

FUNGOS ENDOFÍTICOS DE RAÍZES DE SISAL ANTAGONISTAS AO *Aspergillus niger*

Eliane Leal Candeias¹, Maria Luíza do Carmo Santos¹, Elizabeth Amélia A. Duarte², Thiago Alves Santos de Oliveira², José Luiz Bezerra^{1,3}, Ana Cristina Fermino Soares¹

¹Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas/UFRB - agrcandeias@hotmail.com; mluizadocarmo@gmail.com; ferminosoares@gmail.com; ²PNPD-CAPES/UFRB - elizabethaad@gmail.com/oliveira.tas@gmail.com; ³Departamento de Micologia/UFPE- jlulabezerra@hotmail.com

O sisal é uma cultura de grande relevância para o semiárido brasileiro, sobretudo a Bahia, onde representa uma das principais fontes de renda local. A podridão vermelha, doença causada pelo fungo *Aspergillus niger* vem acometendo os plantios de sisal da Bahia ocasionando perdas de até 75% na produção. Desta forma, este trabalho objetivou selecionar fungos endofíticos isolados do sisal quanto ao seu potencial antagonico ao patógeno *A. niger*. Os fungos foram isolados, identificados e posteriormente submetidos a testes de antagonismo e patogenicidade. Sete gêneros endófitos de raízes de sisal foram identificados e entre estes, as espécies *Periconia* sp., *Chaetomium* sp.3, *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp.1 apresentaram antibiose ao *A. niger* em condições *in vitro*. Todos os isolados mostraram-se não patogênicos ao sisal.

Palavras-chave: *Agave sisalana*, biocontrole e patogenicidade

Endophytic fungi of sisal roots *Aspergillus niger* antagonists. The sisal is a very important crop for the Brazilian semi-arid region, especially in Bahia, which one of the main local source of income. The red rot disease caused by the fungus *Aspergillus niger* is affecting the sisal plantations of Bahia caused losses of up to 75% in production. Thus this work aims to select endophytic fungi isolated from sisal as potential antagonistics to the pathogen *A. niger*. The fungi were isolated, identified and subsequently subjected to antagonism and pathogenicity tests. Seven genera of endophytes from sisal roots were identified and among these species, *Periconia* sp., *Chaetomium* sp.3, *Cladosporium* sp. and *Penicillium* sp.1. Antibiosis showed antagonism to *A. niger* under *in vitro* conditions. All isolates were shown to be non-pathogenic to sisal.

Key words: *Agave sisalana*, biocontrol, pathogenic

Introdução

O gênero *Agave* possui aproximadamente 200 espécies, destas 150 são relatadas no México (Garcia-Mendoza, 2007). No Brasil, a espécie *Agave sisalana* Perrine ex Engelm é a mais cultivada por ser adaptada às condições edafoclimáticas do semiárido devido a sua rusticidade e resistência à seca. O sisal é cultivado em larga escala no nordeste brasileiro em condições adversas, locais de altitude de até 600 metros, com regime de precipitação máxima de 1200 mm ao ano e em solos alcalinos (Beltrão, 2006; Suinaga et al., 2006; Embrapa, 2010; Carneiro et al., 2014). A Bahia é o maior produtor e gera aproximadamente 90 toneladas de fibra (FAO, 2014). Porém, a produtividade do sisal na Bahia está sendo ameaçada pela doença podridão vermelha causada pelo *Aspergillus niger* Tieghem (Coutinho et al., 2006; Gama et al., 2015). Este patógeno é facultativo e no sisal a infecção é causada por lesões de origem mecânica e ou aberturas naturais na planta (Lima et al., 1998; Schuster et al., 2002).

