UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PORTO NACIONAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECÓTONOS

WINÍCIUS SIQUEIRA PINTO

FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A *Myrcia sellowiana*, NA REGIÃO DO JALAPÃO/TOCANTINS

PORTO NACIONAL/TO
ABRIL, 2011

WINÍCIUS SIQUEIRA PINTO

FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A *Myrcia sellowiana*, NA REGIÃO DO JALAPÃO/TOCANTINS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ecologia de Ecótonos da Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ecologia de Ecótonos.

Orientador: Prof. Dr. Raphael Sanzio Pimenta

PORTO NACIONAL/TO
ABRIL, 2011

Aos meus pais, minhas irmãs e meus sobrinhos

Ivy, Isadora, Luísa e Maurício.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Winícius Siqueira Pinto

Fungos endofíticos associados a *Myrcia sellowiana*, na região do Jalapão/Tocantins

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ecótonos, como requisito parcial para obtenção do título em Mestre em Ecologia de Ecótonos pela banca examinadora composta pelos membros:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Paula Benevides de Morais
Universidade Federal do Tocantins (Presidente)

Prof. Dr. Waldesse Piragé de Oliveira Junior
Universidade Federal do Tocantins

Profª. Drª. Ana Kleiber Pessoa Borges
Universidade Federal do Tocantins

Aprovada em: 26 de abril de 2011
Local de defesa: Auditório de Neamb
Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Porto Nacional.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Universidade Federal do Tocantins pela oportunidade de realização deste curso e pelos recursos humanos, técnicos e logísticos disponibilizados durante o decorrer do mesmo.

Ao ICMBio pelo apoio fornecido, principalmente, por meio do afastamento concedido para a realização do curso.

Ao professor Raphael Sanzio Pimenta pelo incentivo, compreensão e preciosa orientação na elaboração deste trabalho.

Aos colegas e professores do curso de mestrado em Ecologia de Ecótonos, que proporcionaram valiosos momentos de aprendizagem e intercâmbio de conhecimentos.

A todos os colegas do IBAMA e ICMBio pela disposição constante em auxiliar em todas as atividades de trabalho e pelo incentivo tão importante para a realização deste curso.

Aos colegas de trabalho Jesse, Mariusz e Raoni, pelo apoio e por terem colaborado diretamente na conclusão deste trabalho.

Aos colegas e chefes Sandra e Fernando, que, muito generosamente, apoiaram a realização deste curso, especialmente, compreendendo as necessidades de afastamento do trabalho e permitindo a compatibilização com os compromissos do mestrado.

À técnica do LAMBIO, Cristiane Martins Coelho, pela atenção e dedicação ao acompanhar e disponibilizar todos os insumos necessários para a realização dos experimentos, participando também, em especial, da condução de uma etapa importante dos experimentos.

Aos estagiários Cícero e Maurício, que acompanharam e auxiliaram no trabalho, desde a coleta em campo até a etapa final, dedicando sempre o máximo de esforço, com muita responsabilidade.

Ao colega de mestrado e laboratório Thompson, que se dispôs a auxiliar na condução deste trabalho desde o início e que, principalmente na etapa final dos experimentos, adotou meu trabalho como seu e se dedicou a ele sem medir esforços para que os resultados fossem satisfatórios.

À colega de laboratório Francisca, que colaborou desde os primeiros dias na realização dos experimentos, orientando, acompanhando e participando, mesmo quando precisava priorizar o próprio trabalho.

À colega de laboratório Juliana, que prestou um auxílio imprescindível para a realização dos procedimentos de biologia molecular, sempre disposta e dedicada.

À colega de mestrado Vaninha, que dispensou toda atenção, a qualquer momento, compartilhando seu conhecimento e auxiliando diretamente na elaboração deste trabalho.

À colega de laboratório Weillan, que auxiliou muito na condução inicial dos experimentos, compartilhando sua experiência e trabalhando junto na bancada.

A todos os colegas do LAMBIO, em especial Amaraína, Ana Elise, Bruna, Camilla, Daiane, Denise, Fabrício, Gisele, Gustavo, Laciene, Renata, Taline, Viviane, que estiveram presentes no período de realização deste trabalho, compartilhando muitos momentos de sucessos e frustrações e tornando as horas no laboratório mais agradáveis.

