
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RENATA LAMOS MOREIRA

**FUNGOS ENDOFÍTICOS E EPIFÍTICOS
ASSOCIADOS ÀS FOLHAS DE CACAUEIRO**



Rio Claro
2014

RENATA LAMOS MOREIRA

FUNGOS ENDOFÍTICOS E EPIFÍTICOS ASSOCIADOS ÀS FOLHAS DE CACAUEIRO

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de
Bacharela em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2014

589.2 Moreira, Renata
M838f Fungos endofíticos e epifíticos associados às folhas de
 cacaueiro / Renata Moreira. - Rio Claro, 2014
 47 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro

Orientador: André Rodrigues

1. Fungos. 2. Barcode. 3. Microfungos. 4. Diversidade. 5.
Interação. I. Título.

Dedico este trabalho a minha família e a todos os meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Devido a correria das aulas, da rotina de experimentos no laboratório, das provas, trabalhos e seminários esquecemos de agradecer no fim de cada jornada concluída. E ao fim desse projeto gostaria de agradecer as pessoas importantes que fizeram parte e me ajudaram de alguma maneira durante esse período de um ano.

Agradeço primeiramente a minha família que me apoiou e se orgulhou da minha escolha de ser bióloga, tudo o que foi conquistado eu devo a eles. Gostaria de agradecer a minha mãe Cristina, ao meu pai João Alfredo e ao meu irmão Daniel por todo o suporte, o amor, a força, o apoio e as palavras de carinho que me ajudaram a superar os momentos difíceis. Agradeço também aos meus outros familiares como avós, tios e primos por participarem e me ajudarem nessa fase.

Ao Prof. Dr. André Rodrigues pela oportunidade de trabalho no seu laboratório, por me ensinar os conceitos de microbiologia, por me mostrar como é ser pesquisador e sempre trabalhar da melhor forma possível, por me ensinar desde o trabalho na bancada até a escrita de um relatório e por me incentivar a buscar sempre o melhor.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de iniciação científica e ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia por fornecer a infraestrutura para o trabalho.

Aos meus amigos que se tornaram minha segunda família, Bárbara, Rafael, Tássio, Danilo, Quimi, Jaqueline, Sadala, Isabela, Cecília, Ana Maria e Paixão, por toda a força nos momentos bons e ruins, pela ajuda nos experimentos, pelos ensinamentos e principalmente pela amizade. Aos meus amigos de graduação, Nathalia, Mariana, Julia e Ramon pela amizade construída nesses quatro anos de faculdade.

Ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia, ao Laboratório de Microbiologia Industrial e Ambiental (LAMAI), ao Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), ao Prof. Vanderlei (CEIS/UNESP) que me auxiliou no sequenciamento de DNA dos fungos e a professora Monita Fiori de Abreu-Tarazi (UESC, Ilhéus, BA) pela disponibilidade do material utilizado.

“A mente que se abre a uma nova
idéia jamais voltará ao seu tamanho original”
Albert Einstein

RESUMO

A produção de cacau no Brasil foi afetada drasticamente pela doença conhecida como vassoura-de-bruxa, cujo agente etiológico é o fungo *Moniliophthora perniciosa*. Estudos prévios sugerem que a microbiota associada ao cacaueiro representa uma possível barreira para o estabelecimento do parasita. Entretanto, pouco se conhece sobre os micro-organismos associados a essa planta. Nesse sentido, nós avaliamos a diversidade e composição de fungos epifíticos e endofíticos associados às folhas de cacaueiros em duas fazendas. Utilizando uma coleção de fungos obtida em estudos prévios, os isolados foram reativados e agrupados segundo as características morfológicas das colônias. Após a triagem morfológica, os isolados representativos de cada morfoespécie foram identificados utilizando sequências da região ITS. Após a identificação dos isolados, as comunidades de fungos foram caracterizadas utilizando métricas ecológicas. No total, foram avaliados 79 fungos filamentosos (40 endofíticos e 39 epifíticos) compreendendo 12 gêneros e 25 espécies. *Fusarium* (33%), *Bionectria* (16,5%) e *Pestalotiopsis* (12,7%) foram os gêneros mais abundantes, sendo que os fungos *Acremonium* sp. 1, *Bionectria ochroleuca*, *Fusarium solani* e *Fusarium* sp. 2 foram encontrados nas comunidades de fungos epifíticos e endofíticos. No geral, os gêneros de fungos encontrados como epifíticos nesse trabalho também foram reportados como endofíticos em outros estudos, o que indica o caráter ubíquo desses táxons. Os índices de diversidade sugerem que a comunidade de fungos epifíticos é mais diversa, quando comparada à comunidade de fungos endofíticos. Adicionalmente, observamos que cacaueiros localizados em diferentes fazendas tendem a compartilhar mais táxons endofíticos, em relação aos táxons epifíticos, o que sugere a influência de fatores ambientais na determinação das comunidades de fungos encontradas nas superfícies das folhas do cacaueiro. Essa observação constitui em uma evidência de que os fungos endofíticos podem desempenhar uma função para o hospedeiro. Estudos adicionais serão realizados para verificar o potencial dos fungos isolados no presente trabalho, na proteção dos cacaueiros frente ao patógeno *M. perniciosa*.

Palavras chaves: Barcode. Microfungos. Diversidade. Interação.

ABSTRACT

Cocoa production in Brazil was drastically affected by the Witch's broom disease caused by the fungus *Moniliophthora perniciosa*. Previous studies showed that the microbiota associated with cocoa plants represent a possible barrier for the establishment of this parasite. However, little is known regarding the microorganisms associated with cocoa plants. In this sense we evaluated the diversity and composition of epiphytic and endophytic fungi associated with cocoa leaves in two farms. Based on a collection of fungi obtained in previous studies, the isolates were grown and grouped according to colony morphology. After morphotyping, representative isolates of each morphospecies were identified by sequencing the ITS region. After identification, fungal communities were characterized using ecological metrics. A total of 79 filamentous fungi were examined (40 endophytic and 39 epiphytic) comprising 12 genera and 25 species. *Fusarium* (33%), *Bionectria* (16.5%) and *Pestalotiopsis* (12.7%) were the prevalent genera. *Acremonium* sp. 1, *Bionectria ochroleuca*, *Fusarium solani* and *Fusarium* sp. 2 were found in both epiphytic and endophytic fungal communities. The epiphytic genera found in this study were also reported as endophytes in other reports, attesting for the commonness of such fungi. The diversity indices suggest that the epiphytic fungal community were more diverse in relation to the endophytic community. In addition, we found that cocoa plants from different farms share more endophytic than epiphytic taxa, suggesting that environmental factors help to determine the communities of fungi found on the leaf surface. This observation constitutes evidence that endophytic fungi may play a role for the host. In this sense, further studies are necessary to assess the putative defensive role of these fungi for cocoa plants against *M. perniciosa*.

Keywords: Barcode. Microfungi. Diversity. Interaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Morfologia das colônias dos gêneros prevalentes de fungos isolados da superfície e do interior das folhas de cacaueiros presentes em duas fazendas. Fungos cultivados em meio MA2% com 7 dias de crescimento.....29
- Figura 2** - Diagrama de Venn que representa o compartilhamento dos táxons entre as comunidades de fungos epifíticos e endofíticos. O número indica a quantidade de táxons por área; o número entre parênteses indica o número total de isolados.....31
- Figura 3** - Diagrama de Venn da comunidade de fungos endofíticos, que representa o compartilhamento de táxons entre as Fazendas Jacy (rosa) e Almirante Cacau (azul). O número indica a quantidade de táxons por área; o número entre parênteses indica o número total de isolados.....32
- Figura 4** - Diagrama de Venn da comunidade de fungos epifíticos, que representa o compartilhamento de táxons entre as Fazendas Jacy (rosa) e Almirante Cacau (azul). O número indica a quantidade de táxons por área; o número entre parênteses indica o número total de isolados.....32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fungos isolados do interior (endofíticos) e da superfície (epifíticos) de folhas de cacaueiro, em duas fazendas (Jacy e Almirante) da região sul da Bahia.....	29
Tabela 2 - Índices de diversidade calculados para as comunidades de fungos endofíticos e epifíticos e para os isolados presentes na Fazenda Jacy e Almirante Cacau.....	30
Tabela 3 - Os índices de similaridade calculados para as comunidades de fungos endofíticos e epifíticos e para os isolados presentes nas fazendas Almirante Cacau e Jacy.....	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 História do cacau no Brasil	12
2.2 Doenças associadas ao cacaueiro	14
2.3 Fungos endofíticos	16
2.4 Métricas Ecológicas	20
3 OBJETIVOS	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Origem dos fungos filamentosos associados ao cacaueiro	25
4.2 Cultivo e triagem dos morfotipos de fungos filamentosos	26
4.3 Identificação molecular dos isolados	26
4.4 Análise de diversidade e comparação das comunidades de fungos	27
5 RESULTADOS	28
5.1 Identificação polifásica dos fungos filamentosos	28
5.2 Caracterização das comunidades de fungos filamentosos associadas às folhas do cacaueiro	30
6 DISCUSSÃO	33
7 CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS	39
APÊNDICE	44
Apêndice A1	45
Apêndice A2	46

1 INTRODUÇÃO

O cacaueiro (*Theobroma cacao*) foi inicialmente cultivado pelas civilizações Maia e Asteca sendo o fruto considerado sagrado e utilizado como moeda de troca. Essa espécie originou-se no continente Sul Americano, provavelmente, nas bacias dos rios Amazonas e Orinoco.

No Brasil, em meados dos anos 70, a produção de cacau iniciou-se no estado do Pará (na região Amazônica), entretanto, a produção em larga escala estabeleceu-se de fato no estado da Bahia (na região de Mata Atlântica). O clima quente, úmido e os solos férteis nesse estado favoreceram o cultivo dessa planta. A produção de cacau na Bahia representou cerca de 80% da produção total do país e a economia nessa região baseou-se no comércio do cacau para a produção de chocolate. Entretanto, o cacau também é utilizado para a produção de outros derivados, como a manteiga de cacau, cosméticos, geléia, vinho, licor, vinagre e suco; derivados que também representavam um parcela significativa no comércio do cacau.

Na década de 90, a produção de cacau entrou em colapso e o país passou a importar as amêndoas, ao invés de exportá-las. O quadro de produção modificou-se, principalmente, pela ocorrência da doença conhecida como “vassoura-de-bruxa”. Essa doença apresenta como agente etiológico o fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora (*Basidiomycota: Agaricales*), o qual é responsável por infectar ramos, frutos e botões florais, provocando a morte dos cacaueiros.

Atualmente, existem duas principais formas de controle da vassoura-de-bruxa: (i) podas fitossanitárias para a remoção dos frutos infectados, na tentativa de diminuir a propagação do inóculo fúngico e (ii) pulverizações com óxido cuproso nos tecidos afetados, a fim de dificultar o restabelecimento do patógeno nos cacaueiros. Infelizmente, essas formas de combate da doença não são eficientes para inibir totalmente a propagação de *M. perniciosa*. Além disso, sabe-se que esses métodos podem causar um elevado impacto no ambiente.

Na tentativa de encontrar uma forma de controle eficaz para inibir a ação do patógeno, Loguercio et al. (2009) realizaram um experimento de campo no qual várias linhagens do fungo *Trichoderma stromaticum* (*Ascomycota: Hypocreales*) foram capazes de inibir *in vivo* o crescimento e a germinação dos esporos de *M. perniciosa*. O fungo *T. stromaticum* é considerado um micoparasita (i.e. fungo com capacidade de se nutrir de outro fungo) e compõe a microbiota natural associada às folhas dos cacaueiros. Alguns estudos sugerem que

fungos associados aos tecidos internos e à superfície das folhas do cacaueteiro apresentam papéis ecológicos ainda não definidos. Entretanto antes de avaliar as funções desses fungos é essencial conhecer a composição da comunidade associada aos tecidos do cacaueteiro.

