



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA/FITOTECNIA

LÍVIA KARLA REMIGÍO MAIA

IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ASSOCIADOS A PLANTAS DE MANGUES NO
ESTADO DO CEARÁ

FORTALEZA

2019

LÍVIA KARLA REMÍGIO MAIA

IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ASSOCIADOS A PLANTAS DE MANGUES NO
ESTADO DO CEARÁ

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia

Orientador: Prof. PhD. José Emilson Cardoso

Coorientador: Dr. Francisco das Chagas Oliveira Freire

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M187i Maia, Lívia Karla Remígio.
Identificação de fungos associados a plantas de mangues no estado do Ceará / Lívia Karla Remígio Maia. – 2019.
100 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Fitotecnia), Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. José Emilson Cardoso.
Coorientação: Prof. Dr. Francisco das Chagas Oliveira Freire.
1. Filogenia. 2. Endofíticos. 3. Patogenicidade. 4. Sequenciamento. 5. Lasiodiplodia. I. Título.
- CDD
630
-

LÍVIA KARLA REMÍGIO MAIA

IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ASSOCIADOS A PLANTAS DE MANGUES NO
ESTADO DO CEARÁ

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Agronomia. Área de concentração: Fitotecnia

Aprovada em: 27 / 02 / 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Emilson Cardoso (Orientador)
EMBRAPA Agroindústria Tropical

Dr. Francisco das Chagas Oliveira Freire (Coorientador)
EMBRAPA Agroindústria Tropical

Prof. Dr. Renato Innecco
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Márcio Cleber de Medeiros Corrêa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Joilson Silva Lima
Instituto Federal do Ceará (IFCE/*Campus* SOBRAL)

A Deus.

Aos meus pais, irmãos e noivo, pela dedicação, confiança e por não medirem esforços para que esse sonho fosse realizado. Pelo amor incondicional e educação.

“Sede firme, forte e corajoso...”

Josué, capítulo 1, versículo 9

AGRADECIMENTO

A Deus, pelo amparo e pela força que me fez superar cada momento de dificuldade, por me guiar e iluminar meu caminho.

À Universidade Federal do Ceará, em especial ao Departamento de Fitotecnia pela oportunidade e apoio na realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida, através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará, onde foram realizados todos os experimentos deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Dr. José Emilson Cardoso, pelos ensinamentos que serviram tanto para a minha vida pessoal como para minha vida acadêmica, pela orientação, paciência e confiança.

Ao meu Co-orientador Dr. Francisco das Chagas Oliveira Freire, pelos ensinamentos, paciência e total dedicação. Agradeço demais por tudo que o senhor fez por mim.

Ao meu Pai, Júlio Mário Maia, pelos dias de trabalho que permitiram eu ter chegado até aqui, pelo amor e incentivo.

À minha mãe, Maria Ivaneide Remígio Silva, pela sua total doação para que tudo em minha vida desse certo. Pelo amor, ensinamentos e confiança.

À minha sobrinha e afilhada Júlia Moreira Maia, por me permitir sentir uns dos amores mais puros existentes e por fortificar os laços de união da minha família.

Aos meus irmãos, Júlio Mário Maia Júnior e Germano Silva Maia pelo amor, carinho, apoio financeiro e incentivo. E também as minhas cunhadas, Ana Paula Siebra e Thaís Abreu, pela amizade e por acreditarem em mim.

Ao meu companheiro de todas as noites acordadas, meu cachorrinho Lucky.

Aos meus avós maternos, Luiz Sabino *in memória* e Maria do Socorro, meus segundos pais, por todo amor e pelos exemplos de vida que contribuíram para a minha formação pessoal. A minha avó paterna Maria Ursulina *in memória*, por que sei que ela esteve comigo todo este tempo.

A todos os meus familiares, próximos ou distantes, que torceram para que eu conseguisse alcançar meus objetivos, principalmente ao meu padrinho Renato Remígio, Tia Bibia, Renan, Thayanne, Roger, Tio Ivanildo, Tia Francimédia e Aline.

Ao meu noivo, Thiago Bezerra Moreira, pela paciência, compreensão, dedicação, incentivo, confiança, carinho, amor e por ajudar a superar cada obstáculo que surgiu no decorrer dessa caminhada.

Aos membros da banca examinadora, pela atenção e contribuição para o enriquecimento deste trabalho científico.

Aos pesquisadores da Embrapa agroindústria Tropical, pelas ajudas, paciência e ensinamentos a mim oferecidos.

À Daniela Ribeiro, por ter sido uma verdadeira irmã, por estar comigo nos momentos mais difíceis, pela amizade, ajuda e disponibilidade e à Karine pela paciência e amizade.

A todos que compõem o grupo de trabalho do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa, em especial Samara, Seiti, Joilson, Daniela, Ítalo, Eduarda, Raul, Aldiel, Wéverson, Francisco, Glauber, Gustavo, Ingrid, Laís, Naide, Sergio, Suane, Thiago, Maria, Regimara e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará.

A todos os professores do Departamento de Fitotecnia da UFC pela experiência repassada e contribuição para minha formação acadêmica, em especial ao Renato Innecco e ao Wagner.

A todos os amigos da Pós-Graduação em Fitotecnia/UFC pela amizade e convivência harmoniosa.

A todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para tornar esse sonho realidade.

RESUMO

Os fungos endofíticos ocorrem em todas as espécies de plantas já estudadas, e são definidos como organismos que colonizam os tecidos vegetais, inter ou intracelular, sem causarem quaisquer sintomas externos aparentes. Ademais, eles conferem aos seus hospedeiros uma maior resistência a ataque de insetos, de herbívoros e a estresses abióticos e bióticos. Atualmente os fungos endofíticos são considerados uma excelente fonte de produção de compostos bioativos, com potencial utilização na agricultura, na medicina e na indústria de um modo geral. Manguezais são ecossistemas localizados na confluência de terra e mar, característicos de áreas tropicais e subtropicais, cobrindo cerca de 18,1 milhões de hectares do planeta. A grande biodiversidade encontrada nestes ambientes ressalta a importância da busca por conhecimentos a seu respeito, como o estudo sobre novos princípios ativos derivados de microrganismos endofíticos presentes nas plantas. Assim, o propósito do presente trabalho foi determinar a diversidade genética da comunidade de fungos endofíticos presentes em folhas, ramos e raízes das principais espécies arbóreas de manguezais do litoral do Ceará, Brasil. O segundo capítulo deste trabalho teve por objetivo a caracterização das espécies de *Lasiodiplodia* de maior fator de virulência atuando como patógenos em plantas dos mangues cearenses. Três espécies de *Lasiodiplodia* foram identificadas, sendo dois isolados patogênicos *L. parva* e *L. theobromae* e um endofítico *L. pseudotheobromae*. As espécies patogênicas identificadas foram capazes de causar lesões necróticas em diferentes níveis de severidade quando inoculadas em frutos de manga, goiaba e banana. O terceiro capítulo trata-se de uma nota de ocorrência com o primeiro relato de *Lasiodiplodia brasiliensis* endofítico de *Avicennia nitida* em mangue do Ceará. E no último capítulo foi realizada a caracterização molecular dos fungos endofíticos associados a plantas de mangues do litoral cearense.

Palavras-chave: Filogenia. Endofíticos. Patogenicidade. Sequenciamento. *Lasiodiplodia*

ABSTRACT

Endophytic fungi occur in all plant species already studied, and are defined as organisms that colonize plant tissues, inter or intracellular, without causing any apparent external symptoms. In addition, they confer to their hosts a greater resistance to attack by insects, herbivores and abiotic and biotic stresses. Nowadays endophytic fungi are considered an excellent source of bioactive compounds, with potential use in agriculture, medicine and industry in general. Mangroves are ecosystems located at the confluence of land and sea, characteristic of tropical and subtropical areas, covering about 18.1 million hectares of the planet. The great biodiversity found in these environments highlights the importance of searching for knowledge about it, such as the study of new active principles derived from endophytic microorganisms present in plants. Thus, the purpose of the present study was to determine the genetic diversity of the endophytic fungi community present in leaves, branches and roots of the main tree species of mangroves of Ceará, Brazil. The second chapter of this work had as objective the characterization of the species of *Lasiodiplodia* of greater factor of virulence acting as pathogens in plants of the mangroves of Ceará. Three species of *Lasiodiplodia* were identified, two pathogenic isolates *L. parva* and *L. theobromae* and one endophytic *L. pseudotheobromae*. The pathogenic species identified were able to cause necrotic lesions at different levels of severity when inoculated on mango, guava and banana fruits. The third chapter deals with an occurrence note with the first report of the endophytic *Lasiodiplodia brasiliensis* of *Avicennia nitida* in the mangrove of Ceará. And in the last chapter the molecular characterization of the endophytic fungi associated with mangrove plants from the coast of Ceará was carried out.

Keywords: Phylogeny. Endophytics. Pathogenicity. Sequencing. *Lasiodiplodia*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Estimativas de divergência evolutiva entre sequências. Mapa de calor gerado pelo programa Morpheus. Similaridade onde o máximo encontrado é simbolizado em vermelho e o mínimo em azul, gerando as árvores filogenéticas respectivas. Ao lado direito temos o cálculo de 'média da variável K' determinando a variação dentro das classes (Azul a branco) e também com gráfico em barras para melhor visualização..... 52
- Figura 2 - Árvore filogenética inferida a partir de análise bayesiana baseada nas seqüências combinadas das regiões gênicas ITS, TEF-1 α e β -tub. Probabilidades posteriores bayesianas são indicadas acima dos nós. As espécies neste estudo são destacadas com setas..... 54
- Figura 3 - Teste de patogenicidade em função do tempo em análise de regressão linear bivariada..... 55
- Figura 4 - Os gráficos correspondem a correlação e a variância expressas na Figura 3..... 56
- Figura 5 - Mapa de Superfície de Aproximação Total entres as espécies (a) LK01 e *Lasiodiplodia theobromae*; (b) LK02 e *Lasiodiplodia pseudotheobromae* e (c) LK03 e *Lasiodiplodia parva*. Em baixo menor aproximação (rosa) em cima maior aproximação (laranja)..... 57
- Figura 6 - Mapa de divisão das eco-regiões brasileiras. Sub-divisão baseada nas características climatológicas, geomorfológicas e geológicas (Baseado em Lacerda, 2005). Em destaque as áreas de manguezais (em verde) do litoral cearense..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Localização geográfica dos manguezais amostrados no estado do Ceará....	73
Tabela 2 - Fungos endofíticos encontrados no manguezal cearense.....	75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Histórico da taxonomia microbiana.....	17
2.2	Taxonomia de fungos.....	18
2.3	Manguezais e sua importância.....	21
2.4	Fungos presentes em manguezais e sua diversidade genética.....	23
2.5	Microrganismos endofíticos.....	24
2.6	Fungos endofíticos.....	25
2.7	Aspectos gerais da família Botryosphaeriaceae.....	28
3	CAPÍTULO I - IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>Lasiodiplodia</i> PATOGÊNICAS E ENDOFÍTICAS EM PLANTAS DE MANGUES DO CEARÁ.....	43
3.1	Introdução.....	46
3.2	Material e métodos.....	48
3.2.1	Amostragem e isolamento de fungos.....	48
3.2.2	Extração de DNA e amplificação de sequências.....	49
3.2.3	Análises filogenéticas.....	50
3.2.4	Caracterização patogênica.....	50
3.2.4.1	Patogenicidade em frutas.....	50
3.3	Resultados.....	51
3.3.1	Análises filogenéticas.....	51
3.3.2	Caracterização patogênica.....	55
3.3.2.1	Patogenicidade em frutas.....	55
3.4	Discussão.....	56
3.4.1	Análises filogenéticas.....	56
3.4.2	Caracterização patogênica.....	58
3.4.2.1	Patogenicidade em frutas.....	58
3.5	Conclusão.....	58
4	CAPÍTULO II - PRIMEIRO RELATO DE <i>Lasiodiplodia Brasiliensis</i> ENDOFÍTICA DE <i>Avicennia Nitida</i> EM MANGUES DO CEARÁ.....	64

5	CAPÍTULO III - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A PLANTAS DE MANGUES DO LITORAL CEARENSE.....	67
5.1	Introdução.....	70
5.2	Material e métodos.....	71
5.2.1	<i>Amostragem e isolamento de fungos.....</i>	73
5.2.2	<i>Extração de DNA e amplificação de sequências.....</i>	73
5.3	Resultados e discussão.....	74
5.4	Conclusão.....	82
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
	REFERÊNCIAS.....	88

1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 70% de nosso planeta é coberto por oceanos e estes em sua parte mais inferior são recobertos por sedimentos, desde cascalho a uma fina lama, caracterizando assim o maior habitat em toda a superfície de nosso planeta. Aproximadamente 83% deste habitat é mais profundo que 1000m. E assim a maioria dos micro-organismos marinhos sobrevivem em ambientes gelados, sem iluminação e com alta pressão, onde a comida escassa provém da distante superfície da água.

O termo manguezal é frequentemente utilizado para se referir às plantas e à sua comunidade associada. Essa última é composta por uma ampla gama de organismos pertencentes a diferentes grupos incluindo bactérias, fungos, microalgas, invertebrados, pássaros e mamíferos. Estima-se que a área global dos manguezais seja de 18,1 milhões de hectares, distribuídos em 112 países, sendo que o Brasil possui a segunda maior área de manguezais do mundo. Os manguezais ocupam uma fração significativa do litoral brasileiro, cerca de 92% da linha de costa (± 6.800 km), estendendo-se do extremo norte no Oiapoque, Estado do Amapá ($4^{\circ}30'N$), até seu limite sul na Praia do Sonho em Santa Catarina ($28^{\circ}53'S$). Este ecossistema desempenha papel fundamental na estabilidade da geomorfologia costeira, na conservação da biodiversidade e na manutenção de amplos recursos pesqueiros, geralmente utilizados pela população local. Particularmente ao longo do litoral Nordeste, devido ao clima semiárido, às condições oligotróficas das águas costeiras e à importância da pesca artesanal para a população litorânea, essas propriedades dos manguezais são ressaltadas, tornando-os ecossistemas de imenso valor ecológico e ambiental. Baseado nessas propriedades, a legislação brasileira considera as áreas de manguezal como áreas de preservação permanente. Entretanto, apesar dos esforços para sua conservação, os manguezais encontram-se permanentemente ameaçados por diversas atividades humanas desenvolvidas tanto no litoral, quanto no interior.

Mesmo com a crescente ameaça sobre as áreas de manguezais do estado do Ceará, grande parte do seu território ainda preserva a cobertura vegetal original, via de regra em áreas de difícil acesso. Sendo assim, torna-se fundamental para a caracterização dos efeitos do desmatamento sobre a biota local, possibilitando a criação de medidas mitigadoras a essa problemática, sendo um importante instrumento para a ampliação do conhecimento sobre aquela biodiversidade a utilização de uma coleção científica. Essas coleções científicas podem ser utilizadas como fonte de benefícios para toda a sociedade,

subsidiando políticas públicas, fomentando a mitigação de impactos ambientais, orientando estratégias de manejo e conservação, e promovendo a identificação de organismos potencialmente úteis. O conhecimento sobre a biodiversidade representa atualmente um importante recurso produtivo e as coleções são essenciais neste contexto.

Dentro da biodiversidade mundial, os fungos representam o segundo maior grupo de organismos no nosso planeta, atrás apenas, dos insetos. Eles são elementos chave nos ecossistemas tropicais, sendo cosmopolitas e ocorrendo nos mais diversos habitats (psicrófilos a termófilos). Os fungos são organismos heterotróficos, podendo se comportar como saprófitas e/ou parasitas. Durante a evolução, quando as plantas colonizaram a terra, os fungos desenvolveram diferentes tipos de relações com elas. Um grupo, denominado de “endofíticos”, formou um tipo de associação o qual tem sido confirmado através registros fósseis, sugerindo que a associação endofítico-planta evoluiu desde o estabelecimento das primeiras plantas sobre a terra.

O termo endofítico foi criado com o intuito de diferenciá-los dos fungos epifíticos, que ocorrem apenas na superfície das plantas. Vários outros autores têm sugerido definições. Entretanto, a mais aceita é a definição o qual os fungos endofíticos como “organismos que durante algum estágio de seu desenvolvimento sobrevivem no interior dos tecidos vegetais, sem causar qualquer dano aparente ou sintoma de doença no hospedeiro”. Recentemente, os fungos endofíticos foram divididos em quatro classes com base na gama de hospedeiros, no modo de colonização, no tipo de transmissão e em virtude de sua função ecológica.

Apesar da importância dos microrganismos, muito pouco da diversidade existente é conhecida, tornando imperativa a exploração de microrganismos de ecossistemas como os manguezais brasileiros. A versatilidade bioquímica e diversidade biológica de fungos endofíticos representam uma enorme variedade de genes que ainda são desconhecidos, os quais podem apresentar importantes aplicações biotecnológicas e agrícolas. Por essa razão, o presente trabalho avaliou a comunidade fúngica presente nos manguezais do litoral cearense através do estudo da diversidade de fungos endofíticos associados aos ramos, raízes e às folhas de três espécies arbóreas de manguezais (*Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* e *Avicennia nitida*).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico da taxonomia microbiana

A classificação de organismos vivos foi um tema de grande interesse para os cientistas que pesquisavam a História Natural na Europa a partir do século XVI. Lineu propôs um sistema binomial de classificação que é uma das bases da classificação atual dos organismos. Em 1758, a décima edição do *Systema Naturae* de Lineu incluía 5.897 espécies de plantas e animais, os dois reinos nos quais ele dividia os organismos vivos. A Taxonomia se tornou uma profissão durante o século XIX, resultando em um rápido aumento no número de animais e plantas terrestres conhecidos.

O propósito primário de um sistema taxonômico utilitário é fornecer classificações que sejam úteis para finalidades científicas ou práticas diversas, especialmente a identificação, e também gerar bases de dados contendo informação relevante sobre organismos. Estas classificações devem ser estáveis, objetivas e preditivas.

Dentro dessas classificações microbianas, a identificação clássica de fungos filamentosos leva em consideração, principalmente, as características morfológicas das estruturas reprodutivas (sexual e assexual). Dessa forma, para se identificar estas estruturas, os isolados devem ser cultivados a partir de colônias puras em meios de cultura apropriados e corada com técnicas apropriadas para manutenção das estruturas. Em muitos casos, pode não ocorrer a produção de estruturas reprodutivas, sendo necessário assim alterar as condições de cultivo. Para induzir a esporulação pode ser utilizado meio de cultura pobre (ágar-água), aumento da iluminação da cultura, irradiação com doses reduzidas de luz ultravioleta. Fatos estes possíveis somente para espécies/isolados cultiváveis. Em todos os casos deve se realizar uma preparação para observação microscópica das estruturas. As estruturas observadas devem ser comparadas com aquelas da literatura padrão, por meio de chaves de identificação (ARX, 1974; BARNETT; HUNTER, 1972).

Análises bioquímicas também podem ser utilizadas. Para fungos que não esporulam em meio sintético, técnicas de biologia molecular devem ser utilizadas. Estas técnicas se baseiam principalmente no sequenciamento das regiões espaçadoras (ITS) do DNA ribossomal (rDNA) e comparação com uma base de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Tudo isso torna o desenvolvimento de uma base de dados para sequências de DNA importante para a classificação de espécies fúngicas

especialmente para o Brasil, país detentor de uma biodiversidade substancial, a qual poderia gerar uma quantidade muito grande de dados para a identificação de fungos.

2.2 Taxonomia de fungos

Os estudos taxonômicos de fungos no Brasil começaram ainda no século XIX, quando viajantes coletores de fungos, na maioria estrangeiros, realizaram coletas em vários pontos do País, inclusive na Amazônia. Esses espécimes foram enviados a outros países para classificação. Como descrevem Fidalgo e Fidalgo (1957), ainda no século XIX e início do século XX destacam-se coletas, classificações preliminares e pequenas coleções de fungos realizadas por Juan Ignacio Puigarin em 1877, Heinrich Rehm de 1889 a 1912, Arsène Puttemans em Piracicaba na ESALQ, Fritz Noak no Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), Avena Saccá na ESALQ e um pouco mais tarde, em 1925, W.A. Mirril, cujos fungos coletados estão na coleção do New York Botanical Garden.

Além dos trabalhos pioneiros realizados com fungos de importância para a saúde, os quais não serão mencionados no presente trabalho, fungos causadores de doenças de plantas foram estudados no IAC por Ahmés Pinto Viegas e também no Instituto Biológico de São Paulo. O Instituto de Botânica de São Paulo teve destaque na taxonomia de fungos, especialmente basidiomicetos. De grande realce foi o trabalho iniciado por Augusto Chaves Batista em 1954 no Recife, Pernambuco, que no Instituto de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco por ele criado, conduziu importantes trabalhos sobre taxonomia de fungos organizando a coleção que até hoje é mantida no Departamento de Micologia da UFPE. Também coleções de fungos, especialmente leveduras de interesse industrial, foram organizadas no antigo Instituto Zimotécnico da ESALQ/USP por Jaime Rocha de Almeida.

Atualmente coleções e herbários de fungos existem no Brasil, destacando-se, entre outras as da Universidade de Brasília, relacionada a fungos isolados de plantas do cerrado, da Universidade Federal de Pernambuco (talvez a mais completa no Brasil), do IAC (fitopatógenos), do Instituto de Botânica (Basidiomicetos), do CENARGEN, EMBRAPA em Brasília (fungos usados no controle biológico de insetos), da ESALQ no Departamento de Tecnologia Agroindustrial (principalmente leveduras) e Genética (especialmente fungos de interesse genético e fungos endofíticos), do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (fungos de interesse industrial).

A maioria delas, entretanto, constituem coleções de pesquisa que são referências no assunto, mas existem diversos outros pequenos grupos de estudos que constituem suas próprias micotecas de estudos, como os centros de fitossanidades distribuídos nas universidades e centros de pesquisas.

Um esforço para reunir todos esses dados foi realizado nos anos 80, por Wanderley Perez Canhos e seu grupo, organizando catálogos que reuniam todos os dados sobre coleções de culturas de microrganismos no Brasil, incluindo os fungos (CANHOS et al, 1989). Os trabalhos de classificação continuam a ser realizados com base nos aspectos morfológicos, especialmente na UFPE. Mais recentemente, especialmente após programas financiados, primeiro pela FAPESP e depois por órgãos do Governo Federal, visando estabelecimento de técnicas de sequenciamento genômico de diferentes espécies microbianas, diversos laboratórios estão empregando técnicas moleculares na taxonomia de fungos, como foi o Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical, que em uma parceria com a UFPE, realizou um estudo taxonômico de fungos endofíticos oriundo da Caatinga cearense (GONÇALVES, 2014).

O Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical realiza diversas atividades na área de doenças tropicais, incluindo na taxonomia da microbiota regional e, com as diversas parcerias criadas foram-se desenvolvendo diversos trabalhos, principalmente teses de doutorado, com a identificação de novas espécies de fungos (BRAUN; FREIRE; URTIAGA, 2010; COUTINHO et al, 2016) e caracterização de espécies regionais (FREIRE; GONÇALVES, 2012; FREIRE; BERNDT, 2013; COUTINHO et al, 2016), descobertas de fungos produtores de metabólitos potencialmente utilizados pela indústria farmacológica (VASCONCELOS, 2015), identificação de compostos nocivos a saúde (ROCHA et al., 2013, VIEIRA et al., 2007; ROCHA et al., 2014), identificação de patógenos em cultivares regionais (MARTINS et al., 2014; FREIRE; MARTINS, 2010; FREIRE, 2012, 2014; FREIRE; MOSCA, 2009; FREIRE; CARDOSO, 1997; FREIRE; CAVALCANTE; BEZERRA, 1996), diferenciação entre espécies através de quimiotaxonomia, dentre outros (MUNIZ et al., 2013; SANTOS; FREIRE; CARDOSO, 2001; MIDORIKAWA et al., 2008; CARDOSO et al., 2006; FREIRE et al., 2002; BERNDT et al., 2007; BRAUN; DAVID; FREIRE, 1999; BRAUN; FREIRE, 2002, 2007)

Em um dos trabalhos de Freire e Gonçalves (2012) observou-se a diversidade fúngica, bem como espécies da classe Oomicota associada a plantas da caatinga cearense, onde foram identificado 332 espécimes (320 fungos e 12 Oomicetos), com o aparecimento de

6 novas espécies de fungos causadores de ferrugem em plantas, 1 espécie de celomiceto e 49 espécies de hifomicetos.

