

**FUNGOS ENDÓFITOS ASSOCIADOS AO
CACAUEIRO**

LOISE ARAUJO COSTA

2008

LOISE ARAUJO COSTA

FUNGOS ENDÓFITOS ASSOCIADOS AO CACAUEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador
Prof. Dr. Ludwig Heinrich Pfenning

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Costa, Loise Araujo.
Fungos endófitos associados ao cacauero / Loise Araujo Costa. –
Lavras : UFLA, 2008.
61 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.
Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.
Bibliografia.

1.Theobroma cacao. 2. Fungos endófitos. 3. Diversidade. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.474

LOISE ARAUJO COSTA

FUNGOS ENDÓFITOS ASSOCIADOS AO CACAUEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 29 de julho de 2008

Prof. Dr. Luís Fernando Pascholati Gusmão	UEFS
Prof. Dr. Luís Roberto Batista	UFLA
Prof. Dr. Eduardo van den Berg	UFLA

Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

DEDICATÓRIA

A minha família, aos meus
amigos e aos interessados no assunto,

OFEREÇO

Aos meus pais,
Newton e Antônia;
aos meus irmãos,
Leonardo, Luciano e Laécio,
e à minha querida Isabella,
DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras.

Ao professor Ludwig H. Pfenning, pela orientação, confiança, incentivo e amizade.

Ao colega Lucas Magalhães de Abreu, pela co-orientação.

Aos professores da Microbiologia Agrícola, Rosane, Eustáquio, Romildo e Patrícia.

A todos do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos da UFLA, em especial Ana Karla, Cristiano, Edson, Mário e Mirian.

Ao professor Eduardo Nagal e ao colega Cilo, da Universidade Federal do Amazonas.

Ao Professor Mário Lúcio e aos colegas João de Cássia, Fabrício e Márcia.

A todos os amigos da Microbiologia Agrícola e da Fitopatologia.

À CAPES.

Aos meus pais, Newton e Antônia.

A Deus, acima de tudo.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO GERAL	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Fungos endófitos e interação com a planta hospedeira.....	4
2.2 Isolamento e caracterização taxonômica de fungos endófitos.....	7
2.3 O cacaueteiro: botânica e importância econômica.....	9
2.4 Endófitos do cacaueteiro.....	11
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
CAPÍTULO 2 Comunidade de fungos endófitos associados ao cacaueteiro em vegetação nativa e sob o sistema de monocultivo.....	18
1 RESUMO	20
2 ABSTRACT	21
3 INTRODUÇÃO	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Local de coleta e amostragem.....	24
4.2 Metodologias de isolamento dos fungos endófitos.....	25
4.3 Análise dos dados.....	27
5 RESULTADOS	30
5.1 Metodologias de isolamento de endófitos.....	30
5.2 Taxas de colonização e de isolamento.....	30
5.3 Composição da comunidade de fungos endófitos.....	31
5.4 Diversidade.....	31
5.4.1 Análise da diversidade de espécies: Curva de rarefação.....	32

5.4.2 Padrões de colonização.....	32
5.4.3 Preferência de colonização.....	33
6 DISCUSSÃO.....	34
6.1 Metodologias de isolamento de endófitos.....	34
6.2 Taxas de colonização e de isolamento.....	36
6.3 Composição da comunidade de fungos endófitos.....	37
6.4 Diversidade: Análise da diversidade, padrões de colonização e preferência de colonização.....	39
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
8 ANEXOS.....	48

RESUMO

COSTA, Loise Araujo. **Fungos endófitos associados ao cacauero**. 2008. 61 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Os estudos envolvendo a taxonomia e ecologia de fungos endófitos de plantas em regiões tropicais apresentam um potencial bastante amplo, mas ainda são incipientes. Em *Theobroma cacao*, a composição e diversidade da comunidade de fungos endófitos são desconhecidas. O objetivo do presente trabalho foi comparar os fungos endófitos em folhas e hastes do cacauero em vegetação nativa e em área de monocultivo. Seis amostras de folhas e hastes foram coletadas de cacaueros em vegetação nativa, na região de Manaus, Amazonas, e em área de monocultivo, na região de Itabuna, Bahia. As amostras vegetais foram submetidas às metodologias de explantes e de trituração e filtração de partículas para o isolamento dos fungos endófitos, após o procedimento de desinfecção superficial. Aproximadamente 5.700 CFUs foram recuperadas e 114 espécies foram identificadas, das quais 65 foram encontradas no cacauero cultivado e 75 no cacauero nativo. Espécies de *Phomopsis* e *Glomerella cingulata* foram dominantes em ambas as áreas estudadas. A análise multivariada de correspondência evidenciou a preferência das espécies mais frequentes por algum tipo de tecido e área estudada. A espécie *Lasiodiplodia theobromae* predominou em hastes do cacauero nativo, e as folhas exibiram a maior diversidade de espécies nesse ambiente. Para o cacauero cultivado a diversidade foi maior nas hastes. A maior similaridade das comunidades de fungos endófitos foi verificada entre as amostras de folhas. O elevado número de espécies e a abundância de isolados da comunidade de fungos endófitos associados ao cacauero cultivado, comparável à área de vegetação nativa, indicam que o sistema agrícola de monocultivo parece não interferir na biodiversidade dos endófitos do cacauero. O emprego de mais de um método de isolamento nos estudos de comunidades de endófitos é favorável, uma vez que permitiu uma melhor amostragem da diversidade de fungos presentes em hastes e folhas de cacaueros.

* Comitê Orientador: Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning – UFLA (orientador), Lucas Magalhães de Abreu – UFLA (Co-orientador).

ABSTRACT

COSTA, Loise Araujo. **Fungal endophytes associated to the cocoa tree**. 2008. 61 p. Dissertation (Master Degree in Agricultural Microbiology) Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Studies about taxonomy and ecology of endophytic fungi in tropical plants are promising, although being still in an initial phase. Composition and diversity of the community of endophytic fungi in the cocoa tree is almost unknown. The objective of this work was to compare endophytic fungi in leaves and twigs of the cocoa tree in a native stand and under conditions of monoculture. Six samples of each plant material were collected in the region of Manaus AM, and Itabuna BA, Brazil. For isolation of fungi, samples were submitted after a superficial disinfection to two techniques, using explants and the particle trituration and filtration method. From about 5.700 colony-forming units 114 species have been identified, being 65 from cultivated trees and 75 from trees growing in natural conditions. Species of *Phomopsis* and *Glomerella cingulata* were dominant in both areas studied. A multivariate correspondence analysis evidenced preference of most frequent species to a particular area or plant tissue. *Lasiodiplodia theobromae* was dominant in twigs of native trees, where leaves also showed a higher diversity of species. In the cultivated area, diversity was higher in twigs. Communities of endophytes in leaves of both areas were more similar than that of twigs. An elevated number of species and abundance of isolates recovered from the cultivated area indicate that crop management in monoculture may not influence on the diversity of endophytic fungi in the cocoa tree. The use of two different isolation techniques allowed a more reliable assessment of endophytes present in leaves and twigs in this important tropical crop.

*Guidance Committee: Ludwig H. Pfenning - UFLA (Advisor), Lucas Magalhães de Abreu - UFLA (Co-Advisor)

CAPÍTULO 1
FUNGOS ENDÓFITOS ASSOCIADOS AO CACAUEIRO

1 INTRODUÇÃO GERAL

No interior dos tecidos de plantas sadias coexiste uma diversidade de microrganismos capazes de colonizar órgãos aéreos e subterrâneos de suas plantas hospedeiras, sem causar sintomas aparentes de doenças. Tais microrganismos são conhecidos como endófitos e compreendem as bactérias (Kobayashi & Palumbo, 2000) e as leveduras (Maria & Sridhar, 2003), que são raramente citadas na literatura (Chanway, 1996) e os fungos filamentosos (Stone et al., 2000), que formam o grupo mais estudado.

As interações entre fungos e plantas já são conhecidas há muito tempo, porém, esses microrganismos eram vistos como patógenos ou sapróbios oportunistas que colonizavam qualquer tecido ou órgão das plantas hospedeiras, sem causar maiores prejuízos. A partir de estudos taxonômicos e ecológicos mais aprofundados, iniciados por Berstein & Carroll (1977) e Carroll & Carroll (1978), tem sido constatada a presença de microrganismos no interior de tecidos vegetais sadios, abrindo novas perspectivas para o estudo da interação endófito-hospedeiro.

Essas interações são dinâmicas por todo o ciclo de vida do vegetal e têm sido classificadas desde um parasitismo latente ao mutualismo. A relação de mutualismo entre gramíneas e ciperáceas e algumas espécies de fungos, pertencentes aos gêneros *Epichlõe* e *Balansia* e seus anamorfos, já é bem conhecida. A existência de mutualismo entre plantas lenhosas e endófitos não é tão clara como no caso de gramíneas, entretanto, um estudo conduzido por Arnold et al. (2003) postula que fungos endófitos de plantas lenhosas podem exercer importante papel na proteção do hospedeiro contra fitopatógenos.

Muitos trabalhos abrangendo o isolamento de endófitos de plantas lenhosas de regiões tropicais e temperadas têm demonstrado que várias espécies de fungos são consideradas tipicamente endófitas. Esses resultados evidenciam

que as plantas representam um dos maiores reservatórios de espécies de fungos e sugerem que os fungos endófitos possam ser uma rica fonte de espécies não descritas. Como a diversidade botânica é maior em regiões tropicais, o potencial de hospedeiros tropicais abrigarem novas espécies de fungos mostra-se bastante amplo.

Em relação ao *Theobroma cacao* L., os trabalhos existentes sobre a comunidade de fungos endófitos discutem dois principais temas: interação com os principais patógenos, *Moniliophthora perniciosa* (Rubini et al., 2005) e *Phytophthora* sp. (Arnold et al., 2003), e caracterização taxonômica (Rubini et al., 2005; Crozier et al., 2006; Samuels et al., 2006). O estudo da composição e da diversidade da comunidade de fungos endófitos associados a cacauzeiros ainda é negligenciado.

Este estudo foi realizado com os objetivos de: comparar a comunidade de fungos endófitos associados a folhas e a hastes de cacauzeiro em vegetação nativa e em área de monocultivo, para verificar se há diferenças na riqueza e na abundância das espécies endófitas entre ambas as comunidades; comparar o padrão de colonização dos tecidos estudados pelos fungos endófitos; e verificar a utilização de dois diferentes métodos de isolamento de fungos em estudos de diversidade da comunidade endófitas. Os resultados podem proporcionar informações sobre a distribuição dos endófitos nos tecidos investigados e a sua interação com os cacauzeiros nativos e sob o sistema de cultivo, além de criar oportunidades para pesquisas futuras que visam à prospecção de agentes potenciais como estratégia alternativa de controle biológico e de compostos químicos bioativos de interesse industrial e farmacológico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fungos endófitos e interação com a planta hospedeira

As interações entre plantas e microrganismos já são conhecidas há muito tempo. Com exceção da associação de plantas com fungos micorrízicos, acreditava-se inicialmente que estas interações resultavam na formação de lesões nos tecidos dos hospedeiros (Rayner, 1948). Entretanto, mais recentemente, vem sendo registrada a presença de microrganismos no interior de tecidos vegetais saudáveis, abrindo novas perspectivas para o estudo da interação planta-microrganismo (Arnold et al., 2000).

De Bary (1866) foi o primeiro a citar o termo endófito (citado por Fröhlich et al., 2000) que caracterizava qualquer organismo verificado no interior de tecidos vegetais. Ao longo do tempo, a definição de endófito compreendeu novas caracterizações sendo a mais abrangente proposta por Petrini et al. (1992), que inclui todos os organismos que durante um período de seu ciclo de vida colonizam o interior dos tecidos vivos de seus hospedeiros sem causarem sintomas de doenças. Esta definição abrange microrganismos que têm uma fase epífita e também aqueles patógenos latentes que poderiam viver em seus hospedeiros assintomaticamente, por um período do seu ciclo vital. Como indicado pela definição do termo endófito, além dos fungos filamentosos, compreendem também outros microrganismos como leveduras e, especialmente, bactérias (Chanway, 1996).

A interação endófito-hospedeiro pode ser caracterizada como uma simbiose extremamente dinâmica, por todo o ciclo de vida do vegetal (Petrini, 1991), a qual tem sido classificada desde um parasitismo ao mutualismo (Schulz et al., 1999). Esta relação de parasitismo envolve a infecção latente de plantas por fungos tipicamente patógenos causando o mínimo de prejuízo para o hospedeiro, mas não apresentando sintomas de doenças. A distinção entre

fungos endófitos e patógenos latentes nem sempre é clara (Azevedo et al., 2000), uma vez que muitas espécies conhecidas como patógenos são normalmente recuperadas de tecidos vegetais saudáveis, junto a outros fungos tipicamente endófitos (Lodge et al., 1996; Rodrigues, 1994; Rodrigues & Samuels, 1999; Santos et al., 2003).

O tipo de relação ecológica existente na interação endófito-hospedeiro é dependente do nível de virulência do fungo, da resposta de defesa do hospedeiro, além de fatores ambientais que influenciam no caráter fenotípico de ambos (Schulz & Boyle, 2005). Estudos relatam que gramíneas e ciperáceas apresentam uma relação de mutualismo com algumas espécies de fungos. Tais endófitos são conhecidos como *Balansiaceous* e incluem ascomicetos da família Balansiaceae pertencentes aos gêneros *Epichloë* e *Balansia*, e seus anamorfos *Neotyphodium* e *Ephelis*. Estes fungos colonizam seus hospedeiros de maneira sistêmica e, muitas vezes, são capazes de colonizar o interior de sementes, sendo transmitidos verticalmente, de geração a geração, em conjunto com a sua hospedeira (Schulz & Boyle, 2005). Como retribuição à proteção, à nutrição e à garantia a disseminação, os fungos endófitos produzem toxinas que, uma vez dispersas pelos órgãos das plantas, conferem benefícios (Barker & Addison, 1996; Clay, 1988).