Para conhecer e analisar os fungos associados às folhas dessa planta, o presente estudo tentou responder às seguintes perguntas: (i) quais são os fungos presentes no interior e na superfície das folhas do cacaueteiro? (ii) existem diferenças entre essas comunidades? Estudando uma coleção de fungos endofíticos e epifíticos obtida de folhas de cacaueteiros cultivados em duas fazendas no sul da Bahia, foi possível ampliar o conhecimento sobre os micro-organismos associados a essa planta. As informações obtidas no presente estudo podem ser utilizadas como base para pesquisas posteriores que avaliem o potencial desses isolados como agentes biológicos na proteção dos cacaueteiros, principalmente, frente ao patógeno causador da vassoura-de-bruxa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 História do cacau no Brasil

O cacau é produzido no continente americano e está distribuído desde os estados do Espírito Santo, Bahia, Amazonas até na América do Norte (México). Atualmente, a produção das amêndoas é destinada para a produção de chocolate; contudo, outras partes do cacau são também utilizadas para produção de outros derivados. Por exemplo, a partir das sementes se extrai a manteiga utilizada na indústria farmacológica e cosmética e, a partir da polpa do fruto, rica em açúcares, é fabricado geleia, vinho, licor, vinagre, suco e sorvete (SILVA NETO et al., 2001).

O cacaueiro pertence à família Malvaceae e caracteriza-se por ser uma árvore de pequeno porte, com copa globosa e que apresenta flores e frutos de tamanho variável (LORENZI, et al., 2006). O fruto divide-se em três grupos principais de cultivares, segundo a distribuição geográfica e características morfológicas: Forastero, Criolo e Trinitário (N'GORAN et al., 1994).

O cultivar Forastero (ou variedade selvagem) originou-se na região Amazônica e suas vagens apresentam cor verde, as sementes são roxas e os clones desse cultivar representam 80% da produção mundial de cacau. O segundo cultivar, denominado Criolo, caracteriza-se por ser o primeiro cacau domesticado, originário na América Central e na região norte da América do Sul. Esse tipo de cacau apresenta sementes de coloração branca a rosada, das quais pode-se extrair um chocolate com baixo valor econômico agregado. O terceiro cultivar, denominado Trinitário, é o resultado da hibridização entre o primeiro e o segundo grupo, o qual apresenta grande variabilidade de vagens e sementes. Dentre esses tipos, o grupo Forastero, devido a resistência à pragas, é o mais comercializado e abastece 80% do mercado, enquanto que os cultivares Criolo e Trinitário, abastecem o mercado em 1% e 14%, respectivamente (N'GORAN et al., 1994). As primeiras variedades do cultivar Forastero são originárias da bacia do baixo Amazonas e foram cultivadas principalmente no Brasil e na região da Venezuela (SOUNIGO et al., 2003).

O cacaueiro é uma espécie dos trópicos úmidos em que o cultivo é realizado em uma área que apresenta pequenas variações climáticas, por exemplo: temperatura e radiação solar. A temperatura média anual deve ser superior a 21 °C, a temperatura média igual ou superior a 22 °C para o desenvolvimento da floração e frutificação, essas condições de temperatura são responsáveis pela abertura das gemas e formação de novos frutos (DINIZ et al., 1983).

Outro fator que influencia o cultivo do cacau é o tipo de solo. A composição física, profundidade, drenagem e fertilidade são componentes fundamentais para o cultivo apropriado da planta. O cacaueiro apresenta sistema radicular pivotante que necessita de uma profundidade mínima de solo e uma composição sem camadas contendo pedras ou qualquer composto que impeça o desenvolvimento da raiz. Esse solo deve apresentar boa drenagem e média a alta fertilidade (SILVA NETO et al., 2001).

As condições responsáveis pela alta produtividade do cacaueiro como o clima e o solo são encontradas no Brasil, principalmente, no estado da Bahia. Nessa região é possível observar o clima quente, úmido e a presença de solos férteis, condições necessárias para compor uma boa área de cultivo. Porém, não são todos os municípios que apresentam precipitação pluviométrica suficiente para suprir as necessidades hídricas do cacaueiro, ou mesmo a temperatura ideal para seu crescimento.

A faixa territorial que apresenta tais características é a zona costeira, a qual abrange desde o extremo sul do estado da Bahia até a ilha de Itaparica. Paralela a essa área, encontra-se a região marginal que se estende desde o extremo sul do território baiano até o limite norte do Recôncavo. Essa região apresenta temperatura média anual superior a 21 °C, ideal para o cultivo do cacau, porém, apresenta uma estação de seca moderada (DINIZ et al., 1983).

Apesar da Bahia apresentar condições favoráveis ao cultivo do cacau, a produção no país é antiga e não se iniciou nesse estado. O cultivo do cacau iniciou-se a partir de 1679 com o desenvolvimento da Carta Régia que demonstrava a autorização dos colonizadores para a plantação dos cacaueiros em suas terras. Introduziu-se, inicialmente, a produção de cacau no estado do Pará, porém, a pobreza dos solos da região não tornou esse estado o principal produtor (GARCEZ, 1975).

Em 1746, o baiano Antônio Dias Ribeiro recebeu algumas sementes de cacau do tipo Forastero do colonizador francês, Luiz Frederico Warneau. Introduziu-se o cultivo do cacau na região da Bahia a partir dessas sementes, e a primeira plantação foi realizada na fazenda Cubículo, localizada às margens do rio Pardo, onde hoje é o município de Canavieiras (GARCEZ, 1975).

Ao longo dos anos, a cacaucultura se tornou uma atividade capitalista, com conteúdo mercantilista o qual modificou a economia da região da Bahia, já que acumulou as riquezas oriundas do comércio de exportação (DINIZ et al., 1983). O censo agrícola realizado no ano de 1920 apresentou que a Bahia produziu 989.613 sacos com 60 quilos, na safra de 1919/1920. Essa produção total correspondeu à produção dos 14 municípios produtores de cacau. O município de Ilhéus destacava-se dos demais por contribuir com 41,24 % da

produção total do estado da Bahia. Além de Ilhéus, o município de Itabuna ocupava o segundo lugar na produção de cacau com 14,30% e o restante dos municípios não ultrapassava 10% da produção total (DINIZ et al., 1983).

O município de Ilhéus caracteriza-se por ser o maior produtor de cacau desde o século XIX. Essa produção tornou-se importante por dois fatores: (i) a quantidade de cacau exportado e (ii) a grande área de plantios. A alta produtividade nesse município resultou em riqueza e desenvolvimento de transporte com a construção de ferrovias e melhoramento do porto para o escoamento da produção.

A riqueza proveniente da produção do cacau despertou interesse de cultivo do fruto em outros países. Como consequência houve aumento na produção mundial, o que provocou instabilidade no mercado e queda nos preços nas décadas de 80 e 90. A lavoura cacaueira estava inserida em uma situação de crise em que os baixos preços do cacau e a incidência e alastramento da doença conhecida como “vassoura-de-bruxa” provocaram a drástica queda na produção. Além disso, o Brasil deixou a condição de ser exportador do cacau para ser importador e sofreu com o grande êxodo rural, desemprego e abandono das lavouras. Atualmente, devido a queda da produção baiana do fruto e da necessidade de abastecimento das indústrias, ocorreu sensível redução nas exportações de amêndoas e sim a importação (DINIZ et al., 1983). Porém, a região da Bahia ainda é o maior produtor de cacau no Brasil com 64% da produção do país, seguido pelo estado do Pará (25%), Rondônia (8%) e Espírito Santo (3%, LOPES, et al., 2011).

2.2 Doenças associadas ao cacaueiro

Vários são os insetos associados aos cacaueiros, sendo classificados em duas categorias: (i) insetos benéficos que auxiliam na polinização ou predação de outros insetos; e (ii) aqueles considerados pragas agrícolas, os quais podem prejudicar diversas partes da planta como folhas, flores, ramos, tronco e frutos (SILVA NETO et al., 2001). Como exemplos desse último grupo, pode-se citar as tripes, os monalonios que são espécies de pequenos percevejos denominados popularmente de “chupança”, os besouros escolitídeos, o manhoso, a broca dos frutos, as vaquinhas, as lagartas e formigas; esses são alguns dos organismos que prejudicam a produção de cacau.

Apesar dos vários insetos pragas associados aos cacaueiros, a principal doença que afeta a produção do cacau é a vassoura-de-bruxa. O agente etiológico dessa doença, o fungo *M. pernicioso*, foi anteriormente classificado como *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer.

Esse fungo é considerado um patógeno hemibiotrófico, pois apresenta duas fases em seu ciclo de vida na planta hospedeira: (i) a fase parasítica, na qual o fungo é encontrado nos espaços intercelulares do tecido vegetal e apresenta micélio espesso, monocariótico e sem grampos de conexão; e (ii) a fase saprofítica, na qual o fungo vive nos espaços intercelulares e intracelulares da planta e apresenta micélio delgado (quando comparado à fase parasítica), dicariótico e com grampos de conexão (EVANS, 1980).

Na fase parasítica, o fungo infecta os tecidos meristemáticos ativos do hospedeiro e coloniza-os. Após a infecção, o fungo vive a partir da obtenção da matéria orgânica proveniente de frutos e folhas. São nessas partes do hospedeiro onde o fungo é capaz de produzir o basidioma (estrutura de reprodução sexuada), essa produção intensifica-se com a ocorrência de períodos de chuvas seguidos de períodos de seca (SILVA NETO et al., 2001). A partir dos basidiomas ocorre a produção dos basidiósporos, responsáveis por infectar os tecidos meristemáticos de *T. cacao* e espécies de *Herrania* (GRIFFITH, 2004). Os esporos invadem os tecidos meristemáticos do caule e folha, germinam e desenvolvem hifas irregulares, monocarióticas e sem grampos de conexão. Após o desenvolvimento do fungo, ocorre a necrose das vassouras e inicia-se a fase saprofítica em que esse fungo apresenta hifas delgadas e grampos de conexão (KIMATI et al., 1997).

A vassoura-de-bruxa foi transmitida para a maioria dos países da América do Sul, Panamá e Caribe. Essa transmissão se apresentava como uma ameaça de contaminação para as áreas não infectadas do estado da Bahia, cuja lavoura cacaueira permaneceu não infectada até o final do ano 1980 (PEREIRA et al., 1996).

Dois anos antes do início da infecção na região da Bahia, o Ministério da Agricultura desenvolveu a “Campanha de Controle para a Propagação da Vassoura-de-bruxa” (CAVAB). Essa campanha foi gerenciada pela organização do governo federal brasileiro denominada CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) responsável pela indústria do cacau (PEREIRA et al., 1996).

O município de Uruçuca caracterizou-se por ser o primeiro local de infecção da doença na Bahia. Esse município é importante para a economia da região, devido a grande área de cultivo de cacau e alta produção (SILVA et al., 1988). Em maio de 1989, iniciou-se uma pesquisa com trinta trabalhadores agrícolas treinados e quatro assistentes de campo responsáveis por inspecionar, aproximadamente, 300.000 árvores de cacau. Foram demarcadas 112 árvores infectadas com 1 a 15 “vassouras” por árvore, de modo que foi possível mapear a extensão da lavoura contaminada (PEREIRA et al., 1996).

O Ministério da Agricultura foi responsável por implementar um programa de erradicação da vassoura-de-bruxa com o auxílio da CEPLAC (PEREIRA et al., 1996). Inicialmente, implementou-se duas principais estratégias de erradicação incluindo as podas fitossanitárias e o uso de produtos químicos como o óxido cuproso e os fungicidas etil trianol e triadimefon. Essas estratégias foram desenvolvidas para eliminar o micélio agente da infecção nos tecidos, interromper o ciclo da doença e proteger os tecidos não infectados a fim de erradicar novos focos da doença. Apesar dos esforços, verificou-se que o programa de erradicação da vassoura-de-bruxa não foi eficiente, pois a doença espalhou-se para outras regiões da Bahia. O controle químico utilizado nesse programa, como os fungicidas, pode proporcionar diversos problemas, por exemplo, contaminação de solos e águas, intoxicação de agricultores, entre outros fatores.