O conhecimento dessa diversidade é importante não somente para o conhecimento e preservação do ambiente, mas também como fontes promissoras de produtos biotecnológicos, como foi citado por Freire, Vasconcelos e Coutinho (2014), ao relatar as possibilidades de utilização de metabólitos oriundos de fungos endofíticos, principalmente como poderosas drogas contra patógenos humanos e de plantas. Os autores relatam que até o momento, um número elevado de compostos com propriedades antimicrobianas foram isolados de fungos endofíticos de plantas de terra firme, de manguezais e também de fungos provenientes de animais e plantas marinhas.

Esses trabalhos demonstram a importância de estudos de diversidade microbiológica em biomas pouco explorados, confirmando a necessidade de medidas que reduzam rapidamente a degradação desses biomas, como a caatinga que é um bioma genuinamente brasileiro e os manguezais, tão explorados pela especulação imobiliária e industrial. Ademais, a presença de uma população fúngica endofítica totalmente inexplorada, com potencial para a obtenção de metabólitos para aplicação na agricultura e na indústria farmacêutica, agrega assim valor econômico a esse enorme patrimônio genético.

A análise do conjunto de genes 18S, 5,8S e 25-28S do rDNA é muito utilizada para avaliar as relações filogenéticas entre os fungos. As regiões variáveis ITS1 e ITS2 são encontradas entre estes genes e são transcritas e processadas dando origem ao RNA ribossômico. (GUARRO; GENE; STCHIGEL, 1999; LARENA et al., 1999). Essas regiões ITS evoluem de modo rápido, sendo utilizadas para discriminar espécies relacionadas e variedades de uma mesma espécie.

As regiões ITS são utilizadas na identificação molecular de fungos por 3 principais motivos: o agrupamento gênico que codifica o rDNA está repetido centenas de vezes facilitando a amplificação; os fragmentos de ITS são curtos (600 a 800pb); essas regiões ITS apresentam alta variabilidade discriminando espécies fúngicas, e até mesmo, isolados de algumas espécies. Análises da sequência de rDNA 18S também são utilizadas em estudos taxonômicos de fungos (KUNINAGA et al., 1997; LEE; TAYLOR, 1992; WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990).

Várias técnicas moleculares podem ser empregadas para avaliar a diversidade de fungos, como ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), DGGE/TGGE (Denaturing/Temperature

Gradient Gel Electrophoresis), clonagem de genes, SSCP (Single-Strand-Conformation Polymorphism), T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; ANDERSON; CAIRNEY, 2004; PANG; MITCHELL, 2005; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003).

2.3 Manguezais e sua importância

As plantas dos manguezais estão entre as mais produtivas do oceano. A principal representante nas regiões tropicais do continente americano é o mangue vermelho (*Rhizophora mangle*), enquanto que o mangue preto (*Avicennia germinans*) e o mangue branco (*Laguncularia racemosa*) são as mais abundantes nos estuários do México, oeste da Índia, Barramas e Flórida (MILES et al., 1999). Estas plantas sintetizam compostos bioativos utilizados na área médica, agrônômica e cosmética como sais, ácidos orgânicos, carboidratos, hidrocarbonetos, benzoquinonas, nfitofuranos, sesquiterpenos, triterpenos, alcalóides, flavonóides, polímeros, derivados sulfurosos e taninos (LI et al., 2009; MILES et al., 1999; SHARAF et al., 2000; WU et al., 2008).

Estudos recentes indicam que a produção fotossintética das plantas dos manguezais é maior que a das microalgas, algas de recifes de corais e fitoplâncton (ALONGI, 2002). O carbono produzido nos manguezais é superior em cerca de 40% ao que o ecossistema requer. O mesmo é consumido por herbívoros, exportado para costas adjacentes, estocado em sedimentos, decomposto e reciclado dentro do sistema. A diminuição dos manguezais pode desencadear um impacto significativo no estoque de carbono global, devido à grande quantidade de carbono fixado e estocado neste ecossistema. Análises do carbono fixado em ecossistemas marinhos estimaram que a perda de aproximadamente 35% dos manguezais de todo o mundo tem resultado na perda de $3,8 \times 10^{14}$ g de carbono estocado como biomassa em manguezais (ALONGI, 2002).

Situados na interface entre terra e mar, os manguezais são ambientes bem adaptados às condições de estresses naturais como temperatura, salinidade, anóxia e radiação ultravioleta. Entretanto, esse ecossistema tem determinados limites de tolerância, sendo sensível às alterações criadas pelas atividades humanas (BADOLA, et al., 2008). A proximidade do mesmo com os centros urbanos favorece a sua exploração. Além disso, efluentes industriais têm contribuído para a contaminação de sedimentos com metais pesados.

Muitos manguezais também têm sido contaminados com óleos, como resultado de derramamentos de petróleo. Esses eventos têm gerado efeitos negativos nos mesmos (BADOLA, et al., 2008; KATHIRESAN; BINGHAM, 2001).

A manutenção dos manguezais é um desafio de importância econômica para a maioria dos países tropicais. Nos últimos 50 anos, aproximadamente um terço das florestas de mangue foi perdido (ALONGI, 2002). Os manguezais de todo o mundo têm sido destruídos principalmente devido à aquicultura, à produção de madeira e ao desenvolvimento urbano. Isso gera significantes perdas de peixes, pássaros, plantas e microrganismos, pois os manguezais estão entre os três ambientes mais produtivos do ecossistema global, ao lado dos recifes de corais e das florestas tropicais (AL-SAYED et al., 2005). Os manguezais servem como refúgio e abrigo, favorecendo a criação e alimentação de numerosas espécies marinhas importantes para a economia e ecologia. Também são o habitat do principal santuário de pássaros e de um grande número de insetos, alguns répteis, poucos mamíferos e muitos invertebrados (AL-SAYED et al., 2005; HOLGUIN; GONZALEZ- ZAMORANO; DE-BASHAN, 2006; NAGELKERKEN et al., 2008).

O habitat marinho é o maior dentre os habitats da biosfera, cobrindo 70% da superfície da Terra e apresentando o maior espaço para os microrganismos viverem. Os microrganismos marinhos apresentam um alto potencial biotecnológico, representando uma fonte de compostos bioativos de importância comercial e tendo uma extraordinária capacidade de biorremediação. Eles participam na decomposição de matéria orgânica, reciclando e conservando nutrientes neste ecossistema (DAS et al., 2006; KRISTENSEN et al., 2008). No ambiente dos manguezais, há evidências que propõem a íntima relação entre microrganismos – nutriente – planta, funcionando como um mecanismo para reciclar e conservar nutrientes.

A comunidade microbiana diversa e produtiva de manguezais tropicais transforma continuamente a vegetação morta em fontes de nitrogênio, fósforo e outros nutrientes diversos, que podem ser consumidos pelas plantas. Em troca, exsudados de raízes servem como fonte de alimentação para os microrganismos (DHAM, 2002; KRISTENSEN et al., 2008; SOUSA et al., 2006). Entretanto, o conhecimento da diversidade microbiana de manguezais ainda é muito limitado.

Durante as últimas três décadas, os manguezais têm recebido enorme atenção, refletindo em um aumento exponencial do número de publicações (GOPAL; CHAUHAN, 2006), contudo, os conhecimentos sobre este ecossistema ainda são incipientes. Com a contínua degradação deste ambiente, é de extrema importância a avaliação da diversidade e

do potencial biotecnológico dos microrganismos que lá habitam, uma vez que estas espécies podem ser extintas.

Dentre os ecossistemas marinhos, os manguezais constituem o segundo ecossistema mais produtivo e rico, sendo superados apenas pelos recifes de corais (SRIDHAR, 2004). As plantas de manguezais são morfológicamente e fisiologicamente adaptadas a esse ambiente com alta salinidade, inundações (marés), ventos fortes, alta temperatura e solo anaeróbico. Os manguezais apresentam matéria orgânica, proveniente das plantas, a qual forma a base da cadeia alimentar nos estuários tropicais (SARMA; HYDE; VITTAL, 2001).

2.4 Fungos presentes em manguezais e sua diversidade genética

Os estudos sobre fungos marinhos de plantas e solos foram iniciados há 60 anos atrás, na Austrália (CRIBB; CRIBB, 1955). Estudos ecológicos e taxonômicos têm sido conduzidos desde 1980, nos oceanos Pacífico e Índico. Esses trabalhos têm contribuído para a identificação de espécies de fungos de manguezais (ABDEL-WAHAB, 2005; PARRENT et al., 2004). Vários artigos foram publicados nas duas últimas décadas sobre os fungos marinhos de manguezais tropicais (CAVALCANTE et al., 2009; GILBERT; GOROSPE; RYVARDEN, 2008; HARVEY; GOFF, 2010; KUMARESAN; TRICHUR; SURYANARAYANAN, 2001; TREMBLAY, 2007), entretanto, esses aspectos têm sido pouco explorados nos manguezais brasileiros.

Os fungos marinhos desempenham importante papel no ciclo de regeneração de nutrientes para decompor a matéria orgânica morta. O estudo da diversidade da comunidade fúngica marinha, abrangendo a diversidade genética e riqueza de espécies, é o primeiro passo para o modelamento dinâmico da comunidade fúngica em termos de abundância e distribuição espacial e temporal de espécies e na ciclagem de nutrientes. Tais modelos são essenciais para o manejo e conservação eficientes de ambientes marinhos, florestais e agrários, os quais são importantes economicamente (PANG; MITCHELL, 2005).

O ambiente marinho é alvo do desenvolvimento urbano como descarga de efluentes industriais, derramamento de petróleo e contaminação por pesticidas. Os manguezais são ecossistemas muito expostos a esses fatores estressantes. A contaminação por petróleo é uma das maiores ameaças a todos os organismos marinhos. A presença de hidrocarbonetos no mar pode reduzir a diversidade de fungos marinhos, pois a presença desse

composto na superfície de um substrato reduz a aeração diminuindo a atividade dos fungos (HYDE et al., 1998).

O número de microrganismos descritos na literatura representa apenas uma pequena fração da diversidade microbiana existente (AZEVEDO, 1998; PACE, 1996). Estudos comparativos indicam que apenas uma pequena fração dos microrganismos presentes na natureza, representando entre 0,1% a 1%, dependendo do habitat, é cultivada por meio do emprego de técnicas microbiológicas convencionais (AMANN et al., 1995). Muitos fatores podem ser apontados para a dificuldade no cultivo de microrganismos em condições laboratoriais, incluindo o pouco conhecimento sobre seus requisitos nutricionais e a natureza fastidiosa de muitas espécies presentes em diferentes amostras ambientais. Portanto, a análise de genes do DNA ribossomal proveniente de DNA de amostras ambientais tem expandido o conhecimento da diversidade genética de fungos (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; PACE, 1996).

A utilização dessas técnicas permite a avaliação do conteúdo de DNA dos organismos, não dependendo do estado fisiológico dos mesmos, permitindo o estudo de microrganismos não cultiváveis.

Dentre os 900 fungos marinhos já identificados, 358 pertencem a ecossistemas de manguezais (MARIA; SHIDHAR, 2002). Estes fungos realizam processos importantes como a transformação de compostos poliméricos em matéria orgânica dissolvida, utilizada por outros consumidores da cadeia alimentar (HYDE et al., 1998).

Diante de poucos estudos sobre fungos endofíticos de manguezais brasileiros, ressalta-se a importância da avaliação da diversidade em manguezais do estado de Ceará, em busca da determinação da estrutura genética e identificação das espécies presentes.

2.5 Microrganismos endofíticos

Os microrganismos endofíticos são bactérias ou fungos que colonizam o interior dos tecidos de plantas, sem apresentar efeito patogênico no hospedeiro (OWEN; HUNDLEY, 2004; TAN; ZOU, 2001). Dessa maneira, ocorre uma associação simbiótica entre a planta hospedeira, que o protege e alimenta, e o microrganismo endofítico, produtor de metabólitos bioativos que auxiliam o crescimento e a proteção da planta contra o ataque de fitopatógenos (OWEN; HUNDLEY, 2004; TAN; ZOU, 2001; ZHANG; SONG; TAN, 2006). Entretanto, desde a descoberta dos microrganismos endofíticos em Darnel (Alemanha) em 1904, muitos

pesquisadores têm definido diferentemente o termo endófito (HALLMANN et al., 1997; PETRINI, 1991; TAN; ZOU, 2001). Uma definição proposta por Azevedo e Araújo (2007) considera endófito como todo aquele que pode ou não crescer em meios de cultura, ou seja, cultiváveis ou não, e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais. Porém, essa definição exclui rizóbios e micorrizas. Dessa forma, Mendes e Azevedo (2007) propuseram a redefinição desse termo, considerando a definição anterior proposta por Azevedo e Araújo (2007), adicionando a divisão dos microrganismos endofíticos em dois tipos: Tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e Tipo II, os que produzem estruturas externas à planta.

Cada uma das 300.000 espécies de plantas existentes é hospedeira de um ou mais microrganismos endofíticos, mas poucas delas têm sido completamente estudadas com relação à sua biologia endofítica. A facilidade de isolamento desses microrganismos em meio de cultura torna esse grupo uma fonte promissora de produtos biotecnológicos. Conseqüentemente, torna-se grande a oportunidade de descobrir novos e interessantes microrganismos endofíticos de plantas hospedeiras de diferentes ecossistemas (STROBEL et al., 2004).

Dentre todos os produtores de compostos bioativos naturais, os microrganismos representam uma fonte rica de metabólitos biologicamente ativos que apresentam ampla aplicação como antibióticos, antiparasitários, antifúngicos, antitumorais, entre muitos outros compostos. Estima-se que somente 1% das espécies de bactérias e menos de 7% das espécies de fungos sejam conhecidas (HAWKSWORTH, 2004; GUNATILAKA, 2006), sugerindo que milhões de espécies microbianas poderão fornecer importantes biomoléculas. Historicamente, de todos os microrganismos estudados, os actinomicetos e os fungos têm sido os maiores produtores de metabólitos secundários. Sugere-se ainda que os fungos são fundamentais para a saúde e prosperidade de muitos ecossistemas terrestres, sendo essenciais para a sustentabilidade e biodiversidade dos mesmos (GUNATILAKA, 2006; OWEN; HUNDLEY, 2004; SRIDHAR, 2004).

2.6 Fungos endofíticos

Os estudos sobre a proporção do número de espécies de fungos para cada espécie vegetal indicam que o número estimado de espécies fúngicas é de 1,5 milhões, entretanto o

número de espécies descritas até hoje é de aproximadamente 100 mil (HAWKSWORTH, 1991, 2004). Postulados sobre o número de espécies fúngicas existentes chegam até mesmo a estimar 8,25 milhões de espécies fúngicas, considerando que a diversidade é maior em regiões tropicais (ARNOLD et al., 2000; FRÖHLICH; HYDE, 1999). Acredita-se que todas as espécies de plantas são potenciais hospedeiros para diversos fungos (AGRIOS, 1997; RODRIGUEZ et al., 2009). Esses dados revelam o grande potencial de exploração da diversidade genética, materiais biotecnológicos fúngicos, além biodiversidade e potenciais fitopatógenos no ambiente agrícola.

Os fungos normalmente exercem uma associação mutualística, antagônica ou neutra com uma infinidade de organismos heterotróficos e autotróficos. Essas relações apresentam diversos graus de associação e interdependência nutricional. Fungos que vivem no exterior de seus hospedeiros são chamados de epifíticos, enquanto aqueles que vivem completamente no interior são chamados de endofíticos. Os endofíticos em contraste com os epifíticos vivem completamente dentro da planta hospedeira e podem ter uma associação parasítica ou simbiótica com o hospedeiro (SINCLAIR; CERKAUSKAS, 1996).

Na definição mais simples endofítico refere-se ao local do organismo em relação à planta, onde “endo” (dentro) e “phyte” (planta), descreve todos os organismos que vivem dentro de plantas. No entanto, o termo tem evoluído não apenas para indicar o local do organismo em relação à planta, mas também para descrever o tipo de associação de fungo ou bactéria com seus hospedeiros.

A natureza da interação descrita pelo termo endofítico mostra que os organismos se encontram dentro da planta, mas não causam sintomas de doenças, ou seja, a infecção é assintomática (WILSON, 1995). Foi proposto a existência de uma mudança evolucionária entre parasitas, mutualista e/ou saprófitas e, que esta mudança evolucionária é multidirecional, ou seja, o fungo pode evoluir de mutualista à saprófita e à patógeno, ou de patógeno à mutualista e à saprófita (CARROLL, 1988; RODRIGUES; REDMAN, 1997). A proposição é que a mudança de mutualismo a parasitismo pode ser devido a algum antagonismo balanceado ou equilíbrio na interação hospedeiro-endofítico. Se este balanço é alterado ocorre o desenvolvimento da doença (KOGEL; FRANKEN; RÜCKELHOVEN, 2006).

O potencial biotecnológico dos fungos endofíticos tem sido muito estudado por vários autores (DAVIS et al., 2005; KUMAR et al., 2004; SESSITSCH et al., 2004; SURYANARAYANAN et al., 2009; THINES; ANKE; WEBER, 2004). Com o número

crescente de trabalhos sobre a interação entre planta e endófitos (ARAÚJO et al., 2001; BRUNDRETT, 2006; RODRIGUEZ; REDMAN, 2008), juntamente com os resultados promissores observados, têm sido importantes os estudos de fungos endofíticos como agentes de controle biológico de inúmeros patógenos (AZEVEDO et al., 2000; LIU et al., 2001; SIEGEL et al., 1990), promotores de crescimento vegetal (MARKS; CLAY, 1990; VARMA et al., 1999), produtores de enzimas (STROBEL; DAISY, 2003) e ainda o uso de fungos endofíticos em plantas como fitoremediadores de áreas poluídas (DERAM et al., 2008; XIAO et al., 2010).

É importante ressaltar que produtos de valor biotecnológico, como antibióticos e outros princípios ativos, com inúmeras propriedades farmacológicas, têm sido sintetizados por fungos endofíticos, tornando esses um importante alvo em estudos aplicados na área médica e agrônômica. O taxol, um potente agente antitumoral, sintetizado pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* da planta hospedeira *Taxus brevifolia*, vem sendo estudado para a sua produção em escala industrial (YUAN et al., 2006). Os fungos têm sido uma fonte de antibióticos muito utilizados na prática clínica como a penicilina produzida pelo fungo *Penicillium notatum*, e a cefalexina sintetizada pelo fungo *Cephalosporium acremonium* (OWEN; HUNDLEY, 2004).

Os fungos endofíticos podem contribuir para crescimento da planta hospedeira de modo direto ou indireto. O modo direto de promoção de crescimento vegetal está relacionado com a produção de compostos ativos pelos endófitos, facilitando a absorção de nutrientes e água pela planta hospedeira (ZHANG; SONG; TAN, 2006). Trabalhos têm sugerido que os endófitos alteram o fluxo de água em plantas por meio da produção de compostos químicos solúveis em água como os alcalóides, os quais aumentam o fluxo osmótico nas raízes da planta hospedeira (BACON, 1993; OWEN; HUNDLEY, 2004; TAN; ZOU, 2001).

A forma indireta do endófito proporcionar a melhoria no crescimento e desenvolvimento vegetal é feita por meio da proteção ao ataque de pragas e patógenos (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Os endófitos podem proteger as plantas produzindo compostos como alcalóides e terpenos, os quais apresentam efeito inseticida repelindo insetos e tornando a planta menos susceptível ao ataque de insetos. Outro mecanismo encontrado na literatura é o controle natural de insetos por meio da produção de metabólitos citotóxicos pelos fungos entomopatogênicos (REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001; SCHULZ; BOYLE, 2005; STONE; POLISHOOK; WHITE, 2004).

Várias classes de metabólitos secundários como alcalóides, pirolizidinas, esteróides, terpenóides, sesquiterpenos, isocumarínicos, quinonas, flavonóides, fenilpropanóides, policetídeos, lactonas, dentre outros, são produzidos por fungos endofíticos, o que faz com que eles sejam uma fonte promissora para estudos de exploração do potencial biotecnológico de produtos aplicados na prática clínica (ZHANG; SONG; TAN, 2006).

2.7 Aspectos gerais da família Botryosphaeriaceae

Taxonomicamente, a família Botryosphaeriaceae pertence ao: Domínio Eukaryota; Reino Fungi; Filo Ascomycota; Classe Dothideomycetes e Ordem Botryosphaeriales (SCHOCH et al., 2006). É composta por vários complexos de espécies crípticas, estando inseridos 17 gêneros e cerca de 110 espécies devidamente caracterizadas, tanto morfológicamente quanto molecularmente, por meio do sequenciamento gênico multilocus de DNA (PHILLIPS et al., 2013).

Os gêneros que a compõe, são: *Lasiodipodia* spp., *Barriopsis* spp., *Botryosphaeria* spp., *Botryobambusa* spp., *Cophinforma* spp., *Diplodia* spp., *Dothiorella* spp., *Neodeightonia* spp., *Macrophomina* spp., *Phaeobotryon* spp., *Sphaeropsis* spp., *Tiarosporella* spp., *Neoscytalidium* spp., *Neofusicoccum* spp., *Spencermartinsia* spp., *Endomelanconiopsis* spp., *Pseudofusicoccum* spp. (PHILLIPS et al., 2013).

Tradicionalmente, membros das Botryosphaeriaceae foram identificados com base em características morfológicas de seus estágios assexuais e, ou, sexuais quando presente. Por ser o estágio sexual raramente encontrado na natureza, e seu estágio assexual altamente variável quando cultivado em diferentes meios de cultura artificiais, condições de cultivo e durante os estágios da vida desses fungos, tal caracterização foi o principal motivo para as grandes confusões e modificações ao longo da sua história taxonômica dos fungos desta família (CROUS et al., 2006; SCHOCH et al., 2006; PHILLIPS et al., 2013).

Diante da plasticidade fenotípica que os membros da Botryosphaeriaceae possuem, estudiosos afirmam, que dados morfológicos sozinhos são insuficientes para uma classificação em nível de espécie, sugerindo sempre a presença de caracterização a nível molecular, combinada a dados morfofisiológicos e patogênicos para sustentação desses dados, marcando o início de uma nova na classificação das Botryosphaeriaceae (DEANM et al., 2000).

Com o advento de ferramentas de sequenciamento do DNA, foram fornecidos aos taxonomistas suporte para o verdadeiro reconhecimento dos membros dessa família, que os possibilitou o realocamento de gêneros e espécies filogeneticamente relacionados. Desde então novas espécies e gêneros foram identificados em associação com os mais diferentes hospedeiros, localizações geográficas e condições ambientais (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007; SAKALIDIS et al., 2013; PHILLIPS et al. 2013).

Os fungos pertencentes a essa família já foram detectados em todas as áreas geográficas e climáticas do mundo, com exceção as regiões polares, possuindo a capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros e conviver com os mesmos de forma endofítica, se tornando patogênico ou não, com hábitos saprofíticos ou necrotróficos, associados, sobretudo as espécies vegetais lenhosas, como também em plantas herbáceas (PHILLIPS et al., 2013). Variações quanto à virulência e especificidade desses fungos, quanto ao hospedeiro e ao ambiente, ainda são uma incógnita que envolve a magnitude da expressão e incidência desses fungos na natureza (SAKALIDIS et al., 2013).

Quanto à infecção e colonização por Botryosphaeriaceae em seus hospedeiros, na maioria dos casos, ocorrem por meio de ferimentos em folhas, caules ou ramos, mas também por aberturas naturais como lenticelas, estômatos e hidatódios de plantas saudáveis (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

Na sua forma endofítica, enquanto latentes em plantas assintomáticas, esses fungos são uma ameaça significativa à agricultura e a ecossistemas florestais por serem capazes de conviver harmoniosamente com seus hospedeiros, passando despercebidos em medidas de quarentena e demonstrando sua capacidade patogênica, apenas sob condições de estresse (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007). Ao contrário, também são considerados fonte de uma infinidade de metabólitos secundários com elevado potencial biotecnológico que podem ser empregados na agricultura, como agentes inseticida, fungicida, bactericida e herbicida.

Em sua fase patogênica, podem agir como biotróficos e necrotróficos, também apresentando potencial saprofítico. São responsáveis por provocarem um quadro sintomático envolvendo desde a morte descendente e seca de ramos, e a exsudação de resinosidade pelos hospedeiros, provocando lesões necróticas e cancos em ramos, caules e tubérculos, podendo levar a morte progressiva de plantas jovens, adultas e portaenxertos; além de serem importantes patógenos de sementes e podridões pedunculares e de pós-colheita em frutos (CARDOSO et al., 2006; MARQUES et al., 2013a,b; NETTO et al., 2014; ZHAI et al., 2014).

