



Sara Daniela da Costa Dias **A microbiota endofítica de *Pinus* spp. como fonte de agentes de biocontrolo contra *Fusarium circinatum***

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2017

Sara Daniela da Costa Dias **A microbiota endofítica de *Pinus* spp. como fonte de agentes de biocontrolo contra *Fusarium circinatum***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves, investigador principal do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro da FCT e do FEDER através do programa COMPETE no âmbito do projeto de investigação URGENTpine.

PTDC/AGR-FOR/2768/2014
POCI-01-0145-FEDER-016785

Cofinanciado por:



FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

Dedico este trabalho aos meus pais e à minha irmã.

o júri

presidente

Doutora Isabel da Silva Henriques
investigadora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Glória Catarina Cintra da Costa Pinto
professora auxiliar convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves
investigador principal do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço ao Doutor Artur Alves, por me ter integrado no seu grupo de trabalho e pela disponibilidade e orientação nesta dissertação. Admiro imenso o seu trabalho e a agradeço toda a sabedoria transmitida.

Agradeço à Doutora Anabela Lopes e Marta Alves pelos seus ensinamentos, disponibilidade e paciência.

Agradeço a toda a equipa do Microlab, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigada por serem pessoas incríveis, lutadoras e inteiramente prestáveis. Obrigada por tudo!

Agradeço ao meu amigo Hélio por ter sido uma peça fundamental na realização desta dissertação. Obrigada por toda a ajuda que me deste, pela paciência, pela companhia no laboratório, pelas tardes e noites de estudo, por toda a dedicação. Obrigada!

Agradeço às minhas amigas “Primas da Bianchi”, por toda a força e apoio que me deram. Vocês são como família. Obrigada por toda a preocupação e espero que isto seja motivo para mais um dos nossos eventos!

Um obrigado especial à Beatriz Pereira por todas as dúvidas esclarecidas pelo whatsapp e horas perdidas a aturar-me.

Ao meu amigo Paladino, que mesmo estando longe nunca deixou de me acompanhar e ajudar. Um especial obrigado pelos teus serviços prestados.

Aos meus queridos pais pela enorme paciência, ajuda e dedicação. Sem vocês isto nunca teria sido possível. Um grande obrigado!

À minha irmã que me apoiou bastante e me ajudou sempre que possível.

Obrigada minha princesa pelas horas de sono que abdicaste para mim.

Um especial obrigado ao meu namorado pelo carinho, amor e ajuda. Obrigada por toda a força dada, por todas as palavras ditas, pela paciência e por ouvires as minhas lamentações. Enfim, obrigada por tudo! Foste sem dúvida o meu grande pilar.

palavras-chave

Cancro resinoso do pinheiro, controlo biológico, *Fusarium circinatum*, microrganismos endofíticos, *Pinus* spp..

resumo

Fusarium circinatum (= *Gibberella circinata*) é o agente responsável pelo cancro resinoso do pinheiro, que afeta diversas espécies de *Pinus*, e também *Pseudotsuga menziesii*.

Este fungo é considerado um organismo patogénico de quarentena e representa uma grande ameaça para as florestas (naturais e plantadas) de *Pinus* spp., uma vez que causa redução no crescimento e qualidade da madeira e provoca uma elevada taxa de mortalidade.

O objetivo deste trabalho foi analisar a comunidade endofítica de três espécies de *Pinus* (*P. pinaster*, *P. pinea* e *P. nigra*) e avaliar a presença de potenciais agentes de biocontrolo contra *F. circinatum*. O biocontrolo é bastante importante, no sentido que é uma técnica que utiliza meios naturais, de forma a reduzir a população de organismos considerados pragas. Através de metodologias dependentes do cultivo foram obtidos 34 isolados de fungos endofíticos e todos foram testados quanto à sua capacidade de inibir o crescimento do micélio de *F. circinatum* em contato direto. Destes isolados 7 apresentaram resultado positivo. Assim, os isolados com atividade foram identificados através da amplificação da região ITS do cistrão ribossomal. A identificação mostrou que pertencem aos géneros *Nemania*, *Plectania*, *Fusarium*, *Xylaria*, *Rosellinia* e *Microdiplodia*.

Estes sete isolados foram avaliados quanto à sua capacidade de inibição de *F. circinatum* por produção de compostos orgânicos voláteis, não tendo sido obtido resultado positivo para nenhum dos isolados testados.

Cada um destes fungos endofíticos foi ainda caracterizado quanto à sua capacidade de produzir enzimas extracelulares, nomeadamente amilase, protease, lipase, pectinase, celulase, xilanase, urease e de lacase. Nenhum isolado revelou a capacidade de produzir todas as atividades. As atividades mais frequentes entres os isolados foram amilase, celulase e lipase. Nenhum isolado produziu pectinase e urease.

Adicionalmente, foi avaliada a capacidade antagonica de 139 bactérias endofíticas isoladas de diferentes espécies de *Pinus*, contra *F. circinatum*, das quais 5 conseguiram inibir o seu crescimento. Estas pertencem aos géneros *Bacillus* e *Moraxella*.

Os resultados obtidos mostram que a microbiota endofítica de *Pinus* spp. possui potenciais agentes de biocontrolo (fungos e bactérias) contra *F. circinatum*. No entanto, são necessários mais estudos para conhecer o seu mecanismo de acção bem como para avaliar o seu efeito *in vivo*.

keywords

Pitch canker disease, biological control, *Fusarium circinatum*, endophytic microorganisms, *Pinus* spp.

abstract

Fusarium circinatum (= *Gibberella circinata*) is the agent responsible for pitch canker, which affects several species of *Pinus* and *Pseudotsuga menziesii*. This fungus is considered a quarantine pathogen and represents a major threat to natural and planted pine forests, since it causes a reduction in the growth and quality of the wood and a high mortality rate.

The aim of this study was to analyze the endophytic community of three pine species (*P. pinaster*, *P. pinea* and *P. nigra*) and evaluate the presence of potential biocontrol agents against *F. circinatum*. Biocontrol is very important, in the sense that it's a technique that uses natural means, in order to reduce the population of organisms considered pests. By means of culture-dependent methodologies 34 isolates of endophytic fungi were obtained and all of them tested for the ability to inhibit the growth of the mycelium of *F. circinatum* in direct contact. Of these isolates seven showed positive results. Thus, the isolates with activity were identified by the amplification of the ITS region of the ribosomal cistron. The identification showed that they belong to the genera *Nemania*, *Plectania*, *Fusarium*, *Xylaria*, *Rosellinia* e *Microdiplodia*.

These seven isolates were further evaluated for their ability to inhibit *F. circinatum* by production of volatile organic compounds, and no positive results were obtained for any of the isolates tested.

Each of these endophytic fungi was also characterized for the ability to produce extracellular enzymes, namely amylase, protease, lipase, pectinase, cellulase, xylanase, urease and laccase. None of the isolates showed the ability to produce all the activities. The most frequent activities among the isolates were amylase, cellulase and lipase. No isolate produced pectinase and urease.

In addition, the antagonistic capacity of 139 endophytic bacteria isolated from different species of *Pinus*, against *F. circinatum* was evaluated. Of these, five were able to inhibit its growth. These belong to the genera *Bacillus* and *Moraxella*.

The results obtained show that the endophytic microbiota of *Pinus* spp. harbours potential biocontrol agents (fungi and bacteria) against *F. circinatum*. However, more studies are needed to understand their mode of action as well as their effect *in vivo*.

ÍNDICE

I.	Índice de Figuras	V
II.	Índice de Tabelas.....	IX
III.	Lista de Abreviaturas	XI
1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Floresta em Portugal	3
1.2	Cancro resinoso do pinheiro	4
1.3	Controlo da Doença	8
1.4	Controlo Biológico	10
2.	OBJETIVOS	15
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	Recolha de amostras	21
3.2	Isolamento de fungos endofíticos	21
3.3	Isolamento do fungo patogénico	21
3.4	Isolamento de bactérias endofíticas	22
3.5	Testes de antagonismo	22
3.5.1	Teste de antagonismo direto – fungos endofíticos vs <i>Fusarium circinatum</i>	22
3.5.2	Teste de inibição por compostos orgânicos voláteis	23
3.5.3	Teste de antagonismo direto – bactérias endofíticas vs <i>Fusarium circinatum</i>	24
3.6	Deteção de atividade enzimática extracelular	25
3.6.1	Meios de cultura	25
3.6.2	Deteção de atividades enzimáticas extracelulares	29
3.7	Identificação de fungos endofíticos	32
3.7.1	Extração de DNA genómico.....	32
3.7.2	Armazenamento de culturas	34
3.7.3	Amplificação da região ITS	34
3.7.4	Visualização do DNA.....	35
3.7.5	Purificação dos produtos de amplificação.....	35
3.7.6	Determinação da sequência nucleotídica	35
3.7.7	Análise computacional	35
4.	RESULTADOS	37
4.1	Recolha de amostras	39
4.2	Teste de antagonismo de fungos endofíticos	39

4.2.1	Teste de antagonismo direto – fungos endofíticos vs <i>F. circinatum</i>	39
4.2.2	Teste de inibição por compostos orgânicos voláteis	41
4.3	Identificação de fungos endofíticos	41
4.3.1	Amplificação da região ITS	41
4.3.2	Determinação da sequência nucleotídica	42
4.4	Caraterização da atividade enzimática extracelular	43
4.4.1	Deteção de atividades enzimáticas extracelulares	43
	44
4.5	Teste de Antagonismo de bactérias endofíticas	48
5.	DISCUSSÃO.....	49
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS	61
7.	BIBLIOGRAFIA.....	65
8.	ANEXOS.....	81
	ANEXO I:	83
8.1	Extração de DNA- soluções stock.....	83
8.1.1	Tampão TES.....	83
8.1.2	Cloreto de sódio (NaCl)	83
8.1.3	Brometo de Cetiltrimetilamónio (CTAB)	83
8.1.4	Acetato de Amónio (NH ₄ OAC)	84
8.1.5	Tampão TE.....	84
8.2	Gel de agarose	84
	ANEXO II:	85
8.3	Crescimento de patógenios em meio sólido	85
8.4	Crescimento de fungos endofíticos em meio sólido.....	85
8.5	Crescimento de bactérias endofíticas em meio sólido.....	85
8.6	Testes de antagonismo	85
8.6.1	Teste de antagonismo direto – fungos endofíticos vs <i>Fusarium circinatum</i>	85
8.6.2	Testes de antagonismo direto – bactérias endofíticas vs <i>Fusarium circinatum</i> ..	86
8.6.3	Testes de inibição por compostos orgânicos voláteis.....	87
	ANEXO III:.....	88

I. Índice de Figuras

Figura 1 - Distribuição das áreas totais por espécie/grupo de espécies (ICNF,2013).	3
Figura 2 - Ciclo de infecção de <i>Fusarium circinatum</i> em campo e plantações (Conejero, 2013)..	7
Figura 3 - Desenho esquemático do teste de antagonismo direto.	23
Figura 4 - Desenho esquemático do teste de inibição por compostos orgânicos voláteis.	24
Figura 5 - Resultado do teste de antagonismo direto entre os fungos endofíticos (P5; N2I1; N4I; B5I; P3; N4III; P2) e <i>F. circinatum</i> , obtidos através do programa GraphPad 5. A inibição micelial foi determinada por co-cultura, a 25°C durante um período de 15 dias, através da medição do raio de crescimento de cada fungo endofítico e de <i>F. circinatum</i> . Os dados são apresentados como média \pm desvio.	40
Figura 6 - Registo fotográfico do teste de antagonismo direto. Crescimento do micélio de <i>Fusarium Circinatum</i> , controlo (A). Crescimento de fungo endofítico N2I1 (B), N4III (C), B5I (D), P3 (E), P5 (F), N4I (G) e P2 (H). Crescimento do micélio de <i>F. circinatum</i> e de cada fungo endofítico medido após 15 dias de inucação a 25°C.	41
Figura 7 - Imagem ilustrativa do resultado negativo do teste de inibição por compostos orgânicos voláteis. Crescimento do isolado B5I (A) e respetiva placa sobreposta contendo <i>Fusarium Circinatum</i> (A1). B5I (A) não inibiu o crescimento de <i>F. circinatum</i> , após 7 dias de incubação a 25°C.	41
Figura 8 - Imagem obtida por análise do gel de agarose, resultante da aplicação da técnica de ITS-PCR.	42
Figura 9 - Desenho esquemático da posição dos primers ITS5 e NL4.	42
Figura 10 - Fotografia do isolado N2I1 produtor de celulase (A) e amilase (B).	44
Figura 11 - Fotografia do isolado P5 produtor de lipase (A), protease (B), amilase (C), celulase (D) e lacase (E).	44
Figura 12 - Fotografia do isolado N4I produtor de lipase (A), celulase (B), amilase (C) e xilanase (D).	44
Figura 13 - Fotografia do isolado B5I produtor de lipase (A), celulase (B) e amilase (C).	44
Figura 14 - Fotografia do isolado P2 produtor de lipase (A) e amilase (B).	44
Figura 15 - Fotografia do isolado P3 produtor de lipase (A), xilanase (B) e amilase (C).	45
Figura 16 - Fotografia do isolado N4III produtor de celulase (A).	45
Figura 17 – Representação estatística da atividade enzimática obtida através do programa GraphPad 5. Índice enzimático referente à atividade celulolítica (A). N2I1 (69.35%); P5 (85.23%); N4I (61.69%); B5I (65.24%); N4III (66.90%). Índice enzimático referente à atividade amilolítica (B). N2I1 (63.12%); P5 (92.11%); N4I (65.05%); B5I (33.99%); P2 (61.98%); P3 (73.09%).	47

Figura 18 - Representação estatística da atividade enzimática obtida através do programa GraphPad 5. Índice enzimático referente à atividade da lacase (C). P5 (97.71%). Índice enzimático referente à atividade lipolítica (D). N4I (69.35%); P5 (70.23%); B5I (74.45%); P2 (79.78%); P3 (55.75%).....	47
Figura 19 - Representação estatística da atividade enzimática obtida através do programa GraphPad 5. Índice enzimático referente à atividade proteolítica (E). P5 (88.80%). Índice enzimático referente à atividade xilanolítica (F). N4I (98.84%); P3 (97.44%).....	47
Figura 20 - Registo fotográfico do teste de antagonismo direto. Crescimento de bactérias endofíticas 36. (I), 37. (J), 25. (K), 35. (L), 80. (M) em contato direto com <i>F. circinatum</i> , em meio de cultura PCA. Crescimento de <i>F. circinatum</i> e de cada bactéria endofítica medido ao 20º dia de incubação a 25°C.	48

II. Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição do meio da lipase.	26
Tabela 2 - Composição do meio do amido.	26
Tabela 3 - Composição do meio de Skim Milk.	27
Tabela 4 - Composição do meio de pectina.	27
Tabela 5 - Composição do meio da xilanase	28
Tabela 6 - Composição do meio da urease.	28
Tabela 7 - Composição do meio de celulase.	29
Tabela 8 - Composição do meio da lacase.	29
Tabela 9 - Identificação de cada isolado do pinheiro com base na sua sequência nucleotídica e o hospedeiro do qual foi isolado.	43
Tabela 10 - Presença ou ausência das várias enzimas extracelulares, nos isolados em estudo.	46
Tabela 11 - Identificação de bactérias endofíticas que apresentaram atividade antagonista contra <i>Fusarium circinatum</i> , no teste de antagonismo direto.	48
Tabela 12 - Preparação do tampão TES.	83
Tabela 13 - Preparação de NaCl.	83
Tabela 14 - Preparação de CTAB.	83
Tabela 15 - Composição de NH ₄ OAC.	84
Tabela 16 - Preparação do tampão TE.	84
Tabela 17 - Preparação do gel de agarose.	84
Tabela 18 - Lista de identificação das bactérias endofíticas utilizadas neste estudo.	88

III. Lista de Abreviaturas

μl – microlitro	mL – mililitro
μg – micrograma	NCBI – National Center for Biotechnology Information
BLAST – “Basic Local Alignment Search Tool”	NaCl – Cloreto de sódio
cm – centímetros	NaNO_3 – Nitrato de sódio
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – cloreto de cálcio dihidrato	NH_4OAc – Acetato de amónia
CIA – clorofórmio: álcool isoamílico	$^\circ\text{C}$ – Graus Celsius
COV – Compostos Orgânicos Voláteis	PCA – Plate Count Agar
CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamónio	PCR – “Polymerase Chain Reaction”
DNA – Ácido Desoxirribonucleico	PDA – “Potato Dextrose Agar”
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético	pmol – picomol
g – grama	rpm – rotações por minuto
h – horas	SDS – Dodecil sulfato de sódio
HCl – Ácido clorídrico	TAM – Meio de Ácido Tânico
ITS – “Internal Transcribed Spacer”	TAE – Tris Acetato EDTA
KH_2PO_4 – dihidrogenofosfato monopotássico	TE – Tris-EDTA
L – Litro	TES – Tris+EDTA+SDS
M – molar	Tris – Trisaminometano
MEA – Malt Extract Agar	V – Voltes
m – massa	
mm – milímetro	
m/v – massa por volume	
mg – miligrama	
min – minutos	
MgSO_4 – Sulfato de magnésio	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Floresta em Portugal

Segundo divulgado pela Associação Nacional de Empresas Florestais, Agrícolas e do Ambiente (ANEFA), a sustentabilidade da floresta de pinho em Portugal encontra-se numa situação crítica (2009). A floresta portuguesa apresenta uma elevada importância ambiental, económica e social, ocupando 35,4% do território, colocando Portugal na média dos 27 países da União Europeia (37,6%). Contudo, entre 2005 e 2010 verificou-se um decréscimo de 57 mil hectares, devido à redução de superfícies temporariamente desarborizadas (superfícies ardidas, cortadas e em regeneração) e ao aumento da área arborizada (correspondente aos designados povoamentos florestais), no mesmo espaço temporal (ICNF, 2013).

Para além disto, a ocorrência de incêndios florestais e a presença do nemátodo da madeira do pinheiro também podem contribuir para a diminuição da área florestal. Este facto torna-se preocupante, visto que coloca em risco não só as empresas do sector florestal, mas também toda a indústria que delas dependem para obterem a sua matéria-prima (ANEFA, 2009; ICNF, 2013; Paiva, 2011).

Relativamente às espécies florestais, como se pode verificar na figura 1, a superfície florestal é ocupada essencialmente por eucalipto (812 mil ha; 26%). De seguida, o sobreiro é a segunda espécie dominante (737 mil ha; 23%), seguido do pinheiro-bravo (714 mil ha; 23%). É importante salientar que o pinheiro-manso apenas ocupa 6% da área referente às espécies resinosas (ICNF, 2013; ICNF, 2015). Com isto, pode concluir-se que 31% da superfície florestal corresponde a espécies resinosas, estando os restantes 69% ocupada por espécies folhosas (ICNF, 2013).

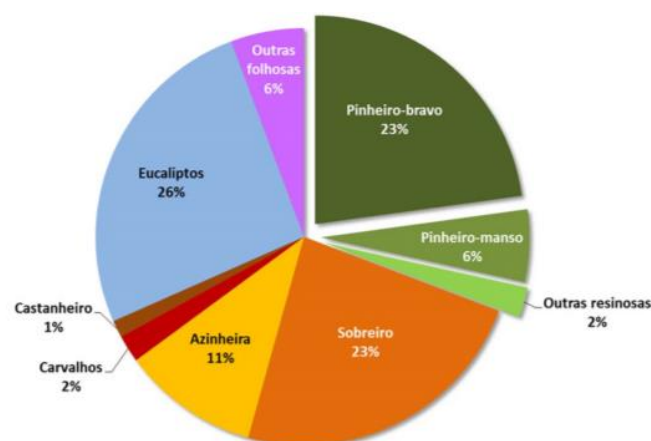


Figura 1 - Distribuição das áreas totais por espécie/grupo de espécies (ICNF,2013).

O sistema florestal português é constituído por algumas espécies de pinheiro, cada uma com as suas próprias características. Em Portugal, as espécies mais comumente encontradas são *Pinus pinaster* Aiton. (pinheiro-bravo) e *Pinus pinea* L. (pinheiro-manso). Existem, ainda, outras espécies como o pinheiro-larício (*P. nigra* Arnold), de alepo (*P. halepensis* Miller) e o silvestre (*P. silvestris* L.), entre outras, que são considerados menos frequentes, mas que desempenham localmente um papel relevante pela sua importância produtiva, protetiva e paisagística (Coelho, 2013; ICNF, 2013; ICNF, 2015; Ratola *et al.*, 2011).

