

# Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.)<sup>1</sup>

Roberta Lane de Oliveira Silva<sup>2</sup>, Jaqueline Silva Luz<sup>3</sup>, Elineide Barbosa da Silveira<sup>4</sup> e Uided Maaze Tiburcio Cavalcante<sup>5,6</sup>

Recebido em 15/12/2004. Aceito em 16/03/2006

**RESUMO** – (Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de *Annona squamosa* L.). A partir de folhas, caules e raízes de plantas de pinha e graviola coletadas em Pernambuco foram obtidos 110 e 90 isolados fúngicos endofíticos, respectivamente. Vinte e nove isolados foram selecionados e avaliados quanto à produção de enzimas extracelulares, através do método qualitativo em placas com meios sólidos específicos, e à capacidade de estimular o crescimento de mudas de pinha. Esses isolados foram identificados como pertencentes aos gêneros *Acremonium* (10,34%), *Aspergillus* (3,45%), *Chaetomium* (3,45%), *Colletotrichum* (10,34%), *Cylindrocladium* (13,8%), *Fusarium* (31,03%), *Glomerella* (3,45%), *Nigrospora* (6,9%), *Penicillium* (6,9%) e *Phomopsis* (10,34%). Dezenove isolados apresentaram atividade lipolítica, cinco atividade proteolítica e nenhum deles atividades celulolítica ou amilolítica. Onze isolados dos gêneros *Acremonium* (GFR6 e GRR1), *Colletotrichum* (GFR4 e PFR4), *Phomopsis* (PFR3 e GCR4), *Cylindrocladium* (GRR4), *Chaetomium* (GRR7) e *Fusarium* (GRR5, PRR1 e PRR6) promoveram eficientemente o crescimento vegetal. Os índices de aumento da biomassa seca da parte aérea de mudas de pinha variou de 23,2 a 32,7%, sendo que nenhum isolado promoveu a biomassa seca da raiz. Destaca-se também que 20 isolados apresentaram efeito deletério significativo ( $P = 0,05$ ) na biomassa seca da raiz das mudas de pinha. Em tecidos aparentemente saudáveis de plantas de pinha e graviola são encontrados alguns fungos que podem promover o crescimento da parte aérea, como também reduzir o crescimento da raiz e outros sem efeito no crescimento de mudas de pinha.

**Palavras-chave:** fungos endofíticos, enzimas, graviola, pinha, crescimento vegetal, mudas

**ABSTRACT** – (Endophytic fungi of *Annona* spp.: isolation, enzymatic characterization of isolates and plant growth promotion in *Annona squamosa* L. seedlings). Endophytic isolates of fungi were obtained from leaves, stems and roots of 110 sweetsop and 90 soursop plants from Pernambuco. Twenty-nine isolates were analyzed for production of extracellular enzymes by qualitative assay in Petri dishes containing specific solid media, and for the capacity to promote growth of sweetsop seedlings. These isolates were identified as *Acremonium* (10.34%), *Aspergillus* (3.45%), *Chaetomium* (3.45%), *Colletotrichum* (10.34%), *Cylindrocladium* (13.8%), *Fusarium* (31.03%), *Glomerella* (3.45%), *Nigrospora* (6.9%), *Penicillium* (6.9%) and *Phomopsis* (10.34%). Nineteen isolates showed lipolytic activity while five showed proteolytic activity; cellulolytic and amylolytic activity were not detected. Eleven isolates of the genera *Acremonium* (GFR6 and GRR1), *Colletotrichum* (GFR4 and PFR4), *Phomopsis* (PFR3 and GCR4), *Cylindrocladium* (GRR4), *Chaetomium* (GRR7) and *Fusarium* (GRR5, PRR1 and PRR6) efficiently improved plant growth. Increase in shoot dry matter of sweetsop seedlings ranged from 23.2 to 32.7%; there was no increase in root dry matter. It is worthy of note that 20 isolates caused significant ( $P = 0.05$ ) reduction in root dry matter of sweetsop seedlings. In apparently healthy tissues of sweetsop and soursop plants, some fungi promote shoot growth or reduce root growth, while others have no effect on growth of sweetsop seedlings.