3 REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB, M.A. Diversity of marine fungi from Egyptian Red Sea mangroves. **Botanica Marina**, Berlin, v. 48, p. 348-355, 2005.

AGRIOS, G.N. Plant disease caused by fungi. **Plant Pathology**. London:Academic Press, 1997. p. 245-406.

ALONGI, D.M. Present state and future of the world`s mangrove forests. **Environmental Conservation**, Queensland, v. 29, p. 331-349, 2002.

AL-SAYED, H.A.A.; GHANEM, E.H.; SALEH, K M. Bacterial community and some physico- chemical characteristics in a subtropical mangrove environment in Bahrain. **Marine Pollution Bulletin**, New York, v. 50, p. 147-155, 2005.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 143–169, 1995.

ANDERSON, I.C.; CAIRNEY, J.W.G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, New York, v. 8, p. 769-779, 2004.

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A. V.; SARIDAKIS H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.

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

ARX, J.A. VON. **The Genera of Fungi Sporulating in pure culture**. 2 ed. Vaduz: J. Cramer, 351p. 1974.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. 488p.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR., W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 3, p. 1-36, 2000.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESMHMUKH, S. K. (Ed.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, 2007. chap. 12, p. 191-209.

BACON, C.W. Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte- infected tall fescue. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Athens, v. 44, p. 123-141, 1993.

BADOLA, R.; PRIMAVERA, J.H.; BARBIER, E.; DAHDOUH-GUEBAS, F. Ethnobiology, socio-economics and management of mangrove forests: A review. **Aquatic Botany**, New York, v. 89, p. 220-236, 2008.

BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. Third Edition, Burgess Publishing Company, Minneapolis, 241p. 1972.

BERNDT, R.; FREIRE, F.C.O.; PIATEK, M.; WOOD, R. New species of *Phakopsora* (Basidiomycota, Uredinales) from Cameroon, South Africa and Brazil. **Sydowia**, v. 60, n. 1, p. 15-24, 2007.

BRAUN, U.; DAVID, J.; FREIRE, F.C.O. Some cercosporoid hyphomycetes from Brazil. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 20, n. 2, p. 95-106, 1999.

BRAUN, U.; FREIRE, F.C.O.; URTIAGA, R. New species and new records of cercosporoid hyphomycetes from Brazil, New Zealand and Venezuela. **Polish Botanical Journal**, v. 55, n. 2, p. 281-291, 2010.

- BRUNDRETT, M.C. Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In: SCHULZ, B.J.E.; BOYLE, C.J.C.; SIEBER, T.N. (Ed.). **Microbial root endophytes**. Berlin: Springer-Verlag. chap. 16, p. 281-293. 2006
- CANHOS, W.P.; SOUZA, S. & LANGE-CANHOS, D. A. **Catálogo Nacional de Linhagens**. 3^a Edição, Base de Dados Tropical, Campinas. 1989
- CARDOSO, J.E.; PAIVA, J.P.; CAVALCANTI, V.; SANTOS, A.A.; VIDAL, J.C. Evaluation of resistance in dwarf cashew to gummosis in north-eastern Brazil. **Crop Protection**, v. 25, p. 855-859, 2006.
- CAVALCANTE, R.M.; SOUSA, F.W.; NASCIMENTO, R.F.; SILVEIRA, E.R.; FREIRE, G.S.S. The impact of urbanization on tropical mangroves (Fortaleza, Brazil): Evidence from PAH distribution in sediments. **Journal of Environmental Management**, New York, v. 91, p. 328- 335, 2009.
- CRIBB, A.B.; CRIBB, J.W. Marine fungi from queensland. In: CRIBB, A.B.; CRIBB, J.W. Marine fungi from Queensland I. **Queensland: University Queensland**. p.77-81. 1955.
- CROUS, P.W., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M.J., RHEEDER, J., MARASAS, W.F.O., PHILLIPS, A.J.L., ALVES, A., BURGESS, T.I., BARBER, P.A., GROENEWALD, J.Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 235-253, 2006.
- DAS, S.; LYLA, P S.; KHAN, A. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. **Current Science**, Bangalore, v. 90, p. 1325-1334, 2006.
- DAVIS, R.A.; ANDJIC, V.; KOTIW, M.; SHIVAS, R.G. Phomoxins B and C: Polyketides from an endophytic fungus of the genus *Eupenicillium*. **Phytochemistry**, Netherlands, v. 66, p. 2771- 2775, 2005.
- DENMAN, S., CROUS, P.W., TAYLOR, J.E., KANG, J.C., PASCOE, I.,

WINGFIELD, M.J. An overview of the taxonomic history of Botryosphaeria, and a reevaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. **Studies in Mycology**, v.45, p.129–140, 2000.

DERAM, A.; LANGUEREAU-LEMAN, F.; HOWSAM, M.; PETIT, D.; HALUWYN, C.V. Seasonal patterns of cadmium accumulation in *Arrhenatherum elatius* (Poaceae): Influence of mycorrhizal and endophytic fungal colonisation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 845-848, 2008.

FIDALGO, O.; FIDALGO, M. E. P. K. **Revisão de Fungi São Paulensis**. Arquivos do Museu Nacional 43: 157-188. 1957.

FREIRE, F.C.O. Deterioração microbiológica de amêndoas de cajueiros: um problema de difícil solução. **Essentia**, v. 15, n. 2, p. 37-48, 2014.

FREIRE, F.C.O. Fungi associated with cashew inflorescences in Brazil. **Essentia**, v. 13, n. 2, p. 27-41, 2012.

FREIRE, F.C.O.; BERNDT, R. An updated list of plant fungi from Ceará State (Brazil) II. Rusts. **Essentia**, v. 14, n. 2, p. 53-62, 2013.

FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E. Doenças das *Spondias* – Cajarana (*S. cytherea* Sonn.), Cajazeira (*S. mombin* L.), Ciriguela (*S. purpúrea* L.), Umbu (*S. tuberosa* A. Cam.) e Umbuguela (*Spondias* spp.) no Brasil. **Agrotropica**, v. 9, n. 2, p. 75-82, 1997.

FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E.; SANTOS, A.A.; VIANA, F.M.P. Diseases of cashew nut plants (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. **Crop Protection**, v. 21, p. 489-494, 2002.

FREIRE, F.C.O.; CAVALVANTE, M.J.B.; BEZERRA, J.L. Deterioração fúngica de amêndoas de cajueiro no nordeste brasileiro. **Agrotropica**, v. 8, n. 3, p. 65-68, 1996.

FREIRE, F.C.O.; MARTINS, M.V.V. Confirmação da ocorrência do sangramento do caule do coqueiro no estado do Ceará. **Essentia**, v. 12, n. 1, p. 31-39, 2010.

FREIRE, F.C.O.; MOSCA, J.L. Patógenos associados a doenças de plantas ornamentais no estado do Ceará. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. v.15, n. 1, p. 83-89, 2009.

FREIRE, F.C.O.; GONÇALVES, F.J.T. A diversidade microbiológica da caatinga cearense. **Essentia**, v. 14, n. 1, p. 11-34, 2012.

FREIRE, F.C.O.; VASCONCELOS, F.R.; COUTINHO, I.B.L. Fungos endofíticos: uma fonte de produtos bioativos de importância para a humanidade. **Essentia**, v. 16, n. 1, p. 61-102, 2014.

FRÖHLICH, J.; HYDE, K.D. Biodiversity of palm fungi in the tropics: Are global fungal diversity estimates realistic? **Biodiversity and Conservation**, London, v. 8, p. 977-1004, 1999.

GILBERT, G.S. GOROSPE, J.; RYVARDEN, L. Host and habitat preferences of polypore fungi in Micronesian tropical flooded forests. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, p. 674-680, 2008.

GONÇALVES, F.J.T. **Identificação de espécies de Botryosphaeriaceae endofítica de plantas da Caatinga do estado do Ceará e patogenicidade em manga e ramos de umbu-cajá**. 2014. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2014.

GOPAL, B.; CHAUHAN, M. Biodiversity and its conservation in the Sundarban Mangrove Ecosystem. **Aquatic Sciences**, Berlin, v. 68, p. 338-354, 2006.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A.M. Development in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, p. 454-500, 1999.

GUNATILAKA, A.A.L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. **Journal Natural Product**, Ohio, v. 69, p. 509-526, 2006.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HARVEY, J.B.J.; GOFF, L.J. Genetic covariation of the marine fungal symbiont *Haloguignardia irritans* (Ascomycota, Pezizomycotina) with its algal hosts *Cystoseira* and *HALIDRYS* (Phaeophyceae, Fucales) along the west coast of North America. **Fungal Biology**, Amsterdam, v. 114, p. 82-95, 2010.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, p. 641-655, 1991.

HAWKSWORTH, D.L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 50, p. 9–18, 2004.

HOLGUIN, G.; GONZALEZ-ZAMORANO, P.; DE-BASHAN, L.E. Mangrove health in an arid environmental encroached by urban development – a case study. **Science of the Total Environment**, Boston, v. 363, p. 260-274, 2006.

HYDE, K.D.; JONES, E.B.G.; LEANO, E.; POINTING, S.B.; POONYTH, A.D.; VRIJMOED, L.L.P. Role of fungi in marine ecosystems. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 7, p. 1147-1161, 1998.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B.L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. **Advances in Marine Biology**, San Diego, v. 40, p. 81-251, 2001.

KRISTENSEN, E.; BOUILLON, S.; DITTMAR, T.; Marchand, C. Organic carbon dynamics in mangrove ecosystems: **A review**. **Aquatic Botany**, New York, v. 89, p. 201-219, 2008.

KUMAR D.S.S.; CHEUNG, H. YEUNG, C.S.L.; CHEN, F.; HYDE, K.D. In vitro studies of

endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii* with anti-proliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 94, p. 295-300, 2004.

KUMARESAN, V.; SURYANARAYANAN, T.S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. **Mycological Research**, Cambridge, v.105, p. 1388-1391, 2001.

KUNINAGA, S.; NATSUAKI, T.; TAKEUCHI, T.; YOKOSAWA, R. Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**, Berlin, v. 32, p.237-243, 1997.

LARENA, I.; SALAZAR, O.; GONZALEZ V.; JULIAN, M. C.; RUBIO, V. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 75, p. 187-194, 1999.

LEE, S.B.; TAYLOR, J.W. Phylogeny of five fungus-like protistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 9, p. 636-653, 1992.

LI, M.Y.; XIAO, Q.; PAN, J.Y.; WU, J. Natural products from semi-mangrove flora: source, chemistry and bioactivities. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 26, p. 281-298, 2009.

LIU, C.I.; ZOU, W.X.; LU, I.; TAN, R.X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 88, p. 277-282, 2001.

MARIA, G.L.; SRIDHAR, K.R. Richness and diversity of filamentous fungi on woody litter of mangrove along the west coast of India. **Current Science, Bangalore**, v. 83, p. 1573-1580, 2002.

MARQUES, M.W., LIMA, N.B., MORAIS Jr M.A., BARBOSA, M.A.G., SOUZA, B.O., MICHEREFF, S.J., PHILLIPS, A.J.L., CAMARA, M.P.S. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v.61, p.181–193, 2013a.

MARQUES, M.W., LIMA, N.B., MORAIS JR, M.A., MICHEREFF, S.J., PHILLIPS, A.J.L., CÂMARA, M.P.S. *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, p.195-208, 2013b.

MARKS, S.; CLAY, K. Effects of CO₂ enrichment, nutrient addition, and fungal endophyte-infection on the growth of two grasses. **Oecologia**, Berlin, v. 84, p. 207–214, 1990.

MARTINS, M.V.V.; FREIRE, F.C.O; LUZ, E.D.M.N; SANTOS, M.V.O.; ARAUJO, F.S.A.; CORDEIRO, I.M. Ocorrência de *Phytophthora nicotianae* em *Lilium speciosum* no Brasil. **Summa phytopathol.** V. 40, n. 4, p. 383, 2014

MENDES, R.; AZEVEDO, J.L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A.M. (Org.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife: UFPE: 2007. p. 129-140.

MIDORIKAWA, G.E.O.; PINHEIRO, M.R.R.; VIDIGAL, B.S.; ARRUDA, M.C.; COSTA, F.F.; PAPAS JR., G.J.; RIBEIRO, S.G.; FREIRE, F.; MILLER R.N.G. Characterization of *Aspergillus flavus* strains from Brazilian Brazil nuts and cashew by RAPD and ribosomal DNA analysis. **Lett Appl Microbiol.** v. 47, n. 1, p. 1-8, 2008.

MILES, D.H.; KOKPOL, U.; CHITTAWONG, V.; TIP-PYANG, S.; TUNSUWAN, K.; NGUYEN, C. Mangrove Forests – The importance of conservation as a bioresource for ecosystem diversity and utilization as a source of chemical constituents with potential medicinal and agricultural value. **Pure Applied Chemical**, Berlin, v. 70, p. 23-27, 1999.

MUNIZ, C.R.; FREIRE, F.C.O; SOARES, A.A.; COOKE, P.H. The ultrastructure of shelled and unshelled cashew nuts. **Micron**, v. 54-55, p. 52-56, 2013.

NAGELKERKEN, I.; BLABER, S.J.M.; BOUILLON, S.; GREEN, P.; HAYWOOD, M.; KIRTON, L.G.; MEYNECKE, J.-O.; PAWLIK, J.; PENROSE, H M.; SASEKUMAR, A.P.J.

The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: A review. **Aquatic Botany**, New York, v. 89, p. 155-185, 2008.

NETTO, M.S.B., ASSUNÇÃO, I.P., LIMA, G.S.A. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brasil. **Fungal Diversity**, v.67, p.127–41, 2014.

OWEN, N.L.; HUNDLEY, N. Endophytes – the chemical synthesizer inside plants. **Science Progress**, New York, v. 87, p. 79-99, 2004.

PACE, N.R. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. **ASM News**, New York, v. 62, p. 463-470, 1996.

PANG, K.L.; MITCHELL, J.I. Molecular approaches for assessing fungal diversity in marine substrata. **Botanica Marina**, Berlin, v. 48, p. 332-337, 2005.

PARRENT, J.L.; GARBELOTTO, M.; GILBERT, G.S. Population genetic structure of the polypore *Datronia caperata* in fragmented mangrove forests. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, p. 403-410, 2004.

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

PHILLIPS, A.J.L., ALVES, A., ABDOLLAHZADEH, J., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M.J., GROENEWALD, J.Z., CROUS, P.W. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, v.76, p.51–167, 2013

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

ROCHA, M.E.B.; FREIRE, F.C.O.; VIEIRA, I.G.P.; FILHO, J.M.S.; MAIA, F.E.F.; GUEDES, M.I.F.; RONDINA, D. Production of aflatoxins from *Aspergillus flavus* in liquid medium. **Journal of Life Sciences**, v. 7, n. 4, p. 377-381, 2013.

ROCHA, M.E.B.; FREIRE, F.C.O.; MAIA, F.E.F.; GUEDES, M.I.F.; RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, p. 159-165, 2014.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, p. 1109-1114, 2008.

RODRIGUEZ, R.J.; WHITE JR, J.F.; ARNOLD, A.E.; REDMAN, R.S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, London, v. 182, p. 314-330, 2009.

SAKALIDIS, M.L., SLIPPERS, B., WINGFIELD, B.D., HARDY, G.E.S., BURGESS, T.I. The challenge of understanding the origin, pathways and extent of fungal invasions: global populations of the *Neofusicoccum parvum*-*N. ribis* species Complex. **Diversity and Distributions**, v.19, p.873-883, 2013.

SANTOS, A.A.; FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E. Ocorrência da podridão interna do mamão no estado do Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 673-674, 2001.

SARMA, V.V.; HYDE, K.D.; VITTAL, B.P.R. Frequency of occurrence of mangrove fungi from the east coast of India. **Hydrobiologia**, Netherlands, v. 455, p. 41-53, 2001.

SCHLOSS, P.D., HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 14, p. 303-310, 2003. SCHOCH, C.L., SHOEMAKER, R.A., SEIFERT, K.A., HAMBLETON, S., SPATAFORA, J.W., CROUS, P.W. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. **Mycologia**, v.98, p.1041-1052, 2006.

- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, p. 661-686, 2005.
- SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. **Canadian Journal Microbiology**, Saskatoon, v. 50, p. 239-249, 2004.
- SHARAF, M.; EL-ANSARI, M.A.; SALEH, N.A.M. New flavonoids from *Avicennia marina*. **Fitoterapia**, Novara, v. 71, p. 274-277, 2000.
- SIEGEL, M.R.; LATCH, G.C.M.; BUSH, L.P.; FANNIN, F.F.; ROWAN, D.D.; TAPPER, B.A.; BACON, C.W.; JOHNSON, M.C. Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 3301-3315, 1990.
- SLIPPERS, B., WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**, v.21, n.2-3, p. 90-106, 2007.
- SOUSA, O.V.; MACRAE, A.; MENEZES, F.G.R.; GOMES, N.C.M.; VIEIRA, R.H.S.F.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.S. The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceará, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, New York, v. 52, p. 1725-1734, 2006.
- SRIDHAR, K.R. Mangrove fungi in India. **Current Science**, Bangalore, v. 86, p. 1586-1587, 2004.
- STONE, J.K.; POLISHOOK, J.D.; WHITE, J.R.J. Endophytic fungi. In: MUELLER, G.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S. (Ed.). Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. **Burlington: Elsevier**, 2004. p. 241-270.
- STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal Natural Products**, Washington, v. 67, p. 257-268, 2004.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, p. 491-502, 2003.

SURYANARAYANAN, T.S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU M. B.; SASSE, F.; JANSEN R.; MURALI T. S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 23, p. 9-19, 2009.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 18, p. 448-459, 2001.

THINES, E.; ANKE, H.; WEBER, R.W.S. Fungal secondary metabolites as inhibitors of infection-related morphogenesis in phytopathogenic fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, p. 14-25, 2004.

TREMBLAY, L.B.; DITTMAR, T.; MARSHALL, A.G.; COOPER, W. J.; COOPER, W.T. Molecular characterization of dissolved organic matter in a North Brazilian mangrove porewater and mangrove-fringed estuaries by ultrahigh resolution Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance mass spectrometry and excitation/emission spectroscopy. **Marine Chemistry**, New York, v. 105, p. 15-29, 2007.

VARMA, A.; VERMA, S.; SAHAY, N.; BUTEHORN, B.; FRANKEN, P. Piriformospora indica, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2741-2744, 1999.

VIEIRA, I.G.P.; FREIRE, F.C.O.; ANDRADE, J.A.; MENDES, F.N.P.; MONTEIRO, M.C.N. Determinação de aflatoxinas em amêndoas de cajueiro por cromatografia em camada delgada. **Rev. Ciên. Agron.**, v. 28, n. 4, p. 430-435, 2007.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domain Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

WU, J.; XIAO, Q.; XU, J.; LI, M. Y.; PAN, J. Y.; YANG, M. H. Natural products from true mangrove flora: source, chemistry and bioactivities. **Natural Products Reports**, Cambridge, v. 25, p. 955-981, 2008.

XIAO, X.; LUO, S.; ZENG, G.; WEI, W.; WAN, Y.; CHEN, L.; GUO, H.; CAO, Z.; YANG, L.; CHEN, J.; XI, Q. Biosorption of cadmium by endophytic fungus (EF) *Microsphaeropsis* sp. LSE10 isolated from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, p. 1668-1674, 2010.

YUAN, J. I.; JIAN-NAN B. I.; BING Y.; XU-DONG Z. Taxol-producing Fungi: A New Approach to Industrial Production of Taxol. **Chinese Journal of Biotechnology**, New York, v. 22, p. 1-6, 2006.

ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 23, p. 753-771, 2006.

ZHAI, L., ZHANG, M., L.V, G., CHEN, X., JIA, N., HONG, N., WANG, G. Biological and molecular characterization of four *Botryosphaeria* species isolated from pear plants showing stem wart and stem canker in China. **Plant Disease**, v.98, p.716-726, 2014.

3 CAPÍTULO I

Identificação e caracterização de espécies de *Lasiodiplodia* patogênicas e endofíticas em plantas de mangues do Ceará

RESUMO

Dentre as espécies do fungo *Lasiodiplodia* já identificadas, 14 já foram relatadas no território brasileiro, em associação com o declínio, a morte descendente de ramos e podridão peduncular em frutos de mangueira, morte descendente de ramos em videira, cajueiro e outras frutíferas tropicais. O achado de espécies de *Lasiodiplodia* foi associado a podridão peduncular em mamoeiro e coqueiro e a podridão do colo e radicular em pinhão manso e mandioca. Sete das que foram descritas no Brasil são: *L. brasiliense*, *L. euphorbicola*, *L. jatrofiphicola*, *L. subglobosa*, *L. macrospora*, *L. pontae* e *L. caatinguensis*, o que nos indica a grande diversidade fúngica presente na nossa região. Este trabalho teve por objetivo a caracterização das espécies de *Lasiodiplodia* de maior fator de virulência atuando como patógenos em plantas do mangue do Ceará. As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas em coletas realizadas nas localidades de Acaraú e Itarema na planta *Avicennia nitida*. Essas passaram pelo processo de isolamentos para fungos endofíticos, depois foram repicados em meio BCA, purificados e preparados para posteriores análises. A identificação fúngica foi realizada utilizando uma combinação de características morfofisiológicas e patogênicas, juntamente com análises filogenéticas baseadas na sequência parcial do alongamento da translação 1-a (TEF1-a), espaçador interno transcrito (ITS) e b-tubulina (b-tub). Três espécies de *Lasiodiplodia* foram identificadas, sendo dois isolados patogênicos *L. parva* e *L. theobromae* e um endofítico *L. pseudotheobromae*. As espécies patogênicas identificadas foram capazes de causar lesões necróticas em altos níveis de severidade quando inoculadas em frutos de manga, goiaba e banana.

Palavras chave: Filogenia. Patogenicidade. Sequenciamento. Fungos

ABSTRACT

Among the species of the fungus *Lasiodiplodia* already identified, 14 have been reported in Brazil, in association with the decline, the descendant death of branches and peduncular rot in hose fruits, descending death of branches in grapevine, cashew and other tropical fruits. The finding of *Lasiodiplodia* species was associated with peduncular rot in papaya and coconut, and root and root rot in jatropa and cassava. Seven of those described in Brazil are: *L. brasiliense*, *L. euphorbicola*, *L. jatrophiicola*, *L. subglobosa*, *L. macrospora*, *L. pontae* and *L. caatinguensis*, which indicates the great fungal diversity present in our region. The objective of this work was to characterize the *Lasiodiplodia* species with the greatest virulence factor acting as pathogens in plants of the mangrove of Ceará. The samples used in this study were obtained from collections at the locations of Acaraú and Itarema at *Avicennia nitida* plant. These underwent the isolation process for endophytic fungi, then were re-collected in BCA medium, purified and prepared for further analysis. The fungal identification was performed using a combination of morphophysiological and pathogenic characteristics, together with phylogenetic analyzes based on the partial sequence of the 1-a translation stretching (TEF1-a), transcribed internal spacer (ITS) and b-tubulin (b-tub) . Three species of *Lasiodiplodia* were identified, two pathogenic isolates *L. parva* and *L. theobromae* and one endophytic *L. pseudotheobromae*. The pathogenic species identified were able to cause necrotic lesions at high levels of severity when inoculated on mango, guava and banana fruits.

Keywords: Phylogeny. Pathogenicity. Sequencing. Fungi

3.1 INTRODUÇÃO

A família Botryosphaeriaceae (Ascomycota, Botryosphaeriales) é composta por complexos de espécies crípticas endofíticas e patogênicas capazes de provocar sintomas de cancos e morte descendente de ramos a diversos hospedeiros, sobretudo plantas lenhosas.

Fungos da família Botryosphaeriaceae são importantes patógenos de plantas lenhosas, que apresentam hábitos parasíticos, saprofíticos e endofíticos, grande diversidade ecológica, morfológica e genética (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007; PHILLIPS et al., 2013).

Com o advento da biologia molecular, a taxonomia dessa família de fungos passou por diversas mudanças sendo atualmente composta por 17 gêneros e uma média de 222 espécies, devidamente caracterizadas tanto morfológicamente, através das dimensões de seus conídios, como molecularmente, com base em sequências de DNA (PHILLIPS et al., 2013).