Aos técnicos e estagiários do curso de Medicina Joelma, Michele, Herold e Rafael, que participaram de uma etapa importante dos experimentos, a quem devo parcela significativa dos resultados obtidos.

Ao professor Waldesse, pelo apoio, orientação e acompanhamento nos experimentos de biologia molecular, indispensáveis para a conclusão deste estudo.

À professora Paula, pelo apoio prestado na realização dos experimentos no LAMBIO, pelas preciosas orientações e pela colaboração na realização dos experimentos na UFMG.

Ao professor Luiz Rosa, que orientou e acompanhou a condução deste trabalho desde as etapas iniciais até sua conclusão.

Às professoras da graduação Cristiane e Denise, orientadoras de monitoria, que sempre acreditaram e incentivaram meu desenvolvimento, o que foi muito importante para alcançar mais esta vitória.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade na correção e avaliação deste trabalho.

Aos amigos Eduardo e Juliana, sempre presentes e dispostos a ajudar em todos os momentos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS viii

LISTA DE FIGURAS ix

LISTA DE ABREVIATURAS x

RESUMO xii

ABSTRACT xiv

INTRODUÇÃO 16

REVISÃO DE LITERATURA 19

1. Microrganismos endofíticos 19
2. Produção de compostos bioativos 21
3. Hospedeiro vegetal: *Myrcia sellowiana* 25

OBJETIVOS 29

Objetivo geral 29

Objetivos específicos 29

MATERIAL E MÉTODOS 30

1. Área de coleta 30
2. Amostragem 32
3. Isolamento e preservação dos microrganismos 32
4. Cálculo da frequência de colonização 33
5. Preparação de extratos vegetais de *M. sellowiana* 33
6. Preparação de extratos fúngicos 34
7. Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos e vegetais 34
   7.1. Padronização dos inóculos de microrganismos alvos 35
   7.2. Ensaio antimicrobiano 36
8. Determinação da atividade antagonista direta dos fungos endofíticos 37
9. Caracterização, agrupamento morfológico e identificação dos fungos endofíticos 38
   9.1. Extração do DNA total 38
   9.2. Obtenção dos amplicons 39

9.3. Purificação dos amplicons....39
9.4. Reações de sequenciamento....40
9.5. Precipitação da reação de sequenciamento....40
9.6. Análise computacional das sequências....41
10. Avaliação da riqueza de morfoespécies....41

RESULTADOS E DISCUSSÃO....42

1. Coleta e isolamento dos fungos endofíticos....42
2. Cultivo dos fungos e obtenção dos extratos metanólicos....45
3. Atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos e vegetais....46
4. Atividade antagonista direta dos fungos endofíticos....50
5. Agrupamento morfológico e identificação molecular....56

CONCLUSÕES....63

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS....64

APÊNDICES....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de atividades biológicas caracterizadas a partir de endofíticos, adapatado de Tejesvi et al. (2007). 26

Tabela 2. Frequência de fungos endofíticos obtidos de amostras de caules e folhas de *Myrcia sellowiana*. 44

Tabela 3. Fungos endofíticos obtidos de amostras de caules e folhas de *Myrcia sellowiana* produtores de extratos com atividade antimicrobiana. 47

Tabela 4. Fungos endofíticos obtidos de amostras de caules e folhas de *Myrcia sellowiana* produtores de substâncias difusíveis e voláteis capazes de inibir o crescimento de *Monilinia fructicola* e/ou *Colletotrichum gloeosporioides*. 50

Tabela 5. Frequência absoluta e frequência relativa de fungos endofíticos por indivíduo de *Myrcia sellowiana* que apresentaram atividade biológica nos três ensaios realizados. 53

Tabela 6. Número de fungos endofíticos e morfoespécies obtidos por indivíduo de *Myrica sellowiana*. 57

Tabela 7. Fungos endofíticos obtidos de amostras de caules e folhas de *Myrcia sellowiana* que apresentaram atividade em mais de um dos ensaios realizados. 60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Folhas (A), inflorescência (B), caule (C) e visão geral (D) de um indivíduo de *Myrcia sellowiana*. 28