No caso de arbustos, árvores e plantas herbáceas, os fungos endófitos associados são conhecidos como *não-balansiaceous* e incluem aquelas espécies, em grande parte, pertencentes ao grupo Ascomycota (Schulz & Boyle, 2005). Este grupo de fungos, normalmente, coloniza porções restritas dos tecidos internos de suas plantas hospedeiras e raramente é transmitido via semente. Nesta situação, sua transmissão ocorre horizontalmente através de esporos que são dispersos principalmente pela chuva e por correntes de ar (Arnold & Herre, 2003), os quais penetram os tecidos da planta via aberturas naturais ou pelo uso de um aparato enzimático (Petrini et al., 1992). Conseqüentemente, a composição

da comunidade endófitas pode variar de acordo com a distribuição geográfica (Arnold & Lutzoni, 2007; Fröhlich et al., 2000; Taylor et al., 1999) e a idade do hospedeiro/tecido (Taylor et al., 1999), além das condições ecológicas e sazonais (Rodrigues, 1994; Murali et al., 2007).

Os endófitos pertencentes a este grupo apresentam uma maior diversidade de espécies do que os *Balansiaceae* (Schulz & Boyle, 2005). Devido a essa diversidade, a maioria dos trabalhos tem se direcionado mais para estudos de composição de espécies e de padrões de distribuição, do que as relações e as funções exercidas pelos endófitos sobre seus hospedeiros (Arnold, 2005; Fröhlich et al., 2000; Taylor et al., 1999). Mesmo que defendida por alguns autores (Arnold et al., 2003; Rubini et al., 2005), a existência de mutualismo entre plantas lenhosas e seus endófitos não é tão clara como no caso de gramíneas e ciperáceas.

Frente à grande diversidade de fungos endófitos existentes em plantas arbóreas e considerando que o interior de vegetais ainda consiste em um hábitat pouco explorado (Hawksworth & Rossman, 1997), o estudo desses microrganismos tem atraído a atenção de diversos pesquisadores interessados na caracterização de novas espécies. Diversos autores propõem estimativas do número global de espécies de fungos, com base em estudos conduzidos em ecossistemas de regiões temperadas (Zhou & Hyde, 2001). Do total estimado de 1,5 milhão de espécies de fungos, apenas 5% são espécies descritas (Hawksworth, 2001).

Para muitos micologistas, as florestas tropicais abrigam grande diversidade de fungos, uma vez que apresentam grande diversidade de espécies botânicas (Arnold et al., 2000; Arnold, 2005). Esta hipótese não foi rigorosamente testada, embora estudos forneçam evidências plausíveis (Arnold & Lutzoni, 2007; Hawksworth & Rossman, 1997).

Comparando a comunidade de fungos endófitos de hospedeiros de regiões de clima tropical e de clima temperado, estudos têm demonstrado diferenças marcantes na composição de espécies de endófitos (Rodrigues & Petrini, 1997). Os hospedeiros de regiões temperadas abrigam endófitos pertencentes a diversas classes de ascomicetos e com baixa diversidade no nível de espécie, enquanto que nos hospedeiros tropicais há grande diversidade de espécies pertencentes a poucas classes de ascomicetos (Arnold & Lutzoni, 2007). Quando as comunidades de fungos endófitos de hospedeiros de distribuição contínua e disjunta são analisadas, verifica-se uma similaridade na riqueza, mas com variação na abundância relativa das espécies, em que a segunda população de hospedeiros apresenta reduzida comunidade de fungos endófitos (Taylor et al., 1999).

2.2 Isolamento e caracterização taxonômica de fungos endófitos

A desinfecção superficial dos tecidos vegetais é o primeiro passo no processamento das amostras para o isolamento de fungos endófitos, visando à eliminação de microrganismos epifíticos. Diversos são os métodos existentes para o processo de desinfecção superficial, no entanto, o procedimento mais comum emprega, inicialmente, um surfactante, como o etanol, seguido por um agente desinfetante, como o hipoclorito de sódio e rápida lavagem final, novamente com o etanol (Schulz & Boyle, 2005).

Em seguida ao processo de desinfecção superficial do tecido vegetal, os mesmos são fragmentados e transferidos assepticamente para placas de Petri contendo meio de cultura adequado. Comumente utiliza-se, na literatura, o ágar extrato de malte, ou MEA (geralmente a 2%) (Fröhlich et al., 2000; Petrini et al., 1992). A metodologia de isolamento amplamente empregada nos diversos trabalhos de fungos endófitos é aquela em que o material vegetal é fragmentado

em poucos milímetros de diâmetro (Arnold & Lutzoni, 2007; Fröhlich et al., 2000; Taylor et al., 1999).

Estudos recentes demonstram que o tamanho dos fragmentos dos tecidos vegetais utilizados no isolamento de fungos endófitos em meio de cultura tem importante efeito sobre o número de espécies isoladas. Carroll (1995) e Gamboa *et al.* (2002) observaram que a diminuição do tamanho dos fragmentos de tecido vegetal, de maneira a aumentar a superfície de contato com o meio de cultura, aumenta também a chance de recuperação de um maior número de isolados por unidade de área amostrada. Além do aumento da superfície de contato, a redução do fragmento poderia reduzir a competição entre os fungos, uma vez que muitos fungos presentes nos fragmentos podem estar sendo inibidos pelo desenvolvimento de outras espécies de crescimento mais rápido, ou simplesmente permanecerem contidos no interior do fragmento vegetal, passando despercebidos pelos pesquisadores.

O método de trituração e filtração de partículas, baseado no método de filtração de partículas usualmente empregado no isolamento de fungos do solo, tem se mostrado eficiente em gerar fragmentos finamente particulados de amostras vegetais. Tal método baseia-se na lavagem e na filtração dos colóides de solo e sua separação em uma série de filtros ou peneiras, com aberturas de malha progressivamente menores, sendo as partículas recuperadas no filtro de menor abertura de malha transferidas para o meio de cultura adequado (Bååth, 1988). Resultados satisfatórios foram observados utilizando esta metodologia para o isolamento de fungos em amostras de líquens (Petrini et al., 1990), serrapilheira (Bills & Polishook, 1994; Paulus et al., 2003) e em tecidos frescos de plantas para estudos de comunidade endófito (Abreu, 2005).

A maioria das espécies de fungos endófitos isolados e identificados pertence ao filo Ascomycota, em grande parte recuperada em sua fase

anamórfica (Petrini et al., 1992; Bills, 1996). Fungos pertencentes ao grupo dos basidiomicetos são mais frequentemente isolados de caules de plantas arbóreas (Bills, 1996). Membros do grupo oomicetos e zigomicetos são isolados como endófitos muito esporadicamente (Sinclair & Cerkauskas, 1996).

As espécies de fungos mais frequentemente recuperadas como endófitos que colonizam órgãos aéreos de diversos hospedeiros tropicais são também espécies patogênicas conhecidas de diversas culturas, dentre as quais se destacam os gêneros *Colletotrichum*, *Idriella*, *Phoma*, *Phomopsis* e *Phyllosticta* (Mendes et al., 1998; Rodrigues & Petrini, 1997). Tais fungos presentes em plantas saudáveis parecem desenvolver uma infecção latente em seus hospedeiros (Petrini, 1991). Espécies pertencentes à família Xylariaceae também são comuns e diversas em plantas de regiões tropicais e têm sido recuperadas em tecidos vivos de seus hospedeiros (Petrini et al., 1995).

Sapróbios primários, tais como *Cladosporium herbarum*, *Aureobasidium pullulans* e *Alternaria alternata* (Rodrigues & Petrini, 1997), além de outros fungos menos comuns, de identificação difícil ou cuja descrição tenha sido feita após seu isolamento, também têm sido recuperados como endófitos (Hata *et al.*, 2002; Rodrigues, 1994; Sherwood-Pike et al., 1986). A ocorrência de muitos micélios estéreis nos isolamentos de endófitos pode estar relacionada a fatores nutricionais e à ausência de condições laboratoriais favoráveis à esporulação dos fungos em meio de cultura (Bills, 1996).

2.3 O cacaueteiro: botânica e importância econômica

O cacaueteiro (*Theobroma cacao* L., Malvaceae) é uma espécie arbórea de clima tropical, originária das florestas úmidas da América do Sul. A nomenclatura genérica *Theobroma*, que significa alimento dos deuses, foi cunhada por Linnaeus, tendo em vista a crença indígena na origem divina do

cacaueiro (Dias, 2001). O seu processo de domesticação é relativamente recente, com os registros históricos apontando a América Central como a sede dos primeiros cultivos de cacau, iniciados há mais de dois mil anos (Dias, 2001).

Apresenta tronco liso e altura superior a quinze metros, em vegetação nativa e, em área de monocultivo, pode alcançar de 5 a 8 metros (Purdy & Schmidt, 1996). Suas folhas são grandes, oblongas e membranáceas e as suas flores são pequenas, se inserindo sobre o tronco e ramos, onde também surgem os frutos de tamanho e de formato variável, contendo de 30 a 50 sementes envoltas por uma polpa doce (Purdy & Schmidt, 1996).

A sua cultura é economicamente importante nas Américas do Sul e Central, na África e na Ásia, sendo as suas amêndoas a principal matéria-prima para a indústria de chocolate. Além disso, o cacau é consumido, também, na produção da manteiga de cacau, polpa, licor e achocolatados, entre outros produtos (Santos, 2005). Em 1750, o cacaueiro foi introduzido no sudeste da Bahia e, até meados de 1989, o cacau foi o principal produto agrícola gerador de capital, chegando a constituir mais de 50% da exportação para o estado (Luz et al, 2006).

Diversas doenças, como vassoura-de-bruxa, podridão parda, monilíase e morte-descendente, são responsáveis pela diminuição da qualidade e quantidade da produção das lavouras cacaueiras nas Américas (Dias, 2001). Entre essas doenças, a vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, é considerada um dos principais e mais sérios problemas fitopatológicos que atingem o cacaueiro, podendo ocasionar perdas na produção de 70%-90% (Rudgard et al., 1993). Essa perda significativa na produção de cacau tem gerado um sério e grande problema socioeconômico para o estado da Bahia (Luz et al, 2006). O desequilíbrio no sistema cacaueiro e a conseqüente queda dos preços do produto no mercado externo provocaram sérios impactos na economia

regional, uma vez que o número de empregos diretos e indiretos sofreu rápida redução de mais de 50% (Moreira & Trevizan, 2005).

2.4 Endófitos do cacauero

Os estudos abrangendo a comunidade de fungos endófitos associados a *T. cacao* são direcionados a duas principais discussões: (i) interação com os principais patógenos da cultura cacauera, *M. pernicioso* (Rubini et al., 2005) e *Phytophthora* sp. (Arnold et al., 2003) e (ii) caracterização taxonômica (Crozier et al., 2006; Rubini et al., 2005; Samuels et al., 2006).

Em estudo conduzido por Arnold et al. (2003) foi demonstrado o antagonismo *in vivo* de fungos endófitos isolados de folhas maduras de cacauero contra *Phytophthora* sp. Este estudo recebeu destaque internacional, pelo fato de ter postulado que fungos endófitos de plantas lenhosas exercem importante papel na proteção do hospedeiro contra fitopatógenos, diminuindo consideravelmente os índices de incidência da doença em mudas previamente inoculadas com fungos endófitos (Clay, 2004).

Outro estudo verificou, com sucesso, o antagonismo de fungos endófitos contra o patógeno *M. pernicioso*. O endófito *Gliocladium catenulatum* (= *Clonostachys rosea*) reduziu a incidência da doença vassoura-de-bruxa em plântulas de cacauero em até 70%. Além desta espécie, muitas outras foram recuperadas de ramos de cacaueros assintomáticos e sintomáticos da doença vassoura-de-bruxa coletados na região sul da Bahia. Por meio da metodologia de explantes, foi recuperado o total de 134 endófitos, pertencentes a 23 gêneros, dos quais 21 foram ascomicetos e dois basidiomicetos, além de outros fungos não identificados (Rubini et al., 2005).

Estudos de isolamento de fungos endófitos também foram conduzidos em cacaueros em vegetação nativa. Nos troncos de cacaueros peruanos foram recuperadas duas espécies novas pertencentes ao gênero *Trichoderma* (*T.*

paucisporum e *T. theobromicola*) (Samuels et al., 2006). Em caule e em frutos de cacauzeiros cultivados e nativos, foram recuperados 854 isolados, dos quais 65% dos fungos não puderam ser identificados por caracteres morfológicos. Por meio do seqüenciamento da região ITS do rDNA, a maioria dos fungos foi identificada como basidiomicetos. Neste estudo, os autores verificaram uma composição da comunidade de endófitos associados ao cacauzeiro bem distinta daquela observada em outros hospedeiros tropicais (Crozier et al., 2006). Dessa forma, a ênfase dada ao trabalho foi a classificação dos endófitos basidiomicetos.

Não há informações sobre a composição, a diversidade e a distribuição dos fungos endófitos associados ao cacauzeiro, apesar da importância socioeconômica da cultura. O uso da metodologia de trituração e filtração de partículas, em estudos de diversidade de fungos endófitos, ainda é incipiente e mostrou-se eficiente para a detecção e o isolamento de grande número de unidades formadoras de colônias e de espécies (Abreu, 2005).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. M. de. **Diversidade de fungos endófitos associados à planta parasita *Phoradendron perrottettii* (D.C.) Eichler e sua hospedeira *Tapirira guianensis* Aubl.** 2005. 86 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ARNOLD, A. E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v. 3, p. 267-274, 2000.

ARNOLD, A. E.; HERRE, E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, v. 95, p. 388-398, 2003.

ARNOLD, A. E.; MEDJÍA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 100, p. 15649-15654, 2003.

ARNOLD, A. E. Diversity and Ecology of fungal endophytes in tropical forests. In: DESHMUKH, S.; RAI, M. K. (Ed.). **Biodiversity of fungi; their role in human life**. New Delhi: Oxford & IBH, 2005. p. 49-68.

ARNOLD, A. E.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v. 88, p. 541-549, 2007.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal Biotechnology**, v. 3, n. 11, 2000. Disponível em: <<http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/4>>. Acesso em: 10 jul. 2006.

BÅÅTH, E. A critical examination of the soil washing technique with special reference to the effect of the size of the soil particles. **Canadian Journal of Botany**, v. 66, p. 1566-1569, 1988.