Para este patossistema o controle biológico representa a alternativa mais viável do ponto de vista econômico e social, pois geralmente os produtos sintéticos são pouco eficientes no controle de doenças causadas por fungos de solo e são de difícil aplicação. Adicionalmente podem acarretar danos ao ambiente devido ao resíduo acumulado na área onde foram aplicados, inclusive lençóis freáticos, ocasionando modificações negativas na microbiota de ação benéfica (Kimati et al., 1995). Desta forma, o uso de um formulado biológico torna-se uma boa alternativa para controle de patógenos que vivem no solo a exemplo do *A. niger* em plantios de sisal (Ethur et al., 2007).

Neste contexto, o estudo com fungos endófitos são promissores para o controle biológico de fitopatógenos (Rodrigues & Samuels, 1999; Nalini et al., 2014; Amin et al., 2014), pois são considerados benéficos às plantas (Petrini, 1992). Quando presentes em determinadas fases do ciclo de vida da planta contribuem para o aumento da tolerância a estresses abióticos e na promoção do crescimento (Schulz et al., 2002; Zhang et al., 2014), uma vez que microrganismos endófitos atuam inibindo os patógenos por competição por nutrientes, parasitismo direto e pela produção de metabólitos (Grigoletti Jr et al., 2000; Rubini et al., 2005). Assim como podem estimular a planta a produzir

fitormônios, toxinas e substâncias promotoras de crescimento que estão relacionadas ao controle de fitopatógenos (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006; Azevedo & Araújo, 2007).

Portanto, este trabalho objetivou identificar e selecionar fungos endofíticos de raiz de sisal sem sintomas de podridão vermelha que apresentaram potencial para o biocontrole do patógeno *Aspergillus niger*.

Material e Métodos

Local de coleta

As coletas de raízes de sisal ocorreram em março de 2014 (período de chuvas ocasionais) no município Conceição do Coité, Bahia em uma fazenda produtora de sisal localizada a 11°40'0"S, 39°20'0"W, que foi dividida em quatro subáreas. Foram selecionadas dez plantas jovens de *A. sisalana*, sem sintomas de podridão vermelha, utilizando o método de caminhamento em "W" para o total de 40 amostras. O material biológico foi acondicionado sob refrigeração e encaminhado ao Laboratório de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas de Cruz das Almas-BA, onde foram processadas no tempo limite de 24h.

Isolamento dos fungos endófitos de raízes de sisal

As raízes foram cuidadosamente lavadas em água corrente e sabão neutro, sem causar ferimento. Fragmentos de 5 mm de comprimento dessas raízes foram retirados e desinfestados em álcool 70% (1 min.), hipoclorito de sódio (NaClO) a 1% (1 min.), novamente em álcool 70% (30 seg.) e posteriormente lavados em água destilada esterilizada. Prontamente, foram transferidos seis fragmentos para placas de Petri, com três repetições, contendo Batata-Dextrose-Ágar (BDA) com cloranfenicol (50 mg L⁻¹), incubadas à temperatura ambiente (25±2 °C) e verificadas diariamente por até 15 dias quanto ao crescimento de colônias fúngicas circundantes ao fragmento da raiz. Para o controle da assepsia, 50 L da última água de lavagem das raízes, foram plaqueados em BDA para a comprovação da desinfestação superficial (Pereira et al., 1993).

As culturas de todos os isolados obtidos foram preservadas em água esterilizada contidas em frasco de vidro (10 mL) pelo método de Castellani (1967), constando de duas réplicas para cada isolado.

Teste de patogenicidade, métodos e local de inoculação

Plantas de sisal jovens (12 meses após o plantio do bulbilho) e sem sintomas de podridão vermelha foram cultivadas e mantidas em casa de vegetação para o teste de patogenicidade com os isolados PS 8.1; PD 29.2; PD 44.2; PS 50.4; HS 52.3; HS 53.6; PD 62.8; PD 66.4; HD 71.1; HD 74.4 obtidos neste estudo e, com o patógeno *Aspergillus niger* (HD 71.4) da Coleção Micológica do Laboratório de Microbiologia, CCAAB da UFRB. Folhas foram destacadas e inoculadas no limbo e na bainha das superfícies adaxial e abaxial com e sem ferimento, utilizando disco de 5 mm de diâmetro de cada cultura fúngica. As folhas inoculadas foram incubadas em câmara úmida durante 72h a $25\pm 2^\circ\text{C}$ e observadas por oito dias quanto ao aparecimento de alguma lesão.

