

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO.

TÍTULO:

Potencial Genético e Químico dos Endófitos de
Murraya paniculata L. (Jack).

ANTONIA QUEIROZ LIMA DE SOUZA

São Carlos, dezembro de 2006.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO.**

TÍTULO:

*Potencial Genético e Químico dos Endófitos de
Murraya paniculata L. (Jack).*

ANTONIA QUEIROZ LIMA DE SOUZA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciências Biológica), área de concentração: Genética e Evolução.

São Carlos, dezembro de 2006.

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução.

TÍTULO:
*Potencial Genético e Químico dos Endófitos de
Murraya paniculata L. (Jack).*

ANTONIA QUEIROZ LIMA DE SOUZA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciências Biológica), área de concentração: Genética e Evolução da doutoranda Antonia Queiroz Lima de Souza.

Orientador: Dr. José Odair Pereira – FCA/UFAM.
Coorientador: Dr. Edson Rodrigues Filho – DQ/UFSCar.

São Carlos, dezembro de 2006.

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S729pg

Souza, Antonia Queiroz Lima de.

Potencial genético e químico dos endófitos de *Murraya paniculata* L. (Jack) / Antonia Queiroz Lima de Souza. -- São Carlos : UFSCar, 2007.

128 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Microbiologia. 2. Microorganismos endofíticos. 3. *Murraya paniculata*. 4. Diversidade biológica. 5. Metabólitos secundários. 6. Biotecnologia. I. Título.

CDD: 576 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**“POTENCIAL GENÉTICO E QUÍMICO DOS ENDÓFITOS DE *Murraya
paniculata* L. (JACK)”**

Tese de Doutorado de Antonia Queiroz Lima de Souza

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Odair Pereira

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

Profa. Dra. Maria Inez de Moura Sarquis

Prof. Dr. Rogério Eiji Hanada



Handwritten signatures of the five members of the examining board, each on a dotted line.

Orientador:

Prof. Dr. José Odair Pereira

Co-orientador:

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

OFEREÇO

A Deus, Pai eterno de amor e de bondade, que me conduziu até aqui e deu-me a oportunidade de realizar este trabalho, fruto de amor e dedicação.

DEDICO

A minha família, em especial:

Ao meu esposo, Afonso D. Leão de Souza, pelo companheirismo, apoio e pelas discussões em amplo sentido.

Aos meus filhos: Thiago, Ana Caroline, André e Sarah que tornaram esta caminhada mais leve e gratificante, na certeza da construção de uma vida mais útil.

Aos meus pais, Luiz e Terezinha, que não mediram esforços para criar a mim e meus seis irmãos dando-nos o melhor de si na nossa formação.

Ao Prof. Dr. José Odair Pereira, meu orientador, pela oportunidade e orientação rumo ao "novo mundo", o mundo dos endófitos.

Aos Profs. Dr. Edson Rodrigues Filho e Dr. Flávio Henrique da Silva pela acolhida, co-orientação e participação imprescindível a realização deste trabalho.

Iahwer é meu Pastor, nada me falta.
Em verdes pastagens me faz repousar.

(Salmo 23.)

Agradecimentos

Ao Deus de Jesus Cristo, pelo amor e carinho com que tem me acompanhado, protegido e guiado todos os dias de minha vida, em especial neste momento.

Ao meu esposo e filhos pelo amor, compreensão e estímulo.

Aos meus pais e irmãos pela amizade que nos une.

Ao Prof. Dr. José Odair Pereira pela confiança em mim depositada ao aceitar-me como orientada e pelo apoio que culminaram na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza, pelo carinho, apoio e colaboração no “engatinhar” das pesquisas químicas e valiosas sugestões ao longo de todo este trabalho.

Aos Profs. Drs. Edson Rodrigues Filho e Flávio Henrique da Silva pela acolhida em seus laboratórios, amizade, ensinamentos e pela co-orientação que muito me ajudaram no amadurecimento científico e humano.

A Dra. Suzilei França, da UNAERP, por todo apoio na realização de bioensaios e parte da pesquisa molecular.

Ao Dr. Itamar Soares de Melo da EMBRAPA – Meio Ambiente, também pela acolhida no seu laboratório, pela linhagem de *Pythium* sp. cedida e pelas microfotografias eletrônicas.

A Dra. Janete Magaly, da UFPe, pela ajuda na busca da identificação do fungo “Fed”.

A Dra. Bianca, da UNAERP, pela orientação, acompanhamento e paciência na parte molecular desenvolvida na UNAERP.

Às Dras. Maria Inez de Moura Sarquis e Maria Lúcia Belém Pinheiro pela amizade, incentivo, entusiasmo, parcerias e preciosas colaborações.

Aos meus Professores da UFSCar: Dr. Flávio Henrique da Silva, Dra. Sílvia Nassif Del Lama, Dr. Marco Antônio Del Lama, Dr. Gilberto Moraes, Dra. Maria Luiza Schwantes, Dr. Orlando Moreira Filho, Dra. Angélica, Dra. Heloisa e Dra. Ana Paula pelos ensinamentos e novos horizontes da ciência apresentados; o meu sincero reconhecimento.

À MSc. Tereza Cristina Barbosa, minha orientadora de PIBIC, pela amizade e pelos meus primeiros passos no mundo científico.

Aos colegas de turma Luis, Cesar, Viviane, Andréia, Talita, Ana Nery e Celeste, pelo companheirismo e bons momentos de convívio durante o doutorado.

Aos amigos: Andréia Soares, Cesar e Andréia pelo auxílio no sequenciamento das amostras.

A amiga de todas as horas Celeste Mutuko Nakayama, foi preciso ir a outro estado para encontrar-la e descobrir esta amizade verdadeira, a minha sincera gratidão e carinho pela pessoa especial que ela é.

Aos colegas do LEM pelos bons momentos compartilhados nos seminários de quinta-feira e nas horas de descontração – Micheli, Miriam, Greycy, Angela, Francinete, Regina, Ana Paula, Paula, Sebastian, Rodrigo, Gezimar, Fabio, Andrey, Afonso, Luiz Henrique, Luiz Fernando, Luciana, Renata, Daniele e o Dr. Edson.

As colegas da UNAERP - Simore Torres, Patricia e Juliana pelo incentivo, companheirismo e bons momentos de convivência.

Ao técnico da vidraria, Ademir, pela ajuda na confecção de materiais para a realização deste trabalho.

À Nazaré Barbosa da UFAM, pela ajuda administrativa e amizade em todos os momentos.

A Rose, Regiane e a Tatiane, secretárias da pós-graduação da UFSCar, pelo apoio administrativo e atenção.

A **Universidade Federal de São Carlos** pela oportunidade de fazer mais este curso aprimorando os meus conhecimentos num órgão público, gratuito e de qualidade.

A CAPES pela bolsa concedida.

A todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Resumo

Potencial Genético e Químico dos Endófitos de *Murraya paniculata* L. (Jack).

A planta *Murraya paniculata* é de origem asiática e em seu continente de origem foi isolado, das cascas das raízes, o alcalóide *yuehchukeno* que apresenta atividade anticoncepcional e hormonal. Em espécimes brasileiros nenhum alcalóide foi detectado, o que inspirou novas pesquisas envolvendo o estudo dos microrganismos que interagem com esta, incluindo o presente trabalho. Assim, foram isolados 1.711 microrganismos endofíticos de quatro hospedeiras, no estado de São Paulo, verificando-se os índices de colonização sazonal, a frequência e a especificidade dos grupos identificados por tecidos (micro-habitat). Dos isolados, 1.061 eram fungos filamentosos e 650 eram bactérias, com frequências de 62% e 38% e índices de colonização de 33% e 20%, respectivamente. Os menores índices de colonização foram observados para as bactérias em todas as coletas, principalmente nas folhas que apresentaram a maior frequência para os fungos. Os fungos endofíticos foram classificados em 20 grupos morfológicos, 15 identificados ao nível de gênero e cinco desconhecidos, sendo dois *Micelia sterilia*. Os gêneros identificados foram *Fusarium*, *Colletotrichum* e seus teleomorfos *Giberella* e *Glomerella* respectivamente, *Trichoderma*, *Phomopsis*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Epicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Alternaria*, *Xylaria*, *Nigrospora* e *Guignardia* e os não identificados foram denominados como grupos A-E. Foi também detectada grande diversidade dentro dos gêneros mais frequentes, pela morfologia e por marcadores moleculares. Foi verificada maior diversidade de gêneros de fungos no inverno (17) que na primavera (9). A população de fungos endofíticos foi menor no verão (44,7%) em contraste com o outono (77,7%). De uma amostragem de 59 isolados e seis controles foram extraídos os DNAs genômicos e seqüenciadas as regiões ITS-1. Para a linhagem indeterminada B (**Fed**) foi seqüenciada a região 5,8s e a ITS-2. Foram identificadas 21 espécies pela região ITS-1 e detectadas duas possíveis espécies novas: uma de *Trichoderma* e o **Fed** cujos estudos morfológicos e quimiotaxonômicos apóiam esta hipótese. Os *Trichoderma* associados a *M. paniculata* foram isolados principalmente das cascas e apresentaram 9 espécies, sendo uma indeterminada. Foi também avaliado o potencial para produção de substâncias bioativas de endófitos. Os grupos mais promissores para a produção de substâncias extracelulares foram os dos fungos *Penicillium* com ação bactericida e anti-protozoária, *Pestalotiopsis* candidida e *Trichoderma* fungicida e bactericida. **Fed** com substâncias intracelulares de forte ação bactericida e de voláteis fungicidas. Buscou-se ainda o isolamento dos princípios ativos tendo sido isolados de *Penicillium citrinum* a citrinina e um alcalóide indeterminado, de *Trichoderma koningii* 13 substâncias, das quais quatro koningininas relacionadas às atividades biológicas detectadas. De **Fed-3** foram identificadas 10 substâncias, sete fixas e três voláteis, incluindo um sesquiterpeno guaiano manosilado inédito e as substâncias 3-Hidróxi-5-fenilmetil-(3S,5R)- β 10-O-tetrahidrofuran-2-ona e cloroacetônitrila, isoladas pela primeira vez de fonte natural. A esta última é sugerida a ação fungicida dos voláteis. Esta pesquisa foi oportuna ao revelar a diversidade de microrganismos associados à hospedeira, a alta variabilidade entre e dentro os gêneros, incluindo duas possíveis novas espécies, e o potencial na produção de moléculas bioativas e inéditas. Espera-se ter contribuído para o conhecimento da biodiversidade dos

microrganismos endofíticos e do potencial químico e biotecnológicos que eles representam.

Abstract

Genetic and Chemical Potential of the Endophytes from *Murraya paniculata* L. (Jack).

The plant *Murraya paniculata* is native in Asia where its root barks have produced the contraceptive and hormonal alkaloid *yuehchukene*. In Brazilian specimens no alkaloid was detected. This had inspired new researches about the microorganisms that interact with it in Brazil, including the present work. Therefore, 1711 endophytic microorganisms were isolated from four host plants, in São Paulo State, and the seasonal colonization indexes, the microbial frequencies and the specificities of the identified groups per tissues (microhabitats) were verified. Among the obtained endophytes, 1061 were filamentous fungi and 650 were bacteria, with 62% and 38% of frequency and 33% and 20% of colonization index, respectively. The colonization indexes of the bacteria in comparison to the of fungi were lower in all gatherings and hosts, principally for leaves that, had shown the bigger frequency for the fungi and the smaller for the bacteria. Fungi were clustered in 20 morphological groups, 15 identified to genus level and five unknown, including two *Mycelia sterilia*. The recognized genera were *Fusarium*, *Colletotrichum* and its teleomorphs *Giberella* and *Glomerella* respectively, *Trichoderma*, *Phomopsis*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Epicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Alternaria*, *Xylaria*, *Nigrospora* and *Guignardia* and the unknown were named A-E groups. The more frequent genera were rich in diversity, according to morphological and molecular data. A more diversity of fungi genera were verified in the winter (17) and a less in the spring (9) as the endophytic fungi were smaller in quantity in the summer (44.7%) and greater in the autumn (77.7%). From a sample of 59 isolates and six fungi as prototypes genomic DNAs were obtained and their ITS-1 regions were sequenced. The unknown strain B (**Fed**) had sequenced its 5.8s and ITS-2 regions. 21 species were identified by their ITS-1 regions and two others were hypothesized as novelty: one *Trichoderma* and the **Fed** that all morphological and chemotaxonomic studies appoint as a new species. *Trichoderma* associated to *M. paniculata* were in majority from barks and had showed great diversity of species (9). It was evaluated too the potential of the endophytes from host for bioactive metabolite production. The more promising groups for extracellular substances were the fungi *Penicillium*, with bactericidal and antiprotozoal actions, *Pestalotiopsis*, active against *Candida*, and *Trichoderma*, with fungicidal and bactericidal activities. For **Fed** it was noted its intracellular metabolites as strong bactericidal and its volatiles as anti-fungi. By looking for the active principles of those microorganisms, from *Penicillium citrinum* the citrinin and an undetermined alkaloid were obtained and from *Trichoderma koningii* 13 metabolites, including four koninginins related to those biological activities observed were identified. From **Fed-3**, 10 substances were obtained,

seven fixed and three volatile, including a novel manosil guaiane type sesquiterpene and the new, as natural substances, 3-Hydroxy-5-phenylmethyl-(3*S*,5*R*)- β 10-O-tetrahydrofuran-2-one and chloroacetonitrile. The chloroacetonitrile was suggested as the active principle of the **Fed's** volatiles. This work was important to reveal the diversity of the endophytes from Brazilian *M. paniculata*, the high variability of their more frequent genera, two possible novel species and the potential of them to produce bioactive and new metabolites. This work is hoped to contribute for understanding the endophytic microorganism biodiversity as well as their chemical and biotechnological potential.

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Quantidade de fungos e bactérias endofíticas isoladas de <i>M. paniculata</i> no estado de São Paulo e seus respectivos índices de colonização. | 39 |
| Gráfico 1-A: Apresenta o índice de colonização dos fungos endofíticos, calculado para cada hospedeira conforme o número de fragmentos amostrados. | 40 |
| Gráfico 1-B: Apresenta o índice de colonização das bactérias endofíticas, calculada para cada hospedeira conforme o número de fragmentos amostrados. | 40 |
| Tabela 2: Números de fungos endofíticos isolados por tecidos e suas respectivas frequências. Em destaque os tecidos que apresentaram as maiores frequência..... | 41 |
| Gráfico 2-A: Quantidades de fungos endofíticos isolados por tecidos, sendo a casca do caule o órgão que esteve mais colonizado..... | 41 |
| Gráfico 2-B: Apresenta a porcentagem de fungos endofíticos isolados por tecidos, sendo a casca do caule o órgão que esteve mais colonizado..... | 42 |
| Tabela 3: Frequência Sazonal dos fungos endofíticos isolados dos tecidos de <i>Murraya paniculata</i> no estado de São Paulo..... | 45 |
| Tabela 4: Fungos endofíticos isolados dos diferentes tecidos de <i>Murraya paniculata</i> , de acordo com as estações sazonais. | 46 |
| Gráfico 3: Apresenta o índice de colonização dos fungos endofíticos de <i>Murraya paniculata</i> , nas estações sazonais..... | 47 |
| Tabela 5: Componentes da PCR e suas respectivas concentrações e quantidades. | 57 |
| Tabela 6: Componentes da PCR de sequenciamento e suas respectivas concentrações e quantidades..... | 58 |
| Tabela 7: Fungos endofíticos de <i>Murraya paniculata</i> e suas identificações moleculares..... | 63 |
| Tabela 8: Plantas das quais foram isoladas microrganismos endofíticos e as substâncias por eles produzidas. | 77 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 9: Resultados de antibiose de fungos endofíticos de <i>Murraya paniculata</i> contra patógenos humanos. Todos os experimentos foram em triplicata e no intervalo de 8 (oito),16, 24, 32 e 40 dias. | 83 |
| Tabela 10: Resultado da antibiose dos líquidos metabólicos de linhagens fúngicas endofíticas isoladas de <i>Murraya paniculata</i> | 86 |
| Tabela 11: Resultado dos ensaios de antibiose dos extratos de <i>Pestaliosis disseminata</i> e Fed 3, um fungo endofítico isolado do córtex de <i>Murraya paniculata</i> no Estado de São Paulo – Br. | 88 |
| Tabela 12: Resultados da ação dos voláteis de Fed contra fungos filamentosos de interesse humano e agrícola. | 92 |
| Tabela 13: Voláteis de Fed 3 detectados por micro-extração em fase sólida, após a comparação e eliminação dos picos residuais do branco (adaptado de Souza, 2005). | 103 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** O Paclitaxel (taxol), o primeiro fármaco anticancer do mundo, é produzido por muitos fungos endofíticos. Possui elevada atividade antioomyceto (adaptada de Strobel & Daisy, 2003).2
- Figura 2:** Meroterpenos isolados pela primeira vez da cultura do fungo *Penicillium* sp., isolado do córtex da raiz de *Melia azedarach*. A substância número 4, Austinoneol, é inédita. Substâncias 1 - 4 semelhantes aos limonóides produzidos pela planta hospedeira. Os autores sugerem a ação de enzimas similares participando da biossíntese destas substancias na planta e no endófito. Figura adaptada de Santos & Rodrigues-Filho, 2003.....3
- Figura 3:** A planta *Murraya paniculata* no Campus da UFSCar.....4
- Figura 4 A-B:** (A) Detalhes da parte superior. (B) Detalhes do quarto direito superior de (A), mostrando diversos filamentos com estruturas terminais escuras. As setas indicam estruturas terminais com múltiplos apêndices filamentosos (barra igual a 20 µm). Adaptado de Yuan et al., 2005.....12
- Figura 5 A - B:** A - *Aglaophyton* (= *Rhynia*) major um fóssil de planta de 400 milhões de anos de Rhynie Chert é associada com Glomales. (a) Seção do rizoma de *A. major* mostrando a parte central e o parênquima cortical com uma zona escura (flecha) onde hifas, vesículas e arbusculos foram descritos (barra: 1 mm). B - Duas células parenquimáticas apresentando arbusculos de FMA em troncos fosseis altamente conservados (barra: 10 mm). Adaptado de Selosse & Le Tacon, 1998 – recebeu como cortesia de T.N. Taylor13
- Figura 6 A-H:** (A-C e E-G) Fóssil de hifas e esporos do Ordoviciano e (D e H) esporos formados por fungos existentes da ordem glomales. (A e B) Resumos do material fossilizado. (C, E, F, e G) Detalhes de esporo fossilizado. (C) Detalhe (de B). (D) um esporo atual de *Glomus* sp. com destaque da parede. (Em G), a seta mostra paredes de um esporo contendo hifas em contato com a parede de esporos. (H) Um esporo atual de *Glomus leptotichum*, um membro divergente das linhagens glomales. As imagens foram obtidas pela microscopia luz branca (A, C, F, e G), microscopia de contraste de interferência diferencial dos espécimes em polivinilalcool-lactoglicerol (D, E, e H), e microscopia de raio laser confocal com o

autofluorescência do material (B). Todas as barras de escala são 50 mm. Adaptado de Redecker et al., 2000. 13

Figura 7: Adaptado dos trabalhos de Selosse & Le Tacon, 1998; Berbee & Taylor, 2001; **Nicholas**, 2005; Benton & Ayala, 2003 e **Blackwell M.; 2000**..... 15

Figura 8-A: Comparação entre a entrada de fungo endófito e de um fitopatogênio, relatada por Kogel et al. (2006). Em a o fungo endófito germina fora da célula vegetal e estabelece um contato com sinalizadores químicos em contraste em f que o fitopatogênio primeiro entra em contato para depois germinar com a formação do apressório. Em b ocorre um reconhecimento e um reprogramamento da hospedeira para facilitar a entrada do endófito enquanto que em g o fitopatogênio libera enzimas que degradam a parede celular. Em c contato concreto do endófito seguido de colonização em d, enquanto em h e i a planta se defende do fitopatogênio com a produção de proteínas de resistência. Finalizando em e relações simbióticas entre o endófito e sua hospedeira enquanto em j a guerra entre fitopatogênio e a planta continua..... 17

Figura 8-B: Transmissão vertical – em gramíneas. Observe em 1 a semente, em 2 a semente germinando com o endófito presente nos folíolos e nas raízes. Em 3 a colonização total da plântula pelo endófito e as sementes infectadas com os esporos dos fungos endófitos em 4. Adaptado de Ahlholm et al, 2002..... 18

Figura 9-A: Isolamento das folhas de *M. paniculata*. As setas indicam a saída das bactérias do fragmento da folha em b e o controle da assepsia comprovando a eficiência da técnica em a. 25

Figura 9-B: Isolamento de fungos endófitos de *M. paniculata*. A seta indica a saída de fungos endófitos do fragmento do fruto maduro (a) e do caule consecutivamente (b)..... 25

Figura 10-A: Diversidade de fungos endófitos isolados de *M. paniculata* no estado de São Paulo. Da esquerda para direita: Guignardia, Phomopsis, Fusarium gramineaceum, 2 Penicilliums, Trichoderma, Colletotrichum, Pestalotiopsis, Penicillium, Fed e Alternaria..... 27

Figura 10-B: Diversidade de fungos endófitos isolados de *M. paniculata* no estado de São Paulo. Da esquerda para direita: Alternaria, Paecilomyces, Penicillium,

Fusarium gramineaceum, Penicillium, Penicillium (rosa), Paecilomyces, 2
Colletotrichum, Aspergillus niger e Guignardia.....27

Figura 11: *Trichoderma hamatum* – MpCe2 2.2a. Em **A** cultura em placa de petri com conídios, em **B** a seta indica hifas com conidioforos (obj. 4x), em **C** e **D** conidioforos em triades (0bj. 10x) e em **E - H** detalhes do conidioforo e da tríade respectivamente (Obj. 40x).28

Figura 12: Fotos de Mpce2 3.3b. Em **A** cultura em placa de petri, em **B** detalhes das hifas (obj. 100x), em **C, D, E - H** detalhes de estruturas vegetativas (Obj. 40x).....29

Figura 13: Fotos de MpF1 1.2 – *Colletotrichum acutatum* isolado das folhas de *Murraya paniculata*. Em **A** e **E** conídios, a seta em **B** indica o conidióforo, em **C** e **D** detalhes do apressório em forma de clava (obj. 10x) e em **F** a seta mostra os detalhes da formação dos conídios em obj. 40x.30

Figura 14: *Colletotrichum gloeosporioides* (MpF2 2.1). Aspectos macroscópicos em **A** da cultura em placas de petri com BDA, em **B** conidioforo, **C** e **D** conídios, em **E** e **F** as setas mostram a formação e os detalhes dos apressórios respectivamente (obj. 40x) e em **G** e **H** as setas indicam detalhes dos conídios e dos apressórios respectivamente também (obj. 100x).31

Figura 15:– *Colletotrichum* sp. (MpFrVb2 2.1b). Conídios em **B** (obj. 10x), em **C** e de **D – F** detalhes do conídio e dos apressórios respectivamente (obj. de 100x). Em **E** a seta indica a germinação a partir do apressório.32

Figura 16: *Paecilomyces* sp. (MpGe7 3.2). Em **A** aspecto macroscópico da cultura em placa de petri com BDA, de **B – H** conídios e conidioforos (obj. 40x). Em **D** a seta mostra a formação dos conidióforos com conídios.33

Figura 17: *Penicillium* sp. (MpRp2 3.2). Aspectos macroscópicos da cultura em placa de petri com BDA em **A**, observação em **B** do conidióforo biverticilado cuja seta indica. Em **C** e **D** detaque das cadeias de conídios (obj. 10x), em **E** filiares (obj. 40x) e em **F** os detalhes dos conidioforos.....34

Figura 18: *Fusarium* sp. (MpR2 1.3). Aspecto macroscópico da cultura em placa de petri com BDA, com oito dias a temperatura ambiente (**A**). As setas indicam os conídios fusiformes de **B – F** observados nas objetivas de 10x, 40x e 100x respectivamente.35

| | |
|--|----|
| Figura 19: <i>Aspergillus ochraceus</i> (MpR2 2.1a). Em A conidioforos mostrando as visículas radiadas, a seta em B indica a célula pé, em C a seta indica as fialides e em D destaque destas. As micrografias com objetivas de 4x, 10x, 40x e 100x respectivamente..... | 36 |
| Figura 20: Fed 3 (MpR3 2.3b). Em A asco observado na objetiva de 40x, em B e C esporos (obj. 100x e 40x respectivamente). Em D microfotografia de <i>Eutypa lata</i> (adaptado Munkvold, 2001)..... | 38 |
| Figura 21: DNA genômico de fungos endofíticos de <i>Murraya paniculata</i> | 61 |
| Figura 22: Amplificações das regiões ITS-1. M = Marcador de 100pb, 2 = controle <i>Penicillium</i> sp. (LRMa), 3 = P7, 4 = P1, 5 = P2, 6 = <i>Trichoderma</i> sp. (F80), 7 = <i>Xylaria</i> sp. (Xy) e em C- = controle negativo da reação. | 62 |
| Figura 23: Aspectos das culturas de <i>Trichoderma</i> isolados de <i>Murraya paniculata</i> em BDA, com 16 dias a temperatura ambiente..... | 65 |
| Figura 24 A: Árvore não enraizada, a partir dos perfis químicos (marcadores fenotípicos), de <i>Trichodermas</i> isolados de <i>Murraya paniculata</i> . Os destaques em verde indicam as plantas hospedeiras e os vermelhos às estações sazonais. As setas amarelas indicam indivíduos oriundos de uma mesma hospedeira e com produção de metabólitos similares. A seta azul indivíduos de mesma origem divergindo na produção dos metabólitos. Adaptada de Souza, 2005..... | 66 |
| Figura 24 B: Dendograma dos <i>Trichodermas</i> isolados de <i>Murraya paniculata</i> , a partir do perfil químico. A numeração nos ramos é percentagem de confiabilidade dada pelo Bootstrap em 500 repetições..... | 67 |
| Figura 25: Árvore filogenética de <i>Pestalotiopsis</i> endofíticos. Os números em vermelhos apresentam os valores do Bootstrap para cada ramo da árvore..... | 69 |
| Figura 26 A: Microfotografia eletrônica de Fed 3 com aumento de 2000x. Detalhes das hifas entrando meio de cultura. Barra de 20µm..... | 71 |
| Figura 26 B: Microfotografia eletrônica de Fed 3 com aumento de 1000x. Detalhes das hifas entrando meio de cultura. Barra de 20µm..... | 71 |
| Figura 26 C: Microfotografia eletrônica de Fed 3 com aumento de 10.000x. Detalhes das hifas entrando meio de cultura. Barra de 2µm..... | 72 |

| | |
|--|----|
| Figura 26 D: Microfotografia eletrônica de Fed 3 com aumento de 200x. Detalhes das hifas formando ascus. Barra de 200µm. | 72 |
| Figura 27: Em A antagonismo de MpRpb2 3.3 ao testador <i>Pythium</i> sp. com 96hs e em B antibiose ao mesmo testador pela linhagem de bactéria endofítica (MpRb1 3.2), ambas isoladas de <i>Murraya paniculata</i> no estado de São Paulo. | 82 |
| Figura 28: Resultados dos testes de antibiose dos endófitos de <i>Murraya paniculata</i> com 40 dias de cultivo. Em A e B avaliação dos fungos endofíticos pela técnica do bloco de gelose contra <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Escherichia coli</i> respectivamente. As setas destacam o <i>Aspergillus ochraceo</i> com resultados satisfatórios. | 84 |
| Figura 29: Antibiose de linhagens fungicas endofíticas isoladas de <i>Murraya paniculata</i> . As setas indicam a ação dos metabólitos extracelulares de <i>Penicillium citrinum</i> (MpR1 3.2a) contra <i>Staphylococcus aureus</i> em A e <i>Escherichia coli</i> em B | 85 |
| Figura 30: Ação antibiótica dos extratos de fungos endofíticos. As setas indicam em A ação candidida da fração BMLP de <i>Pestalotiopsis disseminata</i> e em B ação bactericida da fração FED3A4. | 87 |
| Figura 31: Resultado da Dosagem Mínima Inibitória (MID) das substâncias isoladas de <i>Trichoderma koningii</i> (F80) contra <i>Aspergillus flavus</i> . A seta indica a koninginina D. | 89 |
| Figura 32: Resultado dos ensaios de bioautografia dos extratos de <i>Penicillium citrinum</i> contra <i>Escherichia coli</i> . Em A a seta indica a atividade do extrato etanólico do micélio e em B as setas indicam a ação dos extratos clorofórmicos e acetato de étila da esquerda para a direita respectivamente. | 90 |
| Figura 33: Antagonismo dos voláteis de duas linhagens de Fed contra fungos de interesse médico e agrícola. As letras a e b representam à frente e o dorso das placas após 72hs respectivamente. * Placa controle. Em 1 temos <i>Aspergillus flavus</i> , 2 - <i>Guignardia citricata</i> , 3 - <i>Trichoderma</i> sp., 4 - <i>Aspergillus niger</i> e em 5 - <i>Fusarium gramineaceum</i> | 94 |
| Figura 34: Aspectos macro-morfológicos de <i>Trichoderma koningii</i> (F80) em A. Inibição de <i>Aspergillus flavus</i> pelos metabólitos extracelulares de F80 em B (Souza et al., 2003). | 95 |
| Figura 35: Substâncias isoladas de <i>Trichoderma koningii</i> – F80 (Souza, 2005). | 96 |

| | |
|--|-----|
| Figura 36: Semelhança entre a koninginina D e a vitamina E (alfa tocoferol). | 97 |
| Figura 37: Substâncias isoladas da linhagem MpR3 2.3b – Fed3 (Souza, 2005). 100 | |
| Figura 38: Captação dos voláteis de Fed 3 pelo aparelho de micro-extração em fase sólida (SPME). Em A retenção dos voláteis e em B destaque da fibra, sem contado com o meio de cultura ou com o fungo. | 102 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 – INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 1.1 – Biodiversidade de Microrganismos Endofíticos e a Diversidade de Metabólitos..... | 1 |
| 1.2 – A Hospedeira <i>Murraya paniculata</i> L. (Jack). | 3 |
| 2 – JUTIFICATIVA..... | 6 |
| 3 – OBJETIVOS | 8 |
| Geral: | 8 |
| Específicos:..... | 8 |
| 4 – CAPÍTULO 1 | 9 |
| Diversidade dos Endófitos de <i>Murraya paniculata</i> | 9 |
| 4 - Introdução do Capítulo 1 | 10 |
| 4.1 Microrganismos Endofíticos. | 10 |
| 4.1.1 Registros Fósseis da Interação Planta/Fungo..... | 11 |
| 4.1.2 Transmissão e Colonização dos Endófitos. | 16 |
| 4.2 - Materiais e Métodos..... | 20 |
| 4.2.1 Coleta das plantas | 20 |
| 4.2.2 Material Vegetal Utilizado..... | 20 |
| 4.2.3 Desinfecção do Material Vegetal e Isolamento dos Endófitos..... | 20 |
| 4.2.4 Purificação, Identificação e Preservação dos Endófitos..... | 23 |
| 4.2.5 Acompanhamento da Sazonalidade e dos Micro-habitats dos Endófitos..... | 24 |
| 4.3 - Resultados e Discussão..... | 25 |
| 4.3.1 Isolamento e Conservação..... | 25 |
| 4.3.2 Identificação Morfológica dos Fungos Endofíticos | 26 |
| 4.3.3 Características dos grupos não identificados..... | 37 |
| 4.3.4 Índice de Colonização e Frequência dos Endófitos | 39 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.3.5 | Influência da Sazonalidade | 43 |
| 4.3.6 | Influência da Sazonalidade e Especificidade por Hospedeira e por Micro-habitat dos Fungos Endofíticos | 49 |
| 5 | – CAPÍTULO 2 | 50 |
| | * Variabilidade genética das regiões ITSs de <i>Pestalotiopsis</i> spp., de <i>Trichoderma</i> spp. e de um grupo de fungo endofítico não identificado de <i>Murraya paniculata</i> L. (Jack). | 50 |
| 5 | - Introdução do Capítulo 2 | 51 |
| 5.1 | Advento e Importância da Biologia Molecular | 51 |
| 5.1.1 | Ribossomos e as Regiões ITS (internal transcribed spacer regions) | 52 |
| 5.2 | - Materiais e Métodos do Capítulo 2 | 53 |
| 5.2.1 | Condições de cultivo | 53 |
| 5.2.2 | Seleção dos Grupos de Fungos Endofíticos para Identificação Molecular .. | 54 |
| 5.2.3 | Extração do DNA | 54 |
| 5.2.3.1 | Quantificação do DNA | 56 |
| 5.2.3.2 | Reação de Polimerase em Cadeia da Região ITS – 1 do rDNA | 56 |
| 5.2.3.3 | Sequenciamento | 57 |
| 5.2.3.4 | Alinhamento e Análise das Seqüências | 58 |
| 5.2.3.5 | Análise Molecular dos Grupos de Fungos Endofíticos | 59 |
| 5.3 | - Resultados e Discussão | 60 |
| 5.3.1 | Cultivo e Extração do DNA genômico | 60 |
| 5.3.2 | Amplificação e Identificação da região ITS-1 | 61 |
| 5.3.2.1 | Variabilidade Genética e Química dos <i>Trichoderma</i> | 64 |
| 5.3.2.2 | Variabilidade Genética e Química dos <i>Pestalotiopsis</i> | 68 |
| 5.3.2.3 | Variabilidade Genética de “Fed” | 70 |
| 6 | – CAPÍTULO 3 | 74 |

| | |
|---|-----|
| * Isolamento e identificação de substâncias bioativas dos endófitos de <i>Murraya paniculata</i> L. (Jack) e de <i>Trichoderma koningii</i> isolado de <i>Strychnos cogens</i> | 74 |
| 6.1 Introdução do Capítulo 3..... | 75 |
| 6.1.1 – Interação entre Expressão Gênica e Prospecção Química nos Microrganismos..... | 76 |
| 6.2 Materiais e Métodos do Capítulo 3..... | 79 |
| 6.2.1 Obtenção e Caracterização dos Metabólitos Bioativos..... | 79 |
| 6.2.2 Obtenção dos Extratos dos Fungos Endofíticos. | 80 |
| 6.2.3 Identificação de Substâncias Bioativas..... | 81 |
| 6.3 - Resultados e Discussão..... | 82 |
| 6.3.1 Detecção de Antagonismo com Bactérias..... | 82 |
| 6.3.2 Detecção de Antibiose com os Fungos..... | 83 |
| 6.3.3 Detecção de Antibiose com os Extratos..... | 87 |
| 6.3.4 Ação Fungicida de Fed 3..... | 91 |
| 6.4.1 Substâncias isoladas de <i>Trichoderma koningii</i> , linhagem F80..... | 94 |
| 6.4.2 Análise dos voláteis de Fed 3..... | 102 |
| 7 – CONCLUSÕES..... | 105 |
| 8 – REFERÊNCIAS..... | 107 |
| Anexo I: Extração do DNA..... | 123 |
| Anexo 2: Listagens dos fungos endofíticos com o DNA genômico extraído..... | 124 |

1 – INTRODUÇÃO GERAL

1.1 – Biodiversidade de Microrganismos Endofíticos e a Diversidade de Metabólitos.

As florestas tropicais e temperadas são os ecossistemas terrestres de maior diversidade biológica do planeta. Nelas são encontradas 60% de toda a biodiversidade da Terra (Mittermeier *et al.*, 1999), sendo que as maiores concentrações dessa diversidade localizam-se nas regiões tropicais. Estes dados que são válidos para diferentes grupos de seres vivos podem ser extrapolados para os microrganismos, em especial para os endófitos (microrganismos que vivem no interior dos vegetais), ainda pouco estudados em plantas tropicais.

As variações ambientais das regiões tropicais ocasionaram o surgimento de muitas espécies vegetais endêmicas. É provável que estas plantas possuam também microrganismos que co-evoluíram com suas hospedeiras, tornando-se tão adaptados a estas que sejam capazes de mimetizá-las na produção de moléculas bioativas, como constatado para diferentes gêneros de fungos endofíticos isolados da planta de clima temperado *Taxus wallichiana* na produção do taxol, um reconhecido agente anti-cancerígeno (**fig.1**). Resultados semelhantes foram também observados para outras classes de substâncias encontradas, tanto em plantas hospedeiras como nas culturas de seus endófitos. Na Figura 2 os meroterpenos de 1 - 4 são semelhantes aos limonóides produzidos pela planta hospedeira. Os autores sugerem a ação de enzimas similares participando da biossíntese destas substâncias na planta e no endófito (Strobel & Daisy, 2003; Santos & Rodrigues-Filho, 2003).

Na natureza o número de espécies fúngicas é estimado em torno de 1.500.000, mas apenas 8 – 12% foram descritas (Hawksworth & Rossman, 1987) e espera-se que novas espécies sejam encontradas em nichos ainda pouco ou não explorados, enquadrando-se neste contexto as florestas tropicais. A alta diversidade constatada entre os microrganismos endofíticos de florestas tropicais tem reflexo positivo na produção de metabólitos secundários em comparação com os microrganismos de florestas temperadas, segundo Bills *et al.* (2002), cujos resultados de uma amostragem avaliados estatisticamente, comprovam uma maior diversidade de moléculas produzidas pelos endófitos tropicais.

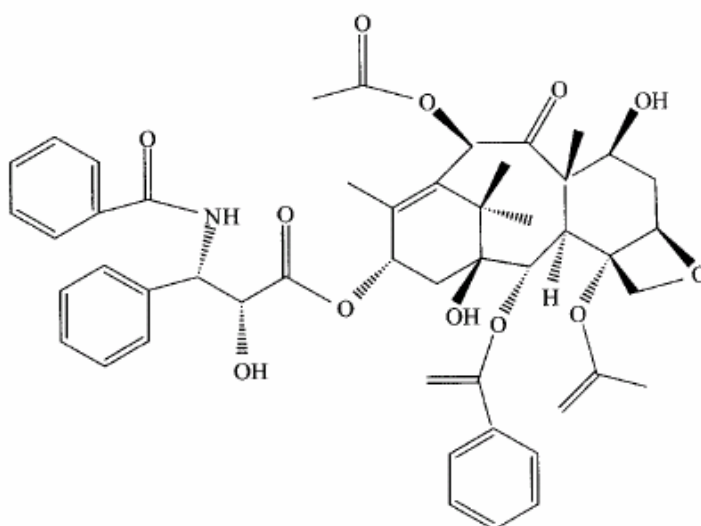
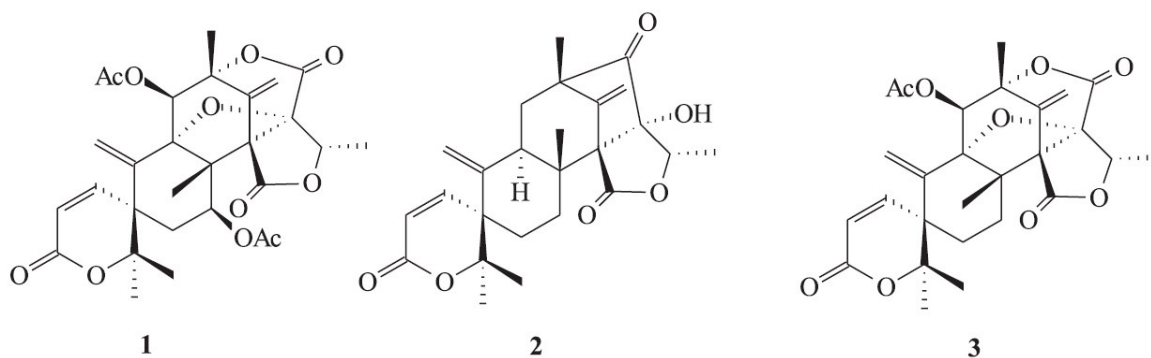


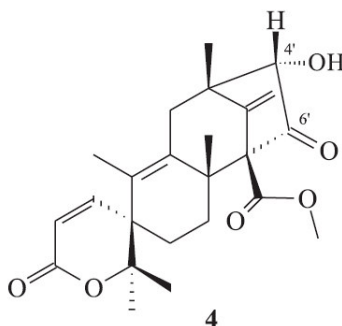
Figura 1: O Paclitaxel (taxol), o primeiro fármaco anticancer do mundo de 1 bilhão de dolar, é produzido por muitos fungos endofíticos. Possui elevada atividade antioomyceto (adaptada de Strobel & Daisy, 2003).