BARKER; G. M.; ADDISON, P. J. Influence of clavicipitaceous endophyte infection in ryegrass on development of the parasitoid *Microctonus hyperodae*

- Loan (Hymenoptera: *Braconidae*) in *Listronotus bonariensis* (Kuschel) (Coleoptera: Curculionidae). **Biological Control**, v. 7, p. 281-287, 1996.
- BERNSTEIN, M. E.; CARROLL, G. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. **Canadian Journal of Botany**, v. 55, p. 644-653, 1977.
- BILLS, G. F. Isolation and analyses of endophytic fungal communities from wood plants. In: REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. (Ed.). **Endophytic fungi in grasses and woody plants**, St. Paul, MN: APS, 1996. p. 31-65.
- BILLS, G.F.; POLISHOOK, J. D. Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. **Mycologia**, v. 86, p. 187-198, 1994.
- CARROLL, G. C. Forest endophytes: pattern and process. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. S1316-S1324, 1995. Supplement 1.
- 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. 3034-3043, 1978.
- CHANWAY, C. P. Endophytes: they're not just fungi! **Canadian Journal of Botany**, v. 74, p. 321-322, 1996.
- CLAY, K. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. **Ecology**, v. 69, p. 10-16, 1988.
- CLAY, K. Fungi and the food of the gods. **Nature**, v. 427, p. 401-402, 2004.
- CROZIER, J.; THOMAS, S. E.; AIME, M. C.; EVANS, H. C.; HOLMES, K. A. Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. **Plant Pathology**, v. 55, p. 783-791, 2006.
- DIAS, L. A. S. **Melhoramento Genético do cacaueteiro**. Viçosa: Folha de Viçosa, 2001. 578p.
- FRÖHLICH, J.; HYDE, K.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with palms. **Mycological Research**, v. 104, p. 1202-1212, 2000.
- GAMBOA, M. A.; LOUREANO, S.; BAYMAN, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? **Mycopathologia**, v. 156, p. 41-45, 2002.

HATA, K.; ATARI, R.; SONE, K. Isolation of endophytic fungi from leaves of *Pasania edulis* and their within-leaf distributions. **Mycoscience**, v. 43, p. 369-373, 2002.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 102, p. 1422-1432, 2001.

HAWKSWORTH, D. L.; ROSSMAN, A. Y. Where are all the undescribed fungi? **Phytopathology**, v. 87, p. 888- 891, 1997.

KOBAYASHI, D. Y.; PALUMBO, J. D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: BACON, C. W.; WHITE, J. F. (Ed.) **Microbial Endophytes**. New York: M. Dekker, 2000. p. 199-236.

LODGE, D. J.; FISHER, P. J.; SUTTON, B. C. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia*, v. 88, p. 733-738, 1996.

LUZ, E. D. M. N.; SOUZA, J. T.; OLIVEIRA, M. L.; BEZERRA, J. L.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Vassoura-de-bruxa do cacauzeiro: novos enfoques sobre uma velha doença. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 14, p. 59-111. 2006.

MARIA, G. L.; SRIDHAR, K. R. Endophytic fungal assemblage of two halophytes from west coast mangrove habitats, India. **Czech Mycology**, v. 55, n. 3/4, p. 241-251, 2003.

MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L.; DIANESE, J. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; SANTOS, C. E. N.; GOMES NETO, E., URBEN, A. F., CASTRO, C. **Fungos em plantas no Brasil**. Embrapa-SPI/Embrapa Cenargen, Brasília, 1998. 555p.

MOREIRA, G. L.; TREVISAN, S.D.P. O turismo nas cidades litorâneas. 2005. **Revista Turismo**. Disponível em:
<<http://revistaturismo.cidadeinternet.com.br/materiasespeciais/litoraneas.htm>.
Acesso em: 22 ago. 2005.

MURALI, T. S.; SURYANARAYANAN, T. S.; VENKATESAN, G. Fungal endophyte communities in two tropical forests of southern India: diversity and host affiliation. **Mycological Progress**, v. 6, p. 191-199, 2007.

PAULUS, B.; GADEK, P.; HYDE, K. Estimation of microfungi diversity in tropical rainforest leaf litter using particle filtration: the effects of leaf storage and surface treatment. **Mycological Research**, v. 107, p. 748-756, 2003.

- PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. (Eds.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer Verlag, 1991. p. 179-197.
- PETRINI, O.; HAKE, U.; DREYFUSS, M. An analysis of fungal communities isolated from fruticose lichens. **Mycologia**, v. 82, p. 444-451, 1990.
- PETRINI, O.; PETRINI, L. E.; RODRIGUES, K. F. Xylariaceous endophytes: na exercise in biodiversity. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 531-539, 1995.
- PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v. 1, p. 185-196, 1992.
- PURDY, L. H. ; SCHMIDT, R. A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. **Annual Reviews Phytopathology**, v. 34, p. 573-594, 1996.
- RAYNER, R. W. Latent infection in *Coffea arabica* L. **Nature**, v. 161, n. 4085, p. 245-246, 1948.
- RODRIGUES, K. F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleraceae*. **Mycologia**, v. 86, p. 376-385, 1994.
- RODRIGUES, K. F.; PETRINI, O. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. In: HYDE K. D. (Ed.). **Biodiversity of tropical microfungi**. Hong Kong: Hong Kong University, 1997. p. 57-69.
- RODRIGUES, K. F.; SAMUELS, G. J. Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. **Journal of Basic Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 131-135, 1999.
- RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Science**, v. 1, p. 24-33, 2005.
- RUDGARD, S.A., MADDISON, A.C.; ANDEBRHAN, T. **Disease management in cocoa: comparative epidemiology of witches' broom**. London: Chapman and Hall, 1993. 249p.

SAMUELS, G. J.; SUAREZ, C.; KARINA, S.; HOLMES, K. A.; THOMAS, E.; ISMAIEL, A.; EVANS, H.C. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species isolated from cacao in South America. **Mycological Research**, v. 110, p. 381-392, 2006.

SANTOS, R. M. G. dos; RODRIGUES-FO, E.; ROCHA, W. C.; TEIXEIRA, M. F. S. Endophytic fungi from *Melia azedarach*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 767-770, 2003.

SANTOS, S. C. **Caracterização de hidrofobinas do fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, causador da doença vassoura-de-bruxa no cacauero**. 2005. 53p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, p. 661-686, 2005.

SCHULZ, B.; RÖMMERT, A. K.; DAMMANN, U.; AUST, H. J.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? **Mycological Research**, v. 103, n. 10, p.1275-1283, 1999.

SHERWOOD-PIKE, M.; STONE, J. K.; CARROLL, G. C. *Rhabdocline parkeri*, a ubiquitous foliar endophyte of Douglas fir. **Canadian Journal of Botany**, v. 64, p. 1849-1855, 1986.

SINCLAIR, J. B.; CERKAUSKAS, R. F. Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. In: REDLIN, S.C.; CARRIS, L. M. (Ed.). **Endophytic fungi in grasses and woody plants**. St. Paul MN: APS, 1996. p. 3-29.

STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE, J. F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: BACON, C. W.; WHITE, J. F. (Ed.). **Microbial endophytes**. New York: M. Dekker, 2000. p. 3-30.

TAYLOR, J. E.; HYDE, K. D.; JONES, E. B. G. Endophytic fungi associated with the temperate palm *Trachycarpus fortunei* within and outside its natural geographic range. **New Phytologist**, v. 142, p. 335-346, 1999.

ZHOU, D.; HYDE, K. D. Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. **Mycological Research**, v. 12, p. 1449-1457, 2001.

CAPÍTULO 2

COMUNIDADE DE FUNGOS ENDÓFITOS ASSOCIADOS AO CACAUEIRO EM VEGETAÇÃO NATIVA E SOB O SISTEMA DE MONOCULTIVO

Comunidade de fungos endófitos associados ao cacauero em vegetação nativa e sob o sistema de monocultivo (Preparado de acordo com as normas da revista “*Brazilian Journal of Microbiology*”)

Loise A. Costa¹, Lucas M. de Abreu³, Ana Karla F. M. Machado¹ & Ludwig H. Pfenning²

¹ Departamento de Biologia; ² Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras; ³ Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Autor para correspondência: Ludwig H. Pfenning (ludwig@ufla.br)

1 RESUMO

COSTA, Loise Araujo. Comunidade de fungos endófitos associados ao cacauero em vegetação nativa e sob o sistema de monocultivo. In: _____. **Fungos endófitos associados ao cacauero**. 2008. Cap. 2, p. 18-61. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Foi objetivo desse trabalho comparar a composição e diversidade de fungos endófitos em folhas e hastes de *Theobroma cacao* em vegetação nativa, na região de Manaus, Amazonas, e em área de monocultivo, na região de Itabuna, Bahia. O isolamento dos fungos endófitos foi realizado por meio de explantes, totalizando 3.600 fragmentos, e também pelo método de trituração e filtração de partículas, totalizando 120 placas cada. Aproximadamente 5.700 CFUs pertencentes a 114 espécies e morfoespécies distintas foram detectadas, das quais 65 foram encontradas no cacauero cultivado e 74 no cacauero nativo. Espécies de *Phomopsis* e *Glomerella cingulata* foram dominantes em ambas as áreas estudadas. As comunidades de endófitos associados ao cacauero das diferentes áreas foram mais similares entre as amostras de folhas. A análise multivariada de correspondência evidenciou a preferência das espécies mais frequentes por algum tipo de tecido e área estudada. A espécie *Lasioidiplodia theobromae* predominou em hastes do cacauero nativo, e as folhas exibiram a maior diversidade de espécies nesse ambiente. Já para o cacauero cultivado a diversidade foi maior nas hastes. O elevado número de espécies e a abundância de isolados da comunidade de fungos endófitos associados ao cacauero cultivado, comparável à área nativa, indica que o sistema agrícola de monocultivo parece não interferir na diversidade dos endófitos do cacauero. O emprego de mais de um método de isolamento nos estudos de comunidades de endófitos é favorável, de forma que permitiu uma melhor amostragem da real diversidade de fungos presentes em tecidos de cacaueros.

* Comitê Orientador: Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning – UFLA (orientador), Lucas Magalhães de Abreu – UFLA (Co-orientador).

2 ABSTRACT

COSTA, Loise Araujo. Community of endophytic fungi associated to the cocoa tree under natural vegetation and monoculture. In: _____. **Fungal endophytes associated to the cocoa tree**. 2008. Cap. 2, p. 18-61. Dissertation (Master Degree in Agricultural Microbiology) - Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.

The objective of this work was to compare endophytic fungi in leaves and twigs of the cocoa tree in a native stand and under conditions of monoculture. Six samples of each plant material were collected in the region of Manaus AM, and Itabuna BA, Brazil. For isolation of fungi, samples were submitted after a superficial disinfection to two techniques, using explants and the particle trituration and filtration method. From about 5.700 colony-forming units 114 species have been identified, being 65 from cultivated trees and 75 from trees growing in natural conditions. Species of *Phomopsis* and *Glomerella cingulata* were dominant in both areas studied. A multivariate correspondence analysis evidenced preference of most frequent species to a particular area or plant tissue. *Lasiodiplodia theobromae* was dominant in twigs of native trees, where leaves also showed a higher diversity of species. In the cultivated area, diversity was higher in twigs. Communities of endophytes in leaves of both areas were more similar than that of twigs. An elevated number of species and abundance of isolates recovered from the cultivated area indicate that crop management in monoculture may not influence on the diversity of endophytic fungi in the cocoa tree. The use of two different isolation techniques allowed a more reliable assessment of endophytes present in leaves and twigs in this important tropical crop.

*Guidance Committee: Ludwig H. Pfenning - UFLA (Advisor), Lucas Magalhães de Abreu - UFLA (Co-Advisor)

3 INTRODUÇÃO

Fungos endófitos vivem no interior de tecidos saudáveis de plantas e são capazes de colonizar órgãos aéreos e subterrâneos de suas hospedeiras sem causarem sintomas aparentes de doenças (Petrini et al., 1992). Esta definição abrange microrganismos que têm uma fase epífita e também aqueles patógenos latentes que poderiam viver em seus hospedeiros assintomaticamente, por um período do seu ciclo vital. Como indicado pela definição do termo endófito, além dos fungos filamentosos, eles compreendem também as leveduras, que são raramente citadas na literatura (Chanway, 1996) e as bactérias (Kobayashi & Palumbo, 2000).

A interação endófito-hospedeiro pode ser caracterizada como uma simbiose extremamente dinâmica, por todo o ciclo de vida do vegetal (Petrini, 1991), a qual tem sido classificada desde um parasitismo latente ao mutualismo (Schulz et al., 1999). Os fungos associados a gramíneas apresentam relação de mutualismo com os seus hospedeiros e, devido à sua importância econômica, a taxonomia e a ecologia deste grupo têm sido extensivamente estudadas (Cheplick & Clay, 1988; Schulz & Boyle, 2005). Estes fungos são transmitidos verticalmente e podem beneficiar as gramíneas hospedeiras, por conferirem resistência a estresse hídrico (McInroy & Kloepper, 1995), aumento da tolerância a metais pesados no solo e proteção contra herbívoros invertebrados e vertebrados (Azevedo et al., 2000; Carroll, 1988).

Endófitos que colonizam arbustos e plantas arbóreas são transmitidos horizontalmente, por meio de propágulos aéreos de fungos que colonizam porções restritas nos tecidos dos hospedeiros e apresentam maior diversidade de espécies do que os endófitos associados a gramíneas (Schulz & Boyle, 2005). Entretanto, este grupo de endófitos ainda é pouco conhecido, especialmente

aqueles associados às angiospermas, de forma que a natureza da interação com as plantas hospedeiras, a ecologia e a composição taxonômica não têm sido caracterizadas em detalhe.

Muitos trabalhos abrangendo o isolamento de endófitos de plantas lenhosas de regiões tropicais e temperadas têm demonstrado que várias espécies de fungos são consideradas tipicamente endófitas (Rodrigues & Petrini, 1997). Esses resultados evidenciam que as plantas representam um dos maiores reservatórios de espécies de fungos e sugerem que os fungos endófitos possam ser uma rica fonte de espécies não descritas (Arnold et al., 2000). Para muitos pesquisadores, a diversidade deste grupo de microrganismos é maior nas florestas tropicais, onde há ampla e imensurável diversidade de espécies botânicas (Arnold et al., 2000; Arnold & Lutzoni, 2007). O potencial de hospedeiros tropicais de abrigarem novas espécies de endófitos mostra-se bastante amplo e não deve ser negligenciado. Entretanto, estudos em áreas tropicais ainda são incipientes (Arnold et al., 2000; Arnold & Lutzoni, 2007, Schulz & Boyle, 2005; Suryanarayanan et al., 2002).