Identificação morfológica dos fungos endofíticos de sisal

O exame macroscópico das culturas constou na observação das seguintes características: coloração, forma e aspecto das colônias durante 10 dias de incubação a $28\pm 2^\circ\text{C}$ em meio BDA.

As observações microscópicas foram feitas em lâminas com e sem corante azul de algodão. As imagens foram capturadas utilizando o equipamento e Leica ICC 50 HD acoplado ao Leica DM 750, respectivamente. As estruturas encontradas foram identificadas utilizando a literatura específica (Ellis, 1971; Sutton, 1980; Sivanesan, 1984; Domsch et al., 1993) e outras.

Teste de antagonismo

Os mesmos isolados utilizados no teste de patogenicidade foram submetidos ao teste de antagonismo pelo método de pareamento em placa de Petri com meio BDA, perfazendo um total de cinco repetições, incluindo o controle com cultura pura. Os fungos endofíticos candidatos a biocontroladores foram confrontados com *A. niger* (HD 71.4). As placas foram incubadas em BOD a $25\pm 2^\circ\text{C}$ e após 48h o raio

das colônias dos fungos foi medido em dois sentidos diametralmente opostos com paquímetro digital. A área do crescimento micelial foi obtida pela fórmula: $S = \pi \times r_1 \times r_2$. Sendo: S = área do crescimento micelial; r_1 = raio 1; r_2 = raio 2. A área foi transformada em porcentagem de crescimento micelial e foram agrupados em classe segundo escala de notas de Bell et al. (1982) (Tabela 1). Adicionalmente foi avaliado o tipo de interação entre os isolados de fungos endofíticos e o patógeno *A. niger* utilizando a classificação de Moore-Landecker (1996).

Tabela 1. Escala de notas com atribuição do grau de crescimento micelial dos candidatos a biocontroladores em direção ao fitopatógeno (Bell et al., 1982)

Notas	Grau de crescimento do antagonista sobre o fungo fitopatogênico no meio de cultura
Nível 1	O antagonista cobriu 100% da superfície da placa. Supressão total do crescimento micelial por parte do antagonista.
Nível 2	O antagonista cobriu 75% da superfície da placa.
Nível 3	Antagonista e fitopatógeno colonizam cada um 50% da superfície da placa.
Nível 4	O antagonista cobriu ao menos 25% da superfície da placa.
Nível 5	O fitopatógeno cobriu a totalidade da superfície, anulando o antagonista. Ausência de supressão micelial por parte do antagonista.

Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com dez tratamentos e cinco repetições, em que cada repetição é composta por uma placa de Petri. As medias da área de crescimento micelial foram submetidas à análise de variância, sendo a separação de medias efetuada pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando o programa SISVAR 5.3 (Ferreira, 2011).

Resultados e Discussão

Teste de patogenicidade, métodos e local de inoculação

Todos os isolados inoculados, inclusive o de *A. niger* foram incapazes de penetrar o tecido com a superfície intacta (sem ferimento), independentemente do local de inoculação (limbo e bainha da folha nas faces

adaxial e abaxial). É possível deduzir que esses fungos são incapazes de produzir a enzima cutinase que rompe a cutícula de vegetais permitindo assim a penetração do patógeno na ausência de ferimentos (Nery-Silva et al., 2007).

Para todos os tratamentos onde foram realizados ferimentos (injúria física) somente *A. niger* causou lesões independente do local de inoculação (Tabela 2). Portanto, mesmo fornecendo o micélio ativo com esporos do fungo sobre o ferimento os isolados de fungos endofíticos não foram patogênicos ao sisal.