**Key words:** endophytic fungi, enzymes, soursop, sweetsop, plant growth, seedlings

## Introdução

A pinha (*Annona squamosa* L.) e a graviola (*Annona muricata* L.) são anonáceas que produzem

frutos dos mais apreciados, sendo cultivadas em regiões onde as condições climáticas, de temperatura e umidade, favorecem seus cultivos. A polpa desses frutos é utilizada para consumo *in natura* e na indústria de

<sup>1</sup> Monografia da primeira Autora, Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Brasil

<sup>2</sup> Bolsista de Iniciação Científica-PIBIC/FACEPE/CNPq (robertalane@bol.com.br)

<sup>3</sup> Bolsista de Iniciação Científica-PIBIC/CNPq/UFRPE

<sup>4</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil (elineidebs@yahoo.com)

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, 50670-420 Recife, PE, Brasil

<sup>6</sup> Autor para correspondência: umaaze@yahoo.com.br; umaaze@hotmail.com

sucos, sorvetes, geléias e doces, destacando-se entre os frutos tropicais de maior interesse comercial. Entre as doenças que limitam o cultivo da pinha e graviola, destaca-se a “Podridão da raiz” causada por *Phytophthora* spp., que ocorre em plantas mantidas em viveiros ou pomares, afetando o transporte de água e nutrientes na planta (Gramacho *et al.* 2001).

A agricultura moderna tem enfrentado o grande desafio de aumentar a produção das culturas gerando sustentabilidade, baseando-se em enfoque que visa a proteção ambiental e, para atingir esse objetivo, uma das alternativas é a utilização de microrganismos promotores de crescimento vegetal. A capacidade de estimular o crescimento vegetal apresentada por esses organismos tem sido atribuída a mecanismos diretos tais como a fixação do nitrogênio, produção de fitohormônios e indiretos como antagonismo em relação a patógenos levando, conseqüentemente, ao aumento na taxa de germinação, crescimento das raízes e parte aérea, número de folhas e flores, área foliar e rendimento de culturas (Silveira 2001).

Os microrganismos endofíticos, sem considerar os fungos micorrízicos arbusculares, estão presentes no interior de órgãos e tecidos vegetais como folhas, caules e raízes de várias plantas, aparentemente saudáveis, podendo em alguns casos produzir danos à planta quando as condições ambientais e estado fisiológico do hospedeiro se tornarem favoráveis (Azevedo 1998). Dentre os fungos mais freqüentemente isolados endofiticamente incluem: *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. in Penz., *Cladosporium* Link ex Fr., *Phomopsis* (Sacc.) Bubák., *Fusarium* Link:Fr. e *Xylaria* L. (Araújo *et al.* 2001; Mariano *et al.* 1997; Pereira *et al.* 1999; Photita *et al.* 2001).

Muitos fungos produzem enzimas extracelulares de importância na degradação e transporte de nutrientes para a célula e no processo de patogênese (Bateman & Basham 1976), podendo a produção de enzimas extracelulares ser indicativa da característica patogênica desses fungos. Como uma forma de estabelecer o papel funcional dos fungos endofíticos se faz necessário, dentre outros fatores, a detecção de enzimas extracelulares (Carroll & Petrini 1983).

Estudos envolvendo fungos endofíticos em fruteiras são poucos no Brasil, tendo sido relatados isolamentos de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) (Rodrigues 1994), bananeira (*Musa acuminata* Colla) (Pereira *et al.* 1999), coqueiro (*Cocos nucifera* L.) (Mariano *et al.* 1997), citrus (*Citrus limon* L.) (Araújo *et al.* 2001) e cajá (*Spondias mombin* L.) (Rodrigues & Samuels 1999). Em outras culturas como algodoeiro

(*Gossypium hirsutum* L.) (Gasoni & Gurfinfel 1997), hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) (Mucciarelli *et al.* 2003), milho (*Zea mays* L.) e fumo (*Nicotiana tabacum* L.) (Franken *et al.* 1998) resultados promissores têm sido obtidos com a utilização desses fungos na promoção do crescimento de plantas.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de isolar fungos endofíticos de folhas, caules e raízes de *Annona* spp., detectar a produção de enzimas extracelulares (amilase, celulase, lipase e protease) e avaliar o comportamento dos fungos em relação à capacidade de promover o crescimento de mudas de pinha.