Acetoxi-de-hidroaustina

Neoaustina

De-hidroaustina



Austinoneol

Figura 2: Meroterpenos isolados pela primeira vez da cultura do fungo *Penicillium* sp., isolado do córtex da raiz de *Melia azedarach*. A substância número 4, Austinoneol, é inédita. Figura adaptada de Santos & Rodrigues-Filho, 2003.

Foi neste contexto que se focalizou a atenção no estudo da biodiversidade dos microrganismos endofíticos e da produção de seus potenciais metabólitos secundários. A planta escolhida para essa pesquisa foi *Murraya paniculata* encontrada no estado de São Paulo.

1.2 – A Hospedeira *Murraya paniculata* L. (Jack).

A família Rutaceae tem distribuição pantropical com cerca de 150 gêneros e 1.600 espécies (Ribeiro, 1999). Entre essas espécies encontramos a planta *M. paniculata* que é classificada como arbusto em seu habitat natural na Ásia. As espécimens cultivadas no ambiente urbano têm suas características originais modificadas para arvoretas (**fig. 3**) ou cercas-vivas, conforme a finalidade de cultivo, e são encontradas com muita facilidade nas regiões sul e sudeste do Brasil, onde foram introduzidas e são comumente utilizadas na ornamentação de praças, ruas e cemitérios; o que lhe valeu a alcunha de “murta”.



Figura 3: A planta *Murraya paniculata* no Campus da UFSCar.

Várias classes de substâncias foram isoladas de *M. paniculata* na Ásia, entre as quais podemos citar: cumarinas, flavonóides, esteróides e alcalóides. Das raízes de seus indivíduos asiáticos foi isolado o alcalóide *yuehchukeno* que apresenta atividade anticoncepcional e hormonal (Wang, *et al.*, 1990). Inspirados neste resultado, estudos fitoquímicos foram realizados no Brasil por Ferracini (1996) o qual, no entanto não encontrou nenhum alcalóide. O aparente desvio da rota biossintética dos alcalóides tem sido observado em Rutaceae por Silva *et al* (1988) e pode ser uma manifestação de interação planta/ecossistema (Gottlieb, *et al.*, 1996). Como têm sido demonstrados, muitos microrganismos podem interferir nas funções fisiológicas de suas hospedeiras (Cordeiro Neto & Dietrich, 1992). Este enfoque tem sido objeto de pesquisa no Departamento de Química da UFSCar.

Um isolamento aleatório de fungos endofíticos de *M. paniculata* foi realizado em 2001 em São Carlos. Entre os fungos isolados, um ascomiceto

identificado como *Eupenicillium* sp. foi cultivado em maior escala e dele foram isolados cinco esteróides ergostano, entre eles o ergosterol (comum em fungos e precursor da vitamina D) e o peróxido de ergosterol, dois alcalóides sendo um da classe paxillina e outro com esqueleto do tipo espiroquinazolino, duas ceramidas, três derivados de policetídeos e dois açúcares, sendo um deles o sorbitol (Barros, 2002).

Dando continuidade a essa abordagem de conhecer o potencial químico dos fungos endofíticos de *M. paniculata* e com o intuito de conhecer a biodiversidade dos microrganismos endofíticos que interagem com ela iniciou-se esta pesquisa que teve como enfoque principal conhecer e avaliar o potencial biotecnológico de novos isolados endofíticos dessa planta hospedeira.

2 – JUTIFICATIVA

A enorme diversidade de plantas e de microrganismos localizada em território brasileiro é potencial fonte de inúmeras substâncias químicas de interesse biotecnológico. Além disto, se considerarmos as interações entre as plantas e os microrganismos amplia-se ainda mais este potencial para descoberta de novos produtos.

Muitos aspectos são ainda desconhecidos nas interações entre plantas/microrganismos que vivem associados e só mais recentemente com ajuda de especialistas das áreas de bioquímica, genética clássica e molecular, ecologia e outras áreas afins começam a se desvendar detalhes desta interação. Contudo ainda levará muito tempo para este grande vazio ser preenchido satisfatoriamente. Neste sentido o estudo da comunidade de microrganismos que colonizam assintomaticamente os tecidos de *M. paniculata* foi proposto como uma contribuição a estas investigações.

Os efeitos de sazonalidade e dos micro-habitats que os endófitos ocupam dentro da planta podem também influenciar na diversidade dos isolados e possivelmente nos metabólitos produzidos pela planta hospedeira. Existem, entretanto pouquíssimos dados à disposição, justificando mais pesquisas neste campo. Neste trabalho também se procura contribuir para o esclarecimento dessa influência.

A pesquisa da dimensão da variabilidade genética de um grupo de endófitos freqüente ou de interesse de *M. paniculata* é uma contribuição inédita que ajudará a compreender melhor a diversidade genética, evolutiva ou sistemática dos isolados, correlacionando-os com sua localização na planta hospedeira e dentro do grupo do qual foi isolado.

Os microrganismos, como já exposto, são importantes fontes de metabólitos bioativos. O potencial biotecnológico dos metabólitos produzidos pelos microrganismos isolados de *M. paniculata* foi também inspiração deste trabalho e tendo sido priorizado o estudo do potencial genético e químico destes endófitos.

Considerando a alta biodiversidade microbiana esperada e vislumbrado-se a diversidade de metabólitos produzidos por microrganismos endofíticos, pré-compreende-se a importância e a urgência do presente estudo sobre a composição, os nichos e as aplicabilidades dos endófitos de plantas tropicais e respectivos metabólitos. Neste contexto e diante da carência de informações sobre os recursos genéticos e biotecnológicos que representam os microrganismos de *M. paniculata*, além do total desconhecimento sobre os micro-habitats de seus hóspedes foi que nos propomos a realizar os seguintes objetivos:

3 – OBJETIVOS

Geral:

Estudar a biodiversidade e a diversidade genética e química dos endófitos de *Murraya paniculata* L. (Jack).

Específicos:

- 1 – Isolar, cultivar e identificar os endófitos de *M. paniculata*.
- 2 – Verificar a distribuição sazonal e dos micro-habitats dos endófitos de *M. paniculata* L. (Jack).
- 3 – Avaliar a variabilidade genética ao nível de DNA do endófito mais freqüente ou de maior interesse de *M. paniculata*.
- 4 – Avaliar o potencial bioativo de metabólitos dos endófitos contra linhagens testadoras patogênicas.
- 5 – Isolar e identificar pelo menos um dos metabólitos bioativos produzidos por endófitos de *M. paniculata*.

4 – CAPÍTULO 1

Diversidade dos Endófitos de *Murraya paniculata*

*** Isolamento, Cultivo, Identificação e Conservação dos Endófitos de *M. paniculata*.**

*** Distribuição Sazonal e dos Micro-habitats dos Fungos Endofíticos em *M. paniculata*.**

4 - Introdução do Capítulo 1

4.1 Microrganismos Endofíticos.

Em 1866, Bary, ao observar a microbiota associada às plantas dividiu em dois grupos: **Epifíticos** – os que vivem na superfície dos vegetais e **Endofíticos** – os que vivem no interior. Mais de um século depois, os estudos com os microrganismos endofíticos foram retomados e estes foram definidos por Carroll (1986) como colonizadores assintomáticos do interior das partes aéreas das plantas, ou seja, sem causar danos aparentes. Isto os segregaria dos fitopatógenos o que gerou uma controvérsia com muitos fitopatologistas.

Em 1991, Petrini, ampliou esta definição afirmando que os endófitos podem viver todo ou parte do seu ciclo de vida na planta hospedeira (ver definição completa no próximo parágrafo). Em 1998, Azevedo, também considerou os fungos micorrizos e as bactérias que formam nódulos nas raízes de plantas como endofíticos. Entretanto, estes têm sido bem mais estudados devido as suas funções ecológicas de fixação biológica do nitrogênio (FBN) e absorção de nutrientes e água para as plantas, sendo então considerados separadamente dos que habitam as partes aéreas dos vegetais.

Das 500.000 espécies de plantas estimadas no planeta (Strobel, 2002), menos de 1.000 espécies vegetais tiveram sua microbiota endofítica estudada, porém pelas projeções das pesquisas, todas as plantas, fanerógamas ou não, são hospedeiras de grupos de endófitos. Embora exista uma ampla controvérsia sobre a definição dos endófitos a definição de Petrini (1991) é a mais amplamente aceita, na qual os microrganismos endofíticos são aqueles que residem assintomaticamente nos espaços apoplásticos e/ou dentro das células vivas das plantas todo ou pelo

menos uma parte significativa de seu ciclo de vida. Estas infecções assintomáticas têm sido descritas por serem difundidas naturalmente e os sintomas são expressos somente sob certas condições eco-fisiológicas adversas à planta hospedeira.

Os relacionamentos dos endófitos com a planta hospedeira variam de simbiótico – comensalismo e mutualismo – ao patogênico. Muitos fitopatologistas consideram os microrganismos endofíticos como fitopatógenos latentes, que aguardam uma ocasião para provocar doenças nas plantas. Isto será mais bem discutido adiante quando for diferenciada a entrada e colonização do endófito e do fitopatógeno, no item 4.1.2. Contudo recentes estudos comprovam que os endófitos são capazes de produzir ou induzir as plantas hospedeiras à produção de fitoalexinas (compostos de baixo peso molecular com ação anti-microbiana) não produzidas na ausência destes. Com isto promovem a estimulação ou inibição de animais herbívoros (Rodrigues e Dias-Filho, 1996). Tem sido constatado que eles aumentam a tolerância da planta hospedeira aos stresses abióticos, acumulando ou ajudando-a guardar um estoque melhorado de nutrientes, como foi mostrado para as simbioses com micorriza arbuscular, *Neotyphodium* e seu estágio sexual ou telemórfico *Epichloë* em gramas de pastagens, eles próprios podem fornecer nutrientes minerais e em contra-partida, a planta lhes oferece abrigo e condições de sobrevivência. Estes são alguns exemplos de interações mutualísticas de fungos com plantas mais intensamente estudadas, (Saikkonen *et al.*, 1998 & Harrison, 2005).

4.1.1 Registros Fósseis da Interação Planta/Fungo.

As interações plantas microrganismos são tão antigas quanto a colonização da terra pelos organismos eucariotos, contudo a busca por fósseis de

endófitos que as comprovem é difícil devido o material fossilizado das plantas serem encontrados frequentemente comprimidos. Entretanto, em algumas plantas do Siluriano – Devoniano, de afinidades sistemáticas desconhecidas, foram encontradas estruturas de fungos (Yuan *et al.*, 2005). Também foram encontrados outros fósseis de líquens, neste contexto, envolvendo cianobactérias e fungos não septados que podem ter existido entre 1.000 – 600 milhões de anos atrás conforme ilustrado na **Figura 4 A-B**.

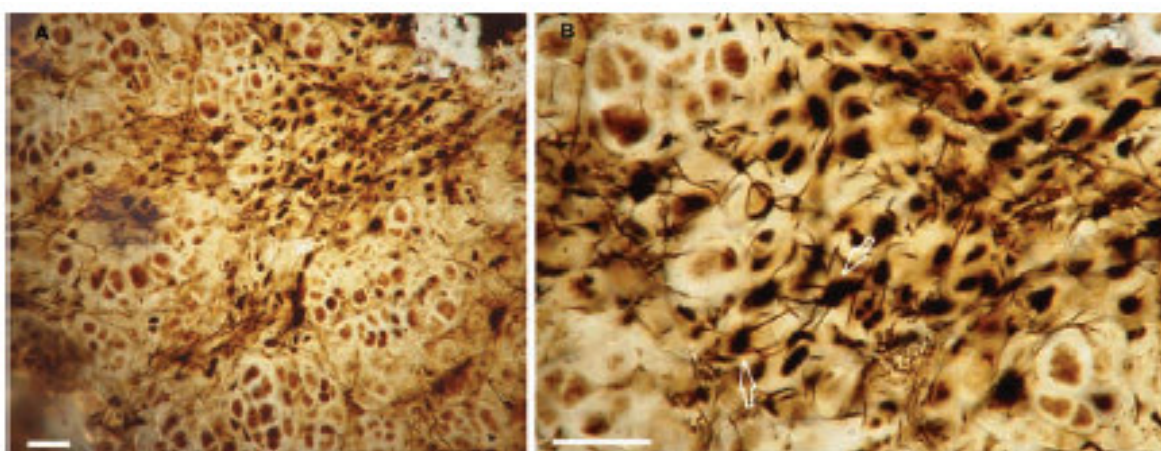


Figura 4 A-B: (A) Detalhes da parte superior. (B) Detalhes do quarto direito superior de (A), mostrando diversos filamentos com estruturas terminais escuras. As setas indicam estruturas terminais com múltiplos apêndices filamentosos (barra igual a 20 μm). Adaptado de Yuan *et al.*, 2005.

Fósseis de líquens do pré-cambriano, tal como *Lichenoides* de *Thuchomyces* da África do Sul, freqüentemente são considerados duvidosos (Selosse & Le Tacon, 1998) devido à dificuldade citada acima (**fig. 5 A-B**). Outra interação, a dos fungos micorrizos arbusculares (FMA), são comuns em ecossistemas terrestres e análises de dados fósseis e moleculares indicam sua origem há mais de 460 milhões de anos, sugerindo que estes fungos ajudaram as plantas em sua colonização terrestre conforme pode ser observado na **Figura 6 de A-H** (Redecker *et al.*, 2000).

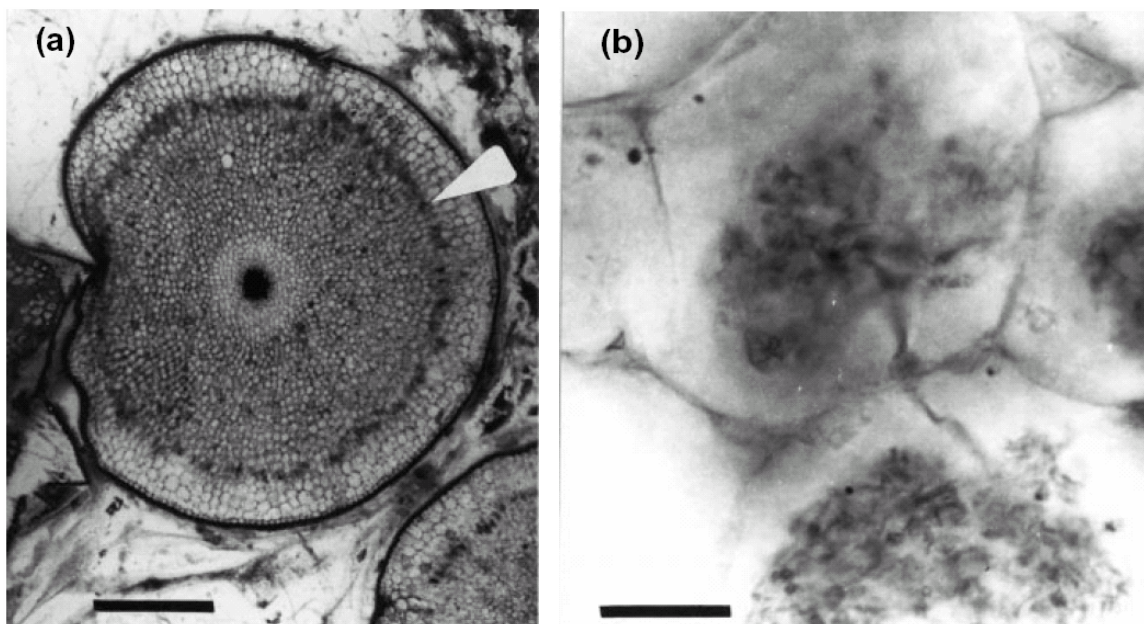


Figura 5 A - B: A - *Aglaophyton* (= *Rhynia*) *major* um fóssil de planta de 400 milhões de anos de Rhynie Chert é associada com Glomales. (a) Seção do rizoma de *A. major* mostrando a parte central e o parênquima cortical com uma zona escura (flecha) onde hifas, vesículas e arbusculos foram descritos (barra: 1 mm). B - Duas células parenquimáticas apresentando arbusculos de FMA em troncos fósseis altamente conservados (barra: 10 mm). Adaptado de Selosse & Le Tacon, 1998 – recebeu como cortesia de T.N. Taylor

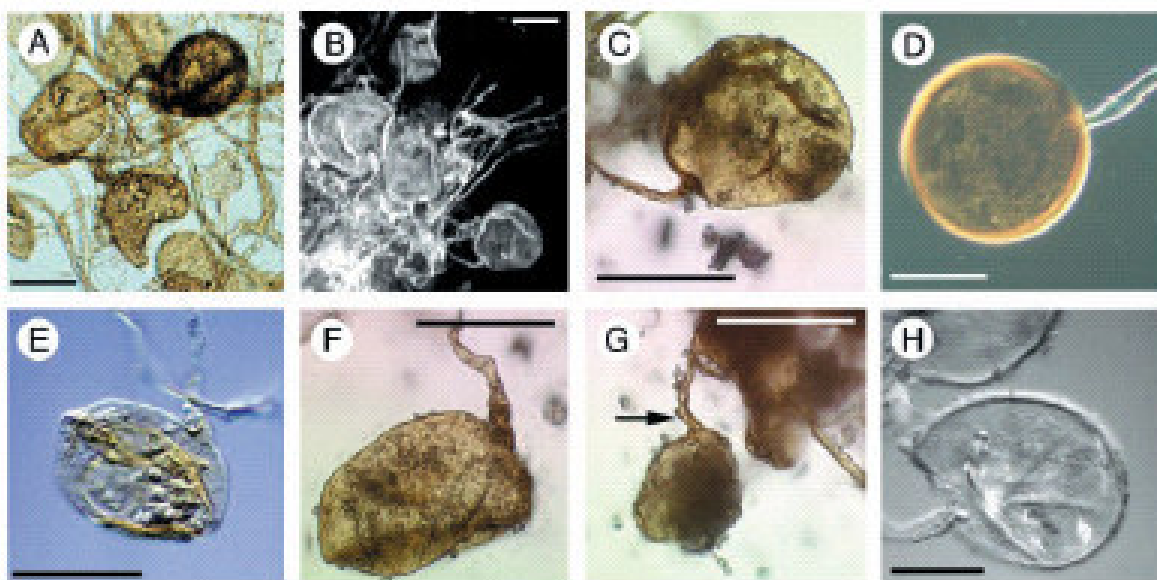


Figura 6 A-H: (A-C e E-G) Fóssil de hifas e esporos do Ordoviciano e (D e H) esporos formados por fungos existentes da ordem glomales. (A e B) Resumos do material fossilizado. (C, E, F, e G) Detalhes de esporo fossilizado. (C) Detalhe (de B). (D) um esporo atual de *Glomus* sp. com destaque da parede. (Em G), a seta mostra paredes de um esporo contendo hifas em contato com a parede de esporos. (H) Um esporo atual de *Glomus leptotichum*, um membro divergente das linhagens glomales. As imagens foram obtidas pela microscopia de luz branca (A, C, F, e G), microscopia de contraste de interferência diferencial dos espécimes em polivinilalcool-lactoglicerol (D, E, e H), e microscopia de raio laser confocal com o autofluorescência do material (B). Todas as barras de escala são 50 mm. Adaptado de Redecker *et al.*, 2000.

A presença de fósseis e de dados moleculares demonstrando que a colonização da terra pelos organismos eucarióticos foi provavelmente facilitada pela interação entre fototróficos e fungos a pelo menos 600 Ma estão representadas no quadro abaixo. A presença de cianobactérias e fungos não septados nos fósseis de líquens, recentemente descobertos reforçam as estimativas do que o relógio molecular insistia em afirmar e alarga o tempo da conquista terrestre para 1000 Ma o que está de acordo com as pesquisas sobre proteínas de Heckman *et al.* (2001) e de genes ribossomais de Berbee & Taylor (2001). As interações simbióticas que uniram planta e fungo no princípio ainda persistem entre grupos especializados, como reportada para os FMA.

Escala de Tempo Geológica na Evolução Plantas/Fungos.

| Datação a partir do DNA | | Fósseis fúngicos | |
|--|-----------------------------------|----------------------|--|
| Idade a partir do DNA e Fósseis Animais. Fungos patógenos | Cenozoico – idade dos mamíferos | Quaternário | <p>Recente – Pleistoceno</p> <p>24</p> <p>Ectomicorizas (50 Ma) Líquens (50 Ma)</p> |
| | | Terciário | <p>Piloceno – Paleoceno</p> <p>65</p> |
| Maioreia dos insetos modernos | Mesozoico – idade dos répteis | Cretáceo | <p>- Aparecimento das monocotiledôneas e declínio das gimnospermas.</p> <p>- Emergência dos Holobasiodiomicotina.</p> <p>144</p> |
| | | Jurássico | <p>- Aparecimento e ascensão das dicotiledôneas.</p> |
| | | Triássico | <p>206</p> <p>- Domínio das gimnospermas.</p> <p>- Evidência da diversificação dos fungos V. A. a partir de fósseis da raiz de <i>Cycad</i> na Antártica.</p> <p>251</p> |
| Traços fósseis de Millipedes, | Paleozoico - Idade da vida antiga | Permiano | <p>- Líquens envolvendo cianobactérias e zygomycetos.</p> |
| | | Carbonífero | <p>- Fóssil de plantas vasculares com associações V. A.</p> |
| | | Devoniano | <p>300</p> <p>- Divergência entre ascomycetos e Basidiomycetos (395 Ma).</p> |
| | | Siluriano | <p>354</p> <p>- Fósseis de líquens e ascomycetos</p> |
| | | Ordoviciano | <p>409</p> <p>- Divergência entre Glomerales e outros Zygomycetos.</p> |
| | | Cambriano | <p>510</p> <p>- Divergência entre <i>Chytrids</i> e fungos terrestres.</p> <p>543</p> |
| Glomerales, Ascomycetos – basidiomycetos e origem das plantas terrestre (600Ma). | Proterozoico | Pré-Cambriano | <p>- Paleosolo com micro-fototrópicos de vida livre. Fóssil de afinidade incerta interpretada como líquens por alguns autores.</p> <p>570</p> |

Figura 7: Escala de Tempo Geológica na Evolução Plantas/Fungos. Adaptado dos trabalhos de Selosse & Le Tacon, 1998; Blackwell M., 2000; Berbee & Taylor, 2001; Benton & Ayala, 2003 e Nicholas, 2005.

4.1.2 Transmissão e Colonização dos Endófitos.

Os microrganismos endofíticos podem infectar as plantas hospedeiras de duas formas; vertical ou horizontal, e colonizá-la em todo ou em parte do seu ciclo de vida. Na **transmissão horizontal** o endófito se encontra presente na população vegetal e sua transmissão para novos indivíduos compreende a entrada pelas raízes, nas folhas: através dos estômatos e/ou lesões e nos mais diversos órgãos que sofrem algum tipo de ferimento. Neste caso eles vivem apenas partes do seu ciclo de vida dentro da planta e assim podem ser confundidos com os fitopatógenos. A **Figura 8-A** compara a entrada de um fungo endofítico com um fitopatógeno.

Outra forma é a **transmissão vertical**, ilustrada na **Figura 8-B**. Nesse sistema os microrganismos presentes na planta-mãe são transmitidos via semente. A exemplo disso foi observado que nas gramíneas os fungos endofíticos estão presentes desde a germinação da semente e atingem do rizoma até o ápice das folhas no adulto (Ahlholm *et al.*, 2002). Para as plantas que não produzem sementes e são propagadas através de clones na natureza, os microrganismos passam direto da hospedeira para sua prole via clone, como comprovado para a cana-de-açúcar (James *et al.*, 1994). Estes microrganismos estão intimamente ligados às plantas hospedeiras e vivem todo o seu ciclo de vida na planta. Um exemplo bem conhecido é a bactéria *Acetobacter diazotrophicus* da cana-de-açúcar. Ela mantém uma relação mutualística íntima com a planta hospedeira e apesar de algumas ser morfologicamente semelhante aos patógenos de mesmo grupo, não causa doenças e não sobrevive muito tempo fora de suas hospedeiras. Evolutivamente ela está tão distante dos fitopatógenos que pode ser diferenciada destes por marcadores moleculares e chegam a produzir proteínas homólogas diferentes que conferem mais resistência a suas hospedeiras (Fungaro, 2001 & Azevedo *et al.*, 2000).

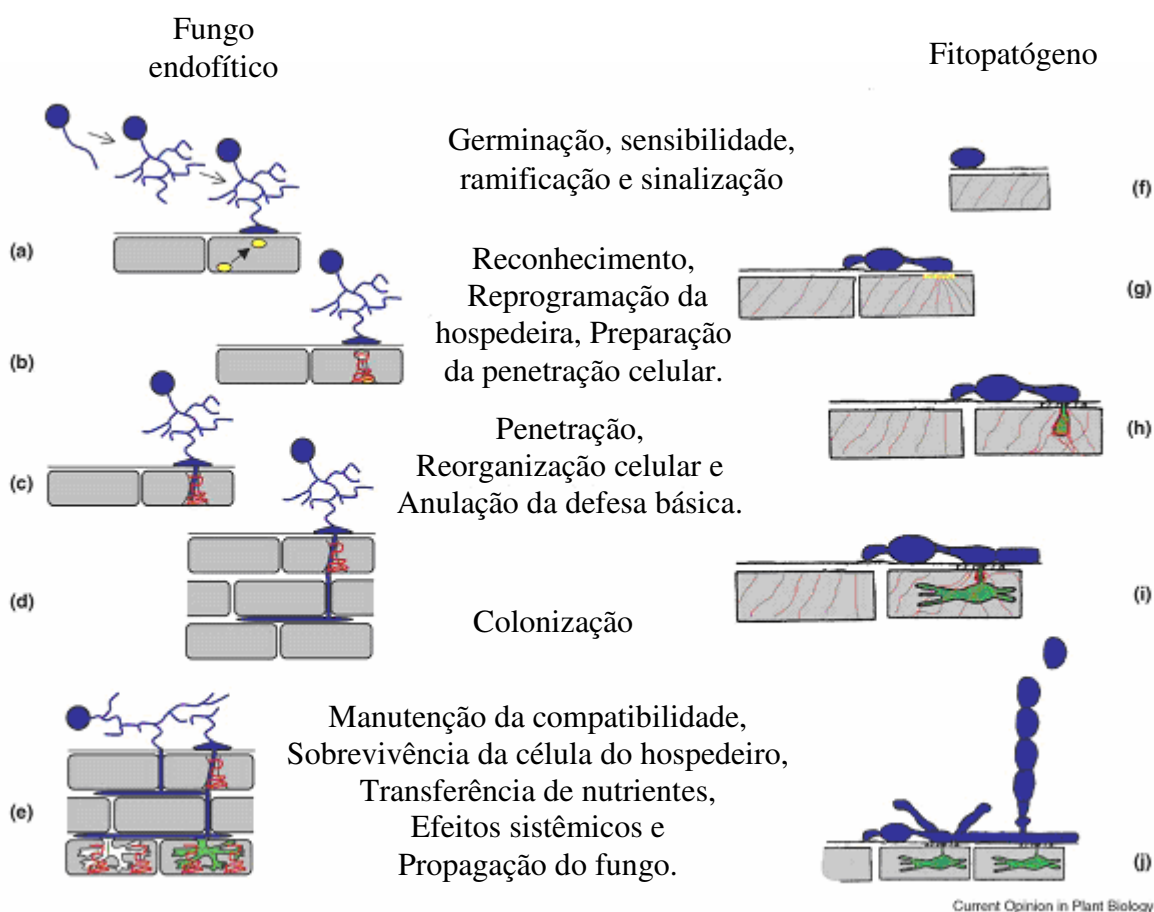


Figura 8-A: Comparação entre a entrada de um fungo endofítico e de um fitopatógeno, relatada por Kogel *et al.* (2006). Em **a** o fungo endofítico germina fora da célula vegetal e estabelece um contato com sinalizadores químicos em contraste em **f** que o fitopatógeno primeiro entra em contato para depois germinar com a formação do apressório. Em **b** ocorre um reconhecimento e um reprogramamento da hospedeira para facilitar a entrada do endófito enquanto que em **g** o fitopatógeno libera enzimas que degradam a parede celular. Em **c** contato concreto do endófito seguido de colonização em **d**, enquanto em **h** e **i** a planta se defende do fitopatógeno com a produção de proteínas de resistência. Finalizando em **e** relações simbióticas entre o endófito e sua hospedeira enquanto em **j** a guerra entre fitopatógeno e a planta persiste.

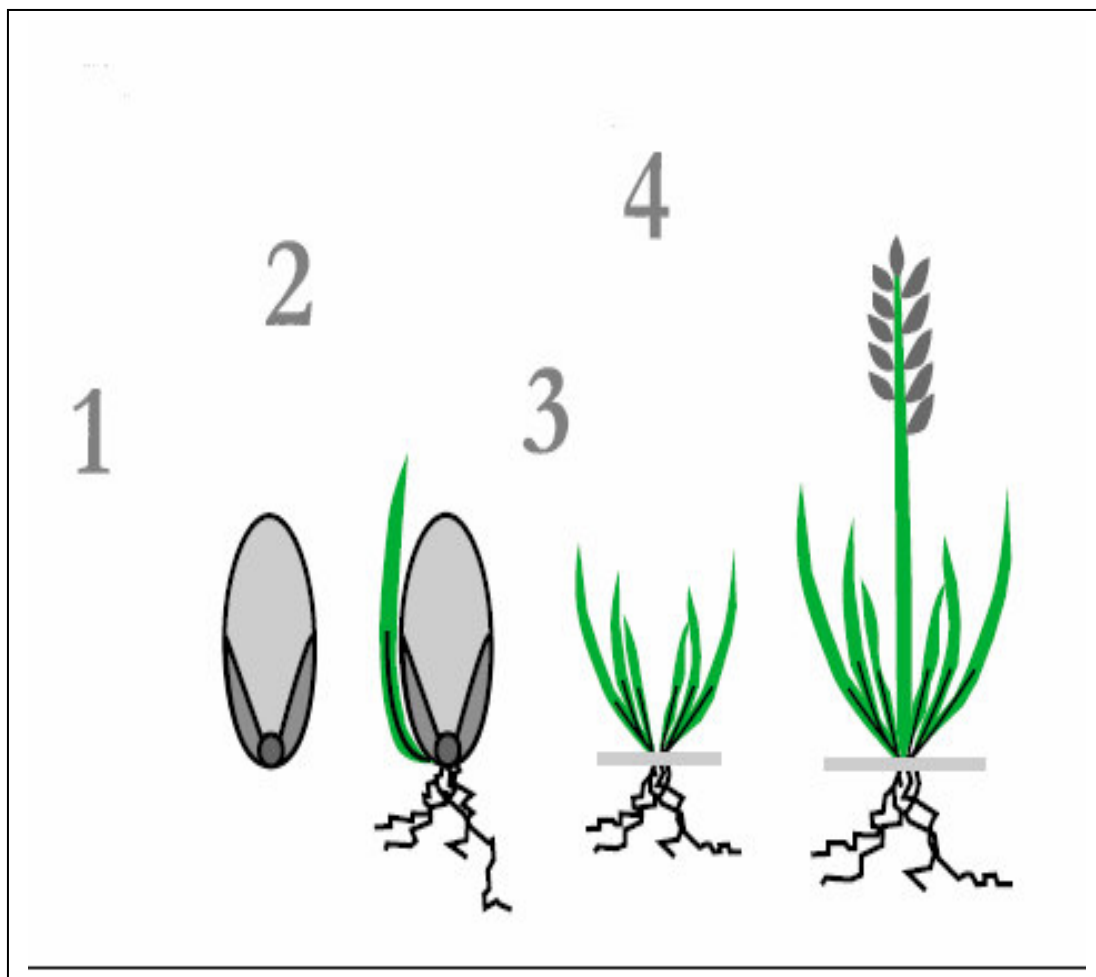


Figura 8-B: Transmissão vertical – em gramíneas. Observe em **1** a semente, em **2** a semente germinando com o endófito presente nos folíolos e nas raízes. Em **3** a colonização total da plântula pelo endófito e as sementes infectadas com os esporos dos fungos endófiticos em **4**. Adaptado de Ahlholm *et al.*, 2002.

Evidências limitadas indicam que esses endófitos influenciam nas dinâmicas de populações, diversidade de comunidades de plantas e de microrganismos assim como em suas funções nos ecossistemas. No entanto, a maioria das evidências para estes tipos de mutualismos e suas conseqüências ecológicas tem como base alguns endófitos de grama (monocotiledôneas) que foram mais bem investigados que os de outros grupos de plantas – dicotiledôneas, gimnospermas, pteridófitas e briófitas.

Uma vista mais compreensiva da ecologia e evolução das interações planta/endófito é necessária, devendo estas interações ser consideradas únicas para cada sistema de planta/comunidade endofítica no tempo e no espaço em que ocupam. No presente capítulo está apresentado os resultados da identificação de gêneros de fungos endofíticos associados a indivíduos de *M. paniculata*, do estado de São Paulo, e discutem-se as características de vida de cada grupo de fungo isolado, com suas variações morfológicas, relacionando-os com os possíveis fatores que os estão influenciando na ocupação daquele nicho.

4.2 - Materiais e Métodos

4.2.1 Coleta das plantas

Foram escolhidos quatro espécimes de *M. paniculata* em três locais do estado de São Paulo para realização das coletas. As plantas foram amostradas pelo período de um ano, de acordo com as diferentes sazonalidades. Os locais de coleta foram:

Local 1. Ao lado do Restaurante universitário da UFSCar em São Carlos – **Hospedeira I.**

Local 2. Águas da Prata – **Hospedeira II.**

Local 3. Viveiro da Botânica da UFSCar em São Carlos – **Hospedeiras III e IV.**

4.2.2 Material Vegetal Utilizado

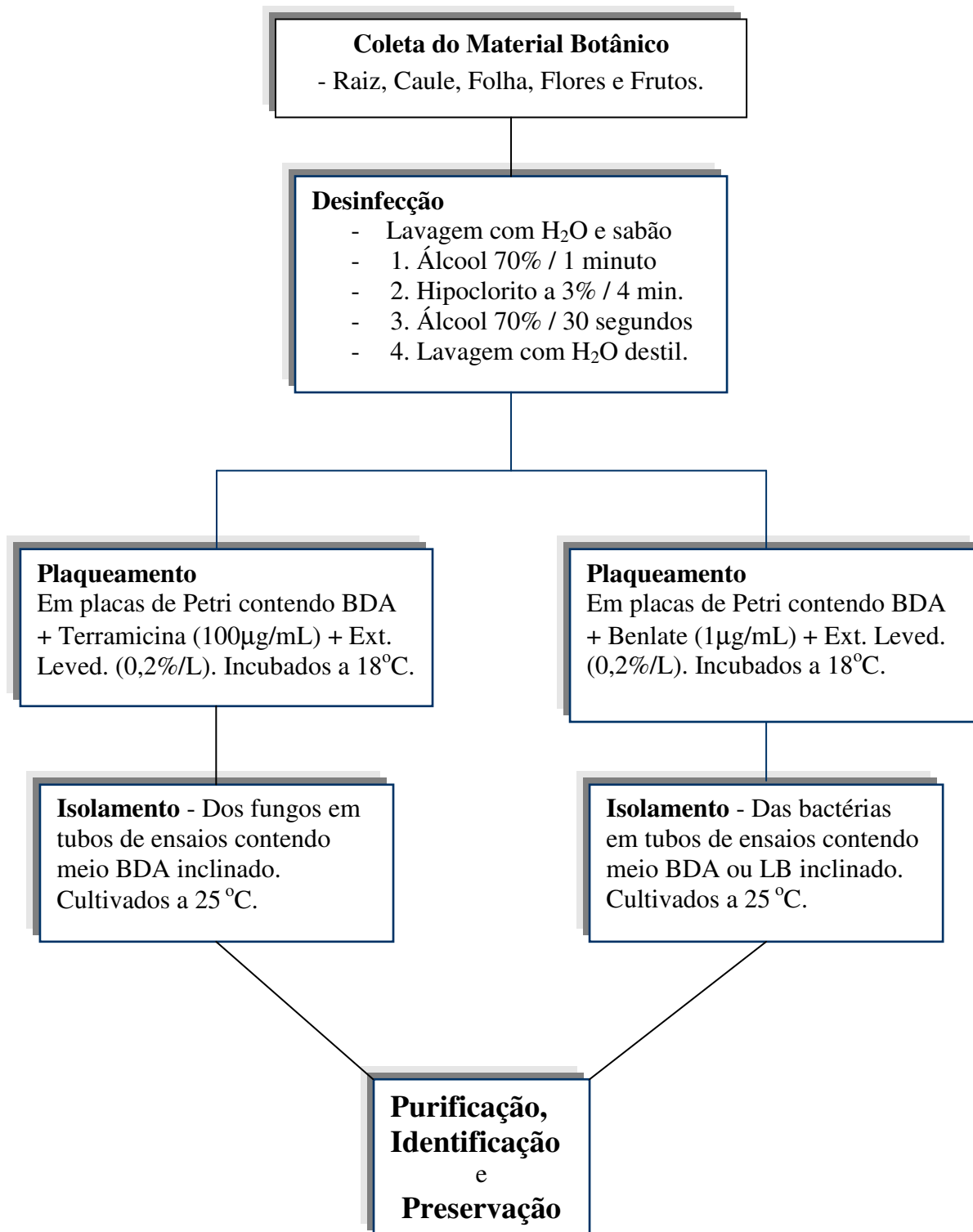
Para a realização deste trabalho foram utilizados folhas, caules, raízes, flores, frutos e sementes – sendo que os três últimos apenas quando estavam presentes. Esta parte do trabalho foi realizada no LABIOMI (Laboratório de Bioquímica Molecular de Microrganismos), no Departamento de Química da UFSCar.

4.2.3 Desinfecção do Material Vegetal e Isolamento dos Endófitos

O material coletado foi lavado com detergente líquido e água corrente. Em seguida, para a remoção dos microrganismos epifíticos foi feita, em câmara asséptica, esterilização superficial com álcool 70% por 1 minuto, tratamento com

hipoclorito de sódio 4% por 4 minutos, novamente imersão em álcool 70% por 30 segundos e finalmente lavagem em água destilada esterilizada, o esquema abaixo ilustra todas as etapas do isolamento, identificação e conservação.

As amostras foram cortadas em pequenos fragmentos de 4 mm x 4 mm, colocadas em placas de Petri contendo: BDA (batata - dextrose - ágar) acrescido de extrato de leveduras a 0,2% e de Terramicina, na concentração de 100 µg/mL para isolamento dos fungos filamentosos e de leveduras ou com Benlate, na concentração de 1 µg/mL para isolamentos das bactérias. Os fragmentos foram mantidos a 18°C por 3 dias. Após este tempo foi iniciada a repicagem para tubos de ensaios contendo meio de cultura inclinado apropriado. Todo o material foi datado e identificado para facilitar o uso posterior.

Organograma do isolamento dos endófitos de *Murraya paniculata*.

4.2.4 Purificação, Identificação e Preservação dos Endófitos

Após o isolamento dos fungos endofíticos a purificação foi feita pela técnica de tween (Azevedo e Costa, 1973) quando apresentaram conídios ou esporos e repiques sucessivos para os que foram *Mycelia sterilia*. As amostras foram conservadas conforme Castellani (1939). As bactérias endofíticas foram purificadas pelo método do esgotamento por estrias cruzadas e conservadas a -4 °C em meios de culturas apropriados. Foram utilizados os seguintes meios de cultura: LB, BDA, Millehinton e BHI - recobertas com óleo mineral ou acrescentado glicerol na concentração de 10 %.

As identificações dos fungos endofíticos foram realizadas pelas análises das estruturas macroscópicas, observando-se a consistência, a coloração e a forma das colônias; microcultivo para verificação das estruturas microscópicas, hifas, micélio e estruturas de reprodução (sexual e assexual), coradas com lactofenol ou outro corante afim e comparação com literatura específica à taxonomia de cada grupo. Para efeito de comprovação da identificação as estruturas dos fungos foram observadas em microcultivos e fotografadas no Laboratório de Espectrometria de Massas (LEM).

As identificações das bactérias seriam feitas por estudos morfológicos das macro-colônias e micro-estruturas (Shirling & Gottlieb, 1966), bioquímicos, como a constituição da parede celular (Staneck & Roberts, 1974; Lechevalier & Lechevalier, 1970), e também pela técnica molecular, a partir da PCR, do sequenciamento do DNA que codifica a região ribossomal 16s (SSU-rDNA). Os isolamentos das bactérias ficaram restritos apenas às quatro primeiras e às quatro últimas coletas.