Os fungos fitopatogênicos são capazes de infectar os tecidos foliares via penetração pela superfície adaxial, abaxial ou ambas (Agrios, 2005). As injúrias provocadas na folha facilitaram a penetração do patógeno (*A. niger*) e, portanto, o processo de infecção ocorreu precocemente neste tratamento. Como nos tratamentos sem ferimento não houve infecção por nenhum dos isolado, nem mesmo do patógeno, acredita-se que houve aumento da atividade metabólica das células com ferimento que permitiu ao patógeno penetrar e causar lesões (Guzmán et al., 1999).

Os fungos endofíticos podem permanecer em estágio de latência em algum momento do ciclo de vida das plantas e em certas circunstâncias podem atuar como patógenos da cultura (Wilson, 1995; Ragazzi et al., 2001; Cheplick & Faeth, 2009). O fato dos fungos candidatos a antagonista não terem sido capazes de causar lesões nas folhas destacadas de sisal sem ferimentos, indica que eles podem continuar sendo

Teste de antagonismo

Todos os isolados testados mostraram algum tipo de antagonismo ao *A. niger*, com predominância de antibiose e impasse (Tabela 3).

Dos dez isolados que foram submetidos ao teste de antagonismo apenas *Fusarium* sp. mostrou-se estatisticamente superior quando comparado com os demais isolados. Este fungo apresentou 71% de crescimento micelial em placa, sendo classificado como nível 2 na escala de Bell et al. (1982), que constitui a ocupação de 2/3 da placa pelo antagonista. Tal comportamento pode ser atribuído à competição por espaço e por nutrientes presentes no meio de cultura e/ou ao hiperparasitismo (Vinale et al., 2008; Carvalho et al., 2011). Os fungos do gênero *Fusarium* são geralmente encontrados como patógenos, porém a espécie *Fusarium oxysporum* também foi isolada como endofítica de raízes de *Vitis labrusca* cv. Isabel (Lima et al., 2014). Os fungos selecionados para o biocontrole podem produzir substâncias ativas que interferem no crescimento, assim o uso destes micro-organismos constitui fonte promissora de princípios ativos com potencial para substituição dos fungicidas (García et al., 2014).

Embora os demais fungos endofíticos tenham demonstrado menor crescimento micelial quando comparado com o patógeno, isso não descarta a possibilidade destes micro-organismos atuarem como agente biocontrolador. Evidenciando a necessidade de ajuste temporal entre o estabelecimento do antagonista em relação ao patógeno, por exemplo. Ou, ainda, na baixa competitividade na colonização do meio em relação ao fitopatógeno.

Nos confrontos realizados entre *Periconia* sp., *Chaetomium* sp. 3, *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp.1 com o *A. niger* foi observada pouca eficiência na competição por espaço (Tabela 3). Contudo estes antagonistas produziram substâncias inibidoras que foram liberadas no meio, as quais podem apresentar importância biotecnológica, como produção de antibióticos e outras substâncias bioativas.

Estudos adicionais são requeridos para estes fungos, uma vez que o

Tabela 2. Teste de patogenicidade dos isolados endofíticos provenientes do sisal

Isolados	Sem Ferimento				Com Ferimento			
	LAB	LAD	BAB	BAD	LAB	LAD	BAB	BAD
PS 8.1	-	-	-	-	-	-	-	-
PD 29.2	-	-	-	-	-	-	-	-
PD 44.2	-	-	-	-	-	-	-	-
PS 50.4	-	-	-	-	-	-	-	-
HS 52.3	-	-	-	-	-	-	-	-
HS 53.6	-	-	-	-	-	-	-	-
PD 62.8	-	-	-	-	-	-	-	-
PD 66.4	-	-	-	-	-	-	-	-
HD 71.1	-	-	-	-	-	-	-	-
HD 74.4	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	-	-	-	-	+	+	+	+

LAB: limbo/abaxial; LAD: limbo/adaxial; BAB: bainha/abaxial; BAD: bainha/adaxial; (+) apresentou lesão; (-) não apresentou lesão.