## Material e métodos

Isolamento de fungos endofíticos – Foram utilizadas 10 amostras de plantas de pinha e graviola, aparentemente saudáveis, coletadas em Pernambuco (Tab. 1) e separadas em folhas, caules e raízes, lavadas com sabão em água corrente, desinfestadas em álcool 70% por 30 segundos e hipoclorito de sódio a 1,5% (produto comercial com 2%) por quatro minutos, lavadas em água destilada esterilizada e colocadas para secar em papel de filtro esterilizado. Após desinfestação, foram retirados discos foliares (5 mm diâmetro) e fragmentos do caule e raiz (5 mm comprimento), transferidos para placas de Petri contendo o meio batata-dextrose-ágar (BDA) suplementado com o antibiótico cloranfenicol (100 mg L<sup>-1</sup>) e incubados à temperatura ambiente (25±2 °C). Após sete dias, foi determinada a taxa de colonização (TC) (Petrini *et al.* 1992), onde TC = número total de segmentos com um ou mais isolados/total de segmentos da amostra, expressa em percentagem. As colônias fúngicas que se apresentavam distintas umas das outras, de acordo com observações macroscópicas (coloração e características de crescimento em meio de cultura), foram purificadas em meio BDA, preservadas pelo método da subcultura e armazenadas a ± 4 °C. Para identificação, ao nível de gênero, dos 29 isolados selecionados, foram feitas microculturas utilizando bloco de ágar (Menezes & Silva-Hanlin 1997).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial de 5 × 3, correspondendo a cinco amostras de pinha ou graviola × três partes da planta (folha, caule e raiz), com cinco repetições, sendo a unidade experimental constituída por uma placa com oito discos de folha ou fragmentos de caule ou raiz.

Tabela 1. Taxa de colonização de fungos endofíticos em diferentes tecidos de pinha (*Annona squamosa* L.) e graviola (*Annona muricata* L.).

Amostra	Origem	Taxa de colonização em pinha (%)		
		Folha	Caule	Raiz
I	Viveiro - Recife	87,50 aA <sup>1</sup>	100,00 aA	97,40 aA
II	Viveiro/UFRPE - Recife	82,20 aA	92,40 aA	100,00 aA
III	Pomar residencial - Olinda	74,80 aA	100,00 aA	87,20 aA
IV	Pomar residencial - Olinda	100,00 aA	67,20 bB	52,40 bB
V	Plantio comercial - Moreno	100,00 aA	100,00 aA	100,00 aA
C.V. (%)		21,66	17,39	27,09

Amostra	Local	Taxa de colonização em graviola (%)		
		Folha	Caule	Raiz
I	Viveiro - Recife	100,0 aA <sup>1</sup>	100,00 aA	94,80 aA
II	Viveiro/UFRPE - Recife	92,4 aA	79,80 aA	87,20 aA
III	Pomar residencial - Olinda	54,8 bA	85,00 aA	77,20 aA
IV	Viveiro/UFRPE - Recife	87,4 aA	72,40 aA	97,40 aA
V	Plantio comercial - Moreno	100,0 aA	95,00 aA	79,80 aA
C.V. (%)		22,5	27,14	21,29

<sup>1</sup>Média de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Duncan (P = 0,05).

Foram utilizados para diferenciar os isolados os seguintes códigos: a primeira letra indicando a anonácea graviola (G) ou pinha (P); a segunda letra, o órgão de origem folha (F), caule (C) ou raiz (R); a terceira letra, a repetição (R) e; a quarta, o número do isolado.

Atividade enzimática – A produção das enzimas hidrolíticas extracelulares amilase, celulase, lipase e protease foi avaliada em placas de Petri contendo meio de cultura específico para cada enzima (Hankin & Anagnostakis 1975; Sarath *et al.* 1989; Neiroti & Azevedo 1988). Discos (5 mm diâmetro) de micélio dos 29 fungos endofíticos cultivados em BDA por cinco dias, foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo o meio de cultura da enzima específica, incubados à temperatura ambiente (25±2 °C) e avaliados após cinco dias, quanto a presença ou ausência de halo de degradação. O experimento foi realizado em DIC com 29 tratamentos (isolados representando diferentes gêneros dos fungos encontrados) e quatro repetições, sendo a unidade experimental constituída por uma placa de Petri contendo um disco de micélio do fungo endofítico.