Os gêneros de Botryosphaeriaceae de maior expressão mundial na agricultura, são: *Lasiodiplodia* Ellis & Everh, 1896; *Diplodia* Fr.; *Botryosphaeria* Ces. & De Not.1877; *Neofusicoccum* Crous Slippers & A.J.L. Phillips 2006; *Neoscytalidium* Crous & Slippers, 2006; *Pseudofusicoccum* Mohali, Slippers & Wingf; tanto pelos números de espécies crípticas, como pela constante ocorrência e disseminação nos mais diferentes patossistemas (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007; SAKALIDIS et al., 2011; SAKALIDIS et al., 2013).

O gênero *Lasiodiplodia*, introduzido por Ellis; Everh em 1896, que possui como espécie tipo *Lasiodiplodia theobromae sensu lato* (Pat.) Griffin; Maublanc, 1909, é amplamente distribuído em regiões de clima tropicais e subtropicais, sendo o gênero mais relatado (PHILLIPS et al., 2013). Apresentam conídios do tipo diplóide, de formato ovóide, com coloração hialina e asseptados quando imaturo se tornando marrons, septados e com estrias longitudinais, quando maduros. Até 2004, essa era a única espécie filogeneticamente associada ao gênero, no entanto, por meio do sequenciamento multilocus de DNA, mais 26 espécies crípticas já foram molecularmente caracterizadas e registradas no Mycobank (ROSADO et al., 2016). Essas espécies apresentam, além de diferenças morfológicas quanto a dimensões de conídios, paráfises e células conidiogênicas, diferenças de nucleotídeos nas regiões gênicas do seu DNA, sendo estas características as que realmente delimitam os limites entre espécies (PHILLIPS et al., 2013).

Dentre as espécies de *Lasiodiplodia* já identificadas, 14 já foram relatadas no território brasileiro, em associação com o declínio de plantas, a morte descendente de ramos e

podridão peduncular, em frutos de mangueira (COSTA et al., 2010; MARQUES et al., 2013a), morte descendente ramos em videira (CORREIA et al., 2016), cajueiro e outras frutíferas tropicais (COUTINHO et al., 2016), podridão peduncular em mamoeiro (NETTO et al., 2014) e coqueiro (ROSADO et al., 2016) e a podridão do colo e radicular em pinhão manso (MACHADO et al., 2014a) e mandioca (MACHADO et al., 2014b). Nove dessas espécies foram descritas no Brasil: *L. brasiliense* (NETTO et al., 2014), *L. marypalme* (= *L. euphorbicola*), *L. jatrophiicola*, *L. subglobosa*, *L. macrospora* (MACHADO et al., 2014a) *L. pontae* e *L. catinguense* (COUTINHO et al., 2016)) o que indica a grande diversidade fúngica presente na nossa região.

As regiões codificadoras de proteínas, aqui representadas pelo TEF1- α e β -tubulina, caracterizam-se por serem fortemente conservadas e abundantes, que desempenham papéis cruciais no desenvolvimento dos organismos (O'DONNELL et al., 1998). O TEF1- α é uma proteína envolvidas nos processos de iniciação, alongamento e tradução do DNA (KEELING; INAGAKI, 2004) e a β -tubulina a proteína envolvida na formação dos microtubulos essenciais para a divisão celular (GLASS; DONALDSON, 1995; EINAX; VOIGT, 2003).

Mesmo diante da grande confiabilidade depositada em dados moleculares para a descrição de novas espécies, poucos estudos filogenéticos trazem explícitos em seus resultados à localização exata e a quantificação das diferenças nucleotídicas existentes entre regiões gênicas das novas espécies e das espécies filogeneticamente relacionadas às mesmas. Diante da necessidade de tais verificações, informando o real polimorfismo entre esses indivíduos, visa-se dar mais consistência a hipótese taxonômica levantada.

Nesse sentido, dentro do complexo *Lasiodiplodia*, revela-se que a separação filogenética desses organismos é efetivamente baseada em diferenças na região de um único gene, o TEF-1 α , e nas dimensões de seus conídios, sendo prudente, mediante aparecimento de mais espécies, incluir outras regiões genéticas às análises a fim de reforçar essa diferenciação (DAMM et al., 2007; ABDOLLAHZADEH et al., 2010).

No atual estudo, em mangues cearenses, foi encontrado espécies de *Lasiodiplodia* tanto endofítica como patogênica. Os manguezais são ecossistemas localizados em regiões de interação do ambiente terrestre com o marinho.

A área global total dos manguezais é estimada em 18,1 milhões de hectares, sendo distribuído em 112 países. Mais de 41% das florestas de mangues do mundo estão localizadas no sul e sudeste asiático, sendo que 23% estão situadas somente na Indonésia (GOPAL;

CHAUHAN, 2006). Além disso, 27,1% da área total de manguezais encontram-se no continente americano. O Brasil apresenta a segunda maior área de manguezais do mundo, sendo a maior das Américas (SOUSA et al., 2006).

Dessa forma, essa pesquisa teve por objetivo a identificação e caracterização das amostras coletadas, análises filogenéticas e caracterização patogênica.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Amostragem e isolamento de fungos

As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas a partir de coletas realizadas em mangues do Ceará, nas localidades de Acaraú e Itarema, da planta *A. nitida*. O material coletado (folhas, ramos e raízes) foi levado para isolamento no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará. Ambos os fungos endofítico e patogênicos foram encontrados nas amostras.

Antes do isolamento, as folhas foram cortadas em discos de aproximadamente 5 mm e raízes/ramos em pequenos fragmentos de aproximadamente 1 cm. O isolamento dos fungos endofíticos e patogênicos de plantas dos manguezais seguiu o processo de desinfecção superficial, no qual as superfícies das amostras foram desinfestadas pela seguinte sequência de imersão: etanol 96% por 60 segundos; hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% (v/v) de cloro ativo por 3 minutos; novamente em etanol 96% por 60 segundos e duas lavagens em água destilada e esterilizada. Em seguida, 10 fragmentos vegetais foram transferidos para placas de Petri contendo o meio de cultura extrato-de-malte-ágar (EMA) acrescido dos antibióticos cloranfenicol (50 g.mL^{-1}) e estreptomicina ($50 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), para impedir o crescimento de bactérias.

As placas foram incubadas a 28°C por 2 a 14 dias e acompanhadas periodicamente para avaliação do crescimento de fungos a partir dos fragmentos vegetais. Após o crescimento fúngico, houve a repicagem para o meio de batata-cenoura-ágar (BCA), esses foram identificados, foram purificados e preparados para análises posteriores.

3.2.2 Extração de DNA e amplificação de sequências

O DNA genômico total foi extraído dos três isolados do tipo *Lasiodiplodia* identificados com base na morfologia dos conídios. Os isolados foram cultivados em caldo batata-dextrose (BD) durante sete dias em erlenmeyers de 250 mL. A biomassa micelial de cada isolado foi seca à temperatura ambiente (25 a 30°C) em uma câmara de fluxo laminar por 24 h. A extração do DNA genômico seguiu o protocolo de Cavalcanti e Wilkinson (2007) com modificações, onde aproximadamente 1 g de micélio foi moído em um pó fino usando um pilão em um almofariz preenchido com nitrogênio líquido. As amostras de DNA extraídas foram quantificadas usando um espectrofotômetro NanoDrop® 2000c (Thermo Fisher Scientific), versão 1.0.

Após a quantificação do DNA extraído, este foi diluído para uma concentração de 10 ng.μ⁻¹ e armazenado a -20°C. As misturas de reação em cadeia da polimerase (PCR; 50 μL) continham 6,25 μL de DNA genômico (10 ng.μ⁻¹), 10 μL de buffer 1x, 1 μL de dNTP (0,2 mM), 3 μL de MgCl₂ (1,5 mM) 5 μL de cada par de primers (1, 0 mM, Invitrogen), 0,5 μL de DNA Taq Flexi (0,05 U. μL⁻¹, Promega) e 19,25 μL de água desionizada estéril. Foram utilizados *primers* para as regiões ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990) na amplificação e sequenciamento das regiões 1 e 2, incluindo o gene de RNAr de 5,8S (ITS); primers βt2a e βt2b foram usados para sequenciar um fragmento da β-tubulina (βt) (GLASS; DONALDSON, 1995); e os primers TEF1-688F e TEF1-1251R (ALVES et al., 2008) foram usados para amplificar um fragmento do fator de transcrição e elongação 1-α (TEF1-α) (CARBONE et al., 1999).

O ciclo térmico da PCR consistiu num passo de desnaturação inicial a 96°C durante 1 min; seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 1 min a 58°C (regiões TEF1-α e ITS) ou 68°C (região βt), 1,5 min a 72°C (anelamento) e 10 min a 72°C (extensão final). Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão tris-acetato EDTA 1X (TAE), corados com brometo de etídio (0,5 g.mL⁻¹) por 1 min e visualizados em transiluminador UV. Após a verificação das bandas amplificadas, alíquotas de 40 μL do produto de PCR de cada amostra foram enviadas para a empresa MacroGen Inc., Korea (<http://www.macrogen.com>), para serem purificadas e sequenciadas para cada par de *primer*, nas direções direta e reversa. Assim, os isolados foram sequenciados para a região TEF1-α. Após a análise filogenética de TEF1-α, os isolados foram selecionados para representar a variação genética para cada espécie identificada neste estudo. As regiões

ITS e βt foram também sequenciadas para resolver todas as espécies utilizadas para reconstruir a filogenia de *Lasiodiplodia*.

3.2.3 Análises filogenéticas

As sequências foram editadas usando o software BioEdit (HALL, 2012) e foram manualmente antes da construção de contigs usando sequências direta e reversa. As sequências ITS, TEF1- α e βt foram utilizadas nas análises filogenéticas, seguindo a mesma metodologia de Coutinho et al. (2016).

Eles foram alinhados com base na ordem ITS, TEF1- α ou βt e as relações filogenéticas foram inferidas usando o programa de software MEGA X. Em seguida, análises de inferência Bayesiana (BI) foram conduzidas utilizando o método de Markov Chain Monte Carlo baseado nas sequências (ITS, TEF1- α e βt).

Gerou-se um gráfico de mapa de calor para melhor visualização dos dados de agrupamento utilizando o programa Morpheus, <https://software.broadinstitute.org/morpheus>. Ainda, com os dados acima mencionados, foi realizada a análise evolutiva pelo método dos mínimos quadrados, utilizando o programa MEGA X.

3.2.4 Caracterização patogênica

3.2.4.1 Patogenicidade em frutas

Os dois isolados que apresentaram características patogênicas nas amostras coletadas, sendo esses *Lasiodiplodia parva* e *Lasiodiplodia theobromae*, foram inoculados nas cultivares de manga Tommy Atkins, banana Prata e goiaba Paluma (Todos os frutos estavam em sua maturação comercial). Os frutos foram esterilizados na superfície por imersão em hipoclorito de sódio a 1,2% por 5 min e enxaguados em água destilada esterelizada antes da inoculação.

O método de inoculação e incubação seguiu a metodologia de Marques et al. (2013). Após a secagem, os frutos foram colocados em bandejas de plástico estéreis, com o fundo coberto com camadas de toalhas de papel umedecidas e esterilizadas. Para evitar o contato direto dos frutos com toalhas úmidas, cada fruto foi colocado em um dos lados de uma placa de Petri. Os frutos foram delicadamente feridos em duas regiões com o auxílio de

uma ponta de três pinos estéreis, a uma profundidade de 3 mm, antes de ser colocado um disco de tamanho 5 mm contendo micélio cultivado em BCA. Discos de BCA não-colonizados foram usados como tratamentos controle.

As bandejas plásticas foram dispostas lado a lado e mantidas vedadas por 48 horas para manter a umidade próxima à saturação, a 25 ± 2 ° C, com fotoperíodo de 12 horas com luz fluorescente branca. Após esse período, a câmara úmida foi removida das bandejas, as toalhas de papel não foram umedecidas e os frutos permaneceram na sala de incubação nas condições mencionadas acima por 10 dias.

Após 48 horas já se notava lesões consideráveis nos frutos. A virulência dos isolados foi avaliada diariamente, medindo-se o comprimento da lesão em duas direções perpendiculares em cada fruto até o sétimo dia. Estes dados foram utilizados para calcular o comprimento da lesão (mm) e a taxa de crescimento (mm/dia) de cada isolado.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições por isolado e três frutos por parcela. Os valores médios foram submetidos à análise de variância, pelo programa GraphPad Prism 7.

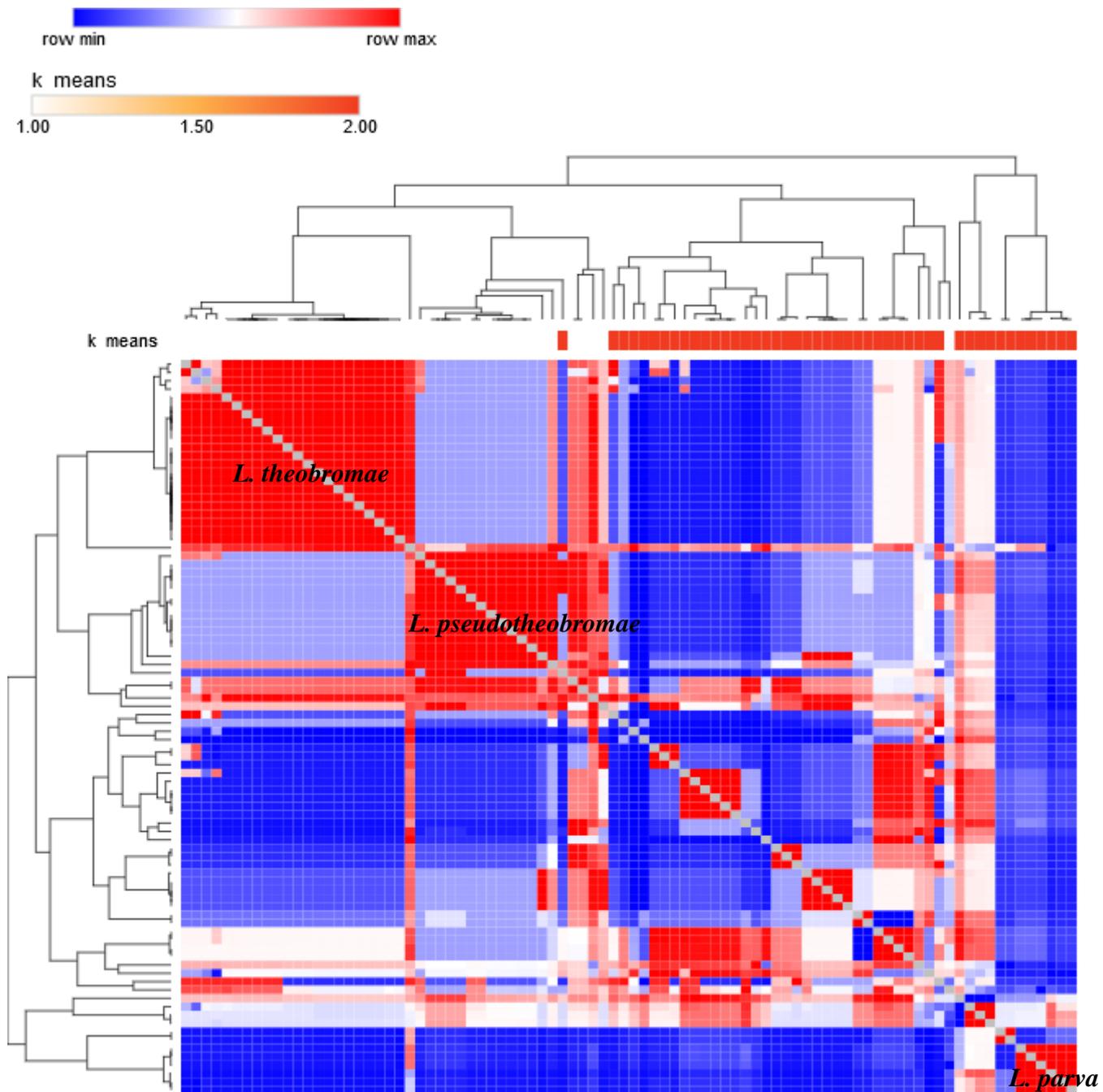
3.3 RESULTADOS

3.3.1 Análises filogenéticas

As análises foram conduzidas usando o modelo método Máxima Probabilidade Composta (TAMURA et al., 2004). Esta análise envolveu 88 sequências de nucleotídeos. As posições de códon incluídas foram 1° + 2° + 3° mais Não Codificador. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (opção de eliminação em pares). Houve um total de 1701 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA X (KUMAR et al, 2018). A partir desses dados foi gerado um mapa de calor (Figura 1) para melhor visualização dos dados de agrupamento, utilizando o método de 'k-means' fornecendo partições eficientes para determinação de variação dentro das classes, utilizando o programa Morpheus, <https://software.broadinstitute.org/morpheus>.

Figura 1 - Estimativas de divergência evolutiva entre sequências. Mapa de calor gerado pelo programa Morpheus. Similaridade onde o máximo encontrado é simbolizado em vermelho e o mínimo em azul, gerando as arvores filogenéticas respectivas. Ao lado direito temos o cálculo de 'média da variável K' determinando a variação dentro das classes (Azul a branco) e também com gráfico em barras para melhor visualização.

ANÁLISES FILOGENÉTICAS



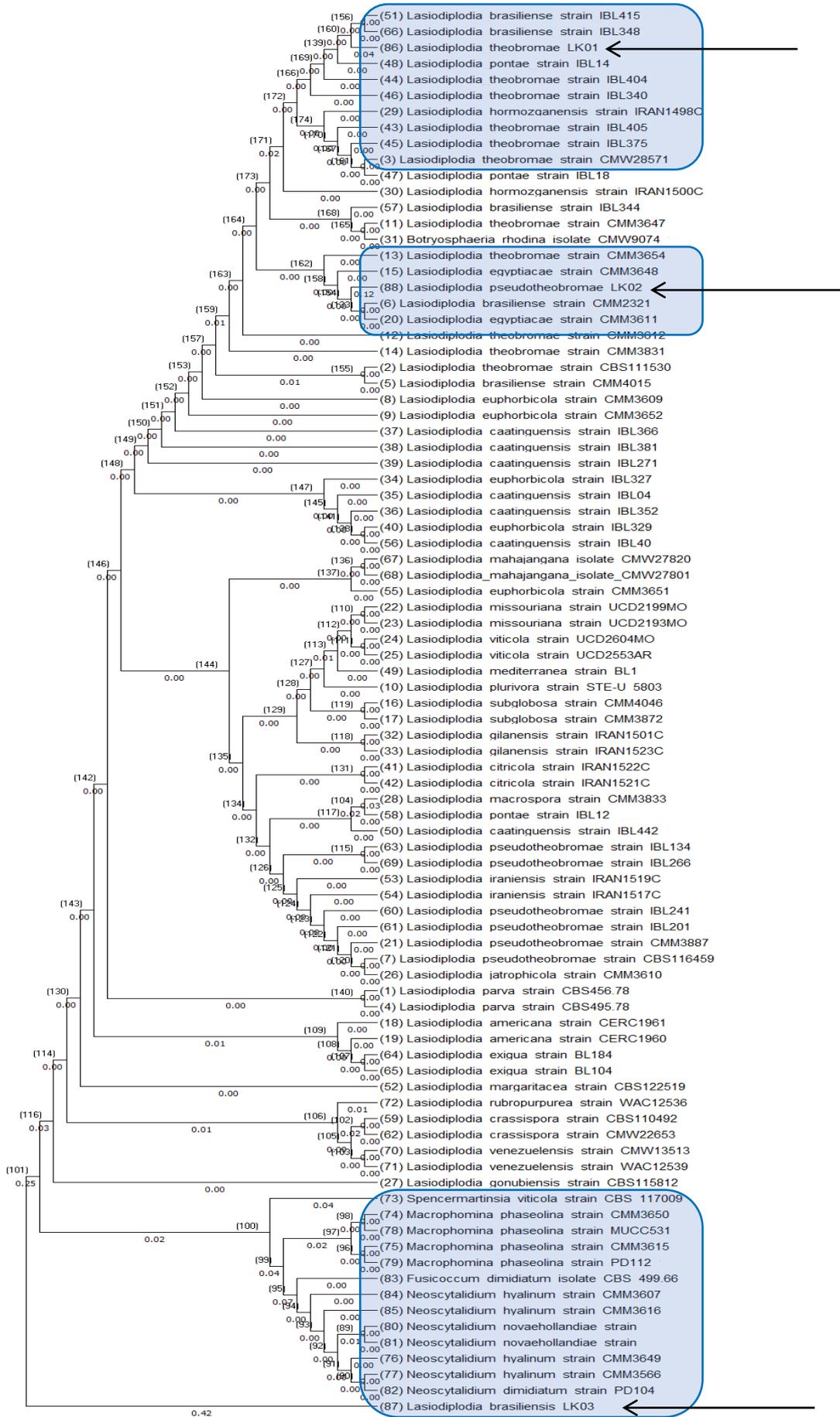
Fonte: elaborada pelo autor.

Foi gerada ainda, com os dados acima mencionados, análise evolutiva pelo método dos mínimos quadrados. Esta análise filogenética, baseada no alinhamento concatenado, foi realizada utilizando o programa MEGA X com 100 milhões de gerações, tendo cada árvore filogenética do espaço amostral de cada corrida a cada 500 gerações, descartando 25% das primeiras amostras da cadeia de frio, que foram submetidas. A topologia de árvore especificada pelo usuário foi analisada pelo método dos mínimos quadrados (RZHETSKY A. and NEI M.,1993). A soma dos comprimentos de ramificação para a árvore exibida foi igual a 3.79545838.

A árvore (Figura 2) é desenhada em escala, com comprimentos de ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método da Máxima Verossimilhança Composta (TAMURA et al, 2004) e estão nas unidades do número de substituições de base por local. Esta análise envolveu 88 sequências de nucleotídeos. As posições de códon incluídas foram 1° + 2° + 3° mais Não Codificador. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (opção de eliminação em pares). Houve um total de 1701 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA X (KUMAR et al, 2018). As árvores foram visualizadas e exportadas para programas gráficos. Com base na filogenia, os clados de *Lasiodiplodia* foram formados, e dois deles não foram agrupados, apesar de já terem sido reportados na literatura.

Figura 2 - Árvore filogenética inferida a partir de análise bayesiana baseada nas sequências combinadas das regiões gênicas ITS, TEF-1 α e β -tub. Probabilidades posteriores bayesianas são indicadas acima dos nós. As espécies neste estudo são destacadas com setas.

Fonte: elaborada pelo autor.



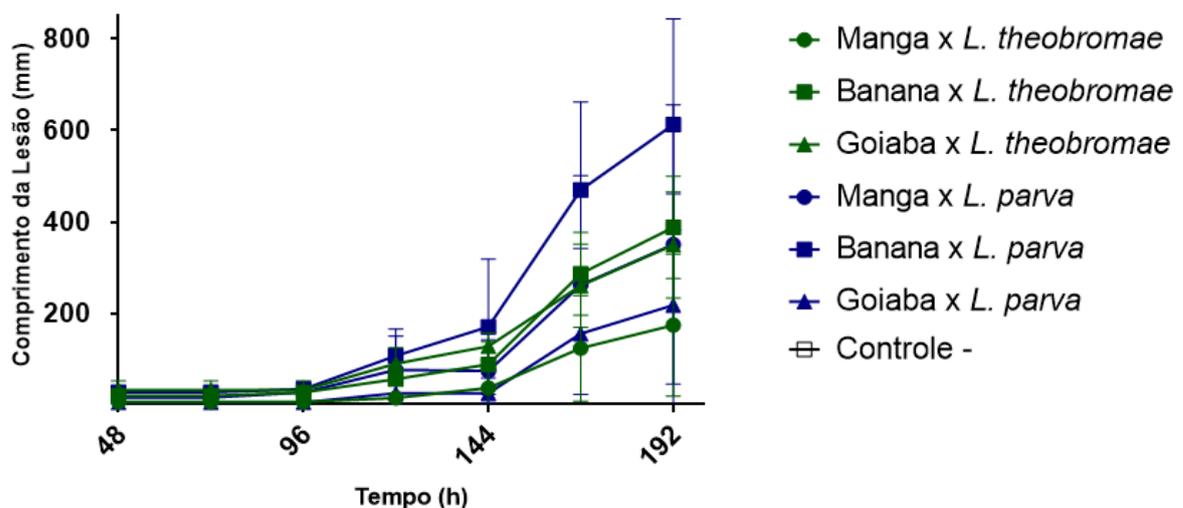
3.3.2 Caracterização patogênica

3.3.2.1 Patogenicidade em frutas

As correlações significantes (r) foram observadas entre os 2 grupos (Figura 3 e 4). O primeiro grupo correspondem aos 3 tipos de frutas Vs *Lasiodiplodia theobromae* e os segundo grupo, 3 tipos de frutas Vs *Lasiodiplodia parva*. Conforme analisado a correlação entre os grupos foi significativamente alta. Primeiro grupo: Manga ($r= 0,8709$; $p< 0,0107$), Banana ($r= 0,8805$; $p< 0,0089$) e Goiaba ($r= 0,9196$; $p< 0,0034$). Para o segundo grupo: Manga ($r= 0,8888$; $p< 0,0075$), Banana ($r= 0,9009$; $p< 0,0056$) e o Goiaba ($r= 0,8517$; $p< 0,015$).