Existem cerca de 100 espécies de *Pinus*, distribuídos mundialmente, algumas das quais estão entre as espécies de maior valor comercial, não só pela madeira, mas também, pela resina que dela se extrai que é utilizada no fabrico de tintas, vernizes e aguarrás. A partir desta, também pode ser obtido a terebentina utilizada para fins medicinais (antissépticos, balsâmicos) (Forestis, 2012; Paiva, 2011). Largamente comercializada na Europa, a madeira apresenta diversas utilizações, tais como, na indústria de celulose, no fabrico de mobiliário, na indústria de aglomerados e construção civil, entre outros (ICNF, 2013).

Para além da madeira, algumas espécies de pinheiro são bastante apreciadas pela produção de pinhões comestíveis, constituindo assim, um fator de elevado valor económico (Forestis, 2012; Paiva, 2011). Apresentam, ainda, um grandioso valor ornamental em diversos parques ou jardins, dada a sua beleza paisagística, sendo relevante o seu papel na época natalícia (ICNF, 2013).

1.2 Cancro resinoso do pinheiro

O fungo *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell é o principal agente causador do cancro resinoso do pinheiro, uma importante doença de *Pinus radiata* ou Pinheiro de Monterey (Iturrutxa *et al.*, 2017; Romón *et al.*, 2008). Embora *F. circinatum* seja primariamente um patógeno de *P. radiata*, mais de 50 espécies de *Pinus* são consideradas suscetíveis a infeções por este fungo patogénico, incluindo espécies tipicamente mediterrânicas, como *P. halepensis*, *P. pinea*, *P. pinaster* e *P. sylvestris*, e outras originárias da América do Norte, tais como, *P. contorta* e *P. strobus*, e da Ásia, *P. densiflora* e *P. thunbergii* (Conejero, 2013; EPPO, 2005; ICNF, 2013; Iturrutxa *et al.*, 2017).

Para além disto, *Pseudotsuga menziesii*, é a única espécie, fora do género *Pinus*, afetada pelo patógeno. Alóctone da Europa, encontra-se especialmente em jardins e plantações, tendo por isso uma distribuição bastante dispersa (EFSA, 2010; ICNF, 2013).

Fusarium circinatum é considerado um organismo de quarentena que afeta severamente as espécies de *Pinus* (EFSA, 2010). Consequentemente, este fungo tem sido alvo de grande atenção nos últimos anos devido aos surtos de infeções severas que tem causado, o que conduziu à sua inclusão na lista A2, nº 306, da EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) (ICNF, 2013; Leslie *et al.*, 2006; Soria *et al.*, 2012).

Fusarium circinatum foi descrito pela primeira vez em 1946 associado a uma doença no estado da Carolina do Norte (Estados Unidos da América), que afeta *Pinus* spp. e *Pseudotsuga menziesii*, sendo responsável por grandes perdas da indústria florestal (Coutinho *et al.*, 2007; Martínez-Álvarez *et al.*, 2014; Martínez-Álvarez *et al.*, 2016).

Seguidamente, este fungo foi confirmado no México, África do Sul, Chile, Japão, América do Sul, Espanha, Portugal, Nova Zelândia, China e no Brasil (Bragança *et al.*, 2009; Ganley *et al.*, 2009; ICNF, 2013; Maphosa *et al.*, 2016; Muñoz-Adalia *et al.*, 2016; Soria *et al.*, 2012).

Em 2005, foi relatado um surto da doença causada por *Fusarium circinatum*, no norte de Espanha, em viveiros de *P. radiata* e *P. pinaster*, sendo este fungo mencionado pela primeira vez na União Europeia (Bragança *et al.*, 2009; Landeras, *et al.*, 2005; Pérez-Sierra *et al.*, 2007). Itália foi o segundo país a reportar a doença, tendo os primeiros sintomas sido observados em árvores adultas de *P. halepensis* e *P. pinea* (Carlucci *et al.*, 2007). Em Abril de 2008, foram observados na região centro de Portugal, sintomas da doença em viveiros de *P. radiata* e *P. pinaster*, nomeadamente na cidade de Anadia (Bragança *et al.*, 2009; ICNF, 2013; ICNF, 2015).

Fusarium circinatum, considerado o fungo invasivo necrotrófico mais importante do pinheiro em vários países do mundo, pode afetar as partes vegetativas e reprodutivas dos hospedeiros suscetíveis em qualquer fase do seu desenvolvimento. Sendo assim, este fungo pode infetar raízes, troncos, ramos, rebentos, agulhas, pinhas e sementes, em árvores hospedeiras de qualquer idade e em qualquer época do ano (Aegerter *et al.*, 2006; ANEFA, 2009; Iturritxa *et al.*, 2017).

O cancro resinoso do pinheiro é considerado uma doença dinâmica e cada surto é um caso singular, tendo em conta que os seus sintomas diferem consoante a espécie hospedeira, a região geográfica e as condições climatéricas (Conejero, 2013;

Hammerbacher *et al.*, 2008; ICNF, 2013; Iturritxa *et al.*, 2017). Os principais sintomas desta doença são a murchidão e descoloração das agulhas. Contudo, o principal sintoma causado por *Fusarium circinatum* é a produção excessiva de resina no tronco ou nos ramos da árvore, o que inspirou o nome da doença que afeta o pinheiro “cancro resinoso”. O excesso de resina produzido causa obstrução do fluxo de água e conseqüentemente a morte dos ramos (Conejero, 2013; Gordon *et al.*, 2015; Hammerbacher, 2005; Hammerbacher *et al.*, 2008;).

Um estudo demonstrou que *F. circinatum* apresenta elevada tolerância à resina, o que explica a sua grande virulência. Para além disto, outras características que são consideradas importantes a este respeito incluem fatores de patogenicidade produzidos pelo fungo, tais como enzimas e toxinas e a tolerância a componentes não voláteis da resina (Conejero, 2013).

Alguns isolados de *F. circinatum*, produzem compostos tóxicos resultantes do metabolismo secundário, também denominados de micotoxinas, capazes de conferir vantagem competitiva em relação a outros fungos e bactérias presentes no meio ambiente (Fotso *et al.*, 2003). As micotoxinas apresentam variabilidade quanto à sua prevalência e grau de toxicidade, sendo a família dos Tricotecenos produzidos maioritariamente por fungos do género *Fusarium* (Pereira *et al.*, 2012). *F. circinatum* produz ainda beauvericina (BEA), um ionóforo conhecido pela sua toxicidade comprovada para insetos e células humanas, capaz de induzir morte celular programada, ou apoptose (ICNF, 2013; Logrieco *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2012).

O inóculo de *F. circinatum* encontra-se disponível durante todas as estações do ano e a dispersão dos esporos pode ocorrer através de material infetado (sementes, madeira), do vento, água de irrigação, solo, insetos que criam feridas permitindo a entrada de esporos por si transportados, tempestades, chuvas e ainda, por meio de atividades antropogénicas, como por exemplo, práticas de silvicultura (figura 2) (EFSA, 2010; ICNF, 2013).

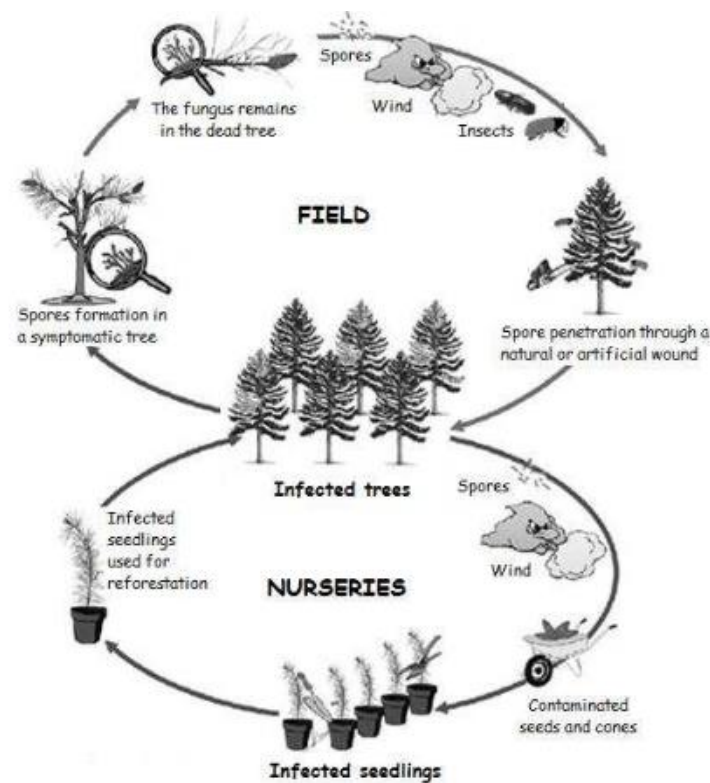


Figura 2 - Ciclo de infecção de *Fusarium circinatum* em campo e plantações (Conejero, 2013).

Os mecanismos através dos quais *F. circinatum* infeta sementes, podem ser diferenciados em superficial, quando o inóculo aéreo penetra no cone aberto, ou não superficial, quando o fungo cresce da lesão através do ramo ou do cone, o que vai afetar a semente. Sendo assim, a redução do risco de introdução de *F. circinatum* pode ser realizado através do tratamento de sementes (ICNF, 2013; Iturritya *et al.*, 2017). Assim, é aconselhável evitar a movimentação desde áreas infetadas para regiões onde a doença não ocorre, uma vez que, as sementes são um importante veículo de transporte do patógeno a longas distâncias (Berbegal *et al.*, 2015; Iturritya *et al.*, 2017; Soria *et al.*, 2012).

Existem vários fatores que podem afetar a patogenicidade de *F. circinatum*, tais como, a disponibilidade de nutrientes, especificamente altos níveis de nutrientes tanto no solo como nas folhas, altas concentrações de ozônio, bem como a humidade e temperatura que influenciam o crescimento e a germinação de esporos (Hammerbacher *et al.*, 2008; Lopez-Zamora *et al.*, 2007).

Contudo, o intervalo de suscetibilidade da ferida define o período em que os esporos de *F. circinatum* podem germinar, sendo bastante lenta a 10°C e rápida quando a temperatura ultrapassa os 25°C, concluindo que a taxa de infeção tende a ser mais baixa no inverno do que nos períodos mais quentes (Conejero, 2013; Gordon *et al.*, 2015; Hammerbacher, 2005; Inman *et al.*, 2008). Deste modo a distribuição geográfica da doença incide essencialmente em áreas costeiras, visto que nestas zonas residem condições climatéricas amenas e humidade relativa elevada, o que favorece a infeção pelo patógeno (ICNF, 2013). Segundo a European Food Safety Authority (EFSA), tendo como base a distribuição geográfica do fungo patogénico e as condições climáticas, as áreas do centro e norte de Portugal encontram-se potencialmente ameaçadas pelo estabelecimento da doença (EFSA, 2010; Gordon *et al.*, 2015; ICNF, 2013).

1.3 Controlo da Doença

Relativamente ao cancro resinoso do pinheiro em viveiros e plantações, não existem meios absolutos para o controlar, contudo uma abordagem de gestão integrada pode reduzir o impacto económico da doença. Para tal, medidas de gestão integrada incluem medidas de quarentena, técnicas de silvicultura apropriadas, seleção de espécies resistentes para cultivo, tratamento de sementes com água quente e adição de peróxido de hidrogénio à água de irrigação (ICNF, 2013; ICNF, 2015; Muñoz-Adalia *et al.*, 2016; Sanz-Ros *et al.*, 2015).

A implementação de medidas de quarentena é de grande importância de modo a evitar a dispersão e o estabelecimento do fungo em novas áreas. Para tal, deve-se minimizar a importação e exportação de material lenhoso, plantas, sementes e outros produtos provenientes da floresta, assim como, o seu movimento dentro do próprio país.

A ação de agentes bióticos nocivos depende bastante do meio ambiente, nomeadamente, do estado nutricional do solo, bem como da sua textura. Assim, os locais de cultivo devem ser apropriados, a densidade de árvores deve ser reduzida e o local deve possuir uma drenagem adequada (Hammerbacher, 2005; ICNF, 2013; ICNF, 2015). Deste modo, não devem ser utilizadas técnicas que causem lesões nos hospedeiros, bem como elevados níveis de fertilização, de forma a minimizar os pontos de infeção da doença. Uma árvore severamente infetada deve ser abatida de imediato, não sendo eficaz apenas a remoção dos ramos infetados, uma vez que este processo não reduz o progresso da doença nem aumenta o tempo de vida da planta (Gordon *et al.*, 2001; ICNF, 2013).

Para além disto, a utilização de sementes livres do patogeno é um dos meios de prevenção mais relevante contra o cancro resinoso do pinheiro. Para tal, é recomendado o tratamento de todas as sementes com peróxido de hidrogénio a 20%, visto que o fungo patogénico pode ser encontrado no interior e exterior da casca das mesmas (ANEFA, 2009; Berbegal *et al.*, 2015; Coutinho *et al.*, 2007; Hammerbacher *et al.*, 2008). Caso isto não aconteça e a doença for evidente, é necessário aplicar um período de quarentena a fim de adotar medidas de saneamento adequadas (Hammerbacher, 2005; ICNF, 2013). Contudo, estudos revelam que o tratamento com água quente reduz significativamente a contaminação de *F. circinatum* em sementes de *P. radiata*, sendo este tratamento mais eficiente que a utilização de peróxido de hidrogénio e de fungicidas (Berbegal *et al.*, 2015).

Diversas medidas podem ser adotadas a fim de reduzir a incidência do fungo patogénico e prevenir graves surtos da doença, tais como a utilização de água não contaminada para irrigação, solo e recipientes estéreis, desinfeção e limpeza de maquinarias, veículos e equipamentos utilizados em áreas infetadas e todo o material contaminado deve ser extraído e incinerado ou enterrado com cal viva, no próprio local. Tais medidas são extremamente importantes, no sentido que a circulação de material contaminado é o principal veículo de disseminação da doença para outras áreas não infetadas. (ANEFA, 2009; Hammerbacher, 2005; ICNF, 2013; Muñoz-Adalia *et al.*, 2016).

De forma a controlar a doença cancro resinoso do pinheiro, é importante termos em conta a sua relação com a presença de insetos, uma vez que estes são vetores responsáveis por transmitir o *F. circinatum* a outras espécies de pinheiro. Embora não seja um dos fatores mais relevantes, é necessário recorrer à aplicação de inseticida sistémico, como por exemplo carbofurano, que é absorvido pela planta através da raiz e, a partir daí, é distribuído para todos os órgãos da mesma, o que resulta na diminuição da infeção causada pela doença e do prejuízo causado por insetos (ANEFA, 2009; Hammerbacher *et al.*, 2008).

Também foram estudados uma diversidade de métodos de controlo químico de modo a monitorizar a presença de *F. circinatum* em pinheiros. Alguns fungicidas como tiabendazol, mancozebe e clorotalonil podem efetivamente limitar o crescimento de *F. circinatum* a partir de sementes de pinheiro tratadas, o que poderá levar à prevenção da expressão de sintomas da doença. Em contraste, alguns tratamentos baseados em hipoclorito de sódio são ineficazes devido à elevada contaminação interna de sementes

pelo patógeno. O tratamento através da utilização de água quente para além de ser uma alternativa aos tratamentos químicos demonstra ser uma metodologia bastante eficaz, visto que o calor penetra na semente e reduz a incidência de contaminação (Berbegal *et al.*, 2015; Hammerbacher *et al.*, 2008).

Apesar de estarem disponíveis fungicidas para o controlo do cancro resinoso do pinheiro, ainda não foi desenvolvida uma estratégia de custo eficaz para a utilização de materiais antifúngicos para controlar a doença (Gordon *et al.*, 2015). Sendo assim, restrições ao uso de fungicidas e os cuidados com o meio ambiente reforçam a procura por alternativas viáveis e menos nocivas à natureza e à saúde humana, como os bioprotetores. O tratamento de sementes com microrganismos antagonistas, também designado de microbiolização de sementes constitui uma possibilidade de controlo de patógenos com a vantagem de não ser poluente e por contribuir para o controlo mais estável da doença, especialmente para culturas agrícolas. No entanto, são necessários mais estudos para a extensão e melhoramento desta técnica para sementes de espécies florestais (Corrêa *et al.*, 2008; Lazarotto *et al.*, 2013; Mertz *et al.*, 2009).

1.4 Controlo Biológico

A fitosfera é considerada um habitat bastante importante e caracteriza-se por apresentar uma enorme multiplicidade de microrganismos. Estes podem ser denominados de epifíticos, isto é, crescem à superfície dos tecidos dos diversos órgãos da planta, ou endofíticos, que se desenvolvem no interior da planta (Lindow *et al.*, 2003; Pereira, 2014). A fitosfera é caracterizada por albergar uma comunidade microbiana muito complexa, sujeita a múltiplos fatores químicos e físicos que limitam o crescimento dos microrganismos e a sua sobrevivência. É, também, influenciada por fatores climáticos, tais como, a temperatura, radiação ultravioleta, entre outros (Hyde *et al.*, 2008; Lindow *et al.*, 2003).

Deste modo, o estudo desta comunidade é essencial no sentido de fornecer novos conhecimentos para o desenvolvimento de medidas de controlo ou prevenção de possíveis fitopatologias (Lindow *et al.*, 2003).

O controlo biológico ou biocontrolo é definido como a redução da densidade populacional de pragas e doenças através da utilização de inimigos naturais, também denominados de agentes de controlo biológico. Os agentes de controlo biológico são considerados organismos que atuam como fatores reguladores das populações de agentes

patogênicos e têm como objetivo impedir que estas causem prejuízos. Os agentes de biocontrole geralmente são insetos, ácaros, nematodes, fungos, bactérias e vírus (Bale *et al.*, 2008).

O biocontrole pode ser considerado bastante vantajoso, no sentido que não provoca poluição e pode autoperpetuar durante longos períodos de tempo. Contudo, é importante salientar que o controle biológico não erradica, apenas reduz as pragas (Bale *et al.*, 2008). Para além disto, uma vez que se tem recorrido à utilização de fungicidas para o controle de fungos, sendo estes considerados parcialmente poluentes para o meio ambiente e para a produção agrícola, torna-se importante o desenvolvimento e a aplicação de agentes biológicos para o controle de doenças de plantas (Todorova *et al.*, 2010).

Como tal, o controle biológico oferece uma alternativa eficaz para a redução ou eliminação do uso de produtos químicos no controle de organismos patogênicos. Deste modo, contribui para a minimização de consequências negativas para a saúde humana e para o meio ambiente envolvente (Lanna Filho *et al.*, 2010; Kim, *et al.*, 2003; Soria *et al.*, 2012).

Os microrganismos endofíticos, isto é, microrganismos bacterianos (Jasim *et al.*, 2014) ou fúngicos (Nalini *et al.*, 2014), encontram-se livremente dentro do tecido vegetal sem causarem quaisquer danos no hospedeiro. Estes caracterizam-se por colonizarem os tecidos das plantas de forma intercelular e/ou intracelular, durante todo o seu ciclo de vida ou parte dele (Fernandes *et al.*, 2015; Gqola, 2015; Nair *et al.*, 2014). Estudos realizados com diferentes estirpes de *Trichoderma* spp. e *Clonostachys* spp. demonstraram que algumas destas estirpes poderiam ser utilizadas como agentes de biocontrole contra *F. circinatum* em viveiros de *P. radiata* (Gqola, 2015; Moraga-Suazo *et al.*, 2011).

A efetividade dos microrganismos endofíticos como agentes de biocontrole depende de diversos fatores: a especificidade da planta hospedeira, a dinâmica de colonização da planta, a habilidade para se movimentar no interior dos seus tecidos e a capacidade para induzir resistência sistémica (Esposito-polesi, 2011; Melnick *et al.*, 2008). Estes microrganismos compreendem o grupo de organismos que vivem em simbiose com as plantas hospedeiras, sem causar patologias nos seus hospedeiros. Estes podem ser considerados organismos mutualistas, comensalistas e/ou saprófitas, sendo a relação endófito-hospedeiro maioritariamente mutualística, isto é, recebem nutrientes e proteção da planta hospedeira que, por sua vez, é beneficiada com o favorecimento do seu crescimento e desenvolvimento devido à rapidez na formação de mudas, resistência

a nematodes e diversos patógenos, bem como, a tolerância a diversas condições ambientais e nutricionais (Esposito-polesi, 2011; Fernandes *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2008; Nair *et al.*, 2014; Sanz-Ros *et al.*, 2015; Strobel *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2011).