Ao avaliar ambos os fatores positivos e negativos em relação ao controle químico, é possível verificar que os problemas superaram os benefícios do uso desses produtos. Portanto foi necessário avaliar outros métodos para substituir o controle químico como, por exemplo, o uso de controle biológico (BETTIOL et al., 2009). Esse controle consiste na utilização de organismos vivos para matar, controlar o crescimento, expansão populacional e reduzir a capacidade competitiva de um patógeno ou praga.

Loguercio e colaboradores (2009) demonstraram a capacidade de *T. stromaticum* em inibir o crescimento e germinação dos esporos de *M. pernicioso*. Os resultados mostraram a eficiência do fungo, o que levou à geração de um produto chamado de Tricovab. Esse produto comercial é fabricado pela Unidade de Biocontrole do CEPEC (Centro de Pesquisas do Cacau), no município de Itabuna (Bahia) e a aplicação do produto representa uma etapa do manejo integrado da vassoura-de-bruxa. Os cacaueiros tratados com esporos de *T. stromaticum* não apresentam a formação de basidiomas de *M. pernicioso*, enquanto que cacaueiros não tratados apresentam. De fato, o fungo *T. stromaticum* é responsável pela supressão e paralisação da produção dos basidiomas (BASTOS, 2000).

2.3 Fungos endofíticos

Existem várias definições para o termo endófito. Em 1866, De Bary foi o primeiro a caracterizar o termo “endofítico”, como qualquer organismo presente no interior de tecidos de uma planta. Já em 1988, Carroll acrescentou ao termo a característica de que os endófitos provocam colonizações assintomáticas ao hospedeiro, essa nova definição excluía o grupo composto por organismos patogênicos e mutualistas. Três anos mais tarde, Petrini propôs que

o termo endofítico, refere-se a qualquer micro-organismo pertencente a parte aérea das plantas, capaz de colonizar os tecidos internos dos vegetais em algum período do ciclo de vida. Essa colonização caracteriza-se por não apresentar danos aparentes ao hospedeiro, conforme mencionado anteriormente por Carroll.

Wilson, em 1995, definiu que o termo endófito refere-se à bactérias e fungos que infectam assintomaticamente os tecidos da planta hospedeira, como as folhas, ramos ou caules e acrescentou ainda que a infecção ocorre durante um período ou todo o ciclo de vida desses micro-organismos. Em 2005, Schulz e Boyle utilizaram a definição de Wilson para caracterizar os micro-organismos endofíticos. Ao analisar infecções fúngicas assintomáticas em gramíneas, por espécies de fungos da família *Clavicipitaceae*, os pesquisadores utilizaram de dois termos (endófitos e endofíticos) para classificar o mesmo isolado. O uso desses dois termos provocou confusão na literatura. Portanto, o conceito de endófito e a sua classificação ainda é tema de debate entre os pesquisadores, já que cada um utiliza a sua própria definição.

Além das inúmeras definições, outra dificuldade encontra-se na diferenciação entre os micro-organismos endofíticos, epifíticos e patogênicos. Azevedo (1998) indica que um micro-organismo epifítico, o qual coloniza a superfície vegetal pode ser encontrado no interior dos tecidos vegetais como um endofítico em algumas condições, e esse mesmo micro-organismo pode se tornar um patógeno.

Cubit (1974) relatou que a taxa de herbivoria das algas verdes *Enteromorpha vexata* por moluscos era menor quando infectadas por um fungo endofítico. A partir dessa infecção essas algas sobreviviam ao verão, período em que a taxa de herbivoria era maior. Outra função dos fungos endofíticos baseia-se na proteção para os hospedeiros contra patógenos, a partir da produção de metabólitos antagônicos (WHITE et al., 1990). Gramíneas de estação fria pertencente a subfamília Pooidea, apresentam o fungo *Acremonium* como endófito predominante. Esse micro-organismo apresenta antagonismo frente a vários patógenos fúngicos de gramíneas como *Nigospora sphaerica*, *Periconia sorghina* e *Rhizoctonia cerealis* (CARROLL et al., 1988).

Essas funções desempenhadas pelos fungos endofíticos atraem a atenção dos pesquisadores. Esses organismos tornaram-se objeto de estudo de diversas pesquisas a fim de avaliar a ecologia, diversidade, fisiologia e adaptação da relação entre os parceiros. O interesse em investigar os fungos endofíticos reflete na natureza assintomática da infecção no hospedeiro. Compara-se a relação entre endofítico e o hospedeiro como um mutualismo, porém, essa classificação é errônea devido a heterogeneidade das interações entre os fungos e as plantas (SCHULZ et al., 2005).

Segundo Rodriguez et al. (2008) os fungos endofíticos são classificados em dois grupos: os endófitos da família *Clavicipitaceae* (C- endófitos) que colonizam gramíneas e os não-*Clavicipitaceae* (NC- endófitos) que colonizam assintomaticamente os tecidos de plantas não vasculares, samambaias, coníferas e angiospermas. Essa classificação baseia-se nas diferenças de parentesco evolutivo e taxonomia dos fungos, na gama de hospedeiros que infectam e nas funções ecológicas dos fungos. Esses dois grupos são divididos em classes, os C-endófitos apresentam apenas uma classe, enquanto que os NC- endófitos apresentam três. Cada classe caracteriza-se pelos seguintes parâmetros: gama de hospedeiro, tecidos colonizados, limitada ou extensa colonização da planta, alta ou baixa biodiversidade vegetal, tipo de transmissão e os benefícios.

Os C-endófitos compreendem espécies de vida livre e organismos associados a insetos, fungos, gramíneas, juncos e ciperáceas. Esse grupo é derivado da ordem *Hypocreales* a qual é composta por linhagens de patógenos e endofíticos. Esses micro-organismos apresentam transmissão vertical, ou seja, as plantas parentais distribuem os fungos para as plântulas via infecções de sementes (SAIKKONEN et al., 2002).

A maioria dos C-endófitos (classe 1) é responsável por aumentar a resistência dos hospedeiros perante a herbivoria de insetos (ROWAN et al., 1986; CLAY, 1990; PATTERSON et al., 1991; RIEDELL et al., 1991). Além dessa função esses micro-organismos apresentam atividade anti-nematóide (KIMMONS et al., 1990). Entretanto demonstrou-se que alguns C-endófitos não apresentam esses benefícios em relação ao hospedeiro, sendo necessário analisar as plantas em condições naturais para avaliar os reais benefícios (SAIKKONEN et al., 1999; FAETH et al., 2006). Outras vantagens relacionadas a esses micro-organismos referem-se a resistência às doenças, melhoria na ecofisiologia das plantas a fim de promover melhor adaptação a condições de estresse (ARECHAVALETA et al., 1989).

O segundo grupo, os NC-endófitos apresentam alta diversidade. A primeira classe, a classe 2, pode desenvolver-se nos tecidos encontrados tanto acima, quanto abaixo do solo, geralmente apresentando extensa colonização dos tecidos do hospedeiro. A maioria dos componentes dessa classe pertence ao filo *Ascomycota* e os demais componentes pertencem ao filo *Basidiomycota*. Uma das principais características dessa classe é a capacidade de conceder tolerância às condições de estresse específicas para as plantas (RODRIGUEZ et al., 2008).

A classe 2 de NC-endófitos difere-se das classes 3 e 4 devido ao local e ao tipo de infecção. Os fungos pertencentes a essa classe colonizam raízes, caules e folhas; e essa

infecção ocorre de maneira extensa dentro dos hospedeiros. A distribuição e abundância desses fungos na rizosfera não é compreendida em sua totalidade devido a insuficiência de estudos ecológicos realizados.

Segundo Rodriguez et al. (2008) o fungo *Fusarium culmorum* coloniza tecidos não embrionários da planta *Leymus mollis*. A ausência dessa simbiose provoca a morte da planta hospedeira e o crescimento lento do fungo aos altos níveis de salinidade. Os resultados são diferentes quando ocorre a simbiose, pois ambos os organismos tornam-se capazes de tolerar os altos níveis de salinidade da água do mar.

Além dos benefícios atribuídos à simbiose, esses micro-organismos são responsáveis por conferir proteção contra doenças a partir da incapacidade do patógeno em competir com os fungos endófitos pelos recursos e nicho; e por elevar a biomassa vegetal em condições de estresse (RODRIGUEZ et al., 2008). Segundo Redman et al. (1999) plantas colonizadas por endófitos ativavam mais rapidamente os mecanismos de defesa, do que plantas não colonizadas, durante o contato com patógenos.

A outra classe de NC-endófitos, a classe 3, compreende fungos ascomicetos que caracterizam-se: pela colonização principalmente de tecidos que encontram-se acima do solo, a transmissão é horizontal, a infecção é altamente localizada, concedem tolerância às condições de estresse específicas do habitat e alta diversidade. Essa alta diversidade remete a várias perguntas em relação aos papéis ecológicos desses micro-organismos, porém é difícil desenvolver regras gerais para todos os diferentes isolados de fungos no interior de um único hospedeiro (RODRIGUEZ et al., 2008). Arnold et al. (2003) demonstraram que diversos isolados de endófitos são responsáveis por diminuir lesões e a morte de folhas de *T. cacao* provocadas pelo patógeno *Phytophthora* sp. Ao considerar a interação entre endófitos dessa classe e seus hospedeiros, no contexto ecológico, é possível avaliar que esses micro-organismos apresentam papéis importantes na interação.

A última classe dos NC-endófitos, a classe 4, compreende fungos que apresentam hifas e septos melanizados, localizados exclusivamente nas raízes de árvores, arbustos e coníferas. Acredita-se que esses micro-organismos desempenham papel importante na ecofisiologia de seus hospedeiros, porém pouco se sabe sobre essa função. Além do pouco conhecimento sobre o papel desses fungos, outros aspectos como a taxonomia, ecologia e papéis ecológicos também são pouco compreendidos. Descobrir o papel funcional desses fungos é de interesse para compreender as interações entre esses organismos e seus hospedeiros.

2.4 Métricas Ecológicas

Odum e Barrett (2008) consideram que a diversidade de espécies apresenta dois componentes: (i) a riqueza de espécies, a qual compreende o número total de espécies presentes em uma amostra e (ii) a abundância relativa das espécies. Já Primack (2001) define “diversidade” como o número de espécies encontradas em uma comunidade, ou seja, a riqueza de espécies. Portanto, é comum muitos autores empregarem o termo “riqueza” como sinônimo de “diversidade”, entretanto, Margurran (2004), semelhante a Odum e Barrett (2008) considera que a diversidade de espécies compreende dois componentes: riqueza de espécies e equitabilidade. O componente riqueza refere-se ao número de espécies presentes em uma amostra (ou habitat), já a equitabilidade descreve a variabilidade na abundância de espécies, ou seja, como as proporções de cada espécie estão distribuídas na comunidade. A comunidade que apresenta diferentes espécies representadas com o mesmo número de indivíduos (i.e. igualmente abundantes), se caracteriza pela elevada equitabilidade. Já a comunidade que compreende espécies representadas com diferentes números de indivíduos apresenta uma baixa equitabilidade (MAGURRAN, 2004).

A diversidade biológica de espécies pode ser avaliada em diferentes escalas, categorizadas em diversidade alfa (α), beta (β) e gama (γ). A diversidade alfa, ou local, corresponde à diversidade presente em um habitat ou comunidade; a diversidade beta corresponde à diversidade entre habitats ou uma variação ambiental qualquer, ou seja, avalia o quanto a composição de espécies varia de um lugar para outro; e a diversidade gama ou regional corresponde a diversidade de uma grande área, bioma, continente ou ilha (WHITTAKER, 1960).