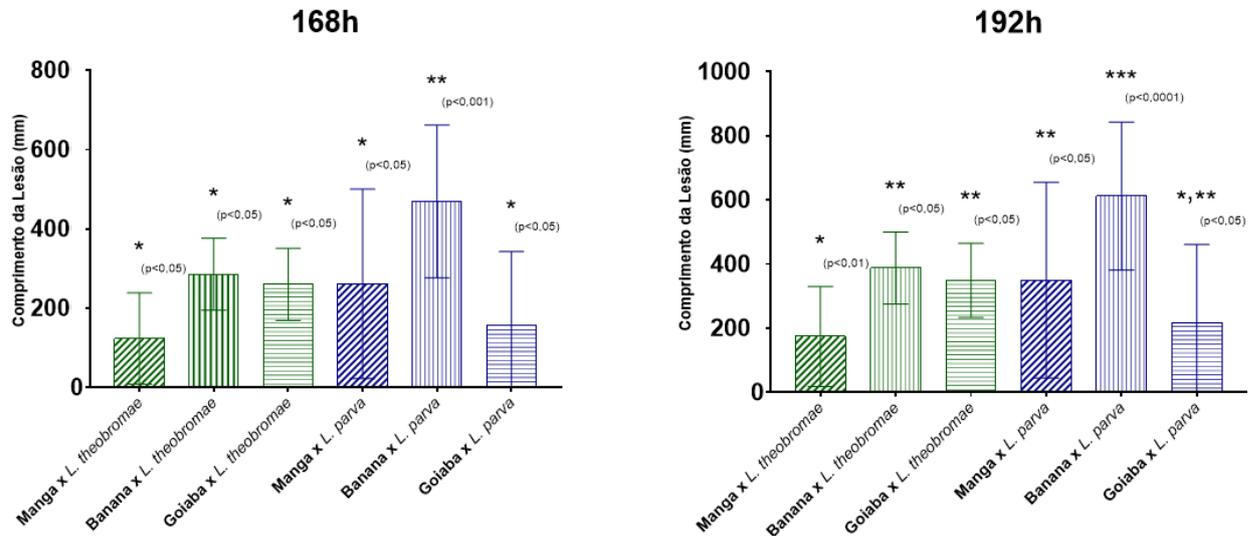
Os dois isolados de *L. parva* e *L. theobromae* causaram lesões arredondadas necróticas na epiderme que evoluíram para podridão mole após o segundo dia de incubação. Foi observado os maiores comprimentos da lesão para *L. parva* em manga (77,27 mm) e banana (53,66 mm), enquanto *L. theobromae* causou maiores lesões em goiaba (58,67 mm). Quanto a agressividade das espécies nas frutas inoculadas, verifica-se que *L. parva* foi mais agressiva em banana, seguido de goiaba e manga, respectivamente. Enquanto a espécie *L. theobromae* foi mais agressiva em banana, diferindo estatisticamente em relação às demais frutas.

Figura 3. Teste de patogenicidade em função do tempo em análise de regressão linear bivariada



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 4. Os gráficos correspondem a correlação e a variância expressas na Figura 3.



Fonte: elaborada pelo autor.

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Análises filogenéticas

Mapas de calor e agrupamento são usados frequentemente em estudos de análise de expressão para visualização eficiente de padrões e relações entre dados genômicos de alta dimensionalidade e controle de qualidade (ZHAO et al, 2014; GU et al, 2016).

De acordo com as análises bayesianas foi gerado mapa de calor para inferir a proximidade gênica entre as espécies estudadas. Os dados obtidos levam a determinação de agrupamentos entre espécies de acordo com os três genes (ITS, TEF1- α e β tub) expressos. Onde, quão mais agrupado está marcado na cor vermelha, quão mais distante, está marcado na cor azul.

Pode-se observar a aproximação total de 85% entre as espécies LK01 e *Lasiodiplodia theobromae*, 70% entre as espécies LK02 e *Lasiodiplodia pseudotheobromae* e 75% entre LK03 e *Lasiodiplodia parva*. A distinção entre as amostras é evidenciada em azul (Heatmap, Figura 1) ou rosa (Figura 5) dentre estas três espécies descritas e as demais. Ainda, estes resultados corroboram com o padrão das relações entre os nodos da filogenia (Figura 2) e o número de mudanças ocorridas entre estes, em que “K means” demonstra a quantificação de partições eficientes para determinação de variação entre classes.

3.4.2 Caracterização patogênica

3.4.2.1 Patogenicidade em frutas

As espécies *L. parva* e *L. theobromae* identificadas neste estudo desenvolveram sintomas em frutos de manga, banana e goiaba, com diferentes graus de severidade. Os resultados sugerem que plantas de mangue são hospedeiras das espécies *L. parva* e *L. theobromae*, e podem ser fontes de inóculo para manga, banana e goiaba. Coutinho et al. (2017) encontrou maiores lesões para a patogenicidade em manga com média 30,3 mm para *L. pontae* e média de 23,33 mm para *L. brasiliense*, *L. caatinguensis* e *L. theobromae*. Neste trabalho, encontramos lesões de média 77,27 mm para *L. parva* e superior a 37,06 mm para *L. theobromae* em manga, demonstrando assim o alto grau de patogenicidade dessas espécies de acordo com a severidade das lesões.

3.5 CONCLUSÃO

Com esse estudo pôde-se concluir que *Lasiodiplodia* sp. podem atuar como patogênicos em plantas de mangue e não diferem geneticamente das espécies anteriormente evidenciadas na região nordeste. Plantas de mangue podem ser hospedeiras das espécies *L. parva* e *L. theobromae*, e podem ser fontes de inóculo para manga, banana e goiaba.

Os resultados devem ser levados em conta pelos produtores, governos e instituições financeiras para evitar a implantação de cultivos de frutíferas nas regiões adjacentes a manguezais, já que esses são fontes de inóculo de diversas culturas.

3.6 REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHZADEH, J., JVADI, A., MOHAMMADI-GOLTAPPEH, E., ZARE, R., PHILLIPS, A.J.L. Phylogeny And Morphology Of Four New Species Of *Lasiodiplodia* From Iran. **Persoonia**, V.25, P.1–10, 2010.
- ALVES, A., CROUS, P.W., CORREIA, A., PHILLIPS, A.J.L. Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, v.28, p.1–13, 2008.
- CARBONE, I., ANDERSON, J.B., KOHN, L.M., A method for designing primer sets for the speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia** 91, 553–6. 1999.
- CAVALCANTI, J.J.V., WILKINSON, M.J. The first genetic maps of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Euphytica** 157, 131–43. 2007.
- CORREIA, K.C., SILVA, M.A., MORAIS JR, M.A., ARMENGOLD, J., PHILLIPS, A.J.L., CÂMARA, M.P.S., MICHEREFF, S.J. Phylogeny, Distribution And Pathogenicity Of *Lasiodiplodia* Species Associated With Dieback Of Table Grape In The Main Brazilian Exporting Region. **Plant Pathology** 65, 92–103, 2016.
- COSTA, V.S.O., MICHEREFF, S.J., MARTINS, R.B., GAVA, C.AT., MIZUBUTI, E.S.G., CÂMARA, M.P.S. Species Of Botryosphaeriaceae Associated On Mango In Brasil. **European Journal Plant Pathology**, V.127, P.509–519. 2010.
- COUTINHO, I.B.L., FREIRE, F.C.O., LIMA, C.S., LIMA, J.S., GONCALVES, F.J.T., MACHADO, A.R.A., SILVA, M.S., CARDOSO, J. E. Diversity Of Genus *Lasiodiplodia* Associated With Perennial Tropical Fruit Plants In Northeastern Brazil. **Plant Pathology**, 2016. Doi: 10.1111/Ppa.12565.
- CROUS PW, SLIPPERS B, WINGFIELD MJ *ET AL.*, 2006. Phylogenetic Lineages In The Botryosphaeriaceae. **Studies In Mycology** 55, 235–53.

- DAMM, U., CROUS, P. W., FOURIE, P. H. Botryosphaeriaceae As Potential Pathogens Of *Prunus* Species In South Africa, With Descriptions Of *Diplodia Africana* And *Lasiodiplodia Plurivora* Sp. Nov. **Mycologia**, V. 99, N. 5, P. 664-680, 2007.
- EINAX, E., VOIGT, K. Oligonucleotide Primers For The Universal Amplification Of Btubulin Genes Facilitate Phylogenetic Analyses In The Regnum Fungi. **Organisms Diversity & Evolution**, N. 3, P.185–194, 2003.
- GLASS, N.L., DONALDSON, G.C. Development Of Primer Sets Designed For Use With The Pcr To Amplify Conserved Genes From Filamentous Ascomycetes. **Applied And Environmental Microbiology**, V.61, P.1323–30, 1995.
- GOPAL, B.; CHAUHAN, M. Biodiversity And Its Conservation In The Sundarban Mangrove Ecosystem. **Aquatic Sciences**, Berlin, V. 68, P. 338-354, 2006.
- GU, Z., EILS, R., SCHLESNER, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics**. Volume 32, Issue 18, 15 September 2016, Pages 2847–2849, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>.
- HALL, T, 2012. Bioedit V7.0.9: Biological Sequence Alignment Editor For Win95/98/2k/Xp/7. Available At [Http://Www.Mbio.Ncsu.Edu/Bioedit/Bioedit.Html](http://www.Mbio.Ncsu.Edu/Bioedit/Bioedit.Html). Accessed 15 November 2014.
- KEELING, P.J., INAGAKI, Y.A. Class Of Eukaryotic Gtpase With A Punctate Distribution Suggesting Multiple Functional Replacements Of Translation Elongation Factor-1 Alpha. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, V.101 , P.15380-15385, 2004.
- KUMAR S., STECHER G., LI M., KNYAZ C., AND TAMURA K. Mega X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Across Computing Platforms. **Molecular Biology And Evolution** 35:1547-1549. 2018.
- MACHADO, A.R., PINHO, D.B., PEREIRA, O.L. Phylogeny, Identification And Pathogenicity Of The Botryosphaeriaceae Associated With Collar And Root Rot Of The

- Biofuel Plant *Jatropha Curcas* In Brazil, With A Description Of New Species Of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity**, V.67, P.231–247., 2014a.
- MACHADO, A.R., PINHO, D.B., OLIVEIRA, S.A.S., PEREIRA, O.L. New Occurrences Of Botryosphaeriaceae Causing Black Root Rot Of Cassava In Brazil. **Tropical Plant Pathology**, V.39, P.464-470, 2014b.
- MARQUES, M.W., LIMA, N.B., MORAIS JR, M.A., BARBOSA, M.A.G., SOUZA, B.O, MICHEREFF, S.J, PHILLIPS, A.J.L, CAMARA, M.P.S. Species Of *Lasiodiplodia* Associated With Mango In Brasil. **Fungal Diversity**, V.61, P.181–193, 2013a.
- MARQUES, M.W., LIMA, N.B., MORAIS J.M.A, MICHEREFF, S.J., PHILLIPS, A.J.L., CÂMARA, M.P.S. *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* And *Pseudofusicoccum* Species Associated With Mango In Brazil. **Fungal Diversity**, V. 61, P.195- 208, 2013b.
- NETTO, M.S.B., ASSUNÇÃO, I.P., LIMA, G.S.A. Species Of *Lasiodiplodia* Associated With Papaya Stem-End Rot In Brazil. **Fungal Diversity**, V.67, P.127–41, 2014.
- O'DONNELL, K., KISTLER, H.C., CIGELNIK, E., PLOETZ, R.C. Multiple Evolutionary Origins Of The Fungus Causing Panama Disease Of Banana: Concordant Evidence From Nuclear And Mitochondrial Gene Genealogies. **Applied Biological Science**, V.95, P.2044–2049, 1998.
- PHILLIPS AJL, ALVES A, ABDOLLAHZADEH J *ET AL.*, The Botryosphaeriaceae: Genera And Species Known From Culture. **Studies In Mycology** 76, 51–167. 2013.
- RZHETSKY A. AND NEI M. Theoretical Foundation Of The Minimum-Evolution Method Of Phylogenetic Inference. **Molecular Biology And Evolution** 10:1073-1095. 1993.
- ROSADO, A.W.C., MACHADO, A.R., FREIRE, F.C.O., PEREIRA, O.L. Phylogeny, Identification And Pathogenicity Of *Lasiodiplodia* Associated With Postharvest Stem-End Of Coconut In Brazil. **Plant Disease**, V.100, N.3, P.561-568, 2016.

SAKALIDIS, M.L., RAY, J.D., LANOISELET, V., HARDY, G.E.S., BURGESS, T.I. Pathogenic Botryosphaeriaceae Associated With *Mangifera Indica* In The Kimberley Region Of Western Australia. **European Journal Of Plant Pathology**, V.130, P.379–91, 2011.

SAKALIDIS, M.L., SLIPPERS, B., WINGFIELD, B.D., HARDY, G.E.S., BURGESS, T.I. The Challenge Of Understanding The Origin, Pathways And Extent Of Fungal Invasions: Global Populations Of The *Neofusicoccum Parvum*–*N. Ribis* Species Complex. **Diversity And Distributions**, V.19, P.873–883, 2013.

SCHOCH, C.L., SHOEMAKER, R.A., SEIFERT, K.A., HAMBLETON, S., SPATAFORA, J.W., CROUS, P.W. A Multigene Phylogeny Of The Dothideomycetes Using Four Nuclear Loci. **Mycologia**, V.98, P.1041–1052, 2006.

SLIPPERS, B., FOURIE, G., CROUS, P.W., COUTINHO, T.A., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J. Multiple Gene Sequences Delimit *Botryosphaeria Australis* Sp. Nov. From *B. Lútea*. **Mycologia**, V.96, N.5, P.1030–1041, 2004a.

SLIPPERS, B., CROUS, P. W., DENMAN, S., COUTINHO, T. A., WINGFIELD, B. D., WINGFIELD, M. J. Combined Multiple Gene Genealogies And Phenotypic Characters Differentiate Several Species Previously Identified As *Botryosphaeria Dothidea*. **Mycologia**, New York, V. 96, N. 1, P. 83-101, 2004b.

SLIPPERS, B., WINGFIELD, M.J. Botryosphaeriaceae As Endophytes And Latent Pathogens Of Woody Plants: Diversity, Ecology And Impact. *Fungal Biology Reviews* **21**, 90–106. 2007.

SOUSA, O.V.; MACRAE, A.; MENEZES, F.G.R.; GOMES, N.C.M.; VIEIRA, R.H.S.F.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.S. The Impact Of Shrimp Farming Effluent On Bacterial Communities In Mangrove Waters, Ceará, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, New York, V. 52, P. 1725-1734, 2006.

TAMURA, K., NEI, M., AND KUMAR, S.. Prospects For Inferring Very Large Phylogenies By Using The Neighbor-Joining Method. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences** (Usa) 101:11030-11035. 2004

ZHAO, S., GUO, Y. , SHENG Q., AND SHYR Y. Advanced Heat Map and Clustering Analysis Using Heatmap3. **BioMed Research International**. Volume 2014, Article ID 986048, 6 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/986048>

4 CAPÍTULO II

Primeiro relato de *Lasiodiplodia brasiliensis* endofítica de *Avicennia nitida* em mangues do Ceará

Primeiro relato de *Lasiodiplodia brasiliensis* endofítica de *Avicennia nitida* em mangues do Ceará

Avicennia germinans L., também conhecido como *Avicennia nitida* Jacq., e *Avicennia tomentosa* Jacq., é uma árvore típica da vegetação de mangue. É conhecida popularmente como sereíba, siriúba, siriúva, siribeira, saraíba e mangue-branco. Possui pequeno diâmetro, madeira dura, flores pequenas em racemo e frutos moles e achatados. Essas são presentes em mangues pretos. Foi realizada coleta de folhas, ramos e raízes em mangue localizado no município de Itarema no estado do Ceará para identificação de fungos endofíticos. O material coletado foi levado para isolamento no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará. Anteriormente ao processo de isolamento, as folhas foram cortadas em discos de aproximadamente 5mm e raízes/ramos em pequenos fragmentos de aproximadamente 1cm. O isolamento dos fungos endofíticos seguiu o processo de desinfecção superficial, no qual as superfícies das folhas, ramos e raízes foram desinfestadas pela imersão em etanol 96% e hipoclorito de sódio (NaOCl). Em seguida, foram transferidos 10 fragmentos vegetais para cada placa de Petri, contendo meio de cultura extrato-de-malte-ágar (EMA) acrescido do antibiótico cloranfenicol (50 g.mL^{-1}). As placas de isolamento foram incubadas a 28° C por 2 a 14 dias e acompanhadas periodicamente. Após o crescimento fúngico, houve a repicagem para o meio de batata-cenoura-ágar (BCA), esses foram identificados, purificados e preparados para análises posteriores. O DNA genômico total foi extraído dos isolados do gênero *Lasiodiplodia*, identificados com base na morfologia dos conídios (COUTINHO, 2016). A extração do DNA genômico seguiu o protocolo de Cavalcanti e Wilkinson (2007). Na reação em cadeia da polimerase (PCR), foram utilizados *primers* para as regiões ITS1 e ITS4 na amplificação e sequenciamento das regiões 1 e 2, incluindo o gene de RNAr de 5,8S (ITS); *primers* $\beta t2a$ e $\beta t2b$ foram usados para sequenciar um fragmento da β -tubulina (βt) (GLASS; DONALDSON, 1995); e os *primers* TEF1-688F e TEF1-1251R (ALVES ET AL., 2008) foram usados para amplificar um fragmento do fator de transcrição e alongação 1- α (TEF1- α) (CARBONE ET AL., 1999). As sequências ITS, TUB2 e EF1- α apresentaram 99% de homologia com *Lasiodiplodia brasiliensis* (KY783475.1, MG870604.1 e KY038625.1) do GenBank. Baseado em análise de sequência, o isolado END01 foi confirmado como *L. brasiliensis* e as sequências depositados no GenBank com os números de acesso SB5222708 (ITS), SUB5222720 (TUB2) e SUB5222728 (EF1- α). Foi realizado o teste de patogenicidade em cultivares de manga Tommy Atkins, banana Prata,

goiaba Paluma e mudas de cajueiro. Os frutos foram delicadamente feridos em duas regiões em três réplicas com o auxílio de uma ponta de três pinos estéreis, a uma profundidade de 3 mm, antes de ser colocado um disco de tamanho 5 mm contendo micélio cultivado em BCA. Nas mudas de cajueiro foi feito pequenos ferimentos nas hastes e colocado os discos colonizados. Discos de BCA não-colonizados foram usados como tratamentos controle. Sete dias depois da inoculação foi reportada ausência total de sintomas de doença tanto no fruto como no caule. Nenhum sintoma foi observado nos controles, provando assim ser realmente um caso de *L. brasiliensis* endofítico. Um relato de *L. brasiliensis* causando cancro do caule em macieiras no Ceará já foi relatado por Martins (2018), porém nenhum caso foi relatado de *Lasiodiplodia brasiliensis* endofítica em plantas de mangues no litoral do Ceará/Brasil. Estudos posteriores são necessários para identificar possíveis estratégias de resistência desses frutos e plantas a cepa em estudo.

Referências

- ALVES, A., CROUS, P.W., CORREIA, A., PHILLIPS, A.J.L. Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, v.28, p.1–13, 2008.
- CARBONE I, ANDERSON JB, KOHN LM, 1999. A method for designing primer sets for the speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia** 91, 553–6.
- CAVALCANTI JJV, WILKINSON MJ, 2007. The first genetic maps of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Euphytica** 157, 131–43.
- COUTINHO, I.B.L., FREIRE, F.C.O., LIMA, C.S., LIMA, J.S., GONCALVES, F.J.T., MACHADO, A.R.A., SILVA, M.S., CARDOSO, J. E. Diversity Of Genus *Lasiodiplodia* Associated With Perennial Tropical Fruit Plants In Northeastern Brazil. **Plant Pathology**, 2016. Doi: 10.1111/Ppa.12565.
- GLASS, N.L., DONALDSON, G.C. Development Of Primer Sets Designed For Use With The Pcr To Amplify Conserved Genes From Filamentous Ascomycetes. **Applied And Environmental Microbiology**, V.61, P.1323–30, 1995.
- MARTINS, M. V. V., LIMA, J. S., HAWERROTH, F. J., OOTANI, M. A., ARAUJO, F. S. A., CARDOSO, J. E., SERRANO, L. A. L., AND VIANA, F. M. P. First Report of *Lasiodiplodia brasiliense* Causing Disease in Apple Trees in Brazil. **Plant Pathology**, V.102, N. 5, P.1027, 2018 Doi: 10.1095.

5 CAPÍTULO III

Caracterização molecular dos fungos endofíticos associados a plantas de mangues do litoral cearense.

RESUMO

O manguezal é um ambiente ecológico único, que abriga árvores com raízes aéreas, galhos, troncos e sedimentos. Ilhados neste habitat, atraem uma comunidade epifaunal rica como fungos, bactérias, macro-algas e invertebrados. O Brasil apresenta a segunda maior área de manguezais do mundo, sendo a maior das Américas. Os microrganismos endofíticos são bactérias ou fungos que colonizam o interior dos tecidos de plantas, sem apresentar efeito patogênico no hospedeiro. Dessa maneira, ocorre uma associação simbiótica entre a planta hospedeira, que o protege e alimenta, e o microrganismo endofítico, produtor de metabólitos bioativos que auxiliam o crescimento e a proteção da planta contra o ataque de fitopatógenos. O presente trabalho avaliou a comunidade fúngica presente nos manguezais do Litoral cearense através do estudo da diversidade de fungos endofíticos associados aos ramos, raízes e às folhas de três espécies arbóreas de manguezais. As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas a partir de coletas realizadas em mangues do Ceará, mangue vermelho (*Rhizophora mangle*), mangue preto (*Avicennia nitida*) e mangue branco (*Laguncularia racemosa*). Essas passaram pelo processo de isolamentos para fungos endofíticos, depois foram repicados em meio BCA, purificados e preparados para posteriores análises. A identificação fúngica foi realizada utilizando uma combinação de características morfofisiológicas juntamente com análises filogenéticas utilizando os primers ITS1 e ITS 4. Por meio do método de isolamento dependente de cultivo foi possível isolar 27 fungos endofíticos. Grande foi a diversidade e a riqueza da comunidade fúngica de raízes, ramos e folhas encontrada nas três espécies de plantas *R. mangle*, *A. nitida* e *L. racemosa*. Uma quantidade 15 gêneros foi identificada. Dentre esses, os gêneros *Colletotrichum*, *Pichia*, *Aspergillus* e *Podospora* foram os mais frequentes.

Palavras chave: Gêneros. Sequenciamento. *Rhizophora mangle*. *Avicennia nitida*. *Laguncularia racemosa*.

ABSTRACT

The mangrove is a unique ecological environment, which houses trees with aerial roots, branches, trunks and sediments. In this habitat, they attract a rich epifaunal community such as fungi, bacteria, macro-algae and invertebrates. Brazil presents the second largest area of mangroves in the world, being the largest in the Americas. Endophytic microorganisms are bacteria or fungi that colonize the interior of plant tissues without presenting a pathogenic effect on the host. In this way, there is a symbiotic association between the host plant, which protects and nourishes it, and the endophytic microorganism, which produces bioactive metabolites that aid the growth and protection of the plant against the attack of phytopathogens. This work evaluated the fungal community present in the mangrove Coastal Ceará by studying the diversity of endophytic fungi associated with branches, roots and leaves of three species of mangrove trees. The samples used in this study were collected from mangroves of Ceará, red mangrove (*Rhizophora mangle*), black mangrove (*Avicennia nitida*) and white mangrove (*Laguncularia racemosa*). These underwent the isolation process for endophytic fungi, then were re-collected in BCA medium, purified and prepared for further analysis. Fungal identification was performed using a combination of morphological and phylogenetic characteristics using ITS1 and ITS 4 primers. Using the culture-dependent isolation method, it was possible to isolate 27 endophytic fungi. Great was the diversity and richness of the fungal community roots, branches and leaves found in three species of plants *R. mangle*, *A. nitida* and *L. racemosa*. An amount of 15 genera was identified. Among these, the genera *Colletotrichum*, *Pichia*, *Aspergillus* and *Podospora* were the most frequent.