Deste modo, as plantas geralmente controlam os seus fungos endofíticos e a sua relação é considerada como uma associação equilibrada, pelo facto de o hospedeiro tolerar por completo os metabolitos secundários excretados pelo endófito e retardar o crescimento do invasor sem erradicá-lo (Sanz-Ros *et al.*, 2015; Verma *et al.*, 2011). Quando surge o aumento da virulência fúngica ou diminuição na defesa da planta hospedeira, ocorre a alteração do equilíbrio, o que conduz ao desenvolvimento da doença (Meyer *et al.*, 2012; Pereira, 2014).

Os microrganismos endofíticos podem ser classificados em obrigatórios ou facultativos, sendo que o crescimento e sobrevivência dos microrganismos obrigatórios depende completamente da planta hospedeira, enquanto que os facultativos vivem uma parte do seu ciclo dentro da planta e outra fora dela. (Esposito-Polesi, 2011; Nair *et al.*, 2014).

O efeito dos endofíticos no crescimento da planta ocorre através da secreção de reguladores de crescimento (ácido indolacético), da atividade de solubilização do fosfato, da produção de sideróforos e do fornecimento de azoto. Outros efeitos da infeção endófito na planta hospedeira incluem ajuste osmótico, regulação estomática, modificação da morfologia radicular, absorção de nutrientes, eficácia fotossintética e alteração do metabolismo e da acumulação de nitrogénio (Bandara *et al.*, 2007; Esposito-polesi, 2011; Lopez-Zamora *et al.*, 2007).

O endófito, pela produção ou indução da produção de metabolitos primários e secundários, confere benefícios aos seus hospedeiros ao superar o stress biótico (insetos, herbívoros, fitopatogénicos) e abiótico (stress hídrico, salinidade, metais, entre outros), e por ser considerado como agente de controlo biológico contra patógenos das plantas hospedeiras. Por sua vez, a planta hospedeira protege o endófito, fornecendo-lhe os nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento e apresenta um papel relevante na sua transmissão (Pereira, 2014; Sanz-Ros *et al.*, 2015; Verma *et al.*, 2011).

Diversos mecanismos contribuem para o controlo biológico dos microrganismos, sendo importante a avaliação da capacidade enzimática dos microrganismos endofíticos de *Pinus* spp., visto que estes organismos produzem enzimas que degradam a parede celular, nomeadamente, amilase, celulase, pectinase, lipase, quitinase e protease. Deste modo, as enzimas podem estar envolvidas na inibição de crescimento de fungos

patogênicos, o que permite controlar a doença da planta hospedeira (Bhat, 2000; Budi *et al.*, 2000; Dinesh *et al.*, 2015; Pereira, 2014; Robl *et al.*, 2013). Porém, outras enzimas e micotoxinas têm sido identificadas como importantes substâncias na infecção da planta por espécies de *Fusarium*, o que indica o envolvimento do complexo enzimático na colonização do hospedeiro (Esposito-polesi, 2011; Muñoz-Adalia *et al.*, 2016).

Para além disto, é importante salientar que existem bactérias produtoras de biosurfactantes, sendo estes, compostos de origem microbiana e que consistem em subprodutos dos seus próprios sistemas metabólicos, tais como, surfactinas, iturinas e fengicinas (Bugay, 2009; Todorova *et al.*, 2010). Embora estruturalmente semelhantes, diferem quanto à sua atividade, como por exemplo, as iturinas e fengicinas exibem uma forte atividade antifúngica e inibem o crescimento de uma ampla gama de fitopatógenos, enquanto as surfactinas não são por si fungitóxicas, mas exercem algum efeito sinérgico antifúngico, quando acompanhadas da iturina A (Bugay, 2009; Lanna *et al.*, 2010).

Como tal, *Bacillus subtilis* é considerado uma das bactérias produtoras mais importantes do género *Bacillus*, visto que, produz um elevado número de substâncias com atividade antifúngica e/ou antibacteriana contra vários microrganismos patogênicos. Esta espécie é bastante eficaz contra várias espécies, nomeadamente contra *Fusarium* spp. (Bugay, 2009; Todorova *et al.*, 2010). Assim, *B. subtilis* é considerado um agente ideal para o controlo biológico, sendo o seu uso um processo alternativo para a proteção das plantas (Todorova *et al.*, 2010).

Com isto, conclui-se que vários microrganismos endofíticos sintetizam compostos bioativos que podem ser usufruídos pela planta hospedeira para defesa contra patógenos, no sentido que apresentam a capacidade de melhorar e promover o crescimento das plantas; aumentar o rendimento; reduzir a severidade dos sintomas da doença causados por agentes patogênicos; diminuir a atratividade da planta hospedeira a insetos e herbívoros; remover contaminantes do solo, incluindo metais pesados; melhorar o desempenho da planta em condições extremas de temperatura e disponibilidade de água; solubilizar fósforo; contribuir com nitrogénio para as plantas; aumentar a diversidade genética e bioquímica da planta e conferir proteção contra nematodes e resistência contra patógenos de origem bacteriana e fúngica, o que pode inibir a infecção e proliferação do fungo dentro da planta (Card *et al.*, 2015; Esposito-polesi, 2011; Melnick *et al.*, 2008; Sanz-Ros *et al.*, 2015; Strobel *et al.*, 2004).

Neste sentido, microrganismos endofíticos são considerados potenciais fontes de substâncias naturais para exploração em diversas áreas, tais como, na medicina moderna,

na agricultura e na indústria (Esposito-polesi, 2011; Sanz-Ros *et al.*, 2015; Strobel *et al.*, 2004).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo principal identificar microrganismos endofíticos de diferentes espécies de *Pinus* com potencial atividade de biocontrole contra *F. circinatum*, o agente causador do cancro resinoso do pinheiro.

Para a realização deste trabalho, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Identificação e caracterização de fungos endofíticos de *Pinus* spp. (*P. pinea*; *P. pinaster*; *P. nigra*).
- Determinação da presença de atividade antagonista dos fungos endofíticos contra *F. circinatum*.
- Determinação da atividade enzimática dos fungos endofíticos que apresentavam antagonismo contra *F. circinatum*.
- Determinação da atividade antagonista de bactérias endofíticas de *Pinus* spp. na presença de *F. circinatum*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Recolha de amostras

A recolha de amostras foi realizada entre Setembro e Novembro de 2016 em plantações de pinheiros provenientes de três zonas de Portugal: Figueiró dos Vinhos, Gafanha da Encarnação e Aveiro. Neste estudo foram utilizadas 25 amostras de pinheiro assintomáticas, sendo 15 provenientes de Figueiró dos Vinhos (5 ramos de *P. pinea*, 5 ramos de *P. pinaster* e 5 ramos de *P. nigra*), 6 ramos de *P. pinea* obtidas de Aveiro e 4 ramos de *P. pinaster* obtidas da Gafanha da Encarnação.

Amostras de ramos de pinheiro foram recolhidas e transportadas para o laboratório, sendo mantidas a 4°C e processadas num período máximo de 24h.

3.2 Isolamento de fungos endofíticos

Pequenas porções dos ramos foram sujeitas a uma desinfecção superficial em 5% de hipoclorito de sódio durante 2 minutos, seguidas de etanol a 96% durante 2 minutos e uma lavagem final em água destilada estéril. Após secar os fragmentos, estes foram cortados longitudinalmente e removida a camada externa. De seguida, cada parte do fragmento foi inoculado em placas de Petri contendo meio PDA (Potato Dextrose Agar) e meio MEA (Malt Extract Agar). Por fim, as placas de Petri foram seladas com parafilme e colocadas na estufa a incubar durante 7 dias, a 25°C.

Após incubação, as colónias visualmente identificadas foram isoladas para meio PDA, de forma a obter colónias puras, bem como as colónias obtidas em meio MEA. As placas foram igualmente seladas com parafilme, identificadas e incubadas a 25°C.

Os meios de cultura foram preparados segundo as indicações dos fabricantes, sendo a sua composição apresentada para um volume final de 1 litro. Após a sua preparação foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 20 minutos.

3.3 Isolamento do fungo patogénico

O fungo patogénico utilizado neste trabalho, nomeadamente, *Fusarium circinatum* (FcCa6) foi cedido pelo Laboratório de Patologia e Entomologia Florestal da Universidade de Valladolid (Espanha). Este fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio PDA e incubado a 25°C durante 7 dias.

3.4 Isolamento de bactérias endofíticas

As bactérias endofíticas utilizadas neste estudo foram obtidas num outro trabalho. Foram isoladas 139 bactérias endofíticas de diferentes espécies de *Pinus*, nomeadamente, *P. nigra*, *P. pinaster* e *P. pinea* provenientes de Figueiró dos Vinhos. Estas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio PCA e incubadas a 28°C.

3.5 Testes de antagonismo

Os fungos endofíticos foram testados quanto o seu potencial antagonismo contra o fungo patogénico *F. circinatum*. Para tal, dois testes diferentes foram realizados, nomeadamente, o teste de antagonismo direto e o teste de inibição por compostos orgânicos voláteis. Para além destes, foi também realizado um teste de antagonismo direto utilizando bactérias endofíticas e o fungo *F. circinatum*. Todos os testes de antagonismo foram realizados em triplicado.

Os protocolos encontram-se devidamente descritos no anexo II e os meios de cultura foram preparados segundo as indicações do fabricante, sendo a sua composição apresentada para um volume final de 1 litro. Após a sua preparação foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 20 minutos.

3.5.1 Teste de antagonismo direto – fungos endofíticos vs *Fusarium circinatum*

O teste de antagonismo direto foi realizado através de um método de cultura dupla numa placa de Petri contendo meio PDA. Para tal, cada fungo endofítico foi colocado individualmente com *F. circinatum* a uma distância de 6.5 cm (figura 3). A placa de controlo continha apenas o fungo patogénico. Ao longo do período de incubação (15 dias), o raio de crescimento do micélio de cada fungo endofítico foi medido nos primeiros 7 dias, ao 10º, 12º e 15º dia, bem como o raio de crescimento do micélio de *F. circinatum*.

Foi realizado um registo fotográfico e a medição da área (cm²) de inibição do micélio foi determinado com o auxílio de uma régua, sendo posteriormente definido estatisticamente através da utilização do programa GraphPad 5.

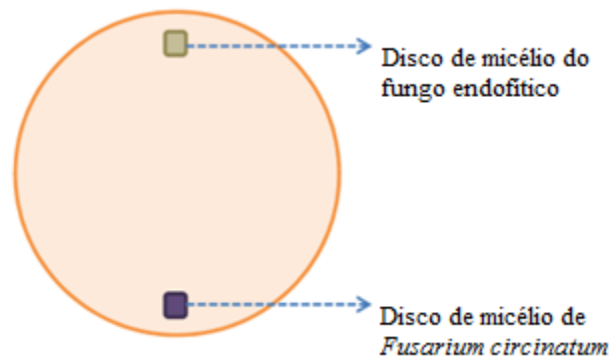


Figura 3 - Desenho esquemático do teste de antagonismo direto.

3.5.2 Teste de inibição por compostos orgânicos voláteis

O teste de inibição por compostos orgânicos voláteis foi realizado através da inoculação de cada fungo endofítico no centro de uma placa de Petri contendo meio PDA. O mesmo procedimento foi efetuado para *F. circinatum*. Ambas as placas foram incubadas durante 1 dia a 25°C. De seguida, as placas contendo *F. circinatum* foram colocadas, invertidas, no topo de cada uma das placas contendo cada um dos fungos endofíticos (figura 4). Ambas as placas foram seladas com parafilme, e incubadas a 25°C durante 7 dias. Como controlo, colocou-se apenas um plug de *F. circinatum*, numa placa de Petri contendo PDA.

Durante o período de incubação, isto é, ao longo de 7 dias foi medido o raio de crescimento do micélio de *F. circinatum* e de cada fungo endofítico e realizou-se um registo fotográfico.

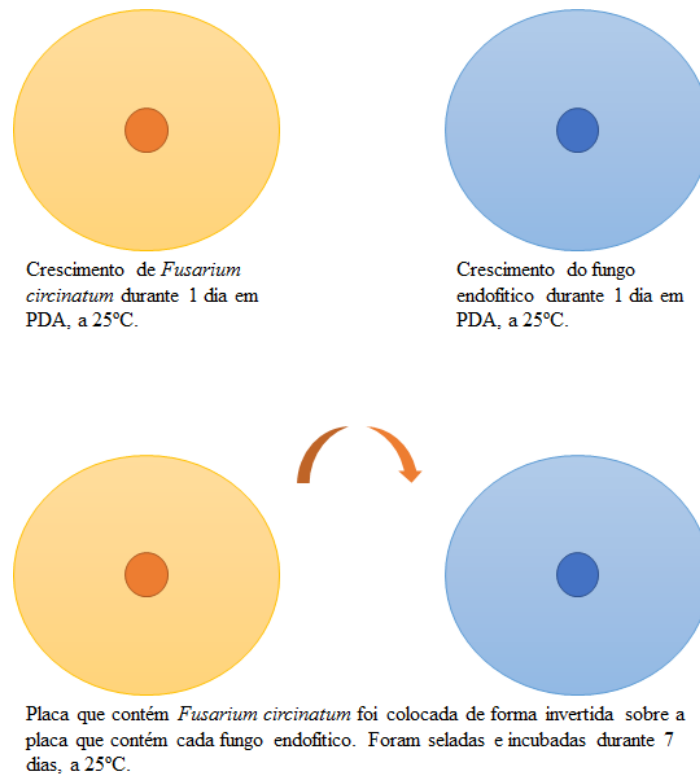


Figura 4 - Desenho esquemático do teste de inibição por compostos orgânicos voláteis.

3.5.3 Teste de antagonismo direto – bactérias endofíticas vs *Fusarium circinatum*

O teste foi efetuado em placa de Petri contendo meio PCA. Para tal, em cada placa de Petri foi colocado a 2 cm de uma extremidade 1µL de cada suspensão de bactérias e um plug de *F. circinatum* na extremidade oposta. O controle foi realizado tanto para o fungo patogénico como para todas as bactérias utilizadas. As placas foram incubadas a 25°C durante 20 dias. Ao longo do período de incubação, o raio de crescimento do micélio do fungo foi medido diariamente, assim como o crescimento da bactéria e foi realizado um registo fotográfico.

1. Preparação da suspensão de bactérias

- a. Preparar a solução de NaCl 0,9%.
- b. Colocar a crescer as bactérias em meio PCA, durante cerca de 3 dias, a 28°C.
- c. Identificar os microtubos de 1,5 mL com a respetiva amostra.
- d. Adicionar a cada tubo 500µL de NaCl.

- e. Com a ajuda de um palito raspar a parte superior da superfície da colónia da bactéria da placa de Petri e colocar no microtubo.
 - f. Homogeneizar de modo atingir a turbidez segundo a escala McFarland.
-

3.6 Deteção de atividade enzimática extracelular

Os fungos endofíticos que apresentaram resultado positivo no teste de antagonismo direto foram testados quando à produção de enzimas extracelulares, nomeadamente amilase, lipase, xilanase, lacase, urease, celulase, pectinase e protease. Para tal, foram utilizados diferentes meios de cultura contendo diferentes substratos e os resultados foram obtidos após cerca de 48h/72h de incubação a 25°C.

A produção de enzimas extracelulares é visualizada através do aparecimento de halos transparentes, produção de precipitados, alteração de cor do meio de cultura, entre outros. O halo em redor do plug correspondente a cada fungo endofítico e o respetivo diâmetro do micélio foi medido e o ensaio foi realizado em triplicado. O protocolo da experiência encontra-se descrito no anexo II.

Após o período de incubação, a capacidade de produção de enzimas por microrganismos foi expressa em índice enzimático (IE), mediante a relação do diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colónia. O IE foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$IE(\text{índice enzimático}) = \frac{Dh}{Dc}$$

Dh representa o diâmetro do halo e Dc o diâmetro de crescimento do micélio do fungo endofítico.

3.6.1 Meios de cultura

Os meios de cultura foram preparados de acordo com as seguintes composições, para um volume final de 1 litro, no qual foi adicionado água destilada de modo a perfazer o volume pretendido.

- **Meio de Tween 20** (adaptado de Hankin & Anagnostakis, 1975)

Tabela 1 – Composição do meio da lipase.

Meio de Lipase	
Peptona	10g
NaCl	5g
CaCl₂.2H₂O	0,1g
Tween 20	1% (v/v)
Bacto-Agar	20g

Autoclavar a 121°C durante 20 minutos. Esterilizar a solução Tween 20 separadamente e adicionar ao restante meio esterilizado na proporção de 1% (v/v).

- **Meio de Amido** (adaptado de Hankin & Anagnostakis, 1975)

Tabela 2 - Composição do meio do amido.

Meio do Amido	
Peptona	10g
NaCl	5g
Amido	2g
Extrato de Levedura	5g
Bacto-Agar	15g

Ajustar o pH a 6.8. Autoclavar a 121°C durante 20 minutos.

- **Meio de Skim Milk** (adaptado de Alves, 2006)

Tabela 3 - Composição do meio de Skim Milk.

Meio de Skim Milk	
Skim Milk	10g
Extrato de Malte	5g
Bacto-Agar	15g

Esterilizar o skin milk à parte dos restantes reagentes, fazendo-se no final a junção de todos os reagentes. Autoclavar a 121°C durante 20 minutos.

- **Meio de Pectina** (adaptado de Hankin and Anagnostakis, 1975; St Leger *et al.*, 1997)

Tabela 4 - Composição do meio de pectina.

Meio de Pectina	
NaNO₃	0,3g
KH₂PO₄	0,1g
MgSO₄	0,5g
Extrato de Levedura	1g
Pectina	5g
Bacto-Agar	15g

Ajustar o pH a 5 ou a 7. Autoclavar a 121°C durante 20 minutos.

- **Meio de Xilano** (adaptado de St Leger *et al.*, 1997)

Tabela 5 - Composição do meio da xilanase

Meio da Xilanase	
NaNO₃	0,3g
KH₂PO₄	0,1g
MgSO₄	0,5g
Extrato de Levedura	1g
Xilano	5g
Bacto-Agar	15g

Autoclavar a 121°C durante 20 minutos.

- **Meio de Ureia** (adaptado de Hankin & Anagnostakis, 1975)

Tabela 6 - Composição do meio da urease.

Meio da Urease	
Peptona	1g
D(+)-glucose	1g
KH₂PO₄	2g
NaCl	5g
Vermelho de fenol	0,012g
Bacto-Agar	15g

Após esterilizar por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos, deixar arrefecer e adicionar 50 mL/L de uma solução de ureia a 40 % (m/v), esterilizada por filtração.

- **Meio de Celulose** (adaptado de St Leger *et al.*, 1997)

Tabela 7 - Composição do meio de celulase.

Meio de Celulase	
NaNO₃	0,3g
KH₂PO₄	0,1g
MgSO₄	0,5g
Extracto de Levedura	1g
CM- celulose	5g
Bacto-Agar	15g

Autoclavar a 121°C durante 20 minutos.

- **Meio de ácido tânico** (adaptado de Rigling, 1995)

Tabela 8 - Composição do meio da lacase.

Meio de Lacase	
Extrato de Malte	15g
Bacto-Agar	20g
Ácido Tânico (1%)	10g

Ajustar o pH a 4,5 da solução de ácido tânico e esterilizar separadamente do extrato de malte. Seguidamente procede-se à sua junção.

3.6.2 Detecção de atividades enzimáticas extracelulares

A deteção da produção de enzimas extracelulares foi realizada em placa de Petri, segundo os procedimentos a seguir descritos:

- **Deteção de atividade lipolítica**

1. Colocar no centro da placa de Petri contendo meio de lipase um plug de cada fungo endofítico.
2. Incubar a 25°C durante 48h/72h.
3. Medir o diâmetro do micélio.
4. A produção de lipases é evidenciada pela presença de cristais de cálcio em torno do micélio através da libertação do ácido láurico pela enzima.
5. Medir o diâmetro do micélio e do precipitado que se forma em torno da colónia e calcular o índice de atividade enzimática.