Tabela 3. Controle biológico *in vitro* de isolados de fungos endofíticos do sisal versus ao *Aspergillus niger*, agente etiológico da podridão vermelha

Isolado	Gênero	Interação ¹	Crescimento micelial (%) ²	Escala de Bell ³
PS 8.1	<i>Fusarium</i> sp.	Impasse	71,48 d	2
PD 29.2	<i>Penicillium</i> sp.1	Antibiose	47,40 c	3
PD 44.2	<i>Chaetomium</i> sp.1	Impasse	52,40 c	3
PS 50.4	<i>Penicillium</i> sp.2	Impasse	37,96 b	4
HS 52.3	<i>Periconia</i> sp.	Antibiose	39,07 b	4
HS 53.6	<i>Chaetomium</i> sp.2	Impasse	49,81 c	3
PD 62.8	<i>Chaetomium</i> sp.3	Antibiose	24,25 a	4
PD 66.4	<i>Phaeosclera</i> sp.	Entrelaçamento hifas	34,63 b	4
HD 71.1	<i>Cladosporium</i> sp.	Antibiose	22,77 a	4
HD 74.4	<i>Myceliophthora</i> sp.	Sobreposição	41,84 b	4
C.V%			7,44	

¹Classificação de interação antagonista segundo Moore-Landecker (1996). ²As médias de crescimento micelial, seguidas de letras iguais, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. ³ Grau de crescimento micelial dos antagonistas segundo escala de Bell et al., (1982).

potencial de biocontrole de *Penicillium oxalicum* foi reportado inibindo crescimento de *Verticillium dahliae* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em condições controladas e de campo em tomateiro (Larena et al., 2003; Sabuquillo et al., 2006). Espécies de *Penicillium* endófitas foram isoladas de folhas, frutos, raiz e caule de *Melia azedarach* (Santos et al., 2003; Marinho et al., 2007; Marinho et al., 2009) e *Genipa americana* e *Zea mays* (Sousa et al., 2013). Assim como isolados de *Periconia* sp. que também são reportados como endofíticos com potencial controle de doenças de plantas (Turhan, 1993).

Os fungos *Myceliophthora* sp. e *Phaeosclera* sp. possuem clamidósporos, estruturas de resistência que viabilizam a sobrevivência dessas espécies no solo e nos restos de cultura por muito tempo. Característica importante para os fungos que apresentam potencial ao biocontrole (Bettiol, 1995).

Os isolados de *Chaetomium* sp. 1 e 2 foram estatisticamente diferentes dos demais com crescimento de colônia de 52% e 50% respectivamente, obtendo nota 3 onde o antagonista e fitopatógeno colonizam cada um 50% da superfície da placa. Espécies pertencentes ao gênero *Chaetomium* são citadas como sendo eficientes no controle biológico de fitopatógenos (Soytong et al., 2001; Reissinger et al., 2003), apresentando inibição contra *Helminthosporium*, *Pythium ultimum*, *Alternaria raphani*, *A.*

brassicicola e *Phytophthora* (Soytong et al., 2001). Apesar do *Cladosporium* sp. demonstrar-se estatisticamente inferior quando comparado aos demais fungos testados, foi verificado baixo poder de colonização do meio de cultura (crescimento lento) quando comparado com o patógeno, entretanto foi observado halo de inibição no pareamento com *A. niger*. A ação de antibiose de *Cladosporium* é decorrente da produção de um composto químico denominado cladosporol. Este composto foi primeiramente isolado por Sakagami et al. (1995) e é responsável pela inibição da síntese de α -1,3 glucano. Estudos com

cladosporol purificado demonstraram má formação de hifas de *Phytophthora capsici* (Sakagami et al., 1995) e diminuição na germinação de esporos da ferrugem causada por *Uromyces appendiculatus* (Nasini et al., 2004).