Figura 2. Área de coleta, representando a localização geográfica em que se encontra inserida, os limites das unidades de conservação adjacentes e as coordenadas geográficas dos indivíduos vegetais amostrados. 31

Figura 3. Halos de inibição produzidos por extratos brutos de fungos endofíticos isolados de *M. selloviana* contra S. aureus (ATCC 12600) após incubação a 37 ºC por 24 h. 47

Figura 4. Número de isolados de fungos endofíticos ativos (■) e que não apresentaram atividade biológica (□) por indivíduo de *Myrcia sellowiana*, considerando os três ensaios realizados: produção de extratos com atividade antimicrobiana (A), produção de substâncias bioativas difusíveis no meio (B) e produção de compostos voláteis bioativos (C). 55

Figura 5. Exemplos de isolados de fungos endofíticos obtidos de *Myrcia sellowiana* pertencentes a diferentes morfoespécies..... 56

Figura 6. Curva de riqueza de morfoespécies observada (Obs) por indivíduo de *Myrcia sellowiana*, comparativamente ao número de morfoespécies estimado através do estimador Jaccknife 1 (Jacck 1). 57

Figura 7. Número de isolados de fungos endofíticos obtidos de *Myrcia sellowiana* por morfoespécie..... 58

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
cm: centímetro
CTAB: Brometo de cetil trimetilamônio
DNA: Ácido desoxirribonucléico
dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA: Estados Unidos da América
g: grama
h: hora
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITS: Região transcrita interna
Km²: quilômetro quadrado
LBEM: Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular
m: metro
M: molar
mg: miligrama
min: minuto
mL: mililitro
mm: milímetro
mM: milimolar
mol/L: mol por litro
MRS:
µg: micrograma
µl: microlitro
µmol: micromol
NCBI: National Center for Biotechnology Information
NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards
ng: nanograma
nº: número

P.A.: para análise

pH: potencial hidrogeniônico

p.p.m: partes por milhão

pmol: picomol

p/v: peso por volume

rDNA: DNA ribossomal

r.p.m.: rotações por minuto

s: segundo

SDS: dodecil sulfato de sódio

TBE: tris borato

U: unidade

UFC: unidade formadora de colônia

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

V: volts

X: vezes

%: por cento

ºC: graus Celsius

®: marca registrada

RESUMO

PINTO, W. S. Fungos endofíticos associados a *Myrcia sellowiana*, na região do Jalapão/Tocantins. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Tocantins, Porto Nacional, 2011.