- **Deteção de atividade amilolítica**

1. Colocar no centro da placa de Petri contendo meio de amido um plug de cada fungo endofítico.
2. Incubar a 25°C durante 48h/72h.
3. Medir o diâmetro do micélio.
4. Inundar a placa de Petri com soluto de Lugol durante 5 minutos, de modo a observar se ocorre a hidrólise do amido.
5. Caso ocorra a hidrólise do amido, é observado em torno da colónia um halo de tom claro (amarelado), caso contrário apresenta uma coloração preta ou azul.
6. Medir o diâmetro do micélio e do halo que se forma em torno da colónia e calcular o índice de atividade enzimática.

- **Deteção de atividade proteolítica**

1. Colocar no centro da placa de Petri contendo meio de Skin Milk um plug de cada fungo endofítico.
2. Incubar a 25°C durante 48h/72h.
3. Medir o diâmetro do micélio.
4. A atividade da protease é indicada através do aparecimento de um halo transparente à volta da colónia.
5. Medir o diâmetro do micélio e do halo que se forma em torno da colónia e calcular o índice de atividade enzimática.

- **Deteção de atividade pectinolítica**

1. Colocar no centro da placa de Petri contendo meio de pectina pH 5,0 e pH 7,0 um plug de cada fungo endofítico. O meio de pectina, a pH 5,0 permite a deteção de pectinase, e a pH 7,0 permite a deteção de liase do pectato.
2. Incubar a 25°C durante 48h/72h.
3. Medir o diâmetro do micélio.
4. Inundar a placa de Petri com uma solução de CTAB (precipita a pectina) durante 5 minutos.
5. A hidrólise da pectina é observada através do aparecimento de um halo transparente em redor da colónia.
6. Medir o diâmetro do micélio e do halo que se forma em torno da colónia e calcular o índice de atividade enzimática.

- **Deteção de atividade xilanolítica**

1. Colocar no centro da placa de Petri contendo meio de xilano um plug de cada fungo endofítico.
2. Incubar a 25°C durante 48h/72h.
3. Medir o diâmetro do micélio.
4. Corar a placa de Petri com 1mL de solução vermelho do Congo durante 5 minutos.
5. Retirar a última solução e adicionar a solução de NaCl 1M durante 2 minutos.
6. O vermelho do Congo cora o meio não degradado pelas enzimas, colocando assim em evidência a zona de degradação.
7. Medir o diâmetro do micélio e do halo que se forma em torno da colónia e calcular o índice de atividade enzimática

- **Deteção de atividade da urease**

1. Colocar no centro da placa de Petri contendo meio de ureia um plug de cada fungo endofítico.
2. Incubar a 25°C durante 48h/72h.
3. Medir o diâmetro do micélio.
4. A atividade da urease é visualizada através da modificação da cor do meio de cultura. Se a estirpe for urease positiva desenvolve-se cor vermelha/cor-de-rosa devido à presença do indicador vermelho de fenol e de amónia; se for urease negativa não se observa alteração de cor.

5. Medir o diâmetro do micélio e do halo que se forma em torno da colónia e calcular o índice de atividade enzimática.

- **Deteção de atividade celulolítica**

1. Colocar no centro da placa de Petri contendo meio de celulose um plug de cada fungo endofítico.
2. Incubar a 25°C durante 48h/72h.
3. Medir o diâmetro do micélio.
4. Corar a placa de Petri com 1mL de solução vermelho do Congo durante 5 minutos.
5. Retirar a última solução e adicionar a solução de NaCl 1M durante 2 minutos.
6. O vermelho do Congo cora o meio não degradado pelas enzimas, colocando assim em evidência a zona de degradação.
7. Medir o diâmetro do micélio e do halo que se forma em torno da colónia e calcular o índice de atividade enzimática.

- **Deteção de atividade da lacase**

1. Colocar no centro da placa de Petri contendo meio TAM um plug de cada fungo endofítico.
2. Incubar a 25°C durante 48h/72h.
3. Medir o diâmetro do micélio.
4. A produção de lacase é indicada pelo aparecimento de um halo castanho-escuro à volta da colónia.
5. Medir o diâmetro do micélio e do halo que se forma em torno da colónia e calcular o índice de atividade enzimática.

3.7 Identificação de fungos endofíticos

3.7.1 Extração de DNA genómico

O DNA genómico foi extraído de culturas puras de acordo com o protocolo de Möller (1992), com algumas modificações. A composição das soluções stock encontra-se descrita no anexo I.

Extração de DNA genómico

1. Permitir o crescimento de fungos em meio PDA durante 7 a 10 dias a 25°C, de modo a haver um crescimento adequado do micélio.
 2. Transferir o micélio para um microtubo de 2mL (devidamente rotulado) e adicionar 500µL de tampão TES.
 3. Homogeneizar e aquecer a 100°C durante 3 minutos e, de seguida, colocar em gelo durante 10 minutos.
 4. Adicionar 10µL de proteinase K (20mg/mL).
 5. Incubar a 65°C durante 30 minutos (agitando ocasionalmente).
 6. Adicionar 140µL NaCl 5M e 65µL CTAB 10%.
 7. Agitar por inversão e incubar a 65°C durante 30 minutos (agitar ocasionalmente).
 8. Adicionar 1mL clorofórmio: álcool isoamílico (CIA) numa proporção de 24:1 e misturar por inversão durante 1 minuto.
 9. Incubar durante 30 minutos em gelo.
 10. Centrifugar durante 10 minutos a 12000 rpm a 4°C.
 11. Transferir sobrenadante (\pm 800µL) para um novo microtubo de 1.5mL.
 12. Adicionar 225µL 5M NH₄OAc e agitar cuidadosamente.
 13. Incubar durante 30 minutos em gelo.
 14. Centrifugar durante 10 minutos a 12000 rpm a 4°C.
 15. Transferir o sobrenadante (\pm 1000µL) para um novo microtubo de 1.5mL.
 16. Adicionar 500µL de isopropanol gelado e misturar cuidadosamente.
 17. Incubar durante 30 minutos em gelo.
 18. Centrifugar durante 10 minutos a 12000 rpm a 4°C.
 19. Rejeitar o sobrenadante.
 20. Deixar secar os tubos cerca de 2h à temperatura ambiente.
 21. Dissolver o “pellet” em cerca de 50µL de tampão TE (previamente aquecido a 65°C).
 22. Armazenar os tubos a -20 °C.
-

3.7.2 Armazenamento de culturas

Relativamente ao armazenamento de culturas, após 7 a 10 dias de crescimento dos isolados selecionados, foram retirados quatro plugs de micélio com cerca de 5mm de diâmetro da periferia de uma colónia e colocados em criotubos de 1,5mL devidamente identificados com 800µL de solução de glicerol a 15%. Estes criotubos foram incubados overnight à temperatura ambiente e posteriormente armazenados a -80°C.

3.7.3 Amplificação da região ITS

A amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) foi realizada usando os primers ITS5 (3'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-5') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3').

A reação de ITS-PCR foi efetuada num termociclador para um volume de 25µL.

2. Preparação da reação de amplificação: 25µl

- a. 16,75µL água destilada estéril
 - b. 6,25µL Mix (NZYtaq 2x Green Master Mix, NZYtech)
 - c. 1µL “primer” ITS5 (10 pmol/µl)
 - d. 1µL “primer” NL4 (10 pmol/µl)
3. Para a amplificação da região ITS, após uma desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, foram realizados 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, seguido de ligação de primers a 50°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 1 minuto. Por fim, ocorre uma extensão final a 72°C durante 10 minutos.
4. Os produtos de ITS foram separados por electroforese a 80V durante 60 minutos num gel de agarose a 1,5% (a preparação do gel de agarose encontra-se descrito no anexo I). Para cada eletroforese, foi colocado no primeiro poço do gel um marcador de peso molecular (GeneRuler™ DNA Ladder Mix).
-

3.7.4 Visualização do DNA

Após a electroforese os géis foram corados numa solução de brometo de etídio a 0.5 µg/mL durante 10 minutos e colocados em água destilada durante 20 minutos, de modo a eliminar o excesso de brometo de etídio. De seguida, os géis foram visualizados no sistema de aquisição de imagem Gel DOC™ XR+ SYSTEM (Bio-Rad).

3.7.5 Purificação dos produtos de amplificação

Os produtos de amplificação foram purificados usando o kit NZYGelPure™, (Nzytech, Portugal) segundo as instruções do fabricante.

3.7.6 Determinação da sequência nucleotídica

A determinação da sequência nucleotídica dos produtos de amplificação da região ITS foi realizada pela empresa GATC Biotech (Alemanha).

3.7.7 Análise computacional

Os eletroforetogramas obtidos das sequências nucleotídicas foram editados e corrigidos com a ajuda do software FinchTV 1.4.0, de modo a obter uma sequência completa do isolado em questão. De seguida, estas foram submetidas a uma análise primária utilizando o Standard Nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch), para a pesquisa de similaridade na base de dados GenBank.

4. RESULTADOS

4.1 Recolha de amostras

A partir de 25 amostras de *P. pinea*, *P. pinaster* e *P. nigra* foram isolados 34 fungos endofíticos, sendo que 11 foram de *P. pinea*, 10 de *P. pinaster* e 13 de *P. nigra*.

Foram utilizados 139 isolados de bactérias obtidas das espécies *P. nigra*, *P. pinea* e *P. pinaster* num outro trabalho. As amostras foram recolhidas da raiz, serrim e agulha do pinheiro.

4.2 Teste de antagonismo de fungos endofíticos

4.2.1 Teste de antagonismo direto – fungos endofíticos vs *F. circinatum*

Todos os isolados obtidos foram testados de modo a avaliar a sua atividade antagonista contra *F. circinatum*, sendo que apenas 7 apresentaram resultado positivo. Os resultados obtidos através do teste de antagonismo direto encontram-se descritos na figura 5.

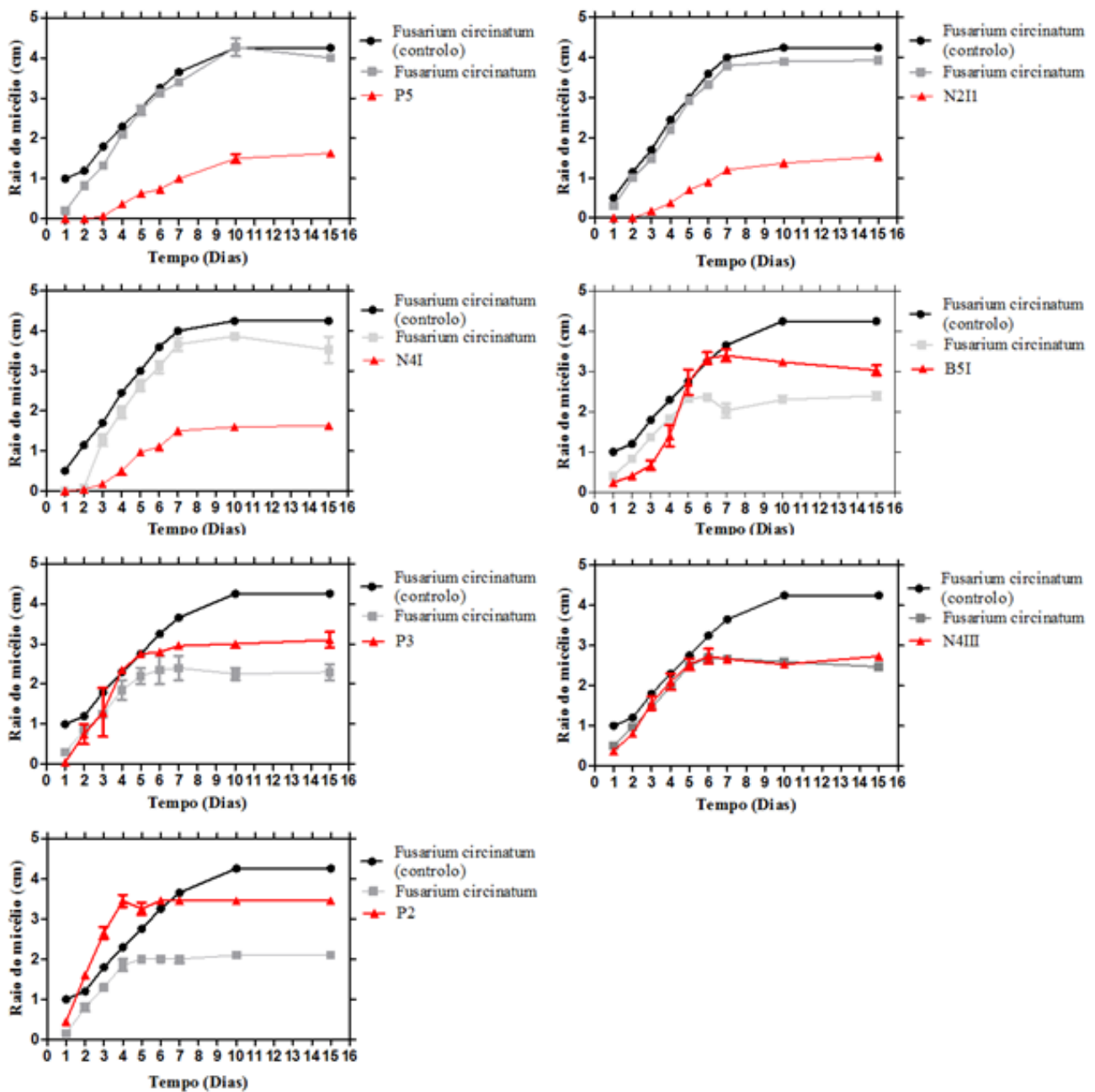


Figura 5 - Resultado do teste de antagonismo direto entre os fungos endofíticos (P5; N2II; N4I; B5I; P3; N4III; P2) e *F. circinatum*, obtidos através do programa GraphPad 5. A inibição micelial foi determinada por co-cultura, a 25°C durante um período de 15 dias, através da medição do raio de crescimento de cada fungo endofítico e de *F. circinatum*. Os dados são apresentados como média \pm desvio.

Diariamente foi realizado um registo fotográfico com o objetivo de complementar o trabalho desenvolvido (figura 6).

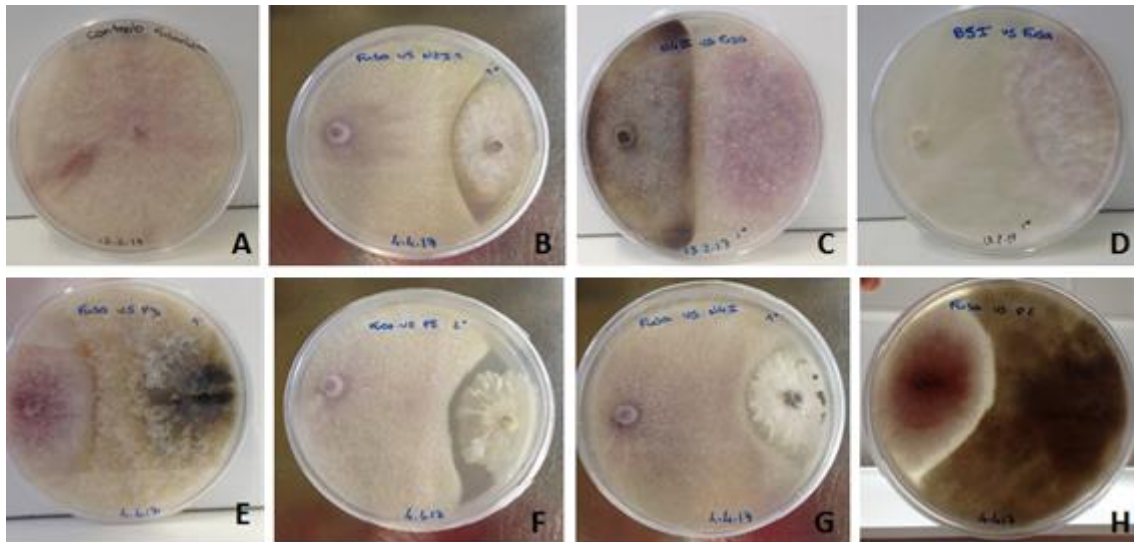


Figura 6 - Registro fotográfico do teste de antagonismo direto. Crescimento do micélio de *Fusarium Circinatum*, controle (A). Crescimento de fungo endofítico N2I1 (B), N4III (C), B5I (D), P3 (E), P5 (F), N4I (G) e P2 (H). Crescimento do micélio de *F. circinatum* e de cada fungo endofítico medido após 15 dias de incubação a 25°C.

4.2.2 Teste de inibição por compostos orgânicos voláteis

Todos os testes de inibição por compostos orgânicos voláteis (COV) realizados entre cada fungo endofítico e *F. circinatum* apresentaram resultado negativo, uma vez que nenhum fungo endofítico inibiu o crescimento do micélio de *F. circinatum*, como se pode observar na figura 7.

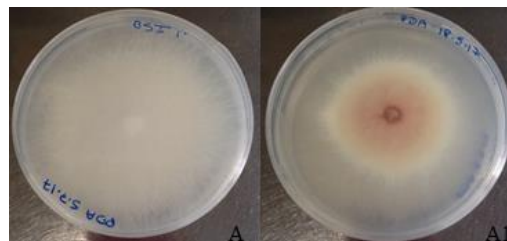


Figura 7 - Imagem ilustrativa do resultado negativo do teste de inibição por compostos orgânicos voláteis. Crescimento do isolado B5I (A) e respectiva placa sobreposta contendo *Fusarium Circinatum* (A1). B5I (A) não inibiu o crescimento de *F. circinatum*, após 7 dias de incubação a 25°C.

4.3 Identificação de fungos endofíticos

4.3.1 Amplificação da região ITS

A partir dos 34 isolados obtidos de três diferentes espécies de pinheiro (*P. pinea*, *P. pinaster*, *P. nigra*), apenas 7 foram relevantes para este estudo. Para cada um destes

isolados foi amplificada a região ITS do gene que codifica para o rDNA (Figura 10). Cada produto obtido por amplificação da região ITS foi submetido a uma electroforese em gel de agarose (figura 8).

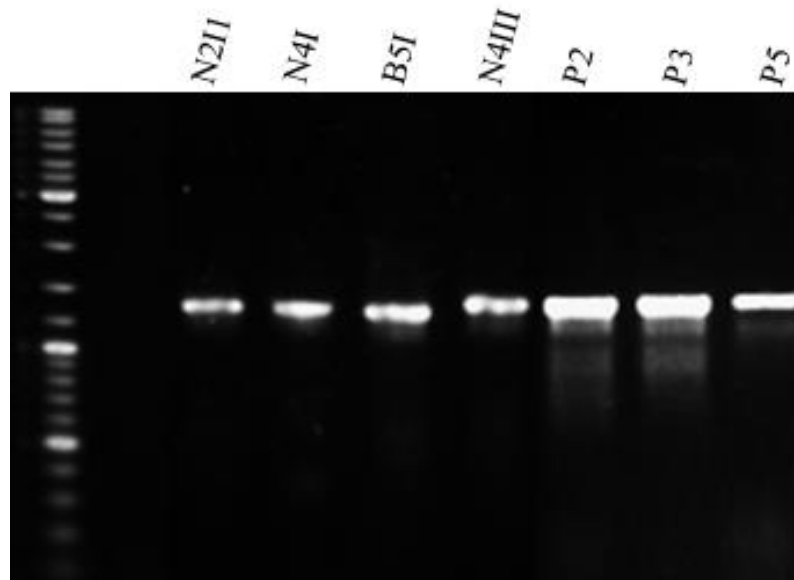


Figura 8 - Imagem obtida por análise do gel de agarose, resultante da aplicação da técnica de ITS-PCR.

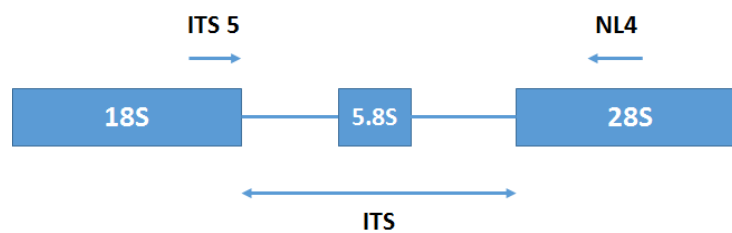


Figura 9 - Desenho esquemático da posição dos primers ITS5 e NL4.

4.3.2 Determinação da sequência nucleotídica

Uma vez obtidas as respectivas sequências nucleotídicas de cada isolado, fez-se uma comparação destes resultados com as sequências presentes na base de dados GenBank, utilizando o programa BLAST de modo a identificar a espécie correspondente a cada isolado. Os resultados obtidos relativamente aos fungos endofíticos do pinheiro encontram-se descritos na tabela 9. Para cada amostra é apresentado o nome da espécie mais estritamente relacionada, o hospedeiro da qual foi obtido o isolado e a percentagem de similaridade.