Keywords: Genres. Sequencing. *Rhizophora mangle*. *Avicennia nitida*. *Laguncularia racemosa*.

5.1 INTRODUÇÃO

Os manguezais são formados a partir da associação de materiais sedimentares provenientes do mar e continente sendo altamente produtivo. Os manguezais apresentam condições de alta salinidade, extrema inundação com as marés, fortes ventos, altas temperaturas, muito lodo e solo anaeróbico. Portanto, apresenta um grupo de plantas e microrganismos que possuem adaptação morfológica, fisiológica, biológica e ecológica para sobreviver nestas condições extremas. Esse ecossistema é um ambiente ecológico único, que abriga árvores com raízes aéreas, galhos, troncos e sedimentos. Ilhados neste habitat, atraem uma comunidade epifaunal rica como fungos, bactérias, macro-algas e invertebrados (BADOLA et al., 2008; KATHIRESAN; BINGHAM, 2001).

Os fungos marinhos desempenham o importante papel no ciclo de regeneração de nutrientes para decompor essa matéria orgânica morta. O estudo da diversidade da comunidade fúngica marinha, abrangendo a diversidade genética e riqueza de espécies, é o primeiro passo para o modelamento dinâmico da comunidade fúngica em termos de abundância e distribuição espacial e temporal de espécies e na ciclagem de nutrientes. Tais modelos são essenciais para o manejo e conservação eficientes de ambientes marinhos, florestais e agrários, os quais são importantes economicamente (PANG; MITCHELL, 2005).

Os microrganismos endofíticos são bactérias ou fungos que colonizam o interior dos tecidos de plantas, sem apresentar efeito patogênico no hospedeiro (OWEN; HUNDLEY, 2004; TAN; ZOU, 2001). Dessa maneira, ocorre uma associação simbiótica entre a planta hospedeira, que o protege e alimenta, e o microrganismo endofítico, produtor de metabólitos bioativos que auxiliam o crescimento e a proteção da planta contra o ataque de fitopatógenos (OWEN; HUNDLEY, 2004; TAN; ZOU, 2001; ZHANG; SONG; TAN, 2006). Entretanto, desde a descoberta dos microrganismos endofíticos em Darnel (Alemanha) em 1904, muitos pesquisadores têm definido diferentemente o termo endófito (HALLMANN et al., 1997; PETRINI, 1991; TAN; ZOU, 2001).

Os fungos endofíticos podem contribuir para crescimento da planta hospedeira de modo direto ou indireto. O modo direto de promoção de crescimento vegetal está relacionado com a produção de compostos ativos pelos endófitos, facilitando a absorção de nutrientes e água pela planta hospedeira (ZHANG; SONG; TAN, 2006). Estudos têm sugerido que os endófitos alteram o fluxo de água em plantas por meio da produção de compostos químicos solúveis em água como os alcalóides, os quais aumentam o fluxo osmótico nas raízes da

planta hospedeira (BACON, 1993; OWEN; HUNDLEY, 2004; TAN; ZOU, 2001). A forma indireta do endófito proporcionar a melhoria no crescimento e desenvolvimento vegetal é feita por meio da proteção ao ataque de pragas e patógenos (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007).

Os endófitos podem proteger as plantas produzindo compostos como alcalóides e terpenos, os quais apresentam efeito inseticida repelindo insetos e tornando a planta menos susceptível ao ataque de insetos. Outro mecanismo encontrado na literatura é o controle natural de insetos por meio da produção de metabólitos citotóxicos pelos fungos entomopatogênicos (REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001; SCHULZ; BOYLE, 2005; STONE; POLISHOOK; WHITE, 2004). O presente trabalho avaliou a comunidade fúngica presente nos manguezais do litoral cearense através do estudo da diversidade de fungos endofíticos associados aos ramos, raízes e às folhas das espécies arbóreas de manguezais *Rhizophora mangle*, *Laguncularia racemosa* e *Avicennia nitida*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

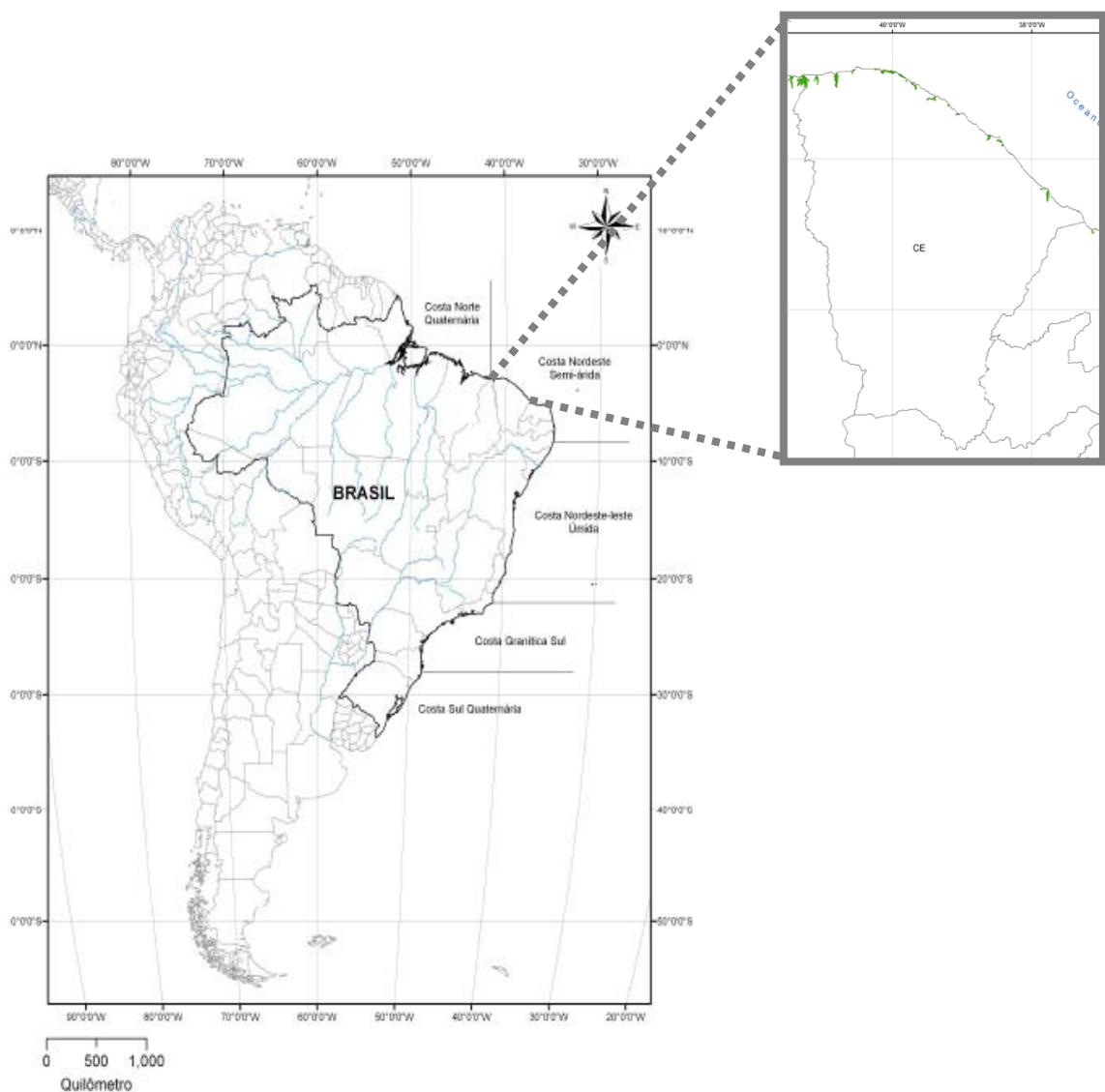
5.2.1 Amostragem e isolamento de fungos

As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas a partir de coletas realizadas em mangues de diversos municípios no Ceará (Figura 1 e Tabela 1), mangue vermelho (*Rhizophora mangle*), mangue preto (*Avicennia nitida*) e mangue branco (*Laguncularia racemosa*). O material (folhas, ramos e raízes) coletado foi levado para isolamento no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará.

As folhas foram cortadas em discos de aproximadamente 5mm e as raízes/ramos em pequenos fragmentos de aproximadamente 1cm. O isolamento dos fungos endofíticos de folhas, ramos e raiz de plantas dos manguezais seguiu o processo de esterilização superficial, no qual as superfícies das folhas, ramos e raízes foram desinfestadas pela seguinte sequência de imersão: etanol 96% por 60 segundos; hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% (v/v) de cloro ativo por 3 minutos; novamente em etanol 96% por 60 segundos e duas lavagens em água destilada e esterilizada. Em seguida transferidos 10 fragmentos vegetais para cada placa de Petri contendo meio de cultura extrato-de-malte-ágar (EMA) acrescido dos antibióticos cloranfenicol (50 g.mL^{-1}), para impedir o crescimento de bactérias.

As placas de isolamento foram incubadas a 28° C por 2 a 14 dias e acompanhadas periodicamente para avaliação do crescimento de fungos a partir dos fragmentos vegetais. Após o crescimento fúngico, houve a repicagem para o meio de batata-cenoura-ágar (BCA), esses foram identificados, foram purificados e preparados para análises posteriores.

Figura 6 - Mapa de divisão das eco-regiões brasileiras. Sub-divisão baseada nas características climatológicas, geomorfológicas e geológicas (Baseado em Lacerda, 2005). Em destaque as áreas de manguezais (em verde) do litoral cearense.



Fonte: elaborada pelo autor, baseado em Lacerda, 2005.

Tabela 1. Georreferências dos manguezais amostrados no estado do Ceará.

ÁREA	REGIÃO	LATITUDE	LONGITUDE
1	Rio Timonha	2°54'52.8"S	41°17'46.6"W
2	Rio Tapuio	2°55'42.1"S	40°58'09.7"W
3	Rio Coreaú	2°54'21.3"S	40°47'33.1"W
4	Mangue Seco	2°50'43.9"S	40°34'58.1"W
5	Aranaú	2°49'13.3"S	40°15'30.8"W
6	Rio Acaraú	2°51'55.3"S	40°08'28.9"W
7	Lagunas de Itarema	2°54'18.1"S	39°52'56.5"W
8	Enseada dos Patos	3°00'20.2"S	39°42'44.3"W
9	Lagoa dos Talos	3°29'47.0"S	38°57'07.6"W
10	Rio Aracati Açú	3°00'32.6"S	39°42'35.5"W
11	Mundaú	3°09'17.0"S	39°28'50.9"W
12	Lagamar do Sal	3°17'30.2"S	39°12'56.7"W
13	Rio Curu	3°24'41.9"S	39°04'47.8"W
14	Rio Ceará	3°41'59.7"S	38°36'45.2"W
15	Rio Cocó	3°46'24.3"S	38°26'53.8"W
16	Rio Pacoti	3°49'25.7"S	38°25'03.0"W
17	Rio Choró	4°07'09.8"S	38°09'54.0"W
18	Rio Piranji	4°23'52.9"S	37°49'18.3"W
19	Rio Jaguaribe	4°26'57.9"S	37°47'00.3"W

Fonte: elaborada pelo autor.

5.2.2 Extração de DNA e amplificação de sequências

O DNA genômico total foi extraído dos isolados e foram cultivados em caldo batata-dextrose(BD) durante sete dias em frascos de 250 mL. A biomassa micelial de cada isolado foi seca à temperatura ambiente (25 a 30°C) sob uma câmara de fluxo laminar por 24 h. A extração do DNA genômico seguiu o protocolo de Cavalcanti; Wilkinson (2007) com modificações, onde aproximadamente 1 g de micélio foi moído em um pó fino usando um pilão em um almofariz preenchido com nitrogênio líquido. As amostras de DNA extraído foram quantificadas usando um espectrofotômetro NanoDrop® 2000c (Thermo Fisher Scientific), versão 1.0.

Após a quantificação do DNA extraído, este foi diluído para uma concentração de 10 ng.µL⁻¹ e armazenado a -20°C. As misturas de reação em cadeia da polimerase (PCR;

50 µL) continham 6,25 µL de DNA genômico (10 ng.µL⁻¹), 10 µL de buffer 1x, 1 µL de dNTP (0,2 mM), 3 µL de MgCl₂ (1,5 mM) 5 µL de cada par de primers (1, 0 mM, Invitrogen), 0,5 µL de DNA Taq Flexi (0,05 U. µL⁻¹, Promega) e 19,25 µL de água desionizada estéril. Foram utilizados primers para as regiões ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990) na amplificação e sequenciamento das regiões 1 e 2, incluindo o gene de RNAr deb 5,8S (ITS).

O ciclo térmico da PCR consistiu num passo de desnaturação inicial a 96°C durante 1 min; seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 1 min a 58°C, 1,5 min a 72°C (anelamento) e 10 min a 72°C (extensão final). Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão tris-acetato EDTA 1X (TAE), corados com brometo de etídio (0,5 µg.mL⁻¹) por 1 min e visualizados em transiluminador UV. Após a verificação das bandas amplificadas, alíquotas de 40 µL do produto de PCR de cada amostra foram enviadas para a empresa MacroGen Inc., Korea (<http://www.macrogen.com>), para serem purificadas e sequenciadas para o par de *primer*, nas direções direta e reversa. Os resultados de BLAST para o DNA genômico total dos isolados identificados foram comparados com a taxonomia com base na morfologia dos esporos.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio do método de isolamento dependente de cultivo foi possível isolar 26 fungos endofíticos. Grande foi a diversidade e riqueza da comunidade fúngica de raízes, ramos e folhas encontrada nas 3 espécies de plantas *Rhizophora mangle*, *Avicennia nitida* e *Laguncularia racemosa*. Os fungos endofíticos obtidos nos isolamentos estão expostos na Tabela 2.

Tabela 2. Fungos endofíticos encontrados no manguezal cearense. Fonte: elaborada pelo autor.

Nº	IDENTIFICAÇÃO	ENCONTRADA EM (GPS)	PLANTA	IDENT	ACCESSION
1	<i>Colletotrichum orchidophilum</i> hypothetical protein (CORC01_01946), partial Mrna	Acaraú-CE	<i>Avicennia nítida</i>	100.00%	XM_022613599.1
2	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain CBS573 chromosome 3, complete sequence	Praia de Arpoeira-CE	<i>Avicennia nítida</i>	100.00%	CP028775.1
3	<i>Aspergillus steynii</i> IBT 23096 hypothetical protein (P170DRAFT_441326), Mrna	Acaraú-CE	<i>Laguncularia racemosa</i>	96.55%	XM_024850287.1
4	<i>Podospora anserina</i> genomic DNA, chromosome 5	Acaraú-CE	<i>Laguncularia racemosa</i>	100.00%	FO904940.1
5	<i>Lactarius piperatus</i> mitochondrion, complete genome	Acaraú-CE	<i>Laguncularia racemosa</i>	100.00%	NC_038056.1
6	<i>Sphaerulina musiva</i> SO2202 hypothetical protein partial Mrna	Praia de Arpoeira-CE	<i>Laguncularia racemosa</i>	100.00%	XM_016907845.1
7	<i>Aspergillus welwitschiae</i> tubulin gamma chain (BDQ94DRAFT_134126), Mrna	Praia de Arpoeira-CE	<i>Laguncularia racemosa</i>	100.00%	XM_026764416.1
8	<i>Zygosaccharomyces parabailii</i> strain ATCC 60483 chromosome 8, complete sequence	Acaraú-CE	<i>Laguncularia racemosa</i>	96.43%	CP019497.1
9	<i>Heterobasidion irregulare</i> TC 32-1 hypothetical protein partial mRNA	Acaraú-CE	<i>Avicennia nítida</i>	100.00%	XM_009548095.1
10	<i>Cryptococcus neoformans</i> strain EN28 chromosome 9, complete sequence	Praia de Arpoeira-CE	<i>Laguncularia racemosa</i>	93.75%	CP025725.1
11	<i>Hyphopichia pseudoburtonii</i> isolate makgeolli chromosome 5, complete sequence	Praia de Arpoeira-CE	<i>Laguncularia racemosa</i>	100.00%	CP024755.1
12	<i>Aspergillus niger</i> clone AXAS121-E11, complete sequence	Acaraú-CE	<i>Avicennia nítida</i>	87.50%	AC253864.1

13	<i>Tetrapisispora blattae</i> CBS 6284 chromosome 5, complete genome	Acaraú-CE	<i>Laguncularia racemosa</i>	89.74%	HE806320.1
14	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40 DNA, SC003	Acaraú-CE	<i>Laguncularia racemosa</i>	92.86%	AP007155.1
15	<i>Cryptococcus gattii</i> WM276 chromosome D, complete sequence	Acaraú-CE	<i>Avicennia nítida</i>	92.59%	CP000289.1
16	<i>Aspergillus niger</i> contig An08c0210, genomic contig	Sapiranga-CE	<i>Avicennia nítida</i>	88.89%	AM270176.1
17	<i>Podospora anserina</i> genomic DNA, chromosome 6	Praia de Arpoeira-CE	<i>Laguncularia racemosa</i>	88.00%	FO904941.1
18	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4 chromosome VII	Praia de Arpoeira-CE	<i>Laguncularia racemosa</i>	92.59%	BN001307.1
19	<i>Hyphopichia burtonii</i> isolate makgeolli chromosome 4	Itarema-CE	<i>Palma</i>	88.57%	CP024762.1
20	<i>Colletotrichum higginsianum</i> IMI 349063	Sapiranga-CE	<i>Avicennia nítida</i>	88.46%	XM_018300008.1
21	<i>Hyphopichia burtonii</i> isolate makgeolli chromosome 4	Itarema-CE	<i>Rhizophora mangle</i>	90.32%	CP024762.1
22	<i>Aspergillus piperis</i> CBS 112811 dihydrodipicolinate synthetase family protein (BO85DRAFT_465107), partial Mrna	Itarema-CE	<i>Palma</i>	96.00%	XM_025662031.1
23	<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40 DNA, SC012	Itarema-CE	<i>Rhizophora mangle</i>	83.02%	AP007161.1
24	<i>Aspergillus heteromorphus</i> CBS 117.55 transcriptional regulator (BO70DRAFT_358331), Mrna	Sapiranga-CE	<i>Avicennia nítida</i>	92.59%	XM_025542265.1
25	<i>Phoma</i> sp. isolate R96896	Acaraú-CE	<i>Avicennia nítida</i>	90.00%	MK268072.1
26	<i>Cryptococcus neoformans</i> strain EN28 chromosome 13, complete sequence	Itarema-CE	<i>Rhizophora mangle</i>	92.31%	CP025729.1

Uma quantidade 15 de gêneros foram identificados. Dentre esses, os gêneros *Colletotrichum*, *Pichia*, *Aspergillus* e *Podospora* foram, também, encontrados por Sebastianes (2010), compondo um estudo realizado em magues no estado de São Paulo.

O gênero *Colletotrichum* (filo Ascomycota, subfilo Sordariomycetes, ordem Glomerellales) contém pelo menos 150 espécies divididas em dez clados principais. Um dos maiores deles é o *Colletotrichum acutatum* complexo de espécies (CAsc), que inclui patógenos fúngicos que infectam uma ampla diversidade de plantas em ecossistemas naturais e manejados. O complexo de espécies possui uma ampla gama de hospedeiros, e cepas foram associadas a doenças de mais de 90 gêneros de plantas e pelo menos três espécies de insetos. A taxonomia complexa do CAsc reflete uma complexidade na história evolucionária, provavelmente causada por saltos recentes do hospedeiro e / ou mudanças no alcance do hospedeiro seguido de adaptação. O CAsc também apresenta uma grande diversidade de comportamentos reprodutivos, embora a maioria das espécies pareça ter perdido sua capacidade de acasalamento. Assim, os CAsc são excelentes candidatos para o estudo do processo de especiação, adaptação do hospedeiro e evolução do comportamento de acasalamento. *Colletotrichum orchidophilum* está intimamente relacionado com o CAsc, mas não é considerado parte dele. Acredita-se que seja o ancestral comum mais próximo do CAsc (BARONCELLI, 2018).

Colletotrichum orchidophilum é um fungo fitopatogênico que infecta uma ampla gama de espécies vegetais pertencentes à família Orchidaceae. Além de seu impacto econômico, *C. orchidophilum* tem sido utilizado nos últimos anos em estudos evolutivos, pois representa as espécies mais próximas do complexo de espécies de *C. acutatum*. Aqui, apresentamos a sequência do genoma inteiro do primeiro esboço de *C. orchidophilum* IMI 309357, fornecendo um recurso para pesquisas futuras sobre a antracnose de Orchidaceae e outros hospedeiros (BARONCELLI, 2018). Apesar de sua agressividade patogênica, ele foi encontrado nesse estudo no hospedeiro *Avicennia nítida* de forma endofítica.

Já *Pichia kudriavzevii* pode ser encontrado no solo e no exterior de frutas e legumes, muitas vezes na presença de outras espécies de *Pichia*. Embora seja encontrado no exterior do produto, não é considerado uma espécie responsável pela deterioração dos alimentos (FROTA, 2011). Em vez disso, o *P. kudriavzevii* pode ser útil ao desenvolver um candidato de base biológica e amigo do ambiente para o conservante e biocontrole de alimentos. Ela produz a toxina *P. kudriavzevii* RY55, que pode matar vários agentes

patogênicos da saúde humana e contribuir para a conservação de alimentos (BAJAJ, 2013). Também pode ser isolado a partir de muitas fermentações diferentes, variando de suco de fruta a amêndoas de cacau.

Uma vez que este organismo contém 3 genes que codificam para fitases, existe uma relação *sintética* entre *P. kudriavzevii* e plantas. Por exemplo, as fitases presentes na levedura degradam o fitato presente no solo, melhorando a quantidade de fosfato ingerido pelas plantas. Como resultado, há uma redução na quantidade de fertilizante de fósforo necessária (CHAN,2012). *P. kudriavzevii* pode estar presente sem causar danos, no entanto, em alguns casos, é patogênico. Alguns considerariam *P. kudriavzevii* como um "patógeno oportunista".

Outra espécie identificada foi *Aspergillus steynii*, tanto esse como *Aspergillus westerdijkiae* são considerados como risco potencial de contaminação por OTA em produtos alimentícios em climas quentes. Esses são as principais espécies produtoras de ocratoxina A (OTA) de *Aspergillus* section Circumdati. Devido à sua recente descrição, poucos dados estão disponíveis sobre a influência de fatores ecofisiológicos no seu crescimento e perfis de produção de OTA. O *Aspergillus westerdijkiae* é considerado como um risco importante para ocratoxina A em meios baseados em presunto curado a seco (GIL-SERNA, 2015).

A espécie endofítica *Podospora anserina* encontrada em *Laguncularia racemosa*, já vem sendo estudada. A degradação da biomassa vegetal é um grande desafio para a produção de compostos e materiais de base biológica. Como principais produtores de enzimas lignocelulolíticas, os fungos filamentosos representam um reservatório promissor para enfrentar este desafio. Entre eles, o ascomiceto coprofílico *Podospora anserina* tem sido utilizado como organismo modelo para o estudo de vários mecanismos biológicos, pois sua genética é bem compreendida e controlada. Em 2008, o sequenciamento de seu genoma revelou uma grande diversidade de enzimas direcionadas a carboidratos vegetais e lignina. Desde então, uma grande variedade de enzimas de ação lignocelulósica foi caracterizada e análises genéticas possibilitaram o entendimento do metabolismo e desenvolvimento da *P. anserina* na biomassa vegetal. No geral, esses esforços de pesquisa lançaram luz sobre a estratégia de *P. anserina* para desbloquear a desconstrução de lignocelulose recalcitrante (COUTURIER, 2016).

Tal como todas as espécies do gênero *Lactarius*, *L. piperatus* é, ecologicamente, um fungo micorrízico, formando portanto uma associação simbiótica mutuamente benéfica

com várias espécies de plantas (KUO, 2011). As ectomicorrizas garantem ao cogumelo compostos orgânicos importantes para a sua sobrevivência oriundos da fotossíntese do vegetal; em troca, a planta é beneficiada por um aumento da absorção de água e nutrientes graças às hifas do fungo. A existência dessa relação é um requisito fundamental para a sobrevivência e crescimento adequado de certas espécies de árvores, como alguns tipos de coníferas (GIACHINA,2000).