Promoção do crescimento em mudas de pinha – Sementes obtidas de frutos comercializados foram plantadas em potes plástico (50 mL) e após 30 dias, quando as plântulas apresentavam as primeiras folhas definitivas, foram transplantadas para potes (500 mL)

contendo solo desinfestado. Antes do transplante, discos com 5 mm do crescimento do fungo endofítico (três por pote) cultivado em meio BDA durante cinco dias, foram colocados no interior da cova de plantio de cada planta, em contato com o sistema radicular. Noventa dias após a inoculação foram avaliados: altura, número de folhas, biomassa seca da parte aérea e raiz. O trabalho foi realizado em casa de vegetação, em DIC com 30 tratamentos (29 isolados fúngicos e um controle não inoculado) e três repetições, sendo a unidade experimental constituída por uma planta.

Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan ou Scott-Knott (P = 0,05).

## Resultados e discussão

Foram obtidos 110 isolados de fungos endofíticos de plantas de pinha e 90 de graviola. As taxas de colonização variaram de 74,8 a 100% (folha), de 67,2 a 100% (caule) e de 52,4 a 100% (raízes) de plantas de pinha; em graviola, essas taxas foram de 54,8 a 100%, 72,4 a 100% e 77,2 a 97,4% em folhas, caules e raízes, respectivamente (Tab. 2). Diferenças significativas (P = 0,05) na taxa de colonização em cada parte da planta foram observadas em uma das amostras de pinha que apresentou menores taxas no

Tabela 2. Atividade enzimática de 29 isolados de fungos endofíticos de pinha (*Annona squamosa* L.) e graviola (*Annona muricata* L.).

Código do Isolado	Hospedeiro	Fungo	Atividade enzimática			
			Lipolítica	Proteolítica	Amilolítica	Celulolítica
GFR6	Graviola (F) <sup>1</sup>	<i>Acremonium</i> sp.	+ <sup>2</sup>	+	-	-
GFR4	Graviola (F)	<i>Colletotrichum</i> sp.	+	-	-	-
GFR19	Graviola (F)	<i>Glomerella</i> sp.	+	-	-	-
GFR3	Graviola (F)	<i>Penicillium</i> sp.	-	-	-	-
GFR1	Graviola (F)	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	-	-
PFR4	Pinha (F)	<i>Colletotrichum</i> sp.	+	-	-	-
PFR3	Pinha (F)	<i>Phomopsis</i> sp.	+	-	-	-
GCR5	Graviola (C)	<i>Nigrospora</i> sp.	+	-	-	-
GCR8	Graviola (C)	<i>Nigrospora</i> sp.	+	-	-	-
GCR4	Graviola (C)	<i>Phomopsis</i> sp.	+	-	-	-
GRR14	Graviola (R)	<i>Fusarium</i> sp.	+	-	-	-
GRR5	Graviola (R)	<i>Fusarium</i> sp.	+	-	-	-
GRR4	Graviola (R)	<i>Cylindrocladium</i> sp.	+	-	-	-
GRR7	Graviola (R)	<i>Chaetomium</i> sp.	+	-	-	-
GRR11	Graviola (R)	<i>Cylindrocladium</i> sp.	+	-	-	-
GRR2	Graviola (R)	<i>Acremonium</i> sp.	-	-	-	-
GRR85	Graviola (R)	<i>Penicillium</i> sp.	-	+	-	-
GRR8	Graviola (R)	<i>Fusarium</i> sp.	+	+	-	-
GRR6	Graviola (R)	<i>Cylindrocladium</i> sp.	+	-	-	-
GRR1	Graviola (R)	<i>Acremonium</i> sp.	+	-	-	-
GRR9	Graviola (R)	<i>Fusarium</i> sp.	+	+	-	-
GRR10	Graviola (R)	<i>Cylindrocladium</i> sp.	-	+	-	-
GRR93	Graviola (R)	<i>Aspergillus</i> sp.	-	-	-	-
PRR1	Pinha (R)	<i>Fusarium</i> sp.	+	-	-	-
PRR6	Pinha (R)	<i>Fusarium</i> sp.	+	-	-	-
PRR3	Pinha (R)	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-
PRR5	Pinha (R)	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-
PRR18	Pinha (R)	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-
PRR37	Pinha (R)	<i>Colletotrichum</i> sp.	-	-	-	-

<sup>1</sup>F= folha, C = caule e R = raiz; <sup>2</sup>Presença (+) e ausência (-) de halo de degradação <sup>3</sup>Média de 3 repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott (P=0,05).

caule (67,2%) e raiz (52,4%) em relação às demais amostras e uma de graviola que teve menor taxa nas folhas (54,8%); quando as partes da planta foram comparadas, uma amostra de pinha apresentou maiores taxas nas folhas (100,0%) do que no caule e raiz enquanto em graviola, não se verificou diferença significativa entre as partes da planta, independentemente da amostra. Esses resultados indicam que qualquer uma das partes da planta pode ser utilizada no processo de isolamento de fungos endofíticos.