Tabela 9 - Identificação de cada isolado do pinheiro com base na sua sequência nucleotídica e o hospedeiro do qual foi isolado.

Isolados	Hospedeiro	Identificação – Similaridade (%)
P5	<i>P. pinea</i>	<i>Nemania diffusa</i> (99%)
N2I1	<i>P. nigra</i>	<i>Plectania rhytidia</i> (100%)
P2	<i>P. pinea</i>	<i>Fusarium solani</i> (99%)
P3	<i>P. pinea</i>	<i>Fusarium solani</i> (99%)
N4I	<i>P. nigra</i>	<i>Xylaria arbuscula</i> (98%)
B5I	<i>P. pinaster</i>	<i>Rosellinia limonispora</i> (96%)
N4III	<i>P. nigra</i>	<i>Microdiplodia miyakei</i> (99%)

4.4 Caracterização da atividade enzimática extracelular

Para cada fungo endofítico foi analisado o seu potencial para produzir enzimas extracelulares, avaliando assim a sua atividade amilolítica, proteolítica, lipolítica, pectinolítica, celulolítica, de xilanase, de urease e de lacase.

4.4.1 Detecção de atividades enzimáticas extracelulares

Relativamente ao isolado N2I1, este apenas apresentou a capacidade de produzir celulase e amilase (figura 10), enquanto P5 produziu diversas enzimas, nomeadamente lipase, protease, amilase, celulase e lacase (figura 11). Referente ao isolado N4I, este apresentou resultados positivos quanto à produção de lipase, celulase, amilase e xilanase, como se pode observar na figura 12. Em relação ao isolado B5I, este apresentou atividade enzimática positiva para as enzimas lipase, celulase e amilase (figura 13). O isolado P2 apenas apresentou atividade lipolítica e amilolítica (figura 14). O isolado P3 demonstrou a capacidade de produzir enzimas como a xilanase, lipase e amilase, como se pode verificar na figura 15. Contudo, o isolado N4III apenas foi capaz de produzir a enzima celulase (figura 16). Na tabela 10 pode-se observar de forma resumida os resultados obtidos de cada fungo endofítico quanto à sua produção (+) ou ausência de produção (-) de cada enzima extracelular testada neste estudo.

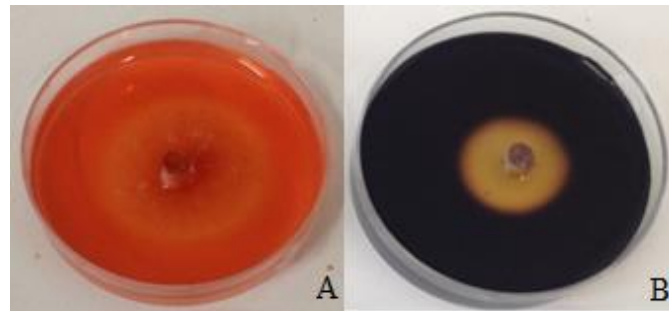


Figura 10 - Fotografia do isolado N2I1 produtor de celulase (A) e amilase (B).

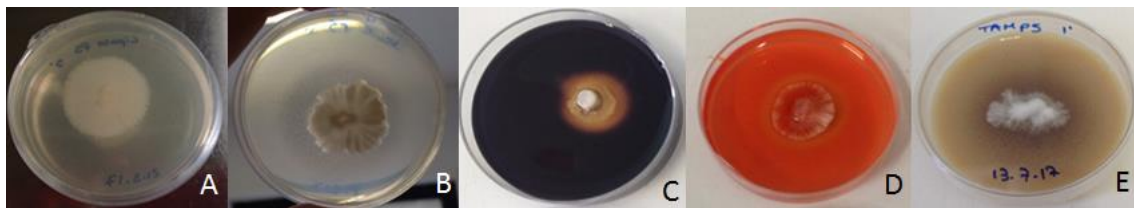


Figura 11 - Fotografia do isolado P5 produtor de lipase (A), protease (B), amilase (C), celulase (D) e lacase (E).

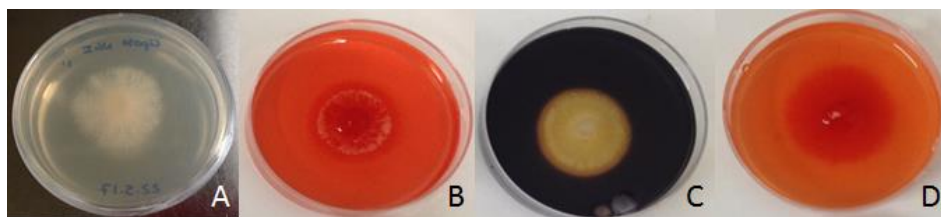


Figura 12 - Fotografia do isolado N4I produtor de lipase (A), celulase (B), amilase (C) e xilanase (D).

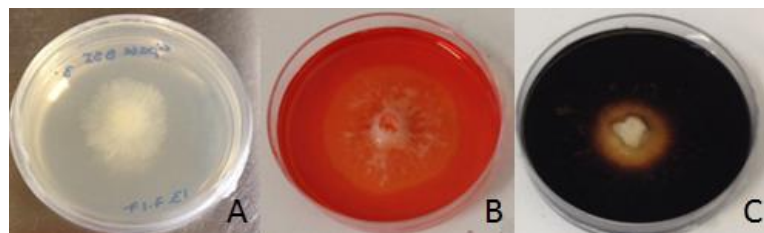


Figura 13 - Fotografia do isolado B5I produtor de lipase (A), celulase (B) e amilase (C).

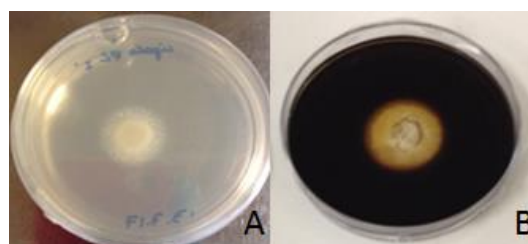


Figura 14 - Fotografia do isolado P2 produtor de lipase (A) e amilase (B).

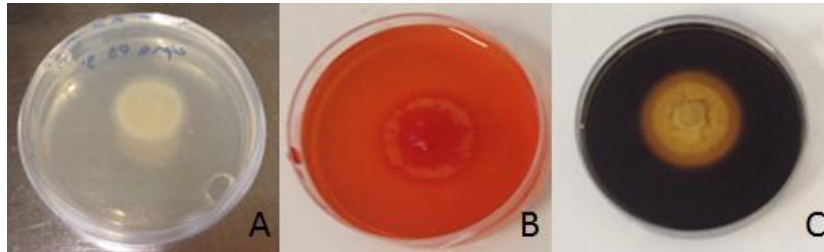


Figura 15 - Fotografia do isolado P3 produtor de lipase (A), xilanase (B) e amilase (C).

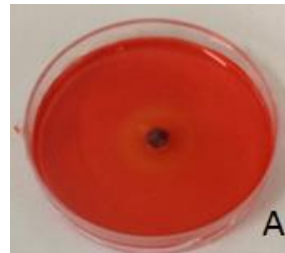


Figura 16 - Fotografia do isolado N4III produtor de celulase (A).

Tabela 10 - Presença ou ausência das várias enzimas extracelulares, nos isolados em estudo.

Isolado	Espécie	Lipase	Amilase	Celulase	Xilanase	Protease	Pectinase	Urease	Lacase
N2II	<i>Plectania rhytidia</i>	-	+	+	-	-	-	-	-
P5	<i>Nemania diffusa</i>	+	+	+	-	+	-	-	+
N4I	<i>Xylaria arbuscula</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
B5I	<i>Rosellinia limonispora</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
P2	<i>Fusarium solani</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
P3	<i>Fusarium solani</i>	+	+	-	+	-	-	-	-
N4III	<i>Microdiplodia miyakei</i>	-	-	+	-	-	-	-	-

Para além das fotografias que ilustram a positividade dos testes de atividade enzimática, pode-se observar nas figuras 17 – 19 o índice enzimático (%) referente a cada enzima produzida por cada isolado.

De um modo geral, cada fungo endofítico foi capaz de produzir algum tipo de enzimas, embora nenhum isolado tenha tido a capacidade de produzir urease e pectinase (tabela 10).

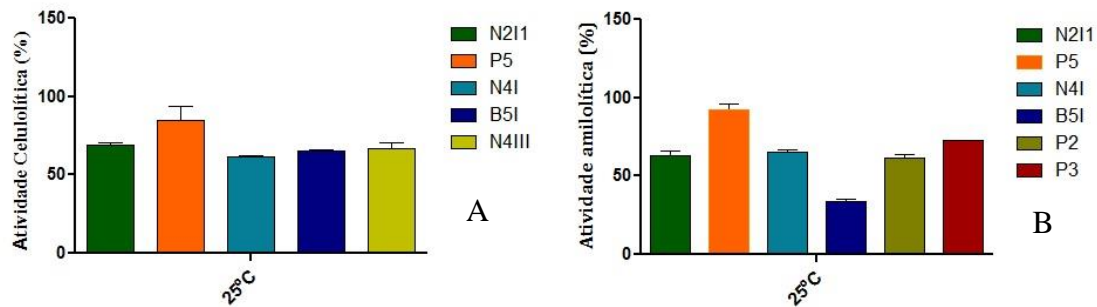


Figura 17 – Representação estatística da atividade enzimática obtida através do programa GraphPad 5. Índice enzimático referente à atividade celulolítica (A). N211 (69.35%); P5 (85.23%); N4I (61.69%); B5I (65.24%); N4III (66.90%). Índice enzimático referente à atividade amilolítica (B). N211 (63.12%); P5 (92.11%); N4I (65.05%); B5I (33.99%); P2 (61.98%); P3 (73.09%).

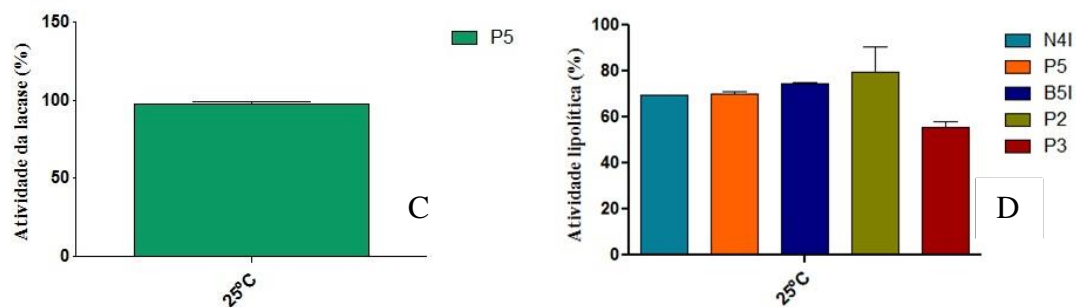


Figura 18 - Representação estatística da atividade enzimática obtida através do programa GraphPad 5. Índice enzimático referente à atividade da lacase (C). P5 (97.71%). Índice enzimático referente à atividade lipolítica (D). N4I (69.35%); P5 (70.23%); B5I (74.45%); P2 (79.78%); P3 (55.75%).

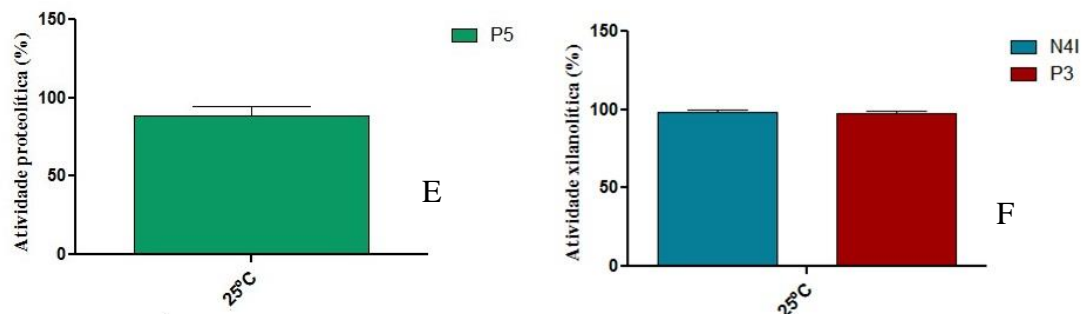


Figura 19 - Representação estatística da atividade enzimática obtida através do programa GraphPad 5. Índice enzimático referente à atividade proteolítica (E). P5 (88.80%). Índice enzimático referente à atividade xilanolítica (F). N4I (98.84%); P3 (97.44%).

4.5 Teste de Antagonismo de bactérias endofíticas

4.5.1 Teste de Antagonismo direto – batérias endofíticas vs *Fusarium circinatum*

O teste de antagonismo direto realizado de modo a avaliar o potencial antagonismo de bactérias endofíticas na presença de *F. circinatum* concluiu que das 139 bactérias endofíticas (descritas no anexo III) apenas 5 (descritas na tabela 11) possuíam a capacidade de inibir o crescimento de *F. circinatum*, como se pode observar na figura 20.

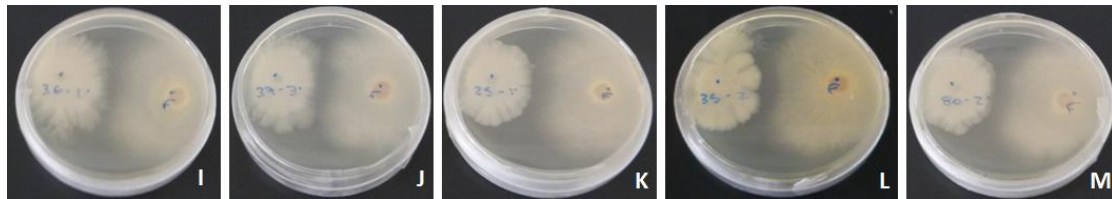


Figura 20 - Registo fotográfico do teste de antagonismo direto. Crescimento de bactérias endofíticas 36. (I), 37. (J), 25. (K), 35. (L), 80. (M) em contato direto com *F. circinatum*, em meio de cultura PCA. Crescimento de *F. circinatum* e de cada bactéria endofítica medido ao 20º dia de incubação a 25°C.

Tabela 11 - Identificação de bactérias endofíticas que apresentaram atividade antagonista contra *Fusarium circinatum*, no teste de antagonismo direto.

Isolado	Hospedeiro	Identificação – similaridade (%)
36.	<i>P. pinea</i>	<i>Bacillus cereus</i> (100%)
37.	<i>P. pinaster</i>	<i>Bacillus cereus</i> (100%)
25.	<i>P. pinaster</i>	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (100%)
35.	<i>P. pinaster</i>	<i>Bacillus toyonensis</i> / <i>Bacillus thuringiensis</i> (99.90%)
80.	<i>P. pinaster</i>	<i>Moraxella osloensis</i> (99.57%)

5. DISCUSSÃO

O cancro resinoso do pinheiro, causado por *F. circinatum* é uma doença que afeta mundialmente várias espécies de *Pinus*, sendo assim importante o estudo dos seus microrganismos endofíticos (fungos e bactérias) de modo a perceber se alguns destes possuem a capacidade de controlar o fungo patogénico.

Para a realização deste estudo foram recolhidas amostras de três diferentes espécies de pinheiro assintomáticas, nomeadamente, pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*), pinheiro-manso (*Pinus pinea*) e pinheiro-larício (*Pinus nigra*), que posteriormente foram desinfectadas e preparadas de modo a permitir o crescimento e subsequente isolamento de fungos endofíticos que usualmente se encontram no interior dos tecidos vegetais. Todo o processo de desinfeção permitiu assim, a eliminação dos microrganismos epifíticos, isto é, dos microrganismos que habitam naturalmente a superfície da planta em questão e cujo estudo não faz parte dos objetivos deste trabalho. Neste sentido, a utilização de tecidos vegetais sem qualquer sintoma aparente permitiu essencialmente a recolha de microrganismos endofíticos, importantes para este estudo.

Uma vez que o objetivo deste estudo foi avaliar a comunidade endofítica do pinheiro como agentes de biocontrolo contra *F. circinatum*, foi essencial a realização de alguns ensaios, tais como o teste de antagonismo direto, o teste de inibição por compostos orgânicos voláteis (COVs) e a avaliação da atividade enzimática, com a finalidade de analisar diversos parâmetros fisiológicos referentes aos endófitos.

Deste modo, realizou-se o teste de antagonismo direto a 34 fungos endofíticos, com o intuito de verificar a capacidade dos endófitos de inibir o crescimento de micélio de *F. circinatum*, no qual se verificou que apenas 7 apresentaram capacidade antagonista perante a presença do fungo patogénico. Desta forma, tendo em conta o objetivo deste estudo, apenas estes 7 isolados apresentaram interesse para a realização do trabalho, tendo sido descartados os restantes isolados.

No que diz respeito aos resultados obtidos no teste de antagonismo direto realizado entre cada fungo endofítico e *F. circinatum* (figura 5 e 6), podemos aferir que houve inibição do fungo patogénico por parte dos fungos endofíticos *Rosellinia limonispora*, *Fusarium solani*, *Nemania difusa*, *Plectania rhytidia* e *Xylaria arbuscula* (isolado B5I, P3, P5, N2I1, N4I e P2), quando colocados em contato direto, embora nos respetivos gráficos (figura 5) esse resultado não seja tão evidente, demonstrando em determinados gráficos um crescimento de *F. circinatum* superior ao dos fungos endofíticos. Em contrário, estudo realizado afirma que *Trichoderma* apresenta um crescimento superior relativamente a *F. circinatum*, enquanto determinadas estirpes de *Clonostachys*

apresentaram taxas de crescimento mais lentas que o fungo patogénico (Moraga-Suazo *et al.*, 2011).

Contudo, o isolado *Rosellinia limonispora* (B5I) e os dois isolados pertencentes ao complexo *Fusarium solani* (P3 e P2) apresentaram evidência de inibição do crescimento do micélio de *F. circinatum*, como se pode verificar nos respetivos gráficos (figura 5), o que pode sugerir que estes fungos são bastante competitivos quanto ao espaço e aos nutrientes, como observado num estudo realizado com *Trichoderma* (Moraga-Suazo *et al.*, 2011).

O isolado *Microdiplodia miyakei* (N4III) apresentou um crescimento semelhante ao de *F. circinatum*, quando colocados em contacto direto (figura 6), demonstrando na representação gráfica (figura 5) uma ligeira inibição de *F. circinatum*.

Relativamente à análise gráfica (figura 5) é visível em determinados isolados como *Rosellinia limonispora*, *Fusarium solani* e *Microdiplodia miyakei* (B5I, P3, N4III e P2) uma ligeira descida no seu crescimento, entre o quarto e sétimo dia, sendo rapidamente contornada.

Não existem estudos referentes à atividade antagonista dos fungos endofíticos identificados neste trabalho perante a presença de *F. circinatum*, contudo determinados estudos referenciam outros fungos, assim como, *Trichoderma viride* isolado de *Pinus radiata* como potenciais inibidores de crescimento de *F. circinatum* in vitro, sendo importante referenciar que o género *Trichoderma* é um dos mais utilizados como agente de biocontrolo (Martínez-Álvarez *et al.*, 2012). Outro estudo realizado a vários tecidos de *Pinus* spp. com o intuito de avaliar a capacidade de 154 endófitos na redução do crescimento de *F. circinatum*, através da utilização de diferentes indicadores, demonstrou que 138 endófitos apresentaram atividade antagonista (Martínez-Álvarez *et al.*, 2016).

Neste sentido, uma vez que o meu trabalho iniciou num pequeno número de isolados seria necessário realizar este teste a um número alargado de isolados de forma a obter resultados mais concretos, bem como a utilização de vários indicadores que permitam a deteção de antagonismo produzida através de diferentes mecanismos, por parte dos fungos endofíticos.