Árvores do gênero *Populus* e seus híbridos interespecíficos são usados em toda a América do Norte para a produção de fibras e como uma fonte potencial de biocombustível. Plantações dessas espécies são severamente impactadas por um fungo patogênico, a *Sphaerulina musiva*, a causa da mancha foliar e do cancro do caule (QIN, 2014). Esse fungo causador de problemas econômicos, foi encontrado na forma endofítica em folhas de *Laguncularia racemosa* no mangue cearense.

Um dos gêneros identificados no nosso estudo foi *Zygosaccharomyces*, esse encontrado em *Laguncularia racemosa*. É um gênero de leveduras da família Saccharomycetaceae. Foi descrito a primeira vez sob o gênero *Saccharomyces*, mas foi reclassificado para o seu nome atual no trabalho de Barnett *et al.*,1983. A levedura tem uma longa história como uma levedura de deterioração, bem conhecida dentro da indústria alimentícia por várias espécies neste gênero serem significativamente resistentes a muitos dos métodos comuns de conservação de alimentos.

A espécie *Heterobasidion irregulare* foi encontrada em *Avicennia nítida* na forma endofítica nos mangues do litoral cearense. Porém sua forma patogênica por causar danos economicamente importante devido ao seu efeito sobre as espécies madeireiras, especialmente nas plantações do Centro-Oeste e do Sudeste dos Estados Unidos. Ele destrói árvores comercialmente viáveis e causa perdas tanto da redução de madeira comercializável quanto do aumento do custo do tratamento para os produtores. Reduz o crescimento de volume e altura, bem como, eventualmente, chega a matar as árvores e as torna mais suscetíveis a outras doenças e insetos (ROBBINS, 1984).

Heterobasidion irregulare é também um agente de perturbação ecologicamente importante em ambientes naturais. Cria lacunas nos dosséis da floresta, permitindo que a luz e a água passem, o que, por sua vez, permite que uma diversidade de plantas se estabeleça. Ele também enfatiza as árvores, tornando-as mais suscetíveis a diferentes fungos e insetos,

particularmente besouros da casca. Estas árvores estressadas podem então agir como uma fonte de infecção por outros organismos de árvores saudáveis próximas (OTROSINA, 1989).

Cryptococcus neoformans como o *Cryptococcus gattii* foram encontradas em sua forma endofítica em mangues do Ceará. *Cryptococcus neoformans* inclui duas variedades (v.): *C. neoformans* v. *neoformans* e v. *grubii*. Uma terceira variedade, *C. neoformans* v. *gattii*, é agora considerada uma espécie distinta, *Cryptococcus gattii*. *C. neoformans* v. *grubii* e v. *neoformans* têm distribuição mundial e são frequentemente encontrados em solo contaminado com excremento de aves. O genoma de *C. neoformans* v. *neoformans* foi sequenciado e publicado em 2005 (LOFTUS, 2005).

A *Hiphopichia* é um gênero de fungos da ordem Saccharomycetales. A relação deste táxon com outros dentro da ordem é desconhecida (*incertae sedis*), e ainda não foi colocada com certeza em nenhuma família. Nesse estudo foi encontrado as seguintes espécies *Hiphopichia pseudoburtonii* e duas *Hiphopichia burtonii* na forma endofítica em *Laguncularia racemosa*, *Avicennia nítida* e *Rhizophora mangle*, respectivamente.

O fungo *Aspergillus niger* é uma das espécies mais comuns do gênero *Aspergillus*. Ela provoca uma doença chamada mofo-preto em algumas frutas e legumes como uvas, cebolas e amendoim, e é um contaminante comum de alimentos. Ele é onipresente no solo e é comumente relatado em ambientes internos, onde suas colônias pretas podem ser confundidas com as de *Stachybotrys* (cujas espécies são também chamadas de "bolor-negro"). Tem sido relatado que algumas cepas de *A. niger* produzem potentes micotoxinas chamadas ocratoxinas, mas outras fontes discordam, alegando que este relatório é baseado em erros de identificação das espécies fúngicas. Evidências recentes sugerem algumas as verdadeiras cepas de *A. niger* produzem ocratoxina (SAMSON, 2001).

Tetrapisispora blattae é um fungo que foi descrito pela primeira vez por Henninger & Windisch, e teve seu nome atual em 2003 por Kurtzman. *Tetrapisispora blattae* incluído no gênero *Tetrapisispora* e família Saccharomycetaceae. Há poucas publicações sobre esse gênero.

Outra espécie encontrada foi *Aspergillus oryzae*, ela é notadamente conhecido na literatura por se desenvolver em culturas em estado sólido, em especial relacionadas à culinária japonesa. Além disso, a espécie é descrita como sendo capaz de produzir e secretar grande número de proteínas, em especial enzimas, fato também apontado pela análise do genoma do microrganismo. Ademais, é descrito que *A. oryzae* secreta um número maior de

proteínas quando crescido em estado sólido quando comparado ao crescimento em estado líquido (MACHIDA et al, 2008; ODA et al, 2006).

Um provável contaminante, *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura utilizada na produção de pão e também de cerveja, além de ser usada para a produção de álcool combustível. Uma cepa, modificada geneticamente, também produz bioquerosene e biodiesel. Esse fungo é utilizado como fermento biológico, por liberar dióxido de carbono, por exemplo, na massa de pão, fazendo-a crescer.

Aspergillus piperis foi sequenciada como parte do projeto de sequenciamento do gênero *Aspergillus*, um projeto dedicado à realização do sequenciamento do genoma completo de todos os membros do gênero *Aspergillus*. Esse gênero onipresente e rico em espécies, atualmente contendo mais de 300 fungos filamentosos. O gênero abrange uma ampla gama de fenótipos e possui uma pegada econômica substancial, pois inclui fermentadores de alimentos, fábricas chave de células para produção de enzimas e ácidos orgânicos, fitopatógenos, organismos modelo para biologia celular, patógenos oportunistas humanos, produtores de animais e micotoxinas humanas e degradadores de uma ampla gama de biomassa orgânica relevante para a conversão de bioenergia.

A. piperis Frisvad & Samson foi descrito em Stud Mycol 50: 23-43, 2004 .Esta espécie é colocada no clado de *A. niger*. Foi encontrado em pimenta de origem tropical, importada para a Dinamarca. Outra espécie encontra foi *A. heteromorphus* Batista e H. Maia foram descritos em Anais Soc Biol Pernambuco 15: 181-237, 1957 50: 200. Esta espécie é colocada no clado de *A. heteromorphus*. Foi encontrado no Brasil. Produz uma série de outros exometabólitos ainda não caracterizados. Ambas espécies são potenciais candidatas para aplicações bioindustriais. (VESTH et al., 2018).

O fungo *Phoma* sp. é causador da doença que incide sobre folhas, frutos e ramos de cafeeiros, produzindo lesões necróticas de vários tamanhos e coloração castanho escura, causa queda de folhas e frutos e quando incide sobre nos ramos, inicia o seu ataque pelas brotações novas acarretando seca total dos tecidos (seca dos ponteiros). Testes de patogenicidade em casa de vegetação e o subsequente isolamento do fungo confirmaram a hipótese de que *Phoma* sp. é o agente etiológico das manchas foliares de capim Pojuca, no Distrito Federal. Os primeiros sintomas apareceram em todas as plântulas inoculadas, quatro a cinco dias após a inoculação. Sete outras espécies de gramíneas foram suscetíveis ao fungo. A

ocorrência de manchas foliares de capim Pojuca causadas por *Phoma* sp. é relatada pela primeira vez no Brasil (LEITE et al., 2001).

Estudos posteriores são indicados para a identificação de fungos em outras estações do ano para avaliar predominância entre espécies nas mais diferentes estações. O presente estudo contribui para o conhecimento da diversidade brasileira de áreas do ecossistema manguezal, ampliando sensivelmente a oferta de informação gênica.

5.4 CONCLUSÃO

Há grande diversidade de fungos endofíticos associados aos ramos, raízes e às folhas de três espécies arbóreas de manguezais (*Rhizophoramangle*, *Laguncularia racemosa* e *Avicennia nitida*).

Os manguezais avaliados são colonizados por 15 de gêneros. Dentre esses, os gêneros *Colletotrichum*, *Pichia*, *Aspergillus* e *Podospora* foram os mais frequentes. A análise da comunidade fúngica demonstrou a diversidade entre diferentes tecidos vegetais e locais de isolamento. A maioria dos fungos encontrados são bem adaptados as condições adversas dos manguezais.

Os resultados servem de alerta para os produtores, governos e instituições financeiras para evitar a implantação de cultivos de frutíferas nas regiões adjacentes a manguezais, já que esses são fontes de inóculo de diversas culturas.

5.5 REFERÊNCIAS

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESMHMUKH, S. K. (Ed.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, 2007. chap. 12, p. 191-209.

BACON, C.W. Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte- infected tall fescue. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Athens, v. 44, p. 123-141, 1993.

BADOLA, R.; PRIMAVERA, J.H.; BARBIER, E.; DAHDOUH-GUEBAS, F. Ethnobiology, socio-economics and management of mangrove forests: A review. **Aquatic Botany**, New York, v. 89, p. 220-236, 2008.

BAJAJ, B; RAINA, S; SIGNH, S. 2013. Toxina Assassina de uma Levedura nova *Pichia kudriavzevii* RY55 com Atividade Antibacteriana Idiossincrática. **Jornal de Microbiologia Básica**. 53: 645-656.

BARONCELLI R, SUKNO SA, SARROCCO S, CAFA G, LE FLOCH G, THON MR. Whole Genoma Sequence of the Orchid Anthracnose Pathogen *Colletotrichum orchidophilum*. **Mol Microbio Vegetal Interact**. 2018 Out; 31 (10): 979-981. doi: 10.1094 / MPMI-03-18-0055-A. Epub 2018 19 de julho.

CHAN, G., GAN, H., LING, H. E RASHID, N. 2012. Sequência do genoma de *Pichia kudriavzevii* M12, um potencial produtor de bioetanol e fitase. **Célula Eucariótica** 11.

COUTURIER, M., TANGTHIRASUNUN, N., NING, X., BRUN, S., GAUTIER, V., BENNATI-GRANIER, C., SILAR, P., BERRIN, J.G. Plant biomass degrading ability of the coprophilic ascomycete fungus *Podospora anserina*. **Biotechnology Advances**. V 34. Issue 5. P 976-983. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.010>.

FROTA, G. 2011. As leveduras. **Elsevier** IBSN: 978-0-444-52149-1.

GIACHINA, A.J., OLIVIERA, V.L., CASTELLANO, M.A., TRAPPE, J.M. (2000). Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in southern Brazil. **Mycologia**. **92**(6): 1166–77. [doi:10.2307/3761484](https://doi.org/10.2307/3761484).

GIL-SERNA, J., PATIÑO, B., CORTES, L., GONZÁLEZ-JAÉN, M.T., VAZQUEZ, C.: *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* as potential risk of OTA contamination in food products in warm climates. **Elsevier Food Microbiology**. V. 46, P. 168-175. 2015. DOI 10.1016.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B.L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. **Advances in Marine Biology**, San Diego, v. 40, p. 81-251, 2001.

KUO, M. (2011, March). *Lactarius piperatus*. Retrieved from the *MushroomExpert.Com* Web site: http://www.mushroomexpert.com/lactarius_piperatus.html.

LEITE, G.G., SILVEIRA, L.F., FERNANDES, F.D., GOMES, AC. Crescimento e composição química do capim *Paspalum atratum* cv. Pojuca. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento n° 19**, Embrapa Cerrados, Brasília, 2001.

LOFTUS BJ; et al. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*. **307** (5713): 1321-24. [PMID 15653466](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15653466/). . 2005. [doi:10.1126/science.1103773](https://doi.org/10.1126/science.1103773)

MACHIDA, M., YAMADA, O., GOMI, K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. **DNA Research**. v.15, p.173-183. 2008.

- ODA, K., KAKIZONO, D., YAMADA, O., IEFUJI, H., AKITA, O., IWASHITA, K. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72 (5), p.3448-3457. 2006
- OTROSINA, WILLIAM J. E COBB, CAMPOS W. JR. 1989. Biologia, ecologia, e epidemiologia de *Heterobasidion annosum*. Proceedings do Simpósio de Pesquisa e Gestão da Doença da Raiz de Annosus (*Heterobasidion annosum*) na América do Norte Ocidental. Serviço Florestal USDA Gen. Tech. Rep. PSW-116
- OWEN, N.L.; HUNDLEY, N. Endophytes – the chemical synthesizer inside plants. **Science Progress**, New York, v. 87, p. 79-99, 2004.
- PANG, K.L.; MITCHELL, J.I. Molecular approaches for assessing fungal diversity in marine substrata. **Botanica Marina**, Berlin, v. 48, p. 332-337, 2005.
- PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J.H.; HIRANO, S.S. (Ed.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991. p. 179-197.
- QIN, RUQIAN & LEBOLDUS, JARED. (2014). The Infection Biology of *Sphaerulina musiva*: Clues to Understanding a Forest Pathogen. **PLoS ONE**. 9. e103477. 10.1371/journal.pone.0103477.
- REDMAN, R.S.; DUNIGAN, D.D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis: from mutualism to parasitism, who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist*, London, v. 151, p. 705- 716, 2001.
- ROBBINS, K.1984. Podridão da raiz do annosus em coníferas orientais. **Folheto sobre insetos e doenças florestais** 76 Serviço Florestal do Departamento de Agricultura dos EUA.
- SAMSON, R.A., HOUBRAKEN, J., SUMMERBELL, R.C., FLANNIGAN, B., MILLER, J.D. (inglês) Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor

environments. In: *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments*. (Português) As espécies comuns e importantes de fungos e actinomicetos em ambientes internos. In: *Microorganisms em ambientes domésticos e de trabalho interior*. [S.l.]: New York: Taylor & Francis. pp. 287–292. 2001.

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

STONE, J.K.; POLISHOOK, J.D.; WHITE, J.R.J. Endophytic fungi. In: MUELLER, G.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S. (Ed.). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. **Burlington: Elsevier**, 2004. p. 241-270.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. ***Natural Product Reports***, Cambridge, v. 18, p. 448-459, 2001.

VESTH TC, NYBO JL, THEOBALD S, FRISVAD JC, LARSEN TO, NIELSEN KF, CASCO JB, BRANDL J, SALAMOV A, RILEY R, GLADDEN JM, PHATALE P, NIELSEN MT, LYHNE EK, ME KOGLE, STRASSER K, MCDONNELL E, BARRY K, CLUM A, CHEN C, LABUTTI K, HARIDAS S, M NOLAN, L SANDOR, KUO A, LIPZEN A, HAINAUT M, DRULA E, TSANG A, MAGNUSON JK, HENRISSAT B, WIEBENGA A, SIMMONS BA, MAKELA MR, DE VRIES RP, GRIGORIEV IV, MORTENSEN UH, BAKER SE, ANDERSEN MR. Investigation of inter- and intraspecies variation through genome sequencing of *Aspergillus section Nigri*. ***Nat Genet*** 2018 Dec;50(12):1688-1695. doi: 10.1038/s41588-018-0246-1. Epub 2018 Oct 22.

ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. ***Natural Product Reports***, Cambridge, v. 23, p. 753-771, 2006.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo foi obtido uma nota de ocorrência, onde o fungo *Lasiodiplodia brasiliensis* é encontrado na forma endofítica em plantas de mangues no litoral do Ceará/Brasil. Estudos posteriores são necessários para identificar possíveis estratégias de resistência desses frutos e plantas a cepa em estudo.

Os manguezais avaliados são colonizados por 15 de gêneros. Dentre esses, os gêneros *Colletotrichum*, *Pichia*, *Aspergillus* e *Podospora* foram os mais frequentes.

É importante a continuidade desse estudo para a identificação de fungos em outras estações do ano como uma forma de avaliar a predominância entre espécies nas mais diferentes estações. O presente estudo contribuiu para o conhecimento da diversidade brasileira de áreas do ecossistema manguezal, ampliando sensivelmente a oferta de informação gênica,

Os resultados obtidos devem ser levados em conta pelos produtores, governos e instituições financeiras para evitar a implantação de cultivos de frutíferas nas regiões adjacentes a manguezais, já que esses são fontes de inóculo de diversas culturas.

Ressalta-se, que o sucesso na execução dos objetivos propostos na presente tese, foram frutos de parcerias estabelecidas entre o corpo discente e docente do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia da Universidade Federal do Ceará com pesquisadores da Embrapa Agroindústria Tropical, que forneceram toda a infraestrutura física, técnica e científica para a realização do mesmo. Ressalta-se também, que o desempenho e o compromisso dos profissionais que colaboraram para a execução desse trabalho, foram primordiais para o cumprimento da principal meta desse projeto: Gerar ciência de qualidade.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, M.A. Diversity of marine fungi from Egyptian Red Sea mangroves. **Botanica Marina**, Berlin, v. 48, p. 348-355, 2005.
- ABDOLLAHZADEH, J., JVADI, A., MOHAMMADI-GOLTAPPEH, E., ZARE, R., PHILLIPS, A.J.L. Phylogeny And Morphology Of Four New Species Of *Lasiodiplodia* From Iran. **Persoonia**, V.25, P.1–10, 2010.
- AGRIOS, G.N. Plant disease caused by fungi. **Plant Pathology**. London:Academic Press, 1997. p. 245-406.
- ALONGI, D.M. Present state and future of the world`s mangrove forests. **Environmental Conservation**, Queensland, v. 29, p. 331-349, 2002.
- ALVES, A., CROUS, P.W., CORREIA, A., PHILLIPS, A.J.L. Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, v.28, p.1–13, 2008.
- AL-SAYED, H.A.A.; GHANEM, E.H.; SALEH, K M. Bacterial community and some physico- chemical characteristics in a subtropical mangrove environment in Bahrain. **Marine Pollution Bulletin**, New York, v. 50, p. 147-155, 2005.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 143–169, 1995.
- ANDERSON, I.C.; CAIRNEY, J.W.G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, New York, v. 8, p. 769-779, 2004.
- ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A. V.; SARIDAKIS H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.
- ARNOLD, A.E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G.S.; COLEY, P.D.; KURSAR, T.A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, Oxford, v. 3, p. 267-274, 2000.
- ARX, J.A. VON. **The Genera of Fungi Sporulating in pure culture**. 2 ed. Vaduz: J. Cramer, 351p. 1974.
- AZEVEDO, J.L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. 488p.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR., W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic

- microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 3, p. 1-36, 2000.
- AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESMHMUKH, S. K. (Ed.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, 2007. chap. 12, p. 191-209.
- BACON, C.W. Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte- infected tall fescue. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Athens, v. 44, p. 123-141, 1993.
- BADOLA, R.; PRIMAVERA, J.H.; BARBIER, E.; DAHDOUH-GUEBAS, F. Ethnobiology, socio-economics and management of mangrove forests: A review. **Aquatic Botany**, New York, v. 89, p. 220-236, 2008.
- BAJAJ, B; RAINA, S; SIGNH, S. 2013. Toxina Assassina de uma Levedura nova *Pichia kudriavzevii* RY55 com Atividade Antibacteriana Idiossincrática. **Jornal de Microbiologia Básica**. 53: 645-656.
- BARONCELLI R, SUKNO SA, SARROCCO S, CAFA G, LE FLOCH G, THON MR. Whole Genoma Sequence of the Orchid Anthracnose Pathogen *Colletotrichum orchidophilum*. **Mol Microbio Vegetal Interact**. 2018 Out; 31 (10): 979-981. doi: 10.1094 / MPMI-03-18-0055-A. Epub 2018 19 de julho.
- BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. Third Edition, Burgess Publishing Company, Minneapolis, 241p. 1972.
- BERNDT, R.; FREIRE, F.C.O.; PIATEK, M.; WOOD, R. New species of *Phakopsora* (Basidiomycota, Uredinales) from Cameroon, South Africa and Brazil. **Sydowia**, v. 60, n. 1, p. 15-24, 2007.
- BRAUN, U.; DAVID, J.; FREIRE, F.C.O. Some cercosporoid hyphomycetes from Brazil. **Cryptogamie, Mycologie**, v. 20, n. 2, p. 95-106, 1999.
- BRAUN, U.; FREIRE, F.C.O.; URTIAGA, R. New species and new records of cercosporoid hyphomycetes from Brazil, New Zealand and Venezuela. **Polish Botanical Journal**, v. 55, n. 2, p. 281-291, 2010.
- BRUNDRETT, M.C. Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In: SCHULZ, B.J.E.; BOYLE, C.J.C.; SIEBER, T.N. (Ed.). **Microbial root endophytes**. Berlin: Springer-Verlag. chap. 16, p. 281-293. 2006.
- CANHOS, W.P.; SOUZA, S. & LANGE-CANHOS, D. A. **Catálogo Nacional de Linhagens**. 3ª Edição, Base de Dados Tropical, Campinas. 1989.
- CARBONE, I., ANDERSON, J.B., KOHN, L.M., A method for designing primer sets for the speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia** 91, 553–6. 1999.

CARDOSO, J.E.; PAIVA, J.P.; CAVALCANTI, V.; SANTOS, A.A.; VIDAL, J.C. Evaluation of resistance in dwarf cashew to gummosis in north-eastern Brazil. **Crop Protection**, v. 25, p. 855-859, 2006.

CAVALCANTE, R.M.; SOUSA, F.W.; NASCIMENTO, R.F.; SILVEIRA, E.R.; FREIRE, G.S.S. The impact of urbanization on tropical mangroves (Fortaleza, Brazil): Evidence from PAH distribution in sediments. **Journal of Environmental Management**, New York, v. 91, p. 328- 335, 2009.

CAVALCANTI, J.J.V., WILKINSON, M.J. The first genetic maps of cashew (*Anacardium occidentale* L.). **Euphytica** 157, 131–43. 2007.

CHAN, G., GAN, H., LING, H. E RASHID, N. 2012. Sequência do genoma de *Pichia kudriavzevii* M12, um potencial produtor de bioetanol e fitase. **Célula Eucariótica** 11.

COSTA, V.S.O., MICHEREFF, S.J., MARTINS, R.B., GAVA, C.AT., MIZUBUTI, E.S.G., CÂMARA, M.P.S. Species Of Botryosphaeriaceae Associated On Mango In Brasil. **European Journal Plant Pathology**, V.127, P.509–519. 2010.

COUTURIER, M., TANGTHIRASUNUN, N., NING, X., BRUN, S., GAUTIER, V., BENNATI-GRANIER, C., SILAR, P., BERRIN, J.G. Plant biomass degrading ability of the coprophilic ascomycete fungus *Podospora anserina*. **Biotechnology Advances**. V 34. Issue 5. P 976-983. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.05.010>.

COUTINHO, I.B.L., FREIRE, F.C.O., LIMA, C.S., LIMA, J.S., GONCALVES, F.J.T., MACHADO, A.R.A., SILVA, M.S., CARDOSO, J. E. Diversity Of Genus *Lasiodiplodia* Associated With Perennial Tropical Fruit Plants In Northeastern Brazil. **Plant Pathology**, 2016. Doi: 10.1111/Ppa.12565.

CORREIA, K.C., SILVA, M.A., MORAIS JR, M.A., ARMENGOLD, J., PHILLIPS, A.J.L., CÂMARA, M.P.S., MICHEREFFB, S.J. Phylogeny, Distribution And Pathogenicity Of *Lasiodiplodia* Species Associated With Dieback Of Table Grape In The Main Brazilian Exporting Region. **Plant Pathology** 65, 92–103, 2016.

CRIBB, A.B.; CRIBB, J.W. Marine fungi from queensland. In: CRIBB, A.B.; CRIBB, J.W. Marine fungi from Queensland I. **Queensland: University Queensland**. p.77-81. 1955.

CROUS, P.W., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M.J., RHEEDER, J., MARASAS, W.F.O., PHILLIPS, A.J.L., ALVES, A., BURGESS, T.I., BARBER, P.A., GROENEWALD, J.Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 235-253, 2006.

DAMM, U., CROUS, P. W., FOURIE, P. H. Botryosphaeriaceae As Potential Pathogens Of *Prunus* Species In South Africa, With Descriptions Of *Diplodia Africana* And *Lasiodiplodia Plurivora* Sp. Nov. **Mycologia**, V. 99, N. 5, P. 664-680, 2007.

DAS, S.; LYLA, P S.; KHAN, A. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. **Current Science**, Bangalore, v. 90, p. 1325-1334, 2006.