Entre os anos 1950 a 1960, muitos cientistas dedicaram-se a encontrar uma medida para descrever a diversidade de uma amostra, porém, calcular a diversidade com apenas uma única medida, ou índice, é uma tarefa complexa. Portanto, é necessário avaliar quais componentes da diversidade devem ser calculados e assim determinar qual o índice para se realizar a análise (MAGURRAN, 2004). Assim, vários índices são utilizados para o cálculo da diversidade de espécies (ODUM, 1983).

Para avaliar a riqueza de espécies pode-se utilizar dois principais parâmetros: a riqueza de espécies numérica (S), a qual consiste no número de espécies em uma amostra; e a densidade de espécies, que refere-se ao número de espécies por área de coleta. Um dos principais problemas associados a esses métodos é a dependência do esforço amostral, pois diferentes amostras (ou ambientes) podem ser avaliados com diferentes esforços, dificultando

a comparação da riqueza. A solução para esse problema corresponde à construção de curvas de rarefação, as quais estimam a riqueza de espécies e possibilitam a comparação entre amostras com diferentes tamanhos amostrais. Por exemplo é possível comparar a riqueza de espécies entre uma amostra que apresenta 750 indivíduos, enquanto a outra amostra apresenta 500 indivíduos. Ao fornecer informações e possibilitar comparações entre amostras com tamanhos diferentes, os pesquisadores caracterizam as curvas de rarefação como uma abordagem útil (MAGURRAN, 2004).

Existem diversos métodos para estimar a riqueza de espécies como os métodos paramétricos que se baseiam em parâmetros de distribuição, e os métodos não paramétricos que não se baseiam em parâmetros de um modelo de abundância de espécies. Muitos desses métodos foram desenvolvidos por Anne Chao e colaboradores, são eficientes e representam o avanço na determinação da diversidade (MAGURRAN, 2004).

Dentre os métodos não paramétricos, Chao 1 estima o número absoluto de espécies presentes em uma comunidade e baseia-se no número de espécies raras presentes em uma amostra. A fórmula desse método é representada por:

$$S_{Chao\ 1} = S_{obs} + \frac{F_1^2}{2 F_2}$$

onde S_{obs} corresponde ao número de espécies na amostra analisada, F_1 o número de espécies observadas representadas por um único indivíduo (*singletons*) e F_2 é o número de espécies observadas representadas por dois indivíduos (*doubletons*). Os resultados dessa fórmula são intuitivos e podem ser gerados em softwares como o *EstimateS* (MAGURRAN, 2004; COLWELL, 2013).

Existem vários índices para estimar a riqueza de espécies e o mesmo também ocorre com a vasta gama de índices de diversidade. Esse elevado número de índices e a representação de apenas um componente da diversidade em cada um são fatores que dificultam e prejudicam a escolha de um índice eficaz para a análise. Os índices de diversidade são divididos em: paramétricos, baseados em modelos pré-determinados que incidem sobre um parâmetro de uma ou mais populações; e os testes não paramétricos, que não se baseiam em um modelo e seus parâmetros (MAGURRAN, 2004).

Dentre os índices não paramétricos mais utilizados, o índice de Shannon, considera que os indivíduos são escolhidos ao acaso em uma comunidade e que todas as espécies estão

representadas na amostra (MAGURRAN, 2004), esse índice confere peso maior às espécies raras (ODUM, 1983). A fórmula para o cálculo desse índice é:

$$H' = -\sum p_i \ln p_i$$

onde i representa o número de espécies, p_i representa a proporção da espécie i estimada como n_i/N em que n_i corresponde a medida de importância da espécie i (número de indivíduos) e N corresponde ao número total de indivíduos. O valor obtido do índice situa-se na faixa de valores de 1,5 a 3,5, essa pequena faixa pode dificultar a interpretação de um pesquisador que se depara com os valores $H' = 2,35$ e $H' = 2,47$ que podem indicar que as duas comunidades são diferentes ou semelhantes em relação a diversidade. A tentativa de suprir essa dificuldade é o emprego de um teste estatístico (MAGURRAN, 2004).

O índice de Shannon tende a representar o componente riqueza de espécies, enquanto que outros índices de diversidade tendem a representar o componente abundância, a exemplo o índice de Simpson. Em 1949, Simpson representou matematicamente a probabilidade de dois indivíduos removidos ao acaso de uma comunidade, pertencerem a mesma espécie. Essa probabilidade (índice de Simpson) confere peso maior às espécies comuns e é representado pela fórmula:

$$D = \sum p_i^2$$

onde p_i representa a proporção da espécie i na comunidade e i representa o número de espécies. Quanto maior o valor de D , menor é a diversidade da amostra, pois significa que existe uma grande probabilidade de dois indivíduos removidos ao acaso, pertencerem à mesma espécie. Assim, para tornar o índice mais intuitivo, a probabilidade é calculada como $1/D$ (índice inverso de Simpson). Esse índice caracteriza-se como um dos índices mais robustos e significativos, já que representa a variação da distribuição da abundância das espécies (MAGURRAN, 2004).

Além dos índices de Shannon, Simpson e Chao 1 utilizados para a análise e cálculo da diversidade alfa, existem aqueles utilizados para a análise da diversidade beta. Há três categorias em que os índices da diversidade são divididos: a primeira representa a diferença entre as diversidades presentes em duas ou mais áreas, a segunda categoria representa a diferença na composição de espécies em determinadas áreas e a terceira categoria representa

a relação espécie-área. Considerando a segunda categoria, os coeficientes de similaridade de Jaccard, Bray-Curtis e Sorensen são os mais empregados (MAGURRAN, 2004).

Os índices de similaridade de Jaccard (S_j) e de Sorensen (S_s) apresentam as fórmulas:

$$S_j = a / (a + b + c)$$

$$S_s = 2a / (2a + b + c)$$

onde a representa o número de espécies em ambos os locais, b representa o número de espécies no local B, mas não em A e c representa o número de espécies no local A, mas não em B. Esses índices apresentam resultados que variam de 0 (que representa baixa similaridade) até 1 (que representa alta similaridade). Outro coeficiente de similaridade frequentemente utilizado é o coeficiente de Bray-Curtis que caracteriza-se por ser uma versão modificada do índice de Sorensen e cuja fórmula é:

$$C_N = \frac{2jN}{(N_a + N_b)}$$

onde N_a , corresponde ao número total de indivíduos no local A, N_b corresponde ao número total de indivíduos no local B e j corresponde a soma das duas espécies encontradas em menor abundância, em ambos os locais.

Existem formas gráficas para representar o compartilhamento de espécies. A maioria dos projetos relacionados a genômica fornece uma vasta quantidade de dados biológicos. A análise dessa grande quantidade de dados pode ser realizada a partir da sobreposição desses conjuntos de dados a fim de verificar as semelhanças e diferenças entre os conjuntos. O método o qual utiliza a sobreposição dos dados denomina-se diagrama de Venn (HULSEN et al., 2008). O diagrama de Venn pode apresentar dois ou mais círculos sobrepostos, cada círculo representa um conjunto de dados e o tamanho desse corresponde ao tamanho do conjunto de dados analisados.

3 OBJETIVOS

- Caracterizar e comparar a riqueza e abundância de fungos filamentosos isolados da superfície e do interior das folhas de cacaueiros.
- Avaliar se cacaueiros localizados em diferentes fazendas apresentam diversidades diferentes de fungos endofíticos e epifíticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem dos fungos filamentosos associados ao cacauero

Fungos filamentosos da superfície (epifíticos) e do interior (endofíticos) das folhas de cacaueros cultivados na região de Ilhéus (Bahia) foram obtidos no projeto consorciado “CAPES/PRODOC 2010 – Impacto do ambiente de cultivo na resposta funcional do hologenoma do cacau, a partir da análise da diversidade endofítica do filoplano” coordenado pela Profa. Fernanda Amato Gaiotto, da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA.

Os fungos foram isolados a partir de 56 folhas de cacaueros sadios cultivados em duas fazendas: (i) Fazenda Almirante Cacau (Centro Mars de Ciência do Cacau) localizada no município de Barro Preto, BA e (ii) Fazenda Jacy (Instituto Biofábrica de Cacau da UESC) no município de Arataca, BA. Ambas as fazendas apresentavam sistema agroflorestal denominado “cabruca” que baseia-se no cultivo dos cacaueros sob o dossel de árvores, principalmente, de espécies nativas da Mata Atlântica. Na primeira fazenda, a cabruca apresenta ao seu redor a presença de outros cultivos e estradas, enquanto que a segunda fazenda é rodeada com mata nativa conservada em estágio avançado de sucessão.

Para o isolamento dos fungos epifíticos, as folhas de cacauero foram imersas em uma bandeja com água destilada estéril e foram lavadas durante cinco minutos com agitação manual. Aliquotas de 100 µl provenientes da água de lavagem foram inoculadas em placas de Petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Agar) e ME (Extrato de malte 2%) mantidas a 28° C. Já para o isolamento dos fungos endofíticos, as folhas foram desinfetadas superficialmente, fragmentadas com o auxílio de bisturi estéril em cinco fragmentos, os quais foram inoculados em meio BDA (Batata Dextrose Agar) e ME (Extrato de malte 2%) mantidos a 28° C. Os fungos filamentosos provenientes desses isolamentos foram depositados no acervo de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM – UNESP) e estão preservados a -80 °C. A coleção compreende 40 isolados provenientes do interior das folhas (endofíticos) e 39 isolados provenientes da superfície das folhas dos cacaueros (epifíticos).

4.2 Cultivo e triagem dos morfotipos de fungos filamentosos

Inicialmente, os isolados presentes na coleção foram reativados em ágar malte 2% (MA2%) e incubados durante sete dias a 28 °C. Tal cultivo foi realizado a fim de avaliar as condições de pureza e esporulação das culturas.

Após o cultivo, realizou-se uma triagem avaliando as características macro e microscópicas dos isolados com o intuito de separar os fungos em morfoespécies. Os fungos foram inicialmente caracterizados quanto à coloração do micélio e aspecto do reverso e do obverso da cultura, com o auxílio de esteromicroscópio (EZ4, LEICA). Após a análise macroscópica, realizou-se a avaliação das estruturas de reprodução com a preparação de lâminas, as quais foram analisadas em microscópio (DM750, LEICA). A análise das estruturas de reprodução auxiliou a identificação dos isolados até gênero ou espécie, a partir da comparação dessas estruturas encontradas nas chaves taxonômicas (WATANABE, 2002; DOMSCH et al., 1980).

As culturas que não apresentavam as estruturas de reprodução foram cultivadas em ágar aveia durante 30 dias a 25 °C (RODRIGUES et al., 2011), a fim de estimular o processo de esporulação. Todos os isolados foram armazenados a 10 °C em tubos de MA2% inclinado, o qual constituiu o estoque de trabalho para o presente projeto de pesquisa.

4.3 Identificação molecular dos isolados

Foi selecionado apenas um representante de cada morfoespécie para a identificação a partir de marcadores moleculares, além desses isolados foi realizado a identificação molecular para 14 fungos denominados “FNI” (fungos não identificados) e 3 fungos denominados “FNE” (fungo não esporulante).

Inicialmente, o DNA genômico foi extraído pelo método modificado de Möller et al. (1992) e Gerardo et al. (2004). Após o processo de extração, a região ITS (espaçador interno transcrito) foi amplificada com a utilização dos *primers* ITS4 e ITS5 (WHITE et al. 1990). Os *amplicons* foram purificados e, posteriormente, quantificados e preparados para o sequenciamento utilizando *BigDye Terminator[®] v.3.1. Kit* (Life Technologies). Ambas as sequências *forward* e *reverse* foram geradas em ABI 3330x1 (Life Technologies) e reunidas em uma sequência consenso. Tais sequências foram comparadas com aquelas depositadas nas bases de dados do NCBI- GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e CBS (www.cbs.knaw.nl).