Após a concretização do teste de antagonismo direto, procedeu-se à realização do teste de inibição por compostos orgânicos voláteis com o objetivo de verificar se a inibição do crescimento de micélio de *F. circinatum* por parte dos 7 fungos endofíticos se devia à libertação de compostos voláteis, o que revelou um resultado negativo. Desta forma, os compostos voláteis atuam como principal defesa contra agentes patogénicos,

sendo de extrema importância o seu estudo no sentido em que podem revelar as interações entre os fungos endofíticos e o patógeno (Gonçalves, 2013). Estes compostos produzidos por fungos endofíticos são uma classe conhecida de biopesticidas, apresentando assim, elevadas propriedades antimicrobianas (Medina-Romero *et al.*, 2017). Além disso, as taxas de produção de compostos orgânicos voláteis dependem de vários fatores, como tempo, temperatura, substrato, interações com outras espécies e outras variáveis ambientais específicas para cada microrganismo (Medina-Romero *et al.*, 2017).

Para a realização deste teste *in vitro*, a placa contendo o fungo patogénico foi colocada de forma invertida sobre cada placa contendo o fungo endofítico, ambas seladas com parafilm, de forma a evitar qualquer perda de metabolitos (Medina-Romero *et al.*, 2017). O teste realizado apresentou resultado negativo para todos os isolados (figura 7). Neste sentido, poucos estudos foram realizados para avaliar a produção de compostos orgânicos voláteis por parte de fungos endofíticos de *Pinus* spp., sendo a maioria dos estudos relacionados com a atividade antimicrobiana de COVs sobre microrganismos fitopatogénicos direcionados para os ascomicetos, nomeadamente *Trichoderma* spp. e *Muscodor albus* (Lívia, 2013).

Para além da realização dos testes anteriormente referidos, os fungos endofíticos foram avaliados e caracterizados quanto à produção das enzimas amilase, lipase, celulase, pectinase, protease, lacase, xilanase e urease. Para a deteção destas enzimas recorreu-se à utilização de meios seletivos, o que torna este método bastante sensível e específico. Porém, a deteção da degradação do meio por parte da enzima produzida pelo fungo também facilita a sua deteção (Saraiva, 2009).

No presente estudo, nenhum isolado foi capaz de produzir todas as enzimas extracelulares testadas. Neste sentido, nenhum fungo endofítico testado apresentou capacidade de produzir urease e pectinase (tabela 10). Segundo um estudo realizado a 40 isolados de fungos filamentosos de seis géneros (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium* e *Rhizopus*), 13 produziram pectinases, o que corrobora os resultados do presente estudo, uma vez que nenhum fungo endofítico testado foi capaz de produzir pectinase (Pereira, 2012).

No presente estudo, apenas um isolado (*Nemania diffusa* - P5) foi capaz de produzir as enzimas lacase e protease (figura 11). Num estudo realizado para avaliar a atividade de enzimas extracelulares de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais, concluiu-se que apenas 3 isolados de 3 plantas diferentes foram capazes de produzir lacase, concluindo que poucos fungos endofíticos foram capazes de produzir esta enzima

(Srinivas *et al.*, 2013). Contudo, (Maria *et al.*, 2005) reportaram que apenas alguns fungos endofíticos foram capazes de produzir lacase, embora a sua atividade seja observada em diversos fungos marinhos. A natureza endofítica desses fungos pode ser a razão da falta de atividade de lacase, uma vez que uma enzima ativa pode danificar a planta hospedeira (Maria *et al.*, 2005). É importante salientar que *Nemania diffusa* apresentou maior atividade de lacase do que proteolítica.

Quanto à produção de lipases por parte dos fungos endofíticos *Nemania difusa*, *Xylaria arbuscula*, *Rosellinia limonispota* e *Fusarium solani* (P5, N4I, B5I, P2 e P3) presente na figura 10-15, o isolado P2 (*Fusarium solani*) apresentou a maior atividade enzimática para a lipase, sendo P3 (*Fusarium solani*) o isolado que demonstrou a menor atividade lipolítica. Estudo realizado por (Colen *et al.*, 2006) a 59 estirpes fúngicas do solo, mencionou que 25 estirpes foram capazes de apresentar atividade lipolítica. Lipases também são produzidas por fungos endofíticos tais como, *Acremonium sp.*, *Alternaria chlamydosporus*, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.* e *Pestalotiopsis sp.* (Maria *et al.*, 2005).

Os fungos endofíticos *Plectania rhytidia*, *Nemania difusa*, *Xylaria arbuscula*, *Rosellinia limonispota* (N2I1, P5, N4I, B5I) como demonstrado na figura 10-13 e *Microdiplodia miyakei* (N4III) presente na figura 16, apresentaram resultado positivo para a produção de celulase, sendo *Nemania diffusa* o isolado com maior atividade celulolítica (figura 17,A). Os restantes isolados apresentaram valores bastante semelhantes entre si. No estudo referido anteriormente, realizado por (Maria *et al.*, 2005) também foi referido que os 7 fungos endofíticos testados produziram a enzima celulase. Em relação à produção de xilanase, apenas *Xylaria arbuscula* (figura 12) e *Fusarium solani* (P3) (figura 15) apresentaram resultado positivo, demonstrando uma atividade xilanolítica idêntica entre eles (figura 17, F). (Choi *et al.*, 2005) testaram 21 isolados endofíticos de *Brucea javanica*, quanto à sua habilidade de produzir enzimas extracelulares, afirmando que 15 dos isolados foram capazes de produzir xilanase, embora apenas um isolado apresentou uma reação forte.

Quanto à produção de amilase, os fungos endofíticos *Plectania rhytidia*, *Nemania diffusa*, *Xylaria arbuscula* e *Fusarium solani* (N2I1, P5, P2, P3, N4I) apresentaram resultado positivo (figura 10-15). De todas as enzimas testadas, a amilase foi a enzima mais produzida pelos fungos endofíticos. Neste estudo, *Nemania diffusa* apresentou elevada atividade amilolítica, sendo *Rosellinia limonispota* o endófito com menor capacidade de produzir amilase (figura 17, A). Segundo (Tran *et al.*, 2010), observaram

que *Aureobasidium pullulans* isolado de *Acacia baileyana* (S6E3) e de *A. floribunda* (S8E6) exibem atividade amilolítica, enquanto (Maria *et al.*, 2005) demonstraram que apenas um pequeno número de isolados conseguiu produzir amilase.

Deste modo, pode-se concluir que os fungos endofíticos possuem a capacidade de produzir determinadas enzimas extracelulares, tendo estas um papel crucial nos processos de biodegradação e hidrólise, uma vez que estes processos são considerados mecanismos importantes contra a infecção do patógeno, bem como, para a obtenção de nutrientes essenciais da planta hospedeira (Fouda *et al.*, 2015).

Uma vez que os 7 fungos endofíticos apresentaram interesse para este estudo foi importante proceder à sua identificação. Para tal, recorreu-se à utilização de técnicas moleculares, nomeadamente a extração de DNA, a amplificação e sequenciação de uma região específica (região ITS), rejeitando a avaliação morfológica, uma vez, que isolados de uma mesma espécie de fungo podem apresentar uma enorme variedade fenotípica. A amplificação da região ITS do gene que codifica para rDNA foi eleita, uma vez que esta região é considerada o marcador filogenético predileto para a identificação de espécies fúngicas. Ao submeter o produto da técnica de ITS-PCR a uma electroforese em gel de agarose, obteve-se a presença de uma banda correspondente a cada isolado (figura 8), indicadora da amplificação, visto que os primers utilizados (ITS5 e NL4) usam regiões conservadas dos genes 18S e 28S rDNA, respetivamente, com o intuito de amplificar regiões não codificantes (ITS) entre eles (figura 9). Estas regiões não codificantes evoluem de forma rápida e podem apresentar grandes variações entre espécies do mesmo género (Aleixo, 2013).

Após a obtenção das respetivas sequências nucleotídicas de cada isolado, procedeu-se à sua comparação com as sequências de estirpes presentes numa base de dados GenBank, permitindo assim, a sua afiliação filogenética. Os resultados obtidos relativamente aos fungos endofíticos do pinheiro (tabela 9) demonstraram que cada isolado corresponde a diferentes espécies, sendo que dois deles (P2 e P3) pertencem ao complexo *Fusarium solani*, apresentando 99% de similaridade (extensão em que duas sequências de nucleótidos possuem os mesmos resíduos nas mesmas posições num alinhamento, expressa em percentagem). Membros do complexo de espécies de *Fusarium solani* (FSSC) são capazes de causar doenças em diversas culturas de importância agrícola, representando mais de 60 espécies. *Fusarium solani* possui uma distribuição cosmopolita, podendo ser encontrado no solo, raíz, madeira, tecidos herbáceos, fruta e em tecidos animais queratináceos. Os seus hospedeiros albergam várias famílias de

plantas, sendo que determinadas estirpes podem causar infecções em seres humanos (Coleman, 2016). Não existem muitos estudos referentes a *Fusarium solani* como agente de biocontrole, no entanto um estudo realizado afirmou que uma estirpe não patogénica de *Fusarium solani* foi capaz de colonizar as raízes de tomate e assim proteger a planta contra o patógeno *Septoria lycopersici* (Vos *et al.*, 2014).

Para além destes, também P5 e N4III demonstraram 99% de similaridade com *Nemania diffusa* e *Microdiplodia miyakei*, respetivamente. Relativamente a estes dois fungos não existe muita informação disponível, uma vez que poucos estudos foram realizados. Segundo (Liu *et al.*, 2016), *Nemania difusa*, isolada de *Cephalotaxus hainanensis*, considerada uma planta medicinal pertencente à família de coníferas *Cephalotaxaceae*, demonstra ter elevada atividade antimicrobiana e antitumoral. Quanto a *Microdiplodia miyakei*, (Caballero-George *et al.*, 2013) isolou este fungo de esporas marinhas. No entanto, quanto a *Microdiplodia* spp., estudos afirmam que pode ser considerado um agente de biocontrole, como constatado num estudo que avaliou a atividade antifúngica dos endófitos contra o fungo patogénico *R. quercivora*, concluindo que de 50 isolados fúngicos, uma estirpe de *Microdiplodia* spp. demonstrou inibir *in vitro* *R. quercivora* (Shiono *et al.*, 2015).

Contudo, apenas N2I1 apresenta o valor máximo de similaridade (100%) com a espécie *Plectania rhytidia*, pertencente ao grupo dos ascomicetos. Não existem estudos referentes a esta espécie nem de fungos como potenciais agentes de biocontrole pertencentes a *Plectania* spp.. B5I apenas demonstrou 96% de similaridade com *Rosellinia limonispota*. Este fungo encontra-se distribuído no Noroeste da América do Norte e na Europa, sendo isolado como endófito (Checa *et al.*, 2008). As espécies de *Rosellinia* encontram-se distribuídas mundialmente, sendo comuns em regiões tropicais e temperadas. Algumas vivem endofíticamente e, ocasionalmente podem-se transformar em agentes patogénicos (Ten *et al.*, 2006).

Por último, o isolado N4I apresentou 98% de similaridade com *Xylaria arbuscula*. Este fungo pode ser localizado em zonas cujas condições climáticas apresentam temperaturas quentes a tropicais, podendo ser encontrado na casca e madeira decorticada. Segundo um estudo realizado por (Amaral *et al.*, 2017), *Xylaria arbuscula*, isolada de *Cupressus lusitanica*, apresenta atividade biológica uma vez que demonstrou capacidade de produzir uma importante classe de metabolitos secundários, nomeadamente citocalasinas.

No contexto de que as bactérias têm demonstrado ser microrganismos promissores no controlo biológico de fitopatogénios, foi também importante avaliar a capacidade de bactérias endofíticas de *Pinus* spp., obtidas de um outro estudo (anexo III) como potenciais agentes de biocontrolo contra *F. circinatum*.

Relativamente aos resultados deste teste, concluiu-se que das 139 bactérias endofíticas, apenas 5 (tabela 11) apresentaram capacidade de inibir o crescimento do micélio de *F. circinatum* (figura 20). O desenvolvimento do halo de inibição entre a colónia do fungo e o inóculo de bactéria, pode ocorrer devido à produção de metabolitos por parte das bactérias que se difundem no meio de cultura e suprimem o crescimento de *F. circinatum*.

Num estudo realizado de modo a avaliar o efeito antagonista de bactérias endofíticas de *Pinus taeda* L. na presença de *F. circinatum* demonstrou que as 5 estirpes de bactérias testadas possuíam a capacidade de inibir o crescimento de micélio de *F. circinatum* (Soria *et al.*, 2012). Também noutro estudo efetuado a 289 isolados bacterianos obtidos de grãos de trigo, observou-se que apenas 3 estirpes de bactérias diferentes (*Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces* sp. e *Bacillus subtilis*) apresentaram capacidade de inibir o crescimento de micélio de *F. graminearum* (Nourozian *et al.*, 2006), bem como num estudo realizado por (Karimi *et al.*, 2012), que constatou que 12 das 232 estirpes bacterianas apresentaram elevada atividade antagonista contra o patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Neste seguimento, tanto no meu trabalho realizado como nos estudos efetuados por outros autores, concluiu-se que a partir de um número elevado de isolados bacterianos apenas uma pequena porção apresenta atividade antagonista contra o fungo patogénico.

O isolado 36 e 37 obtidos de *P. pinea* e *P. pinaster*, respetivamente, apresentaram 100% de similaridade com *Bacillus cereus*. *Bacillus cereus* tem sido descrito por vários autores como uma espécie importante no biocontrolo de doenças de plantas. Estudo realizado por (De Deus Ribeiro Lima *et al.*, 2014) constatou a inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* por parte de *Bacillus cereus* pela produção de sideróforos, compostos voláteis, bacteriocinas e quitinase. O mesmo resultado também foi observado num outro estudo realizado com o objetivo de avaliar a atividade antagonista de *B. cereus* perante a presença de *Fusarium moniliforme* (Bressan *et al.*, 2010). Também num estudo realizado para avaliar o efeito antagonista de *Bacillus* spp. no biocontrolo da doença do tomate provocada por *Fusarium*, verificou que *B. cereus* foi a

espécie que apresentou a maior taxa de inibição de crescimento de micélio perante *Fusarium solani* (Ajillogba *et al.*, 2013).

Relativamente ao isolado 25 e 35, ambos obtidos de *P. pinaster*, apresentaram 100% de similaridade com *Bacillus weihenstephanensis* e 99.9% com *Bacillus toyonensis*/*Bacillus thuringiensis*, respetivamente. Ambos constituem membros do grupo *B. cereus* e encontram-se amplamente distribuídos no meio ambiente (Blackburn *et al.*, 2014). O que distingue *B. weihenstephanensis* e *B. thuringiensis* de outros membros do grupo *B. cereus* é o fato de *B. weihenstephanensis* ser psicrotolerante, uma vez que possui a capacidade de se desenvolver a baixas temperaturas, enquanto que *B. thuringiensis* produzem cristais proteicos com atividade inseticida. Existem ainda, subespécies de *B. thuringiensis* que produzem cristais tóxicos contra alguns protozoários, ácaros e nematodes (Andrade *et al.*, 2010; Blackburn *et al.*, 2014). Como tal, um estudo realizado a várias estirpes de *Bacillus* obtidas do solo associado a raízes de plantas de tomate com o objetivo de avaliar a sua atividade antagonista contra dois fungos fitopatogénicos, *Verticillium dahliae* e *Verticillium longisporum*, revelou que os isolados de *B. thuringiensis* inibiram *in vitro* o crescimento de *V. dahliae* apresentando pouca eficácia contra o patogénio *V. longisporum*, ao contrário de alguns isolados de *B. weihenstephanensis* que demonstraram ação antagonista para ambos os patogenos (Hollensteiner *et al.*, 2017).

Em relação a *B. toyonensis* não existem muitos estudos acerca da sua associação com plantas nem da sua ação como agente de biocontrolo. Contudo, segundo um estudo realizado para avaliar diversas estirpes de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas para inibir o crescimento de *Meloidogyne incognita* revelou que *B. toyonensis* apresentou atividade antagonista contra *M. incognita* (Xiang *et al.*, 2017). Um outro estudo demonstrou pela primeira vez que *B. toyonensis* apresenta capacidade para produzir diversos antimicrobianos, revelando que a estirpe endofítica BAC3151 pode ser eficaz no desenvolvimento de novas práticas de controlo de doenças microbianas em plantas (Lopes *et al.*, 2017).

Por fim, o isolado 80 obtido de *P. pinaster* apresentou 99.57% de similaridade com *Moraxella osloensis*. Esta bactéria encontra-se descrita como um agente patogénico humano oportunista e pode estar associado com *Phasmarhabditis hermafrodita*, nematodo parasita facultativo que afeta lesmas e caracóis (Tan *et al.*, 2001). No entanto, não existem estudos referentes a esta espécie como agentes de biocontrolo de fungos patogénicos de plantas.

Deste modo, com a realização deste trabalho pode-se concluir que a microbiota endofítica de *Pinus* spp. possui potenciais agentes de biocontrolo contra *F. circinatum*, no entanto será necessário realizar mais estudos para conhecer o seu mecanismo de ação, bem como, avaliar o seu efeito *in vivo*.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Identificar metabolitos secundários secretados por fungos endofíticos com elevado interesse na atividade antagónica contra *F. circinatum*:
- Perceber a função que estes metabolitos desempenham contra *F. circinatum*, essencialmente na redução da atividade dos fatores de virulência deste fungo patogénico;
- Tentar compreender quais são as enzimas mais eficazes no controlo biológico da doença causada pelo fungo patogénico;
- Quantificar as enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos que apresentaram atividade antagónica contra *F. circinatum*.

7. BIBLIOGRAFIA

- Aegerter, B. J., & Gordon, T. R. (2006). Rates of pitch canker induced seedling mortality among *Pinus radiata* families varying in levels of genetic resistance to *Gibberella circinata* (anamorph *Fusarium circinatum*). *Forest Ecology and Management*, 235(3), 14–17. doi: 10.1016/j.foreco.2006.07.011
- Ajilogba, C. F., Babalola, O. O. & Ahmad, F. (2013). Antagonistic effects of *Bacillus* species in biocontrol of tomato *Fusarium* wilt. *Studies on Ethno-Medicine*, 7(3), 205–216. doi:10.1080/09735070.2013.11886462
- Aleixo, A. M. F. (2013). *Biodiversidade de fungos endofíticos em Halimioneportulacoides* (Tese de mestrado, Universidade de Aveiro). Obtido de https://sigarra.up.pt/flup/pt/pub_geral.show_file?pi_gdoc_id=51781
- Alves, A. J. D. C. P. (2006). *Botryosphaeria* species on *Quercus* spp. and other woody hosts: taxonomy and phylogeny (Tese de doutoramento, Universidade de Aveiro). Obtido de <http://ria.ua.pt/handle/10773/4731>
- Amaral, L. da S., Fill, T. P., Santos, L. F. A., & Rodrigues-Filho, E. (2017). Biosynthesis and mass spectral fragmentation pathways of ¹³C and ¹⁵N labeled cytochalasin D produced by *Xylaria arbuscula*. *Journal of Mass Spectrometry*, 52(4), 239–247. doi:10.1002/jms.3922
- Andrade, E., Trindade, G., & Hernan, R. J. (2010). *Bacillus thuringiensis*: general characteristics and fermentation. *Semina: Ciências Agrárias*, 31, 945–958. Obtido de <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewFile/7599/6690>
- Bale, J. ., van Lenteren, J. ., & Bigler, F. (2008). Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 363(1492), 761–776. doi:10.1098/rstb.2007.2182
- Bandara, W. M. M. S., Seneviratne, G., & Kulasooriya, S. A. (2007). Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. *Journal of Biosciences*, 31(5), 645–650. doi:10.1007/BF02708417

- Berbegal, M., Landeras, E., Sánchez, D., Abad-Campos, P., Pérez-Sierra, A., & Armengol, J. (2015). Evaluation of *Pinus radiata* seed treatments to control *Fusarium circinatum*: Effects on seed emergence and disease incidence. *Forest Pathology*, 45(6), 525–533. doi:10.1111/efp.12204
- Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5), 355–383. doi:10.1016/S0734-9750(00)00041-0
- Blackburn, M. B., Martin, P. A. W., Kuhar, D., Farrar, R. R., & Gundersen-Rindal, D. E. (2014). Crystalliferous *Bacillus cereus* group bacteria from a Maryland hardwood forest are dominated by psychrotolerant strains. *MicrobiologyOpen*, 3(4), 578–584. doi:10.1002/mbo3.189
- Bragança, H., Diogo, E., Moniz, F., & Amaro, P. (2009). First Report of Pitch Canker on Pines Caused by *Fusarium circinatum* in Portugal. *Plant Disease*, 93(10), 1079. doi: 10.1094/PDIS-93-10-1079A
- Bressan, W., & Figueiredo, J. E. F. (2010). Chitinolytic *Bacillus* spp. isolates antagonistic to *Fusarium moniliforme* in maize. *Journal of Plant Pathology*, 92(2), 343–347.
- Budi, S. . ., Tuinen, D. Van, Arnould, C., Gianinazzi-Pearson, V., & Gianinazzi, S. (2000). Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. *Applied Soil Ecology*, 15, 191–199.
- Bugay, C. (2009). *Biossurfactantes produzidos por bacillus sp.: Estudos de produção e caracterização* (Tese de mestrado, Universidade Federal do Paraná). Obtido de <http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/27339/R%20-%20D%20-%20BUGAY,%20CRYSHELEN.pdf?sequence=1>
- Caballero-George, C., Bolaños, J., De León, L. F., Ochoa, E., Darias, J., D'croz, L., ... Porrás-Alfaro, A. (2013). Fungal Diversity in Marine Sponges From Highly Diverse Areas in the Isthmus of Panama. *Rubicon Foundation*, 23–30. Obtido de <http://archive.rubicon-foundation.org>