- DAVIS, R.A.; ANDJIC, V.; KOTIW, M.; SHIVAS, R.G. Phomoxins B and C: Polyketides from an endophytic fungus of the genus *Eupenicillium*. **Phytochemistry**, Netherlands, v. 66, p. 2771- 2775, 2005.
- DENMAN, S., CROUS, P.W., TAYLOR, J.E., KANG, J.C., PASCOE, I., WINGFIELD, M.J. An overview of the taxonomic history of Botryosphaeria, and a reevaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. **Studies in Mycology**, v.45, p.129–140, 2000.
- DERAM, A.; LANGUEREAU-LEMAN, F.; HOWSAM, M.; PETIT, D.; HALUWYN, C.V. Seasonal patterns of cadmium accumulation in *Arrhenatherum elatius* (Poaceae): Influence of mycorrhizal and endophytic fungal colonisation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 845-848, 2008.
- EINAX, E., VOIGT, K. Oligonucleotide Primers For The Universal Amplification Of Btubulin Genes Facilitate Phylogenetic Analyses in The Regnum Fungi. **Organisms Diversity & Evolution**, N. 3, P.185–194, 2003.
- FIDALGO, O.; FIDALGO, M. E. P. K. **Revisão de Fungi São Paulensis**. Arquivos do Museu Nacional 43: 157-188. 1957.
- FREIRE, F.C.O. Deterioração microbiológica de amêndoas de cajueiros: um problema de difícil solução. **Essentia**, v. 15, n. 2, p. 37-48, 2014.
- FREIRE, F.C.O. Fungi associated with cashew inflorescences in Brazil. **Essentia**, v. 13, n. 2, p. 27-41, 2012.
- FREIRE, F.C.O.; BERNDT, R. An updated list of plant fungi from Ceará State (Brazil) II. Rusts. **Essentia**, v. 14, n. 2, p. 53-62, 2013.
- FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E. Doenças das *Spondias* – Cajarana (*S. cytherea* Sonn.), Cajazeira (*S. mombin* L.), Ciriguela (*S. purpúrea* L.), Umbu (*S. tuberosa* A. Cam.) e Umbuquela (*Spondias* spp.) no Brasil. **Agrotropica**, v. 9, n. 2, p. 75-82, 1997.
- FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E.; SANTOS, A.A.; VIANA, F.M.P. Diseases of cashew nut plants (*Anacardium occidentale* L.) in Brazil. **Crop Protection**, v. 21, p. 489-494, 2002.
- FREIRE, F.C.O.; CAVALVANTE, M.J.B.; BEZERRA, J.L. Deterioração fúngica de amêndoas de cajueiro no nordeste brasileiro. **Agrotropica**, v. 8, n. 3, p. 65-68, 1996.
- FREIRE, F.C.O.; MARTINS, M.V.V. Confirmação da ocorrência do sangramento do caule do coqueiro no estado do Ceará. **Essentia**, v. 12, n. 1, p. 31-39, 2010.
- FREIRE, F.C.O.; MOSCA, J.L. Patogenos associados a doenças de plantas ornamentais no estado do Ceará. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. v.15, n. 1, p. 83-89, 2009.

FREIRE, F.C.O.; GONÇALVES, F.J.T. A diversidade microbiológica da caatinga cearense. **Essentia**, v. 14, n. 1, p. 11-34, 2012.

FREIRE, F.C.O.; VASCONCELOS, F.R.; COUTINHO, I.B.L. Fungos endofíticos: uma fonte de produtos bioativos de importância para a humanidade. **Essentia**, v. 16, n. 1, p. 61-102, 2014.

FRÖHLICH, J.; HYDE, K.D. Biodiversity of palm fungi in the tropics: Are global fungal diversity estimates realistic? **Biodiversity and Conservation**, London, v. 8, p. 977-1004, 1999.

FROTA, G. 2011. As leveduras. **Elsevier** ISBN: 978-0-444-52149-1.

GLASS, N.L., DONALDSON, G.C. Development Of Primer Sets Designed For Use With The Pcr To Amplify Conserved Genes From Filamentous Ascomycetes. **Applied And Environmental Microbiology**, V.61, P.1323–30, 1995.

GIACHINA, A.J., OLIVIERA, V.L., CASTELLANO, M.A., TRAPPE, J.M. (2000). Ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* and *Pinus* plantations in southern Brazil. **Mycologia**. **92**(6): 1166–77. doi:10.2307/3761484.

GIL-SERNA, J., PATIÑO, B., CORTES, L., GONZÁLEZ-JAÉN, M.T., VAZQUEZ, C.: *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* as potential risk of OTA contamination in food products in warm climates. **Elsevier Food Microbiology**. V. 46, P. 168-175. 2015. DOI 10.1016.

GILBERT, G.S. GOROSPE, J.; RYVARDEN, L. Host and habitat preferences of polypore fungi in Micronesian tropical flooded forests. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, p. 674-680, 2008.

GONÇALVES, F.J.T. **Identificação de espécies de Botryosphaeriaceae endofítica de plantas da Caatinga do estado do Ceará e patogenicidade em manga e ramos de umbu-cajá**. 2014. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2014.

GOPAL, B.; CHAUHAN, M. Biodiversity and its conservation in the Sundarban Mangrove Ecosystem. **Aquatic Sciences**, Berlin, v. 68, p. 338-354, 2006.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A.M. Development in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, p. 454-500, 1999.

GUNATILAKA, A.A.L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. **Journal Natural Product**, Ohio, v. 69, p. 509-526, 2006.

GU, Z., EILS, R., SCHLESNER, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics**. Volume 32, Issue 18, 15 September 2016, Pages 2847–2849, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>.

HALL, T., Bioedit V7.0.9: Biological Sequence Alignment Editor For Win95/98/2k/Xp/7. Available At [Http://Www.Mbio.Ncsu.Edu/Bioedit/Bioedit.Html](http://Www.Mbio.Ncsu.Edu/Bioedit/Bioedit.Html). Accessed 15 November 2014. 2012.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HARVEY, J.B.J.; GOFF, L.J. Genetic covariation of the marine fungal symbiont *Haloguignardia irritans* (Ascomycota, Pezizomycotina) with its algal hosts *Cystoseira* and *HALIDRYIS* (Phaeophyceae, Fucales) along the west coast of North America. **Fungal Biology**, Amsterdam, v. 114, p. 82-95, 2010.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, p. 641-655, 1991.

HAWKSWORTH, D.L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 50, p. 9–18, 2004.

HOLGUIN, G.; GONZALEZ-ZAMORANO, P.; DE-BASHAN, L.E. Mangrove health in an arid environmental encroached by urban development – a case study. **Science of the Total Environment**, Boston, v. 363, p. 260-274, 2006.

HYDE, K.D.; JONES, E.B.G.; LEANO, E.; POINTING, S.B.; POONYTH, A.D.; VRIJMOED, L.L.P. Role of fungi in marine ecosystems. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 7, p. 1147-1161, 1998.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B.L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. **Advances in Marine Biology**, San Diego, v. 40, p. 81-251, 2001.

KEELING, P.J., INAGAKI, Y.A. Class Of Eukaryotic Gtpase With A Punctate Distribution Suggesting Multiple Functional Replacements Of Translation Elongation Factor-1 Alpha. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, V.101 , P.1538015385, 2004.

KRISTENSEN, E.; BOUILLON, S.; DITTMAR, T.; Marchand, C. Organic carbon dynamics in mangrove ecosystems: A review. **Aquatic Botany**, New York, v. 89, p. 201-219, 2008.

KUO, M. *Lactarius piperatus*. Retrieved from the *MushroomExpert.Com*. Disponível em: <http://www.mushroomexpert.com/lactarius_piperatus.html>. Acesso em: 12 jan. 2019.

KUMAR S., STECHER G., LI M., KNYAZ C., AND TAMURA K. Mega X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Across Computing Platforms. **Molecular Biology And Evolution** 35:1547-1549. 2018.

KUMAR D.S.S.; CHEUNG, H. YEUNG, C.S.L.; CHEN, F.; HYDE, K.D. In vitro studies of

endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii* with anti-proliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 94, p. 295-300, 2004.

KUMARESAN, V.; SURYANARAYANAN, T.S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. **Mycological Research**, Cambridge, v.105, p. 1388-1391, 2001.

KUNINAGA, S.; NATSUAKI, T.; TAKEUCHI, T.; YOKOSAWA, R. Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**, Berlin, v. 32, p.237-243, 1997.

LARENA, I.; SALAZAR, O.; GONZALEZ V.; JULIAN, M. C.; RUBIO, V. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 75, p. 187-194, 1999.

LEE, S.B.; TAYLOR, J.W. Phylogeny of five fungus-like protist *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 9, p. 636-653, 1992.

LEITE, G.G., SILVEIRA, L.F., FERNANDES, F.D., GOMES, AC. Crescimento e composição química do capim *Paspalum atratum* cv. Pojuca. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento n° 19**, Embrapa Cerrados, Brasília, 2001.

LI, M.Y.; XIAO, Q.; PAN, J.Y.; WU, J. Natural products from semi-mangrove flora: source, chemistry and bioactivities. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 26, p. 281-298, 2009.

LIU, C.I.; ZOU, W.X.; LU, I.; TAN, R.X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 88, p. 277-282, 2001.

LOFTUS BJ; et al. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Science**. **307** (5713): 1321-24. [PMID 15653466](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15653466/). 2005. [doi:10.1126/science.1103773](https://doi.org/10.1126/science.1103773).

MACHADO, A.R., PINHO, D.B., PEREIRA, O.L. Phylogeny, Identification And Pathogenicity Of The Botryosphaeriaceae Associated With Collar And Root Rot Of The Biofuel Plant *Jatropha Curcas* In Brazil, With A Description Of New Species Of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity**, V.67, P.231–247., 2014a.

MACHADO, A.R., PINHO, D.B., OLIVEIRA, S.A.S., PEREIRA, O.L. New Occurrences Of Botryosphaeriaceae Causing Black Root Rot Of Cassava In Brazil. **Tropical Plant Pathology**, V.39, P.464-470, 2014b.

MACHIDA, M., YAMADA, O., GOMI, K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. **DNA Research**. v.15, p.173-183. 2008.

- MARIA, G.L.; SRIDHAR, K.R. Richness and diversity of filamentous fungi on woody litter of mangrove along the west coast of India. *Current Science*, **Bangalore**, v. 83, p. 1573-1580, 2002.
- MARQUES, M.W., LIMA, N.B., MORAIS Jr M.A., BARBOSA, M.A.G., SOUZA, B.O., MICHEREFF, S.J., PHILLIPS, A.J.L., CAMARA, M.P.S. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity*, v.61, p.181–193, 2013a.
- MARQUES, M.W., LIMA, N.B., MORAIS JR, M.A., MICHEREFF, S.J., PHILLIPS, A.J.L., CÂMARA, M.P.S. *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity*, v. 61, p.195-208, 2013b.
- MARKS, S.; CLAY, K. Effects of CO₂ enrichment, nutrient addition, and fungal endophyte-infection on the growth of two grasses. *Oecologia*, Berlin, v. 84, p. 207–214, 1990.
- MARTINS, M. V. V., LIMA, J. S., HAWERROTH, F. J., OOTANI, M. A., ARAUJO, F. S. A., CARDOSO, J. E., SERRANO, L. A. L., AND VIANA, F. M. P. First Report of *Lasiodiplodia brasiliense* Causing Disease in Apple Trees in Brazil. *Plant Pathology*, V.102, N. 5, P.1027, 2018 Doi: 10.1095.
- MARTINS, M.V.V.; FREIRE, F.C.O; LUZ, E.D.M.N; SANTOS, M.V.O.; ARAUJO, F.S.A.; CORDEIRO, I.M. Ocorrência de *Phytophthora nicotianae* em *Lilium speciosum* no Brasil. *Summa phytopathol.* V. 40, n. 4, p. 383, 2014
- MENDES, R.; AZEVEDO, J.L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A.M. (Org.). *Micologia: avanços no conhecimento*. Recife: UFPE: 2007. p. 129-140.
- MIDORIKAWA, G.E.O.; PINHEIRO, M.R.R.; VIDIGAL, B.S.; ARRUDA, M.C.; COSTA, F.F.; PAPAS JR., G.J.; RIBEIRO, S.G.; FREIRE, F.; MILLER R.N.G. Characterization of *Aspergillus flavus* strains from Brazilian Brazil nuts and cashew by RAPD and ribosomal DNA analysis. *Lett Appl Microbiol.* v. 47, n. 1, p. 1-8, 2008.
- MILES, D.H.; KOKPOL, U.; CHITTAWONG, V.; TIP-PYANG, S.; TUNSUWAN, K.; NGUYEN, C. Mangrove Forests – The importance of conservation as a bioresource for ecosystem diversity and utilization as a source of chemical constituents with potential medicinal and agricultural value. *Pure Applied Chemical*, Berlin, v. 70, p. 23-27, 1999.
- MUNIZ, C.R.; FREIRE, F.C.O; SOARES, A.A.; COOKE, P.H. The ultrastructure of shelled and unshelled cashew nuts. *Micron*, v. 54-55, p. 52-56, 2013.
- NAGELKERKEN, I.; BLABER, S.J.M.; BOUILLON, S.; GREEN, P.; HAYWOOD, M.; KIRTON, L.G.; MEYNECKE, J.-O.; PAWLIK, J.; PENROSE, H M.; SASEKUMAR, A.P.J. The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: A review. *Aquatic Botany*, New York, v. 89, p. 155-185, 2008.

NETTO, M.S.B., ASSUNÇÃO, I.P., LIMA, G.S.A. Species Of *Lasiodiplodia* Associated With Papaya Stem-End Rot In Brazil. **Fungal Diversity**, V.67, P.127–41, 2014.

ODA, K., KAKIZONO, D., YAMADA, O., IEFUJI, H., AKITA, O., IWASHITA, K. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72 (5), p.3448-3457. 2006

O'DONNELL, K., KISTLER, H.C., CIGELNIK, E., PLOETZ, R.C. Multiple Evolutionary Origins Of The Fungus Causing Panama Disease Of Banana: Concordant Evidence From Nuclear And Mitochondrial Gene Genealogies. **Applied Biological Science**, V.95, P.2044–2049, 1998.

OTROSINA, WILLIAM J. E COBB, CAMPOS W. JR. 1989. Biologia, ecologia, e epidemiologia de *Heterobasidion annosum*. Proceedings do Simpósio de Pesquisa e Gestão da Doença da Raiz de Annosus (*Heterobasidion annosum*) na América do Norte Ocidental. Serviço Florestal USDA Gen. Tech. Rep. PSW-116

OWEN, N.L.; HUNDLEY, N. Endophytes – the chemical synthesizer inside plants. **Science Progress**, New York, v. 87, p. 79-99, 2004.

PACE, N.R. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. **ASM News**, New York, v. 62, p. 463-470, 1996.

PANG, K.L.; MITCHELL, J.I. Molecular approaches for assessing fungal diversity in marine substrata. **Botanica Marina**, Berlin, v. 48, p. 332-337, 2005.

PARRENT, J.L.; GARBELOTTO, M.; GILBERT, G.S. Population genetic structure of the polypore *Datronia caperata* in fragmented mangrove forests. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, p. 403-410, 2004.

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

PHILLIPS, A.J.L., ALVES, A., ABDOLLAHZADEH, J., SLIPPERS, B., WINGFIELD, M.J., GROENEWALD, J.Z., CROUS, P.W. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, v.76, p.51–167, 2013.

QIN, RUQIAN & LEBOLDUS, JARED. (2014). The Infection Biology of *Sphaerulina musiva*: Clues to Understanding a Forest Pathogen. **PLoS ONE**. 9. e103477. 10.1371/journal.pone.0103477.

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

ROCHA, M.E.B.; FREIRE, F.C.O.; VIEIRA, I.G.P.; FILHO, J.M.S.; MAIA, F.E.F.; GUEDES, M.I.F.; RONDINA, D. Production of aflatoxins from *Aspergillus flavus* in liquid medium. **Journal of Life Sciences**, v. 7, n. 4, p. 377-381, 2013.

ROCHA, M.E.B.; FREIRE, F.C.O.; MAIA, F.E.F.; GUEDES, M.I.F.; RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, p. 159-165, 2014.

ROBBINS, K. Podridão da raiz do annosus em coníferas orientais. **Folheto sobre insectos e doenças florestais** 76 Serviço Florestal do Departamento de Agricultura dos EUA. 1984.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, p. 1109-1114, 2008.

RODRIGUEZ, R.J.; WHITE JR, J.F.; ARNOLD, A.E.; REDMAN, R.S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, London, v. 182, p. 314-330, 2009.

SAMSON, R.A., HOUBRAKEN, J., SUMMERBELL, R.C., FLANNIGAN, B., MILLER, J.D. (inglês) Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments. In: *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments*. (Português) As espécies comuns e importantes de fungos e actinomicetos em ambientes internos. In: *Microorganisms em ambientes domésticos e de trabalho interior*. [S.l.]: New York: Taylor & Francis. pp. 287–292. 2001.

SAKALIDIS, M.L., SLIPPERS, B., WINGFIELD, B.D., HARDY, G.E.S., BURGESS, T.I. The challenge of understanding the origin, pathways and extent of fungal invasions: global populations of the *Neofusicoccum parvum*-*N. ribis* species Complex. **Diversity and Distributions**, v.19, p.873–883, 2013.

SAKALIDIS, M.L., RAY, J.D., LANOISELET, V., HARDY, G.E.S., BURGESS, T.I. Pathogenic Botryosphaeriaceae Associated With *Mangifera Indica* In The Kimberley Region Of Western Australia. **European Journal Of Plant Pathology**, V.130, P.379–91, 2011.

SANTOS, A.A.; FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E. Ocorrência da podridão interna do mamão no estado do Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 673-674, 2001.

SARMA, V.V.; HYDE, K.D.; VITTAL, B.P.R. Frequency of occurrence of mangrove fungi from the east coast of India. **Hydrobiologia**, Netherlands, v. 455, p. 41-53, 2001.

SCHLOSS, P.D., HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 14, p. 303-310, 2003. SCHOCH, C.L., SHOEMAKER, R.A., SEIFERT, K.A., HAMBLETON, S., SPATAFORA, J.W., CROUS, P.W. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. **Mycologia**, v.98, p.1041–1052, 2006.

- SCHOCH, C.L., SHOEMAKER, R.A., SEIFERT, K.A., HAMBLETON, S., SPATAFORA, J.W., CROUS, P.W. A Multigene Phylogeny Of The Dothideomycetes Using Four Nuclear Loci. **Mycologia**, V.98, P.1041–1052, 2006.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, p. 661-686, 2005.
- SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. **Canadian Journal Microbiology**, Saskatoon, v. 50, p. 239-249, 2004.
- SHARAF, M.; EL-ANSARI, M.A.; SALEH, N.A.M. New flavonoids from *Avicennia marina*. **Fitoterapia**, Novara, v. 71, p. 274-277, 2000.
- SIEGEL, M.R.; LATCH, G.C.M.; BUSH, L.P.; FANNIN, F.F.; ROWAN, D.D.; TAPPER, B.A.; BACON, C.W.; JOHNSON, M.C. Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 3301-3315, 1990.
- SLIPPERS, B., WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**, v.21, n.2-3, p. 90-106, 2007.
- SLIPPERS, B., FOURIE, G., CROUS, P.W., COUTINHO, T.A., WINGFIELD, B.D., WINGFIELD, M.J. Multiple Gene Sequences Delimit *Botryosphaeria Australis* Sp. Nov. From *B. Lútea*. **Mycologia**, V.96, N.5, P.1030–1041, 2004a.
- SLIPPERS, B., CROUS, P. W., DENMAN, S., COUTINHO, T. A., WINGFIELD, B. D., WINGFIELD, M. J. Combined Multiple Gene Genealogies And Phenotypic Characters Differentiate Several Species Previously Identified As *Botryosphaeria Dothidea*. **Mycologia**, New York, V. 96, N. 1, P. 83-101, 2004b.
- SOUSA, O.V.; MACRAE, A.; MENEZES, F.G.R.; GOMES, N.C.M.; VIEIRA, R.H.S.F.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.S. The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceará, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, New York, v. 52, p. 1725-1734, 2006.
- SRIDHAR, K.R. Mangrove fungi in India. **Current Science**, Bangalore, v. 86, p. 1586-1587, 2004.
- STONE, J.K.; POLISHOOK, J.D.; WHITE, J.R.J. Endophytic fungi. In: MUELLER, G.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S. (Ed.). Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. **Burlington: Elsevier**, 2004. p. 241-270.
- STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal Natural Products**, Washington, v. 67, p. 257-268, 2004.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, p. 491-502, 2003.

SURYANARAYANAN, T.S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU M. B.; SASSE, F.; JANSEN R.; MURALI T. S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 23, p. 9-19, 2009.

TAMURA, K., NEI, M., AND KUMAR, S.. Prospects For Inferring Very Large Phylogenies By Using The Neighbor-Joining Method. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences (Usa)** 101:11030-11035. 2004.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 18, p. 448-459, 2001.

THINES, E.; ANKE, H.; WEBER, R.W.S. Fungal secondary metabolites as inhibitors of infection-related morphogenesis in phytopathogenic fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, p. 14-25, 2004.

TREMBLAY, L.B.; DITTMAR, T.; MARSHALL, A.G.; COOPER, W. J.; COOPER, W.T. Molecular characterization of dissolved organic matter in a North Brazilian mangrove porewater and mangrove-fringed estuaries by ultrahigh resolution Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance mass spectrometry and excitation/emission spectroscopy. **Marine Chemistry**, New York, v. 105, p. 15-29, 2007.

VARMA, A.; VERMA, S.; SAHAY, N.; BUTEHORN, B.; FRANKEN, P. Piriformospora indica, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2741-2744, 1999.

VESTH TC, NYBO JL, THEOBALD S, FRISVAD JC, LARSEN TO, NIELSEN KF, CASCO JB, BRANDL J, SALAMOV A, RILEY R, GLADDEN JM, PHATALE P, NIELSEN MT, LYHNE EK, ME KOGLE, STRASSER K, MCDONNELL E, BARRY K, CLUM A, CHEN C, LABUTTI K, HARIDAS S, M NOLAN, L SANDOR, KUO A, LIPZEN A, HAINAUT M, DRULA E, TSANG A, MAGNUSON JK, HENRISSAT B, WIEBENGA A, SIMMONS BA, MAKELA MR, DE VRIES RP, GRIGORIEV IV, MORTENSEN UH, BAKER SE, ANDERSEN MR. Investigation of inter- and intraspecies variation through genome sequencing of *Aspergillus* section *Nigri*. **Nat Genet** 2018 Dec;50(12):1688-1695. doi: 10.1038/s41588-018-0246-1. Epub 2018 Oct 22.

VIEIRA, I.G.P.; FREIRE, F.C.O.; ANDRADE, J.A.; MENDES, F.N.P.; MONTEIRO, M.C.N. Determinação de aflatoxinas em amêndoas de cajueiro por cromatografia em camada delgada. **Rev. Ciên. Agron.**, v. 28, n. 4, p. 430-435, 2007.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domain Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

WU, J.; XIAO, Q.; XU, J.; LI, M. Y.; PAN, J.Y.; YANG, M. H. Natural products from true mangrove flora: source, chemistry and bioactivities. **Natural Products Reports**, Cambridge, v. 25, p. 955-981, 2008.

XIAO, X.; LUO, S.; ZENG, G.; WEI, W.; WAN, Y.; CHEN, L.; GUO, H.; CAO, Z.; YANG, L.; CHEN, J.; XI, Q. Biosorption of cadmium by endophytic fungus (EF) *Microsphaeropsis* sp. LSE10 isolated from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, p. 1668-1674, 2010.

YUAN, J. I.; JIAN-NAN B. I.; BING Y.; XU-DONG Z. Taxol-producing Fungi: A New Approach to Industrial Production of Taxol. **Chinese Journal of Biotechnology**, New York, v. 22, p. 1-6, 2006.

ZHAI, L., ZHANG, M., L.V, G., CHEN, X., JIA, N., HONG, N., WANG, G. Biological and molecular characterization of four *Botryosphaeria* species isolated from pear plants showing stem wart and stem canker in China. **Plant Disease**, v.98, p.716-726, 2014. ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 23, p. 753-771, 2006.

ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 23, p. 753-771, 2006.

ZHAO, S., GUO, Y. , SHENG Q., AND SHYR Y. Advanced Heat Map and Clustering Analysis Using Heatmap3. **BioMed Research International**. Volume 2014, Article ID 986048, 6 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/986048>