. 81: 812-813, 1990.
- LEUCHTMANN, A.; CLAY, K. Isozyme variation in the *Acremonium epichlon* fungal endophyte complex. **Phytophatology**, v. 80, p.1133-9, 1990.
- LONGO, A. C. Transformação genética e variabilidade. detectada por RAPD em isolados endofíticos de *Colletotrichum musae*. Piracicaba, SP, 1996. 103p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MORGAN-JONES, G.; GAMS, W. Notes Hyphomycetes. Xyli an endophytic of *Festuca arundinacea* and the anamorph of *Epichloe typhyna*, New taxa in one of two sections of *Acremonium*. **Micotaxon**,v. 15:311-318, 1982.
- MURRAY, F. R.; LATCH, G. C. M.; SCOTT, D. B. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. **Molecular General Genetics**, Berlin, v. 233, p.1-9, 1992.
- PAMPFILE, J. A. Variabilidade, transformação genética e transposons em linhagens endofíticas de *Fusarium moniliforme* isoladas de milho (*Zea mays* L.) Piracicaba, SP, 1997, 166 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

PAMPHILE, J. A.; VIEIRA, M. L. C.; AZEVEDO, J. L. Isolamento e caracterização molecular por RAPD de linhagens endofíticas de *Fusarium* sp. isoladas de milho. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 20, Piracicaba, 1995. **Resumos**. Piracicaba: BANDEL, G.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J. L. eds./SBG/USP/ESALQ, 1995, p. 122.

PAULA, M. A., REIS, V. M. & DÖBEREINER, J. Interaction of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugar cane (*Saccharum spp.*) and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, v. 11, p. 111-115, 1991.

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

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

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

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissue. In **Microbiology of the Phyllosphere**, Ed. N. J. Fokkema; J. van den Heuvel, p. 175-187, Cambridge University Press, 1986

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

- PETRINI, O.; CARROLL, G. Endophytic fungi in foliage of some *Cupressaceae* in Oregon. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, p.629-36, 1981.
- PETRINI, O., DREYFUSS, M. Endophytic fungi in Araceae, Bromeliaceae and Orchidaceae. **Sydowia**, v. 34: 135-148, 1981.
- PETRINI, O; MÜLLER, E. Haupt und Nebenfruchtformen Europäischer Pilze. **Mycologia Helvetica**, v. 1, p.501-627, 1986.
- PETRINI, O. STONE, J. K.; CARROLL, F. E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, p.789-96, 1982.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M. MacDONALD, K.D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*, **Advance in Genetics**, v. 5:141-238, 1953.
- REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. Endophytic fungi in grasses and wood plants. APS Press, St. Paul, 223 pp, 1996.
- RIBEIRO, L. A. Variabilidade genética por RAPD em fungos isolados de *Zea mays* L. Curitiba, PR. 1995. 91p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná.
- RIESEN, T. & SIEBER, T. Endophytic fungi in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Endophytische Pilze von Winterweizen (*Triticum aestivum* L.). Zhrich, 1985. (PhD). Eidgemössiche Technische Hochschule (ETH).
- RODRIGUES, K. F. **Endophytic fungi in tropical palm *Euterpe oleracea* Mart.** New York, 1992. (PhD).

- RODRIGUES, K.F. Fungi endophytes of palms. In **Endophytic fungi in grasses and woody plants**, Ed. S. C. Redlin; L. M. Carris p. 197-207, APS Press, St. Paul, 1996
- RODRIGUES, K.F. & SAMUELS, G.J. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. **Mycological Research**,, v. 94, p.827-30, 1990.
- SARDI, P.; SARACCHI, M.; QUARONI, S.; PETROLINI, B.; BORGONOV, E.; MERLI, S. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. **Applied and Environmental Microbiology**, p.2691-3, 1992.
- SCHARDL, C. L.; LIU, J.; WHITE, J. F.; FINKEL, R. A.; AN, Z.; SIEGEL, M. Molecular phylogenetic relationships of nonpathogenic grass mycosymbionts and clavicipitaceous plant pathogens. **Plant Systematics and Evolution**, v. 178, p.27-41, 1992.
- SIEBER-CANAVESI, F.; PETRINI, O; SIEBER, T. N. Endophytic leptostroma species on *Picea abies*, *Abies alba*, and *Abies balsamea*: a cultural, biochemical, and numerical study. **Mycologia**, v. 83,p.89-96, 1991.
- SIEBER, T.; RIESEN, T. K.; MÜLLER E.; FRIED, P. M. Endophytic fungi in four winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) differing in resistance against *Stagonospora nodorum* (Berck.) Cast. & Germ. = *Septoria nodorum* (Berck.) Berck. **Journal Phytopathology**, v. 122, p.289-306, 1988.
- SIEGEL, M. R.; LATCH, G. C. M.; JOHNSON, M. C. Fungal endophytes of grasses. **Annual Review of Phytopathology**, v. 25, p.293-315, 1987.

- SILVA, A. C.; ARAUJO, J. M.; AZEVEDO, J. L. Ocorrência de actinomicetos endofíticos em milho (*Zea mays*). In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 20., Piracicaba, 1995. **Anais**. 1995. p.125.
- SILVA, A. C.; NOGUEIRA, N. L.; SALVADOR, J. O. ; GUIRADO, N. ; MOREIRA, A. Ocorrência de fungos endofíticos em goiabeira (*Psidium guava*), cultivadas em omissão de macronutrientes. In: 3<sup>o</sup> ENCONTRO CIENTIFICO DOS PÓS-GRADUADOS DO CENA/USP, Piracicaba, 1997. **Resumos**. 1997. p. 22.
- SILVA, A. C. ; PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L. Obtenção de fungos endofíticos de milho (*Zea mays*) var. PIRANÃO. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 18, São Paulo, 1992. **Resumos**. São Paulo: SBG/USP, 1992, p. 134.
- SINCLAIR, J. R.; CERKAUSAS, R. F. Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. In Endophytic fungi in grasses and woody plants, Ed. S. C. Redlin; L. M. Carris, p. 3-30, APS Press, St. Paul, 1996.
- SPURR, H. W.; WELTY, R. E. Characterization of endophytic fungi in healthy leaves of *Nicotiana* spp. **Phytopathology**, v. 65, p.417-22, 1975.
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreane*, an endophytic fungus of pacific. **Science**, v. 260, p.214-6, 1993.
- STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; FORD, E.; SIDHU, R. S.; YANG, X. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17:413-423, 1996.

- TOTI, L.; VIRET, O.; CHAPELA, I. H.; PETRINI, O. Differential attachment by conidia of the endophyte, *Discula umbrinella* (Berk. & Br.) Morelet, to host and non-host surfaces. **New Phytologist**, v. 121, p.469-75, 1992.
- WEBBER, J. A natural control of Dutch elm disease. **Nature**, v. 292, p.449-51, 1981.
- WEBBER, J.; GIBBIS, J. N. Colonization of elm bark *Phomopsis oblonga*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 82, p.348-52, 1984.
- WEBSTER, J. Introduction to fungi, 2<sup>a</sup> ed. Cambridge University. Press, p.669, 1980.
- WHITE Jr., J. F. Widespread distribution of endophytes in the *Poaceae*. **Plant Disease**, St. Paul, v.71, p.340-2, 1987.
- WHITE Jr., J. F.; COLE, G. T. Endophyte-host associations in forage grasses. I. Distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*. **Mycologia**, v. 77, p.323-7, 1985.
- WIDLER, B. & MÜLLER, E. Untersuchungen über endophytische Pilze von *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengel (Ericaceae). **Botanica Helvetica**, v. 94., p.307-37, 1984.