Os fungos endofíticos habitam de forma assintomática tecidos vegetais e interagem com a planta, estabelecendo uma relação tradicionalmente considerada mutualística. Eles são reconhecidos como valiosas fontes de substâncias bioativas. A espécie vegetal *Myrcia sellowiana* (Myrtaceae), conhecida popularmente como "grudento" ou "cascudinho", é empregada para tratamento de ferimentos em animais e humanos, devido ao seu efeito cicatrizante. Este trabalho tem como objetivo contribuir para o conhecimento da assembléia microbiana endofítica associada a *M. sellowiana* e avaliar o potencial destes microrganismos para produção de metabólitos com atividade antimicrobiana. Foram coletadas 3 frações de caule e 3 folhas de 20 indivíduos vegetais na Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins, localizada na região do Jalapão.10 fragmentos por amostra foram desinfetados superficialmente e plaqueados em BDA e YMA para o isolamento de fungos endofíticos. Os isolados foram cultivados em meio BDA e, após 15 dias, tratados com metanol para obtenção de extratos brutos. A atividade antimicrobiana dos extratos brutos a 100 µg/disco foi avaliada pelo método de difusão em disco utilizando os microrganismos alvos: *Candida albicans* (ATCC 18804), C. *krusei* (ATCC 20298), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) e *Cladosporium sphaerospermum* (CCT 1740). A determinação de atividade antagonista direta dos fungos foi realizada por ensaio de produção de substâncias difusíveis e voláteis bioativas, utilizando os fitopatógenos alvos: *Monilinia fructicola* (mfa3635) e *Colletotrichum gloeosporioides* (CG-incoper02). Foram obtidos, no total, 152 isolados de fungos endofíticos. A frequência de colonização global neste trabalho foi de 12,7 %, sendo 24,2 % para as amostras de caule e apenas 1,2 % para as folhas. Dos extratos fúngicos testados, 71 (46,7%) foram ativos contra pelo menos um dos microrganismos alvos, sendo 62 (40,8%) contra *S. aureus*, 20 (13,1%) contra *E. coli* e 11 (7,2%) ativos simultaneamente contra estes dois microrganismos. Nenhum extrato foi ativo contra *Candida albicans*, *C. krusei* e *Cladosporium sphaerospermum*. Os extratos vegetais não apresentaram atividade contra os microrganismos alvos. Quanto à produção de substâncias difusíveis no meio, 34 (22,4%) isolados foram ativos contra *Colletotrichum gloeosporioides* e 1 (0,6%) contra *Monilinia fructicola*. No teste de produção de voláteis bioativos, foram encontrados 32 (21,0%) isolados ativos contra *C. gloeosporioides* e nenhum contra *M. fructicola*. Essa diferença pode ser justificada pela influência da pressão evolutiva sobre o primeiro fitopatógeno, o qual ocorre com grande frequência no Brasil, e pela ausência ou inexpressiva pressão seletiva sobre o segundo, de ocorrência menos frequente em nosso país. Os isolados obtidos foram agrupados em 50 morfoespécies distintas. As curvas de riqueza de morfoespécies observada e estimada indicam a grande probabilidade de que fossem encontradas mais morfoespécies caso o esforço amostral tivesse sido maior. Uma morfoespécie, *Muscodor albus*, foi abundante, tendo apresentado 54 isolados (35,5 %), sendo que 41 (75,9%) foram ativos contra pelo menos um dos microrganismos alvos testados. 6 morfoespécies apresentaram de 6 a 8 isolados, enquanto que a grande maioria apresentou apenas 1 isolado. Isso pode ser interpretado como uma vantagem

competitiva eficiente, a qual, muito provavelmente, favoreceu o estabelecimento da espécie como dominante nesta comunidade microbiana. A espécie vegetal selecionada representa uma boa fonte de fungos endofíticos, pois demonstrou abrigar uma ampla variedade de morfoespécies deste grupo de microrganismos. Além disso, os isolados obtidos apresentaram grande potencial para produção de substâncias bioativas contra bactérias e fungos patógenos de humanos e vegetais.

Palavras-chave: fungos, endofíticos, antimicrobiano, voláteis, *Myrcia sellowiana*, Jalapão.

ABSTRACT

PINTO, W. S. Endophytic fungi associated to *Myrcia sellowiana*, in the region of Jalapao/Tocantins. Master's dissertation. Universidade Federal do Tocantins, Porto Nacional, 2011.