4.2.5 Acompanhamento da Sazonalidade e dos Micro-habitats dos Endófitos.

Dos indivíduos escolhidos (I e II) foram realizadas quatro coletas, de acordo com a sazonalidade. Os resultados foram avaliados estatisticamente para avaliação do índice de colonização, a taxa de frequência dos endófitos e a verificação dos micros-habitat por eles ocupados. O índice de colonização e as taxas de frequência foram calculados conforme descrita do Azevedo (1998), representadas a seguir:

- Taxa de Colonização:

$$Cr = \frac{\text{Número Total de Isolados} \geq 1}{\text{Número de Fragmentos da Amostragem}}$$

- Frequência Relativa:

$$Fr = \frac{\text{Número Total de Isolados de um Grupo}}{\text{Número de Isolados Total}} \times 100.$$

4.3 - Resultados e Discussão

4.3.1 Isolamento e Conservação

Após o acompanhamento por um ano (maio de 2002 – maio de 2003) de quatro espécimes de *M. paniculata* foram isolados 1.711 microrganismos endofíticos a partir de 3.212 fragmentos, sendo 1.061 fungos filamentosos e 650 bactérias. A **Figura 9** ilustra o isolamento e o controle da assepsia.

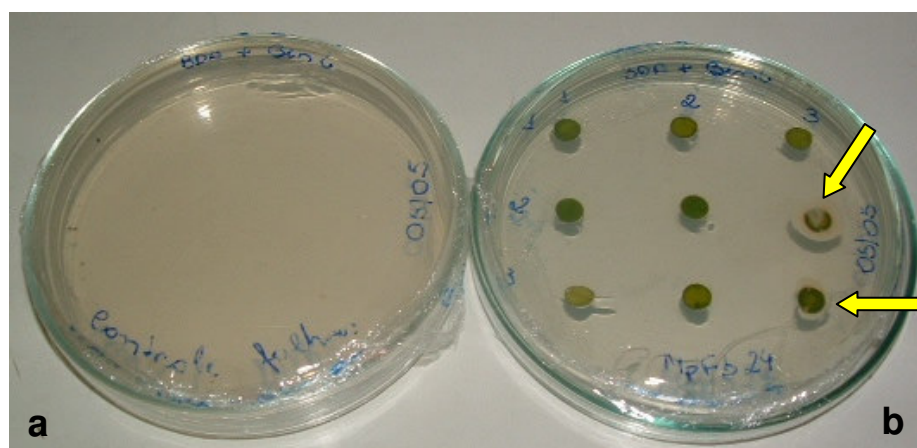


Figura 9-A: Isolamento das folhas de *M. paniculata*. As setas indicam o desenvolvimento de bactérias a partir do fragmento da folha em **b**. Em **a** o controle da assepsia comprovando a eficiência da técnica.

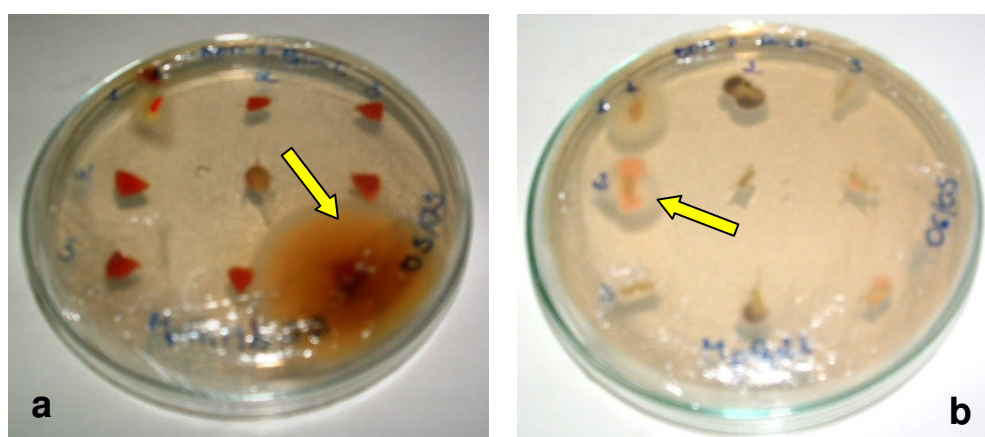


Figura 9-B: Isolamento de fungos endofíticos de *M. paniculata*. As setas indicam o desenvolvimento de fungos endofíticos do fragmento do fruto maduro (**a**) e do caule consecutivamente (**b**).

O tempo e a concentração do hipoclorito na assepsia dos tecidos vegetais são os fatores primordiais para o bom isolamento dos endófitos. Em casos

extremos de concentração do hipoclorito e tempo de exposição os tecidos podem sofrer oxidações e diminuir na quantidade de isolados. Já a ação contrária ocasiona o surgimento de microrganismos mais do ambiente externo que crescem rapidamente inibindo ou ocupando o lugar dos endófitos, por este motivo o controle da assepsia torna-se fundamental, pois ele indica o grau de confiabilidade do experimento. Na presente pesquisa a metodologia utilizada é frequente nos laboratórios de genética da UFAM e tem sido utilizada por ser simples, econômica e eficiente. Depois desta pesquisa esta metodologia foi também adotada no LABIOMI.

Uma amostragem de 130 (12,2 %) fungos filamentosos e de 67 (10,3 %) bactérias foram conservados conforme o **item 4.2.4.** Essa amostragem foi selecionada de acordo com os grupos isolados e significou um aumento de mais de 100 % na coleção de microrganismos do LABIOMI, que contribuirá com as pesquisas químicas de produtos naturais de origem microbiana da Universidade Federal de São Carlos.

4.3.2 Identificação Morfológica dos Fungos Endófitos

Após os agrupamentos dos fungos endófitos foram identificados 20 grupos morfológicos, dos quais 15 eram de gêneros conhecidos e dos outros cinco desconhecidos dois eram *Micelia sterilia* (**fig. 10 A-B**). Os gêneros identificados foram *Fusarium*, *Colletotrichum* e seus telemorfos *Giberella* e *Glomerella* respectivamente, *Trichoderma*, *Phomopsis*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Epicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Alternaria*, *Xylaria*, *Nigrospora* e *Guignardia*. As macrocolônias e os micro-cultivos de alguns destes fungos estão apresentados nas **Figuras 11-19.**

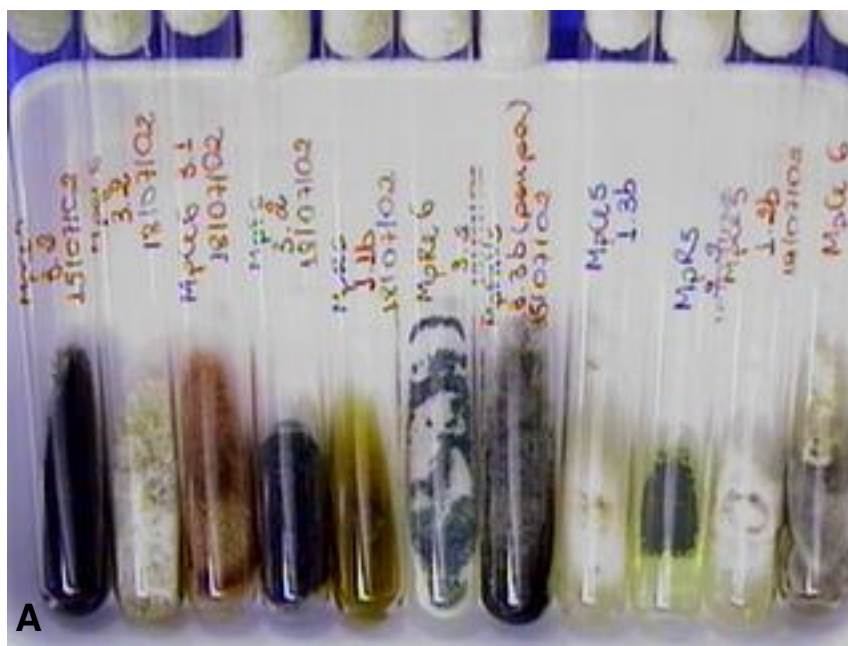


Figura 10-A: Diversidade de fungos endofíticos isolados de *M. paniculata* no estado de São Paulo. Da esquerda para direita: *Guignardia*, *Phomopsis*, *Fusarium gramineaceum*, 2 *Penicillium*, *Trichoderma*, *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Penicillium*, Fed e *Alternaria*.

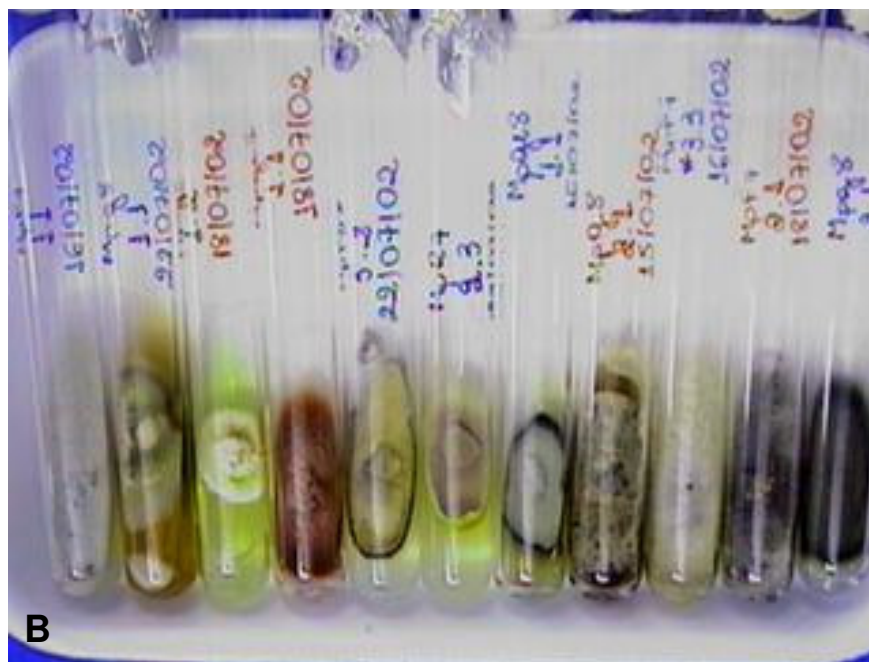


Figura 10-B: Diversidade de fungos endofíticos isolados de *M. paniculata* no estado de São Paulo. Da esquerda para direita: *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Fusarium gramineaceum*, *Penicillium*, *Penicillium* (rosa), *Paecilomyces*, 2 *Colletotrichum*, *Aspergillus niger* e *Guignardia*.

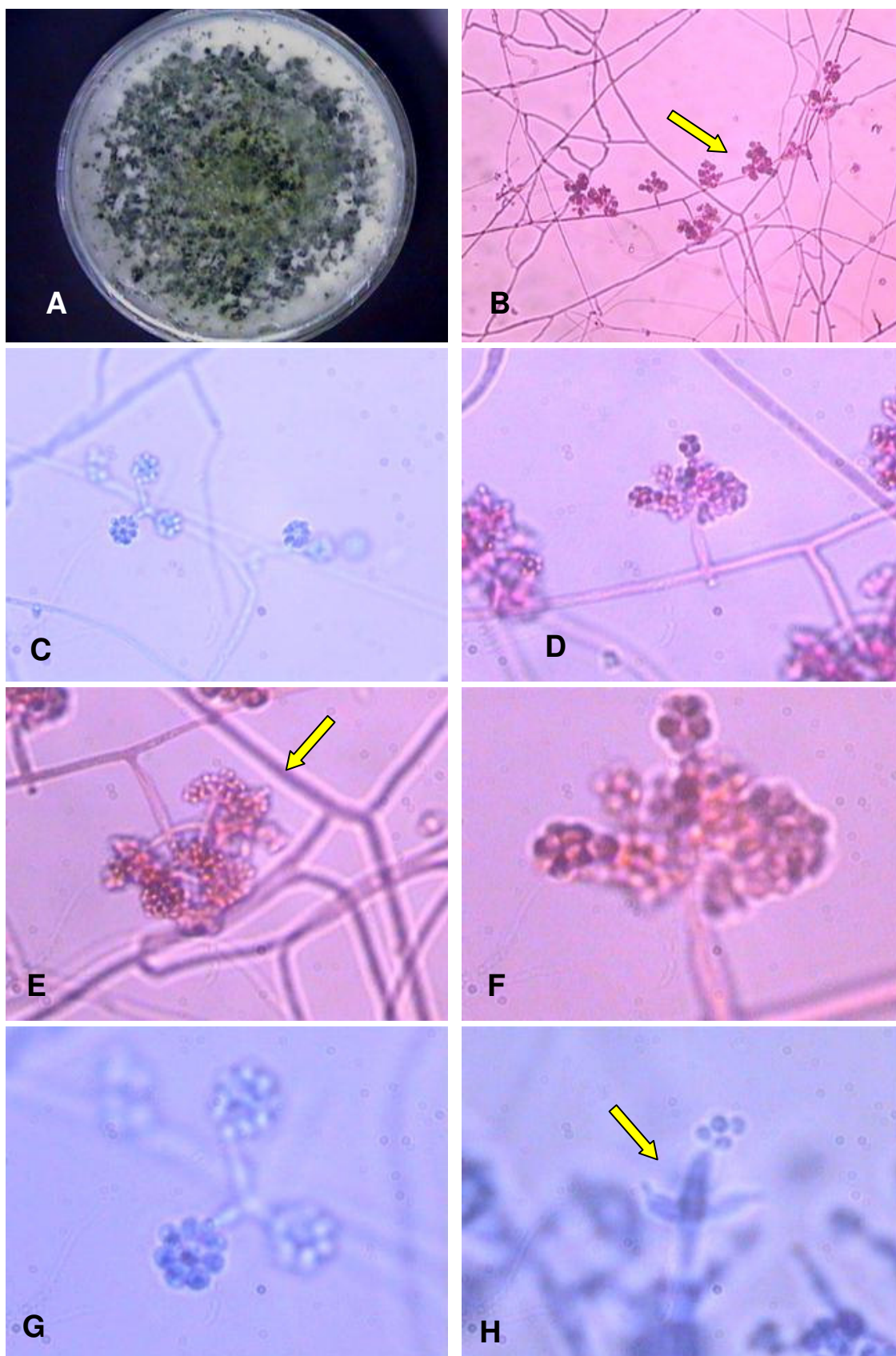


Figura 11: *Trichoderma hamatum* – MpCe2 2.2a. Em **A** cultura em placa de Petri com conídios, em **B** a seta indica hifas com conidióforos (obj. 4x), em **C** e **D** conidióforos em triades (Obj. 10x) e em **E** - **H** detalhes do conidióforo e da tríade respectivamente (Obj. 40x).

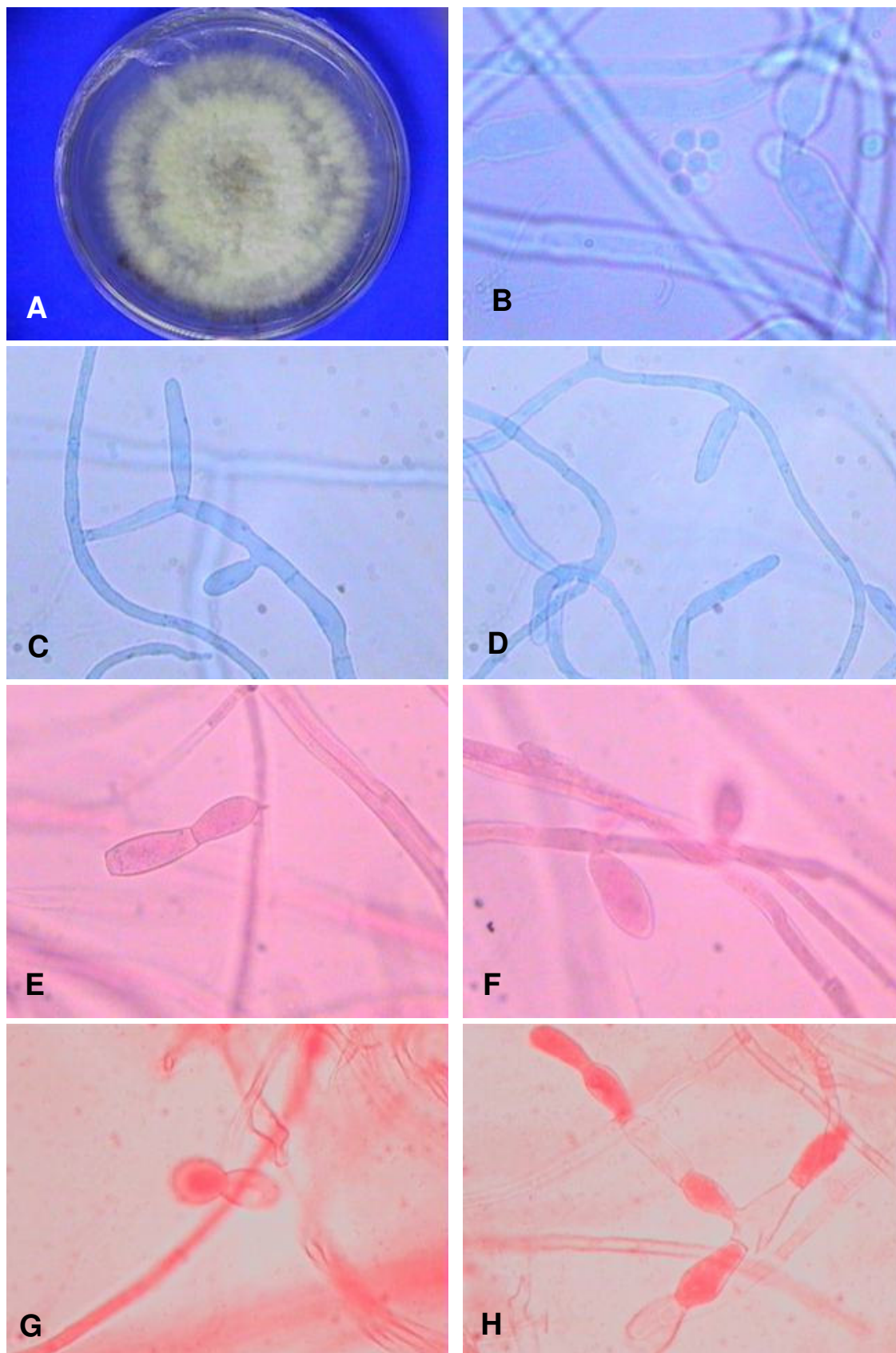


Figura 12: Fotos de Mpce2 3.3b. Em **A** cultura em placa de petri, em **B** detalhes das hifas (obj. 100x), em **C, D, E - H** detalhes de estruturas vegetativas (Obj. 40x).

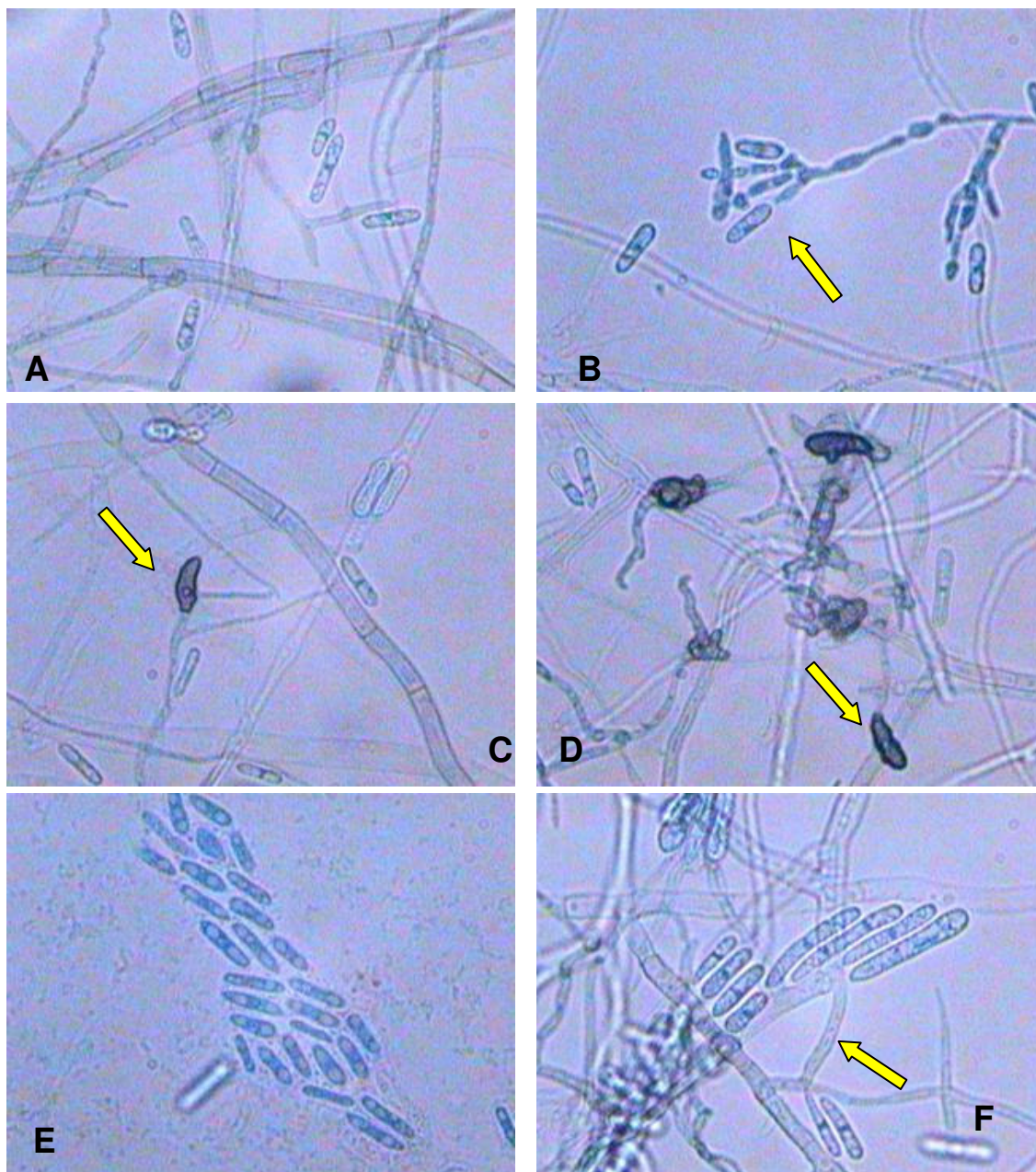


Figura 13: Fotos de MpF1 1.2 – *Colletotrichum acutatum* isolado das folhas de *Murraya paniculata*. Em **A** e **E** conídios, a seta em **F** indica o conidióforo (obj. 40x), em **C** e **D** detalhes do apressório em forma de clava (obj. 10x) e em **B** a seta mostra os detalhes da formação dos conídios em obj. 10x.

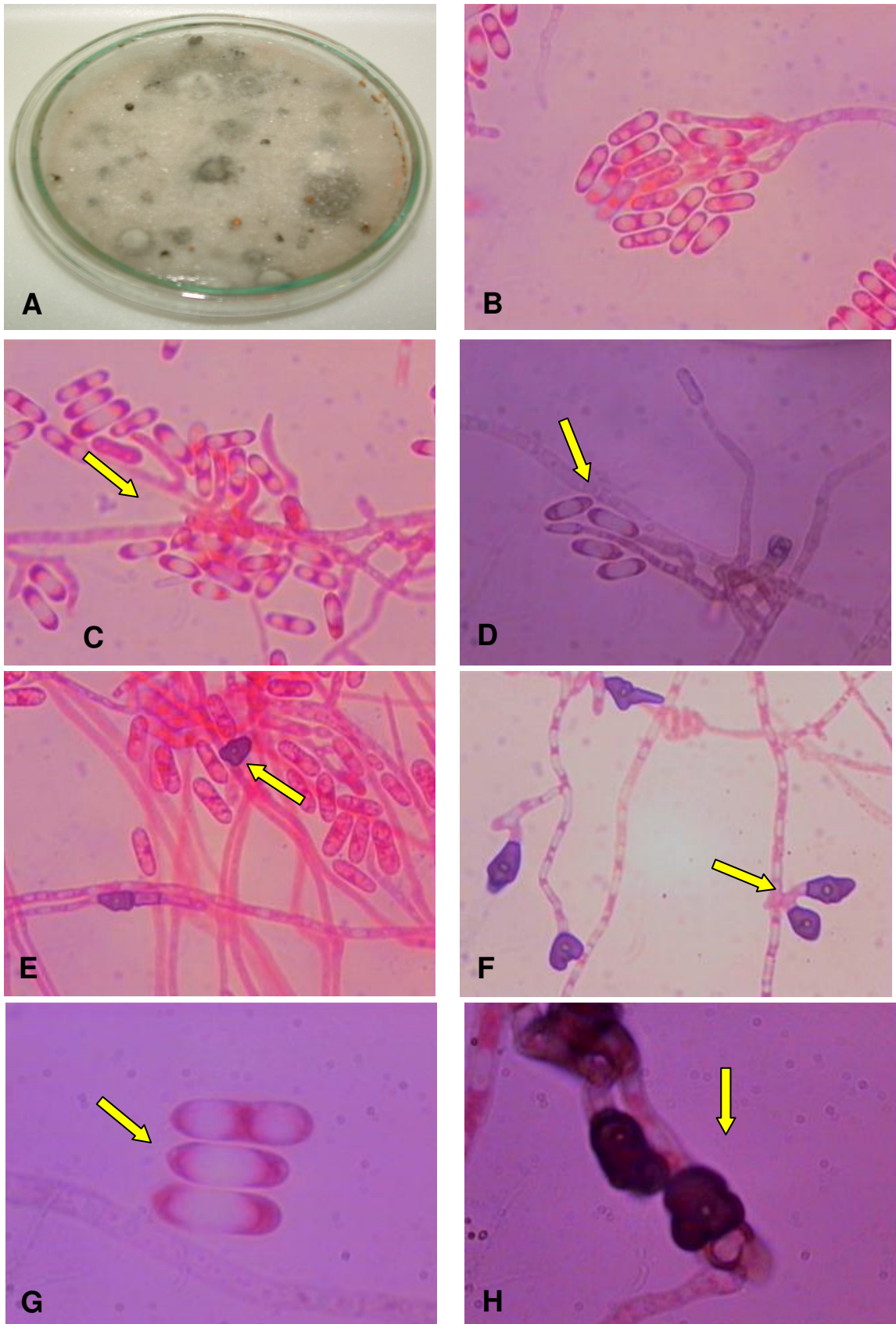


Figura 14: *Colletotrichum gloeosporioides* (MpF2 2.1). Aspectos macroscópicos em **A** da cultura em placas de petri com BDA, em **B** conidióforo, **C** e **D** conídios, em **E** e **F** as setas mostram a formação e os detalhes dos apressórios respectivamente (obj. 40x) e em **G** e **H** as setas indicam detalhes dos conídios e dos apressórios respectivamente (obj. 100x).

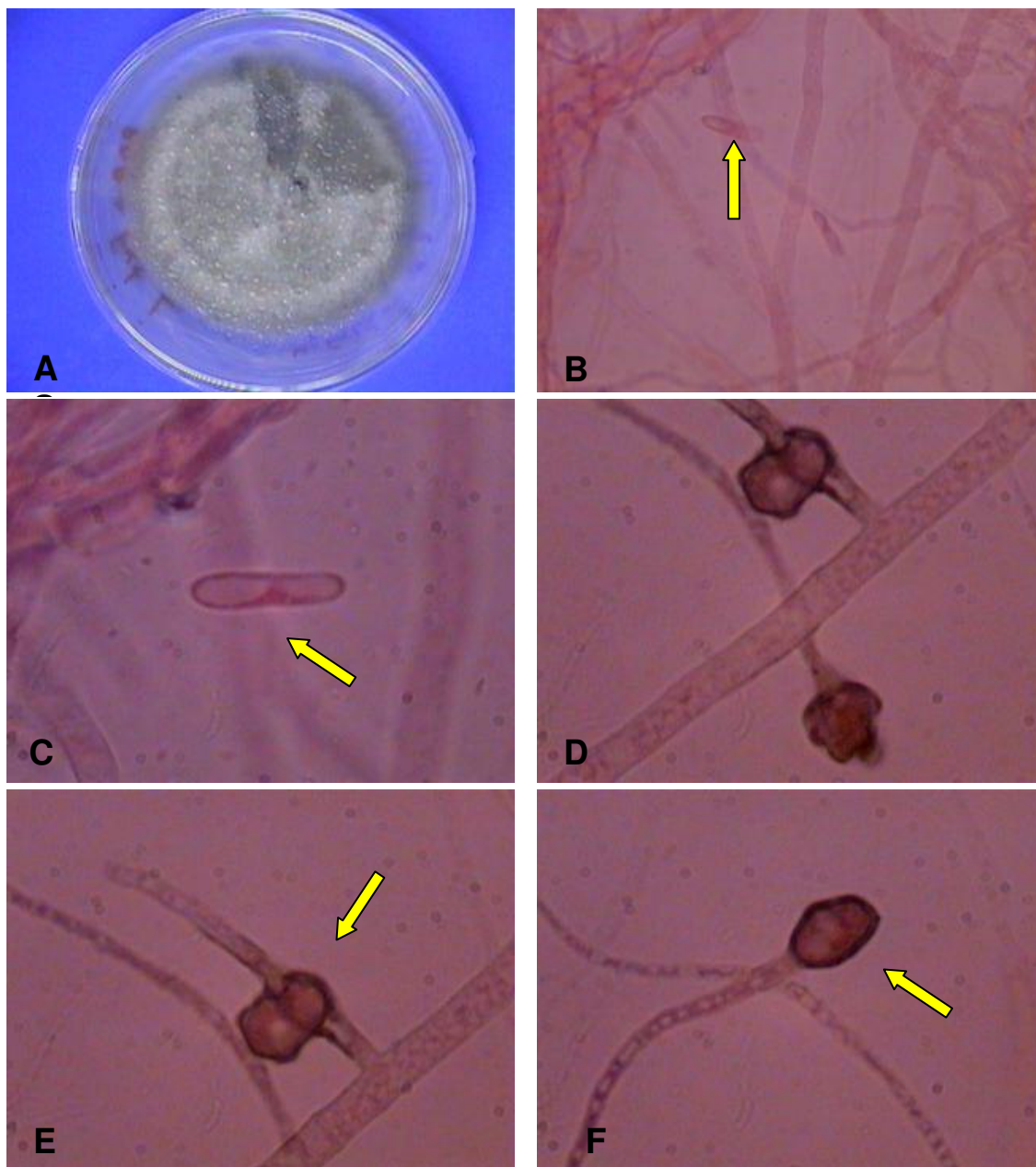


Figura 15:– *Colletotrichum* sp. (MpFrVb2 2.1b). Conídios em **B** (obj. 10x), em **C** e de **D** – **F** detalhes do conídio e dos apressórios respectivamente (obj. de 100x). Em **E** a seta indica a germinação a partir do apressório.

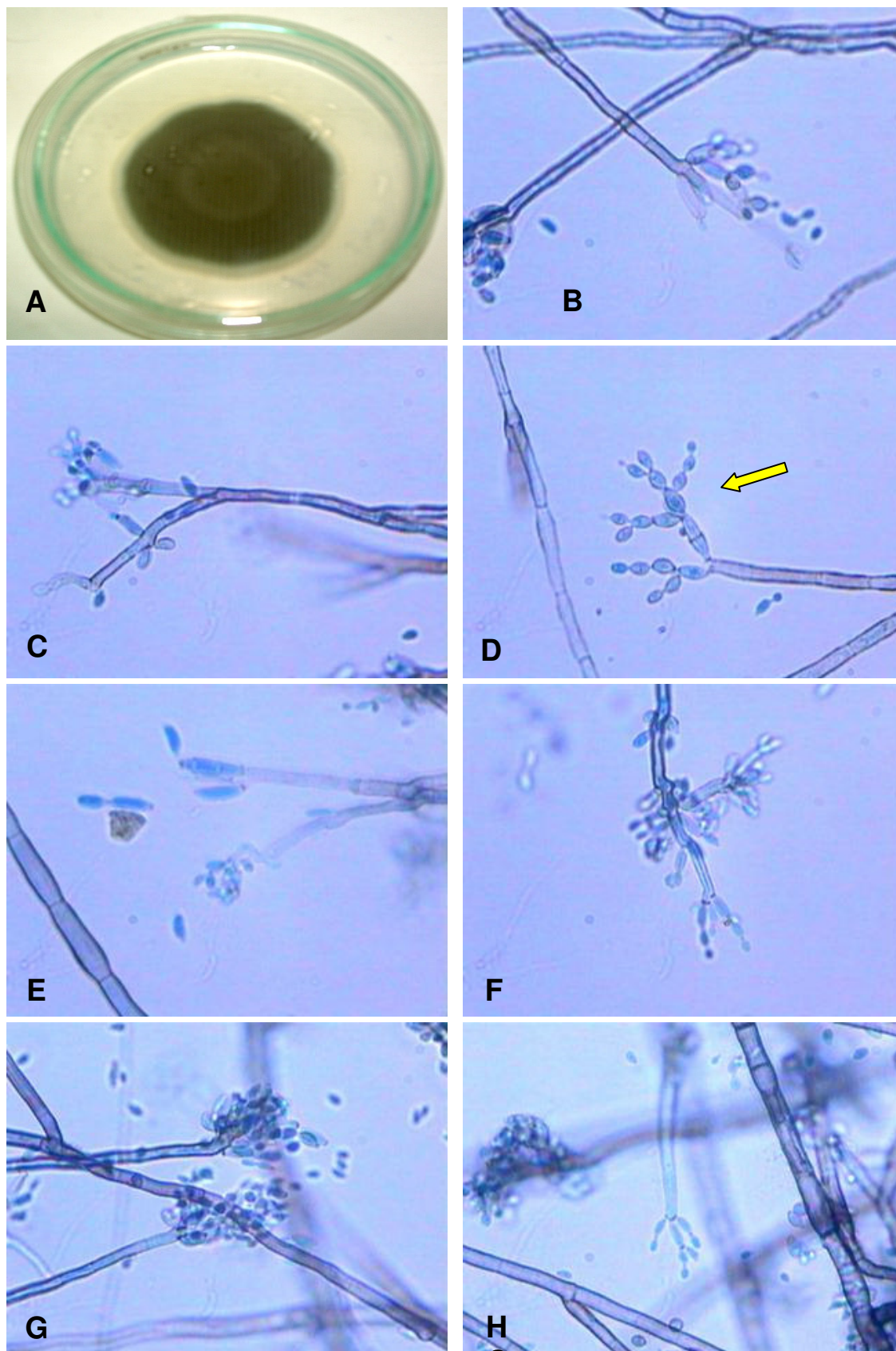


Figura 16: Fotos de MpGe7 3.2. Em **A** aspectos macroscópico da cultura em placa de petri com BDA, de **B – H** conídios e conidióforos (obj. 40x). Em **D** a seta mostra a formação dos conidióforos com conídios.

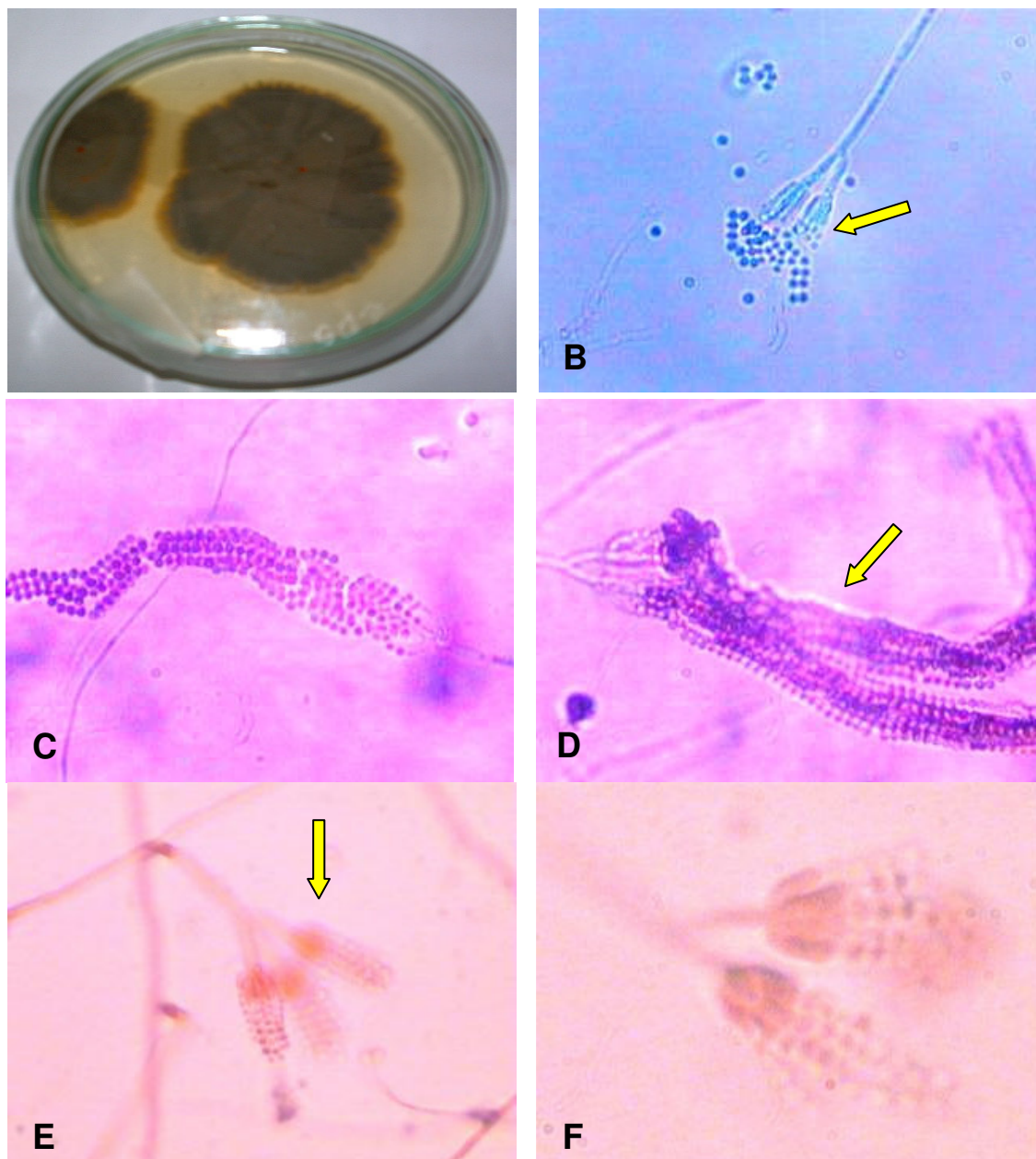


Figura 17: *Penicillium* sp. (MpRp2 3.2). Aspectos macroscópicos da cultura em placa de petri com BDA em **A**, observação em **B** do conidióforo biverticilado cuja seta indica. Em **C** e **D** destaque das cadeias de conídios (obj. 10x), em **E** filiaes (obj. 40x) e em **F** os detalhes dos conidióforos.