A composição microbiana endofítica pode variar em função da espécie vegetal, distribuição geográfica, idade da planta, precipitação anual entre outros fatores (Carroll 1988). Entre os fungos obtidos foram identificados 29 isolados, 8 de pinha e 21 de graviola, pertencentes aos gêneros *Acremonium* Link:Fr. (10,34%), *Aspergillus* P. Mich. ex Link:Fr. (3,45%), *Chaetomium* Kunze:Fr. (3,45%), *Colletotrichum*

*Corda* in Sturm. (10,34%), *Cylindrocladium* Morg. (13,8%), *Fusarium* Link:Fr. (31,03%), *Glomerella* Spauld & H. Schrenk (3,45%), *Nigrospora* A. Zimmerm. (6,9%), *Penicillium* Link:Fr. (6,9%) e *Phomopsis* P. Mich. ex Link:Fr. (10,34%) (Tab. 2). Os gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium* e *Phomopsis* foram encontrados nas duas espécies de anonáceas. Verificou-se que os isolados do mesmo gênero apresentaram-se iguais morfológicamente. Alguns desses gêneros de fungos endofíticos já foram isolados de tecidos sadios de outras fruteiras, tais como coqueiro (Mariano *et al.* 1997), citrus (Dúran *et al.* 2005) e cajá (Rodrigues & Samuels 1999).

Dos 29 isolados testados, 19 (65,5%) de diversos gêneros (*Acremonium*, *Chaetomium*, *Colletotrichum*, *Cylindrocladium*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Nigrospora*, *Phomopsis*) apresentaram atividade lipolítica (Tab. 2). Segundo Roloff *et al.* (1987) a produção de lipase por

microrganismos não tem função totalmente conhecida, porém está relacionada com a localização e possibilidade de expansão da infecção em fungos patogênicos. Já para a atividade proteolítica, apenas cinco isolados (17,2%) apresentaram halo de degradação. Pouco é conhecido sobre o papel das proteases na penetração dos fungos nas plantas (Griffin 1994), porém, vale ressaltar que as proteases são complexos enzimáticos relativamente mais estudados em fungos e são de grande importância em processos industriais (Hancock & Millar 1965).

Apesar de alguns fungos endofíticos terem apresentado atividade lipolítica e proteolítica, isto não caracteriza a fitopatogenicidade, pois, segundo Annis & Goodwin (1997), as diferentes isoenzimas de cada grupo de enzimas que degradam a parede celular podem ter diferentes funções, incluindo a obtenção de nutrientes durante o crescimento saprofítico. A habilidade de várias espécies de fungos em produzir enzimas é bastante variável.

Os fungos endofíticos de pinha e graviola testados não produziram as enzimas hidrolíticas extracelulares celulase e amilase (Tab. 2), comuns em fungos fitopatogênicos, sugerindo que os fungos endofíticos isolados não apresentam enzimas relacionadas à patogênese. A produção de amilase por fungos filamentosos varia de acordo com o gênero e a espécie (Griffin 1994) e, segundo Dianese (1989), as amilases são comuns em fungos, permitindo a hidrólise do amido até glucose.

No teste de promoção de crescimento de mudas de pinha, os isolados fungicos endofíticos GFR6 (*Acremonium*), GFR4 (*Colletotrichum*), GRR7 (*Chaetomium*), GRR4 (*Cylindrocladium*), PFR3 (*Phomopsis*), GCR4 (*Phomopsis*), PRR1 (*Fusarium*), PRR6 (*Fusarium*), PFR4 (*Colletotrichum*), GRR5 (*Fusarium*) e GRR1 (*Acremonium*) diferiram significativamente ( $P = 0,05$ ) da testemunha, com biomassa seca da parte aérea variando de 0,50 a 0,57 g (Tab. 2). Sabe-se que a fotossíntese fornece cerca de 90% a 95% da matéria seca ao vegetal, assim como a energia metabólica requerida para o desenvolvimento da planta (Magalhães *et al.* 2003), e a quantidade de biomassa produzida pelo vegetal pode ser definida por uma relação fisiológica simples, baseada na quantidade de radiação interceptada e em sua eficiência de conversão em matéria seca (Charles-Edwards 1982). Desta forma, o aumento da biomassa seca na parte aérea de pinha indica uma melhoria na qualidade das mudas, o que possibilitará uma redução do tempo das mesmas em viveiro. No que se refere a trabalhos