Em relação ao cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.), não há relatos sobre a composição, a diversidade e a distribuição dos endófitos nos diferentes tecidos. Dessa forma, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de investigar qualitativamente e quantitativamente os fungos endófitos em folhas e em hastes de cacauzeiros em vegetação nativa e em área de monocultivo, para verificar se o ambiente influencia a estrutura das comunidades de endófitos e se há diferenças no padrão de colonização dos tecidos e áreas estudados pelos fungos. Além disso, buscou-se avaliar o emprego de dois distintos métodos de isolamento de fungos, um baseado na fragmentação do material vegetal e o outro na trituração e na filtração de partículas, em estudos de diversidade de endófitos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de coleta e amostragem

Seis árvores de *T. cacao* em área de monocultivo e seis árvores presentes em vegetação nativa foram selecionadas para o estudo. As coletas foram realizadas nos meses de abril e dezembro de 2007, para o cacauzeiro cultivado e nativo, respectivamente.

Os cacauzeiros em área de monocultivo estavam localizados em uma unidade experimental da Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira (CEPLAC), situada em Itabuna, BA. Nesta área de estudo, a população de cacauzeiro é bastante homogênea, sendo o sistema de cultivo utilizado denominado *cabruca*. As árvores utilizadas para compor o sombreamento da cultura cacaueira na área coletada são do gênero *Erythrina*. As seis árvores amostradas já haviam atingido o estágio reprodutivo, apresentavam a mesma altura e idade, e encontravam-se dispostas a uma distância superior a 150 m, umas das outras. De cada árvore, dois ramos plagiotrópicos, de aproximadamente um metro de comprimento, foram coletados aleatoriamente.

A coleta das amostras em vegetação nativa foi realizada em uma reserva em Manaus, AM. Esta área de coleta faz parte da floresta Amazônica sendo caracterizada pela grande diversidade de espécies botânicas e sem o estabelecimento de qualquer sistema de cultivo. A população de cacauzeiro nesta área de coleta é bastante heterogênea, marcada pela grande diversidade genética existente, uma vez que esta região faz parte do seu centro de origem (Bartley, 2005). As árvores amostradas encontravam-se dispersas na floresta e sob a cobertura vegetal. Todas as árvores apresentavam alturas similares e já haviam atingido o seu estágio reprodutivo. De cada árvore foram amostradas folhas e hastes, de ramos plagiotrópicos, aleatoriamente.

Após a coleta do material vegetal, o mesmo foi acondicionado em sacos de papel devidamente identificados (número da amostra e local de coleta) e transportado para o Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, situado na Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG, onde foi submetido ao processo de isolamento dos fungos endófitos.

4.2 Metodologias de isolamento dos fungos endófitos

Para o isolamento dos fungos endófitos foram utilizadas duas metodologias distintas, a inoculação de fragmentos vegetais de alguns milímetros (explantes) em meio de cultura e a trituração e filtração do material vegetal seguida da inoculação das partículas em meio de cultura. O uso de dois métodos de isolamento de fungos endófitos foi realizado no intuito de recuperar uma maior diversidade de espécies presentes nas amostras e também para testar a hipótese de Carroll (1995) e Gamboa et al. (2002) de que o tamanho do tecido vegetal inoculado no meio de cultura (explantes de alguns milímetros ou material finamente particulado) influencia no número de espécies isoladas.

Folhas maduras, situadas a partir do quarto par de folhas dos ramos plagiotrópicos, coletadas de cacauzeiros em área de monocultivo e folhas no mesmo estágio de maturação, coletadas de cacauzeiros em vegetação nativa, foram utilizadas para o isolamento dos fungos endófitos, em ambas as metodologias. As extremidades das hastes foram cortadas e descartadas e a região central foi escolhida para o processamento. O método de desinfecção superficial utilizado foi similar àqueles descritos nos diversos estudos de endófitos (Schulz et al., 1993), com algumas modificações: etanol 70%, por 1 minuto; solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, por 5 minutos, para o material foliar e 3 minutos para as hastes, após uma raspagem superficial da casca; etanol a 70% por mais 0,5 minuto e, por fim, três sucessivas lavagens em água destilada estéril.

De cada cacauero amostrado foram obtidos 150 discos de folhas de 5 mm de diâmetro e 150 fragmentos de hastes de, aproximadamente, 5 mm de extensão. Cinco discos de folhas ou fragmentos de hastes foram transferidos para placas de Petri, de poliestireno de 90 mm de diâmetro, contendo meio de cultura extrato de malte 2% (MA2) (Biobrás) acrescido de 50 mg/L de cloranfenicol (Sigma-Aldrich) e de 50 mg/L de sulfato de estreptomicina (Vetec – Química Fina), para suprimir o crescimento de bactérias, e de 10 mg/L de ciclosporina (Sigmosporin Microoral, Novaquímica - Sigma Pharma), para retardar o crescimento micelial daqueles fungos que desenvolvem rapidamente (Bills, 1996). Um total de 3600 fragmentos foi analisado, sendo, para cada área de estudo, 900 discos de folhas e 900 fragmentos de hastes.

A segunda metodologia utilizada neste estudo é uma adaptação da metodologia de lavagem de solo, empregada para o isolamento de fungos (Bååth, 1988), e já foi utilizada com grandes resultados para o isolamento de fungos de serrapilheira (Bills e Polishook, 1994; Paulus et al., 2003) e de fungos endófitos (Abreu, 2005).

Após a desinfestação superficial das amostras vegetais, uma porção de 10 gramas de folhas e hastes, acrescidos de 100 mL de água destilada estéril, foi triturada por dois minutos com o emprego de um liquidificador. O material triturado foi submetido a uma lavagem com jato de água destilada em um conjunto filtrante composto por cinco peneiras com diferentes aberturas de malha (1,0; 0,7; 0,5; 0,2; e 0,1 mm) por um minuto. As partículas retidas na peneira de menor abertura foram transferidas para tubo de centrífuga e suspensas em 50 mL de água destilada, agitadas e colocadas para decantar. O sobrenadante dos tubos foi descartado e a estes foram acrescidos 25 mL de água destilada autoclavada. Os tubos foram agitados em *vortex* por um minuto e colocados para decantar novamente. Este procedimento de lavagem de partículas foi repetido mais duas vezes e o material residual em cada tubo foi

aspticamente transferido para papel de filtro estéril e posto para secar em fluxo laminar. Ao fim da secagem das partículas, as mesmas foram transferidas para novos tubos de centrífuga e suspensas em 20 mL de água destilada estéril. Alíquotas de 100 µL das suspensões foram transferidas em cinco placas de Petri contendo meio de cultura MA2 e espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalsky. Um total de 120 placas foi utilizado, sendo, para cada área de estudo, 30 placas referentes ao tecido foliar e 30 para as hastes.

A leitura das placas-mãe foi realizada diariamente, em ambas as metodologias utilizadas. Na metodologia de fragmentos, todas as unidades formadoras de colônias (CFUs) foram quantificadas e apenas representantes de cada espécie ou morfoespécie foram isolados. Na metodologia de trituração e filtração de partículas, todo crescimento micelial verificado foi transferido aspticamente para placas de Petri de poliestireno de 60 mm de diâmetro, contendo meio de cultura MA2. Os micélios estéreis foram transferidos para meios de cultura OA (*oatmeal agar* – ágar extrato de aveia) e AA (ágar água) (Guo et al., 2000) acrescido de um fragmento de folha de cravo estéril para induzir a esporulação (Leslie & Summerel, 2006). Aqueles fungos que, mesmo assim, não esporularam foram agrupados de acordo com caracteres culturais em morfoespécies. Isolados de todas as espécies recuperadas no estudo foram depositados na coleção de culturas da Coleção Micológica de Lavras (CML).

4.3 Análise dos dados

Para a análise da eficiência das metodologias de isolamento para a recuperação de espécies endófitas, foi realizada a divisão do número de CFUs pelo número de espécies recuperadas por cada método. O quociente obtido dessa divisão indicou quantas CFUs foram recuperadas, na determinada amostra, para que uma espécie de fungo fosse isolada.

Para mensurar a presença dos fungos endófitos recuperados pela metodologia de explantes nas áreas estudadas e nos tecidos amostrados (folhas e hastes) foram determinadas as taxas de colonização e de isolamento por meio das seguintes equações:

$$\text{Taxa de colonização} = \frac{\text{Número total de fragmentos da amostra contendo } \geq 1 \text{ fungo}}{\text{Número total de fragmentos da amostra}}$$

$$\text{Taxa de isolamento} = \frac{\text{Número total de fungos recuperados da amostra}}{\text{Número total de fragmentos da amostra}}$$

No presente estudo, apenas as taxas de colonização foram discriminadas em percentagem (Taylor et al., 1999).

O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para comparar o número de fungos isolados entre os diferentes tecidos e entre as áreas estudadas (Petrini et al., 1982). A similaridade das comunidades de endófitos dos diferentes tecidos e áreas foi verificada por meio dos índices de Jaccard, baseado em dados de presença e de ausência, e de Morisita-Horn, baseado na frequência (Arnold et al., 2003). Estes índices alcançam valores de 0 (nenhuma sobreposição da comunidade de endófitos entre as amostras) a 1 (sobreposição total da comunidade de endófitos).

A comparação da riqueza de espécies nas amostras com diferentes tamanhos e a observação da abrangência da amostragem, se a mesma foi representativa para a comunidade de fungos associadas a cada amostra, foram

realizadas por meio da construção de curvas de rarefação (Fröhlich et al., 2000; Taylor et al., 1999).

A estrutura das comunidades de fungos endófitos e os padrões de colonização nos diferentes tecidos e áreas estudadas foram avaliados com o auxílio da análise estatística multivariada de correspondência (Taylor et al., 1999; Fröhlich et al., 2000). Para tal análise, foram consideradas as espécies de fungos com uma frequência relativa de, no mínimo, 0,4% do número total de CFUs.

A distribuição de alguns fungos mais frequentemente isolados nos diferentes tecidos e áreas estudadas foi avaliada por meio do método gráfico *box plot* (Fröhlich et al., 2000). Por esta análise, é possível verificar se houve preferência dos endófitos analisados por tipo de tecido particular e população de cacaueteiro.

As análises foram realizadas com o auxílio dos programas MVSP (Kovach Computing, 1999), Biodiversity Pro 2 (Mc Alece, 1997), Minitab 14 (Minitab, 2003) e Estimates 7,5 (Colwell, 2005).

5 RESULTADOS

5.1 Metodologias de isolamento de endófitos

Com a metodologia de trituração e filtração de partículas foram isolados menos CFUs (1252), quando comparada com a metodologia de explantes (4417), no entanto, foi recuperado um maior número de espécies de fungos endófitos com esta metodologia (trituração e filtração de partículas). Da divisão do número de CFUs pelo número de espécies, obtiveram-se menores quocientes pela metodologia de trituração e de filtração de partículas. A amostra que apresentou o menor quociente foi o tecido foliar de cacauero de área cultivada, com 5,09 (Tabela 1).

5.2 Taxas de colonização e de isolamento

Dos 1.800 discos de folhas e 1.800 fragmentos de hastes de *T. cacao*, de ambas as áreas estudadas, obtidos pela metodologia de explantes, foram recuperadas 4.417 CFUs. A maior taxa de colonização total de tecidos de cacaueros foi na área de vegetação nativa, 90%. Quando se verificam as taxas de colonização de cada tecido vegetal particular, as folhas foram as que apresentaram a maior taxa na área de monocultivo, enquanto que, na área de vegetação nativa, a haste foi o tecido mais colonizado pelos fungos endófitos. As taxas de isolamento das hastes foram superiores às das folhas, em ambas as áreas. Entre 74% e 93% dos discos de folhas e fragmentos de hastes foram colonizados por pelo menos um fungo e grande número de fragmentos apresentou infecções múltiplas, com dois ou mais fungos por fragmento (Tabela 2).

5.3 Composição da comunidade de fungos endófitos

Utilizando as duas metodologias de isolamento de fungos, foram obtidas 5.669 CFUs pertencentes a 52 gêneros, 99 espécies e 15 morfoespécies. Esse total de morfoespécies corresponde a 630 isolados, dos quais 336 foram caracterizados apenas pela coloração do micélio e denominados micélio estéril e 294, pertencentes à família Xylariaceae, foram caracterizados de acordo com a textura e a coloração do micélio, além da sua taxa de crescimento em meio de cultivo.

A maioria dos fungos endófitos isolados e identificados pertencia ao filo Ascomycota (93%), sendo 11,3% dos fungos recuperados na fase sexuada e 88,7% na fase assexuada. Dentre os ascomicetos assexuados, 74,5% das espécies foram hifomicetos e 25,5%, celomicetos. Foram encontradas quatro conexões entre teleomorfo e anamorfo: *Phomopsis* spp/*Diaporthe* spp, *Colletotrichum gloeosporioides*/*Glomerella cingulata*, *Colletotrichum crassipes*/*Glomerella* sp. e *Clonostachys rosea*/*Bionectria ochroleuca*. Os basidiomicetos sexuados corresponderam a 1,7% do número total de CFUs e os micélios estéreis, a 5,3% (Tabela 3).

5.4 Diversidade

Do número total de 5.669 CFUs, 2.802 foram recuperadas de folhas e hastes de cacauzeiros presentes em área de monocultivo, com 65 espécies e morfoespécies identificadas, e 2.867 CFUs de cacauzeiros de área de vegetação nativa, pertencentes a 75 espécies e morfoespécies. O número de isolados entre as áreas estudadas não diferiu estatisticamente, pelo teste de Kruskal-Wallis ($P=0,908$). As amostras de hastes, em ambas as áreas de estudo, apresentaram um maior número de CFUs que as amostras de folhas (Tabela 3). Analisando o número de isolados entre os diferentes tecidos e entre as áreas estudadas, apenas

as amostras de folhas e hastes da área de vegetação nativa apresentaram diferença significativa, pelo teste de Kruskal-Wallis ($P=0,037$).

Espécies de *Phomopsis/Diaporthe* (29,92%), *Lasiodiplodia theobromae* (21,11%) e *Colletotrichum gloeosporioides/Glomerella cingulata* (17,06%) foram os táxons com maior frequência de isolamento (Tabela 3).

A comparação, baseada em dados de presença e ausência, das comunidades de endófitos entre os diferentes tecidos e entre as áreas estudadas, mostrou que folhas e hastes de cacauzeiro cultivado (Jaccard = 0,369) e folhas e hastes de cacauzeiro nativo (Jaccard = 0,347) foram as mais similares entre si. Quando esta comparação é realizada levando em consideração dados quantitativos, verifica-se que a similaridade entre as comunidades de endófitos de folhas e hastes de cacauzeiro nativo foi muito baixa (Morisita-Horn = 0,242), no entanto, as amostras de folhas de cacauzeiro nativo e cultivado apresentaram uma elevada sobreposição da comunidade de endófitos (Morisita-Horn = 0,904) (Tabela 4).