4.4 Análise de diversidade e comparação das comunidades de fungos

Após a identificação molecular e morfológica, as comunidades de fungos endofíticos e epifíticos foram caracterizadas quanto à riqueza e abundância de espécies utilizando métricas ecológicas. Foram gerados índices de diversidade (Simpson e Shannon) e o estimador de espécies de Chao1 para as comunidades de fungos. Para avaliar o compartilhamento de espécies entre as amostras, foram utilizados os coeficientes de similaridade de Jaccard, Sorensen e Bray-Curtis.

Todos os índices foram calculados no software *EstimateS* v. 9.1 (COWELL, 2013), utilizando as configurações padrões, ou seja, foram elaboradas 100 randomizações nos cálculos de todos os índices e a fórmula corrigida para o estimador de Chao-1. Foram construídos diagramas de Venn para demonstrar o número de táxons compartilhados entre as comunidades. Os diagramas foram gerados no software R v.3.0.1 (The R Core Team) utilizando o pacote *VennDiagram*.

5 RESULTADOS

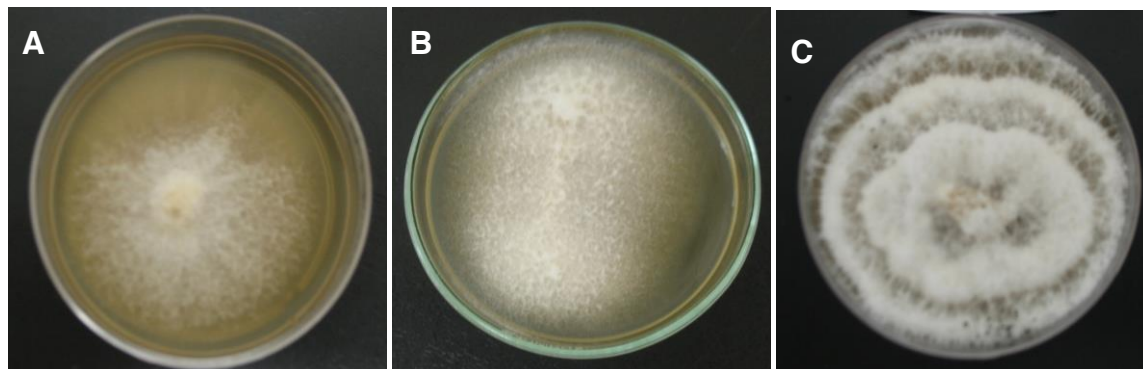
5.1 Identificação polifásica dos fungos filamentosos

Dentre os 79 isolados de fungos filamentosos obtidos das folhas de cacaueiros, três não foram identificados, pois não formaram as estruturas de reprodução em meio de cultivo, portanto, foram classificados como “fungos não esporulantes (FNE)”. Dos 76 isolados remanescentes, todos apresentaram estruturas de reprodução assexuada; assim, 62 isolados foram identificados e agrupados em 9 morfoespécies, segundo as características morfológicas dessas estruturas (Apêndice A1). O restante dos isolados (n= 14) não foi identificado, pois as estruturas presentes nas lâminas não foram encontradas nas chaves de identificação utilizadas. Esses fungos foram classificados como “fungos não identificados” (FNI).

Após a triagem morfológica, realizou-se a identificação molecular de isolados representativos das morfoespécies obtidas (n= 9), os 14 isolados classificados como FNI e os três isolados denominados como FNE. As sequências da região ITS geradas para esses isolados foram comparadas com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI – GenBank e CBS.

Posteriormente, foi elaborada uma comparação entre a análise morfológica e molecular a fim de classificar cada isolado (Apêndice A2). No total, foram identificados 12 gêneros e 25 espécies (Tabela 1). *Fusarium* (33,2%), *Bionectria* (16,6%) e *Pestalotiopsis* (12,8%) foram os gêneros prevalentes no estudo (Tabela 1 e Figura 1). Considerando o total de isolados do estudo, *Bionectria ochroleuca*, *Fusarium* sp. 2 e *Pestalotiopsis* sp. 1 foram as espécies mais abundantes (Tabela 1).

Figura 1: Morfologia das colônias dos gêneros prevalentes de fungos isolados da superfície (epifíticos) e do interior (endofíticos) das folhas de cacaueiros presentes em duas fazendas. Fungos cultivados em meio MA2% com 7 dias de crescimento.



Fusarium sp.

Bionectria sp.

Pestalotiopsis sp.

Tabela 1 – Fungos isolados do interior (endofíticos) e da superfície (epifíticos) de folhas de cacaueiro, em duas fazendas (Jacy e Almirante) da região sul da Bahia.

Fungos	Jacy		Almirante		Nº isolados ¹	% ²
	Endofítico	Epifítico	Endofítico	Epifítico		
<i>Acremonium</i> sp. 1	3	1	0	0	4	5,2
<i>Acremonium</i> sp. 2	0	2	0	0	2	2,6
<i>Albonectria rigidiuscula</i>	3	0	0	0	3	3,8
<i>Bionectria ochroleuca</i>	7	0	5	1	13	16,6
<i>Cladosporium</i> sp.	0	1	0	1	2	2,6
<i>Fusarium polyphialidicum</i>	6	0	5	0	11	14
<i>Fusarium solani</i>	1	1	1	0	3	3,8
<i>Fusarium</i> sp. 1	0	0	1	0	1	1,3
<i>Fusarium</i> sp. 2	4	2	3	1	10	12,8
<i>Fusarium equiseti</i>	0	0	1	0	1	1,3
<i>Gliocadium</i> sp.	0	1	0	0	1	1,3
<i>Hypocreales</i> sp.	0	1	0	0	1	1,3
<i>Mucor</i> sp.	0	3	0	3	6	7,6
<i>Rhizomucor variabilis</i>	0	1	0	0	1	1,3
<i>Penicilium</i> sp.	0	0	0	1	1	1,3
<i>Penicilium citrinum</i>	0	0	0	1	1	1,3
<i>Penicilium rolfsii</i>	0	1	0	0	1	1,3
<i>Penicilium rubrum</i>	0	0	0	1	1	1,3
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	0	0	0	1	1	1,3
<i>Pestalotiopsis</i> sp.1	0	3	0	5	8	10,2
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 2	0	0	0	1	1	1,3
<i>Trichoderma</i> sp.	0	1	0	0	1	1,3
<i>Trichoderma atroviride</i>	0	1	0	0	1	1,3
<i>Trichoderma harzianum</i>	0	2	0	0	2	2,6
<i>Trichoderma</i> cf. <i>strigosum</i>	0	2	0	0	1	1,3
Total	24	23	16	16	79	100

¹ Número de isolados obtidos para cada gênero ou espécie de fungo.

² %: Proporção de cada táxon, em relação ao total de isolados.

5.2 Caracterização das comunidades de fungos filamentosos associadas às folhas do cacaueiro

As comunidades de fungos endofíticos e epifíticos foram caracterizadas quanto à riqueza e abundância de espécies utilizando métricas ecológicas. Principalmente para a comunidade de fungos epifíticos, o estimador de espécie de Chao1 sugere que é necessário um maior esforço amostral, a fim de recuperar o número mínimo de espécies que deve existir em cada uma das comunidades analisadas (Tabela 2).

Além do estimador de riqueza de espécies, foram calculados os índices de Shannon e Simpson, os quais compõem a diversidade alfa das amostras (ODUM, 1983). Esses índices demonstraram que a comunidade de fungos epifíticos é mais diversa, quando comparada a comunidade de fungos endofíticos (Tabela 2). Esses índices também indicam que as comunidades de fungos associadas aos cacaueiros da fazenda Jacy apresentam uma tendência de serem mais diversas, quando comparadas às comunidades de fungos amostradas nos cacaueiros da fazenda Almirante (Tabela 2).

Tabela 2 – Índices de diversidade e riqueza de espécies calculados para as comunidades de fungos endofíticos e epifíticos e para os isolados presentes nas Fazendas Jacy e Almirante Cacau.

Amostras	S ¹	H	1/D	Chao 1
<i>Endofíticos</i>	8	1,74	4,73	8,49
Fazenda Jacy	6	1,66	4,8	6
Fazenda Almirante Cacau	4	1,56	4,13	8,81
<i>Epifíticos</i>	21	2,73	10,94	38,73
Fazenda Jacy	15	2,61	12,3	21,89
Fazenda Almirante Cacau	10	2,06	6,1	36,25

¹ S: riqueza; H: índice de Shannon; 1/D: Simpson inverso; Chao1: estimador de espécies.

Outro tipo de diversidade analisada foi a diversidade beta, a qual corresponde a comparação da diversidade entre habitats (ODUM, 1983). Os valores dos índices de compartilhamento de táxons sugerem que a composição de espécies entre as comunidade de fungos endofíticos e epifíticos é baixa (Tabela 3). Além disso, os mesmos índices calculados para os fungos epifíticos presentes na Fazenda Jacy e Almirante Cacau indicam que há uma baixa similaridade na composição de espécies (Tabela 3). Por outro lado, os índices de similaridade de fungos endofíticos entre as fazendas Jacy e Almirante Cacau apresentam valores próximos a 1, o que indica maior similaridade de composição de espécies entre as fazendas (Tabela 3).

Tabela 3 – Índices de similaridade das comunidades de fungos endofíticos e epifíticos obtidas de cacauzeiros das fazendas Almirante Cacau e Jacy.

Amostra	Jaccard	Sorensen	Bray-Curtis
Endofíticos-Epifíticos	0,16	0,276	0,152
Endofíticos/Jacy- Endofíticos/Almirante	0,5	0,667	0,7
Epifíticos/Jacy-Epifíticos/Almirante	0,19	0,32	0,41

Segundo os diagramas de Venn, as comunidades de fungos endofíticos e epifíticos compartilham quatro táxons, sendo que esses compreendem 38% do total de isolados do estudo (Figura 2). Os fungos *Acremonium* sp. 1, *B. ochroleuca*, *Fusarium solani* e *Fusarium* sp. 2 foram compartilhados entre as comunidades de fungos endofíticos e epifíticos. As demais espécies obtidas no estudo apresentaram isolados exclusivos de uma comunidade ou de uma localidade amostrada (Tabela 1). A comunidade de fungos epifíticos apresenta 17 táxons exclusivos, o que corresponde a 41,7% do total de isolados do estudo. Já a comunidade de fungos endofíticos apresenta quatro táxons exclusivos o que corresponde a 16% do total de isolados.

A comunidade de fungos endofíticos apresenta quatro táxons compartilhados entre as duas fazendas, apesar do pequeno número de táxons esse valor representa 80% do total de isolados (Figura 3). Já a comunidade de fungos epifíticos exibe quatro táxons compartilhados entre as duas fazendas, porém esse número de táxons representa 48,7% do total de isolados (Figura 4).

Figura 2 – Compartilhamento dos táxons entre as comunidades de fungos epifíticos e endofíticos. O número indica a quantidade de táxons de cada grupo e o número entre parênteses indica o número total de isolados.

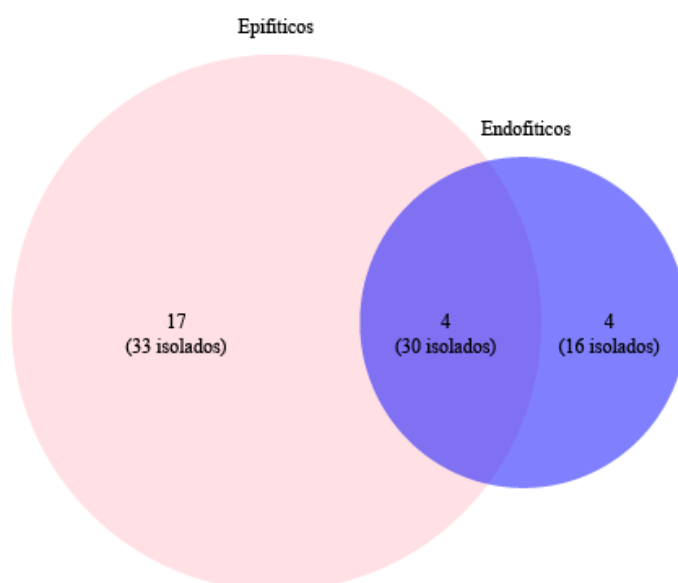


Figura 3 – Compartilhamento de táxons de fungos endofíticos entre as Fazendas Jacy (rosa) e Almirante Cacao (azul). O número indica a quantidade de táxons de cada grupo e o número entre parênteses indica o número total de isolados.