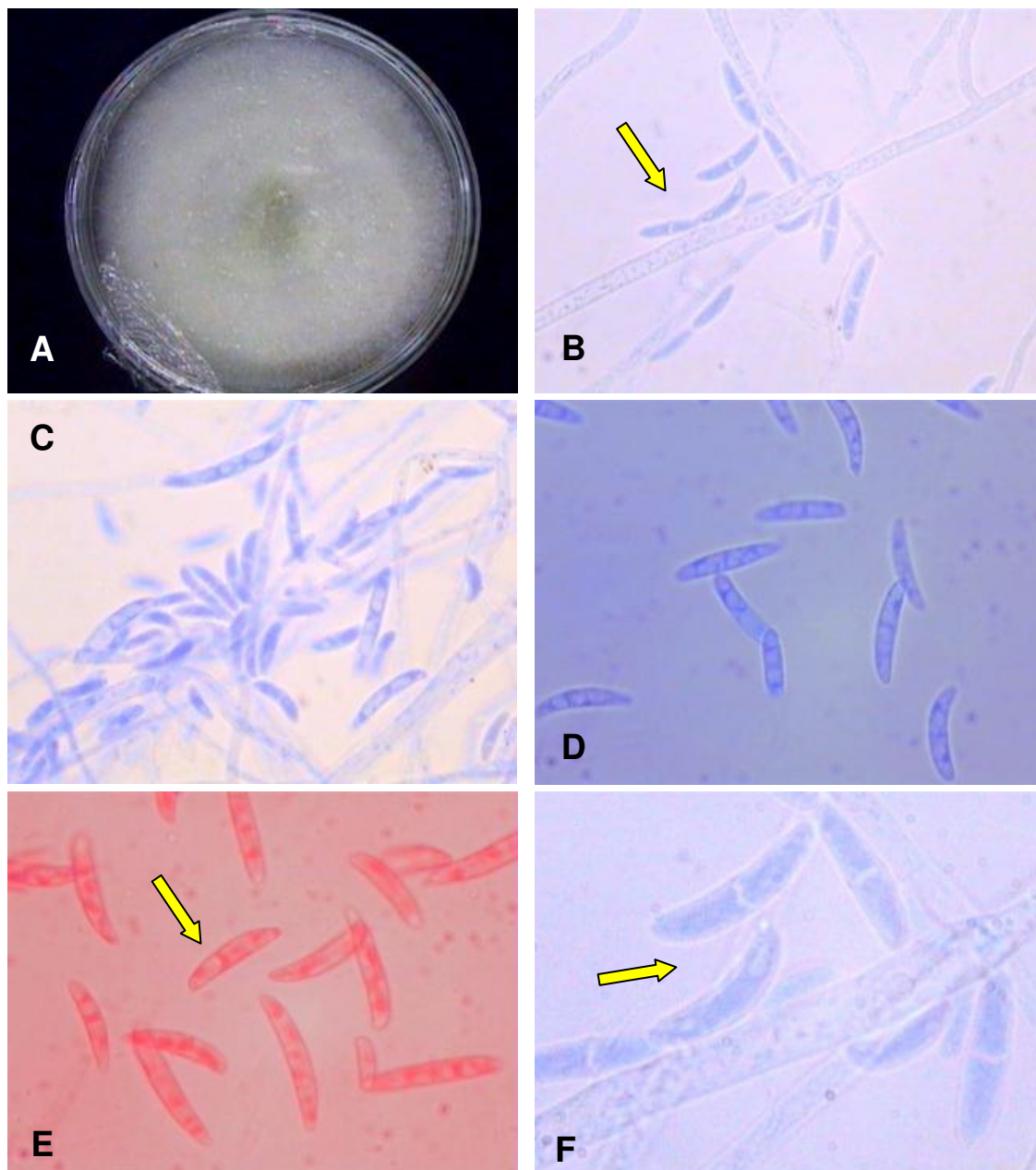


Figura 18: *Fusarium* sp. (MpR2 1.3). Aspecto macroscópico da cultura em placa de Petri com BDA, com oito dias a temperatura ambiente (A). As setas indicam os conídios fusiformes de B – F observados nas objetivas de 10x, 40x e 100x respectivamente.

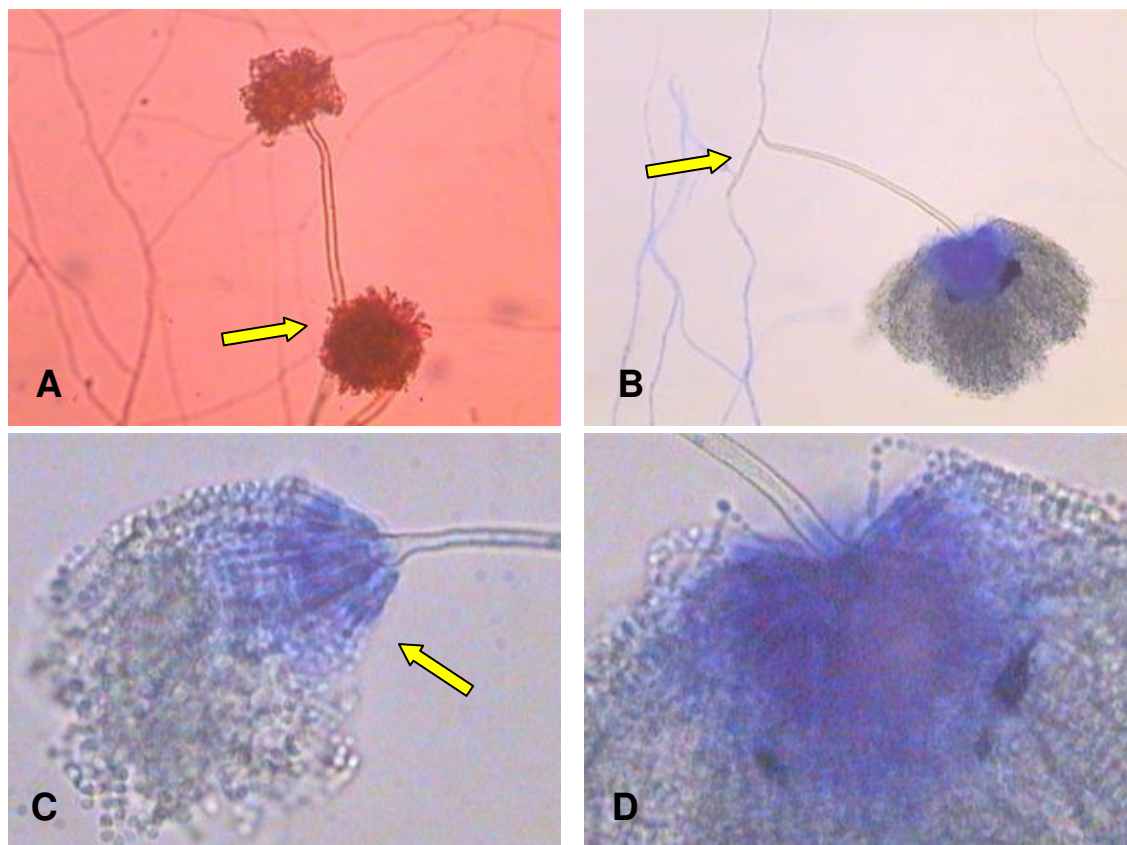


Figura 19: *Aspergillus ochraceus* (MpR2 2.1a). Em **A** conidioforos mostrando as visículas radiadas, a seta em **B** indica a célula pé, em **C** a seta indica as fiálides e em **D** destaque destas. As microfotografias com objetivas de 4x, 10x, 40x e 100x respectivamente.

Houve maior diversidade de gêneros encontrados para as quatro hospedeiras no inverno (17) que na primavera (9), conforme representado na **Tabela 4**. Contudo vale salientar que também ocorreu grande diversidade de espécies dentro dos gêneros que foram identificados pela região ITS-1. (ver **cap.2**) ou pela morfologia. Tais como: *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Colletotrichum*. Para *Fusarium* foi possível sugerir em comparação com culturas padrão as espécies *F. moniliforme* (*F. verticillium*), *F. gramineaceum*, *F. clamidosporo* e *F. nivale*, além do telemorfo *Giberella* sp. O agrupamento morfológico de *Trichoderma* sugestionou no mínimo cinco espécies: *Trichoderma harzianum*, *T. atroviride*, *T. koningii* .*T. hamatum* e *T. viride* (Pukahuta *et al.*, 2000; Samuels *et al.*, 2002) e para os isolados de *Colletotrichum*: *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e seu telemorfo *Glomerella*

(Vinnere, 2004). As análises dos fragmentos ITS-1 e sua região complementar do rDNA dos *Trichoderma* comprovaram haver mais de cinco espécies envolvidas na colonização de *M. paniculata* localizados principalmente no periderma (cascas).

4.3.3 Características dos grupos não identificados

Conforme o **item 4.3.2** cinco grupos que foram agrupados pela similaridade morfológica não foram identificados. Estes grupos foram classificados de A-E e estão descritos abaixo:

Grupo A: Presente em todas as estações na casca das raízes da hospedeira **I**, com micélio pigmentado de marrom, feltroso, septado e crescimento rápido, apresentando muitos conídios.

Grupo B: Fungo presente em todas as coletas no córtex das hospedeiras **2** (exceto no verão) e **3**, seu isolamento foi possível a partir da segunda coleta de uma placa do córtex da raiz que não desenvolveu nenhum microrganismo e após 30 dias foi removida para uma incubadora a 38 °C. Apresentou micélio hialino, coureaceo e septado, muito fino com aproximadamente 1µm de diâmetro das hifas, crescimento lento em BDA, MEA, aveia, LB, BHI e ISP2 a temperatura ambiente ou em mais altas, pleiomorfo, apresentando ascos e ascósporos por volta de 45 – 60 dias, termofílico (28 – 55 °C). Isolados desse grupo não apresentam viabilidade em temperaturas inferiores a 10 °C. Produzindo um odor fétido por volta do 2º – 8º dia, de forte ação fungicida, o que lhe valeu o pseudo-nome de **Fed**. As estruturas vegetativas e reprodutivas são semelhantes a fungos do gênero *Eutypa*. A **Figura 20** de **A–C** apresenta os aspectos macro e micromorfológicos deste isolado. Suas amostras tiveram as regiões ITS-1, 5,8s e parte da ITS-2 do rDNA seqüenciadas (ver **cap. 2**).

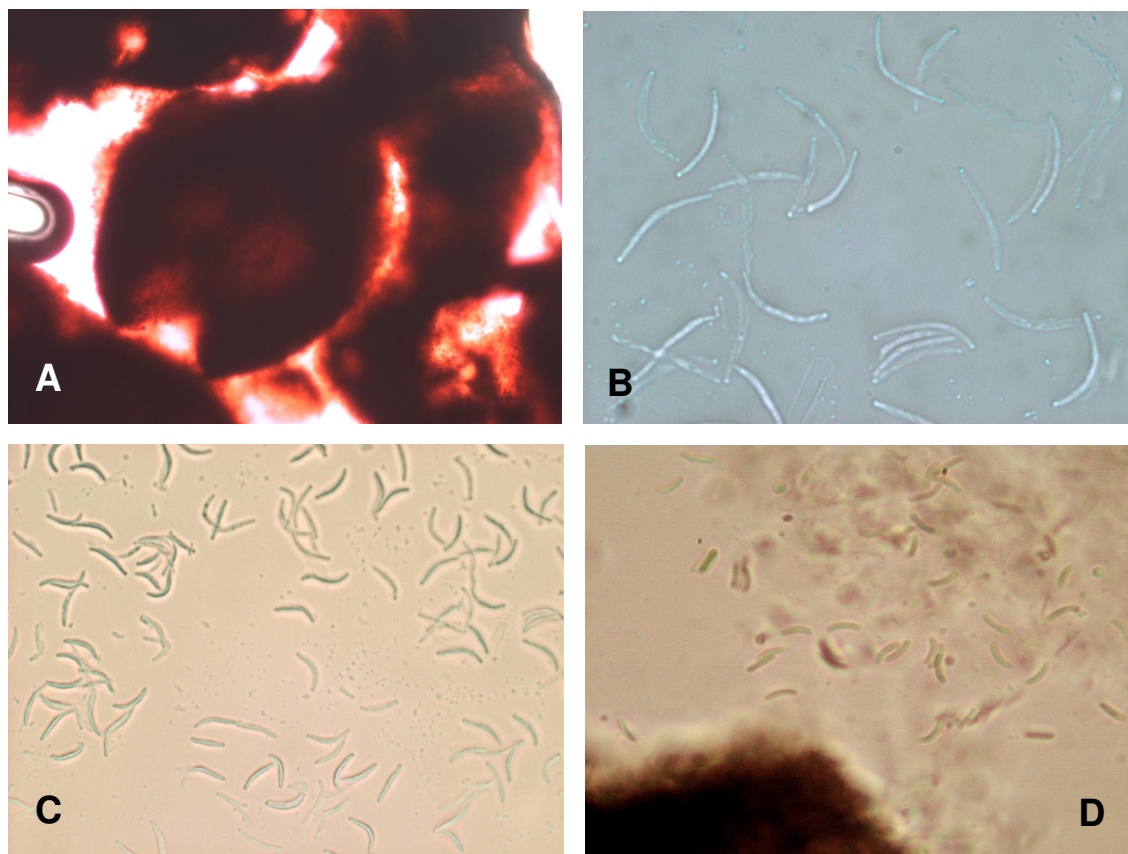


Figura 20: Fed 3 (MpR3 2.3b). Em **A** asco observado na objetiva de 40x, em **B** e **C** esporos (obj. 100x e 40x respectivamente). Em **D** microfotografia de *Eutypa lata* (adaptado Munkvold, 2001).

Grupo C: Hifas pretas e septadas, micélio cotonoso, estruturas reprodutivas ausentes e vegetativas semelhantes à *Botryosphaeria rhodina*.

Grupo D: Hifas hialinas septadas, formando um micélio branco cotonoso com estruturas concêntricas. Sem estruturas reprodutivas.

Grupo E: Morfologicamente semelhante ao grupo B, mas sem odor ou estruturas reprodutivas, isolado um único espécime da flor.

A diversidade de grupos morfológicos de fungos endofíticos isolados de *M. paniculata* foi alta, se considerado um único meio de cultivo e uma única temperatura, mas é possível que uma amostragem independente de cultivo seja mais profunda e detecte também grupos não cultiváveis. O isolamento de **Fed** após

a variação da temperatura é um indício que outros parâmetros devem ser tomados em pesquisas desta natureza.

4.3.4 Índice de Colonização e Frequência dos Endófitos

A quantidade de microrganismos endofíticos isolados e os respectivos índices de colonização estão representados na **Tabela 1** e nos **Gráficos 1 A-B**.

Tabela 1: Quantidade de fungos e bactérias endofíticas isoladas de *M. paniculata* no estado de São Paulo e seus respectivos índices de colonização.

| Hospedeiras | Fungos | | Bactérias | |
|--------------|-------------|------------------|-------------|------------------|
| | nº Isolados | Ind. Colonização | nº Isolados | Ind. Colonização |
| I | 283 | 53,3% | 194 | 36,5% |
| II | 342 | 67,9% | 282 | 55,9% |
| III | 218 | 51,0% | 82 | 19,2%* |
| IV | 218 | 75,7% | 92 | 31,9%* |
| Total | 1.061 | 66,1% | 650 | 40,5% |

*Ocorreu perda na amostragem.

Para as hospedeiras **I** e **II**, as quais foram amostradas nas quatro estações e que não tiveram perda nas amostragens das bactérias, houve uma menor infestação destas em comparação aos fungos endofíticos. A maior diferença foi observada para a hospedeira **I**, com 16,8 %, e a menor para a **II**, com 12,0%. As outras duas hospedeiras também apresentaram índices maiores de colonização para os fungos endofíticos, contudo não se pode saber com precisão qual a diferença em relação às bactérias devido à perda de parte destas. O tecido que mais influenciou nestes resultados foram às folhas, de onde praticamente não foram isoladas bactérias. Os presentes dados não puderam ser comparados com dados da literatura por serem inéditos para *M. paniculata* e por constiuírem uma abordagem

pioneira neste estudo simultaneo de bactérias e fungos isolados numa mesma época para as mesmas hospedeiras.

Gráfico 1-A: Índice de colonização dos fungos endofíticos, calculado para cada hospedeira conforme o número de fragmentos amostrados.

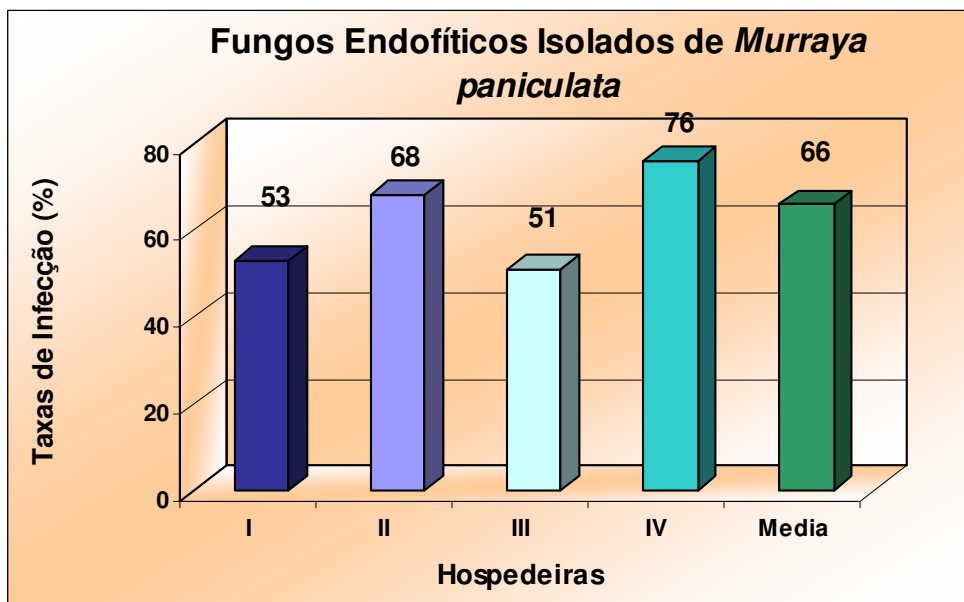
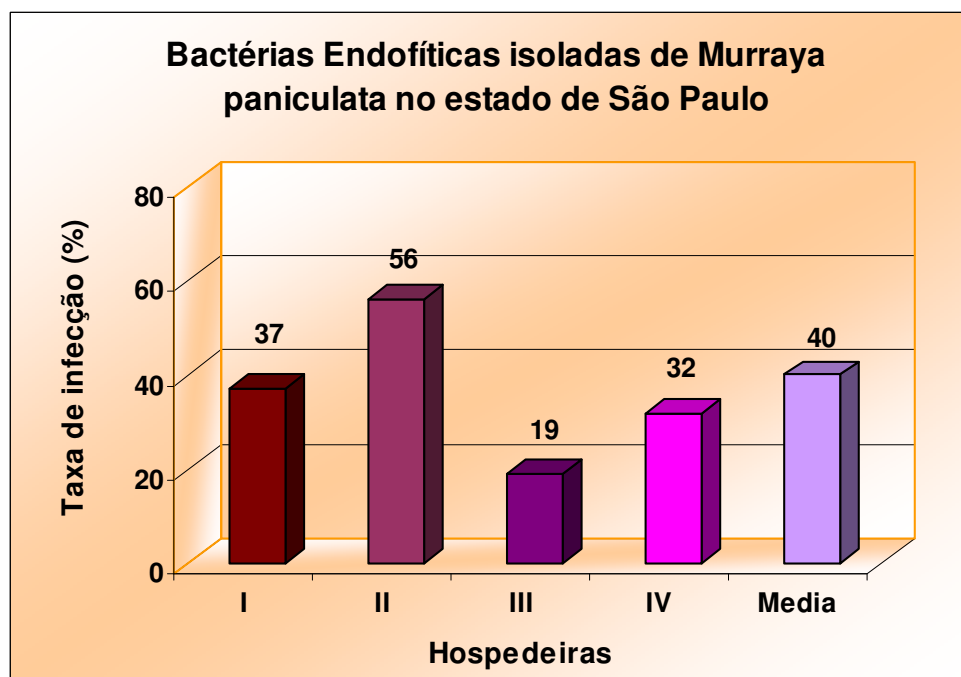


Gráfico 1-B: Índice de colonização das bactérias endofíticas, calculada para cada hospedeira conforme o número de fragmentos amostrados.



A quantidade de fungos endofíticos isolados dos diferentes tecidos de *M. paniculata* e seus respectivos índices de colonização estão plotados na **Tabela 2** e no **Gráfico 2 A-B**. De forma geral ocorreu um maior índice de colonização nos tecidos externos em relação aos tecidos internos correspondentes, onde a casca do caule, a folha, a casca do galho e da raiz foram os que apresentaram os maiores índices de colonização, consecutivamente, conforme destaques na referida tabela. O baixo índice encontrado para a flor pode ser resultado de uma baixa amostragem, devido a sua ausência durante 10 das 12 coletas, além do tecido da pétala ser muito delicado e, portanto mais suscetível ao hipoclorito que os outros tecidos da planta.

Tabela 2: Números de fungos endofíticos isolados por tecidos e suas respectivas frequências. Em destaque os tecidos que apresentaram as maiores frequência.

| Quantidades | Raiz Ex. | Raiz In. | Caule Ex. | Caule In. | Galho Ex. | Galho In. | Folha | Flor | Fruto Verd. | Fruto Mad. |
|-------------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|------|-------------|------------|
| n°. | 165 | 106 | 188 | 99 | 97 | 90 | 181 | 4 | 70 | 61 |
| % | 76,3 | 49,0 | 87,0 | 45,8 | 76,9 | 71,4 | 83,7 | 14,8 | 40,9 | 67,7 |

Gráfico 2-A: Quantidades de fungos endofíticos isolados por tecidos, sendo a casca do caule o órgão que esteve mais colonizado.

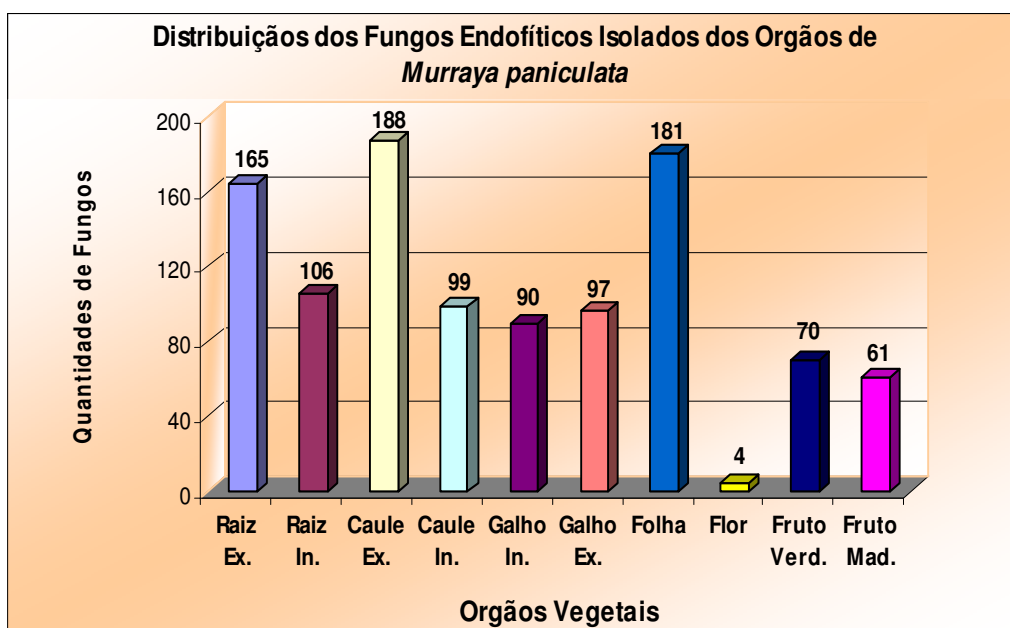
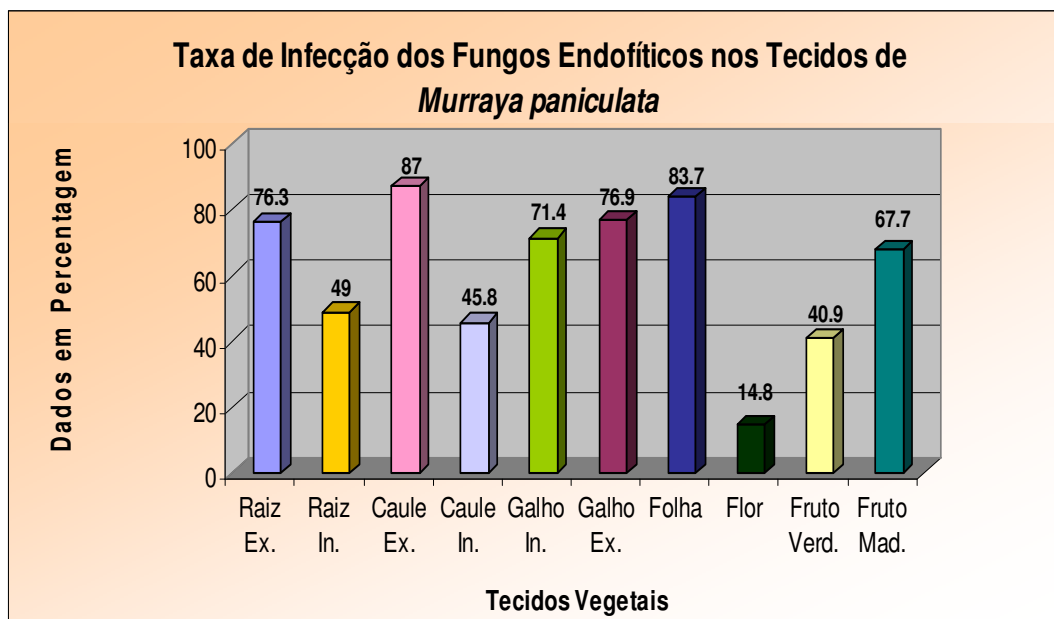


Gráfico 2-B: Percentagem de fungos endófitos isolados por tecidos, sendo a casca do caule o órgão que esteve mais colonizado.



O maior índice de colonização nos tecidos externos observado é explicado, pela exposição destes tecidos ao ambiente, sofrendo a ação do vento e da chuva que trazem conídios e esporos, ajudando na disseminação de fungos e bactérias. Conforme os resultados da identificação dos fungos (ver **tab. 4**), a maioria destes isolados das cascas da raiz, do caule e do galho são saprófitas, cosmopolitas ou comuns no ambiente. Outro fator que deve ter contribuído é a constituição dos tecidos externos que formam a casca, estes apresentam mais re-entrâncias e são impregnados de suberina, uma substância gordurosa resistente a passagens de gases, vapores d'água e de microrganismos.

A presença destes fungos cosmopolitas presentes nos tecidos externos pode ser explicada por uma transferência horizontal, onde o microrganismo presente no ambiente coloniza a planta hospedeira por um determinado tempo, contudo não persiste como observado para *Epicoccum rubro*, *Aspergillus ochraceus*, *Xylaria* sp. entre outros (ver **tab. 4**) que não foram novamente isolados nas coletas seguintes,

ou apenas localizam-se na parte externa havendo diferentes espécies para o mesmo gênero numa mesma hospedeira ou em diferentes estações, conforme observado para *Trichoderma* (ver **tab. 7**).

A inversão do tamanho das barras na frequência dos fungos isolados dos frutos maduros e verdes em relação à quantidade isolada foi devido ao número de fragmentos amostrados (ver **graf. 2-B**), pois era mais comum nas coletas encontrar frutos verdes que maduros, havendo portanto um maior número de fragmentos de frutos verdes amostrados que maduros. A presença de uma fonte de carbono em maior quantidade (frutose) nos frutos maduros deve ter propiciado o aparecimento de *Alternaria* sp., *Aspergillus niger* e *Pestalotiopsis* sp. que não foram observados em frutos verdes, esta observação sugere que estes fungos endofíticos sejam facultativos para *M. paniculata*.

A baixa quantidade de bactérias isoladas das folhas para todas as hospedeiras, é outro fato que merece atenção e que deve ser melhor investigado, pois a quase ausência destas pode ser explicada pela ação da assepsia ou pela forma de cultivo, que não conteria nutrientes mais específicos para esta comunidade desconhecida, que pode ser considerada fastigiosa.

4.3.5 Influência da Sazonalidade

Os índices de colonização dos fungos endofíticos, por tecido e por planta, foram calculados de acordo com a variação sazonal e a folha da **hospedeira IV** no outono e o fruto verde da **III** no inverno apresentaram os maiores índices (144,4 %) entre todos os tecidos, seguidos pelas cascas da raiz da **hospedeira I** e do caule da **II** (133 %) para todos no outono. Os menores índices foram encontrados para o córtex do caule no outono e no verão para a casca da raiz da **hospedeira I**,

para o córtex do caule e da raiz com 0% e 5,5% respectivamente (**tab. 3**). As diferenças entre os índices e os gêneros (**tab. 4**) sugerem que os tecidos possuem populações independentes entre si, mas é necessária a comprovação com testes estatísticos apropriados para a verificação da significância destes dados.

As freqüências dos fungos endofíticos nas quatro sazonalidades foram calculadas para as hospedeiras I – II conforme o **item 4.2.5**, estes resultados estão apresentados no **Gráfico 3**, onde destaca-se a maior freqüência relativa no outono (77,7 %) em contraste com o verão (45,7 %) com a diferença significativa de 32 %.

Tabela 3: Frequência Sazonal dos fungos endofíticos isolados dos tecidos de *Murraya paniculata* no estado de São Paulo.

| Estações Sazonais | Outono | | | | Inverno | | | | Primavera | | Verão | |
|-------------------|--------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-----------|------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Hospedeiras | I | II | III | IV | I | II | III | IV | I | II | I | II |
| Casca da raiz | 100 | 133.3 | 16.6 | 55.5 | 61.1 | 100 | 116.6 | 88.8 | 77.7 | 50 | 0 | 116.6 |
| Córtex da raiz | 50 | 94 | 83.3 | 11.1 | 16.6 | 100 | 77.7 | 44.4 | 55.5 | 22.2 | 5.5 | 27.7 |
| Casca do caule | 133.3 | 105 | 122.2 | 38.8 | 122.2 | 88.8 | 38.8 | 72.2 | 105.5 | 94.4 | 55.5 | 66.6 |
| Córtex do caule | 0 | 55 | 72.2 | 27.2 | 27.7 | 100 | 111.1 | 38.8 | 33.3 | 11 | 0 | 0 |
| Casca do galho | - | - | 94.4 | 122.2 | - | - | 88.8 | 11.1 | 50 | - | 44.4 | 127.7 |
| Córtex do galho | - | - | 22.2 | 83.3 | - | - | 83.3 | 111.1 | 55.5 | - | 72.2 | 72.2 |
| Folha | 88.9 | 111.1 | 44.4 | 144.4 | 88 | 50 | 111.1 | 111.1 | 88.8 | 83.3 | 33.3 | 50 |
| Fruto verde | 44.4 | 50 | 27.7 | 50 | 33.3 | 5.5 | 144.4 | - | - | 55.5 | 11.1 | 38.8 |
| Fruto maduro | - | - | - | - | 55.5 | - | 27.7 | 127.7 | - | 72.2 | 55.5 | - |
| Flor | 11.1 | - | - | - | - | 16.6* | - | - | - | - | - | - |
| Frequência | 61.9 | 91.4 | 60.4 | 66.6 | 57.8 | 65.8 | 88.8 | 75.6 | 66.6 | 55.5 | 30.86 | 62.5 |

Valor em porcentagem. * Actinomicetos.

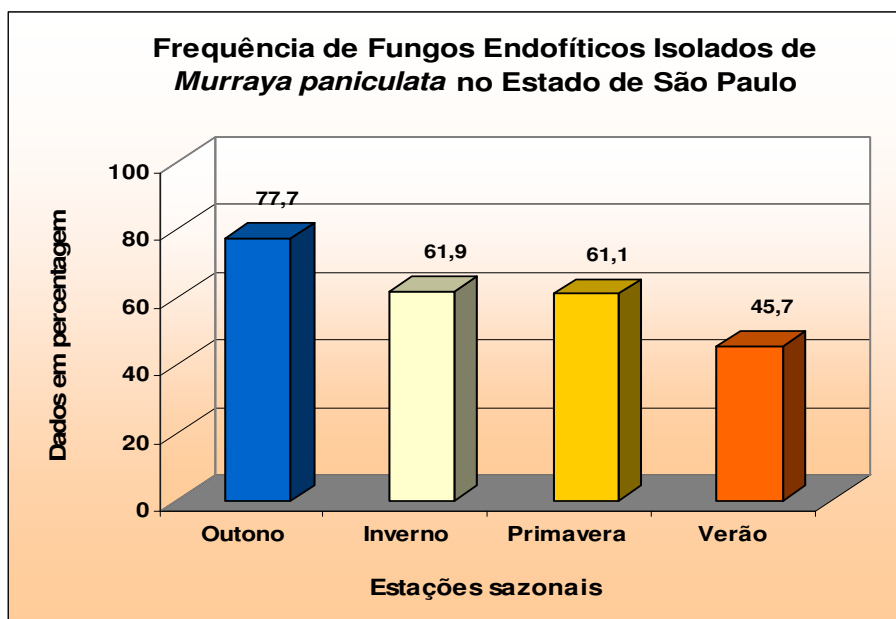
+ Em azul os maiores valores de frequência e em rosa os menores.

Tabela 4: Fungos endofíticos isolados dos diferentes tecidos de *Murrraya paniculata*, de acordo com as estações sazonais.

| Gênero | Tecidos Vegetais | | | | | | | | | |
|-----------------------------|------------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|---------|-------------|--------------|------|
| | Casca da raiz | Córtex da Raiz | Casca do caule | Córtex do caule | Casca do galho | Córtex do galho | Folha | Fruto Verde | Fruto Maduro | Flor |
| <i>Fusarium</i> | ◆ ○ ■ ▲ | ◆ ○ ■ ▲ | ◆ ○ ■ | ◆ ○ | ○ | ◆ ○ ▲ | | ◆ ○ ▲ | ◆ ○ | |
| <i>Trichoderma</i> | ◆ ○ ■ ▲ | ◆ ○ ▲ | ◆ ○ ▲ | ▲ | | ○ ▲ | | | | |
| <i>Penicillium</i> | ◆ ○ ■ ▲ | ◆ ○ ■ | ■ | ◆ ■ | ▲ | | | ○ ▲ | | |
| <i>A. niger e Ochraceus</i> | ◆ | | | | | ◆ | | | ○ | |
| <i>Epicoco rubro</i> | ◆ | | | | | | | | | |
| <i>Colletotrichum</i> | | | ○ | | ■ | ■ | ◆ ○ ■ ▲ | ◆ ○ ■ ▲ | ◆ ○ ■ | |
| <i>Glomerella</i> | | | ◆ | | ■ | ■ | ◆ ○ ■ | ○ ■ | ○ | |
| <i>Phomopsis</i> | ○ | | ◆ ○ ■ ▲ | ○ ■ | ○ ▲ | ▲ | | | | |
| <i>Giberella</i> | ○ | | | | | | | | | |
| <i>Phaecilomyces</i> | | ▲ | ◆ ○ ■ | ○ | ○ ▲ | | | ○ ▲ | | |
| <i>Pestalotiopsis</i> | | | ◆ | | ▲ | | | | ○ | |
| <i>Alternaria</i> | | | | | | | | | ○ | |
| <i>Xylaria</i> | | | ○ | | ▲ | | | | | |
| <i>Guignardia</i> | | | | | | | ○ | | | |
| <i>Nigrospora</i> | ◆ | | | | | | | | | |
| Indeterminado A | ◆ ○ ▲ ■ | | | | | | | | | |
| Ind. B | | ◆ ○ ■ | | ○ ■ | | ○ ▲ | | | | |
| Ind. C | | | ○ | ◆ | ○ | ▲ | | | | |
| Ind. D | ○ ■ ▲ | ■ | ▲ | | | ○ | | | | |
| Ind. E | | | | | | | | | | ◆ |
| Total de gêneros | 10 | 6 | 11 | 7 | 9 | 8 | 3 | 5 | 6 | 1 |

Legendas: ◆ Outono, ○ Inverno, ▲ Primavera e ■ Verão

Gráfico 3: Índice de colonização dos fungos endofíticos de *Murrraya paniculata*, nas estações sazonais.



Os resultados da influência da sazonalidade sobre os grupos de fungos endofíticos são ainda escassos não havendo portanto como comparar os dados obtidos com uma literatura mais específica. Contudo os exemplos mais conhecidos sobre a influência sazonal na freqüência dos endófitos são: **1.** Os grupos de *Epichloe/Neotyphodium* – onde foi verificado um relacionamento entre a abundância destes nos tecidos das gramas com o aumento dos níveis da produção do alcalóide na época de dispersão da semente (Gessner, 1977; Schardl *et al.*, 2004); **2.** Fungos micorrizos – são mais conhecidos do que os endofíticos devido sua importância para o crescimento da planta, armazenando nutrientes e água (Lingfei *et al.*, 2005; Lutgen *et al.*, 2003 & Sigüenza *et al.*, 1996) e **3.** Rhizobacterias – especialmente importantes na fixação de nitrogênio (Estrada-De-Los-Santos *et al.*, 2001; Mengoni *et al.*, 2003 & Smalla *et al.*, 2001). Embora Collado *et al.* (1999), sugeriram que os efeitos geográficos sejam mais determinantes do que a sazonalidade nas comunidades dos fungos endofíticos do caule e nas folhas de *Quercus ilex*.

Os trabalhos citados no parágrafo anterior sugerem que as variações sazonais podem causar um impacto grande nas populações endófitas. Foi observado nesta pesquisa que são maiores as frequências no outono e a diversidade no inverno (17 gêneros) e depois caem bruscamente para nove gêneros na primavera, sobe para 10 no verão e 14 no outono, o que está de acordo com o observado por eles. Em alguns trabalhos (Collado *et al.*, 1999; Lingfei *et al.*, 2005 & Mengoni *et al.*, 2003) notaram, que hospedeiras de uma mesma espécie podem conter resultados diferentes na taxa da frequência e no índice de colonização, entretanto com grupos dominantes idênticos o mesmo foi encontrado para *M. paniculata*.

O decréscimo da diversidade de fungos endofíticos nas hospedeiras I e II no verão concorda com os resultados encontrados para micorrizas (Lingfei *et al.*, 2005), assim como para a planta farmacêutica *Heterosmilax japonica* Kunth, cuja população de fungos endofíticos foi estabelecida por experimentos independente de cultivo e a maior diversidade foi encontrada na primavera do que no verão (Gao *et al.*, 2005). Ocorre nesta época do ano no estado de São Paulo uma baixa na umidade relativa do ar que pode ter contribuído para esse resultado.

De forma geral, verificou-se uma diminuição na frequência de todos os tecidos da hospedeira I no verão. Nas folhas desta hospedeira as frequências não mudaram significativamente (aproximadamente 88%), mas houve uma diminuição drástica no verão (33%) ocorrendo o mesmo com a raiz e com o córtex do caule. Para a hospedeira II, observou-se uma oscilação na frequência entre 111% e 50%, com aumento nas cascas da raiz e do galho, permanecendo assim quase inalterada a frequência dos fungos endofíticos nesta hospedeira.

4.3.6 Influência da Sazonalidade e Especificidade por Hospedeira e por Micro-habitat dos Fungos Endofíticos

Após o isolamento sazonal e a identificação dos fungos endofíticos a especificidade por hospedeira e por tecido da planta foi avaliada. *Fusarium*, *Trichoderma*, *Colletotrichum* e *Phomopsis* foram isolados de todas as hospedeiras e os dois primeiros foram principalmente obtidos dos tecidos externos, cascas das raízes, dos troncos e dos galhos. O gênero *Fusarium* apresentou colonização sistêmica em todas as hospedeiras e foi isolado do fruto e da semente. Trata-se de um microrganismo cosmopolita e o seu isolamento está de acordo com a literatura corrente. A presença de *Fusarium* está usualmente associada à produção de micotoxinas responsáveis pela contaminação de diversos alimentos. Nesta pesquisa este foi o único microrganismo detectado que pode ter transmissão horizontal para *M. paniculata*. O gênero *Colletotrichum* e seu telemorfo *Glomerella* apresentaram maior especificidade pelas folhas e pelo pericarpo do fruto. A maioria destes isolados foram a partir das folhas, exceto para dois isolados de *Guignardia*. A presença marcante de *Colletotrichum* em plantas de clima tropical tem sido relatada em diversos trabalhos de isolamento de endófitos de folhas como o tomate, café e citrus (Larran *et al.*, 2001; Santamaria & Bayman, 2004), contudo o fator determinante parece ter sido, neste caso, o estado fisiológico das folhas, pois as únicas amostras que fugiram a regra foram as que levaram ao isolamento das duas *Guignardias*, quando na ocasião a coleta foi realizada por outra pessoa. Foi nesta coleta que também apareceu *Xylaria* sp.

5 – CAPÍTULO 2

* Variabilidade genética das regiões ITSs de *Pestalotiopsis* spp., de *Trichoderma* spp. e de um grupo de fungo endofítico não identificado de *Murraya paniculata* L. (Jack).

5 - Introdução do Capítulo 2

5.1 Advento e Importância da Biologia Molecular

Com o advento da biologia molecular após a descrição na primeira metade do século passado de que a molécula de DNA é a responsável pelas informações hereditárias, ocorreu o desenvolvimento de novas tecnologias de análise da variabilidade do DNA que permitem identificar pontos de referência, chamados tecnicamente de **Marcadores moleculares**. Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular de um gene expresso ou em um de seus segmentos expressos ou não (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Outros marcos importantes na biologia molecular foram às descobertas das **Enzimas de restrição** (Grodzicker *et al.*, 1974), a **síntese química de fragmentos genicos**, o desenvolvimento da **PCR** – reação de polimerase em cadeia, que permite a amplificação de fragmentos gênicos (Mullis & Faloona, 1987; Saiki, 1988) e o **sequenciamento**.