envolvendo a utilização de fungos endofíticos na promoção de crescimento de plantas, a literatura é escassa. Dos poucos relatos existentes, pode ser citada a utilização do fungo endofítico *Piriformospora indica*, que é indicado para aplicação na floricultura, horticultura e agroflorestal, visando aumentar a produção comercial (Varma *et al.* 1999). Estudos da interação desse fungo com milho e fumo mostraram que a hifa coloniza o córtex da raiz com diferenciação intracelular, sendo a base para o efeito da promoção de crescimento uma maior absorção de fósforo pelas plantas (Franken *et al.* 1998).

Embora não estejam totalmente elucidados os mecanismos envolvendo a promoção de crescimento vegetal pelos fungos endofíticos, existe a possibilidade de que esses fungos promovam o crescimento mais rápido da planta devido à produção de fitohormônios (Azevedo 1998), aumento da capacidade de absorção de minerais como nitrogênio e fósforo (Gasoni & Gurfinkel 1997; Franken *et al.* 1998) e outras substâncias (Mucciarelli *et al.* 2003).

Todos os isolados que promoveram o crescimento das mudas de pinha (GFR6, GFR4, GRR7, GRR4, PFR3, GCR4, PRR1, PRR6, PFR4, GRR5, GRR1) apresentaram atividade lipolítica. Esses isolados não foram patogênicos a essa cultura, indicando que as lipases, neste caso, não têm função relacionada a patogenicidade.

Não foi verificada eficiência dos fungos endofíticos na promoção de crescimento das mudas de pinha quando analisada a variável biomassa seca da raiz (Tab. 2). Destaca-se também que 20 isolados (PRR18, GRR7, PRR6, GRR2, GRR8, GRR85, GCR8, GCR4, PRR37, GRR1, GCR5, GRR6, GRR9, GRR10, GFR1, GRR14, GFR3, PRR3, PRR5, PRR1) apresentaram efeito deletério significativo ( $P = 0,05$ ) em relação à testemunha, reduzindo a biomassa seca da raiz, o que pode ter acontecido devido à competição por nutrientes do solo entre o fungo endofítico e a planta. Kloepper (1996) também verificou efeito deletério de rizobactérias associadas a plantas. Segundo esse autor, na interação entre os microrganismos endofíticos e a planta hospedeira podem ocorrer reações do tipo benéficas, neutras ou prejudiciais.

As plantas tratadas com os isolados de fungos endofíticos não diferiram significativamente do controle em relação às variáveis altura da planta e número de folhas.

Dos 11 isolados que beneficiaram a parte aérea das mudas de pinha, cinco (GCR4, GRR7, GRR1, PRR1 e PRR6) reduziram o peso da biomassa seca

da raiz (Tab. 3). Desta forma, foram selecionados como eficientes na promoção de crescimento os isolados GFR6 (*Acremonium*), GFR4 (*Colletotrichum*), PFR4 (*Colletotrichum*), PFR3 (*Phomopsis*), GRR5 (*Fusarium*) e GRR4 (*Cylindrocladium*), com índices de aumento da biomassa seca da parte aérea, em relação ao controle, variando de 23,2 a 32,7% (Fig. 1).

Os isolados GFR6, GFR4, GRR5 e GRR4 que promoveram o crescimento das mudas de pinha são provenientes de graviola, evidenciando que isolados de um hospedeiro podem facilmente colonizar hospedeiros de espécies diferentes, até mesmo com maior intensidade. Este fato é comumente observado com

Tabela 3. Efeito de fungos endofíticos na promoção do crescimento de mudas de pinha (*Annona squamosa* L.).