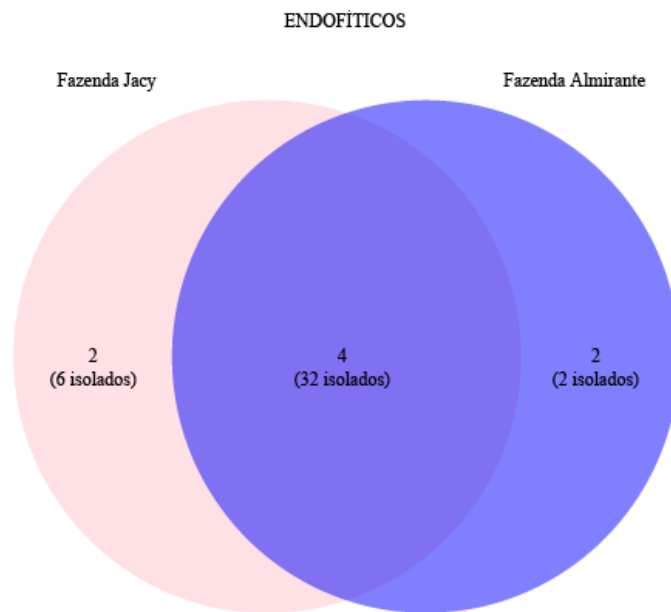
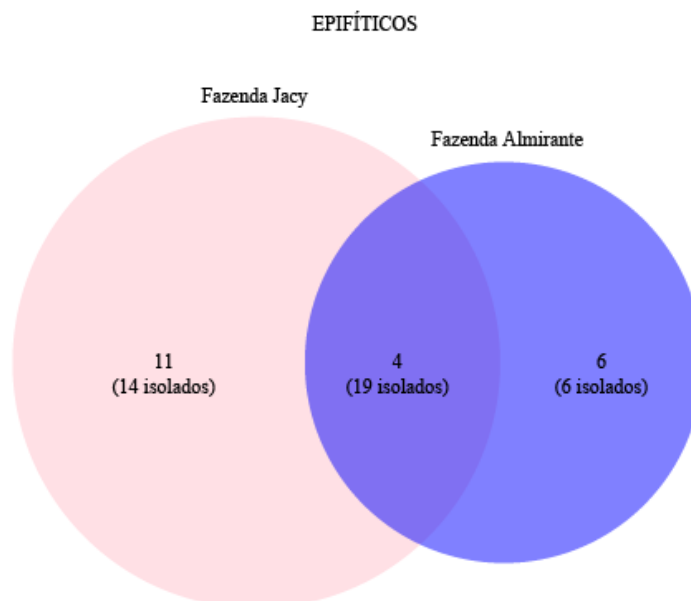


Figura 4 – Compartilhamento de táxons de fungos epifíticos entre as Fazendas Jacy (rosa) e Almirante Cacao (azul). O número indica a quantidade de táxons de cada grupo e o número entre parênteses indica o número total de isolados.



6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou e comparou as comunidades de fungos endofíticos e epifíticos associadas às folhas de cacaueteiro em duas fazendas, na região sul da Bahia. No geral, os resultados obtidos permitiram observar que a interação dos fungos com os cacaueteiros é suscetível a fatores ambientais, os quais são os responsáveis por afetar a composição das comunidades associadas às folhas dessa planta, conforme relatado por Rubini e colaboradores (2005). Em especial, as comunidades de fungos epifíticos avaliadas no presente estudo foram as mais propensas às variações ambientais.

Rubini et al. (2005) isolaram 150 fungos filamentosos pertencentes a microbiota associada aos ramos de cacaueteiros presentes no município de Itabuna, Bahia. Foram isolados e identificados 23 gêneros, tais como: *Acremonium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Gliocadium*, *Pestalotiopsis* e *Trichoderma*. Dentre esses, o gênero *Fusarium* foi prevalente, já que apresentou alta frequência no isolamento. É possível observar que algumas tendências são aparentes em relação aos fungos predominantes isolados como endofíticos, o gênero *Fusarium* parece ser ubíquo já que foi encontrado em outras plantas hospedeiras. Esse gênero pode estar relacionado com o desempenho de alguma função no desenvolvimento da planta, como é o caso de *F. oxysporum* que pode induzir a resistência em pepinos contra a doença conhecida como “podridão das raízes”, cujo agente etiológico é *Pythium ultimum* (RUBINI et al., 2005). Entretanto, no estudo de Rubini et al. (2005) os isolados de *Fusarium* não foram capazes de inibir os efeitos da doença vassoura-de-bruxa nas condições *in vitro* e *in vivo*.

No presente estudo também foram encontrados os mesmos gêneros de fungos em cacaueteiros das duas fazendas. Dentre os fungos isolados no presente estudo, *Fusarium* também foi o gênero prevalente. Vale ressaltar que o tecido de isolamento desses fungos foi diferente, pois Rubini e colaboradores (2005) utilizaram tecidos internos de ramos de cacaueteiros, enquanto, que o presente estudo utilizou a superfície e os tecidos internos das folhas para o isolamento dos fungos filamentosos. Sabe-se que muitos gêneros como o *Fusarium*, por exemplo são ubíquos, ou seja, podem ser encontrados em outras plantas hospedeiras, como também em outras partes da planta.

Além de *Fusarium* sp., outro gênero caracterizado como prevalente no presente estudo foi *Pestalotiopsis*. Esse gênero pertence à família *Amphisphaeriaceae* e está presente em espécies subtropicais e tropicais de plantas. Fungos pertencentes a esse gênero são considerados sapróbios, ou seja, se nutrem de matéria em decomposição proveniente do material vegetal e são encontrados como fungos endofíticos associados a uma variedade de

plantas. A ampla distribuição geográfica e a ocorrência onipresente são aspectos que sugerem o papel importante desse gênero, porém, as funções desse fungo para a planta hospedeira ainda são desconhecidas (TEJESVI et al., 2007).

Uma possível função de *Pestalotiopsis* sp. é conferir a proteção da planta hospedeira frente à fitopatógenos. Tejesvi et al. (2007) isolaram 19 linhagens de *Pestalotiopsis* spp. a partir da casca, galhos e raízes da árvore *Terminalia arjuna*, oriunda de três regiões do estado de Karnataka, na Índia. Outros sete isolados desse fungo foram obtidos da planta de *T. chebula*, localizada no monte Himavad Gopalaswamy Betta, na Índia. Do total de isolados, 62,5% inibiram o crescimento de fungos patogênicos, através da produção de compostos ativos. É sabido que isolados do gênero *Pestalotiopsis* sintetizam uma vasta variedade de moléculas bioativas de interesse para a indústria farmacêutica (STROBEL, 2002). O metabolismo desse fungo, portanto, atrai a atenção dos pesquisadores como fonte de possíveis novos medicamentos, além de ser um possível agente controlador de doenças nas plantas (TEJESVI et al., 2007).

Os trabalhos de Rubini et al. (2005) e Tejesvi et al. (2007) encontraram os mesmos gêneros, porém, no presente estudo os fungos *Acremonium* sp., *Cladosporium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Trichoderma* sp., *Gliocadium* sp., um fungo identificado até ordem (*Hypocreales* sp.) e *Fusarium* sp. foram isolados como epifíticos. Dentre esses, *Pestalotiopsis* sp., *Trichoderma* sp., *Hypocreales* sp. e *Cladosporium* sp. foram isolados somente como epifíticos. Essas características sugerem que fungos epifíticos podem inicialmente habitar a superfície da folhas e, posteriormente, invadir os tecidos internos, através de estômatos, ferimentos, ou mesmo pelas raízes, como sugerido por Azevedo (1998).

Hanada et al. (2010) isolaram 147 fungos endofíticos associados aos tecidos internos de ramos e galhos de cacaueiros. Os gêneros prevalentes do estudo foram: *Trichoderma*, *Pestalotiopsis* e *Fusarium*. Os dois últimos também foram classificados como os mais prevalentes no presente estudo, porém, *Pestalotiopsis* sp. foi encontrado exclusivamente como um fungo epifítico. Além desse fungo, o presente estudo identificou os gêneros *Trichoderma* e *Gliocadium* como fungos epifíticos, ao contrário do estudo de Hanada et al. (2010) que reportou esses gêneros como fungos endofíticos do cacaueiro. Essas observações sugerem que *Pestalotiopsis* e *Trichoderma* podem colonizar tanto os tecidos internos, quanto a superfície das folhas de cacaueiros.

Uma característica presente nesses estudos é a pesquisa exclusiva de fungos endofíticos, sem mencionar os fungos epifíticos. Outros avaliam somente os fungos epifíticos sem analisar os fungos endofíticos. Entretanto, fungos endofíticos e epifíticos coexistem no

mesmo hospedeiro, sendo necessário o incentivo para o desenvolvimento de pesquisas sistêmicas que abranjam, portanto, ambas as comunidades. Um trabalho interessante que envolveu tal estudo sistêmico é o de Rosenberg et al. (2008). Esses autores avaliaram o branqueamento do coral *Oculina patagonica*, resultado da infecção da bactéria *Vibrio shiloi* que ocorre no período do verão, quando a temperatura do mar ultrapassa 25 °C. No período de 2002 a 2004 os pesquisadores notaram a resistência do coral em relação à infecção por *V. shiloi*, a qual está relacionada a uma rápida adaptação dos corais às condições ambientais, devido a alteração da população de bactérias simbiotes presentes nesses organismos. Os corais apresentam uma vasta e diversa população de bactérias associadas aos tecidos, a qual sofre mudanças rápidas a partir da alteração nas condições ambientais. Tal população responde a essas mudanças secretando compostos antimicrobianos. A partir da observação desse fenômeno, foi proposta a hipótese do “Coral Probiótico”, a qual afirma que a alteração na constituição genética do holobionte ocorre via resposta a estímulos ambientais. Assim como o trabalho de Rosenberg et al. (2008), trabalhos semelhantes são necessários para entender as interações entre plantas e fungos endofíticos e epifíticos.

Rubini et al. (2005) avaliaram a atividade dos fungos endofíticos frente ao basidiomiceto *M. pernicioso*. Estudos *in vitro* demonstraram que dentre os 265 isolados de fungos endofíticos, apenas 43 (16,22%) foram capazes de inibir o crescimento do agente etiológico da doença vassoura-de-bruxa. Entretanto, quando esses fungos foram testados em cacaueiros em casas de vegetação (*in vivo*), apenas o fungo *Gliocladium catenulatum* foi capaz de reduzir os sintomas da vassoura-de-bruxa. Esse fungo demonstra-se como um possível agente de controle biológico a ser utilizado em campo contra o fungo *M. pernicioso*. No presente estudo, não foi possível determinar se o isolado de *Gliocladium* sp. obtido pertence à *G. catenulatum*, pois a região ITS não apresentou resolução suficiente para separar entre as espécies desse gênero. Ainda, Hanada et al. (2010) observaram que 70% (dos 147 isolados) apresentaram redução na gravidade da doença da podridão parda (ocasionada pelo agente etiológico *Phytophthora* sp.) nos cacaueiros. Entretanto, apenas oito isolados demonstraram-se promissores agentes biológicos no combate ao desenvolvimento dessa doença.