5.4.1 Análise da diversidade de espécies: Curva de rarefação

A comparação da diversidade de endófitos entre as áreas de monocultivo e de vegetação nativa apresentou um padrão esperado, em que a área de vegetação nativa contém um maior número de espécies (Figura 1). Entretanto, a diferença na riqueza de espécies apresentada entre as áreas foi muito pequena. Dentre os tecidos vegetais analisados, a haste, para a área de monocultivo, exibiu maior diversidade de espécies, enquanto para o cacauzeiro nativo a diversidade foi maior no tecido foliar (Figura 2).

5.4.2 Padrões de colonização

Os dois primeiros eixos representados no gráfico da análise multivariada de correspondência foram capazes de explicar 60,7% da inércia

(variabilidade) total dos dados (Figura 3). O primeiro eixo (o horizontal) separou as amostras de folhas das demais de hastes. As amostras de hastes de área de monocultivo e de vegetação nativa foram separadas também pelo primeiro eixo, mas, principalmente, pelo segundo eixo (o vertical). Assim, três principais grupos foram identificados pelo gráfico. O grupo mais destacado foi formado pelas amostras de folhas das áreas de monocultivo e de vegetação nativa (grupo a), indicando similaridade entre as comunidades de fungos endófitos das amostras. O segundo grupo distinto no gráfico corresponde às amostras de haste nativa (grupo b). O terceiro grupo evidenciado no gráfico foi formado pelas hastes de monocultivo (grupo c).

5.4.3 Preferência de colonização

Os fungos endófitos analisados apresentaram preferência de colonização por um determinado tipo de tecido vegetal, como confirmado pelo teste de Kruskal-Wallis. O táxon mais abundante neste estudo, *Phomopsis* spp, mostrou alta frequência em área de monocultivo, com maior número de isolados em amostras de hastes. A segunda espécie mais abundante, *L. theobromae*, mostrou preferência pelos tecidos lenhosos de hastes de área de vegetação nativa. *C. gloeosporioides* foi mais recorrente em amostras de folhas de ambas as áreas. Os fungos *Virgatospora echinofibrosa* e *Colletotrichum acutatum* apresentaram preferência pela área de monocultivo, tendo esta última espécie apresentado um maior número de isolados nas amostras de folhas e *V. echinofibrosa* mostrou-se específica para as hastes. *Fusarium decemcellulare* e *Clonostachys rosea* apresentaram preferência pelos tecidos de hastes das áreas de vegetação nativa e de monocultivo, respectivamente (Figura 4).

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos evidenciaram que o cacaueteiro abriga, no interior de seus tecidos, vasta diversidade de fungos endófitos, mesmo quando o hospedeiro é cultivado. As comunidades de endófitos em folhas de cacaueteiros nativos e cultivados apresentaram muito similares, tanto em termos de abundância quanto de espécies. Entretanto, para as amostras de hastes, esta similaridade não foi observada. Isso evidencia que os diferentes ambientes parecem influenciar na composição e na diversidade da comunidade de endófitos de uma mesma espécie hospedeira.

6.1 Metodologias de isolamento de endófitos

A grande maioria dos estudos de comunidades de fungos endófitos baseia-se na observação do crescimento de colônias a partir de fragmentos de tecido vegetal com poucos milímetros de extensão (Arnold & Lutzoni, 2007; Fröhlich et al., 2000; Taylor et al., 1999). A metodologia de trituração e filtração de partículas, inicialmente desenvolvida para o isolamento de fungos de solo, tem se mostrado eficiente em estudos envolvendo isolamento de fungos em serrapilheira. Nas florestas tropicais da Costa Rica, foi encontrada grande diversidade de fungos, 1.709 isolados pertencentes a 177 espécies e morfoespécies, associadas a diversos tipos de serrapilheira (Bills & Polishook, 1994). Resultado semelhante foi encontrado também em amostras de serrapilheira de *Neolitsea dealbata* na Austrália, onde foram recuperados 736 isolados, pertencentes a 112 morfoespécies de fungos (Paulus et al., 2003).

O método de trituração e filtração de partículas mostrou-se também viável para o isolamento de fungos endófitos. A partir de 150 gramas de folhas e hastes de *Tapirira guianensis* e sua hospedeira *Phoradendron perrottettii*, foram recuperados 1.678 CFUs, pertencentes a 128 espécies e morfoespécies distintas

de endófitos (Abreu, 2005). No presente trabalho, também foi possível recuperar, por esta metodologia, um grande número de isolados (1.252) e de espécies (77) em apenas poucos gramas de tecido vegetal. Pelo método de explantes, apesar de o número total de espécies isoladas ser ligeiramente inferior (70) ao número de espécies recuperadas pelo método de trituração e filtração, o número de CFUs foi consideravelmente superior (4.417).

Estes dados indicam que, por este método, parece haver maior competição entre os fungos, de forma que muitos fungos presentes nos fragmentos podem estar sendo inibidos pelo desenvolvimento de outras espécies de crescimento mais rápido e que, aumentando o número de fragmentos do material vegetal para o isolamento, possivelmente, o número de espécies recuperadas aumentará. Tais resultados corroboram com as hipóteses de Carroll (1995) e de Gamboa et al. (2002), de que a recuperação de espécies de endófitos é inversamente proporcional ao tamanho do fragmento vegetal utilizado para o isolamento, ou seja, quanto menor a extensão do fragmento vegetal, maior o número de espécies recuperadas.

Apesar do menor número de espécies ter sido isolado pela metodologia de explantes, houve fungos que foram recuperados apenas por esta metodologia. O emprego de dois métodos de isolamento de fungos endófitos permitiu a recuperação de um maior número de isolados e de espécies de endófitos, aproximando-se da diversidade existente nas amostras. A composição das espécies de fungos com maior frequência de isolamento não diferiu nos dois métodos, no entanto, as espécies denominadas raras foram obtidas em maior número pela metodologia de trituração e filtração de partículas. Com a diminuição do tamanho do fragmento, além do aumento da superfície de contato, há a redução da competição entre os fungos, aumentando a chance de recuperação de espécies menos abundantes (Gamboa et al., 2002).

6.2 Taxas de colonização e de isolamento

As altas taxas de colonização dos discos de folhas pelos fungos endófitos, relatadas no presente trabalho, foram muito similares às taxas obtidas em outros estudos de endófitos de cacauero. Arnold & Herre (2003) analisaram taxas de colonização de folhas crescidas por um período de 15 dias sob a cobertura vegetal em floresta secundária no Panamá e das folhas jovens em tempo anterior à exposição. Eles obtiveram taxas de colonização de 94,5% e 85,2%, respectivamente. Em cacaueros maduros, as taxas de colonização de folhas novas, jovens e maduras em cinco distintos sítios de coleta no istmo do Panamá foram de 82,2%, 95,6% e 100%, respectivamente (Arnold et al., 2003).

A taxa de colonização na área de monocultivo, para as folhas, foi ligeiramente superior às da área de vegetação nativa. Um fator que pode ter influenciado diretamente na taxa de colonização das folhas nativas foi o processamento das amostras para o isolamento dos fungos endófitos após oito dias da data de coleta, enquanto que, para as folhas cultivadas, o processamento ocorreu três dias após a coleta. Neste espaço de tempo, entre a coleta e o processamento, possíveis alterações na taxa de recuperação de alguns fungos podem ter ocorrido (Bills, 1996).

As taxas de colonização obtidas no presente estudo para as hastes também foram tão altas quanto aquelas encontradas nas amostras de folhas. Entretanto, as hastes da área de vegetação nativa exibiram maior taxa de colonização. Em geral, as taxas de colonização de cacaueros nativos foram maiores do que as obtidas de cacaueros cultivados. Resultado semelhante foi obtido em *Trachycarpus fortunei*, em que as menores taxas de colonização foram observadas em amostras de populações cultivadas (Taylor et al., 1999).

A taxa de isolamento é utilizada, preferencialmente, como medida de riqueza de fungos em um dado local/planta/tecido (Fröhlich et al., 2000). No presente trabalho, foi utilizada para demonstrar o nível de colonização múltipla

das amostras nas diferentes áreas estudadas (Taylor et al., 1999). As taxas de isolamento obtidas para as hastes foram maiores do que as encontradas por Rubini et al. (2005), em hastes de cacauzeiros sadios (0,42), resistentes (0,34) e sintomáticos (0,50) ao patógeno *Moniliophthora perniciosa*. Esta diferença entre as taxas de isolamento obtidas neste estudo e no trabalho de Rubini et al. (2005) pode ser devido às variações na amostragem do material vegetal, ao período de coleta das amostras e às diferentes metodologias de isolamento, entre outros aspectos.

6.3 Composição da comunidade de fungos endófitos

Cerca de 10,5% das espécies de fungos endófitos apresentaram frequência de isolamento total entre 1% e 30%, enquanto que 89,5% das espécies ocorreram em uma frequência inferior a 1%. Este padrão de poucas espécies com altas frequências de isolamento e um grande número de espécies com apenas uma ou duas ocorrências é muito comum em estudos de diversidade ou riqueza de espécies de endófitos e de outros grupos de fungos, além de plantas e animais (Lodge et al., 1996; Fröhlich et al., 2000; Suryanarayanan et al., 2002; Santamaría & Bayman, 2005; Murali et al., 2007).

Dentre os táxons comuns associados aos cacauzeiros de ambas as áreas estudadas, *Phomopsis/Diaportha* spp, *L. theobromae* e *C. gloeosporioides* foram os mais frequentes. Estes fungos tipicamente generalistas foram recuperados como endófitos de uma gama de hospedeiros de áreas tropicais (Arnold & Lutzoni, 2007; Murali et al., 2007; Rodrigues & Petrini, 1997; Rubini et al, 2005) e também são espécies patogênicas reconhecidas de diversas plantas cultivadas (Mendes et al., 1998). Tais fungos patogênicos presentes em plantas sadias desenvolvem uma infecção latente, que pode ser considerada como um tipo de tolerância do hospedeiro a certos patógenos (Petrini, 1991).

Os táxons citados acima também foram recuperados de cacauzeiros sadios, resistentes e sintomáticos a doença vassoura-de-bruxa, coletados na região sul da Bahia (Rubini et al., 2005). No entanto, dados quantitativos de abundância e frequência relativa para cada táxon identificado não foram discriminados pelos autores. Outros gêneros de fungos presentes aqui também foram relatados por Rubini et al. (2005), como *Acremonium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Xylaria*.

Fungos pertencentes à família Xylariaceae, em sua fase anamórfica, têm sido comumente isolados como endófitos de diversos hospedeiros de regiões temperada e tropical. Entretanto, verifica-se uma tendência a maiores proporções de colonização em hospedeiros tropicais (Fröhlich et al., 2000; Murali et al., 2007; Petrini et al., 1995; Rodrigues, 1994; Suryanarayanan et al., 2002). Os fungos xylariáceos, caracterizados neste estudo como pertencente apenas ao gênero *Xylaria*, foram recuperados numa frequência total de 5,2% e caracterizados em nove distintas morfoespécies.

Os micélios estéreis corresponderam a 5,3% do número total de fungos isolados. A sua ocorrência nos diversos trabalhos de endófitos pode estar relacionada a fatores nutricionais e à ausência de condições laboratoriais favoráveis à esporulação em meio de cultivo (Bills, 1996). Dessa forma, os micélios estéreis são comumente agrupados em morfoespécies, de acordo as suas características culturais (Taylor et al., 1999; Kumar & Hyde, 2004; Crozier et al., 2006). Em um estudo que abrange os fungos endófitos associados ao tecido de caule e de frutos de *T. cacao* nativo e cultivado na América Latina (México, Costa Rica, Brasil e Equador) e na África (Camarão), foram recuperados micélios estéreis em uma frequência de 65%. Os autores caracterizaram 59 morfoespécies por meio de caracteres morfológicos, das quais 42 foram identificadas, através do sequenciamento da região ITS do rDNA, como pertencentes ao filo Basidiomycota (Crozier et al., 2006).

Estes resultados evidenciam que, muitas vezes, o grupo dos basidiomicetos é subestimado em estudos de diversidade de fungos endófitos, uma vez que, raramente, são detectados por caracteres morfológicos. No presente trabalho, foi possível caracterizar dois isolados pertencentes ao grupo dos basidiomicetos, devido à produção de estruturas reprodutivas em meio de cultivo, o que nem sempre ocorre.

Em estudo de endófitos e de micoparasitos associados a árvores nativas de *Theobroma gileri*, foram isoladas, de caule e de frutos, mais de 106 espécies de endófitos. A grande maioria dos endófitos isolados de caule foi anamorfos de Hypocreales e, nos frutos, foram isolados basidiomicetos, além de anamorfos de Hypocreales (Evans et al., 2003). Muitos dos táxons recuperados neste estudo foram recuperados também no presente trabalho, tais como espécies de *Phomopsis*, *L. theobromae* e *C gloeosporioides*, além de espécies raras como *Paecilomyces lilacinus*, *Clonostachys rosea*, *Fusarium decemcellulare*, *F. solani* e *F. stilboides*, evidenciando que a composição de espécies de endófitos associados a *T.cacao* e a *T. gileri* é muito similar.

6.4 Diversidade: análise da diversidade, padrões de colonização e preferência de colonização

A sobreposição de comunidades de fungos entre os diferentes tipos de tecidos e ou de órgãos do mesmo hospedeiro tem sido verificada em alguns estudos. Em *Tripterygium wilfordii*, planta chinesa com potencial medicinal, a comunidade de endófitos apresentou elevado nível de sobreposição entre amostras de folhas e flores, seguida pelas amostras da casca da haste e xilema da haste. Tais resultados evidenciam que tecidos ou órgãos que estejam relacionados na estrutura da planta hospedeira poderiam compartilhar fungos em comum (Kumar & Hyde, 2004).