Fungos do gênero *Cladosporium* são conhecidos por atuarem na melhoria da qualidade de café, pois estes micro-organismos estão presentes nos grãos que proporcionam os melhores sabores deste produto (Pereira et al., 2005). Espécies pertencentes a *Cladosporium* são comumente encontradas habitando a superfície das folhas e nos tecidos internos de folhas jovens e maduras (Sadaka & Ponge, 2003). *Cladosporium tenuissimum* foi isolado como endofítico em folhas de *Eucalyptus nitens* (Fisher et al., 1995) e de *Vitis labrusca* cv. Isabel (Lima et al., 2014). Espécies desse gênero são encontradas atuando como saprófitas, contaminantes do ar e alimentos, possuindo ação biológica admirável na degradação de material vegetal e desempenhando ação competitiva com alguns micro-organismos (Domsch et al., 1993; Ellis, 1971; Samson et al., 2000; Pereira et al., 2005).

Doenças causadas por fungos de solo são mais difíceis de serem controladas por se tratar de um ambiente muito complexo. O uso de produtos sintéticos não oferecem eficiência no controle, pois a aplicação é dificultada, podendo interferir negativamente na microbiota de ação benéfica e causar danos ao

ambiente, devido ao resíduo acumulado na área. Desta forma o uso de um formulado biológico torna-se uma boa alternativa para controle de patógenos que vivem no solo a exemplo o *A. niger* em plantios de sisal (Ethur et al., 2007).

Conclusão

Periconia sp., *Chaetomium* sp.3, *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp.1, apresentaram antibiose contra *A. niger*, necessitando de estudos mais aprofundados, em condições de campo para avaliar a sua eficácia no biocontrole do agente etiológico da podridão vermelha do sisal. Estes fungos mostraram-se não patogênicos para o sisal.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas de estudos dos autores envolvidos no trabalho e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro ao projeto.

Literatura Citada

- AGRIOS, G. N. 2005. Plant Pathology. New York, Elsevier Academic Press. 922p.
- AMIN, N. et al. 2014. Isolation and identification of endophytic fungi from cocoa plant resistant VSD M.05 and cocoa plant susceptible VSD M.01 in South Sulawesi, Indonesia. International Journal Current Microbiology and Applied Sciences 3: 459-67.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. 2007. Endophytic fungi of tropical plants: diversity and biotechnological aspects. In: Ganguli, B.N.; Deshmukh, S. K. Fungi multifaceted microbes. New Delhi, Anamaya Publishers. pp.189-207.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72:379-382.
- BELTRÃO, N. E. M. 2006. A planta. In: Andrade, W. O Sisal do Brasil. 1ª ed. Salvador, BA, SINDIFIBRAS; Brasília, DF, APEX-Brasil. pp.25-28.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. 1995. Controle biológico. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3ed. São Paulo, SP, Agronômica Ceres. pp. 717-727.
- CARNEIRO, F. S. et al. 2014. Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine indução, caracterização anatômica e regeneração. Pesquisa Agropecuária Tropical (Brasil) 44: 294-303.
- CARVALHO, D. D. C. et al. 2011. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. Tropical Plant Pathology 36:28-34.
- CASTELLANI, A. 1967. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. Journal Tropical Medicine and Hygiene 70:181-184.
- CHEPLICK, G. P.; FAETH, S. H. 2009. Ecology and evolution of the Grass-Endophyte Symbiosis. Oxford, Oxford University Press. 256p.
- COUTINHO, W. M. et al. 2006. A podridão do tronco do sisal. Campina Grande, PB, EMBRAPA ALGODÃO, Comunicado Técnico n. 281. 4p.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. 1993. Compendium of soil fungi. Federal Republic of Germany, IHV-Verlag. 859p.
- ELLIS, M. B. 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Wallingford, CAB International. 608 p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). 2010. Informações gerais sobre o sisal. Disponível em: <www.cnpa.embrapa.br>. Acesso em: 14 Jun. 2014.
- ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZI, M. F. B. 2007. Seleção de antagonistas fúngicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato comercial para mudas. Ciência Rural (Brasil) 37:1794-1797.
- FERREIRA, D. F. 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia (Brasil) 35:1039-1042.