Os estudos de Hanada et al. (2010) e Rubini et al. (2005) sugerem que plantas inseridas em regiões tropicais, como o cacaueiro e o cupuaçu, apresentam maior diversidade de micro-organismos endofíticos, em relação à hospedeiros presentes em regiões temperadas. Entretanto, essa diversidade ainda não é conhecida visto que 50% dos isolados caracterizados por Hanada et al. (2010) já foram descritos como fungos endofíticos associados a outras plantas e não ao cacaueiro. Os demais isolados foram registrados somente associados ao

cacaueiro (HANADA et al., 2010). Nesse sentido, estudos adicionais necessitam desvendar os componentes presente nas comunidades de fungos endofíticos e epifíticos associadas aos cacaueiros e, assim, avaliar a diversidade dessas comunidades.

No presente trabalho foi possível avaliar a influência de um local não preservado na diversidade de fungos. A coleta das folhas de cacaueiro foram realizadas em duas fazendas: a Fazenda Jacy e a Fazenda Almirante Cacau. A partir da análise de diversidade de ambas as áreas verificou-se a tendência das comunidades de fungos da Fazenda Jacy serem mais diversas, quando comparadas às comunidades da Fazenda Almirante Cacau. A alta diversidade presente nessa área pode ser consequência da floresta nativa conservada ao redor do sistema agroflorestal, que permite o fluxo de um maior número de espécies fúngicas entre os cacaueiros e as árvores nativas do entorno da cabruca. Esse fluxo pode não ocorrer (ou ocorrer em menor intensidade) na Fazenda Almirante Cacau, já que a área ao redor do sistema agroflorestal foi desmatada para a implementação de estradas e novos cultivos.

Além da diversidade, o compartilhamento de táxons associados às fazendas também foi diferente entre as áreas. O número de táxons endofíticos e epifíticos compartilhados entre as fazendas Jacy e Almirante Cacau foi semelhante ($n = 4$ táxons). Porém, os quatro táxons de fungos endofíticos representam 80% do total dos isolados do estudo, enquanto que os quatro táxons compartilhados dos fungos epifíticos representam 48,7%. Essa característica de compartilhamento de táxons sugere que a comunidade de fungos endofíticos tende a ser mais homogênea entre as áreas de estudo.

As comunidades foram caracterizadas em relação aos índices de diversidade, os quais sugerem que a comunidade de fungos epifíticos é mais diversa em relação a comunidade de fungos endofíticos. Ambas as comunidades estão associadas ao mesmo hospedeiro, porém a planta exerce maior controle sobre a colonização dos tecidos internos do que a colonização dos tecidos externos. Essa característica pode explicar as diferenças encontradas na composição e diversidade das comunidades (SANTAMARÍA et al., 2005).

Além da influência da planta sobre a colonização dos tecidos, a diferença entre a localidade do tecido em que esses micro-organismos estão associados também pode influenciar nas características de cada comunidade. Assim, a comunidade de fungos endofíticos está mais protegida contra as variações e influências das condições ambientais e, possivelmente, menos propensa à mudanças, quando comparado com a comunidade de fungos epifíticos nas duas fazendas avaliadas (Figuras 3 e 4).

Diferente do ambiente interno dos tecidos vegetais, a superfície das folhas do cacaueiro constitui-se em um microambiente exposto à diversas condições ambientais e suas

variações, além de não apresentar o mesmo controle das condições encontradas no ambiente interno da planta. Sabe-se que situações de estresse ou flutuações ambientais são ameaças para a estabilidade da associação entre planta e a microbiota, porém, a diversidade das comunidades microbianas é responsável por estabilizar essa associação (PERRY et al., 1989). De fato no presente estudo, a comunidade de fungos epifíticos é mais diversa em relação à comunidade de fungos endofíticos, o que pode ser resultado da influência dos fatores ambientais e da função de estabilizar a simbiose entre hospedeiro e microbiota. Entretanto, estudos são necessários no sentido de avaliar quais fatores ambientais são os responsáveis por afetar a diversidade em cada comunidade.

Finalmente, o fato dos fungos endofíticos apresentarem uma maior abundância de fungos compartilhados, do que exclusivos para cacauzeiros encontrados em cada área, constitui em uma evidência de que esses fungos podem desempenhar uma função para o hospedeiro. Além da função relacionada aos hospedeiros, os micro-organismos desempenham funções relacionadas ao habitat, sabe-se que o processo de decomposição resultante da atividade microbiana é essencial para o funcionamento dos ecossistemas. Além dessa função, os micro-organismos são responsáveis pela degradação e desintoxicação de contaminantes (ZAK et al., 1994; AELION et al., 1991). Nesse contexto, estudos adicionais são necessários para verificar o potencial dos fungos endofíticos e também dos epifíticos na proteção dos cacauzeiros frente a patógenos, incluindo *M. perniciosa*. O estudo sobre a estimativa da diversidade de micro-organismos caracteriza-se como pré-requisito para o processo de compreensão da atividade funcional que esses micro-organismos desempenham nos hospedeiros (OVREAS et al., 1997). Portanto, o presente estudo foi o primeiro passo para comparar as comunidades de fungos endofíticos e epifíticos do cacauzeiro.

7 CONCLUSÕES

- O presente estudo acessou a diversidade de fungos associados ao cacaueiro e revelou que as comunidades de fungos endofíticos tendem a ser mais coesas (homogêneas), em relação às comunidades de fungos epifíticos, nas diferentes fazendas avaliadas.
- Nossos dados sugerem que as comunidades de fungos epifíticos são mais diversas que as comunidades de fungos endofíticos, o que possivelmente está relacionado à fatores ambientais não controlados no presentes estudo.

REFERÊNCIAS

- AELION, C. M.; BRADLEY, P. M. Degradation potential of subsurface microorganisms from a Jet fuel- contaminated aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 1, p. 57-63, 1991.
- ARECHAVALETA, M.; BACON, C. W.; HOVELAND, C. S.; RADCLIFFE, D. E. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. **Agronomy Journal**, Madison, v. 81, n. 1, p. 83-90, 1989.
- 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**, New York, v. 95, n. 3, p. 388-398, 2003.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Editora Embrapa, 1998. p. 117-137.
- BASTOS, C. N. *Trichoderma stromaticum* sp. nov. on the production of basidiomatas and on infections of shoots and cushion flowers of cocoa by *Crinipellis pernicioso*. **Agrotrópica**, Itabuna, v. 12, n. 1, p. 59-62, 2000.
- BETTIOL, W.; MORANDO, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. 334p.
- CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont, **Ecology**, New York, v. 69, n. 1, p. 2-9, 1988.
- CLAY, K. Fungal endophytes of grasses, **Annual review of ecology and systematics**, California, v. 21, p. 275-297, 1990.
- COWELL, R. K. **EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples**. Version 9. User's Guide and application. Disponível em: <<http://purl.oclc.org/estimates>>. Acesso em: 09 jun. 2013.
- CUBIT, J. D. Herbivory and the seasonal abundance of algae on a high intertidal rocky shore, **Ecology**, New York, v. 65, n. 6, p. 1904-1917, 1984.
- DINIZ, J. A.; DUARTE, A. C. **A região cacauzeira da Bahia**. Recife: SUDENE, 1983. 294 p.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. **Compendium of soil fungi**. 1 ed. Great Britain: Academic Press, 1980, 859 p.
- EVANS, H. C. Pleomorphism of *Crinipellis pernicioso* causal agent of witches' broom disease of cocoa. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 74, n. 3, p. 515-523, 1980.
- FAETH, S. H.; GARDNER, D. R.; HAYES, C. J.; JANI, A.; WITTLINGER, S. K.; JONES, T. A. Temporal and spatial variation in alkaloid levels in *Achnatherum robustum*, a native Grass infected with the endophyte *Neotyphodium*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 32, n. 2 p. 307-324, 2006.

GARCEZ, A. N. R. **Diagnóstico Socioeconômico da região cacauíera**. Ilhéus: Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, 1975. 250 p.

GERARDO, N. M.; MUELLER, U. G.; PRICE, S. L.; CURRIE, C. R. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ant symbiosis. **Proceedings of the Royal Society, Series B**, Edinburgh, v. 271, n. 1550, p. 1791-1798, 2004.

GRIFFITH, G. W. Witches' brooms and frosty pods: threats to world cacao production. **Biologist**, United Kingdom, v. 51, n. 2, p. 71-75, 2004.

HANADA, R. E.; POMELLA, A. W. V.; COSTA, H. S.; BEZERRA, J. L.; LOGUERCIO, L. L.; PEREIRA, J. O. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. **Fungal Biology**, Oxford, v. 114, n. 11-12, p. 901-910, 2010.

HULSEN, T.; VLIEG, J.; ALKEMA, W. BioVenn- a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. **BMC Genomics**, London, v. 9, n. 488, p. 1-6, 2008.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1997. 705 p.

KIMMONS, C. A.; GWINN, K. D.; BERNARD, E. C. Nematode reproduction on endophyte-infected and endophyte-free tall fescue. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, n. 2, p. 757-761, 1990.

LOGUERCIO, L.L.; CARVALHO, A.C.; NIELLA, G.R.; SOUZA, J.T.; POMELLA, A.W.V. Selection of *Trichoderma stromaticum* isolates for efficient biological control of witches broom disease in cacao. **Biological Control**, Orlando, v. 51, n.1049-9644, p.130-139, 2009.

LOPES, V. L.; MONTEIRO, W. R.; PIRES, J. L.; CLEMENT, D.; YAMADA, M. M.; GRAMACHO, K. P. Cacao breeding in Bahia, Brazil – strategies and results. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, p. 73-81, 2011.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 640 p.

MAGURRAN, A. E. **Measuring biological diversity**. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2004. 256 p.

MÖLLER, E. M.; BAHNWEG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H. H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, n. 22, p. 6115-6116, 1992.

N'GORAN, J. A. K.; LAURENT, V.; RISTERUCCI, A.M.; LANAUD, C. Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers. **Heredity**, London, v. 74, p. 589-597, 1994.

ODUM, E. P. Populações em Comunidades. In: _____. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1983. p. 233-281.

ODUM, E. P.; BARRETT, G.W. **Fundamentos de Ecologia**. São Paulo: Cenage Learning, 2008. 612p.

OVREAS, L.; FORNEY, L. DAAE, F. L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-Amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 9, p. 3367-3373.

PATTERSON, C. G.; POTTER, D. A.; FANIN, F. F. Feeding deterrence of alkaloids from endophyte-infected grasses to Japanese beetle grubs. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 61, n. 3, p. 285-289, 1991.

PEREIRA, J.L.; DE ALMEIDA, L.C.C.; SANTOS, S.M. Witche's broom disease of cocoa in Bahia: attempts at eradication and containment. **Crop Protection**, Guildford, v. 15, n. 8, p. 743-752, 1996.

PERRY, D. A.; AMARANTHUS, M. P.; BORCHERS, J. G.; BORCHERS, S. L.; BRAINERD, R. E. Bootstrapping in Ecosystems. **BioScience**, Washington, v. 39, n. 4, p. 230-237, 1989.

PETRINI, J. O. **Fungal endophytic of tree leaves**. In: ANDREWA, J.; HIRANO, S. S. Microbial Ecology of leaves, Spring Verlag, 1991. p. 179-197.

PRIMACK, R. B. **Biologia da conservação**. Londrina: Editora Midiograf, 2001. 328p.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 10 nov. 2013.

REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiotic: from mutualism to parasitism, who controls the outcome, host or invade? **New Phytologist**, Cambridge, v. 151, p. 705-716, 2001.

RIEDEL, W. E.; KIECKHEFER, R. E.; PETROSKI, R. J.; POWELL, R. G. Naturally occurring and synthetic loline alkaloid derivatives: insect feeding behavior modification and toxicity. **Journal of Entomological Science**, Tifton, v. 26, n. 5, p. 122-129, 1991.