Código do Isolado	Promoção de crescimento	
	Biomassa seca parte aérea (g)	Biomassa seca raiz (g)
GFR6	0,57 a <sup>1</sup>	0,62 a
GFR4	0,57 a	0,60 a
GFR19	0,45 b	0,53 a
GFR3	0,40 b	0,33 b
GFR1	0,48 b	0,35 b
PFR4	0,53 a	0,57 a
PFR3	0,54 a	0,52 a
GCR5	0,40 b	0,33 b
GCR8	0,40 b	0,34 b
GCR4	0,50 a	0,41 b
GRR14	0,40 b	0,38 b
GRR5	0,55 a	0,51 a
GRR4	0,57 a	0,51 a
GRR7	0,57 a	0,41 b
GRR11	0,40 b	0,52 a
GRR2	0,44 b	0,37 b
GRR85	0,43 b	0,45 b
GRR8	0,49 b	0,38 b
GRR6	0,45 b	0,43 b
GRR1	0,51 a	0,47 b
GRR9	0,44 b	0,33 b
GRR10	0,46 b	0,37 b
GRR93	0,40 b	0,45 a
PRR1	0,50 a	0,36 b
PRR6	0,52 a	0,48 b
PRR3	0,39 b	0,39 b
PRR5	0,42 b	0,36 b
PRR18	0,38 b	0,31 b
PRR37	0,42 b	0,36 b
Controle	0,43 b	0,49 a
C.V. (%)	17,42	21,88

<sup>1</sup>Média de três repetições. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott (P = 0,05).

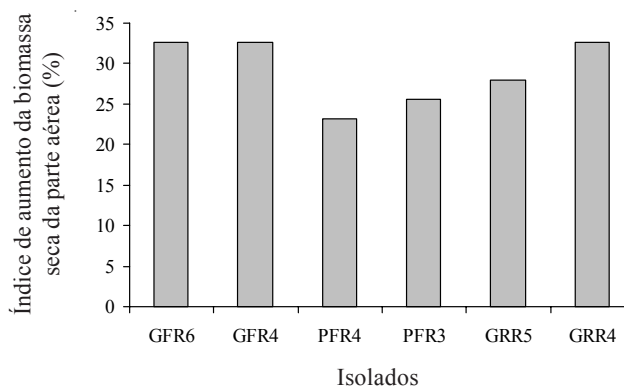


Figura 1. Aumento do índice de biomassa seca da parte aérea de mudas de pinha com 90 dias, em casa de vegetação, pelos isolados fúngicos endofíticos obtidos de plantas de pinha (*Annona squamosa* L.) e graviola (*Annona muricata* L.) sadias. (GFR6 - *Acremonium*, GFR4 - *Colletotrichum*, PFR4 - *Colletotrichum*, PFR3 - *Phomopsis*, GRR5 - *Fusarium*, GRR4 - *Cylindrocladium*).

isolados de bactérias endofíticas e epifíticas promotoras de crescimento de plantas (Silveira *et al.* 2004).

Os resultados evidenciam o potencial de alguns isolados de fungos endofíticos de pinha e graviola em promover o crescimento das mudas de pinha e as atividades lipolítica e proteolítica apresentadas por alguns isolados utilizados neste trabalho, sugerem que endofíticos de pinha e graviola podem ser uma fonte produtora de enzimas de interesse industrial.

## Agradecimentos

Ao CNPq e FACEPE pela concessão das bolsas de Iniciação Científica.

## Referências bibliográficas

- Annis, S.L. & Goodwin, P.H. 1997. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology** 103: 1-14.
- Araújo, W.L.; Saridakis H.O.; Barroso, P.A.V.; Aguilar-Vildoso, C.I. & Azevedo J.L. 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology** 47: 229-236.
- Azevedo, J.L. 1998. Microrganismos endofíticos. Pp. 117-137. In: I.S. Melo & J.L. Azevedo (eds.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna, Embrapa-CNPMA.
- Bateman, D.F. & Basham, H.G. 1976. Degradation of plant-cell walls and membranes by microbial enzymes. **Physiological and molecular plant pathology** 4: 316-355.
- Carroll, G.C. 1988. Fungal endophytes in stem and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology** 69: 2-9.