- Card, S. D., Hume, D. E., Roodi, D., McGill, C. R., Millner, J. P., & Johnson, R. D. (2015). Beneficial endophytic microorganisms of Brassica - A review. *Biological Control*, 90, 102–112. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.06.001
- Carlucci, A., Colatruglio, L., & Frisullo, S. (2007). First Report of Pitch Canker Caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (Southern Italy). *Plant Disease*, 91(12), 1683. doi: 10.1094/PDIS-91-12-1683C
- Checa, J., Arenal, F., Blanco, N., & Rogers, J. D. (2008). *Coniolarrella hispanica* sp. nov. and other additions to *Coniolarrella*. *Mycological Research*, 112(7), 795–801. doi:10.1016/j.mycres.2008.01.014
- Choi, Y. W., Hodgkiss, I. J., & Hyde, K. D. (2005). Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *Journal of Agricultural Technology*, 55–66.
- Coelho, A. L. R. (2013). *Otimização da extração sólido- líquido de antioxidantes de subprodutos florestais pelo método de superfície de resposta* (Tese de Mestrado, Instituto Superior de Engenharia do Porto). Obtido de <http://recipp.ipp.pt/handle/10400.22/6020>
- Coleman, J. J. (2016). The *Fusarium solani* species complex: Ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular Plant Pathology*, 17(2), 146–158. doi:10.1111/mpp.12289
- Colen, G., Junqueira, R. G., & Moraes-Santos, T. (2006). Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(8), 881–885. doi:10.1007/s11274-005-9118-9
- Conejero, M. V. (2013). *Susceptibilidad de Pinus pinaster Ait. Ante Fusarium circinatum Nirenberg & O'Donnell: variabilidad y efectos maternos* (Tese de Doutoramento, Universidad de Valladolid). Obtido de https://www.researchgate.net/profile/Maria_Vivas/publication/236970115_Susceptibility_of_Pinus_pinaster_Ait_to_Fusarium_circinatum_Nirenberg_and_ODonnell

_variability_and_maternal_effects/links/0c960527a6212c5d16000000/Susceptibility-of-Pinus-pinaster-Ait-

- Corrêa, B. O., Moura, A. B., Denardin, N. D., Soares, V. N., Schäfer, J. T., & Ludwig, J. (2008). Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletrichum Lindemuthianum* (Saac e Magn). *Revista Brasileira de Sementes*, 30(2), 156–163. doi:10.1590/S0101-31222008000200019
- Coutinho, T. A., Steenkamp, E. T., Mongwaketsi, K., Wilmot, M., & Wingfield, M. J. (2007). First outbreak of pitch canker in a South African pine plantation. *Australasian Plant Pathology*, 36(3), 256–261. doi:10.1071/AP07017
- De Deus Ribeiro Lima, O., De Jesus Machado Goes de Oliveira, L., Shirlei Brasil dos Santos e Silva, M., & Alice Costa Rodrigues, A. (2014). Ação antifúngica in vitro de isolados de *Bacillus* ssp. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Revista Caatinga*, 27(4), 57–64.
- Dinesh, R., Anandaraj, M., Kumar, A., Bini, Y. K., Subila, K. P., & Aravind, R. (2015). Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. *Microbiological Research*, 173, 34–43. doi:10.1016/j.micres.2015.01.014
- EFSA. (2010). Risk assessment of *Gibberella circinata* for the EU territory and identification and evaluation of risk management options. *European Food Safety Authority*, 8(6), 1–93. doi:10.2903/j.efsa.2010
- EPPO. (2005). Data sheets on quarantine pests: *Gibberella circinata*. *EPPO Bulletin*, 35(3), 383–386. doi:10.1111/j.1365-2338.2005.00905.x
- Esposito-polesi, N. P. (2011). Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. *Revista Brasileira de Biociências*, 9(4), 533–541.
- Forestis. (2012). Associação Florestal de Portugal. Obtido de: <http://forestis.pt/destaques,0,400.aspx>

- Fotso, J., Leslie, J. F., & Smith, J. S. (2003). Production of Beauvericin, Moniliformin, Fusaproliferin, and Fumonisin B1, B2, and B3 by Fifteen Ex-Type Strains of *Fusarium* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 23(1), 20–26. doi:10.1128/AEM.68.10.5195
- Fouda, A. H., Hassan, S. E. D., Eid, A. M., & Ewais, E. E. D. (2015). Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). *Annals of Agricultural Sciences*, 60(1), 95–104. doi:10.1016/j.aoas.2015.04.001
- Ganley, R. J., Watt, M. S., Manning, L., & Iturriza, E. (2009). A global climatic risk assessment of pitch canker disease. *Canadian Journal of Forest Research*, 39(11), 2246–2256. doi:10.1139/X09-131
- Gonçalves, E. V. (2013). *Avaliação da resistência de espécies de Pinus a B xylophilus pela análise de fitoquímicos* (Tese de Mestrado, Universidade de Lisboa). Obtido de <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Gordon, T. R., Storer, a. J., & Wood, D. L. (2001). The Pitch Canker Epidemic in California. *Plant Disease*, 85(11), 1128–1139. doi:10.1094/PDIS.2001.85.11.1128
- Gordon, T. R., Swett, C. L., & Wingfield, M. J. (2015). Management of *Fusarium* diseases affecting conifers. *Crop Protection*, 73, 28–39. doi:10.1016/j.cropro.2015.02.018
- Gqola, B. N. (2015). *Biological Control of Fusarium Wilt of Pine Seedlings Using Endophytic Microorganisms and Silicon* (Tese de Mestrado, University of Kwazulu-Natal). Obtido de <https://researchspace.ukzn.ac.za/xmlui/handle/10413/13364>
- Guo, B., Wang, Y., Sun, X., & Tang, K. (2008). Bioactive natural products from endophytes: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(2), 136–142. doi:10.1007/s10438-008-2002-2
- Hammerbacher, A. (2005). *Biology and Epidemiology of Fusarium circinatum* (Tese de

- Mestrado, University of Pretoria). Obtido de <https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/25707/dissertation.pdf?sequence=1>
- Hammerbacher, A., Ganley, R. J., Steenkamp, E. T., Gordon, T. R., & Coutinho, T. A. (2008). Pitch canker caused by *Fusarium circinatum* - a growing threat to pine plantations and forests worldwide. *Australasian Plant Pathology*, 37, 319–334.
- Hankin, L., & Anagnostakis, S. L. (1975). The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. *Mycologia*, 67(3), 597–607. doi:10.2307/3758395
- Hollensteiner, J., Wemheuer, F., Harting, R., Kolarzyk, A. M., Diaz Valerio, S. M., Poehlein, A., ... Liesegang, H. (2017). *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus weihenstephanensis* inhibit the growth of phytopathogenic *Verticillium* species. *Frontiers in Microbiology*, 7(2171), 1–19. doi:10.3389/fmicb.2016.02171
- Hyde, K. D., & Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, 33, 163–173.
- ICNF. (2013). 6º Inventário Florestal Nacional – Áreas dos usos do solo e das espécies florestais de Portugal continental em 1995, 2005 e 2010. Obtido de <http://www.icnf.pt/portal/florestas/ifn/resource/ficheiros/ifn/ifn6-res-prelimv1-1>
- ICNF. (2015). Proteção e reabilitação de povoamentos florestais. Obtido de <http://www.icnf.pt/portal/florestas/foflo/pdr2020/resource/doc/Areas-rrc-v-final.pdf>
- Inman, A. R., Kirkpatrick, S. C., Gordon, T. R., & Shaw, D. V. (2008). Limiting Effects of Low Temperature on Growth and Spore Germination in *Gibberella circinata*, the Cause of Pitch Canker in *Pine* Species. *Plant Disease*, 92(4), 542–545. doi:10.1094/PDIS-92-4-0542
- Iturrutxa, E., Trask, T., Mesanza, N., Raposo, R., Elvira-Recuenco, M., & Patten, C. L. (2017). Biocontrol of *Fusarium circinatum* infection of young *Pinus radiata* Trees.

Forests, 8(2), 1–12. doi:10.3390/f8020032

Jasim, B., Joseph, A. A., John, C. J., Mathew, J., & Radhakrishnan, E. K. (2014). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from the rhizome of *Zingiber officinale*. *3 Biotech*, 4(2), 197–204. doi:10.1007/s13205-013-0143-3

Karimi, K., Amini, J., Harighi, B., & Bahramnejad, B. (2012). Evaluation of biocontrol potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. against *Fusarium* wilt of chickpea. *Australian Journal of Crop Science*, 6(4), 695–703.

Kim, H., Park, J., Choi, S., Choi, K., Lee, G. P., Ban, S. J., ... Kim, C. S. (2003). Isolation and Characterization of *Bacillus* Strains for Biological Control. *The Journal of Microbiology*, 41(3), 196–201.

Landeras, E., P. García, Y. F., Braña, M., Fernández-Alonso, O., S. Méndez-Lodos, A. P.-S.-C.-J., & Armengol, J. (2005). Outbreak of Pitch Canker Caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. in Northern Spain. *Plant Disease*, 89(9), 1015. doi: 10.1094/PD-89-1015A

Lanna Filho, R., Ferro, H. M., & Pinho, R. S. C. (2010). Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. *Revista Trópica - Ciências Agrárias E Biológicas*, 4, 12–20. doi:10.0000/RTCAB.V4I2.145

Lazarotto, M., Muniz, M. F. B., Beltrame, R., Santos, Á. F. dos, Müller, J., & Araújo, M. M. (2013). Tratamentos Biológico e Químico em sementes de *Cedrela fissilis* para controle de *Rhizoctonia* sp. *Cerne*, 19(1), 169–175.

Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual. In *The Fusarium Laboratory Manual*. Obtido de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470278376.fmatter/pdf>

Lindow, S. E., & Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the Phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1875–1883. doi:10.1128/AEM.69.4.1875

- Liu, Y. H., Hu, X. P., Li, W., Cao, X. Y., Yang, H. R., Lin, S. T., ... Li, C. F. (2016). Antimicrobial and antitumor activity and diversity of endophytic fungi from traditional Chinese medicinal plant *Cephalotaxus hainanensis* Li. *Genetics and Molecular Research*, 15(2). doi:10.4238/gmr.15028633
- Lívia, P. (2013). *Produzidos Por Fungos Associados À Madeiras Em Decomposição E Tóxicos a Patógenos De Importância Florestal E Agrônômica* (Tese de Mestrado, Universidade Federal de Lavras). Obtido de <http://www.prrg.ufla.br/fitopatologia/wp-content/uploads/2015/11/231.pdf>
- Logrieco, A., Moretti, A., Castella, G., KostECKI, M., Golinski, P., Ritieni, A., & Chelkowski, J. (1998). Beauvericin production by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8), 3084–3088.
- Lopes, R., Cerdeira, L., Tavares, G. S., Ruiz, J. C., Blom, J., Horácio, E. C. A., ... Queiroz, M. V. (2017). Genome analysis reveals insights of the endophytic *Bacillus toyonensis* BAC3151 as a potentially novel agent for biocontrol of plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(10), 14. doi:10.1007/s11274-017-2347-x
- Lopez-Zamora, I., Bliss, C., Jokela, E. J., Comerford, N. B., Grunwald, S., Barnard, E., & Vasquez, G. M. (2007). Spatial relationships between nitrogen status and pitch canker disease in slash pine planted adjacent to a poultry operation. *Environmental Pollution*, 147(1), 101–111. doi:10.1016/j.envpol.2006.08.025
- Maphosa, M. N., Steenkamp, E. T., & Wingfield, B. D. (2016). Genome-Based Selection and Characterization of *Fusarium circinatum* - Specific Sequences. *Genes/Genomes/Genetics*, 6(3), 631–639. doi:10.1534/g3.115.025817
- Maria, G. L., Sridhar, K. R., & Raviraja, N. S. (2005). Antimicrobial and Enzyme Activity of Mangrove Endophytic Fungi of Southwest Coast of India. *Journal of Agricultural Technology*, 1, 67–80.
- Martínez-Álvarez, P., Alves-Santos, F. M., & Diez, J. J. (2012). In vitro and in vivo

- interactions between *Trichoderma viride* and *Fusarium circinatum*. *Silva Fennica*, 46(3), 303–316. doi:10.14214/sf.42
- Martínez-Álvarez, P., Vainio, E. J., Botella, L., Hantula, J., & Diez, J. J. (2014). Three mitovirus strains infecting a single isolate of *Fusarium circinatum* are the first putative members of the family *Narnaviridae* detected in a fungus of the genus *Fusarium*. *Archives of Virology*, 159(8), 2153–2155. doi:10.1007/s00705-014-2012-8
- Martínez-Álvarez, P., Fernández-González, R. A., Sanz-Ros, A. V., Pando, V., & Diez, J. J. (2016). Two fungal endophytes reduce the severity of pitch canker disease in *Pinus radiata* seedlings. *Biological Control*, 94, 1–10. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.11.011
- Medina-Romero, Y. M., Roque-Flores, G., & Macías-Rubalcava, M. L. (2017). Volatile organic compounds from endophytic fungi as innovative postharvest control of *Fusarium oxysporum* in cherry tomato fruits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(22), 8209–8222. doi:10.1007/s00253-017-8542-8
- Melnick, R. L., Zidack, N. K., Bailey, B. A., Maximova, S. N., Gultinan, M., & Backman, P. A. (2008). Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biological Control*, 46(1), 46–56. doi:10.1016/j.biocontrol.2008.01.022
- Mertz, L. M., Henning, F. A., & Zimmer, P. D. (2009). Bioprotectors and chemical fungicides in the treatment of soybean seeds. *Ciência Rural*, 13–18.
- Meyer, K. M., & Leveau, J. H. J. (2012). Microbiology of the phyllosphere: A playground for testing ecological concepts. *Oecologia*, 168(3), 621–629. doi:10.1007/s00442-011-2138-2
- Moraga-Suazo, P., Opazo, A., Zaldúa, S., González, G., & Sanfuentes, E. (2011). Evaluation of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. Strains to Control *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* Seedlings. *Chilean Journal of Agricultural Research*,

71(3), 412–417. doi:10.4067/S0718-58392011000300011

- Muñoz-Adalia, E. J., Flores-Pacheco, J. A., Martínez-Álvarez, P., Martín-García, J., Fernández, M., & Diez, J. J. (2016). Effect of mycoviruses on the virulence of *Fusarium circinatum* and laccase activity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 94, 8–15. doi:10.1016/j.pmpp.2016.03.002
- Nair, D. N., & Padmavathy, S. (2014). Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *The Scientific World Journal*, 11. doi:10.1155/2014/250693
- Nalini, M. S., Sunayana, N., & Prakash, H. S. (2014). Endophytic Fungal Diversity in Medicinal Plants of Western Ghats, India. *International Journal of Biodiversity*, 2014, 1–9. doi:10.1155/2014/494213
- Nourozian, J., Etebarian, H. R., & Khodakaramian, G. (2006). Biological control of *Fusarium graminearum* on wheat by antagonistic bacteria. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 28(SUPPL. 1), 29–38.
- Paiva, D. S. C. S. (2011). *Detecção de Fusarium circinatum Nirenberg & O'Donnell em coníferas da região central de Portugal* (Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra). Obtido de [https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/28053/1/Dissertação DPaiva 2011.pdf](https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/28053/1/Dissertação%20DPaiva%202011.pdf)
- Pereira, R. M. F. G. (2014). *Caracterização da população microbiana endo-e epifítica em azeitonas de cultivares Transmontanas* (Tese de Mestrado, Instituto Politécnico de Bragança). Obtido de [https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/11791/1/Tese de Mestrado Rui Pereira 20781.pdf](https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/11791/1/Tese%20de%20Mestrado%20Rui%20Pereira%2020781.pdf)
- Pereira, V. L., Fernandes, J. O., & Cunha, S. C. (2012). Micotoxinas em Portugal: Ocorrência e Toxicidade. *Acta Farmacêutica Portuguesa*, 1, 61–73.
- Pereira, V. M. (2012). *Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e*

otimização da produção de celulases por *aspergillus sulphureus*(fresen.) Wehmer (Tese de Mestrado, Universidade Federal de Lavras). Obtido de [http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/1008/1/DISSERTAÇÃO_Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulases por *Aspergillus sulphureus* %28Fresen%29 Wehme.pdf](http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/1008/1/DISSERTAÇÃO_Avaliação_do_potencial_enzimático_de_fungos_filamentosos_e_otimização_da_produção_de_celulases_por_Aspergillus_sulphureus_%28Fresen%29_Wehme.pdf)

Pérez-Sierra, A., Landeras, E., León, M., Berbegal, M., García-Jiménez, J., & Armengol, J. (2007). Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. *In Mycological Research*, 111, 832–839. doi:10.1016/j.mycres.2007.05.009

Ratola, N., Amigo, J. M., Oliveira, M. S. N., Araújo, R., Silva, J. A., & Alves, A. (2011). Differences between *Pinus pinea* and *Pinus pinaster* as bioindicators of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental and Experimental Botany*, 72(2), 339–347. doi:10.1016/j.envexpbot.2011.04.012

Revista da Associação Nacional de Empresas Florestais, Agrícolas e do Ambiente. (2009), 32. Obtido de https://static1.squarespace.com/static/56f17381f8baf348c571b7fb/t/57024675d51cd4118186c012/1459766907410/revista_3.pdf

Rigling, D. (1995). Isolation and characterization of *Cryphonectria parasitica* mutants that mimic a specific effect of hypovirulence-associated dsRNA on laccase activity . *Canadian Journal of Botany*, 73(10), 1655–1661. doi:10.1139/b95-179

Robl, D., Delabona, P. D. S., Mergel, C. M., Rojas, J. D., Costa, P. D. S., Pimentel, I. C., ... Padilla, G. (2013). The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. *BMC Biotechnology*, 13, 94. doi:10.1186/1472-6750-13-94

Romón, P., Troya, M., Fernández De Gamarra, M. E., Eguzkitza, A., Iturrondobeitia, J. C., & Goldarazena, A. (2008). Fungal communities associated with pitch canker disease of *Pinus radiata* caused by *Fusarium circinatum* in northern Spain: Association with insects and pathogen-saprophyte antagonistic interactions. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 30(2), 241–253.

doi:10.1080/07060661.2008.10540539

Sanz-Ros, A. V., Müller, M. M., San Martín, R., & Diez, J. J. (2015). Fungal endophytic communities on twigs of fast and slow growing Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in northern Spain. *Fungal Biology*, *119*(10), 870–883. doi:10.1016/j.funbio.2015.06.008

Saraiva, M. R. M. (2009). *Enzimas extracelulares de fungos da família Botryosphaeriaceae* (Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro). Obtido de <http://ria.ua.pt/bitstream/10773/867/1/2009001371.pdf>

Shiono, Y., Koyama, H., Murayama, T., & Koseki, T. (2015). New sesquiterpenes from the endophyte *Microdiplodia* sp. TT-12 and their antimicrobial activity. *Phytochemistry Letters*, *14*, 143–147. doi:10.1016/j.phytol.2015.10.004

Soria, S., Alonso, R., & Bettucci, L. (2012). Endophytic bacteria from *Pinus taeda* L. as biocontrol agents of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell. *Chilean Journal of Agricultural Research*, *72*(2), 281–284. doi:10.4067/S0718-58392012000200018

Srinivas, C., Sunitha, V., & Nirmala Devi, D. (2013). Extracellular Enzymatic Activity of Endophytic Fungal Strains Isolated from Medicinal Plants. *World Journal of Agricultural Sciences*, *9*(1), 1–9. doi:10.5829/idosi.wjas.2013.9.1.72148

St Leger, R. J., Joshi, L., & Roberts, D. W. (1997). Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology*, *143*(6), 1983–1992. doi:10.1099/00221287-143-6-1983

Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products*, *67*(2), 257–268. doi:10.1021/np030397v

Tan, L., & Grewal, P. S. (2001). Pathogenicity of *Moraxella osloensis*, a Bacterium Associated with the Nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*, to the Slug

- Deroceras reticulatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3–12), 5010–5016. doi:10.1128/AEM.67.11.5010-5016.2001
- Ten Hoopen, G. M., & Krauss, U. (2006). Biology and control of *Rosellinia bunodes*, *Rosellinia necatrix* and *Rosellinia pepo*: A review. *Crop Protection*, 25(2), 89–107. doi:10.1016/j.cropro.2005.03.009
- Todorova, S., & Kozhuharova, L. (2010). Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(7), 1207–1216. doi:10.1007/s11274-009-0290-1
- Tran, H. B. Q., Mcrae, J. M., Lynch, F., & Palombo, E. (2010). Identification and bioactive properties of endophytic fungi isolated from phyllodes of *Acacia* species. *Applied Microbiology*, 377–382.
- Verma, V. C., Singh, S. K., & Prakash, S. (2011). Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. *Journal of Basic Microbiology*, 51(5), 550–556. doi:10.1002/jobm.201000155
- Vos, C. M., Yang, Y., De Coninck, B., & Cammue, B. P. A. (2014). Fungal (-like) biocontrol organisms in tomato disease control. *Biological Control*, 74, 65–81. doi:10.1016/j.biocontrol.2014.04.004
- Xiang, N., Lawrence, K. S., Kloepper, J. W., Donald, P. A., McInroy, J. A., & Lawrence, G. W. (2017). Biological Control of *Meloidogyne incognita* by Spore-forming Plant Growth-promoting Rhizobacteria on Cotton. *Plant Disease*, 101(5), 774–784. doi:10.1094/PDIS-09-16-1369-RE

8. ANEXOS

ANEXO I:

8.1 Extração de DNA- soluções stock

8.1.1 Tampão TES

Tabela 12 - Preparação do tampão TES.