RODRIGUES, A.; MUELLER, U. G.; ISHAK, H. D.; BACCI, M. Jr; PAGNOCCA, F. C. Ecology of microfungus communities in gardens of fungus-growing ants (*Hymenoptera: Formicidae*): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 244-255, 2011.

- RODRIGUEZ, R. J.; WHITE JR., J. F.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, Cambridge, v. 182, n. 2, p. 314-330, 2009.
- ROSENBERG, E.; ZIBER-ROSENBERG, I. From bacterial bleaching to the hologenome the evolution. **Proceedings of the 11th Internacional Coral Reef Symposium**, Florida, v. 9, p. 1-5, 2008.
- ROWAN, D.D.; GAYNOR, D. L. Isolation of feeding deterrent against stem weevil from ryegrass infected with the endophyte *Acremonium loliae*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 12, n. 3, p. 647-658, 1986.
- RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; DOS SANTOS, C. 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 Sciences**, Australia, v.1, n. 1, p. 24-33, 2005.
- SAIKKONEN, K.; ION, D.; GYLLENBERG, M. The persistence of vertical transmitted fungi in Grass metapopulation. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Edinburgh, v. 269, n. 1498, p. 1397-1403, 2002.
- SANTAMARÍA, J.; BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). **Microbial Ecology**, New York, v. 50, n. 1, p. 1-8, 2005.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophyte continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.
- SILVA, L. F.; LEITE, J. O. Caracterização preliminar dos agrossistemas das regiões cacaueiras da Bahia e Espírito Santo. **Boletim Técnico**, Ilhéus, v. 156, p. 15, 1988.
- SILVA NETO, P. J. **Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira**. Belém: CEPLAC, 2001. 125p.
- SOUNIGO, O.; LACHENAUD, P.; BASTIDE, P.; CILAS, C.; N'GORAN, J.; LANAUD, C. Assessment of the value of doubled haploids as progenitor in cocoa (*Theobroma cacao* L.) breeding. **Journal of Applied Genetics**, v. 44, n. 3, p. 339-353, 2003.
- STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, Montana, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.
- TEJESVI, M. V.; KINI, K. R.; PRAKASH, H. S.; SUBBIAH, V.; SHETTY, H. S. Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. **Fungal Diversity**, Thailand, v. 24, n. 3, p. 37-54, 2007.
- VERMA, V.C.; GOND, S.K.; KUMAR, A.; KHARWAR, R. N.; STROBEL, G. The endophytic mycoflora of bark, leaf, and stems tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Varanasi (Índia). **Microbial Ecology**, New York, v. 54, n. 1, p. 119-125, 2009.

WATANABE, T. **Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species**. 2 ed. Florida: CRC Press, 2002. 486p.

WHITTAKER, R. H. Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. **Ecological Society of America**, Tempe, v. 30, n. 3, p. 279-338, 1960.

WHITE, J. F.; MORROW, A. C.; MORGAN-JONES, G. Endophyte-Host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to pseudocercospora. **Mycologia**, New York, v. 82, n. 2, p. 218-226, 1990.

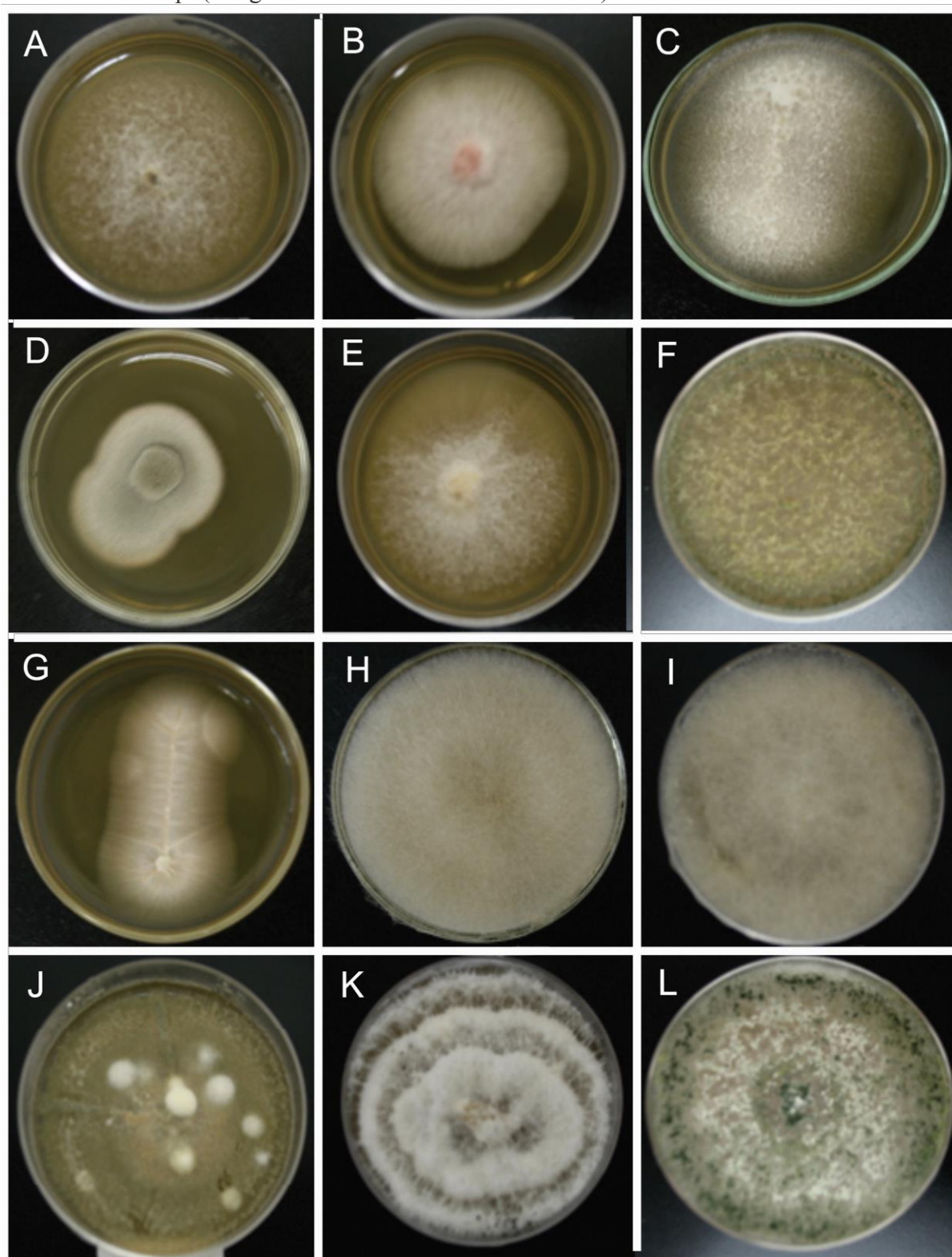
WHITE, T. J.; BURNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rRNA genes for phylogenetics**. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.) **PCR Protocols: a guide to method and applications** San Diego: Academic Press, p. 315-352, 1990.

WILSON, D. Endophyte- the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, Copenhagen, v. 73, n. 2, p. 274-276, 1995.

ZAK, J. C.; WILLIG, M. R.; MOORHEAD, C. L.; WILDMAN, H. G. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 26, n. 9, p. 1101-1108, 1994.

APÊNDICE

APÊNDICE A1 - Gêneros de fungos isolados das folhas de cacauero, A: *Acremonium* sp., B: *Albonectria* sp., C: *Bionectria* sp., D: *Cladosporium* sp., E: *Fusarium* sp., F: *Gliocadium* sp., G: *Hypocreales* sp., H: *Mucor* sp., I: *Rhizomucor* sp., J: *Penicillium* sp., K: *Pestalotiopsis* sp., L: *Trichoderma* sp. (Fungos cultivados em MA2% a 25 °C).



Apêndice A2 - Identificação polifásica dos fungos endofíticos e epifíticos associados as folhas de cacaueiro utilizando marcadores moleculares e morfológicos.

Código	Identificação final	Identificação morfológica	Identificação molecular - Região ITS					N. Isolados ⁴
			NCBI-GenBank ¹			CBS ¹		
			Espécie	# acesso ²	% ³	Espécie	% ³	
Zygomycota								
EX 31	Mucor	Mucor sp.	-	-	-	-	-	6
EX 11	Rhizomucor variabilis	Rhizomucor sp.	Rhizomucor variabilis CBS103.93	DQ119006	98	Rhizomucor variabilis CBS 103.93	98	1
Ascomycota								
END 37	Acremonium sp. 1	Acremonium sp.	-	-	-	-	-	4
EX 35	Acremonium sp. 2	Acremonium sp.	-	-	-	-	-	2
END 02	Albonectria rigidiuscula	Fusarium sp.	Albonectria rigidiuscula CBS 122570	HQ897815	98	Albonectria rigidiuscula CBS 113.57	99	3
END 05	Bionectria ochroleuca	FNE ⁵	Bionectria ochroleuca ATCC 48395	GU256754	99	Bionectria ochroleuca CBS 194.57	99	13
EX 18	Cladosporium sp. 1	FNI ⁶	Cladosporium cladosporioides ATCC 58227	AY361965	100	Cladosporium perangustum CBS 126365	100	2
END 58	Fusarium polyphialidicum	FNI	Fusarium polyphialidicum NRRL 13459	U34580	98	Fusarium polyphialidicum CBS 120989	97	11
END 71	Fusarium solani	FNI	Fusarium solani CBS 119223	JX435203	99	Fusarium solani NRRL 43690	98	3
END 77	Fusarium equiseti	Fusarium equiseti	-	-	-	-	-	1
END 28	Fusarium sp. 1	FNE	Fusarium sp. NRRL 38405	DQ459868	100	Fusarium graminearum CBS128539	100	1
END 65	Fusarium sp. 2	Fusarium sp.	-	-	-	-	-	10
EX 08	Gliocadium sp. 1	Gliocadium sp.	-	-	-	-	-	1
EX 53	Hypocreales sp.	FNI	Hypocreales sp.	HQ107990	100	Hypocreales sp.	100	1
EX 39	Penicilium sp. 1	Penicilium sp.	-	-	-	-	-	1
EX 28	Penicilium citrinum	Penicilium sp.	Penicilium citrinum NRRL 35224	EF634404	99	Penicilium citrinum CBS 232.38	99	1
EX 30	Penicilium rolfsii	Penicilium sp.	Penicilium rolfsii NRRL 1078	AF033439	100	Penicilium rolfsii CBS 368.48	100	1
EX 25	Penicilium rubrum	Acremonium sp.	Penicilium sp. CBS 263.93	JN89315	98	Penicilium rubrum CBS 379.97	98	1
EX 66	Pestalotiopsis microspora	Pestalotiopsis sp.	Pestalotiopsis microspora CBS 364.54	AF377292	100	Pestalotiopsis microspora CBS 364.54	100	1
EX 52	Pestalotiopsis sp. 1	Pestalotiopsis sp.	-	-	-	-	-	8
EX 36	Pestalotiopsis sp. 2	Pestalotiopsis sp.	-	-	-	-	-	1
EX 67	Trichoderma cf. strigosum	Trichoderma sp.	Trichoderma strigosum CBS 34893	NR_103571	99	Trichoderma strigosum CBS 348.93	99	2
EX 60	Trichoderma atroviride	Trichoderma sp.	Trichoderma atroviride ATCC 20476	JQ745258	100	Trichoderma atroviride CBS142.95	100	1
EX 46	Trichoderma harzianum	Trichoderma sp.	Hypocrea lixii NRRL 13019	AY625068	99	Trichoderma harzianum CBS389.36	99	2
EX 51	Trichoderma sp. 1	Trichoderma sp.	-	-	-	-	-	1
Total								79

¹ bancos de sequências de DNA, ² número de acesso das sequências nos bancos de dados, ³ porcentagem de similaridade das sequências comparadas com os bancos de dados, ⁴ número de isolados identificados em cada táxon, ⁵ fungos não esporulantes, ⁶ fungos não identificados.