- FISHER, P. J. et al. 1995. A study of fungal endophytes in leaves, stems and roots of *Gynoxis oleifolia* a Muchler (Compositae) from Ecuador. *Nova Hedwigia* 60:589-594.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). 2014. FAO STAT database. <http://faostat.fao.org/>. Accessed 13 de Jun. de 2014 FHB (2011) edn. Brasília Farmacopéia Homeopática Brasileira, 3rd.
- GAMA, E. S. V. et al. 2015. Homeopathic drugs to control red rot disease in sisal plants. *Agronomy for Sustainable Development* 35:649-656.
- GARCIA-MENDOZA, A. J. 2007. Los Agaves de México. *Ciencias (Mexico)* 87:14-23.
- GARCÍA, S. D. G.; LORZA, A. R.; PELÁEZ, C. A. 2014. Antimicrobial activity of extracellular metabolites from antagonistic bacteria isolated from potato (*Solanum phureja*) crops. *Summa Phytopathologica (Brasil)* 40:212-220.
- GRIGOLETTI, J. R. A.; FIGUEREDO, A.; GARCÍA, C. 2000. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. *Revista Floresta (Brasil)* 30:155-165.
- GUZMÁN, I. L.; CANTWELL, M.; BARRETT, D. M. 1999. Fresh-cut cantaloupe: effects of CaCl_2 dips and heat treatments on firmness and metabolic activity. *Postharvest Biology and Technology* 17:201-213.
- KIMATI, H. 1995. Controle químico. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorin, L. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 3ed. São Paulo, SP, Agronômica Ceres. pp.761-785.
- LARENA, I. et al. 2003. Biocontrol of *Fusarium* and *Verticillium* wilt of tomato by *Penicillium oxalicum* under greenhouse and field conditions. *Journal of Phytopathology* 151:507-512.
- LIMA T. E. F. et al. 2014. Endophytic fungi from leaves and roots of *Vitis labrusca* cv. Isabel in Pernambuco/Brazil. *Sydowia* 66:115-128.
- LIMA, E. F. et al. 1998. Podridão vermelha do tronco do sisal (*Agave sisalana* Perr.) causada por *Botryodiplodia theobromae* Pat. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas* 2:109-112.
- MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; RODRIGUES FILHO, E. 2007. Constituintes químicos de *Penicillium* sp. um fungo endofítico isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae). *Revista Ciências Exatas e Naturais (Brasil)* 9:189-200.
- MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S.; RODRIGUES FILHO, E. 2009. Esteroides produzidos por *Penicillium herquei*, um fungo endofítico isolado dos frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae). *Química Nova (Brasil)* 32:1710-1712.
- MOORE-LANDECKER, E. 1996. Fundamentals of the fungi. New Jersey, Prentice-Hall. 574p.
- NALINI, M. S.; SUNAYANA, N.; PRAKASH, H. S. 2014. Endophytic fungal diversity in medicinal plants of Western Ghats, India. *International Journal of Biodiversity* doi.org/10.1155/2014/494213.
- NASINI, G. et al. 2004. Secondary mould metabolites of *Cladosporium tenuissimum*, a hyperparasite of rust fungi. *Phytochemistry* 65:2107-2111.
- NERY-SILVA, F. A. et al. 2007. Metodologia de inoculação de fungos causadores da podridão peduncular em mamão *Ciência e Agrotecnologia (Brasil)* 31:1374-1379.
- PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. 1993. Endophytic fungi of *Stylosanthes*. *Mycologia* 85:362-364.
- PEREIRA, R. T. G.; PFENNING, L. H.; CASTRO, H. A. 2005. Caracterização e dinâmica de colonização de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries em frutos do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). *Ciência e Agrotecnologia (Brasil)* 29:1112-1116.
- PETRINI, O. et al. 1992. Ecology, metabolite production and substrat utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins* 1:185-196.
- RAGAZZI, A. et al. 2001. Endophytic fungi in *Quercus cerris*: isolation frequency in relation to phenological phase, tree health and the organ affected. *Phytopathologia Mediterranea* 40:165-171.
- REISSINGER, A. et al. 2003. Infection of barley roots by *Chaetomium globosum*: evidence for a