O desenvolvimento neste campo é rápido e fascinante e novas técnicas constantemente alavancam as pesquisas. Em pouco tempo foi possível se descrever, com precisão, inúmeros genomas de diferentes grupos de seres vivos que servem com padrões para estudos aplicados na saúde, na agricultura ou outras áreas afins. Podemos citar entre os genomas descritos de eucarióticos: mamíferos – *Homo sapiens*, *Canis familiaris* e *Macaca mulatta* entre outros; fungos – *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Candida glabrata* também entre outros; protozoários – *Cyanidioschyzon merolae*, *Plasmodium falciparum* e *Entamoeba histolytica*; plantas – *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum* e *Oryza sativa* já completos, existindo vários outros genomas seqüenciados

completos, parcialmente ou em andamento que enriquecem as informações sobre a constituição gênica e a sua expressão.

Através destes inúmeros seqüenciamentos foi possível desenvolver vários marcadores moleculares com as mais diferentes finalidades, desde o isolamento e clonagem de genes até marcadores taxonômicos. Em eucariotos a região que codifica os genes para a transcrição do RNA ribossômico (rRNA) é utilizada com freqüência como marcador taxonômico devido a presença do ribossomo em todos os seres vivos, exceção os vírus. Estudos comparativos das seqüências nucleotídicas do DNA ribossômico (rDNA) garante altos níveis de similaridade taxonômica, devido as lentas mudanças na sub-unidade menor do rDNA (16s para procariotos – 18s para eucariotos) ao contrário do que ocorre com o DNA mitocondrial que sofre mudanças nos seus nucleotídeos mais rápidas (White *et al.*, 1990).

5.1.1 Ribossomos e as Regiões ITS (internal transcribed spacer regions)

Os ribossomos são pequenas organelas celulares responsáveis pela tradução do RNA mensageiro (mRNA), identificados por Paul Zamecnik em 1955. Formados de duas subunidades e de uma complexidade de proteínas, tanto em procariotos como em eucariotos. Durante a síntese proteica os ribossomos se ligam ao mRNA, de modo que os códons deste possam ser relacionados, com alta fidelidade, aos anticódons dos RNAs transportadores (tRNA – Voet *et al.*, 2000). Essa alta fidelidade necessária faz com que o cluster do rDNA seja altamente conservado em procariotos e eucariotos.

Nos eucariotos o rDNA é contituído de várias cópias distribuídas no genoma, sendo formado de três genes que codificam, a subunidade menor (18s), um

pequeno fragmento (5,8s) e a subunidade maior (26s), existindo entre eles espaço transcritos (ITS - internal transcribed spacer regions). A baixa variabilidade encontrada nestas regiões é que permite o uso delas em estudo relacionados à taxonomia de grupos, por esse motivo a região ITS-1 foi o alvo para a identificação dos grupos de fungos selecionados, sendo depois incluída a a região ITS-2 para algumas amostras.

5.2 - Materiais e Métodos do Capítulo 2

5.2.1 Condições de cultivo

Uma amostragem de 59 fungos endofíticos e seis outros (out groups) foram cultivados em triplicata, em erlenmayer de 250 mL contendo 125 mL de BD, acrescidos de 0,2 % de extrato de levedura os fungos foram colocados em agitador orbital, marca Tecnal, submetidos a rotação de 120 rpm e a temperatura ambiente. Para cada amostra foram utilizado cinco fragmentos de ágar coberto de micélio, com aproximadamente 5mm X 5mm. O tempo ideal de cultivo para cada grupo foi estabelecido conforme seu crescimento.

Decorrido o tempo ideal de crescimento, o meio de cultura foi filtrado em duas etapas: A primeira filtração a vácuo com papel Whatman, nº 4 onde se obteve massa micelial suficiente para a extração do DNA e a segunda filtração, procedeu-se com o intuito de conservar o meio metabólico, foi também a vácuo com membrana millipore (0,22µm) e o meio metabólico (meio de cultura fermentado) armazenado a 4°C. Este procedimento objetivou os ensaios biológicos dos metabólitos fixos extracelular.

5.2.2 Seleção dos Grupos de Fungos Endofíticos para Identificação Molecular

A seleção dos isolados a serem identificados pela região ITS-1 foram diferentes entre si e seguiu dois critérios: contribuir com as pesquisas químicas de microrganismos do grupo de Produtos Naturais (PN) da UFSCar e a frequência dos isolados. Para *Pestalotiopsis* o grupo do PN possuía estudos químicos (Magnani *et al.*, 2003) e estava continuando com novos isolados deste grupo, inclusive com dois de *M. paniculata*, a fim de determinar o perfil das substâncias produzidas e continuar os estudos de prospecção química com o isolado **B5-3**. Contudo houve uma diferença grande nos perfis químicos que se fez necessária às identificações moleculares para verificar se tratavam de uma mesma espécie. Durante a padronização dos experimentos de perfil químico a linhagem de *Trichoderma* – **F80**, trazida de Manaus, foi também avaliada. O resultado foi promissor e esta linhagem foi cultivada e seus metabólitos extraídos (ver **item 6.4.1**) por esse motivo os perfis químicos dos *Trichoderma* isolados *M. paniculata* e dois outros controles (**F80** e **PeEs1**) foram avaliados, ocorreu com este grupo o mesmo que havia acontecido com as linhagens de *Pestalotiopsis*. O grupo de **Fed**, totalmente desconhecido, necessitava da identificação molecular devido sua importância e o estudo químico deste em andamento. Os *Penicillium*, *Aspegillus niger* e *Xylaria* foram escolhidos por estarem sendo avaliados quanto à produção de metabólitos bioativos.

5.2.3 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada pela metodologia do CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) descrita por Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987), conforme o seguinte protocolo:

Em cadinhos, os micélios foram triturados separadamente em nitrogênio líquido, 150 mg aproximadamente de cada amostra, depois foram colocados em tubos de eppendorf de 2000 μ L. Seguiu-se da adição de 1000 μ L do tampão de extração (CTAB 2%) e a homogeneização seguiu-se à 4°C. Os tubos foram incubados no banho-maria a 65°C por 30 minutos. Após esta fase, os tubos foram removidos do banho-maria, deixados esfriar no gelo e foram adicionados 200 μ L de clorofol com suave agitação, seguidos de centrifugação a 12.000 rpm por 2 minutos. Depois a fase aquosa foi removida e transferida para outro tubo limpo e adicionado 500 μ L de clorofol e agitados suavemente, seguidos de centrifugação a 12.000 rpm por 3 minutos. A fase aquosa foi novamente transferida para um outro tubo limpo, adicionou-se 600 μ L de isopropanol à -20 °C, misturado bem suave e gentilmente, deixando-os para precipitação no congelador até o dia seguinte. Os tubos com os precipitados foram postos para centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos e os sobrenadantes descartados. Adicionou-se ao sedimento 1000 μ L de isopropanol (70%) à -20 °C, deixou-se agir durante 10 minutos e depois centrifugou-se a 12.000 rpm por 3 minutos. Repetido o procedimento mais uma vez, adicionou-se 1000 μ L de etanol (95%) à -20 °C durante 2 minutos e depois centrifugou-se a 12.000 rpm por 3 minutos. Após essa etapa se descartou os sobrenadantes e os sedimentos foram secos pela inversão dos tubos sobre um papel autoclavado por mais ou menos 30 minutos. Os sedimentos foram dissolvidos em 50 μ L de tampão TE cada e guardados a 4 °C para posterior quantificação. Toda este protocolo foi realizado em triplicata e no final havia 150 μ L de DNA de cada amostra.

5.2.3.1 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi realizada por duas metodologias: **1** – quantificação por espectrofotometria (para as linhagens de *Pestalotiopsis* e seus controles) e **2** – quantificação por comparação com marcador de peso molecular de 1Kb para todas as amostras.

1 – Quantificação por espectrofotometria – Procedeu-se a leitura em espectrofotômetro de luz ultravioleta visível, marca Cary 100 Varian, em 280 nm e 260 nm. Os valores encontrados foram usados para determinação da pureza e para quantificação dos DNAs. A amostra do DNA de *Pestalotiopsis* (**B5-3**) foi diluída para 50 ng/ μ L e foi usada como controle positivo das extrações e PCR das regiões ITS-1 para *Pestalotiopsis*.

2 – Quantificação por comparação – A partir da suspensão do DNA extraído foi utilizado 2,0 uL juntamente com 4,0uL de água mais 2,0uL do tampão de amostra 5x (com bromofenol) aplicado em gel de agarose a 0,8% contendo brometo de etidium. Após a corrida de 60 min a leitura da intensidade das bandas do DNA foi realizada num transiluminador luz branca/UV da BioAgency e comparada com a intensidade e o tamanho do marcador de 1 Kb da Fermentas. Este marcador permite além da leitura das bandas correspondentes a concentração estimada do DNA aplicado.

5.2.3.2 Reação de Polimerase em Cadeia da Região ITS – 1 do rDNA

A partir dos primers descritos por White *et al* (1990) para a região ITS – 1 (internal transcribed spacer) do rDNA as reações foram realizadas (ver **tab. 5**).

Tabela 5: Componentes da PCR e suas respectivas concentrações e quantidades.

| Reagentes | Concentração | Quantidades |
|--|--------------|----------------|
| Água milli-q | - | 10,2 µL |
| Tp | 10x | 2,5 µL |
| MgCl ₂ | (25mM) | 3,0 µL |
| dNTP | (1,25mM) | 3,0 µL |
| Primer ITS 1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) | (10pMol); | 2,0 µL |
| Primer ITS 2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) | (10pMol); | 2,0 µL |
| Taq-polimerase | (5,0U) | 0,3 µL |
| DNA | - | 2,0 µL |
| Volume final | - | 25,0 µL |

As reações de amplificação foram nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguido de 40 ciclos de 2 min de desnaturação a 94 °C, 2 min de anelamento a 55°C e 2 min de alongação a 72 °C e concluindo com 10 min a 72 °C. O produto da PCR foi conferido por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etidium, comparado com o DNA ladder de 100 pb e estimado em 50ng/µL.

5.2.3.3 Sequenciamento

Todas as amostras foram seqüenciadas com os primers das regiões ITS – 1 e seu complementar separadamente, exceto para **Fed** que teve a região ITS – 2. Os produtos das PCRs da regiões ITSS foram diluídos em água destilada autoclavada na proporção de 1/10 e utilizou-se 2,0 µL para o sequenciamento (ver **tab. 6**).

Tabela 6: Componentes da PCR de sequenciamento e suas respectivas concentrações e quantidades.

| Componentes | Quantidades / amostra |
|-------------------------|-------------------------------|
| ETdye | 2,0 μ L |
| Save money | 2,0 μ L |
| Primer (ITS-1 ou ITS-2) | 1,0 μ L (10pmol/ μ L) |
| Água destilada | 3,0 μ L |
| Produto da PCR | 2,0 μ L |
| Volume final | 10,0μL |

O programa de termociclagem consistiu em desnaturação inicial 96 °C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 20 seg de desnaturação a 95 °C, 15 seg de anelamento a 50 °C e 1 min de alongação a 60 °C, concluindo a 4 °C por 24hs. O produto desta PCR foi precipitado e ressuspendido em 3,0 μ L de tampão (loading) e aplicado em gel de acrilamida para leitura das bases no aparelho sequenciador de DNA Abi Prism 377.

5.2.3.4 Alinhamento e Análise das Seqüências

Após a decodificação das seqüências nucleotídicas, seus cromatogramas foram conferidos visualmente, seguidas de previa conferência no *blast* de nucleotídeos do NCBI (National Center for Biotechnology Information), para conferência se os gêneros identificados morfológicamente eram os mesmos identificados pelas regiões ITS 1 e sua complementar. Depois as seqüências complementares foram alinhadas no '*blast special - Align two sequences (bl2seq)*' do NCBI e as bases não lidas foram editadas manualmente com base na fita complementar. As amostras que dispunham de mais de duas seqüências foram alinhadas no programa *alignment* do MultAlin (Multiple sequence alignment by Florence Corpet) que trabalha com o software "Multiple sequence alignment with

hierarchical clustering" de Corpet (1988). O consenso destes foi novamente conferido no *blast* de nucleotídeos do NCBI e as fichas de depósitos das seqüências nucleotídicas semelhantes às que estavam sendo comparadas foram avaliadas com base na origem das amostras foi realizada a escolha da melhor indicação do epíteto específico. Obteve-se assim o resultado final da identificação molecular.

5.2.3.5 Análise Molecular dos Grupos de Fungos Endofíticos

As seqüências de *Pestalotiopsis* foram analisadas no programa *ClustalW 1.83* do GeneBee - Molecular Biology Server, do Instituto de bioengenharia e bioinformática da Universidade do Estado de Moscow. Este programa permite consultas *on line* e a validação estatísticas dos dados com o teste de confiança *bootstrap* (Russo *et al.*, 2001), que foi realizado com 1000 repetições. As análises das árvores filogenéticas apresentam quatro como as mais prováveis, todas parsimoniosas e a escolha dentre elas da mais apropriada foi com base na origem das amostras.

5.3 - Resultados e Discussão

5.3.1 Cultivo e Extração do DNA genômico

Da amostragem de 59 fungos e seus seis controles cultivados em BD para o seqüenciamento da região ITS-1, 41 fungos e seus controles foram extraídos de maneira satisfatória. O tempo de cultivo variou conforme a fisiologia de crescimento das amostras, sendo este fator predominante na qualidade e na quantidade de DNA genômico extraído. Neste contexto, os fungos dos grupos Trichocomaceae e Hypocreales mitosporicos, *Aspergillus* e *Penicillium* do primeiro e *Trichoderma* do segundo grupo foram os que cresceram mais rápido e tiveram seus DNAs extraídos antes da esporulação e da pigmentação do meio. Quando o tempo de extração era excedido e as culturas começavam a pigmentar e esporular a qualidade do DNA era comprometida havendo a degradação ou o comprometimento por impurezas que tornavam inviáveis as PCRs da região ITS-1. O rendimento das extrações variou de 10 ng – 50 ng/ μ L e tempo apropriado em 24 hs – 72 hs para as amostras que foram efetivas nestes grupos.

As amostras do grupo Xylariales (*Pestalotiopsis*, *Xylaria* e Fed) apresentaram o crescimento mais lento e foram extraídos em 8-30 dias. Ocorreu nestas amostras o mesmo problema dos fungos de crescimento rápido quando o tempo era excedido, contudo para as amostras de Fed que tiveram o período mais longo de crescimento em muitas amostras não se obteve os 150 mg de massa micelial esperada. A **Figura 21 A -B** exemplifica a extração de DNA.

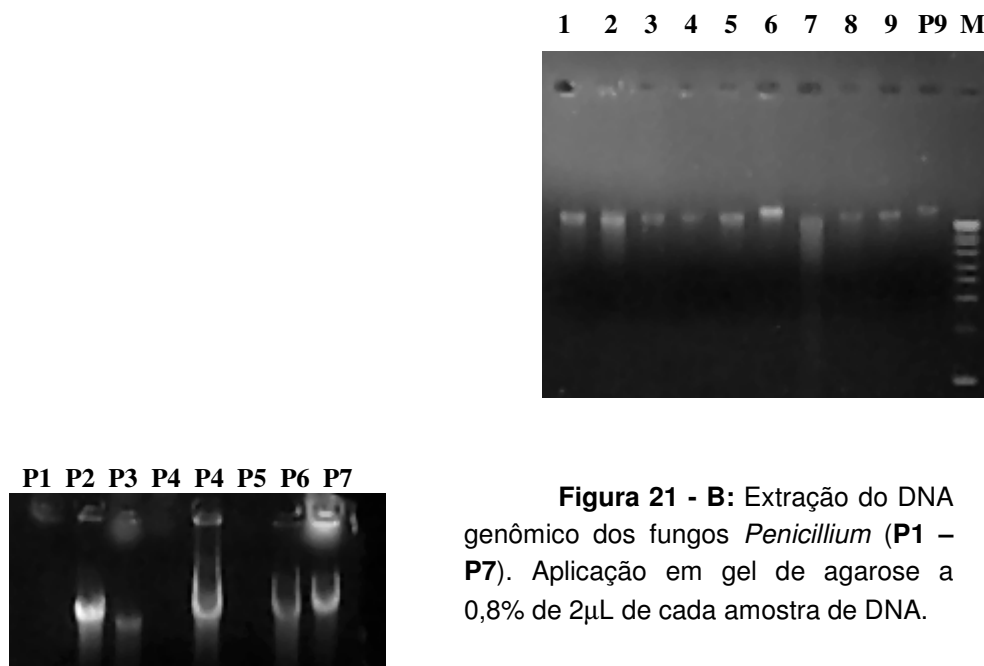


Figura 21 - B: Extração do DNA genômico dos fungos *Penicillium* (P1 – P7). Aplicação em gel de agarose a 0,8% de 2 μ L de cada amostra de DNA.

Figura 21: DNA genômico de fungos endofíticos de *Murraya paniculata*.

5.3.2 Amplificação e Identificação da região ITS-1

As bases nucleotídicas seqüenciadas foram comparadas com os grupos identificados pelas características fisiomorfológicas. O **Anexo 2** relaciona os gêneros identificados pela morfologia, seus tempos de cultivo e o rendimento da extração.

As amplificações dos fragmentos gênicos ITS-1 foram otimizadas a partir do DNA genômico extraído e o produto da amplificação foi conferido em gel de agarose a 1,2% e a quantidade do DNA estimada em 30 – 50 ng/ μ L (**fig. 22**). Os produtos diluídos foram usados para a amplificação de sequenciamento. Algumas amostras ficaram marrons ou com coloração escura como o DNA de *Aspergillus*

niger, indicando a presença de contaminantes polifenóis que inibiram a PCR destes grupos (ver **fig. 22**, amostra 3).

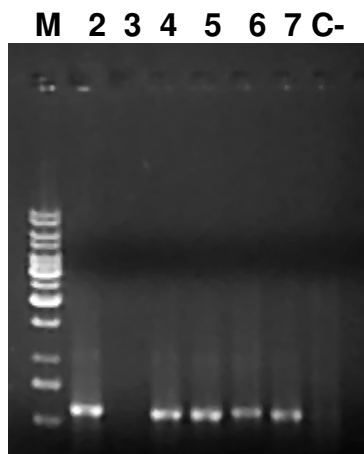


Figura 22: Amplificações das regiões ITS-1. **M** = Marcador de 100pb, **2** = controle *Penicillium* sp. (LRMa), **3** = P7, **4** = P1, **5** = P2, **6** = *Trichoderma* sp. (F80), **7** = *Xylaria* sp. (Xy) e em **C-** = controle negativo da reação.

A concentração inicial dos primers na amplificação era 20 μ M por reação. Foi observada uma variação de 25 μ M – 100 pMol na literatura consultada (Oh SookYung *et al*, 2003; Buzina *et al*, 2001 & White *et al*, 1990), mas a otimização dos primers demonstrou que 20 pMol era o suficiente.

Com o auxílio da ferramenta de blast as seqüências obtidas foram conferidas e alinhadas (ver **item 5.2.3.4**) ao serem confrontadas com as depositadas no banco genômico do NCBI confirmaram os gêneros observados pela morfologia e indicaram as espécies com o maior grau de confiabilidade esperada (0,0), exceto para o grupo de **Fed**. Conforme pode ser observado na **Tabela 7** a seguir:

Tabela 7: Fungos endofíticos de *Murraya paniculata* e suas identificações moleculares.

| N. das Amostras | Código do Isolado e identificação morfológica | Identificação e percentagem de identidade. |
|-----------------|---|---|
| 1. (Tric-1) | MpCe3 3.1 <i>Trichoderma</i> sp. | <i>Trichoderma harzianum</i> – 98%. |
| 2. (Tric-2) | MpCe10 3.2 <i>Trichoderma</i> sp. | <i>T. koningii</i> – 99%. |
| 3. (Tric-4) | MpR2 3.1 <i>Trichoderma</i> sp. | <i>T. ovaslisporum</i> – 98%. |
| 4. (Tric-5) | MpRe6 1.1 <i>Trichoderma</i> sp. | <i>T. erinaceum</i> – 95%. |
| 5. (Tric-12) | MpRe18 3.2 <i>Trichoderma</i> sp. | <i>T. taiwanense</i> – 98%. |
| 6. (Tric-13) | MpRe17 1.3 <i>Trichoderma</i> sp. | <i>T. hamatum</i> – 99%. |
| 7. (Tric-14) | MpRe11 2.3 <i>Trichoderma</i> sp. | <i>T. viride</i> – 98%. |
| 8. (Tric-15) | MpRe18 1.2 <i>Trichoderma</i> sp. | <i>T. viride</i> – 98%. |
| 9. (Tric-17) | MpRe12 2.3 <i>Trichoderma</i> sp. | <i>T. koningii</i> – 98%. |
| 10. (Tric-18) | MpRe11 1.3 <i>Trichoderma</i> sp. | <i>Trichoderma</i> sp. – 95%. |
| 11. (Tric-19) | MpGe16 1.3b <i>Trichoderma</i> sp. | <i>T. ovaslisporum</i> – 99%. |
| 12. (Tric-20) | MpG21 1.1 <i>Trichoderma</i> sp. | <i>Trichoderma</i> sp. – 95%. |
| 13. (Tric-21) | MpRe11 3.3 <i>Trichoderma</i> sp. | <i>T. koningiopsis</i> – 98%. |
| 14. (Tric-22) | MpCe2 2.2a <i>Trichoderma</i> sp. | <i>T. koningiopsis</i> – 98%. |
| 15. (Tric-23) | PeEs 1 <i>Trichoderma</i> sp. | <i>T. koningiopsis</i> – 98% (controle). |
| 16. (Tric-24) | F80. <i>Trichoderma</i> sp. | <i>T. koningii</i> – 99% (controle). |
| 17. (P-1) | MpR2 2.3 <i>Penicillium</i> sp. | <i>Penicillium veridicatum</i> – 98%. |
| 18. (P-2) | MpR18 2.3 <i>Penicillium</i> sp. | <i>P. citrinum</i> – 99%. |
| 19. (P-4) | MpR1 3.2a <i>Penicillium</i> sp. | <i>P. citrinum</i> – 99%. |
| * (Asp-1) | MpFrM14 1.3b <i>Aspergillus niger</i> . | Não identificado. |
| 20. (Pest-1) | MpCe1 1.3c <i>Pestalotiopsis</i> sp. | <i>Pestalotiopsis neglecta</i> – 98%. |
| 21. (Pest-2) | MpFrm14 2.2 <i>Pestalotiopsis</i> sp. | <i>P. neglecta</i> – 96%. |
| 22. (Pest-3) | GaC1 3.2a <i>Pestalotiopsis</i> sp. | <i>P. photinae</i> – 95%. |
| 23. (Pest-4) | GaC2 1.1 <i>Pestalotiopsis</i> sp. | <i>P. photinae</i> – 97%. |
| 24. (Pest-5) | GaFr1 1.2b <i>Pestalotiopsis</i> sp. | <i>P. aeruginea</i> – 98%. |
| 25. (Pest-6) | GaC2 3.1 <i>Pestalotiopsis</i> sp. | <i>P. virgulata</i> – 99%. |
| 26. (Pest-7) | GaFr1 2.3 <i>Pestalotiopsis</i> sp. | <i>P. virgulata</i> – 99%. |
| 27. (Pest-8) | GaFr3 2.3 <i>Pestalotiopsis</i> sp. | <i>P. virgulata</i> – 99%. |
| 28. (Pest-9) | B5-3 <i>Pestalotiopsis</i> sp. | <i>P. disseminata</i> – 99%. |
| 29. (Pest-10) | Kice <i>Pestalotiopsis</i> sp. | <i>P. crassiuscula</i> – 99% (controle). |
| 30. (Kifn 2.2) | <i>Botryosphaeria</i> sp. | <i>Botryosphaeria rhodina</i> – 99% (controle). |
| 31. (Kice 1.2) | <i>Phomopsis</i> sp. | <i>Phomopsis sojae</i> – 99% (controle). |
| 32. (LRMa) | <i>Penicillium</i> sp. | <i>Penicillium commune</i> – 99% (controle). |

* A PCR foi inibida.

O resultado da decodificação das sequências nucleotídicas do fragmento ITS 1 das amostras foram de acordo com as observações morfológicas e permitiram a confirmação da variabilidade de espécies detectada por Souza (2005) através do perfil químico dos *Trichoderma* e dos *Pestalotiopsis*. Os fungos selecionados como controles do sequenciamento apresentaram uma boa quantidade e qualidade do DNA (entre 1,8 e 2,0) e pertenciam aos mesmos gêneros em estudo, exceto *Botryosphaeria* e *Phomopsis* que foram utilizados como controle para as ampliações do **Fed** cujos resultados serem apresentados no **Item 5.3.2.3**.

5.3.2.1 Variabilidade Genética e Química dos *Trichoderma*

Devido à grande variabilidade de metabólitos dos *Trichoderma*, detectada pelo perfil químico, foi realizado o acompanhamento das características morfológicas e depois feito o agrupamento. Foram distintos oito sub-grupos e um não definido com duas amostras que também não haviam apresentadas posição definida quanto a produção dos metabólitos. Estes grupos foram confirmados em nove espécies identificadas pela região ITS-1 e confirmou detecção do perfil químico. A **Figura 23** apresenta a diversidade das colônias e a **Figura 24 A-B** os dendogramas a partir do perfil químico.

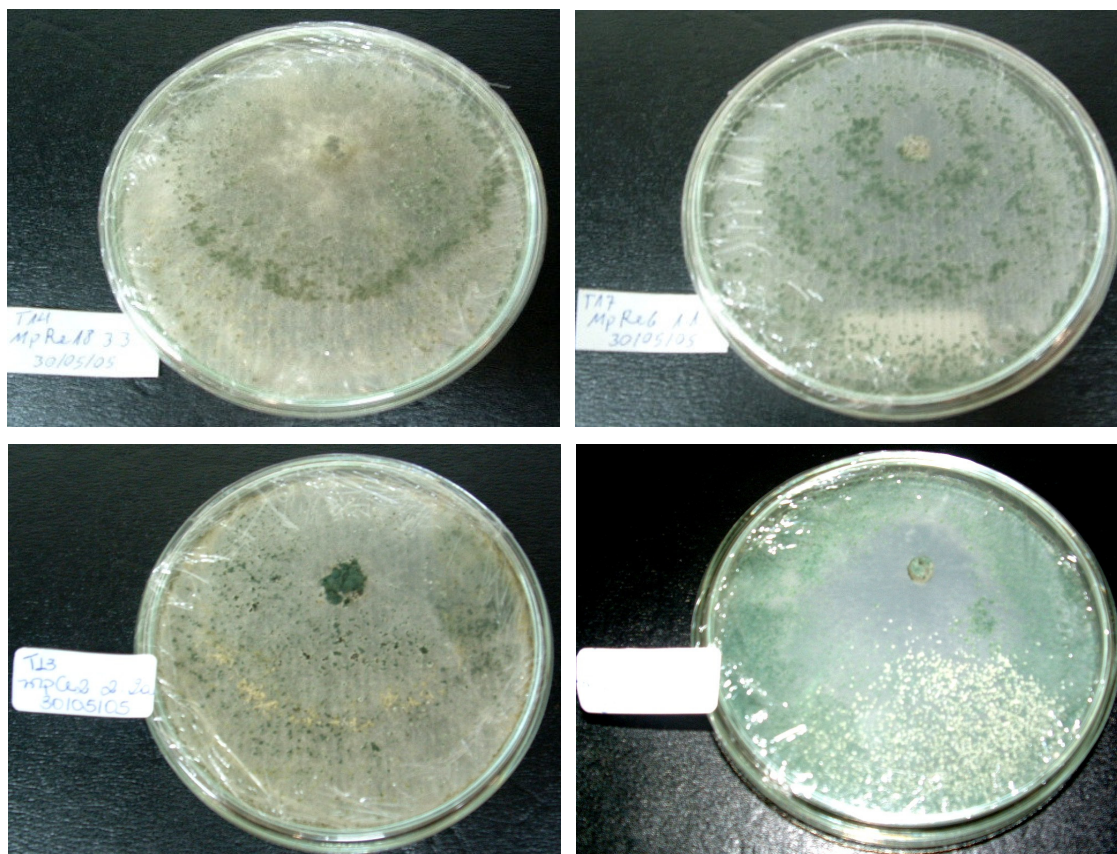


Figura 23: Aspectos das culturas de *Trichoderma* isolados de *Murraya paniculata* em BDA, com 16 dias a temperatura ambiente.

Entre as nove espécies identificadas de *Trichodermas* oito são conhecidas (*T. harzianum*, *T. ovalisporum*, *T. taiwanense*, *T. erinaceum*, *T. hamatum*, *T. viride*, *T. koningii* e *T. koningipsis*) e uma desconhecida. As duas amostras com posição não determinada no perfil químico e pelo DNA estavam misturadas com duas espécies de *Trichodermas*, que eram antagonicas e inibiam a esporulação uma da outra. Por esse motivo existia tanto a produção elevada de peptídeos e de koningininas que não permitia o agrupamento delas em nenhum dos grupos definidos pela produção dos metabólitos majoritários.

Agrupamento das linhagens de *Trichoderma* a partir do perfil químico

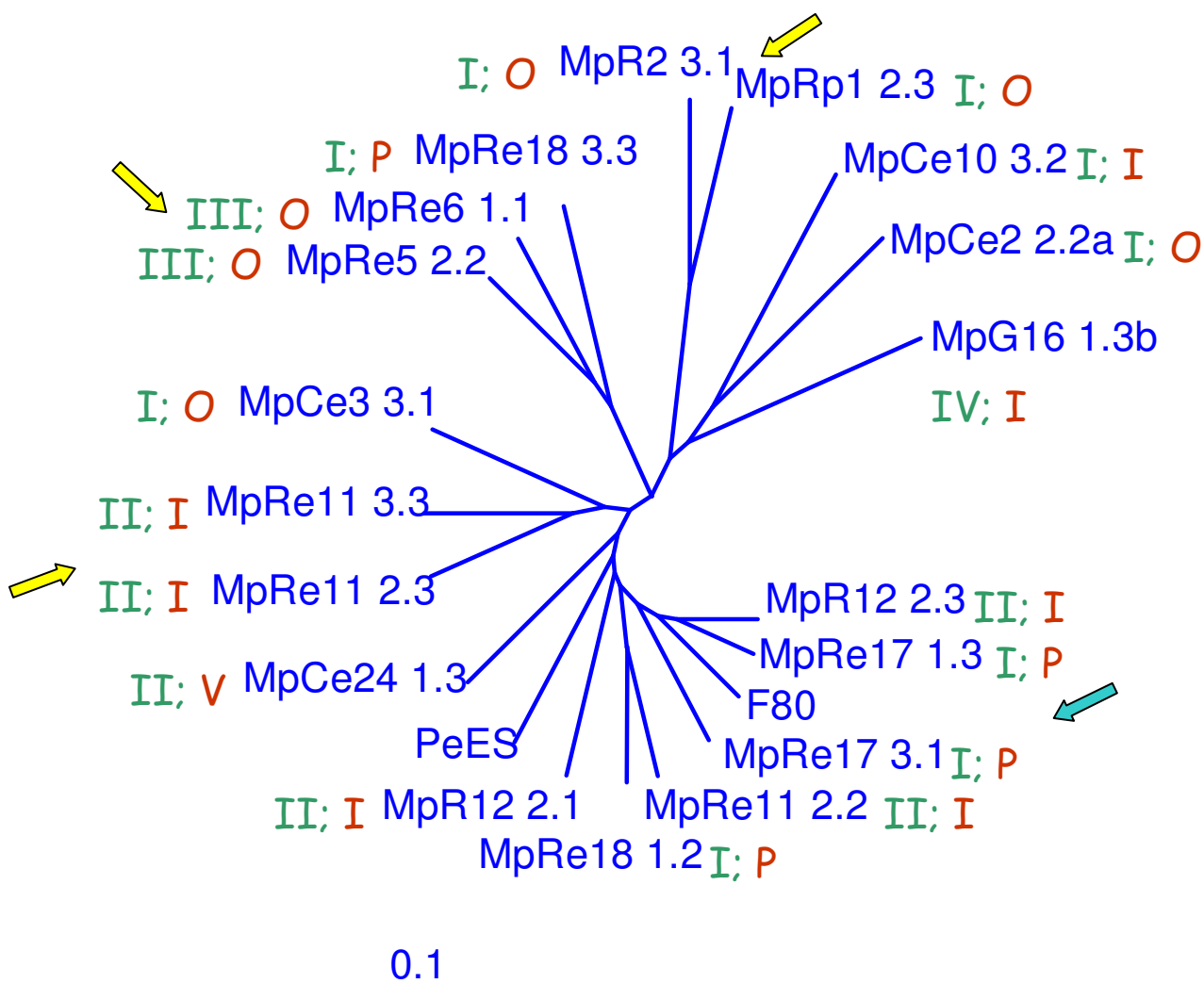


Figura 24 A: Árvore não enraizada, a partir dos perfis químicos (marcadores fenotípicos), de *Trichodermas* isolados de *Murraya paniculata*. Os destaques em verde indicam as plantas hospedeiras e os vermelhos às estações sazonais. As setas amarelas indicam indivíduos oriundos de uma mesma hospedeira e com produção de metabólitos similares. A seta azul indivíduos de mesma origem divergindo na produção dos metabólitos. Adaptada de Souza, 2005.

A divergência na produção de metabólitos entre os isolados de *Trichoderma*, dentro da mesma espécie, é grande e indica uma alta variabilidade fenotípica, possivelmente por uma competição pelos recursos utilizados para a sobrevivência dos indivíduos serem os mesmos. Os resultados encontrados por Souza (2005), reforçam a necessidade do uso de outras ferramentas taxômicas para identificação correta das espécies. Entretanto a quimiotaxonômia pode ajudar a

diferenciar raças quanto à origem ou a produção de metabólitos (Hansen *et al.*, 2005). O perfil químico também é útil na detecção de grupos definidos de substâncias.

A diversidade de *Trichoderma*, encontradas nas cascas de *M. paniculata*, sugere que sua transferência seja horizontal, o que é possível pelo grupo ser cosmopolita e encontrado constantemente como saprofita. Contudo este grupo parece está bem adaptado a sua hospedeira devido sua alta frequência, as diferentes espécies identificadas e a diversidade de metabólitos produzidos.

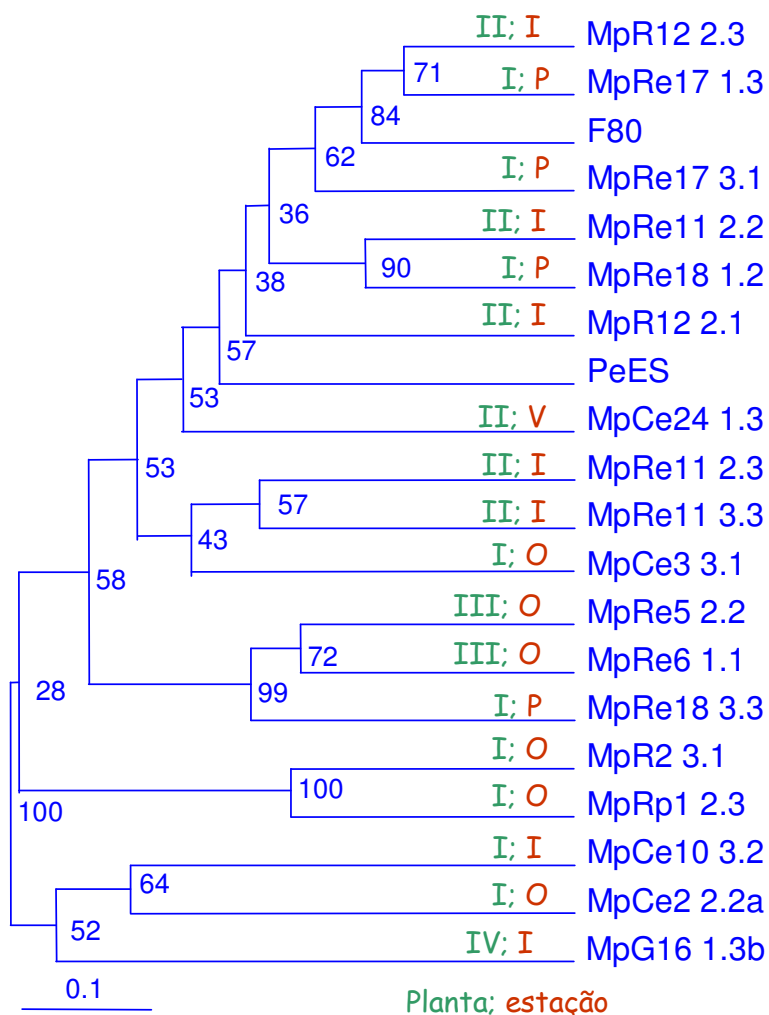


Figura 24 B: Dendrograma dos *Trichodermas* isolados de *Murraya paniculata*, a partir do perfil químico. A numeração nos ramos é percentagem de confiabilidade dada pelo Bootstrap em 500 repetições.

Numa população numerosa, de um mesmo gênero, foi observado por Darwin (1859) que existe uma maior diversidade de espécies e/ou variedades que nas menos numerosas. A seleção natural faz com que a disputa por recursos seja mais acirrada para aqueles que compartilham dos mesmos recursos, ocasionando uma maior diversidade na população. Para *Trichoderma* e outros grupos muito frequentes associados à *M. paniculata* não é diferente do que foi descrito por Darwin, havendo assim uma maior riqueza de espécies dentro da população de fungos endofíticos daqueles gêneros mais frequentes e abundantes.

5.3.2.2 Variabilidade Genética e Química dos *Pestalotiopsis*.

O grupo de *Pestalotiopsis* identificado apresentou 6 espécies distintas (10 amostras, ver **tab. 7**). Destas amostras nove tiveram suas sequências analisadas e a árvore filogenética mais parsimoniosa está apresentada na **Figura 25** a seguir.

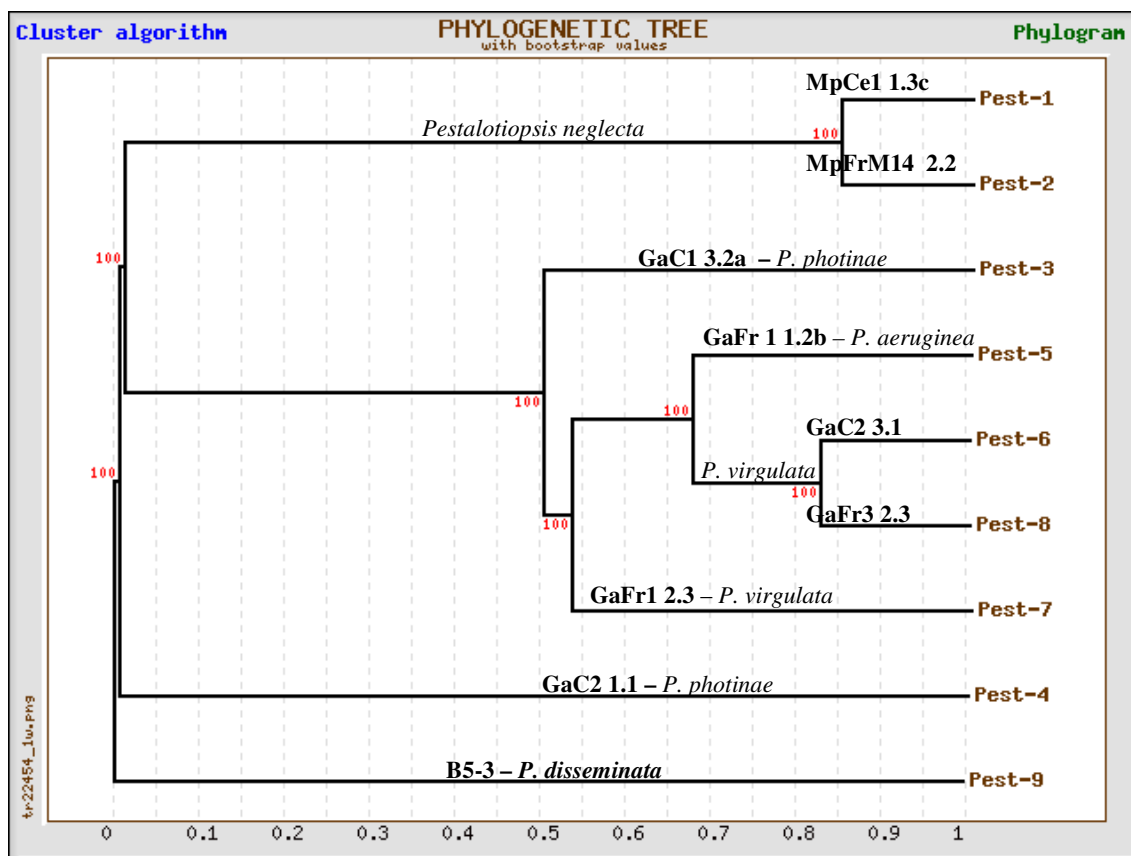


Figura 25: Árvore filogenética de *Pestalotiopsis* endofíticos. Os números em vermelhos apresentam os valores do Bootstrap para cada ramo da árvore.