Quando se verifica a comunidade de endófitos entre hospedeiros de um mesmo sítio de coleta e entre os diferentes sítios, observam-se diferentes padrões de sobreposição. Em *T. fortunei*, hospedeiros de distribuição contínua (China) apresentaram sobreposição de 32,5%, enquanto nos hospedeiros de distribuição disjunta (Austrália e Suíça) a sobreposição foi de 18,6%. Entre os hospedeiros de distribuição contínua e disjunta, a sobreposição da comunidade de endófitos foi menos do que 23,3% para cada sítio de coleta (Taylor et al., 1999). Em palmeiras *Licuala ramsayi*, na Austrália e *Licuala* sp., em Brunei, foi encontrada sobreposição da comunidade de endófitos de 15 espécies, num total de 75 (Fröhlich et al., 2000).

Analisando as comunidades de fungos endófitos entre as amostras de cacauzeiros das áreas de monocultivo e de vegetação nativa, baseando-se apenas nos dados de presença e de ausência (índice de Jaccard), constata-se que os índices de similaridade foram muito baixos. Esses resultados indicam haver várias espécies raras, ocorrendo em somente um tipo de amostra, mas, mesmo assim, folha e haste do cacauzeiro cultivado e folha e haste do cacauzeiro nativo foram os mais similares entre si. Já considerando o fator frequência de isolamento (índice de Morisita-Horn), a similaridade entre folha e haste nativas foi muito baixa, devido à alta ocorrência do fungo *L. theobromae*. No entanto, as amostras de folhas entre as áreas apresentaram alto nível de similaridade.

Uma melhor comparação da riqueza de espécies e do número de isolados obtidos nas diferentes populações de cacauzeiros pode ser visualizada nas curvas de rarefação, apresentadas na Figura 1. Os cacauzeiros presentes na área de vegetação nativa mostraram-se mais ricos em espécies, devido, principalmente, às amostras de folhas. A diferença encontrada entre as curvas de rarefação para cacauzeiros das áreas de monocultivo e de vegetação nativa mostrou-se muito pequena. A tendência da curva da área nativa de afastar-se significativamente de uma assíntota indica que a saturação do número possível

de espécies parece estar longe. Assim, futuras coletas e isolamentos poderiam resultar em um incremento significativo de novas taxa.

O resultado da análise multivariada de correspondência evidenciou a preferência das espécies mais frequentes por algum tipo de tecido e área estudada. O agrupamento das amostras de folhas das áreas de monocultivo e de vegetação nativa mostra que as suas comunidades de fungos endófitos são muito similares, como também indicado pelo índice de Morisita-Horn. As espécies que mais contribuíram para esse agrupamento foram *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*. As amostras de hastes agruparam separadamente devido à presença do endófito *L. theobromae*, que foi dominante em hastes da área de vegetação nativa, as quais tiveram distribuição espacial bem restrita no gráfico. A dispersão dos pontos visualizados no gráfico para as amostras de haste da área de monocultivo é explicada pela presença, em abundância, de várias espécies de endófitos e uma pequena dominância por parte de *L. theobromae*.

Em vários estudos sobre comunidades de endófitos, têm sido discutidas as diferenças na composição e na frequência de espécies de fungos recuperados em diferentes tipos de tecido de um dado hospedeiro (Taylor et al., 1999; Fröhlich et al., 2000; Kumar & Hyde, 2004). Uma análise mais detalhada da preferência de colonização, por tecidos do cacaueteiro, por alguns fungos endófitos mais abundantes, foi realizada por meio da construção de gráficos *box plot* (Figura 4). O padrão de colonização das amostras de folhas e hastes de cacaueteiros pelos endófitos mostrou-se bem variado. Pelos resultados obtidos nos gráficos não foi possível verificar nenhum padrão consistente de colonização dos tecidos lenhosos pelos celomicetos, ou colonização dos tecidos foliares pelos hifomicetos, como observado por Fröhlich et al. (2000). Estes autores encontraram hifomicetos, como os anamorfos de *Xylaria*, ocorrendo mais

freqüentemente em folhas, enquanto celomicetos apresentaram preferência aos tecidos mais rígidos do pecíolo.

Confirmando o padrão observado pela análise multivariada de correspondência, as folhas de cacauzeiros foram significativamente colonizadas pelos endófitos *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, enquanto as amostras de hastes abrigaram, em alta freqüência, espécies de *Phomopsis*, *L. theobromae*, *V. echinofibrosa*, *C. rosea* e *F. decemcellulare* ilustrando possível preferência destes fungos em colonizar tecidos lenhosos.

A especificidade de colonização de tecido ou órgão vegetal pelos endófitos poderia ser um mecanismo de prevenção da sobreposição de nicho e da competição entre endófitos ocupando o mesmo espaço físico, já que as comunidades de fungos endófitos de plantas tropicais se caracterizam por possuir uma grande quantidade de espécies e indivíduos (Arnold & Lutzoni, 2007; Lodge et al., 1996).

Os resultados obtidos neste estudo evidenciaram que cacauzeiro abriga grande diversidade de espécies endófitas. O elevado número de espécies e a abundância de isolados da comunidade de fungos endófitos associados ao cacauzeiro cultivado, comparáveis à área nativa, indica que o sistema agrícola de monocultivo parece não interferir na biodiversidade dos endófitos do cacauzeiro. Apenas as comunidades de endófitos das amostras de folhas foram similares entre as áreas estudadas, diferentemente das amostras de hastes que apresentaram menores índices de similaridade, em consequência da alta freqüência da espécie *L. theobromae* em hastes nativa. O padrão de colonização dos endófitos mostrou-se bem distinto, indicando a preferência das espécies por algum tipo de tecido e área estudada. Foi observado também, neste estudo, que o uso de dois distintos métodos de isolamento de fungos endófitos permitiu uma melhor amostragem da real diversidade de endófitos presentes em hastes e em folhas. Tais resultados indicam que o emprego de mais de um método de

isolamento nos estudos de comunidades de endófitos poderá aumentar significativamente o conhecimento atual sobre a composição e a diversidade dos fungos endófitos de hospedeiros tropicais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. M. de. **Diversidade de fungos endófitos associados à planta parasita *Phoradendron perrottettii* (D.C.) Eichler e sua hospedeira *Tapirira guianensis* Aubl.** 2005. 86 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ARNOLD, A. E.; HERRE, E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, v. 95, p. 388-398, 2003.

ARNOLD, A. E.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v. 88, p. 541-549, 2007.

ARNOLD, A. E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v. 3, p. 267-274, 2000.

ARNOLD, A. E.; MEDJÍA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 100, p. 15649-15654, 2003.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal Biotechnology**, v. 3, n. 11, 2000. Disponível em: <<http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/4>>. Acesso em: 10 jul. 2006.

BÅÅTH, E. A critical examination of the soil washing technique with special reference to the effect of the size of the soil particles. **Canadian Journal of Botany**, v. 66, p. 1566-1569, 1988.

BARTLEY, B. G. D. **The genetic diversity of cacao and its utilization.** Wallingford: CABI, 2005. 341p.

BILLS, G. F. Isolation and analyses of endophytic fungal communities from wood plants. In: REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. (Ed.). **Endophytic fungi in grasses and woody plants**, St. Paul, MN: APS, 1996. p. 31-65.

BILLS, G.F.; POLISHOOK, J. D. Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. **Mycologia**, v. 86, p. 187-198, 1994.

CARROLL, G.C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogens to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, p. 2-9, 1988.

CARROLL, G. C. Forest endophytes: pattern and process. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. S1316-S1324, 1995. Supplement 1.

CHANWAY, C. P. Endophytes: they're not just fungi! **Canadian Journal of Botany**, v. 74, p. 321-322, 1996.

CHEPLICK, P. G.; CLAY, K. Acquired chemical defences in grasses: the role of fungal endophytes. **Oikos**, v. 52, n. 3, p. 309-318, 1988.

COLWELL, R. K. **EstimateS**: statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 7.5. 2005. Software. Disponível em: <www.viceroy.eeb.uconn.edu/EstimateS>. Acesso em: 20 dez. 2007.

CROZIER, J.; THOMAS, S. E.; AIME, M. C.; EVANS, H. C.; HOLMES, K. A. Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. **Plant Pathology**, v. 55, p. 783-791, 2006.

EVANS, H. C.; HOLMES, K. A.; THOMAS, S. E. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. **Mycological Progress**, v. 2, n. 2, p. 149-160, 2003.

FRÖHLICH, J.; HYDE, K.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with palms. **Mycological Research**, v. 104, p. 1202-1212, 2000.

GAMBOA, M. A.; LOUREANO, S.; BAYMAN, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? **Mycopathologia**, v. 156, p. 41-45, 2002.

GUO, L. D.; HYDE, K. D.; LIEW, E. C. Y. Identification of endophytic fungi from *Livistonia chinensis* based on morphology and rDNA sequences. **New Phytologist**, v. 147, p. 617-630, 2000.

KOBAYASHI, D. Y.; PALUMBO, J. D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: BACON, C. W.; WHITE, J. F. (Ed.) **Microbial Endophytes**. New York: M. Dekker, 2000. p. 199-236.

KOVACH COMPUTING SERVICES. **Multi-Variate Statistical Package:** versão 3.1. Anglesey, 1999. Software.

KUMAR, S. S. D.; HYDE, K. D. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Diversity**, v. 17, p. 69-90, 2004.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The fusarium laboratory manual.** Blackwell, 2006. 388p.

LODGE, D. J.; FISHER, P. J.; SUTTON, B. C. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. **Mycologia**, v. 88, p. 733-738, 1996.

MC ALEECE, N. **Biodiversity Profesional Beta I.** London. The Natural History Museum & The Scottish Association for Marine Science, 1997.

MCINROY, J. C.; KLOEPPER, J. W. Survey of indigeous bacterial endophytes from cotton an sweet corn. **Plant and Soil**, v. 173, p. 337-342, 1995.

MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L.; DIANESE, J. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; SANTOS, C. E. N.; GOMES NETO, E., URBEN, A. F., CASTRO, C. **Fungos em plantas no Brasil.** Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa Cenargen, 1998. 555p.

MINITAB INC. MINITAB® **Release 14.** State College, Pa., 2003. Software.

MURALI, T. S.; SURYANARAYANAN, T. S.; VENKATESAN, G. Fungal endophyte communities in two tropical forests of southern India: diversity and host affiliation. **Mycological Progress**, v. 6, p. 191-199, 2007.

PAULUS, B.; GADEK, P.; HYDE, K. Estimation of microfungi diversity in tropical rainforest leaf litter using particle filtration: the effects of leaf storage and surface treatment. **Mycological Research**, v. 107, p. 748-756, 2003.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. (Ed.). **Microbial Ecology of Leaves.** New York: Springer Verlag, 1991. p.179-197.

PETRINI, O.; PETRINI, L. E.; RODRIGUES, K. F. Xylariaceous endophytes: na exercise in biodiversity. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 531-539, 1995.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v. 1, p. 185-196, 1992.

PETRINI, O.; STONE, J.; CARROLL, F. E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: A preliminary study. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, p. 789-796, 1982.

RODRIGUES, K. F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. **Mycologia**, v. 86, p. 376-385, 1994.

RODRIGUES, K. F.; PETRINI, O. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. In: HYDE K. D. (Ed.). **Biodiversity of tropical microfungi**. Hong Kong: Hong Kong University, 1997. p. 57-69.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Science**, v. 1, p. 24-33, 2005.

SANTAMARÍA, J.; BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). **Microbial Ecology**, v. 50, n. 1, p. 1-8, 2005.

SCHULZ, B.; WANKE, U.; DRAEGER, S.; AUST, H. J. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycological Research**, v. 97, p. 1447-1450, 1993.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, p. 661-686, 2005.

SCHULZ, B.; RÖMMERT, A. K.; DAMMANN, U.; AUST, H. J.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? **Mycological Research**, v. 103, n. 10, p.1275-1283, 1999.

SURYANARAYANAN, T. S.; MURALI, T. S.; VENKATESNA, G. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. **Canadian Journal of Botany**, v. 80, p. 818-826, 2002.

TAYLOR, J. E.; HYDE, K. D.; JONES, E. B. G. Endophytic fungi associated with the temperate palm *Trachycarpus fortunei* within and outside its natural geographic range. **New Phytologist**, v. 142, p. 335-346, 1999.

ANEXOS

	Pág
TABELA 1 Número de unidades formadoras de colônias (CFUs) e de espécies de fungos endófitos de folhas e hastes de cacauzeiros em áreas de monocultivo e nativa, recuperado pelas metodologias de isolamento.....	49
TABELA 2 Taxa de colonização e de isolamento dos fungos endófitos recuperados pela metodologia de explantes em discos de folhas e fragmentos de hastes de <i>Theobroma caçã</i>	50
TABELA 3 Freqüência absoluta e relativa das espécies de fungos endófitos de <i>Theobroma cacao</i> em áreas de monocultivo e nativa, com freqüência de isolamento total >0,4%.....	51
TABELA 4 Índices de similaridade de Jaccard e de Morisita-Horn entre as comunidades de endófitos dos diferentes tecidos e áreas estudadas.....	53
FIGURA 1 Curvas de rarefação das espécies de fungos endófitos de <i>Theobroma cacao</i> , em vegetação nativa e em área de monocultivo.....	54
FIGURA 2 Curvas de rarefação das espécies de fungos endófitos de <i>Theobroma caçã</i> , para os dois tipos de tecidos em cada área estudada: Mf, monocultivo/folha; Mh, monocultivo/haste; Nf, nativo/folha; Nh, nativo/haste.....	55
FIGURA 3 Análise de correspondência (CA) apresentando a preferência das espécies com freqüência de isolamento total >0,4% por tipo de tecido e área estudada.....	57
FIGURA 4 Box plot apresentando a distribuição de alguns fungos mais freqüentemente recuperados de acordo ao tipo de tecido e área estudada.....	58

TABELA 1 Número de unidades formadoras de colônias (CFUs) e de espécies de fungos endófitos de folhas e hastes de cacauzeiros em áreas de monocultivo e nativa, recuperado pelas metodologias de isolamento

	Monocultivo				Nativa			
	Folha		Haste		Folha		Haste	
	ME	MT	ME	MT	ME	MT	ME	MT
N° de CFUs (a)	1126	168	1366	142	867	301	1058	641
N° de espécies (b)	15	33	41	22	37	33	23	31
a/b	75,06	5,09	33,3	6,45	23,43	9,12	46	20,6
N° de espécies exclusivas	6	24	28	9	26	22	15	23

ME – metodologia de explantes

MT – metodologia de filtração e trituração de partículas

TABELA 2 Taxa de colonização e de isolamento dos fungos endófitos recuperados pela metodologia de explantes em discos de folhas e fragmentos de hastes de *Theobroma cacao*