- Carroll, G. & Petrini, O. 1983. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. **Mycologia** **75**: 53-63.
- Charles-Edwards, D.A. 1982. **Physiological determinants of crop growth**. London, Academic Press.
- Dianese, J.C. 1989. **Patologia vegetal: agressão e defesa em sistemas planta/patógeno**. Brasília, Editora Universitária da Universidade de Brasília.
- Durán, E.L.; Ploper, L.D.; Ramallo, J.C.; Piccolo Grandi, R.A.; Hupper Giancoli, Á.C. & Azevedo, J.L. 2005. The foliar fungal endophytes of *Citrus limon* in Argentina. **Canadian Journal of Botany** **83**: 350-355.
- Franken, P.; Butehorn, B. & Varma, A. 1998. *Piriformospora indica*, a cultivable root cell-infecting fungus promotes the growth of a broad range of plant species. In: **International Conference on Mycorrhiza**. 2, Swenden.
- Gasoni, L. & Gurfinkel, B.S. 1997. The endophyte *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton roots: phosphorus uptake and host growth. **Mycological Research** **101**(7): 867-870.
- Gramacho, K.P.; Bezerra, L. & Junqueira, N.T.V. 2001. *Phytophthora* sp. em espécies da família anonácea. Pp. 91-99. In: E.D.M.N. Luz; A.F. Santos; K. Matsuoka & J.L. Bezerra. **Doenças causadas por Phytophthora no Brasil**. Campinas, Livraria Rural.
- Griffin, D.H. 1994. **Fungal Physiology**. New York, Willey-Liss.
- Hancock, J.K. & Millar, R.L. 1965. Association of cellulolytic, proteolytic, and xylolytic enzymes with southern anthracnose, spring black stem, and *Stemphylium* leaf spot of alfafa. **Phytopathology** **55**: 356-360.
- Hankin, L. & Anagnostakis, S.L. 1975. The use of the solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia** **67**: 597-607.
- Kloepper, J.W. 1996. Host specificity in microbe-microbe interactions. **BioScience** **46**: 406-409.
- Magalhães, P.C.; Durães, F.O. & Rodrigues, J.A.S. 2003. **Ecofisiologia**. EMBRAPA: Milho e sorgo. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/sorgo/paerea.htm>. (Acesso em: 9/10/2003).
- Mariano, R.L.R.; Lira, R.V.I.; Silveira, E.B. & Menezes, M. 1997. Levantamento de fungos endofíticos e epifíticos em folhas de coqueiro no Nordeste do Brasil. I. Frequência da população fúngica e efeito da hospedeira. **Agrotópica** **9**(3): 127-134.
- Menezes, M. & Silva-Hanlin, D.M.W. 1997. Microculturas. Pp. 79-80. In: M. Menezes & D.M.W. Silva-Hanlin (eds.). **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife, Imprensa Universitária da UFRPE.
- Mucciarelli, M.; Scannerini, S.; Berteza, C. & Maffei, M. 2003. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. **New Phytologist** **158**: 579-591.
- Neiroti, E. & Azevedo, I.L. 1988. Técnicas semiquantitativas de avaliação de produção de celulase em *Humicola* sp. **Revista de Microbiologia** **19**: 78-81.
- Pereira, J.O.; Carneiro-Vieira, M.L. & Azevedo, J.L. 1999. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** **15**: 37-40.
- Petrini, O.; Stone, J. & Carroll, F.E. 1992. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany** **60**: 789-796.
- Photita, W.; Lumyong, S.; Lumyong, P. & Hyde, K.D. 2001. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research** **105**(12): 1508-1513.
- Rodrigues, K.F. 1994. The foliar endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. **Mycologia** **86**(3): 376-385.
- Rodrigues, K.F. & Samuels, G.J. 1999. Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. **Journal of Basic Microbiology** **39**(2): 131-135.
- Rollof, S.; Hedstrom, S.A. & Nilsson-Ehle, P. 1987. Purification and characterization of a lipase from *Staphylococcus aureus*. **Bioquímica et Biophysica Acta** **921**: 363-369.
- Sarath, G.; De La Motte, R.S. & Wagner, F.W. 1989. Protease assay methods. Pp. 25-54. In: R.J. Beynon & J.S. Bonde (eds.). **Proteolytic enzymes: an practical approach**. Oxford, Oxford University Press.
- Silveira, E.B. 2001. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. Pp. 71-100. In: R. Barros & S.J. Michereff. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife, Imprensa Universitária da UFRPE.
- Silveira, E.B.; Gomes, A.M.A.; Mariano, R.L.R. & Silva Neto, E.B. 2004. Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira** **22**(2): 217-221.
- Varma, A.; Verma, S.; Sudah, S.N. & Franken, P. 1999. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology** **65**(6): 2741-2744.