O perfil químico avaliou oito das nove amostras (exceto MpFrM14 2.2) que compõe a árvore filogenética da **Figura 25** encontrando a maior similaridade entre os isolados **B5-3**, de *Pinus taeda* e **MpCe1 1.3c** de *M. paniculata* com 683 de similaridade para o máximo de 1000. Esta similaridade na produção de metabolitos foi explicada pela origem das amostras, pois ambas haviam sido isoladas em São Carlos – S.P., enquanto as **Ga** na Floresta Amazônica da planta *Gustavia eliptica*, uma Leticidaceae. Os valores do Bootstrap chamam a atenção pela alta consistência da árvore e esta foi comparada com outras 3 e manteve os mesmos valores. Destas amostras três (Pest 1 = MpCe1 1.3c - *P. neglecta*, Pest 4 = GaC2 1.1 – *P. photinae* e Pest 7 = GaFr1 2.3 – *P. virgulata*) foram enviadas a Universidade Federal do Paraná (UFPr), aos cuidados da Dra. Glienk para controle de um estudo da variabilidade com marcadores randomicos (RAPD) e foi detectada também uma alta variabilidade

gênica que segundo ela as três amostras não podiam ser de uma mesma espécie, o que já havia sido confirmado pelo perfila químico pela região ITS-1.

5.3.2.3 Variabilidade Genética de “Fed”

A presença freqüente de **Fed** no córtex do caule, a produção de substâncias voláteis bioativas e a sua não identificação morfológica tornaram o alvo mais importante e intrigante desta pesquisa. Dentre os 52 isolados deste grupo 16 foram submetidos à extração de DNA e ao sequenciamento das regiões ITS-1 e ITS-2. Neste grupo ocorreu o maior tempo de cultivo (30 dias) e o menor rendimento, aproximadamente 10 ng/μL, sendo de baixa qualidade o DNA extraído (1,3), muitas vezes escuro e opaco, deixando um rastro na vertical do gel de agarose que indicava degradação das amostras. O estudo do perfil químico também não foi realizado, devido eles consumirem muito pouco do meio de cultura.

As primeiras sequências analisadas indicaram tratar-se de um membro da família Xylareaceae, *Xylaria* sp. ou *Eutypa lata* com 83 % e 84 % de identidade respectivamente. Por esse motivo foram realizadas microfotografias eletrônicas na Embrapa – Meio Ambiente com ajuda do Dr. Itamar Soares de Melo, com o intuito de se conhecer melhor a morfologia destes isolados. A **Figura 26** apresenta as microfotografias eletrônicas.



Figura 26 A: Microfotografia eletrônica de **Fed 3** com aumento de 2000x. Detalhes das hifas entrando meio de cultura. Barra de 20μm.

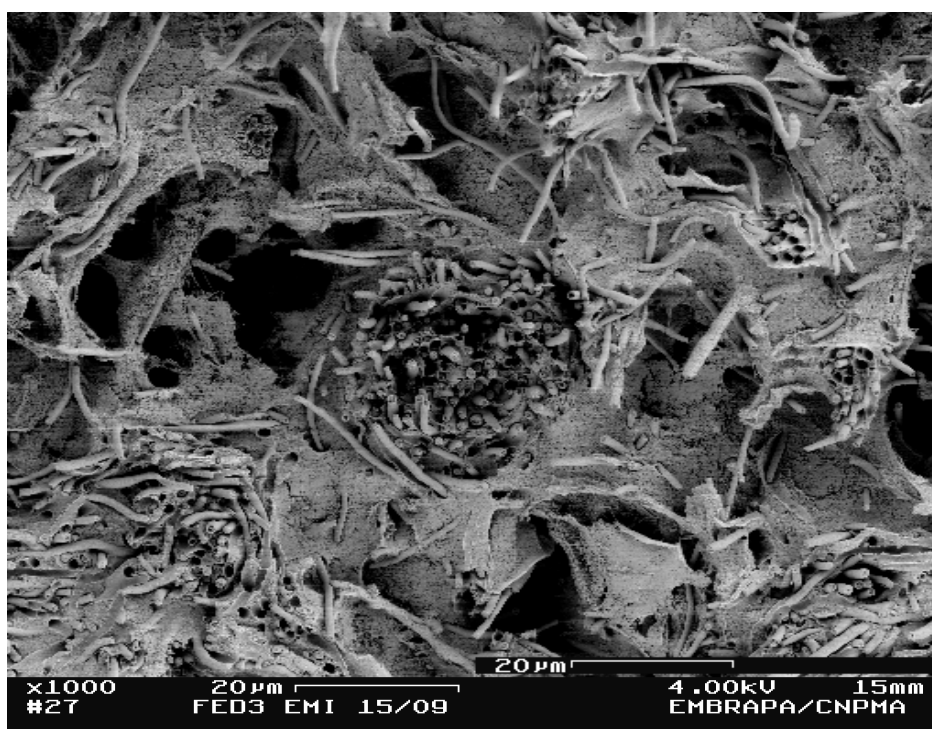


Figura 26 B: Microfotografia eletrônica de **Fed 3** com aumento de 1000x. Detalhes das hifas entrando meio de cultura. Barra de 20μm.

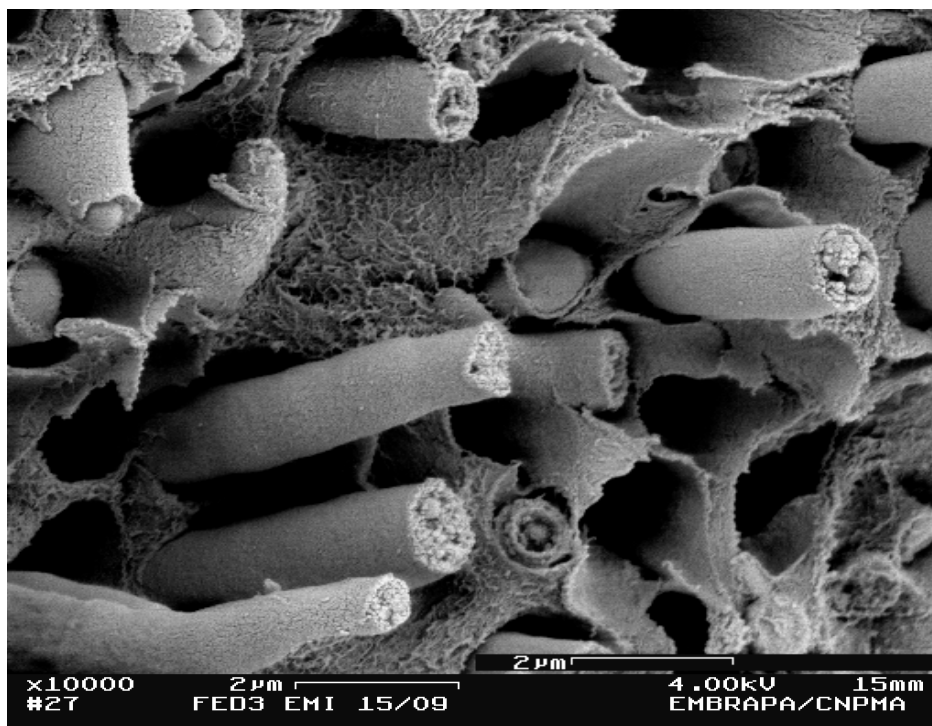


Figura 26 C: Microfotografia eletrônica de *Fed 3* com aumento de 10.000x. Detalhes das hifas entrando meio de cultura. Barra de 2µm.

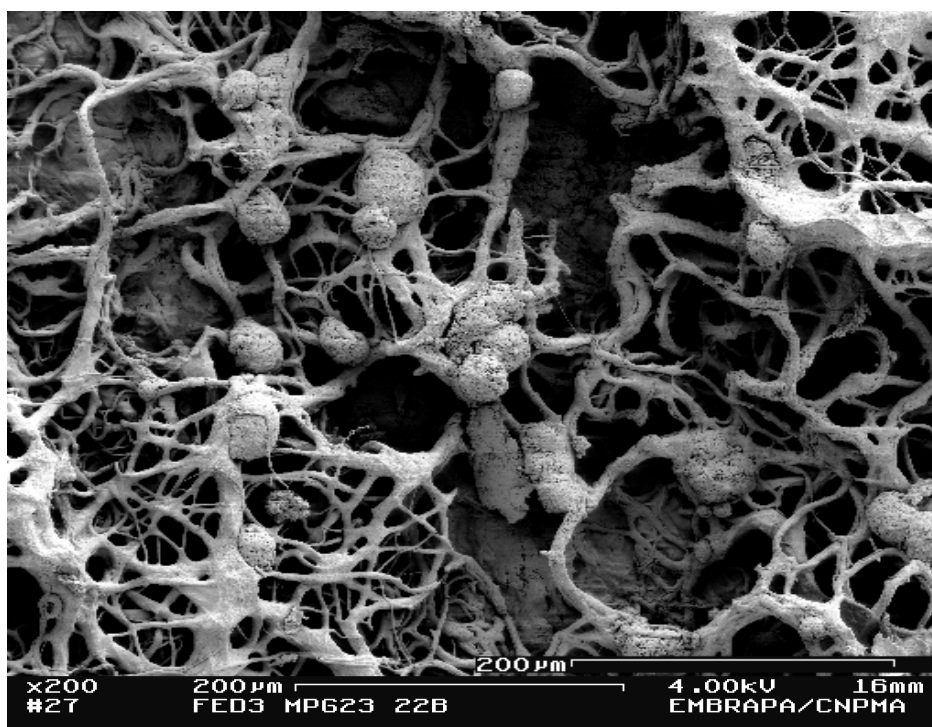


Figura 26 D: Microfotografia eletrônica de *Fed 3* com aumento de 200x. Detalhes das hifas formando ascos. Barra de 200µm.

O resultado do sequenciamento de 7 linhagens de **Fed** para as regiões ITS-1 e ITS-2 apresentaram baixo valor de identidade para quatro amostras, valores entre 76 % a 83 % de identidade, e três amostras com valores acima de 91 % até 99 % de identidade com *Pestalotiopsis microspora*. Os “out groups” destas amostras, *Botryosphaeria* e *Phomopsis* obtiveram 99 % de identidade com seqüências encontradas no NCBI. Embora os resultados dos sequenciamentos das regiões ITS-1 e ITS-2 indiquem tratar-se do gênero *Pestalotiopsis*, com 511 bases decodificadas e o maior índice de confiabilidade (0,0), estes dados são contraditórios aos morfológicos, cujas estruturas vegetativas e reprodutivas são diferentes de *Pestalotiopsis*. Os resultados presentes não permitem afirmar que **Fed** seja uma nova espécie. Novos dados corroboram para esta hipótese e do estudo químico da linhagem **Fed 3** foram isoladas uma molécula inédita e outras duas não isoladas de produtos naturais (ver **cap. 6**).

As linhagens de **Fed** poderiam pertencer a um novo grupo de microrganismos identificado por Sbrobel *et al* (2001) como *Muscodor albus* produtor de voláteis bioativos, inclusive com atividades antifúngicas, estes isolados diferentes de **Fed** produzem um volátil complexo com mais de 20 moléculas enquanto que a amostra em questão produziu apenas três (ver **cap. 6**). Novas microfotografias eletrônicas serão tiradas da parte reprodutiva e a seqüência do rDNA será completada para a conclusão da identificação, além dos dados micromorfométricos.

6 – CAPÍTULO 3

*** Potencial bioativo dos metabólitos dos endófitos.**

*** Isolamento e identificação de substâncias bioativas dos endófitos de *Murraya paniculata* L. (Jack) e de *Trichoderma koningii* isolado de *Strychnos cogens*.**

6.1 Introdução do Capítulo 3

A procura por fármacos (prospecção química), mesmo de forma empírica, levou o homem ao acúmulo de informações sobre o potencial medicinal das plantas e de outros seres vivos, conforme os metabólitos que estes produziam (expressão gênica). Com o progresso das atividades científicas, as propriedades a eles atribuídas puderam ser confirmadas ou negadas. Contudo, uma mesma espécie vegetal localizada em áreas geográficas diferentes pode diferir em relação às substâncias produzidas. Esta variação está atualmente sendo avaliada pela fitoquímica ecogeográfica como um possível resultado da interação planta/ecossistema (biótico e abiótico), portanto da co-evolução destas variáveis.

Um exemplo dessa variação na produção de substâncias por plantas de uma mesma família foi observado por Silva *et al.* (1988) com a família Rutaceae, onde se notou progressões filogenéticas com diferenciações morfológicas, geográficas e químicas paralelas que foi justificado por uma tendência geral da substituição gradual dos alcalóides benzilisoquinolínicos por derivados simples e complexos de ácido antranílico e, eventualmente, por cumarinas e limonóides segundo Gottlieb *et al.* (1996). Coincidentemente Ferracini (1996) ao estudar a planta *M. paniculata* L. (Jack), também da família Rutaceae, aqui no Brasil não isolou nenhum alcalóide ao contrário do que havia ocorrido com os espécimes asiáticos, contudo isolou 21 cumarinas e 10 flavonóides entre outras substâncias, quatro destas inéditas.

6.1.1 – Interação entre Expressão Gênica e Prospecção Química nos Microrganismos.

Focalizando a interação planta com outros sistemas bióticos, podemos encontrar os microrganismos endofíticos, principalmente bactérias e fungos que nos últimos tempos ganharam uma nova conotação devido à descoberta de que muitos destes hóspedes podem interagir com as plantas hospedeiras de forma benéfica ou mesmo “mimetizá-las” na produção de muitos compostos. O exemplo mais conhecido é o do taxol, um diterpeno de ação anticancerígena, obtido do caule de plantas do gênero *Taxus* que foi primeiramente em microrganismos isolado do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* (uma espécie nova) e depois de outros diferentes fungos endofíticos (ver **tab. 8** - Yuan *et al.*, 2006; Strobel *et al.*, 2005, 1996a & b).

Pesquisadores sugerem ser esta capacidade de produção da mesma classe de metabólitos por plantas e seus respectivos hóspedes um tipo de “aprendizado” decorrente de uma transferência gênica horizontal (Rohr, 1997). Sabe-se que o taxol produzido pelos microrganismos segue uma rota sintética diferente do produzido pela hospedeira (Azevedo, 1998), mas assim como o produzido pelas plantas inibe a formação das fibras do fuso durante a mitose, por esta razão usado como anticancerígeno.

A importância médica e econômica do taxol levou a procura de diferentes microrganismos que possam produzir-lo em quantidades economicamente viável, conseqüentemente levou na construção de uma biblioteca de cDNA para o isolamento dos genes envolvidos, culminando em 1998 com a expressão gênica deste em *E. coli* (Long *et al.*, 1998), mas ainda de forma economicamente inviável.

A **Tabela 8** ilustra algumas das substâncias isoladas, identificadas e com atividades biológicas comprovadas produzidas por microrganismos endofíticos.

Tabela 8: Plantas das quais foram isoladas microrganismos endofíticos e as substâncias por eles produzidas.

| Hospedeira | Microrganismo (Referência) | Substâncias | Ação |
|--|---|---|---|
| - Não foi descrita. | - <i>Bacillus cereus</i> (bactéria) (Pleban S., Chernin L., Chet I., 1997) | - Quitinase | - Degradação da parede celular de fungos patogênicos (Micoparasitismo). |
| - <i>Festuca arundinacea</i> | - <i>Acremonium coenophialum</i> (fungo) (Knoch <i>et al.</i>). | - Alcalóides | - Neurotóxicas. |
| - <i>Artemisia annua</i> | - <i>Colletotrichum</i> (fungo) (Hong Lu <i>et al.</i> , 2000). | - Estrutura não elucidada. | - Antifúngica e bactericida. |
| - Não foi descrita. | - <i>Cytospora</i> e <i>Diaporthe</i> spp. (fungos) (Brady <i>et al.</i> , 2000). | - Cytosporones D e E, (Lactonas de Trihidroxibenzeno). | - Antibacteriana. |
| - <i>Artemisia mongolica</i> | - <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (fungo) (Zou <i>et al.</i> , 2000). | - Ácido colletotrico | - Antibiótica para: - <i>Bacillus subtilis</i> , - - <i>Staphylococcus aureus</i> , - - <i>Sarcina lutea</i> (bactérias) e - <i>Helminthosporium sativum</i> (fungo). |
| - <i>Teucrium scorodonia</i> | - <i>Geniculosporium</i> sp. (fungo) (Konig <i>et al.</i> , 1999). | - Geniculol (diterpeno) - Citochalasin F | - Algacida e - Inibidor de Fotossíntese. |
| - <i>Pachyrhizus erosus</i> L. Urban (Jacatupé). | 1 - <i>Mucor</i> (fungo), 2 - <i>Staphylococcus</i> , 3 - <i>Nocardiosis</i> , 4 - <i>Bacillus</i> e bactérias spp. (Stamford <i>et al.</i> , 1998). | - Enzimas: - Proteases (1 e 2), - Lipases (3) e - Amilases (1, 3 e 4). | - Promovem a quebra de: - Proteínas, - Lipídios e - Amido. |
| - <i>Juniperus communis</i> | - <i>Hormonema</i> sp (fungo). (Pelaez <i>et al.</i> , 2000). | - Enfumafungin (Triterpeno glicosídeo) | - Antifúngica: <i>Candida</i> e <i>Aspergillus</i> . |
| Não foi descrita | <i>Cryptosporiopsis</i> cf. <i>quercina</i> (fungo) (Strobel <i>et al.</i> , 1999). | - Cryptocandin (lipopeptídeo). | - Anti-micótica: <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , etc. |
| - <i>Conoplea elegantula</i> (Cooke) M. B. Ellis, (cornífera). | <i>Pestalotia ramulosa</i> (fungo) (Findlay <i>et al.</i> , 1995). | - (3R,4aS,6R)-6-hidroxi ramulosin (isocumarina). | - Inseticida |

Continuação da Tabela 8.

| Hospedeira | Microrganismo (Referência) | Substâncias | Ação |
|---------------------------------|--|---|--|
| -Taxol (diterpeno) | - <i>Taxomyces andreanae</i> , - <i>Pestalotiopsis microspora</i> , - <i>Pestalotia bicilia</i> , - <i>Monochaetia</i> sp., - <i>Fusarium lateritium</i> e etc. (fungos) (Strobel <i>et al.</i> , 1996a; Strobel <i>et al.</i> , 1996b; Stierle, A. <i>et al.</i> , 1993,). | | - Anticancer de ovários e mamas. |
| - <i>Lolium perene</i> L. | - <i>Acremonium lolii</i> e <i>A. loliae</i> (fungo). | - Peramine, - Lolitrem B e - Paxilline (todos alcalóides). | - Neurotóxica. |
| <i>Gaultheria procumbens</i> L. | - Linhagem 4GP4C2 (fungo) (Findlay <i>et al.</i> , 1997a). | - 5-hidroxi-2-(1'-oxo-5'- metil-4'- hexenil)benzofurano. | - Inseticida. |
| <i>Larix laricina</i> | - Linhagem L1930 (fungo) (Findlay <i>et al.</i> , 1997b). | - 8,1',5'-trihidroxi- 3',4''dihidro-1'H- [2,4']binaftaleno-1,4,2''- trione (1). 2-ácido metiloctanoico 6- oxo-2- propenil-3,6-dihydro-2H- piran-3-il ester (2). | - Inseticida (1) - bactericida (2). |

Contudo vale ressaltar que a prospecção química de microrganismos endofíticos no mundo e principalmente no Brasil ainda é muito recente. Os resultados neste campo da pesquisa com microrganismos endofíticos têm-se mostrado promissores e a carência de dados instiga a procura de novas substâncias bioativas e/ou inéditas.

6.2 Materiais e Métodos do Capítulo 3

6.2.1 Obtenção e Caracterização dos Metabólitos Bioativos.

As substâncias bioativas foram avaliadas para representantes dos mesmos grupos de fungos que foram identificados pelas regiões ITSs do rDNA – *Pestalotiopsis*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fed*, *Aspergillus* e *Xylaria*; separados em duas categorias: constituintes fixos e voláteis. Os constituintes fixos foram então subdivididos em substâncias extra e intracelular.

As avaliações das substâncias extracelulares foram, antes de estabelecidas definitivamente, realizadas em ágar, para bactérias e fungos, e depois em meio líquido para os fungos:

1 – Ensaio para detecção de antagonismo com as bactérias – metodologia adotada foi a de Christensen (1996) chamada de culturas pareadas (cocultivos) contra *Pythium* sp. gentilmente cedido pelo Dr. Itamar Soares de Melo da Embrapa Meio Ambiente;

2 – Ensaio para detecção de antibiose com os fungos – foi realizada a metodologia do bloco de gelose por 8 (oito), 16, 24, 32 e 40 dias contra bactérias patogênicas;

3 – Ensaios dos meios líquidos cujo método utilizado para avaliação do meio metabólico foi o de Kawamoto & Lorbeer (1976), também conhecido como ensaio para detecção de antibióticos. Depois de cultivados em meios de cultura líquidos, conforme descrito por Souza *et al*, 2004. Após o crescimento das colônias o meio metabólico foi separado do micélio por filtração em papel Whatman nº4 e esterilizado com membrana millipore (0,22µm ou 0,45µm).

A avaliação das substâncias fixas intracelulares foi realizada conforme o método para detecção de antibióticos, contudo, depois da extração do micélio com solventes orgânicos conforme será descrito no **item 3.2.2**.

A avaliação das substâncias voláteis foi realizada para o grupo de microrganismos denominados de Fed contra uma série de fungos fitopatógenos por um período de 8 (oito), 16, 24, 32 e 40 dias cultivados a temperatura ambiente. Em placas de petri contendo BDA, foi retirada uma faixa central do meio de cultura, depois se cultivou de um lado o fungo fitopatógeno e do outro o Fed. No controle do experimento não foi colocado o Fed, mas apenas o bloco de ágar.

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata para que os dados coletados fossem analisados por testes estatísticos apropriados para verificação da veracidade dos dados obtidos. Esta parte do trabalho foi realizada no LABIOMI e depois alguns ensaios foram repetidos no LBM (Laboratório de Biologia Molecular) da UNAERP.

6.2.2 Obtenção dos Extratos dos Fungos Endofíticos.

O crescimento dos fungos foi conforme descrito no **item 2.2.1**, em triplicata. Um dos frascos era retirado para obtenção do micélio para extração do DNA genômico e os outros dois continuavam sendo cultivados por um tempo maior para obtenção de meios metabólicos. Os meios metabólicos foram separados do micélio, conforme descrito no item 3.2.1, confrontado o pH final com o inicial. Foram bioensaiados e depois extraídos com acetato de etila 1:2, clorofórmio 1:2, diclorometano 1:2, cada etapa foi repetida por 3 vezes. O micélio foi macerado 50mL de etanol por 24hs e depois filtrado. Os extratos brutos foram secos em rotavaporador e depois submetidos aos ensaios biológicos novamente.

6.2.3 Identificação de Substâncias Bioativas

Após os bioensaios as linhagens endofíticas mais promissoras foram cultivadas em meios e condições apropriadas (definidos para cada grupo) para extração do micélio e do líquido metabólico seguidos de novos fracionamentos. As frações foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD) e submetidas à bioautografia para algumas frações dos extratos do Fed, de *Trichoderma* e *Penicillium*. Algumas dessas frações e substâncias bioativas obtidas, após purificação, foram submetidas aos ensaios de MID (Dosagem Mínima Inibitória) para encontrar a dosagem mínima letal aos microrganismos testadores. Linhagens destes grupos de fungos foram ou estão sendo avaliadas quimicamente no DQ/UFSCar.

Os resultados parciais foram comunicados em congressos (Pastre *et al*, 2005 e 2006; Marinho *et al*, 2005; Daniel *et al*, 2006; Souza A. D. L. *et al*, 2005a e b; Souza A. Q. L. de *et al*, 2005a e b, 2003a e b) e os conclusivos estão sendo escritos para publicação em revistas especializadas, sendo que três já estão em fase final: (1) High diversity of endophytic fungi from *Murraya paniculata* L. (Jack) in Brazil: their seasonal fluctuations and microhabitat distributions, (2) A new guaiane mannoside from a like-*Eutypa* fungus isolated from *Murraya paniculata* e (3) Nitropropionic Acid (NPA) from the Endophytic Fungus *Pestalotiopsis disseminata*: Can NPA inhibit this fungal caryophyllenic metabolism? e um submetido (4) Diversidade de Policetídeos Produzidos por Espécies de *Penicillium* Isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*.

6.3 - Resultados e Discussão

6.3.1 Detecção de Antagonismo com Bactérias.

Das 34 bactérias endofíticas ensaiadas contra *Pythium* sp., 11 apresentaram algum tipo de antagonismo: antibiose, microparasitismo ou competição, com destaque para o isolado MpRb1 3.2 pela forte antibiose em até 96 horas de teste (**fig. 27 A-B**).

A avaliação do potencial antagônico das bactérias ensaiadas sugere que pelo menos a linhagem MpRb1 3.2 deva ser estudada quimicamente em virtude de sua ação antibiótica frente à *Pythium* sp. A forma de propagação de *Pythium* é por mitose, por esse motivo *P. ultimum* é usado como um bioindicador de substâncias anticancerígenas. A forte ação da bactéria – MpRb1 3.2 sugere que ela produza moléculas extracelulares antibióticas com este tipo de ação (ver **fig. 27-B**).



Figura 27: Em **A** antagonismo de MpRpb2 3.3 ao testador *Pythium* sp. com 96hs e em **B** antibiose ao mesmo testador pela linhagem de bactéria endofítica (MpRb1 3.2), ambas isoladas de *Murraya paniculata* no estado de São Paulo.

6.3.2 Detecção de Antibiose com os Fungos

Os resultados das linhagens de fungos endofíticos bioensaiadas contra microrganismos patógenos de humanos estão representados na **Tabela 9** e na **Figura 28** a seguir.

Tabela 9: Resultados de antibiose de fungos endofíticos de *Murraya paniculata* contra patógenos humanos. Todos os experimentos foram em triplicata e no intervalo de 8 (oito), 16, 24, 32 e 40 dias.

| Fungos Endofíticos | Microrganismos Testadores | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---------------------------|----|----|----|----|-------------------------------|----|----|----|----|-------------------------|----|----|----|----|-------------------------|----|----|----|----|
| | <i>Bacillus subtilis</i> | | | | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | | | | <i>Escherichia coli</i> | | | | | <i>Cândida albicans</i> | | | | |
| | 8 | 16 | 24 | 32 | 40 | 8 | 16 | 24 | 32 | 40 | 8 | 16 | 24 | 32 | 40 | 8 | 16 | 24 | 32 | 40 |
| 1- <i>Aspergillus ochraceo</i> MpR2 2.1a | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| 3- <i>Pestalotiopsis neglecta</i> MpCe1 1.3c | - | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 6- <i>Trichoderma hamatum</i> MpCe2 2.2a | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

As linhagens MpCe1 2.2 – *Phomopsis* sp. (2), MpCe2 3.3b – *Fusarium* sp. (4), MpR2 3.2 – *Epicoccum rubro* (5), MpR2 1.3 – *Fusarium* sp. (7), MpFrVb2 2.3 – *Colletotrichum* sp. (8) e MpF2 1.2 – *Colletotrichum* sp. (9) não apresentaram nenhum resultado em contrastes as *Aspergillus ochraceus* (1), *Pestalotiopsis neglecta* (3) e *Trichoderma hamatum* (6). Os resultados apresentados pela técnica do bloco de gelose foram promissores e ajudaram a nortear os ensaios seguintes de bioatividade com o meio líquido.

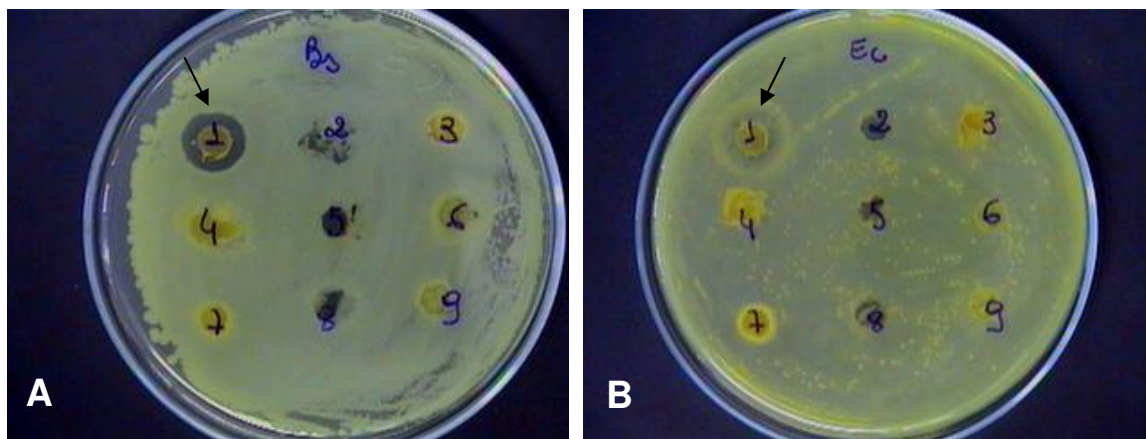


Figura 28: Resultados dos testes de antibiose dos endófitos de *Murraya paniculata* com 40 dias de cultivo. Em **A** e **B** avaliação dos fungos endofíticos pela técnica do bloco de gelose contra *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* respectivamente. As setas destacam o *Aspergillus ochraceo* com resultados satisfatórios.

Os gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Pestalotiopsis* são conhecidos pela produção de grupos definidos de substâncias, tais como: konigininas e peptídeos que apresentam diferentes atividades biológicas que vão desde a antibiose de bactérias Gram-negativa até fitotoxicidade para *Trichoderma* (Peltola *et al*, 2004; Yedidia *et al*, 2003 & Cutler *et al*, 1999); ácido cítrico e micotoxinas dos grupos aflatoxinas e ocratoxinas usualmente são produzidas por *Aspergillus* (Yu *et al*, 2004; Bennett & Klich, 2003; May & Adams, 1997) e sesquiterpenoides cariofilenos e substâncias anti-tumorais usualmente associam-se a *Pestalotiopsis* (Yuan *et al*, 2006; Magnani *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2001; Strobel *et al.*, 1996;). Por estes motivos indivíduos dessas linhagens e de *Penicillium* reconhecido pela produção de antibióticos e *Xylaria* foram escolhidos para os ensaios em meio de cultura líquido.

Os ensaios de bloco de gelose também foram realizados para a linhagem **Fed 3**, mas esta não apresentou nenhum resultado satisfatório, exceto quando a cultura envelheceu e as células de **Fed 3** se romperam. Fato este que será melhor discutido no **item 6.3.3** quando os ensaios das substâncias intra-celulares foram apresentados. Os ensaios com bloco de gelose comprovam que o tempo de

cultivo é um dos fatores determinantes para a bioprospecção de moléculas bioativas de origem microbianas, pois além do tempo às vezes não ser o suficiente para a produção (ver **tab. 8**) ele pode também ultrapassar o limite e o microrganismo promover assim uma catabólise das moléculas produzidas, como parece ter ocorrido para *Pestalotiopsis* e *Trichoderma* após 24 dias.

6.3.2 Detecção de Antibiose com os Meios Metabólicos

Conforme descrito no **item 6.2.1**, depois da conservação do líquido metabólico estes foram descongelados, esterilizados novamente e testados contra uma série de microrganismos patógenos de plantas e animais. Das 19 linhagens fermentadas (nove *Pestalotiopsis*, dois *Trichoderma*, quatro *Penicillium*, uma *Xylaria*, um *Aspergillus niger* e dois Feds) para produção de moléculas bioativas cinco apresentaram algum tipo de antibiose. A **Tabela 10** e a **Figura 29** apresentam estes resultados.

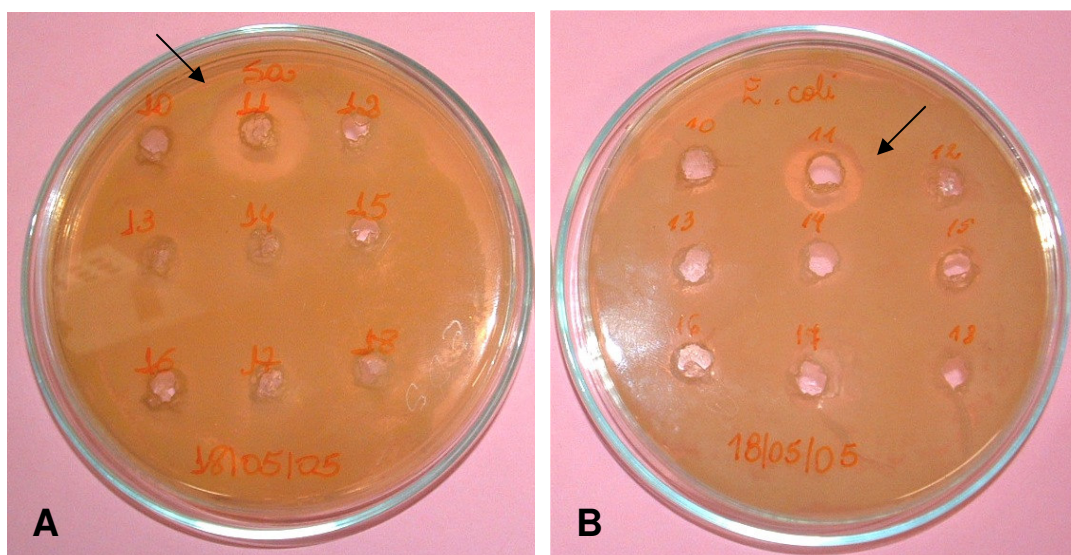


Figura 29: Antibiose de linhagens fungicas endofíticas isoladas de *Murraya paniculata*. As setas indicam a ação dos metabólitos extracelulares de *Penicillium citrinum* (MpR1 3.2a) contra *Staphylococcus aureus* em **A** e *Escherichia coli* em **B**.

Tabela 10: Resultado da antibiose dos líquidos metabólicos de linhagens fúngicas endofíticas isoladas de *Murraya paniculata*.

| Linhagens testadoras | Microrganismos Testadores | | | | | | | | | | |
|---|---------------------------|------|-----|-----|-----|----|-----|---------|----|----|---------------|
| | Sa | Bs | Ec | Pa | Ea | Xa | Tv | Ca / Ct | Fm | Af | Colle. |
| 8- <i>Pestalotiopsis</i> | | | | | | | | +++ | | | |
| 12- <i>Penicillium</i> – P3 | +++ | ++++ | +++ | +++ | +++ | | +++ | | | | |
| 13- <i>Penicillium</i> – P4 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | | +++ | | | | |
| 14- <i>Trichoderma koningi</i> (F80). | | | ++ | ++ | | ++ | | | ++ | ++ | ++ |
| 15- <i>Trichoderma ovalisporum</i> (T2) | | | ++ | ++ | | ++ | | | | | Não realizado |

Sa = *Staphylococcus aureus*, Bs = *Bacillus subtilis*, Ec = *Escherichia coli*, Pa = *Pseudomonas aeruginosa*, Ea =, Xa = *Xanthomonas axenopodis* cv. *citri*, Tv = *Thricomonas vaginales* (protozoário), Ca = *Candida albicans*, Ct = *Candida tropicalis*, Fm = *Fusarium momiliforme*, Af = *Aspergillus flavus* e Colle = *Colletotrichum* sp.

++ = halo de inibição de 12 mm – 15,9 mm de diâmetro, +++ = de 16 mm – 17,9 mm, ++++ = igual ou maior que 18 mm de diâmetro.

6.3.3 Detecção de Antibiose com os Extratos

Das 19 linhagens fúngicas submetidas à triagem para produção de moléculas bioativas com o meio metabólico, quatro (*Trichoderma koningii* – F80, Fed 3 – MpR3 2.3b, *Penicillium citrinum* – P4 e *Pestalotiopsis disseminata* – Pest 9) foram escolhidas. Das cinco frações dos extratos de *P. disseminata* avaliadas a que apresentou o melhor resultado foi um fração do extrato aquoso (BCYaq), mas todas as frações apresentaram um ótimo resultado contra *Candida tropicalis*. Estes resultados estão apresentados na **Figura 30 A** e na **Tabela 11**. Sete frações dos extratos de **Fed 3** foram avaliadas e a que melhor apresentou resultado foi a do micélio (FED3A4) com atividade bactericida. A atividade bactericida de **Fed 3** havia sido detectada no ensaio de bloco de gelose, conforme descrita no **item 6.3.2** e, portanto as principais moléculas bactericidas de **Fed 3** são intracelulares diferentes do que ocorreu com os outros fungos estudados cujas principais moléculas com atividade antibióticas eram excretadas para o meio de cultura, por tanto sendo extracelulares. Em contraste foi detectada ação fungicida tanto para os extratos intra como para os extracelures. A **Figura 30 B** e a **Tabela 11** apresentam estes resultados.

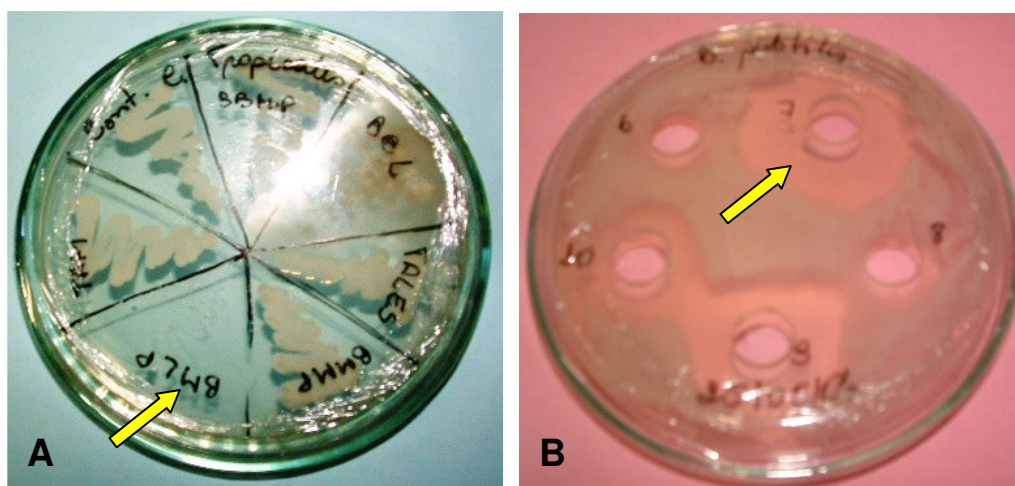


Figura 30: Ação antibiótica dos extratos de fungos endofíticos. As setas indicam em **A** ação candidicida da fração BMLP de *Pestalotiopsis disseminata* e em **B** ação bactericida da fração FED3A4.

Tabela 11: Resultado dos ensaios de antibiose dos extratos de *Pestalotopsis disseminata* e Fed 3, um fungo endofítico isolado do córtex de *Murraya paniculata* no Estado de São Paulo – Br.

| Testadoras | <i>Pestalotopsis disseminata</i> – Pest 9 | | | | | Fed 3 – MpR3 2.3a | | | | | | |
|-------------------------------|---|------|------|-------|-------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | BMA | BMLP | BBLP | BBMaq | BCYaq | FD3A2 | FD3B7 | FD3Am | FD3B9 | FD3A4 | FD3A9 | FD3Bm |
| <i>Bacillus subtilis</i> | | | | | ++ | ++ | ++ | + | + | +++ | + | + |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | + | + | + | | | | | | | | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | | | | + | | + | | | +++ | | |
| <i>Escherichia coli</i> | + | + | + | + | +++ | | +++ | +++ | | +++ | | |
| <i>Candida tropicalis</i> | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | | | | | | | |
| <i>Guignardia citricata</i> | | | | | | +++ | +++ | | | | | |
| <i>Fusarium moniliforme</i> | + | + | + | + | | | | | | | | |
| <i>Aspergillus flavus</i> | | | | | | | | +++ | +++ | | | |

++ = halo de inibição de 12 mm - 15 mm de diâmetro, +++ = < 16 mm - 18 mm, ++++ = maior que 18 mm de diâmetro.