	Áreas estudadas					
	Monocultivo			Nativa		
	Folha	Haste	Total	Folha	Haste	Total
Nº total de fragmentos	900	900	1800	900	900	1800
Nº de fragmentos \geq 1 isolado	839	665	1504	799	822	1621
Taxa de colonização (%)	93	74	84	89	91	90
Nº de fragmentos com 1 isolado	537	236	773	665	634	1299
Nº de fragmentos com 2 isolados	255	215	470	94	158	252
Nº de fragmentos $>$ 2 isolados	47	214	261	40	30	70
Nº total de isolados	1126	1366	2492	867	1058	1925
Taxa de isolamento	1,25	1,52	1,38	0,96	1,28	1,1

TABELA 3 Frequência absoluta e relativa das espécies de fungos endófitos de *Theobroma cacao* em áreas de monocultivo e nativa, com frequência de isolamento total >0,4%

Espécies	Áreas/Amostras				Total	%
	Monocultivo		Nativa			
	Folha	Haste	Folha	Haste		
	1294	1508	1168	1699	5669	100
<i>Phomopsis/Diaporthe</i> spp	466	528	279	423	1696	29,92
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griffon & Maubl.	40	126	6	1025	1197	21,11
<i>Colletotrichum gloeoporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. / <i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk	423	59	429	56	967	17,06
Micélio estéril cinza	19	43	102	24	188	3,32
<i>Virgatospora echinofibrosa</i> Finley	0	174	0	0	174	3,07
<i>Colletotrichum acutatum</i> J.H. Simmonds	158	11	0	0	169	2,98
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	54	75	11	6	146	2,58
<i>Colletotrichum crassipes</i> (Speg.) Arx / <i>Glomerella</i> sp.	0	88	25	5	118	2,08
<i>Xylaria</i> sp.1	36	58	5	0	99	1,75
<i>Fusarium decemcellulare</i> Brick	11	41	1	41	94	1,66
Micélio estéril branco	17	9	50	9	85	1,50
<i>Xylaria</i> sp.5	3	12	46	14	75	1,32
<i>Clonostachys rosea</i> (Preuss) Mussat / <i>Bionectria ochroleuca</i> (Schwein.) Schroers & Samuels	1	50	0	0	51	0,90
<i>Myrothecium</i> spp	0	45	0	0	47	0,79
Micélio estéril marrom	2	15	16	1	34	0,60
<i>Fusarium subglutinans</i> (Wollenw. & Reinking) P.E. Nelson, Toussoun & Marasas	4	25	1	2	32	0,56
<i>Penicillium</i> spp	0	7	8	17	32	0,56
<i>Xylaria</i> sp.7	0	0	26	1	27	0,48

...continua...

TABELA 3 cont.

<i>Guignardia mangifera</i> A.J. Roy	0	0	24	0	24	0,42
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	3	0	5	15	23	0,41
Taxas raras*	46	132	135	60	196	6,40

* Taxas raras são aquelas que apresentaram frequência relativa < 0,4% do número total de UFCs. Abaixo seguem as morfoespécies que ocorreram em cada sistema e tecido estudados:

Monocultivo (folha): *Acremonium curvum*, *Aspergillus niger*, *Celomiceto* sp.1, *Didimosphaeria* sp., *Fusarium semitectum*, *F. solani*, *Hansfordia pulvinata*, *Microsphaeropsis* sp.2, *Myrothecium roridum*, *Neocosmospora* sp., *Periconia echinochloae*, *P. lateralis*, *Pestalotiopsis* spp, *Phoma* spp, *P. herbarum*, *Phylosticta pervincae*, *Pithomyces maydicus*, cf. *Pseudohalonectria lutea*, *Scolecobasidium constrictum*, *S. variabile*, *Torula herbarum*, *Xylaria* sp.2, *Xylaria* sp.4, *Zygosporium mansonii*, *Zygosporium echinosporium*.

Monocultivo (haste): *Acremonium luzulae*, *Aspergillus ostianus*, *Aspergillus parasiticus*, *Corynespora* sp., *Curvularia lunata*, *C. prasadii*, *Drechslera* sp., *Fusarium camptoceras*, *F. semitectum*, *F. solani*, *Hansfordia pulvinata*, Hifomiceto hialino, *Libertella* sp., *Metarhizium anisopliae*, micélio estéril amarelo, micélio estéril róseo, *Microsphaeropsis* sp.1, *Microsphaeropsis* sp.3, *Microsphaeropsis* sp.4, *Myrothecium* sp., *Periconia byssoides*, *P. echinochloae*, *Pestalotiopsis* sp., *Phoma* spp, *P. herbarum*, cf. *Pseudohalonectria lutea*, *Spegazzinia deightonii*, *Stagonospora* sp., *Trichoderma* sp., *Xylaria* sp.2, *Xylaria* sp.3, *Xylaria* sp.4.

Nativo (folha): *Acremonium implicatum*, *A. strictum*, *Agaricales* sp., *Alescheriella* sp., *Alternaria alternata*, *Arthrimum phaeospermum*, *Ascochyta* seção *Ascochyta*, *Celomiceto* sp.1, *Celomiceto* sp.2, *Celomiceto* sp.3, *Chaetomium* sp., *Cladosporium* sp.1, *Cladosporium* sp.2, *Didymosphaeria* sp., *Fusarium proliferatum*, *F. semitectum*, Hifomiceto amarelo sp., Hifomiceto branco sp.1, Hifomiceto branco sp.2, Hifomiceto branco sp.4, micélio estéril amarelo, micélio estéril creme, micélio estéril róseo, *Microsphaeropsis* sp.2, *Nodulisporium* sp.1, *Nodulisporium* sp.2, *Paraconiothyrium* sp., *Periconia echinochloae*, *P. minutissima*, *Pestalotiopsis* sp., *Phoma* sp.3 seção *Plenodomos*, *P. herbarum*, *P. levellei* var. *microspora*, *Pleurophomopsis*, *Pleosporaceae* sp., *Ramocloridium schulzeri* var. *schulzeri*, *Spiniger* sp., *Sporotrix* sp., *Talaromyces* sp., *Xylaria* sp.6, *Xylaria* sp.8, *Xylaria* sp.9.

Nativo (haste): *Acremonium* seção *Nectrioidea*, *A. implicatum*, *A. strictum*, *Aphanocladium album*, *Arthrimum phaeospermum*, *Ascochyta* seção *Ascochyta*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Epicocum purpurascens*,

Eurotiales sp., *Fusarium stilboides*, Hifomiceto amarelo sp., Hifomiceto branco sp.3, Hifomiceto pigmentado, micélio estéril creme, *Nodulisporium* sp.1, *Passalora* sp., *Pestalotiopsis* spp, *Phoma sorghina*, *Phoma* sp.2 seção *Plenodomos*, *Phoma* seção *Phoma*, *Phoma* spp, *Pleurophomopsis* sp. cf. *Pseudohalonectria lutea*, *Sporotrix* sp., *Stagonospora caricinella*, *Xylaria* sp.4, *Xylaria* sp.6.

TABELA 4 Índices de similaridade de Jaccard e de Morisita-Horn entre as comunidades de endófitos dos diferentes tecidos e áreas estudadas

	Mf	Mh	Nf	Nh	Índices
Mf		0,711	0,904	0,351	Morisita-Horn
Mh	0,369		0,573	0,482	
Nf	0,244	0,213		0,242	
Nh	0,224	0,208	0,347		
					Jaccard

Áreas: M – monocultivo; N - nativo
 Amostras: f – folha; h – haste

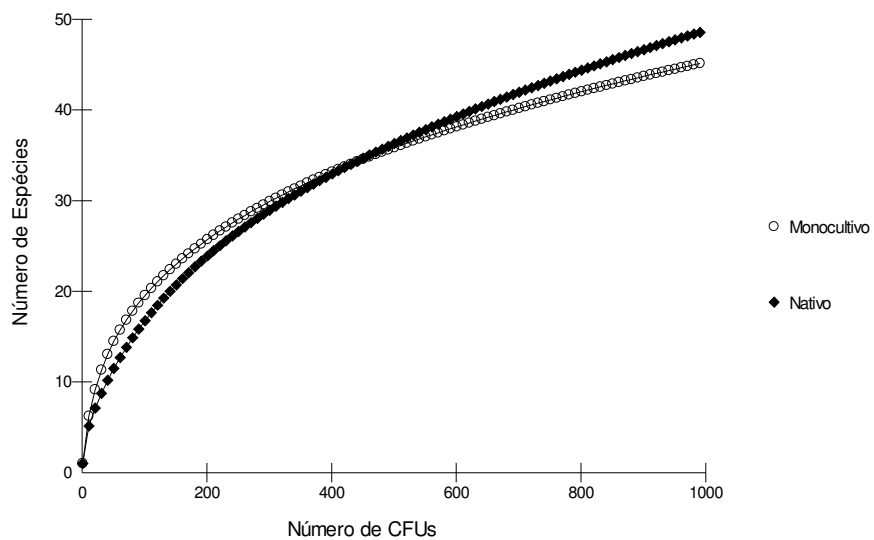


FIGURA 1 Curvas de rarefação das espécies de fungos endófitos de *Theobroma cacao*, em vegetação nativa e em área de monocultivo.

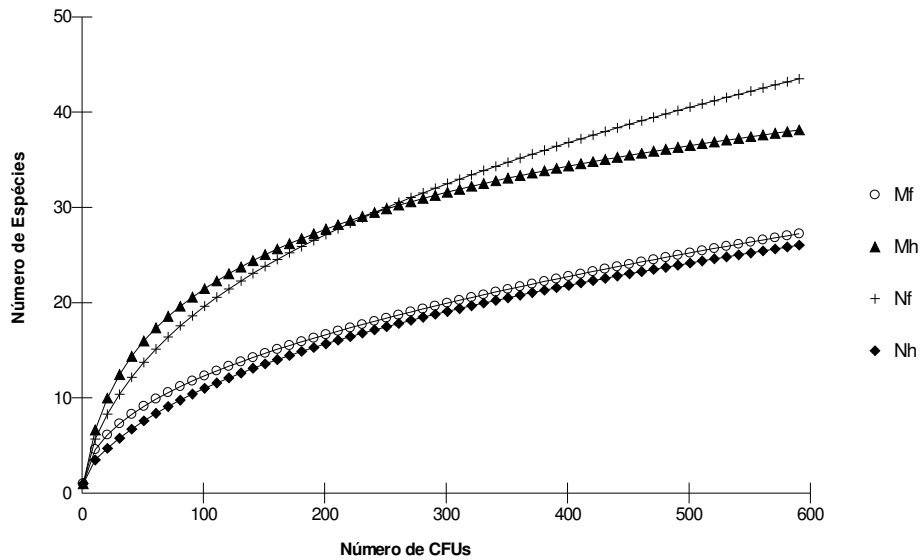


FIGURA 2 Curvas de rarefação das espécies de fungos endófitos de *Theobroma cacao*, para os dois tipos de tecidos em cada área estudada: Mf, monocultivo/folha; Mh, monocultivo/haste; Nf, nativo/folha; Nh, nativo/haste.

95

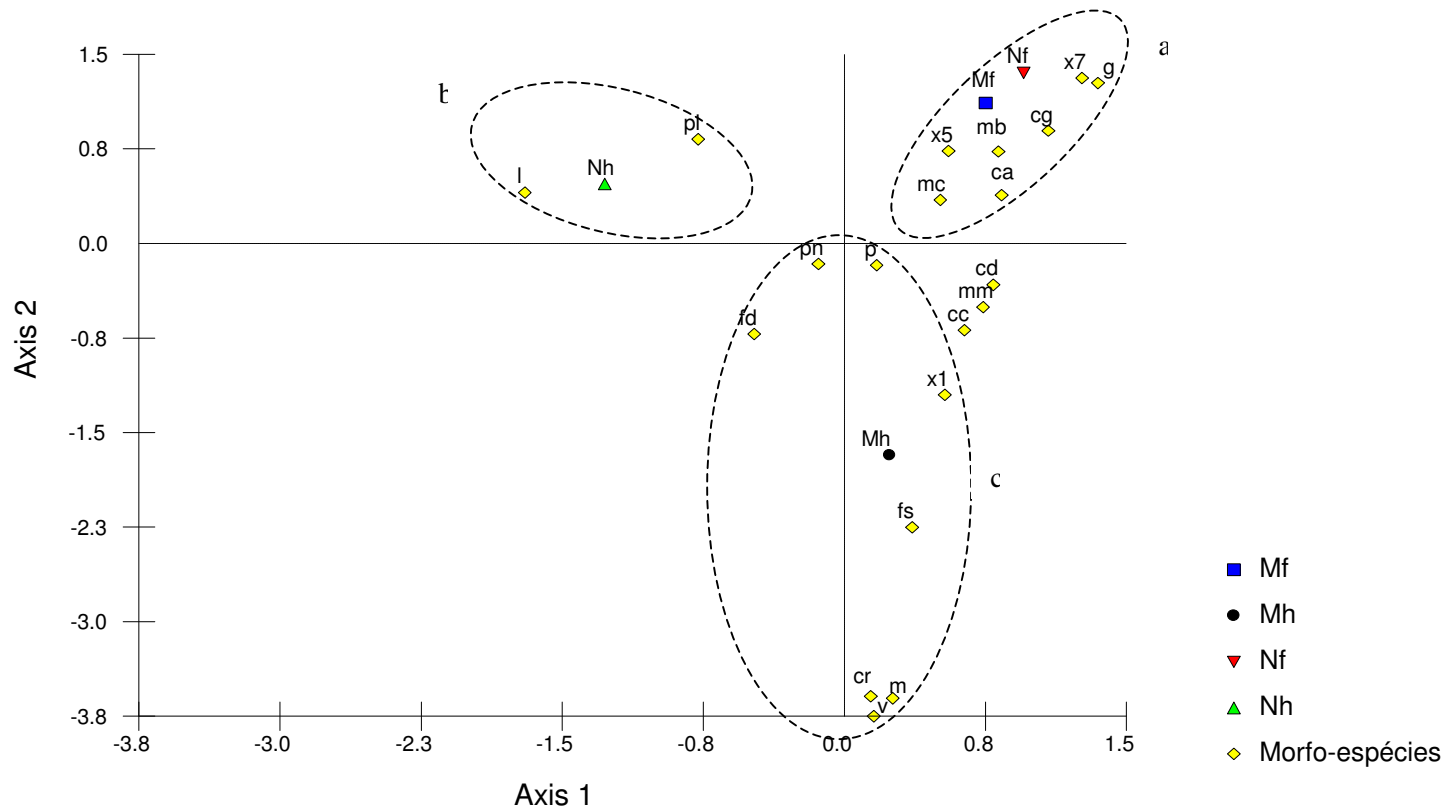


FIGURA 3 Análise de correspondência (CA) apresentando a preferência das espécies com frequência de isolamento $>0,4\%$ por tipo de tecido e área estudada. Mf, monocultivo/ folha; Mh, monocultivo/haste; Nf, nativo/folha; Nh, nativo/haste. Morfoespécies de endófitos: p- *Phomopsis* spp., cg-*Colletotrichum gloeosporioides*, ca- *C. acutatum*, cc- *C. crassipes*, l-*Lasiodiplodia theobromae*, v- *Virgatospora echinofibrosa*, cd- *Cladosporium cladosporioides*, x1- *Xylaria* sp1, x5- *Xylaria* sp5, x7- *Xylaria* sp7, fd-*Fusarium decemcellulare*, fs- *F. subglutinans*, cr- *Clonostachys rosea*, m-*Myrothecium* spp., g- *Guignardia mangifera*, pn- *Penicillium* spp., pl-*Paecilomyces lilacinus*, mc - micélio cinza, MB - micélio branco, mm - micélio marrom. A - grupo das amostras de folhas, b - grupo das amostras de haste nativo, c - grupo das amostras de haste cultivado.