- protective role of the exodermis. *Mycological Research* 107:1094-1102.
- RODRIGUES, K. F.; SAMUELS, G. J. 1999. Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. *Journal Basic of Microbiology* 2:131-135.
- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:827-837.
- RUBINI, M.R. et al. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal Biology Science* 1:24-33.
- SABUQUILLO, P.; DE CAL, A.; MELGAREJO, P. 2006. Biocontrol of tomato wilt by *Penicillium oxalicum* formulations in different crop conditions. *Biological Control* 37:256-265.
- SADAKA, N.; PONGE, J. F. 2003. Fungal colonization of phyllosphere and litter of *Quercus rodundifolia* Lam. in a holm oak forest (High Atlas, Marocco). *Biology and Fertility of Soils* 39:30-36.
- SAKAGAMI, Y. et al. 1995. Cladosporol, a 1,3-glucan biosynthesis inhibitor, isolated by the fungus *Cladosporium cladosporioides*. *Tetrahedron Letters* 36:469-1472.
- SAMSON, R. A. et al. 2000. Introduction to food and air-borne fungi. Baarn, CBS. 389p.
- SANTOS, R. M. G. et al. 2003. *World journal of microbiology and biotechnology* 19:767-770.
- SCHULZ, B. et al. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biological active secondary metabolites. *Mycological Research* 106:996-1004.
- SCHUSTER, E. et al. 2002. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59:426-435.
- SIVANESAN A. 1984. The bitunicate Acomycetes and their anamorphs. *Journal Cramer*. 701p.
- SOYTONG, K. et al. 2001. Application of *Chaetomium* species (Ketomium®) as a new broad spectrum biological fungicide for plant disease control. *Fungal Diversity* 7:1-15.
- SOUSA, K. A. O. et al. 2013. Estudo do potencial de fungos endofíticos no controle do agente causal da fusariose em tomateiro. *Agroecossistemas* 5:50-55.
- SUINAGA, F. A.; SILVA, O. R. R. F.; COUTINHO, W. M. 2006. A história. In: Andrade, W. O *Sisal do Brasil*. 1.ed. Salvador, BA, SINDIFIBRAS; Brasília, APEX-Brasil. pp.19-21.
- SUTTON, B. C. 1980. The Coelomycetes. Kew, England. Commonwealth Mycological Institute. 696p.
- TURHAN G. 1993. Mycoparasitism of *Alternaria alternata* by an additional eight fungi indicating the existence of further unknown candidates for biological control. *Journal of Phytopathology* 138:238-292.
- VINALE, F. et al. 2008. Trichoderma plant pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1-10.
- ZHANG, D. et al. 2014. Periconianone A, a new 6/6/6 carbocyclic sesquiterpenoid from endophytic fungus *Periconia* sp. with neural anti-inflammatory activity. *Organic Letters*, doi: 10.1021/ol500197x.
- WILSON, D. 1995. Endophyte: The evolution of a term and clarification of its use and definition. *Oikos* 2: 274-276.