A linhagem de *Trichoderma koningii* (F80) foi bastante promissora e a partir deste foram identificadas várias substâncias que estão apresentadas no **item 6.4.1**. Dos extratos e frações que levaram a identificação destas substâncias, foram realizados ensaios biológicos numa fase anterior aos isolamentos destas e na fração C65b3/1 foi detectada antibiose para bactérias Gram-negativa (250 µg/mL), Gram-positiva e fungos (125 µg/mL). A identificação desta fração por RMN (Ressonância magnética) e MS (Espectrometria de massas) revelou tratar-se de uma mistura de koningininas, identificadas como: A, D, E e F, destas as três primeiras foram bioensaiadas separadamente. Elas apresentaram o mesmo valor do MID encontrado anteriormente, comprovando serem responsáveis pela ação antifúngica encontrada nesta linhagem por Souza *et al* (2004), contra *Aspergillus flavus*. Contudo o valor do MID para as bactérias Gram-positivas aumentou para 250 µg/mL, aparentemente o melhor valor encontrado para o MID anteriormente tenha sido devido a uma ação sinérgica das moléculas e deve ser melhor investigado (**fig. 31**).

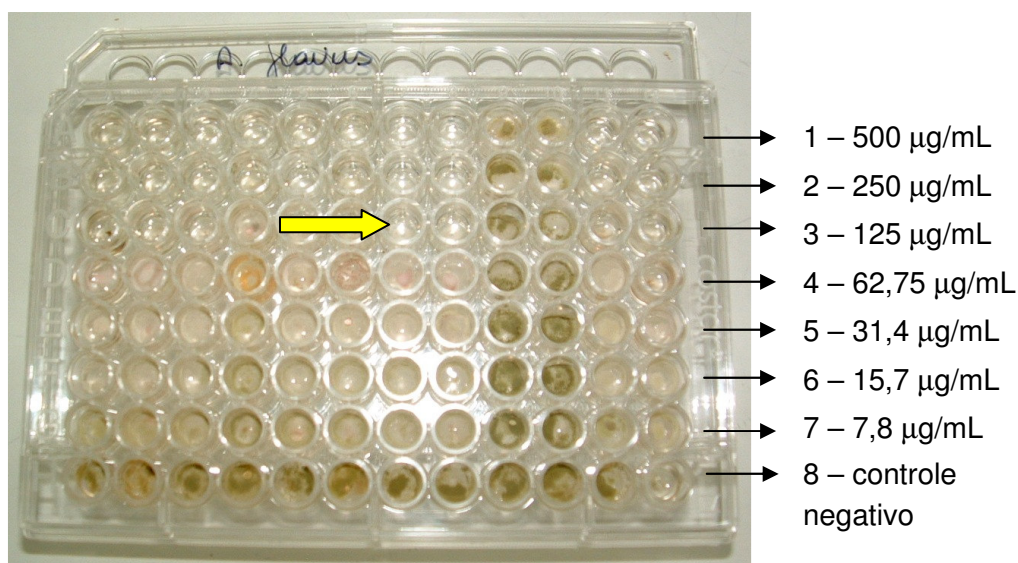


Figura 31: Resultado da Dosagem Mínima Inibitória (MID) das substâncias isoladas de *Trichoderma koningii* (F80) contra *Aspergillus flavus*. A seta indica a koninginina D.

Os ensaios antimicrobianos com *Penicillium citrinum* (P4 – MpR1 3.2a) foram promissores (ver **tab. 9**) por esses motivos extratos etanólicos do micélio, acetato de étila e clorofórmico do meio metabólico foram também avaliados, apresentando resultados similares aos já encontrados para o meio metabólico, também foi detectada a presença de um alcalóide no extrato clorofórmico. Essa linhagem foi estudada quimicamente em colaboração com Marinho (2005) e procurou-se isolar e identificar o princípio ativo dos extratos extracelulares com o acompanhamento da bioautografia (**fig. 32**).

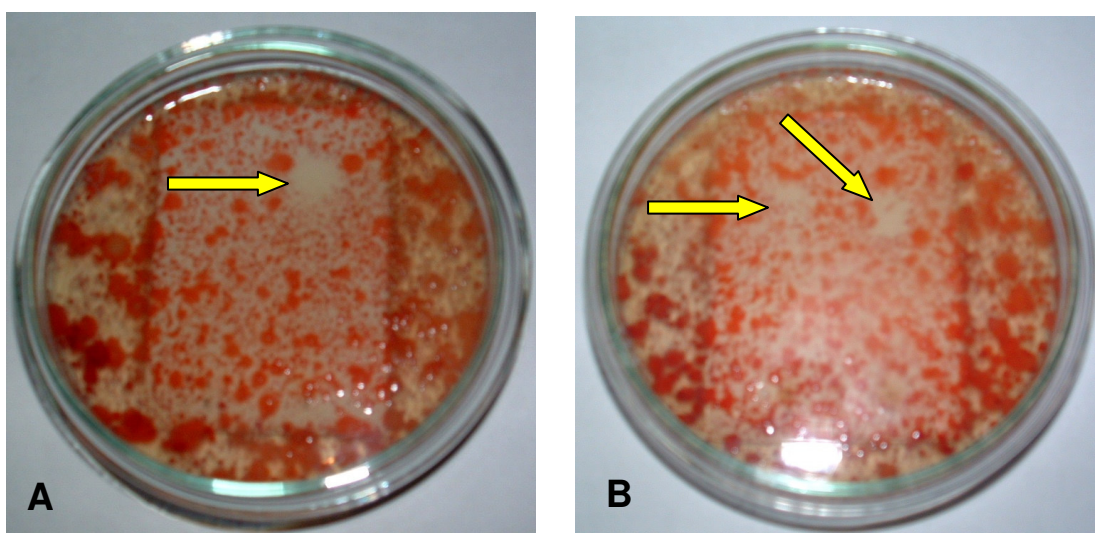


Figura 32: Resultado dos ensaios de bioautografia dos extratos de *Penicillium citrinum* contra *Escherichia coli*. Em **A** a seta indica a atividade do extrato etanólico do micélio e em **B** as setas indicam a ação dos extratos clorofórmicos e acetato de étila da esquerda para a direita respectivamente.

A partir destes extratos foi isolado um alcalóide, cuja estrutura não havia sido ainda elucidada e a substância citrinina responsável pela ação antibiótica registrada para essa linhagem de *Penicillium*. Além deste estudo outros dois foram desenvolvidos com os *Penicillium* isolados de *M. paniculata*, o estudo de perfil químico para determinação das classes de substâncias produzidas por eles e a prospecção de antibióticos por Pastre (2006a e b; 2005). O gênero *Penicillium* é

promissor quanto à produção quantitativa e qualitativa de moléculas bioativas o que favorece o seu estudo aprofundado e o isolamento de novas linhagens.

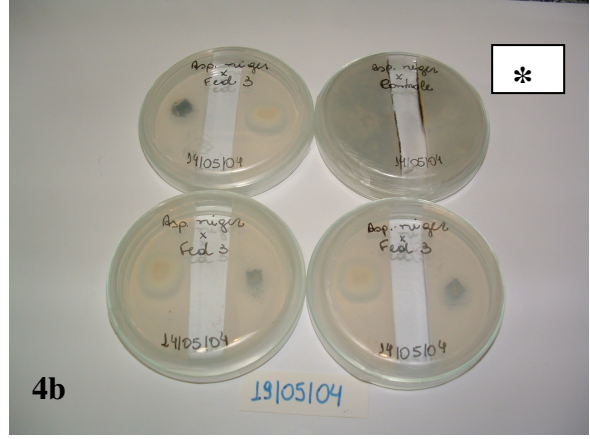
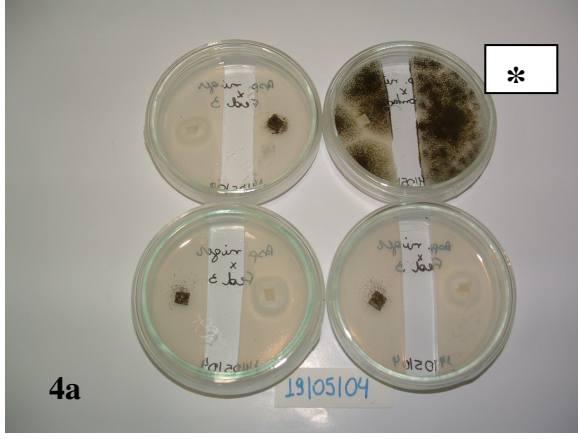
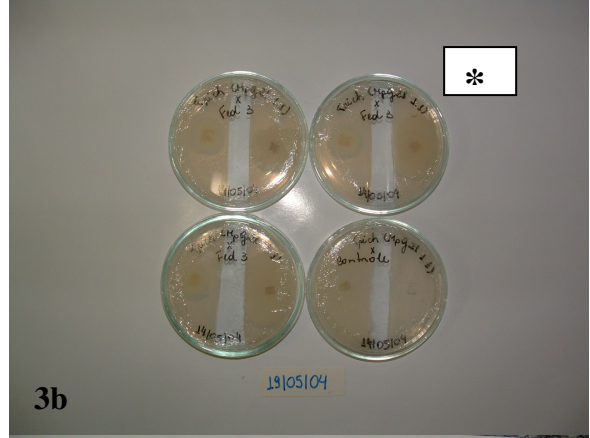
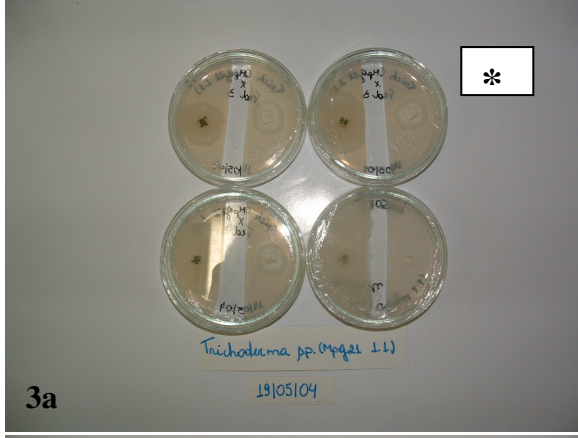
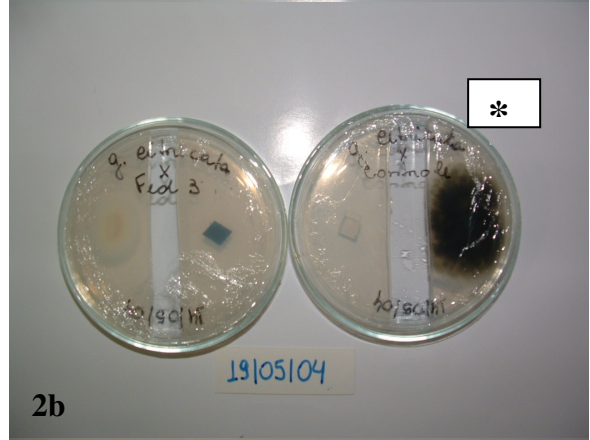
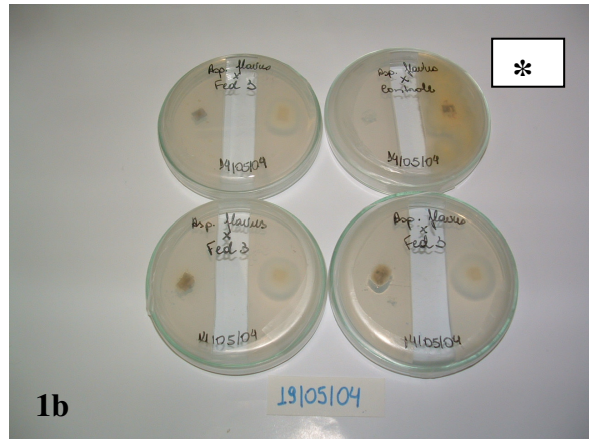
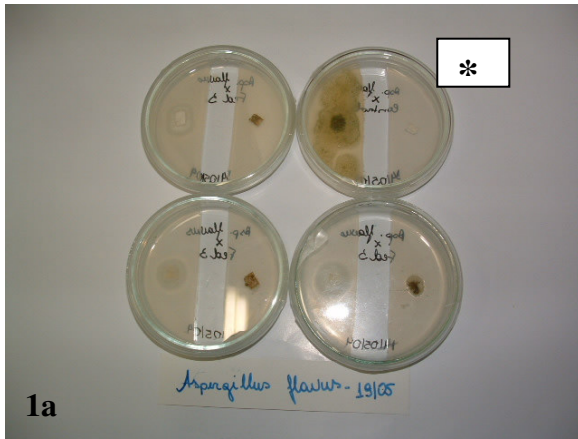
6.3.4 Ação Fungicida de Fed 3

Conforme descrito no **item 6.2.3** as linhagens denominadas **Fed** foram isoladas e conservadas devido o forte odor fétido que exalavam e por esse motivo tornaram-se o objeto dos testes de antibiose com voláteis. Duas linhagens (MpR3 2.3b e Mpg23 2.2b) tiveram seus voláteis ensaiados contra fungos fitopatógenos e apresentaram os mesmos resultados, conforme pode ser observado na **Tabela 12** e na **Figura 33**.

O acompanhamento da produção dos voláteis indicou o principio da produção a partir do segundo dia com ápice por volta do quarto ao sexto e diminuição significativa até o oitavo. Esta observação foi confirmada pelos experimentos realizados por Souza (2005), com análises diárias em GC-MS (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetria de Massas) dos voláteis da linhagem MpR3 2.3b (**Fed 3**).

Tabela 12: Resultados da ação dos voláteis de Fed contra fungos filamentosos de interesse humano e agrícola.

| Linhagens do Fed | Microrganismos-teste | Percentagem inibição |
|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 1 – MpR3 2.3b | <i>Dermateaceo</i> | 100% |
| 2 – MpR3 2.3b | <i>Penicillium sp.</i> | 100% |
| 3 – MpR3 2.3b | <i>Glomerella sp.</i> | 100% |
| 4 – MpR3 2.3b | <i>Aspergillus niger.</i> | 100% |
| 5 – MpR3 2.3b | <i>Fusarium sp.</i> | 50% |
| 6 – MpR3 2.3b | <i>Fusarium sp.</i> | 100% |
| 7 – MpR3 2.3b | <i>Fusarium sp.</i> | 50% |
| 8 – MpR3 2.3b | <i>Phaecylomices sp.</i> | 100% |
| 9 – Mpg23 2.2b | <i>Botryodiplodia rhodina.</i> | 50% |
| 10 – Mpg23 2.2b | <i>Aspergillus niger.</i> | 100% |
| 11 – Mpg23 2.2b | <i>Trichoderma sp.</i> | 50% |
| 12 – Mpg23 2.2b | <i>Aspergillus flavus.</i> | 100% |
| 13 – Mpg23 2.2b | <i>Fusarium moniliforme.</i> | 50% |
| 14 – Mpg23 2.2b | <i>Colletotrichum sp.</i> | 100% |
| 15 – Mpg23 2.2b | <i>Guignardia citricata.</i> | 100% |
| 16 – Mpg23 2.2b | <i>Fusarium gramineaceum.</i> | 100% |
| 17 – Mpg23 2.2b | <i>Phomopsis sp.</i> | 100% |



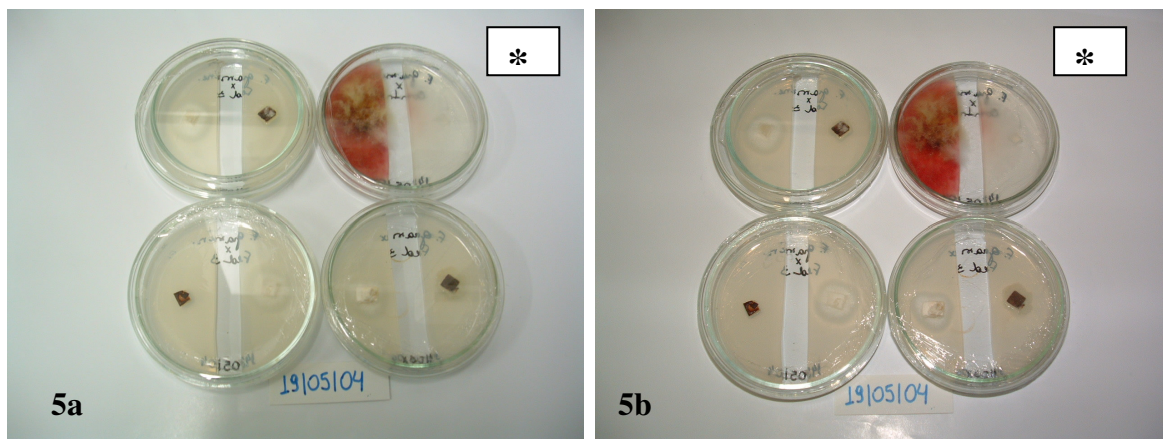


Figura 33: Antagonismo dos voláteis de duas linhagens de Fed contra fungos de interesse médico e agrícola. As letras **a** e **b** representam à frente e o dorso das placas após 72hs respectivamente. * Placa controle. Em **1** temos *Aspergillus flavus*, **2** - *Guignardia citricata*, **3** - *Trichoderma* sp., **4** - *Aspergillus niger* e em **5** - *Fusarium gramineaceum*.

Semelhante ao ocorrido com Strobel (2001) ao explorar a floresta tropical da América Central onde isolou um fungo desconhecido que produzia uma mistura complexa de substâncias voláteis bioativas, nesta pesquisa foi isolada uma possível nova espécie que produz uma mistura simples de ação fungicida e estática. Foram realizados também bioensaios dos voláteis contra bactérias patogênicas humanas, mas até o presente não encontramos resultados.

6.4 Isolamento e Identificação de metabólitos bioativos

6.4.1 Substâncias isoladas de *Trichoderma koningii*, linhagem F80.

A linhagem de *Trichoderma koningii*. – **F80** (**fig. 34**) foi isolada da casca da raiz de *Strychnos cogens* (Loganiaceae), coletada nas proximidades de Manaus por Souza (2001). Em ensaios prévios foram observados antagonismos de substâncias extracelulares contra os microrganismos testadores: *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* e, principalmente, *Aspergillus flavus* (**fig. 34** – Souza

et al, 2004), motivando seu estudo químico e sua identificação ao nível de espécie pelo perfil químico e pela molecular.

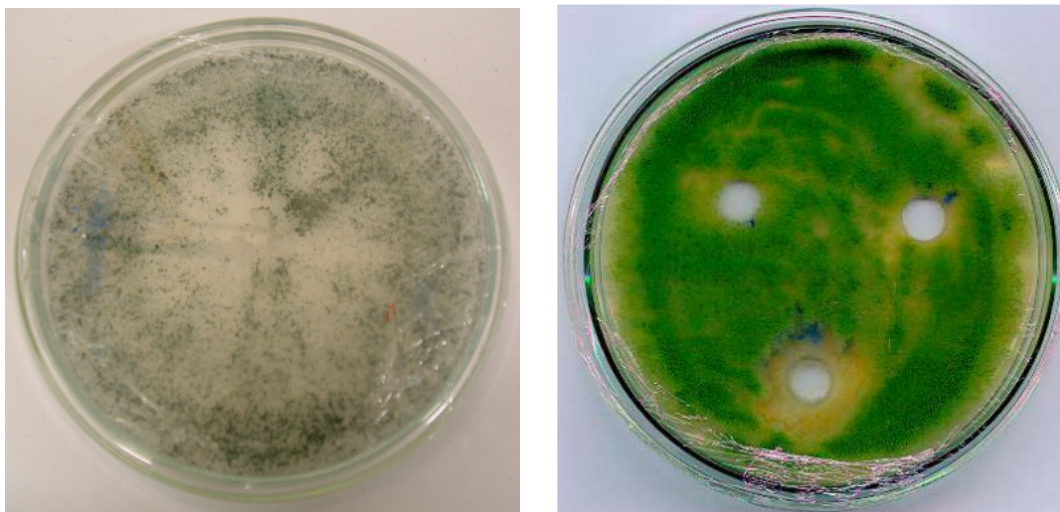


Figura 34: Aspectos macro-morfológicos de *Trichoderma koningii* (F80) em A. Inibição de *Aspergillus flavus* pelos metabólitos extracelulares de F80 em B (Souza *et al.*, 2003).

Na **Figura 35** estão apresentadas às substâncias isoladas em colaboração com Souza (2005), de **F80**: as koningininas como metabólitos extracelulares, embora tendo sido também detectadas no micélio; as duas seguintes apenas como metabólitos extracelulares e as demais exclusivamente como metabólitos intracelulares.

A diversidade de koningininas isoladas de **F80** reforça os resultados dos sequenciamentos da região ITS-1 que indica este isolado como *Trichoderma koningii* com 99% de identidade. Souza (2005) ao estudar o perfil químico dos metabólitos secundários de *Trichoderma*, linhagens estas isoladas de *M. paniculata*, encontrou duas classes predominantes de substâncias: as koningininas e os peptaibois, as quais ele sugere poderem ser usadas como marcadores quimio-taxonômicos deste grupo.

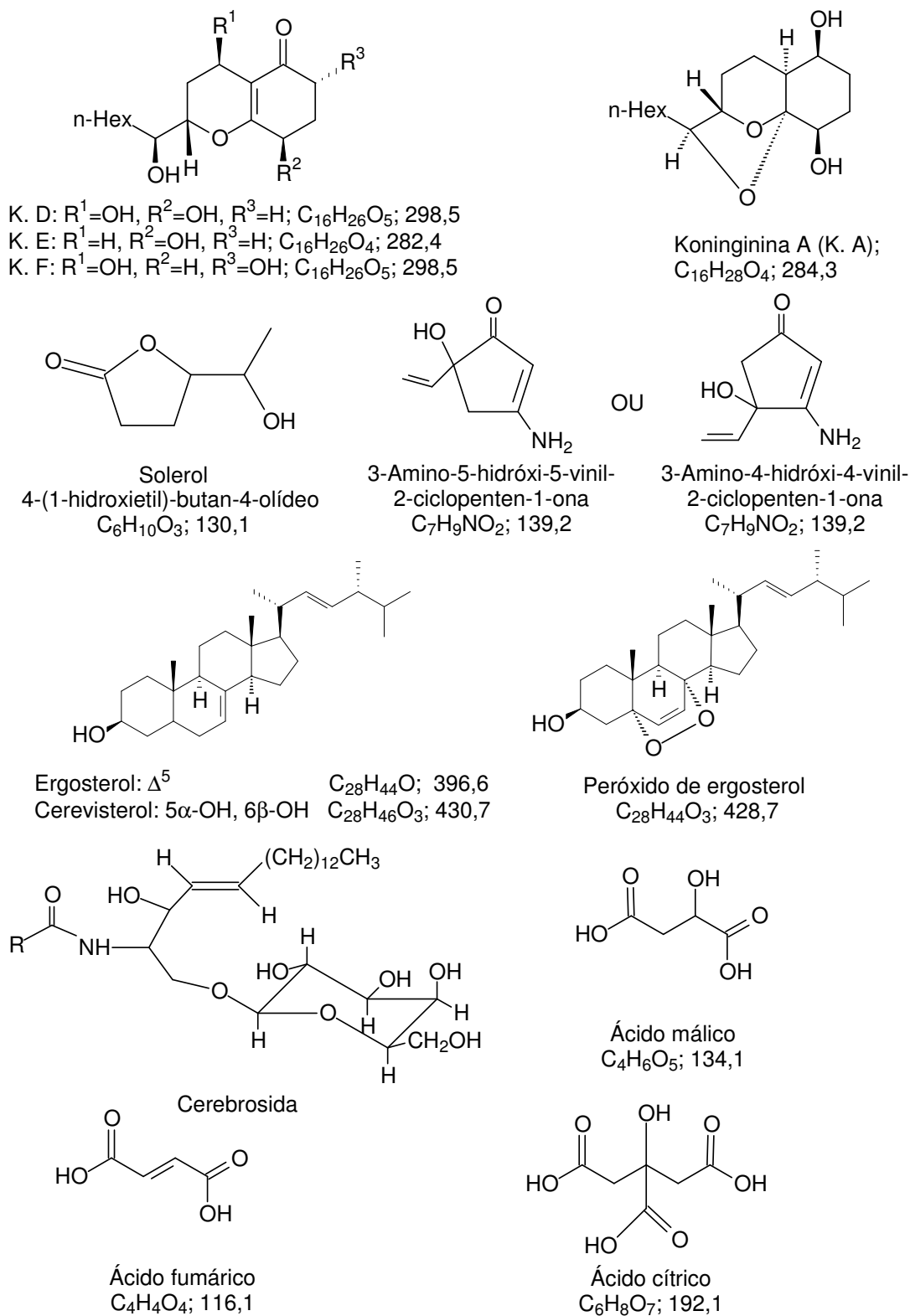


Figura 35: Substâncias isoladas de *Trichoderma koningii* – F80 (Souza, 2005).

A semelhança entre as koningininas e a vitamina E (**fig. 36**) sugeriu uma possível atuação anti-oxidante que foi comprovada recentemente para a

koninginina D e novos experimentos estão sendo desenvolvidos para verificar a possibilidade do uso biotecnológico desta. As substâncias anti-oxidantes agem bloqueando a ação lesiva de radicais livres sobre as estruturas celulares. Acredita-se, atualmente, que os radicais livres e outras espécies reativas estejam envolvidos em diversos processos patológicos da célula podendo acarretar câncer, doenças cardíacas, inflamação e envelhecimento. Sabe-se que a vitamina E e outras formas deste composto estão relacionadas na fisiologia normal do músculo e do sistema vascular (Vieira *et al*, 2002) sendo possível, portanto que as koningininas tenham semelhante ação.

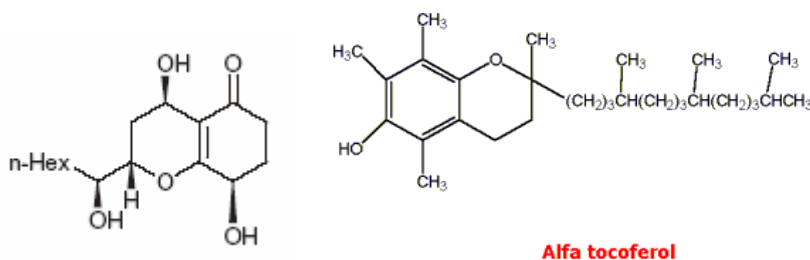


Figura 36: Semelhança entre a koninginina D e a vitamina E (alfa tocoferol).

Os isômeros do solerol foram detectados entre os componentes dos aromas de vinhos. Apoiados em suas observações os autores sugerem que estas lactonas podem ter sido produzidas por *Saccharomyces beticus* durante a armazenagem dos produtos (Muller *et al.*, 1969). Outros isômeros e compostos relacionados foram encontrados em frutos secos, figos e *Phoenix dactylifera* L., em variadas proporções (Krajewski *et al.*, 1995) e também foram isolados do cogumelo *Paxillus atromentosus* (Buchanan *et al.*, 1995). Embora estas e outras referências sugiram os isômeros do solerol como produzidos, alternativamente, por fungos e plantas, é possível que a detecção em frutos seja, de fato, indicativa da infecção por fungos, o que precisa ser investigado.

As substâncias cerebrosida e o ergosterol são comumente isoladas do micélio dos fungos por fazerem partes da parede e da membrana celular respectivamente. O peróxido de ergosterol não é comumente isolado entre os esteróides fúngicos, podendo ser um metabólito ou um produto da auto-oxidação do ergosterol. Citando outros autores, Bok *et al.* (1999) afirmam ser o peróxido de ergosterol uma substância endógena do fungo *Cordyceps sinensis* e demonstram que seu derivado glicosilado na posição 3 tem propriedades citotóxicas, o que está de acordo com seus isolamentos como substâncias intracelulares.

O Ergosterol é um esteróide e funciona também como pró-vitamina que sob a ação dos raios ultravioletas transforma-se em vitamina D₂. Os esteróides formam importantes grupos de substâncias para os animais como os hormônios sexuais, hormônios do córtex da supra-renal e ácido biliares entre outros, esses são semelhantes ao ergosterol.

A detecção dos peptaibois pelo perfil químico de *Trichoderma ovalisporum* (Tric 19 – MpGe16 1.3c), isolado da casca de *M. paniculata*, foi o que motivou o estudo químico dessa linhagem que continua em pesquisa química no DQ-UFSCar. Os ensaios antibacterianos preliminares dos extratos brutos desta linhagem apresentaram uma baixa atividade e novos ensaios de atividades biológicas devem ser direcionados a este grupo de substâncias, os quais têm descrito na literatura com atividades sobre células de mamíferos – espermatozóides e carcinomas (Peltola *et al.*, 2004). Contudo novos peptaibois podem ser identificados para esta espécie que foi recentemente descrita por Samuels *et al.*, (2004) em isolados de *Trichoderma* oriundos de plantas frutíferas da Amazônia e consequentemente sem estudos químicos.

6.4.2 Substâncias Isoladas de Fed 3

A linhagem denominada **Fed 3** foi isolada do córtex do galho de *M. paniculata* coletada em Águas da Prata – São Paulo. O estudo químico desta linhagem foi desenvolvido em colaboração com Souza (2005), e as substâncias isoladas estão apresentadas na **Figura 37**. As três primeiras são metabólitos extracelulares e as demais metabólitos intracelulares.

O primeiro é um novo sesquiterpeno tipo guaiano (1R, 4S, 5S, 7R, 10R) - 10-Hidroxiguaianol -manopiranosídeo e o segundo o 3-Hidroxi-5-fenilmethyl-(3S, 5R) - β 10-O- tetrahidrofuran-2-one, este último foi obtido para a primeira vez de uma fonte natural. A presença de manose em metabólitos de leveduras é conhecida, assim como a produção de guaianos por plantas, contudo essa junção nesse guaiano manosilado é intrigante e reforça a suposição de que **Fed 3** e outros isolados semelhantes sejam uma nova espécie.

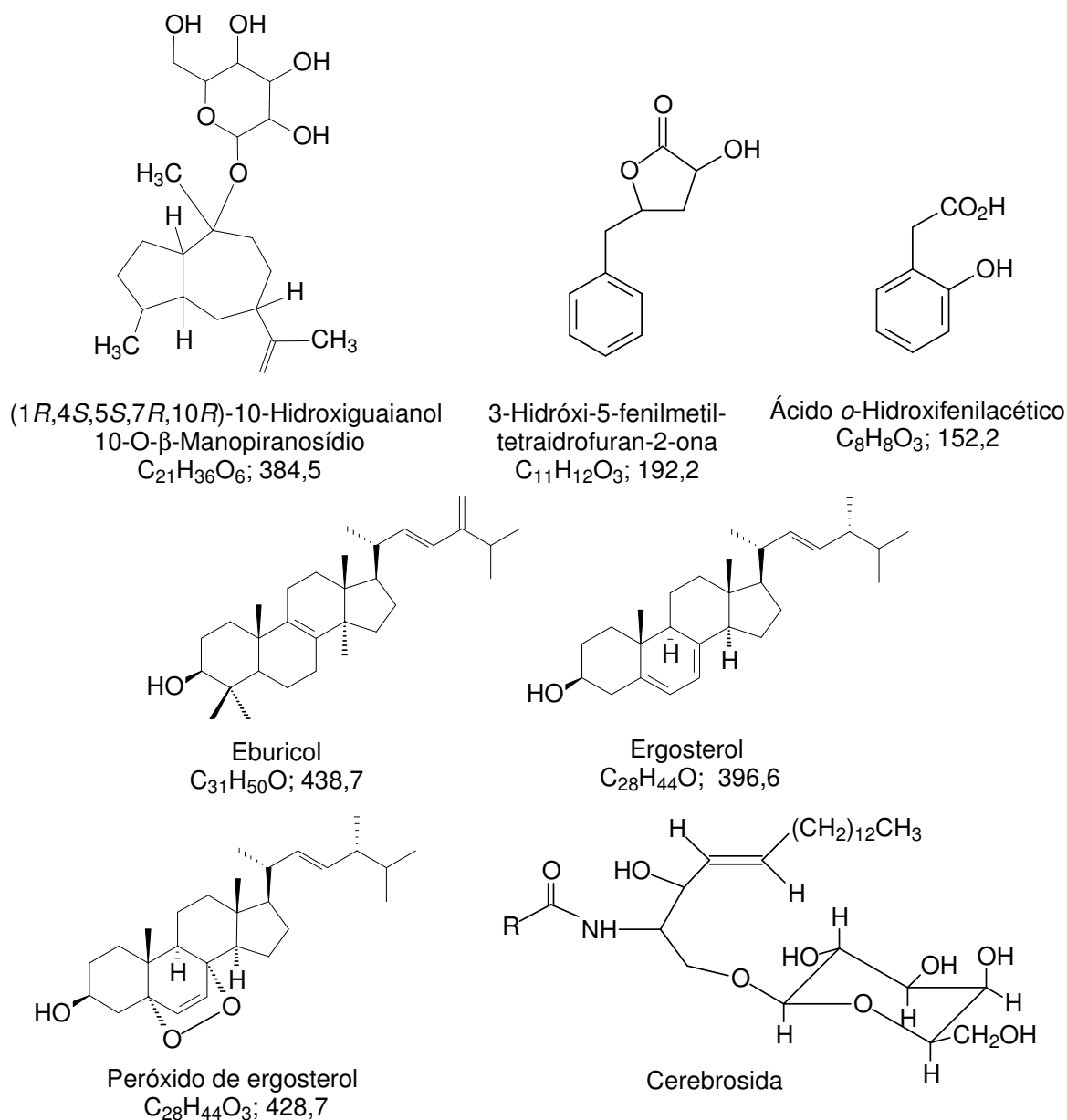


Figura 37: Substâncias isoladas da linhagem MpR3 2.3b – **Fed3** (Souza, 2005).

Amagata *et al.* (1998), isolaram um dos isômeros de 3-hidroxi-5-fenilmetil-tetraidrofuran-2-ona, denominado harzialactona A, de *Trichoderma harzianum* de origem marinha obtido da esponja *Halichondria okadae*. A região de Águas da Prata de onde foi coletada a planta *M. paniculata*, da qual foi isolado **Fed 3**, é reconhecida por seus lençóis freáticos. É possível que o ambiente aquático

favorável a **Fed 3** tenha influenciado na produção dessa molécula, mas é necessário que novos estudos comprovem esta observação.

Eburicol foi isolado de *Pyhcomyces blakesleeanus*, um Zygomyceto e das leveduras *Schizosaccharomyces pombe* e *S. octosporus* (Barrero *et al.*, 1998; Harmouch *et al.*, 1995). Existem duas rotas para a produção do ergosterol: a 1ª numa seqüência em que as desmetilações nos C-4 e C-14 precedem a transmetilação no C-24 em *Saccharomyces cerevisiae* e outras leveduras. Diversos experimentos indicam uma 2ª rota nos fungos filamentosos e em algumas espécies de leveduras onde ocorre primeiro a transmetilação.

Para *Eutypa lata* (Pers.), possível gênero a que o Fed pertence, um estudo sobre a composição de esteróides de várias linhagens resultou no isolamento, entre outros, dos esteróides lanosterol, ergosterol, 4 β -metilfecosterol, 4,4-dimetilfecosterol e eburicol, os três últimos com o metileno no C-24 e uma ou mais metilas nos C-4 e C-14 (Chapuis *et al.*, 1996). Este trabalho e o fato de que *Eutypa* spp. são fungos filamentosos indicam a rota em que a transmetilação no C-24 precede a perda das metilas nos C-4/14 como a mais provável para o gênero. A desmetilação do C-14 de fungos em ordem diferenciada em relação a plantas e animais permitiu o desenvolvimento de diversos fungicidas utilizados na agricultura (Chapuis *et al.*, 1996; Dewick, 2004; Souza, 2005).

Nas leveduras *Schizosaccharomyces pombe* e *S. octosporus* ocorrem as duas rotas. O tempo de divergência no reino *fungi* datado pelo relógio molecular é de 900 Ma. Entre os primeiros grupos a divergirem estão os Zygomycetos a 800 Ma, os Ascomycotas a aproximadamente 420 Ma, dentro deste grupo *S. pombe* a aproximadamente 320 Ma e os grupos *Saccharomyces* e *Candida* por volta de 150 Ma estão entre os ascomicetos mais recentes (Berbee & Taylor, 2000). Quando

comparado estes dados com as rotas da produção do ergosterol pode se sugerir que as transmetilações precederam as desmetilações, como observado para os grupos citados, mas necessários ainda outros dados que o comprovem.

6.4.2 Análise dos voláteis de Fed 3

Sempre que inoculados **Fed 3** e outras linhagens semelhantes apresentaram um odor forte e desagradável a partir do segundo dia até por volta do oitavo dia e que apresentava forte ação fungicida (ver **itens 2.7.4, fig. 23a e tab. 8**). Por esse motivo **Fed 3** que já estava sendo estudado quimicamente para identificação de metabólitos fixos, foi também selecionado para a avaliação dos seus voláteis em colaboração com Souza, 2005.

As análises dos cromatogramas de **Fed 3**, obtidos por CG/EM, revelaram inúmeros picos de diversas intensidades, podendo chegar a cerca de duas centenas de acordo com a maneira de proceder à integração das respectivas áreas. Por isso foi necessário o acompanhamento diário (2 semanas) e o confronto com o branco (placa de petri com BDA sem o microrganismo) para se obter os reais metabólitos voláteis. A **Figura 38** apresenta o aparelho de micro-extração em fase sólida (SPME) usado para captar os voláteis.

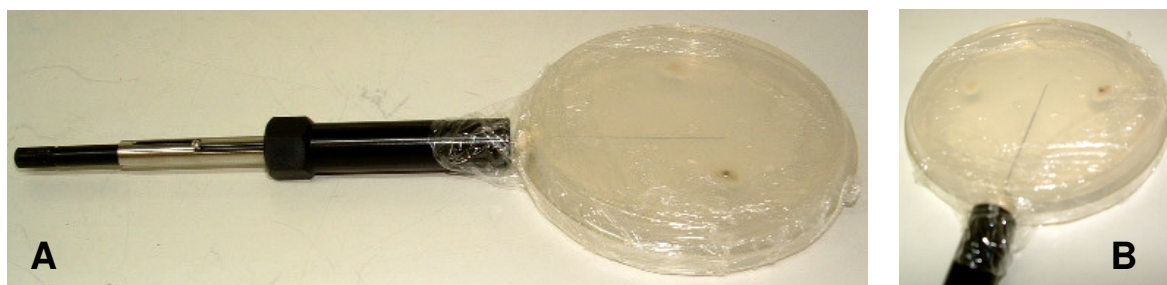


Figura 38: Captação dos voláteis de Fed 3 pelo aparelho de micro-extração em fase solida (SPME). Em **A** retenção dos voláteis e em **B** destaque da fibra, sem contado com o meio de cultura ou com o fungo.

Após a exclusão dos picos correspondentes ao branco foi possível identificar apenas três picos atribuíveis ao **Fed 3 (tab. 11)**. O primeiro pico foi detectado apenas a partir do terceiro dia e, processado, foi sugerido como correspondente à cloroacetoneitrila. Os outros dois picos cromatográficos foram observados já no primeiro dia de crescimento do fungo e seus espectros de massas correspondem a possíveis sesquiterpenos de pesos moleculares iguais a 204 u.m.a. O primeiro foi sugerido como Guaia-1(10),11-dieno e para o segundo não foi apresentada nenhuma sugestão com perfil adequado pela biblioteca do sistema CG/EM.

Tabela 13: Voláteis de Fed 3 detectados por micro-extração em fase sólida, após a comparação e eliminação dos picos residuais do branco (adaptado de Souza, 2005).

| Pico | t _R | Área/% | Possível Identificação | Similaridade/% |
|------|----------------|--------|------------------------|----------------|
| 1 | 1,992 | 14,98 | Cloroacetoneitrila | 85 |
| 2 | 44,017 | 0,68 | Guaia-1(10),11-dieno | 88 |
| 3 | 45,531 | 1,60 | Sesquiterpeno | |

Obs: Áreas calculadas considerando, aproximadamente, os 112 picos mais intensos no cromatograma de Fed 3 obtido após cinco dias de cultivo.