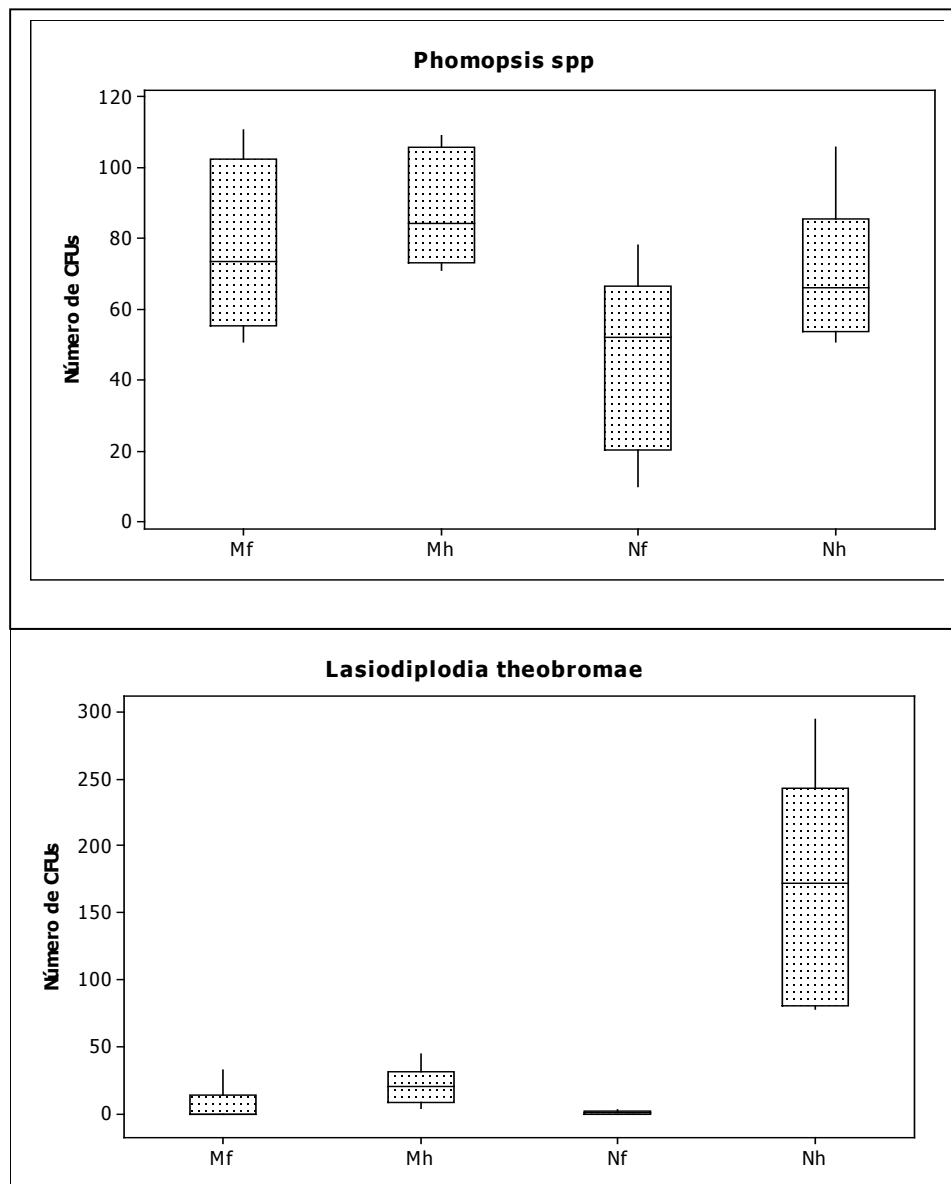
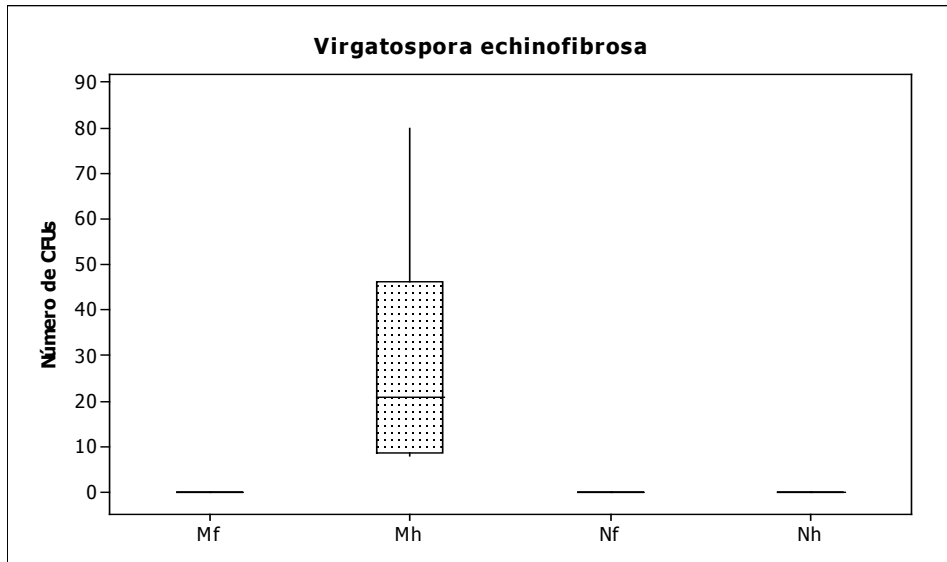
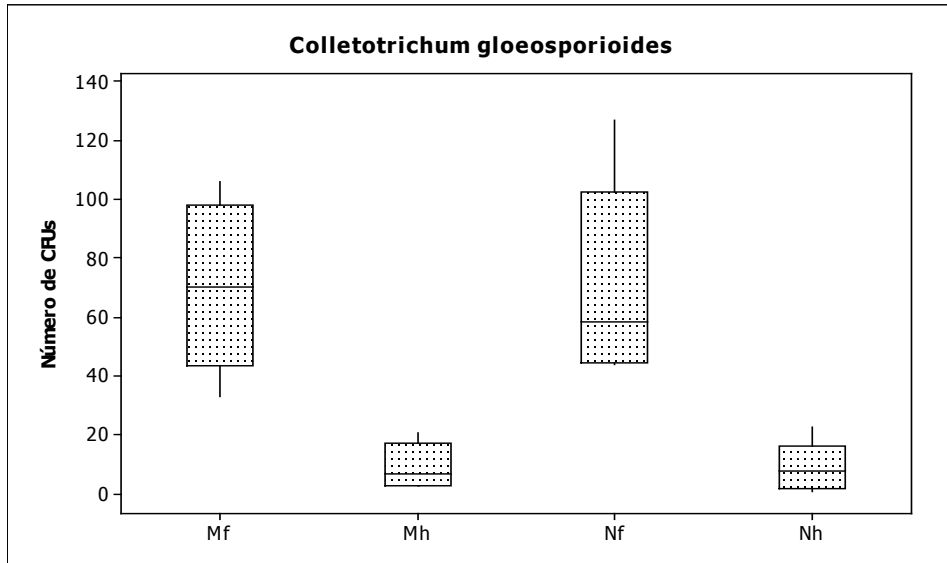


FIGURA 4 Box plot apresentando a distribuição de alguns fungos mais frequentemente recuperados de acordo ao tipo de tecido e área estudada

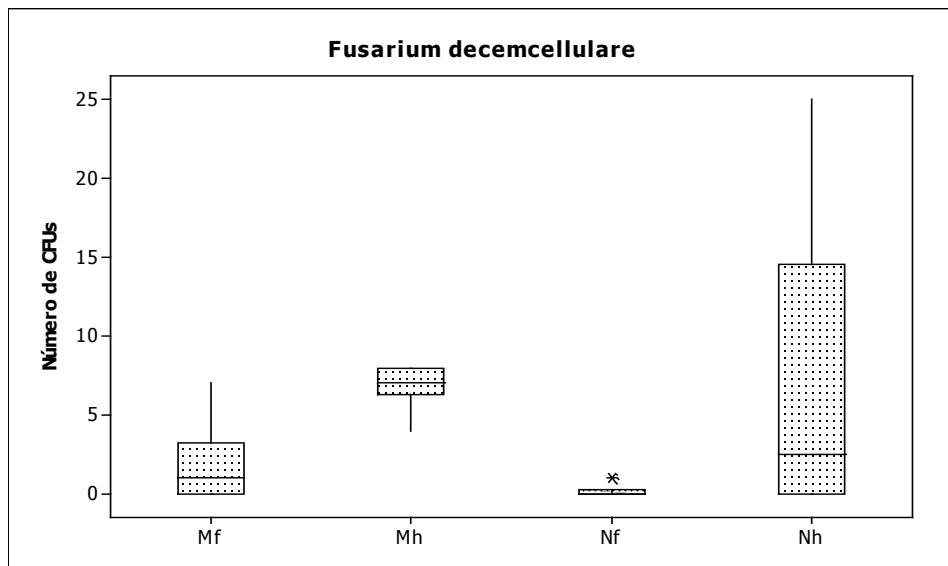
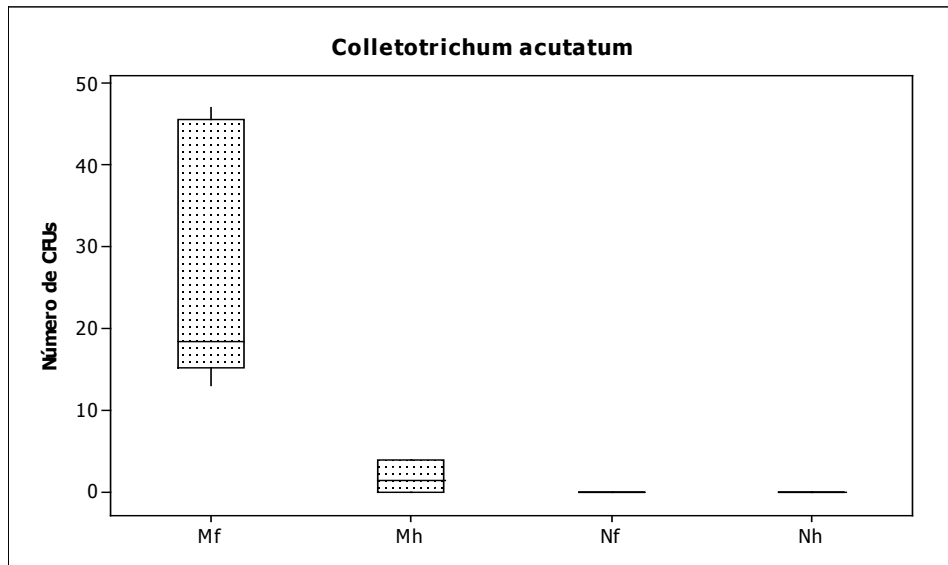
...continua...

FIGURA 4 cont...



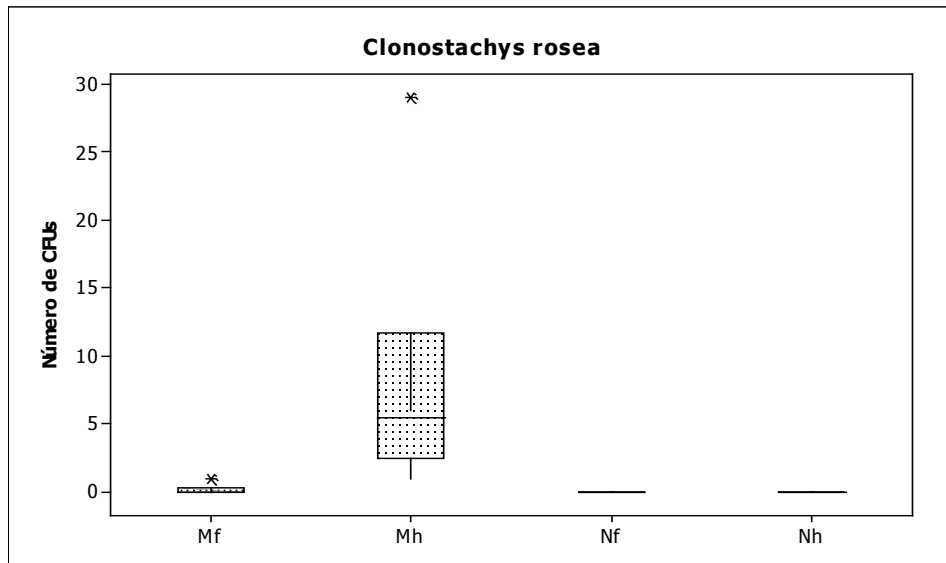
...continua...

FIGURA 4 cont.



...continua...

FIGURA 4 cont.



Legenda: Mf, monocultivo/folha; Mh, monocultivo/haste; Nf, nativo/folha; Nh, nativo/haste. Os limites superior e inferior das caixas contêm 75% da variância amostral. A linha horizontal no interior das caixas representa a mediana e as barras acima e abaixo das caixas indicam os valores máximo e mínimo. * Indica amostras fora do padrão (*Outliers*).