Tampão TES	
Tris 1M, pH=8	10mg
EDTA 5M, pH=8	2mg
SDS 10%	20mg

Adicionar todos os componentes num frasco e adicionar água destilada até perfazer 100ml. Autoclavar durante 20 minutos, a 121°C.

8.1.2 Cloreto de sódio (NaCl)

Tabela 13 - Preparação de NaCl.

NaCl	
NaCl	29,22g
Água destilada	50mL

Adicionar todos os componentes num frasco e adicionar 50 ml água destilada até perfazer 100ml. Autoclavar durante 20 minutos, a 121°C.

8.1.3 Brometo de Cetiltrimetilamónio (CTAB)

Tabela 14 - Preparação de CTAB.

CTAB	
CTAB	10g
Água destilada	100mL

Adicionar todos os componentes num frasco e autoclavar durante 20 minutos, a 121°C.

8.1.4 Acetato de Amónio (NH₄OAC)**Tabela 15** - Composição de NH₄OAC.

NH₄OAC	
Acetato de amónio	38,54g
Água destilada	80mL

Adicionar todos os componentes num frasco e autoclavar durante 20 minutos, a 121°C.

8.1.5 Tampão TE

Tabela 16 - Preparação do tampão TE.

Tampão TE	
Tris- HCL1M, pH=8	1mL
EDTA 0,5M, pH=8	200µl

Adicionar todos os componentes num frasco e adicionar água destilada até perfazer 100 mL. Autoclavar durante 20 minutos, a 121°C.

8.2 Gel de agarose

Para a realização da electroforese é necessário proceder à preparação do gel de agarose.

Tabela 17 - Preparação do gel de agarose.

Gel de Agarose	
Agarose 1,5%	1,35g
TAE 1x	90mL

Adicionar os componentes num frasco de 200 mL e colocar no micro-ondas a descongelar cerca de 10 minutos. Deixar arrefecer ligeiramente e colocar no suporte devidamente preparado e esperar que fique sólido. Depois coloca-se na tina.

ANEXO II:

8.3 Crescimento de patógenos em meio sólido

- a.** Preparar e autoclavar o meio de cultura sólido PDA e distribuir em placas de Petri (90mm \varnothing).
- b.** Inocular o plug do microrganismo patogénico no centro da placa de Petri.
- c.** Selar a placa com parafilme.
- d.** Incubar a 25°C, durante 7 dias.

8.4 Crescimento de fungos endofíticos em meio sólido

- a.** Preparar e autoclavar o meio de cultura sólido PDA/MEA e distribuir em placas de Petri (90mm \varnothing).
- b.** Inocular o plug do microrganismo endofítico no centro da placa de Petri.
- c.** Selar a placa com parafilme.
- d.** Incubar a 25°C, durante 7 a 10 dias.

8.5 Crescimento de bactérias endofíticas em meio sólido

- a.** Preparar e autoclavar o meio de cultura sólido PCA e distribuir em placas de Petri (90mm \varnothing).
- b.** Raspar com um palito a superfície da colónia da bactéria e colocar na placa de Petri.
- c.** Selar a placa com parafilme.
- d.** Incubar a 28°C, durante 3 a 5 dias.

8.6 Testes de antagonismo

8.6.1 Teste de antagonismo direto – fungos endofíticos vs *Fusarium circinatum*

- a.** Crescimento do fungo patogénico em meio PDA (Anexo II).
- b.** Crescimento de fungos endofíticos em meio PDA (Anexo II).
- c.** Preparar, autoclavar e distribuir em placas de Petri (90mm \varnothing) meio PDA.

- d.** Retirar um plug de cerca de 5mm de micélio do fungo patogénico.
- e.** Retirar um plug de cerca de 5mm de micélio do fungo endofítico.
- f.** Colocar na placa de Petri contendo meio PDA o plug do fungo endofítico a cerca de 1 cm da parede da placa e no lado oposto colocar o plug do fungo antagonista (*Fusarium circinatum*).
- g.** Para cada fungo endofítico foram feitas três réplicas.
- h.** Para controlo do teste colocou-se um plug de *Fusarium circinatum* no centro da placa de Petri contendo PDA.
- i.** Incubar as placas de Petri sob as condições desejadas (a 25°C durante 15 dias).
- j.** Durante o período de incubação, realizar medições do raio de crescimento (medição desde o ponto onde se colocou o disco com o micélio até à extremidade do crescimento da cultura), bem como do raio de crescimento de *Fusarium circinatum* nas placas de controlo.
- k.** Realizar as medições consecutivamente nos primeiros 7 dias e depois ao 10º, 12º e 15º dia.
- l.** Fazer um registo fotográfico e o resultado de antagonismo é observado utilizando o programa GraphPad 5.

8.6.2 Testes de antagonismo direto – bactérias endofíticas vs *Fusarium circinatum*

- a.** Preparar, autoclavar e distribuir em placas de Petri (90mm \varnothing) meio PCA.
- b.** Preparar, autoclavar e distribuir em placas de Petri (90mm \varnothing) meio PDA.
- c.** Identificar as placas de Petri com a respetiva amostra de bactéria e o fungo patogénico.
- d.** Crescimento das bactérias endofíticas em meio PCA durante cerca de 3 a 5 dias (Anexo I).
- e.** Crescimento do fungo patogénico em meio PDA durante 7 dias (Anexo II).
- f.** Realizar a suspensão de bactérias.
- g.** Colocar na placa de Petri contendo meio PCA um plug de cerca 5mm de *Fusarium circinatum* a cerca de 2 cm da parede da placa e no lado oposto colocar 1 μ l da suspensão de bactérias.
- h.** Realizar o teste em triplicado.

- i.** Selar as placas com parafilme e incubar a 25°C durante 20 dias
- j.** Durante o tempo de incubação, realizar todos os dias a medição do raio de crescimento do micélio do fungo patogénico e da bactéria.
- k.** Fazer um registo fotográfico.

8.6.3 Testes de inibição por compostos orgânicos voláteis

- a.** Crescimento do fungo patogénico em meio PDA (Anexo II).
- b.** Crescimento de fungos endofíticos em meio PDA (Anexo II).
- c.** Preparar, autoclavar e distribuir em placas de Petri (90mm \varnothing) meio PDA.
- d.** Marcar o centro da placa de Petri contendo PDA e colocar um plug de cerca de 5mm de micélio do fungo endofítico.
- e.** Marcar o centro da placa de Petri contendo PDA e colocar um plug de cerca de 5mm de micélio do patogénico.
- f.** Colocar a placa contendo o fungo patogénico de forma invertida sob cada placa contendo o fungo endofítico.
- g.** Selar com parafilme e incubar a 25°C durante 7 dias.
- h.** Para cada fungo endofítico foram feitas três réplicas.
- i.** Para controlo do teste colocou-se um plug do fungo patogénico no centro da placa de Petri contendo PDA.
- j.** Medir o raio de crescimento do micélio do patógeno e do fungo endofítico no dia 0 (imediatamente antes de inverter as placas de Petri com *F.circinatum* no topo das placas de Petri contendo cada um dos fungos endofíticos) e durante os 7 dias consecutivos de incubação.
- k.** Fazer um registo fotográfico.

ANEXO III:

Tabela 18 - Lista de identificação das bactérias endofíticas utilizadas neste estudo.

Número do isolado	Nomenclatura	Proximidade Relativa (%)
1	T.M2R9	<i>Streptomyces rubrisoli</i> (98.96%)
2	T.M2R8	<i>Streptomyces hirosimensis</i> (98.91)
3	T.N1R2	<i>Paenibacillus castaneae</i> (99.62%)
4	T.M3R7	<i>Paenibacillus ginsengarvi</i> (96.77%)
5	T.B2S3	<i>Micrococcus yunnanensis</i> (99.89%)
6	T.B5S5	<i>Paenibacillus taichungensis</i> (99.54%)
7	T.M2R2	<i>Micrococcus yunnanensis</i> (99.81%)
8	T.N3S1	<i>Micrococcus yunnanensis</i> (99.78%)
9	T.M5R2	<i>Paracoccus yeei</i> (99.64%)
10	T.B3R7	<i>Acinetobacter Iwofii</i> (99.79%)
11	T.B1R2	<i>Paenibacillus taichungensis</i> (99.60%)
12	T.B3R2	<i>Moraxella osloensis</i>
13	T.B1R3	<i>Bacillus mycoides</i> (99.99%) / <i>weihenstephanensis</i> (99.90%)
14	T.N5S2	<i>Microbacterium oxydans</i> (99.90%)
15	T.N5S1	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (99.83%)
16	T.N2S2	<i>Caballeronia sordidicola</i> (98.53%)
17	T.M2R24	<i>Paenibacillus montaniterrae</i> (96.26%)

18	T.N1R1	<i>Paenibacillus tundrae</i> (99.68%)
19	T.M5R3	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (99%)
20	T.B1S2	<i>Sodalis preacaptivus</i> (97.37%)
21	T.B1S4	<i>Sodalis preacaptivus</i> (97.69%)
22	T.M2R1	<i>Bacillus simplex</i> (100%)
23	T.M2R19	<i>Bacillus simplex</i> (100%)
24	T.B4S6	<i>Pantoea séptica</i> (100%)
25	T.M2R20	<i>Sporosarcina psychrophila</i> (99.38%)
26	T.M2R17	<i>Rhanella victoriana</i> (99.91%)
27	T.M3S1	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> (99.01%)
28	T.B2S2	<i>Janibacter hoylei</i> (99.90%)
29	T.M5R4	<i>Paenibacillus lautus</i> (99.43%)
30	T.M5R5	<i>Paenibacillus lautus</i> (99.49%)
31	T.M3R11	<i>Paenibacillus lautus</i> (98.96%)
32	T.N1R4	<i>Paenibacillus lautus</i> (99.36%)
33	T.M2R13	<i>Streptomyces scopuliridis</i> (99.71%)
1.	R.M1R5	<i>Caulobacter henricii</i> (99.26%)
2.	R.M1R12	<i>Sphingomonas formosensis</i> (98.76%)
4.	T.M2R22	<i>Acinetobacter Iwofii</i> (99.68%)
5.	R.N1S4	<i>Caballeronia sordidicola</i> (98.66%)
6.	R.N2R2	<i>Burkholderia udeis</i> (98.80%)

7.	R.M1R3	<i>Paraburkholderia sediminicola</i> (99.52%)
8.	R.B5R1	<i>Paraburkholderia sediminicola</i> (99.69%)
9.	R.M1R10	<i>Paraburkholderia sediminicola</i> (99.50%)
10.	R.M1R4	<i>Paraburkholderia sediminicola</i> (99.62%)
11.	R.N4S2	<i>Caballeronia sordidicola</i> (99.24%)
12.	R.M1R13	<i>Burkholderia sediminicola</i> (99.51%)
13.	R.B5R2	<i>Burkholderia sediminicola</i> (99.68%)
14.	R.N4S4	<i>Burkholderia udeis</i> (98.92%)
15.	R.N3S7	<i>Caballeronia udeis</i> (98.92%)
16.	R.M5R8	<i>Rhizonium rhizogenes</i> (99.81%)
17.	T.B3R6	<i>Acinetobacter Iwofii</i> (99.64%)
18.	T.B4S3	<i>Pseudomonas putida</i> (99.90%)
19.	R.N3S6	<i>Rhizonium qilianshanense</i> (96.99%)
20.	T.N4R3	<i>Paenibacillus taichungensis</i> (99.72%)
21.	R.M2R6	<i>Rhizonium rhizogenes</i> (99.80%)
22.	R.B1S5	<i>Sodalis praecaptivus</i> (97.19%) / <i>Serratia rubidaea</i> (97.28%)
23.	R.N1S5	<i>Sphingomonas paniciterreae</i> (100%)
24.	R.N5R2	<i>Paenibacillus taichungensis</i> (99.65%)
25.	T.B3R1	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (100%)
26.	T.M4R1	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (99.90%)
27.	T.N3S4	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> (99.75%)

33.	R.N1R11	<i>Paenibacillus taichungensis</i> (99.63%)
34.	R.N5R1	<i>Paenibacillus taichungensis</i> (99.58%)
35.	R.B3R18	<i>Bacillus toyonensis</i> / <i>Bacillus thuringiensis</i> (99.90%)
36.	R.M5R5	<i>Bacillus cereus</i> (100%)
37.	R.B5R6	<i>Bacillus cereus</i> (100%)
38.	R.B3R6	<i>Paenabacillus motobuensis</i> (97.11%)
40.	R.M4R1	<i>Paenabacillus selenitireducens</i> (98.94%)
44.	R.M5R19	<i>Paenabacillus vulneris</i> (98.53%)
45.	R.N1S7	<i>Mycobacterium mentmartrense/ lutetiense/ arcueilense</i> (98.30%)
46.	R.B3R17	<i>Paracoccus yeei</i> (99.91%)
55.	R.M5R15	<i>Bradyrhizobium rifense</i> (99.82%)
56.	R.M5R3	<i>Kitasatospora kifunensis</i> (98.97%)
57.	R.M1R6	<i>Rhizobium lusitanum</i> (99.41%)
58.	R.M3R4	<i>Rhizonium rhizogenes</i> (99.81%)
59.	R.B3R10	<i>Micrococcus aloevera</i> (99.91%)
60.	R.M1R2	<i>Mesorhizobium qingshengii</i> (99.81%)
61.	R.N4A2	<i>Kocuria palustris</i>
62.	R.N4A5	<i>Kocuria palustris</i> (100%)
63.	R.N1R7	<i>Paenabacillus chibensis</i> (95.91%)
64.	R.M5R14	<i>Paraburkholderia caledónica</i> (100%)
65.	R.N4R3	<i>Paenabacillus pini</i> (99.32%)

66.	R.B3R27	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> (99.01%)
67.	R.B3R16	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> (99.44%)
68.	R.B1S6	<i>Burkholderia acidipaludis</i> (97.70%)
69.	R.N4S1	<i>Caballeronia udeis</i> (98.89%)
70.	R.B1S4	<i>Burkholderia acidipaludis</i> (97.65%)
71.	T.M3R2	Ainda não foi identificado
74.	R.M1R1	<i>Labrys wisconsinensis</i> (98.97%)
76.	T.N1R3	<i>Paenabacillus castaneae</i> (99.35%)
77.	T.M4R11	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> (99.63%)
78.	T.N4A2	<i>Kocuria rhizophila</i> (99.01%)
79.	T.N4A1	<i>Kocuria rhizophila</i> (99.07%)
80.	T.B3R1	<i>Moraxella osloensis</i> (99.57%)
82.	T.N5A1	<i>Gordonia aichiensis</i> (99.90%)
83.	T.N1R6	<i>Paenibacillus tundrae</i> (99.82%)
86.	T.B5S4	<i>Paenibacillus taichungensis</i> (99.47%)
88.	R.M5R9	<i>Bradyrhizobium rifense</i> (100%)
89.	T.B4S5	<i>Pantoea septica</i> (100%)
90.	R.M5R2	<i>Mycobacterium helvum</i> (98.95%)
91.	R.B4S1	<i>Pantoea septica</i> (100%)
93.	R.N1S3	<i>Micrococcus endophyticus</i> (100%)
94.	R.B3R14	<i>Paenibacillus taichungensis</i> (99.63%)

99.	R.N4S5	<i>Caballeronia sordidicola</i> (98.65%)
100.	R.N4R1	<i>Paenibacillus taichungensis</i> (99.67%)
106.	R.N1R10	<i>Paenibacillus taichungensis</i> (99.49%)
107.	T.B2S5	<i>Pantoea septica</i> (100%)
111.	T.B2S4	<i>Pantoea septica</i> (100%)
112.	R.N1R6	<i>Paenibacillus taichungensis</i> (99.65%)
113.	R.N5R6	<i>Paenibacillus taichungensis</i> (99.64%)
114.	R.B1S3	<i>Burkholderia acidipaludis</i> / <i>Paraburkholderia sprengii</i> (97.58%)
115.	R.N4A6	<i>Kocuria rhizophila</i> (98.86%)
118.	R.N3S8	<i>Caballeronia sordidicola</i> (98.59%)
122.	R.N2S1	<i>Subtercola boreus</i> (97.48%)
123.	R.B2S1	<i>Pantoea septica</i> (99.90%)
124.	R.B3R12	<i>Micrococcus yunnaensis</i> (100%)
125.	R.B3S1	<i>Kocuria palustris</i> (100%)
127.	R.M1R8	<i>Variovorax soli</i> (99.28%)
128.	R.B3R25	<i>Paenibacillus lautus</i> (99.54%)
130.	R.M2R1	<i>Rhizonium rhizogenes</i> (99.81%)
131.	R.M3R1	<i>Paenibacillus cineris</i> (99.68%)
132.	R.B5R3	<i>Paraburkholderia sediminicola</i> (99.73%)
133.	R.B5R7	<i>Caballeronia udeis</i> (99.27%)
134.	R.M5R11	<i>Paenibacillus vulneris</i> (98.67%)

135.	R.N4S6	<i>Caballeronia sordidicola</i> (98.32%)
136.	R.N4S7	<i>Caballeronia sordidicola</i> (98.62%)
137.	R.M5R12	<i>Caballeronia megalochromosomata</i> (99.82%)
138.	R.M2R9	<i>Paraburkholderia sediminicola</i> (99.59%)
139.	R.M4S1	<i>Pseudomonas lutea</i> (100%)
140.	R.B3R8	<i>Moraxella osloensis</i> (98.99%) / <i>Enhydrobacter aerosaccus</i> (99.19%)
141.	R.M1R7	<i>Sphingomonas formosensis</i> (98.77%)
144.	R.M5R10	<i>Variovorax gossypii</i> (99.06%)
145.	R.N4A4	<i>Kocuria palustris</i> (100%)
146.	R.N3S2	<i>Caballeronia sordidicola</i> (98.42%)
149.	R.M1S2	<i>Caballeronia sordidicola</i> (98.53%)
150.	R.M2R8	<i>Pantoea coffeiphila</i> / <i>Erwinia endophytica</i> (97.18%)
151.	R.M3S2	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> (99.34%)
154.	T.B1S3	<i>Sodalis praecaptivus</i> (97.41%)
155.	T.M3R23	<i>Streptomyces tsukubensis</i> (97.99%)