A cloroacetoneitrila tem sido usada na síntese de moléculas e é obtida por síntese, sendo este o primeiro relato de isolamento natural. Devido à coincidência dos picos de produção com as observações no laboratório do odor fétido do Fed sugerimos ser esta molécula o princípio ativo dos voláteis dele, mas é necessária a confirmação por ensaios com a cloroacetoneitrila semelhantes aos realizados com Fed 3 e Fed 15. A produção da cloroacetoneitrila por volta do terceiro dia explica porque alguns fungos de crescimento rápido se desenvolviam e depois cessavam o crescimento (ver **tab. 10**).

A presente pesquisa demonstra como é de vital importância o conhecimento

da comunidade endofítica de forma geral e com destaque para as plantas medicinais. O potencial genético e químico destes microrganismos muito pode contribuir para o conhecimento das interações bioquímicas e evolutivas – plantas/microrganismos, assim como para a descoberta de novos metabólitos.

7 – CONCLUSÕES

Da pesquisa realizada com a planta *Murraya panícula* objetivando o conhecimento sobre: a biodiversidade endofítica desta hospedeira tropical, o índice de colonização nas estações sazonais, a frequência dos grupos, seus micro-habitats e o potencial na produção de substâncias bioativas e de novos compostos podemos concluir:

1. O estudo da biodiversidade e diversidade química dos endófitos de *M. paniculata* se mostrou oportuno e promissor ao se descobrir no mínimo uma possível nova espécie fúngica (**Fed**) e a descoberta de uma molécula inédita – o guaiano manosilado e outras duas ainda não encontradas em produtos naturais.

2. O isolamento e o cultivo dos endófitos evidenciaram uma população numerosa e diversa de microrganismos associados à planta hospedeira.

3. A distribuição dos micro-habitat foi independente da sazonalidade, sendo, no entanto esta importante no índice de colonização.

4. A maior índice de colonização para os fungos endofíticos foi encontrado no outono (77,7%) em contraste com o verão (44,7%).

5. Houve um maior índice de colonização dos fungos frente as bactérias.

6. Existem grupos de fungos endofíticos altamente especializados a tecidos específicos da planta e elas próprias.

7. Foi detectado pela morfologia e pelo sequenciamento da região ITS-1 uma alta diversidade dentro dos gêneros de fungos endofíticos isolados.

8. Foi detectado pelos ensaios biológicos o antagonismo de bactérias endofíticas de *M. paniculata* frente à *Pythium* sp., um bioindicador de substâncias anti-cancerígenas.

9. As linhagens de *Penicillium* isoladas foram promissoras na produção de antibióticos, podendo haver outras linhagens com os mesmos potenciais ou com outros potenciais a serem explorados.

10. Foram isoladas e identificadas de **F80** (*Trichoderma koningii*) várias substâncias entre elas quatro honinginas, responsáveis pela ação bactericida e fungicida detectada pelos ensaios de atividade antimicrobiana.

11. As linhagens de **Fed** são produtoras de substâncias voláteis fungicidas.

12. Foram isoladas 10 substâncias de **Fed 3**, sendo uma inédita e outras duas isoladas pela primeira vez de produtos naturais. O que corrobora para a hipótese deste microrganismo ser uma nova espécie.

8 – REFERÊNCIAS

- Ahlholm, J. U., Helander, M., Lehtimäki, S., Wäli, P. & Saikkonen, K.; 2002.
Vertically transmitted fungal endophytes: different responses of host-parasite systems to environmental conditions; **Oikos**; v. 99; p. 173 –183.
- Amagata, T.; Usami, Y. & Minoura, K.; 1998; Cytotoxic substances produced by a fungal strain from a Sponge: physico-chemical properties and structures. **The Journal of Antibiotics**; v. 51; n.1; p 33-40.
- Azevedo, J. L. e Costa S. O. P.; 1973; **Exercícios Práticos de Genética**; São Paulo – S.P.; 288p.
- Azevedo, J. L., Maccheroni Jr. W., Pereira, J. O. & Araújo, W. L.; 2000; Endophytic Microorganisms: A Review on Insect control and Recent advances on Tropical Plants; **Electronic Journal of Biotechnology**, v. III, n. 1, <http://www.ejb.org/copyri.html>.
- Azevedo, J. L.; 1998; Microrganismos endofíticos; *in*: Melo, I. S. e Azevedo, J. L. eds.; **Ecologia Microbiana**; Jaguariúna – SP, Ed. EMBRAPA, 488p.
- Barrero, A. F.; Oltra, J.E.; Poyatos, J. A.; Jiménez, D. & Oliver, E. “Phycomysterols and Other Sterols from the Fungus *Phycomyces blakesleeanus*”. *Journal of Natural Products*. **61**: 1491-1496, 1998.
- Barros, F. A. P.; 2002; Metabólitos Secundários de *Eupenicillium* sp., um Fungo Endofítico isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae); (Dissertação de Mestrado); UFSCar – SP; 181p.

Bary, A.; 1866; Morphologie und physiologie der Pilze Flechten, und Myxomyceten:

II, **Hofmeister's Handbook of Physiological Botany**, Leipzig.

Bennett J. W. & Klich M.; 2003; Mycotoxins; **Clin. Microbiol. Rev.**; v. 16; p. 497 - 516.

Benton M. J. & Ayala F. J.; 2003; Dating the Tree of Life; **Science**; v. 300; p. 1698 – 1700.

Berbee M. L. & Taylor W.; 2001; Fungal Molecular Evolution: Genes Trees and Geologic Time; **The Mycota VII Part B – Evolution and Sistematic**; p. 229 – 245.

Bills, G., A. Dombrowski, F. Pelaez, J. Polishook, & Z. An; 2002; Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi; *In*: Watling R., Frankland J. C., Ainsworth A. M., Issac S. & Robinson C. H.. (ed.), **Tropical mycology: micromycetes**; v. 2. CABI Publishing; New York - N.Y.; p.165–194.

Blackwell M.; 2000; Terrestrial Life--Fungal from the Start?; **Science**; v. 289; n. 5486; p. 1884 – 1885.

Bok, J. W.; Lermer, L.; Chilton, J.; Klingeman, H. G. & Towers, N. G. H.; 1999; Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*; **Phytochemistry**; v. 51; p. 891-898.

Buchanan, M. S.; Hashimoto, T.; Takaoka, S. & Asakawa, Y.; 1995; "(+)-Osmundalactone, \square -lactones and spiromentins from the fungus *Paxillus atrotomentosus*"; **Phytochemistry**, v. 40; n. 4; p.1251-1257.

- Buzina W., Lang-Loidolt D., Braun H., Freudenschuss K. & Stammberger H.; 2001; Development of Molecular Methods for Identification of *Schizophyllum commune* from Clinical Samples; **Journal Of Clinical Microbiology**; Vol. 39; n. 7; p. 2391–2396.
- Carroll, G. C.; 1986; The Biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: Fokkema, N. J. e Heuvel, J. van den., ed. **Microbiology of Phyllosphere**; London; Cambridge Univesity Press; p. 205-222.
- Castellani, A., 1939, Viability of mold culture of fungi in destiied water, **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 42, p.225.
- Chapuis, L.; Corio-Costet M.-F. & Malosse, C. “Sterol composition of the woody plant pathogenic fungus *Eutypa lata*”. *Phytochemistry*, **42**(6): 1599-1601, 1996.
- Christensen M. J.; 1996; Antifungal activity in grasses infected with *Acremonium* and *Epichloe* endophytes; **Austalasian Plant Phythology**; v. 25; p.186–191.
- Collado, J., Platas, G., Gonzáles, I. & Pélaez, F.;1999; Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*; **New Phytol**; v. ; p. 525 - 532.
- Cordeiro Neto, F. e Dietrich, S. M. C.; 1992; Phytoalexin induction by leaf-surface fungi of tropical Rubiaceae; **Ciência e Cultura**; v. 44; p. 342–344.
- Corpet F.; 1988; Nucl. Acids Res.; v. 16 22; p. 10881-10890.
- Cutler H. G., Cutler S. J., Ross S. A., Sayed K. E., Dugan F. M, Bartlett M. G., Hill A. A., Hill R. A. & Parker S. R.; 1999; Koninginin G, a new metabolite from trichoderma aureoviride; **J Nat Prod.**; v. 62; p. 137-9.

- Daniel J.F.S., Souza A. Q. L. de; Pereira J. O.; Rodrigues-Filho E.; 2006; **Seleção de meio de cultivo para a produção de peptídeos por *Trichoderma ovalisporum***; *In*: III Workshop de Biocatálise; *In*: II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones; São Paulo - SP. Resumo do II Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones; p. 8-8.
- Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products*. New York, USA, John Wiley & Sons, II Ed. 2004, 466.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L.; 1987; A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue; **Phytochem**; Bull. 19, 11–15.
- Estrada-De-Los-Santos, P., Bustillos-Cristales, R. & Caballero-Mellado, J.; 2001; *Burkholderia*, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution; **Applied and Environmental Microbiology**; v. 67; p. 2790 – 2798.
- Ferracini, R. J.; 1996; **Estudo Fitoquímico de *Murraya paniculata***; (Tese de Doutorado); UFSCar-SP.
- Ferreira M. E. & Grattapaglia D; 1998; Introdução ao uso de marcadores RAPD. e RFLP em análise genética; EMBRAPA; p. 441-494.
- Fungaro, M. H. P.; 2001; PCR na Micologia – Diagnostico e Análise de Variabilidade; **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**; v. 14, p. 12 – 16.
- Gao, X.-X., Zhou, H., Xu, D.-Y., Yu, C.-H., Chen, Y.-Q., Qu, .L-H.; 2005; High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica*

- Kunth revealed by cultivation-independent approach; **FEMS Microbiology Letters**; v. 249; p. 255 – 266.
- Gessner, R. V., 1977; Seasonal occurrence and distribution of fungi associated with *Spartina alterniflora* from a Rhode sland estuary; **Mycologia**; v. 69; p. 477 - 491.
- Gottlieb O. R., Kaplan M. A. C. & Borin, M. R.; 1996; **Biodiversidade: Um Enfoque Químico Biológico**; UFRJ – RJ; 268p.
- Grodzicker T, Lewis JB, Anderson CW; 1976; Conditional lethal mutants of adenovirus type 2-simian virus 40 hybrids: II. Ad2⁺ND1 host-range mutants that synthesize fragments of the Ad2⁺ND1 30K protein. **J. Virol.**; v. 19; p. 559-571.
- Hansen M. E., Andersen B. & Smedsgaard J.; 2005; Automated and unbiased classification of chemical profiles from fungi using high performance liquid chromatography; **Journal of Microbiological Methods**; v. 61; n. 3; p. 295 – 304.
- Harmouch, N.; Coulon, J. & Bonaly, R. “Identification of 24-methylene-24,25-dihydrolanosterol as a precursor of ergosterol in the yeasts *Schizosaccharomyces pombe* and *Schizosaccharomyces octosporus*”; 1995; **FEMS Microbiology Letters**; v.134; 147- 152,.
- Harrison M. J; 2005; Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis; **Annu Rev Microbiol**; v. 59; p.19-42.
- Hawksworth, D. C. & Rossman, A. Y.; 1987; Where are the undescribed fungi?; **Phytopathology**; v. 87; p. 888±891.

- Heckman D. S., Geiser D. M., Eidell B. R., Stauffer R. L., Kardos N. L., Hedges S. B.; 2001; Molecular Evidence for the Early Colonization of Land by Fungi and Plants; **Science**; v. 293. n. 5532, p. 1129 – 1133.
- Hong Lu, Zou, W. X., Meng, J. C., Hu, J & Tan, R. X.; 2000; New Bioactive Metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an Endophytic fungus in *Artemisia annua*; **Plant Science**; v. 151; p. 67 – 73.
- James E.K., Reis V.M., Olivares F.L., Baldani J.I. & Döbereiner J.; 1994; Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*, **J. Exp. Bot.**; v. 45; p. 757 - 766.
- Kawamoto S. O. & Lorbeer J. W.; 1976; Protection of Onion Seedling from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* by Seed and Soil Infestation with *Pseudomonas cepacia*, **Plant Dis.**; v. 60; p. 189 –191.
- Knoch, T. R., Faeth, S. H. & Arnott, D. L.; 1993; Endophytic Fungi Alter Foraging and dispersal by desert seed- harvesting ants; **Oecologia**; v. 95; p. 470 – 473.
- Krajewski, D.; Neugebauer, W.; Amajoyi, I. K.; Schreier, P. & Bicchi, C.
“Enantiodifferentiation of solerol isomers in dried figs and dates”. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, **201**(4): 378-380, 1995.
- Larena I., Salazar O., González V., Julián M. C. & Rubio V.; 1999; Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes; **Journal of Biotechnology**; v. 75; p. 187–194.

- Lechevalier, M. P. & Lechevalier, H. A.; 1970; Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes; **International Journal of Systematic Bacteriology**; v. 20; p. 435 – 443.
- Li J.Y., Harper J. K, Grant D. M., Tombe B. O., Bashyal B., Hess W. M, & Strobel G. A.; 2001; Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp.; **Phytochemistry**; v. 56; p. 463-8.
- Lingfei, L., Anna, Y. & Zhiwei, Z.; 2005; Seasonality of arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes in a grassland site in southwest China; **FEMS Microbiology Ecology**; v. 54; p. 367 – 673.
- Long, D. M., Smidansky, E. D., Archer, A. J. & Strobel, G. A.; 1998; *In Vivo* Addition of Telomeric to Foreign DNA Generates Extrachromosomal DNAs in the Taxol-Producing Fungus *Pestalotiopsis microspora*; **Fungal Genetics and Biology**; v. 24; p. 335-344.
- Lutgen, E. R., Muir-Clairmont, D., Graham, J. & Rillig, M. C; 2003; Seasonality of arbuscular mycorrhizal hyphae and glomalin in a western Montana grassland; *Plant and Soil*; v. 257; p. 71–83.
- Magnani R. F., Rodrigues-Fo E., Daolio C., Ferreira A. G. & Souza A. Q. L. de; 2003; Three highly oxygenated caryophyllene sesquiterpenes from *Pestalotiopsis* sp., a fungus isolated from bark of *Pinus taeda*; **Z Naturforsch [C]**; v. 58; p. 319-24.
- Marinho A. M. R.; 2005^a; Metabolismo secundário de fungos endofíticos do gênero *Penicillium* associados às plantas *Melia azedarach* (Meliaceae) e *Murraya paniculata* (Rutaceae); Tese (Doutorado); São Carlos –UFSCar; 280 p.

- Marinho A. M. R.; 2005^b; **Estudo Químico de *Penicillium* sp., fungo associado a *Murraya paniculata* (Rutaceae)**; *In*: XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química; Poços de Caldas-MG.
- May G. S. & Adams T. H.; 1997; The Importance of Fungi to Man; **Genome Res.**; v. 7: p. 1041.
- Mengoni, A., Mocali, S., Surico, G., Tegli, S. & Fani, R; 2003; Fluctuation of endophytic bacteria and hytoplasmosis in elm trees; **Microbiol Res**; v. 158; p. 363 – 369.
- Mittermeier R. A., N. Meyers P. R. Gil, & Mittermeier C. G.; 1999; Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered ecoregions. **Toppan Printing Co.**; Tokyo-Japan.
- Muller, C. J.; Maggiora, L.; Kepner, R. E. & Webb, A. D. "Identification of two isomers of 4,5-dihydroxyhexanoic acid gamma lactone in Californian and Spanish flor sherries". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **17**(6): 1373-1376, 1969.
- Mullis K. & Faloona F.; 1987; Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction; **Methods in Enzymology**; v. 55; p. 335 – 350.
- Munkvold, G. P.; 2001; Eutypa dieback of grapevine and apricot; Online: **Plant Health Progress** doi:10.1094/PHP-2001-0219-01-DG.
- Neves, M. C. P. & Rumjanek, N. G.; 1998; Microrganismos endofíticos, *in*: Melo, I. S. e Azevedo, J. L. eds., **Ecologia Microbiana**, Jaguariúna – SP, Ed. EMBRAPA, 488 p.

- Nicholas J. B.; 2005; Probable Proterozoic fungi; **Paleobiology**; v. 31; n.1; p. 165-182.
- Oh SookKyung D., Pascal K., Keathley D. E. & Kyung-Hwan H.; 2003; Detection and Species Identification of Wood-Decaying Fungi by Hybridization of Immobilized Sequence-Specific Oligonucleotide Probes with PCR-Amplified Fungal Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers; **Holzforschung**; v. 57; p. 346–352.
- Pastre R. & Rodrigues-Filho E.; 2006; **Busca por substâncias com atividade biológica em extratos de fungos endofíticos**; *In*: XIV Congresso de Iniciação Científica; São Carlos-SP.
- Pastre R., Souza A. Q. L. de & Rodrigues-Filho E.; 2005; **Deteção de compostos bioativos em culturas de espécies de *Penicillium***; *In*: XIII Congresso de Iniciação Científica; São Carlos-SP.
- Peltola, J., Ritieni, A., Mikkola, R., Grigoriev, P. A., Pócsfalvi G., Andersson, M. A. & Salkinoja-Salonen M. S.; 2004; Biological Effects of *Trichoderma harzianum* Peptaibols on Mammalian Cells; **Applied and Environmental Microbiology**; v. 70; n. 8; p. 4996-5004.
- Petrini O.; 1991; Fungal endophyte of tree leaves; *In*: Andrews J. & Hirano S. S., eds; **Microbial Ecology of Leaves**; Springs Verlag - New York; p. 179 - 197.
- Pleban S., Chernin L., Chet I.; 1997; Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*; **Letters in Applied Microbiology**; v. 25; p. 284-288.

- Pukahuta, C., Limtong, S., Suwanarit, P. & Nutalayam S; 200; Species Diversity of *Trichoderma* Contaminating Shiitake Production Houses in Thailand; **Kasetsart J** (Nat. Sci.); v. 34; p. 478-85.
- Redecker, D., Kodner R., Graham L. E.; 2000; Glomalean Fungi From The Ordovician; **Science**; v. 289; p. 1920-1921.
- Ribeiro J. E. L. S., Hopkins M. J. G., Vicentini A. *et al.*; 1999; Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central; Maus – Am; INPA; 816 p.
- Rodrigues K. F. & Dias-Filho M. B.; 1996; Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* CV. Marandu and *B. humidicola*, **Pesq. Agropec. Bras.**; v. 31; p. 905-909.
- Rodrigues-Filho E., Pastre R., Marinho A. M. R., Souza A. Q. L. & Pereira, J. O.; 2006; Diversidade de Policetídeos Produzidos por Espécies de *Penicillium* Isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata* (artigo submetido); **Química Nova**; Brasil; v. 0; n. 0; p. 000-000.
- Rohr J.; 1997; Biosynthesis of taxol; **Angewandte Chemie – International**; Edition English; v. 36; p. 2190 – 2195.
- Russo C. A. M., Miyaki C. Y.; Pereira S. L.; 2001; Reconstrução Filogenética: Métodos Geométricos; *In*: **Biologia molecular e evolução**; Matioli R. S. (ed); Ribeirão Preto - São Paulo; p.108 – 116.

- Saiki R. K.; Gyllensten U. B.; Erlich H. A.; 1988; The polymerase chain reaction; **Genome analysis, a practical approach**; *In*: K. E. Davies (ed.); IRL Press; Oxford; p. 141–157.
- Saikkonen K., Faeth S. H., Helander M., Sullivan T. J.; 1998; Fungal Endophytes: A Continuum of Interactions with Host Plants; **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29; p. 319-343.
- Samuels G. J.; 2004; *Trichoderma ovalisporum*: A new endophytic species with potential to control frosty pod rot of cocoa; **Mycol. Prog.**
- Samuels, G. J., Dodd, S. L., Gams, W., Castlebury, L. A. & Petrini, O; 2002; *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**; v. 94; p. 146-170.
- Santamaría J. & Bayman P.; 2004; Fungal Epiphytes and Endophytes of Coffee Leaves (*Coffea arabica*); **Microbial Ecology** (on line).
- Santos, R. M. G. & Rodrigues-Fo. E.; 2003; Structures of Meroterpenes Produced by *Penicillium* sp, an Endophytic Fungus Found Associated with *Melia azedarach*; **J. Braz. Chem. Soc.**; v. 14; p. 722-7.
- Schardl C. L., Leuchtman A. & Spiering M. J.; 2004; Symbioses of Grasses with Seedborne Fungal Endophytes; **Annual Review of Plant Biology**; v. 55; p. 315-340.
- Selosse M-A. & Le Tacon, F.; 1998; The land flora: a phototroph–fungus partnership?; **Tree**; v. 13; n. 1.

- Shapira R., Paster N., Eyal O., Menasherov M., Mett A. & Salomon, R.; 1996; Detection of aflatoxigenic mold in grains by PCR; **Applied and Environmental Microbiology**; v. 62, p. 3270 – 3273.
- Shirling E. B. & Gottlieb D.; 1966; Methods for characterization of *Streptomyces* species, **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, p. 313 – 340.
- Sigüenza, C., Espejel, I. & Allen E. B.; 1996; Seasonality of mycorrhizae in coastal sand dunes of Baja California; **Mycorrhiza**; v. 6; p. 151 – 157.
- Silva M. F. das G. F. da, Gottlieb, O. R. & Ehrendorfer, F.; 1988; Chemosystematics of the Rutaceae: suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary of the family; **Plant Systematic Evolution**; v. 161; p. 97 – 134.
- Smalla K.; Wieland G.; Buchner A.; Zock A.; Parzy J.; Kaiser S.; Roskot N.; Heuer H. & Berg G.; 2001; Bulk and Rhizosphere Soil Bacterial Communities Studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: Plant-Dependent Enrichment and Seasonal Shifts; **Applied and Environmental Microbiology**; v. 67; n. 10; p. 4742-4751.
- Souza A. D. L. de; 2005^a; Perfis químicos e metabólitos de fungos endofíticos dos gêneros *Eutypa*, *Trichoderma* e *Pestalotiopsis* isolados das plantas *Murraya paniculata*, *Strychnos cogens*, *Pinus taeda* e *Gustavia cf. elliptica*; Tese (Doutorado); São Carlos –UFSCar; 302 p.
- Souza A. D. L.^b; Souza A. Q. L. de; Pereira, J. O. & Rodrigues-Filho, E.; 2005; **Estudo químico de *Eutypa* sp., um fungo endofítico de *Murraya paniculata*** **Identificação de um guaiano glicosilado**; *In*: 28^o Congresso Brasileiro de Química, Poços de Calda - MG.

- Souza A. D. L.^c; Souza A. Q. L. de; Magnani, R. F. & Rodrigues-Filho, E.; 2005; Produção do ácido 3-Nitropropiónico por *Pestalotiopsis disseminata* endofítico de *Pinus taeda* possível causa de desvio no metabolismo secundário do fungo; *In*: 28º Congresso Brasileiro de Química; Poços de Calda – MG.
- Souza A. Q. L. de; Souza A. D. L.; Henrique-Silva F.; Pinheiro M. L. B.; Franca S. C. & Pereira J. O.; 2005; **Diversidade e atividade biológica de *Pestalotiopsis* isolados de *Gustavia cf. elliptica*, uma Lecytidaceae da Amazônia Brasileira;** *In*: 51º Congresso Brasileiro de Genética; Águas de Lindóia-São Paulo; SBG; p. 1151-1151.
- Souza A. Q. L. de; Souza A. D. L.; Rodrigues-Filho E.; Henrique-Silva F.; Franca S. C. & Pereira J. O.; 2005; Antibiose dos metabólitos fixos e voláteis de uma possível espécie nova de *Eutypa* identificada pelas regiões ITS-1 e ITS-2 do rDNA; *In*: 51º Congresso Brasileiro de Genética; Águas de Lindóia-São Paulo; SBG; p. 1106-1106.
- Souza A. Q. L. de^a; Souza A. D. L.; Rodrigues-Filho, E. & Pereira, J. O.; 2003; **Biodiversidade de Fungos Endofíticos Isolados de *Murraya paniculata* no Estado de São Paulo.** *In*: I Workshop do Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução; São Carlos- S.P.; I Workshop do Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução.
- Souza, A. Q. L. de^b; Souza, A. D. L.; Rodrigues Filho, E. & Pereira, J. O.; 2003; **Antagonism of Endophytic Bacteria Isolated from *Murraya paniculata* L. (Jack) against *Pythium* sp.;** *In*: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular; Caxambu - MG.

- Souza A. Q. L. de, Souza A. D. L., Astolfi Filho S., Pinheiro M. L. B., Sarquis M. I. M. & Pereira J. O.; 2004; Atividade Antimicrobiana de Fungos Isolados de Plantas Tóxicas da Amazônia: *Palicourea Longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos Cogens* Bethan; **Acta Amazônica**; v. 34 (2); p. 185 -195.
- Souza A. Q. L. de; 2001; Fungos Endofíticos de Plantas Tóxicas da Amazônia, *Palicourea Longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benthams; (Dissertação de Mestrado); UFSCar – SP; 102p.
- Stamford T. L. M., Araújo J. M. & Stamford N. P., 1998, Atividade Enzimática de Microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban), **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 18, n. 4, Sielo.
- Staneck J. L. & Roberts G. D.; 1974; Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography; **Applied Microbiology**; v. 28; p. 226 – 231.
- Stierle, A. *et al.*; 1993; Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreane*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew; **Science**; v. 260; p. 214-216.
- Strobel G. & Daisy B.; 2003; Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products; **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**; v. 67; p. 491 - 502.
- Strobel G. A., Dirkse E., Sears J. & Markworth C.; 2001; Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus; **Microbiology**; v. 147; p. 2943.
- Strobel G. A., Hess W. M., Ford E., Sidhu R. S. & Yang X.; 1996; Taxol from Fungal Endophytes & the Issue of Biodiversity; **Journal of Industrial Microbiology**; v. 17; p. 417 – 423.

- Strobel G. A., Miller R. V., Martinez-Miller C., Condrón M. M., Teplow D. B. & Hess W. M.; 1999; Cryptocandin, a potent antimycotic from the Endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*; **Microbiology**; v. 17; p. 417 – 423.
- Strobel G., Yang X., Sears J, Kramer R, Sidhu R. S. & Hess W. M; 1996; Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*; **Microbiology**; v. 142; 435p.
- Strobel G.A.; 2002; Microbial gifts from rain forests; **Can J Plant Pathol**; v. 24; p.14–20.
- Vieira E. C, Gazzinelli G., Mares-Guia, M.; 2002; **Bioquímica Celular e Biologia Molecular**; Ed. Atheneu, 2^a ed; São Paulo – Br; 360p.
- Vinnere, O.; 2004; Approaches to Species Delineation in Anamorphic (mitosporic) Fungi: A Study on Two Extreme Cases, Tese de doutorado; Uppsala University, Department of Evolutionary Biology, Uppsala, Sweden: Uppsala University Library.
- Wang N. G.; Guan M. Z. & Lei H. P; 1990; Studies on anti-implantation and hormone activity of yuehchukene, an alkaloid isolated from the root of *Murraya paniculata*; **Yao Xue Xue Bao**; v. 25; p. 85 – 89.
- White T.J., Bruns T., Lee S. & Taylor J.; 1990; Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.
- Yedidia I., Shores M., Kerem Z., Benhamou N., Kapulnik Y. & Chet I.; 2003; Concomitant Induction of Systemic Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in Cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and Accumulation

- of Phytoalexins; **Applied and Environmental Microbiology**; V. 69; n. 12; p. 7343–7353.
- Yu J., Perng-Kuang C., Kenneth C. E., Jeffrey W. C., Deepak B., Thomas E. C., Gary A. P., John E. L., Charles P. W., & Joan W. B.; 2004; Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis; **Appl. Envir. Microbiol.**; v. 70; p. 1253 - 1262.
- Yuan J., Jian-Nan B., Bing Y. & Xu-Dong Z.; 2006; Taxol-producing Fungi: a New Approach to Industrial Production of Taxol; **Chinese journal of Biotechnology**; v. 22. p. 1-6.
- Zamecnik, P.C; Littlefield, J.W., Keller, E.B. & Gross, J.; 1955; Studies on cytoplasmic ribonucleoprotein particles from the liver of the rat. **J. Biol. Chem.**; v. 217: p.111-123.
- Zou W. X., Meng J. C., Hong Lu, Chen, G. X., Shi G. X., Zhang T. Y. & Tan R. X.; 2000; Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*; **Journal of Natural Products**; v. 63; n. 11; p.1529 – 1530.

Anexo I: Extração do DNA

- 1) Colocar em tubos de eppendorf 200mg (100mg – 150mg) de micélio de fungo (fungos filamentosos e leveduras). Triturar com nitrogênio líquido.
- 2) Adicionar 100uL de tampão de extração (CTAB 2%) ao tubo homogeneizar à 4°C com o auxílio de um mini pistilo e um pouco de sílica autoclavada.
- 3) Adicionar mais 900uL de tampão de extração, misturar suavemente e incubar no banho-maria a 65°C por 30 minutos.
- 4) Remover o tubo do banho-maria, deixar esfriar no gelo, adicionar 200uL de CLOROFOL ou CLOROFIL, misturar bem, centrifugar a 12.000 rpm por 2 minutos.
- 5) Remover a fase aquosa e transferir para outro tubo limpo. Adicionar 500uL de CLOROFOL ou CLOROFIL e agitar suavemente. Centrifugar a 12.000 rpm por 2 (3) minutos.
- 6) Transferir a fase aquosa para um outro tubo limpo. Adicionar 600uL de ISOPROPANOL ou ETANOL (à -20 °C), misturar bem (gentilmente), deixar precipitando, no congelador, por uma hora ou até o dia seguinte. Colocar o precipitado para centrifugar a 12.000 rpm por 5 (3) minutos.
- 7) Descartar o sobrenadante e adicionar e adicionar ao sedimento 1mL de etanol (70%) e deixar agir durante 5 a 10 minutos. Repetir o procedimento mais uma vez e adicionar 1mL de etanol (95%) durante 2 a 3 minutos.
- 8) Centrifugar a 12.000 rpm por 5 (3) minutos, descartar o sobrenadante e secar o sedimento invertendo o tubo sobre um papel autoclavado por mais ou menos 30 minutos.
- 9) Dissolver o sedimento em 70 ou em 30uL (50uL) de tampão TE e guardar a 4°C para posterior quantificação.

Obs: No protocolo de extração acima não foi executada a parte do texto em vermelho e as em azul foram às alterações utilizadas.

Anexo 2: Listagens dos fungos endofíticos com o DNA genômico extraído

| N. das Amostras | Código do Isolado | Número e local de depósito | Tempo de cultivo | Rendimento | Obs: |
|--------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-------------------|-------------|
| 1. (Tric-1) | MpCe3 3.1 <i>Trichoderma</i> sp. | (154) LABIOMI | 26 – 40hs | 50ng/μL | |
| 2. (Tric-2) | MpCe10 3.2 <i>Trichoderma</i> sp. | (201) LABIOMI | 26 – 40hs | 50ng/μL | |
| 3. (Tric-3) | MpCe24 1.3 <i>Trichoderma</i> sp. | (197) LABIOMI | 26 – 40hs | | não extraiu |
| 4. (Tric-4) | MpR2 3.1 <i>Trichoderma</i> sp. | (193) LABIOMI | 26 – 40hs | 50ng/μL | |
| 5. (Tric-5) | MpRe6 1.1 <i>Trichoderma</i> sp. | (192) LABIOMI | 26 – 40hs | 50ng/μL | |
| 6. (Tric-6) | MpRe18 3.3 <i>Trichoderma</i> sp. | (149) LABIOMI | 26 – 40hs | 50ng/μL | |
| 7. (Tric-7) | MpRe5 2.2 <i>Trichoderma</i> sp. | (202) LABIOMI | 26 – 40hs | 50ng/μL | |
| 8. (Tric-8) | MpR1 2.3 <i>Trichoderma</i> sp. | (200) LABIOMI | 26 – 40hs | | não extraiu |
| 9. (Tric-9) | MpRe11 1.2 <i>Trichoderma</i> sp. | (167) LABIOMI | 26 – 40hs | 70ng/μL | |
| 10. (Tric-10) | MpR12 2.1 <i>Trichoderma</i> sp. | (198) LABIOMI | 26 – 40hs | 90ng/μL | |
| 11. (Tric-11) | MpRe11 2.2 <i>Trichoderma</i> sp. | (199) LABIOMI | 26 – 40hs | 20ng/μL | |
| 12. (Tric-12) | MpRe18 3.2 <i>Trichoderma</i> sp. | (137) LABIOMI | 26 – 40hs | 50ng/μL | |

| N. das Amostras | Código do Isolado | Número e local de depósito | Tempo de cultivo | Rendimento | Obs: |
|------------------|--------------------------------------|----------------------------|------------------|------------|------|
| 13. (Tric-13) | MpRe17 1.3 <i>Trichoderma</i> sp. | (136) LABIOMI | 26 – 40hs | 50ng/μL | |
| 14. (Tric-14) | MpRe11 2.3 <i>Trichoderma</i> sp. | (194) LABIOMI | 26 – 40hs | 30ng/μL | |
| 15. (Tric-15) | MpRe18 1.2 <i>Trichoderma</i> sp. | (118) LABIOMI | 26 – 40hs | 30ng/μL | |
| 16. (Tric-16) | MpRe17 3.1 <i>Trichoderma</i> sp. | (133) LABIOMI | 26 – 40hs | 30ng/μL | |
| 17. (Tric-17) | MpRe12 2.3 <i>Trichoderma</i> sp. | (196) LABIOMI | 26 – 40hs | 30ng/μL | |
| 18. (Tric-18) | MpRe11 1.3 <i>Trichoderma</i> sp. | (195) LABIOMI | 26 – 40hs | 30ng/μL | |
| 19. (Tric-19) | MpG16 1.3b <i>Trichoderma</i> sp. | (144) LABIOMI | 26 – 40hs | 40ng/μL | |
| 20. (Tric-20) | MpG21 1.1 <i>Trichoderma</i> sp. | (132) LABIOMI | 26 – 40hs | 50ng/μL | |
| 21. (Tric-21) | MpRe11 3.3 <i>Trichoderma</i> sp. | (203) LABIOMI | 26 – 40hs | 40ng/μL | |
| 22. (Tric-22) | MpCe2 2.2a <i>Trichoderma</i> sp. | (165) LABIOMI | 26 – 40hs | 50ng/μL | |
| 23. (Tric-23) | PeEs 1 <i>Trichoderma</i> sp. | Lab. de Genét. UFAM. | 26 – 40hs | 50ng/μL | |
| 24. (Tric-24) | F80. <i>Trichoderma</i> sp. | Lab. de Genét. UFAM. | 26 – 40hs | 50ng/μL | |
| 25. (Pen-1) | MpR2 2.3 <i>Penicillium</i> sp. | (161) LABIOMI | 24 – 48hs | 20ng/μL | |

| N. das Amostras | Código do Isolado | Número e local de depósito | Tempo de cultivo | Rendimento | Obs: |
|-----------------|--|----------------------------|------------------|------------|-------------|
| 26. (Pen-2) | MpR18 2.3 <i>Penicillium</i> sp. | (128) LABIOMI | 24 – 48hs | 10ng/μL | |
| 27. (Pen-3) | MpFrM9 3.1 <i>Penicillium</i> sp. | (142) LABIOMI | 24 – 72hs | - | não extraiu |
| 28. (Pen-4) | MpR1 3.2a <i>Penicillium</i> sp. | (160) LABIOMI | 24 – 48hs | 20ng/μL | |
| 29. (Pen-5) | MpR2 3.1 <i>Penicillium</i> sp. | (162) LABIOMI | 24 – 48hs | - | não extraiu |
| 30. (Pen-6) | MpR2 2.1 <i>Penicillium</i> sp. | (158) LABIOMI | 24 – 48hs | 15ng/μL | |
| 31. (Pen-7) | MpR2 3.2 <i>Penicillium</i> sp. | (159) LABIOMI | 24 – 48hs | 50ng/μL | |
| 32. (Asp-1) | MpFrM14 1.3b <i>Aspergillus niger</i> . | (164) LABIOMI | 24 – 36hs | 20ng/μL | |
| 33. (Pest-1) | GaFr1 1.2b <i>Pestalotiopsis</i> sp. | Lab. de Genét. UFAM. | 8 – 21 dias | 50ng/μL | |
| 34. (Pest-2) | GaFr1 2.3 <i>Pestalotiopsis</i> sp. | Lab. de Genét. UFAM. | 8 – 21 dias | 100ng/μL | |
| 35. (Pest-3) | GaFr3 2.3 <i>Pestalotiopsis</i> sp. | Lab. de Genét. UFAM. | 8 – 21 dias | 30ng/μL | |
| 36. (Pest-4) | GaC1 3.2a <i>Pestalotiopsis</i> sp. | Lab. de Genét. UFAM. | 8 – 21 dias | 30ng/μL | |
| 37. (Pest-5) | GaC2 1.1 <i>Pestalotiopsis</i> sp. | Lab. de Genét. UFAM. | 8 – 21 dias | 50ng/μL | |
| 38. (Pest-6) | GaC2 3.1 <i>Pestalotiopsis</i> sp. | Lab. de Genét. UFAM. | 8 – 21 dias | 150ng/μL | |

| n. das Amostras | Código do Isolado | n. e local de depósito | Tempo de cultivo | Rendimento estimado | Obs: |
|------------------|--|------------------------|------------------|---------------------|------|
| 39. (Pest-7) | MpCe1 1.3c <i>Pestalotiopsis</i> sp. | (124) LABIOMI | 8 – 21 dias | 30ng/μL | |
| 40. (Pest-8) | MpFrM14 2.2 <i>Pestalotiopsis</i> sp. | (141) LABIOMI | 8 – 21 dias | 30ng/μL | |
| 41. (Pest-9) | B5-3 <i>Pestalotiopsis</i> sp. | (109) LABIOMI | 8 – 21 dias | 100ng/μL | |
| 42. (Pest-10) | KiCe1 1.2 <i>Pestalotiopsis</i> sp. | LABIOMI | 8 – 21 dias | 50ng/μL | |
| 43. (Xyl-1) | MpCe11 3.2 <i>Xylaria</i> sp. | (206) LABIOMI | 8 – 21 dias | 10ng/μL | |
| 44. (Fed-1) | MpG23 2.3 | LABIOMI | 21 – 30 dias | - | |
| 45. (Fed-2) | MpG24 2.1 | LABIOMI | 21 – 30 dias | 5ng/μL | |
| 46. (Fed-3) | MpR3 | LABIOMI | 21 – 30 dias | 20ng/μL | |
| 47. (Fed-4) | MpR14 2.1 | LABIOMI | 21 – 30 dias | 50ng/μL | |
| 48. (Fed-5) | MpC12 2.2 | LABIOMI | 21 – 30 dias | 20ng/μL | |
| 49. (Fed-6) | MpC13 1.2 | LABIOMI | 21 – 30 dias | 50ng/μL | |
| 50. (Fed-7) | MpC13 2.2 | LABIOMI | 21 – 30 dias | 10ng/μL | |
| 51. (Fed-8) | MpC13 2.1 | LABIOMI | 21 – 30 dias | 50ng/μL | |
| 52. (Fed-9) | MpC16 1.2 | LABIOMI | 21 – 30 dias | 10ng/μL | |
| 53. (Fed-10) | MpG23 1.3 | LABIOMI | 21 – 30 dias | 50ng/μL | |

| n. das Amostras | Código do Isolado | n. e local de depósito | Tempo de cultivo | Rendimento | Obs: |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------|-------------|
| 54. (Fed-11) | MpC14 2.1 | | 21 – 30 dias | 5ng/ μ L | |
| 55. (Fed-12) | MpG14 2.3 | | 21 – 30 dias | 40ng/ μ L | |
| 56. (Fed-13) | MpG23 1.3b | | 21 – 30 dias | 5ng/ μ L | |
| 57. (Fed-14) | MpG24 2.3 | | 21 – 30 dias | 5ng/ μ L | |
| 58. (Fed-15) | MpG23 2.2b | (204) LABIOMI | 21 – 30 dias | 40ng/ μ L | |
| 59. (Fed-16) | MpG24 1.3 | (226) LABIOMI | 21 – 30 dias | - | |