Endophytic fungi inhabit in way symptomless plant tissue and they interact with the plant, establishing a relationship traditionally considered mutualistic. They are recognized as valuable sources of bioactive substances. The plant species *Myrcia sellowiana* (Myrtaceae), known popularly as "grudento" or "cascudinho", is used for treatment of wounds in animals and humans, due to its healing effect. This study has as aim contributes for the knowledge of the endophytic microbial assemblage associated to *M. sellowiana* and to evaluate the potential of these microorganisms for production of metabolites with antimicrobial activity. Three stem fractions and three leaves were collected of 20 plant individuals on Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins, located in the region of Jalapao. 10 fragments for sample were surface disinfected and placed onto PDA and YMA for the isolation of endophytic fungi. The isolates were cultivated in PDA medium and, after 15 days, treaties with methanol for obtaining of crude extracts. The antimicrobial activity of crude extracts at 100 µg/disco was evaluated by the disk diffusion method using the target microorganisms: *Candida albicans* (ATCC 18804), C. *krusei* (ATCC 20298), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) and *Cladosporium sphaerospermum* (CCT 1740). The determination of direct antagonistic activity of the fungi was accomplished through assay of production of diffusible and bioactive volatile substances, using the target phytopathogens: *Monilinia fructicola* (mfa3635) e *Colletotrichum gloeosporioides* (CG-incoper02). It was obtained, in the total, 152 isolates of endophytic fungi. In this work, the overall colonization frequency was 12,7%, being 24,2% for the stem samples and only 1,2% for the leaves. Of the fungi extracts tested, 71 (46,7%) were active against at least one of the target microorganisms, of the which 62 (40,8%) against *S. aureus*, 20 (13,1%) against *E. coli* and 11 (7,2%) simultaneously against these two microorganisms. None of the extracts was active against *Candida albicans*, *C. krusei* e *Cladosporium sphaerospermum*. The plant extracts didn't present activity against the target microorganisms. As for the production of diffusible substances, 34 (22,4%) active against *Colletotrichum gloeosporioides* and 1 (0,6%) against *Monilinia fructicola*. In the test of production of bioactive volatile, it was obtained 32 (21,0%) isolates active against *C. gloeosporioides* and none against *M. fructicola*. That difference can be justified for the influence of the evolutionary pressure on the first phytopathogen, which occurs with great frequency in Brazil, and for the absence or inexpressive selective pressure on the second, of less frequent occurrence in our country. The isolates fungi obtained were grouped into 50 different morphotypes. The observed and estimated morphotypes richness curves indicate the great probability that more morphotypes were found in the case of the sampling effort had been larger. One morphotype, *Muscodor albus*, was abundant, having presented 54 isolates (35,5%), of the which 41 (75,9%) were active against at least one of the tested target microorganisms. 6 morphotypes presented from 6 to 8 isolates, while the great majority presented only 1 isolate. That can be interpreted as a efficient competitive advantage, which, very probably, favored

the establishment of the species as dominant in this microbial community. The selected plant species represents a good source of endophytic fungi, because it demonstrated to shelter a wide variety of morfhotypes of this group of microorganisms. Besides, the isolates obtained presented great potential for production of bioactive substances against bacteria and fungi patogens of humans and plant.

Keywords: fungi, endophytes, antimicrobial, volatile, *Myrcia sellowiana*, Jalapao.

INTRODUÇÃO

Evolutivamente, as plantas vêm desenvolvendo complexos mecanismos adaptativos, sendo que o estabelecimento das mesmas em seus respectivos habitats envolve a sua capacidade em interagir com diferentes espécies de seres vivos (NETO et al., 2002). É provável que as associações fúngicas desempenharam um longo e importante papel na evolução da vida na Terra, o que pode ser confirmado a partir de registros fósseis que sugerem que algumas dessas interações existem há mais de 400 milhões de anos (REDECKER et al., 2000). Entre estas associações, destacam-se as mutualísticas, como os fungos micorrízicos e as bactérias fixadoras de nitrogênio. Além destes, outros microrganismos, chamados de endofíticos, que tipicamente são fungos ou bactérias que habitam de forma assintomática tecidos vegetais, têm recebido especial atenção devido à sua importância em relação a diferentes espécies de plantas (NETO et al., 2002; 2004).

Novas espécies de microrganismos endofíticos estão constantemente sendo descritas na literatura mundial atestando ser esta diversidade ainda não explorada convenientemente. Estima-se que cada espécie vegetal possua microrganismos endofíticos ainda não classificados e com propriedades pouco conhecidas. Além disso, acredita-se que áreas habitadas por uma grande diversidade de formas de vida superiores são, provavelmente, também habitadas por uma alta diversidade de microrganismos. Sendo assim, estudos sobre a biodiversidade fúngica endofítica associada a plantas ocorrentes em países de clima tropical como o Brasil, onde a biodiversidade vegetal é muito elevada, poderão resultar em descobertas de interesse acadêmico e aplicado (AZEVEDO, 1999; NETO et al., 2002; STROBEL, 2006b).

Um crescente conjunto de evidências científicas sugere, ainda, que os microrganismos endofíticos representam um vasto e basicamente inexplorado recurso de moléculas naturais com estruturas químicas que têm sido otimizadas evolutivamente pela sua relevância biológica e/ou ecológica. Isto, porque, em sua associação simbiótica, o organismo vegetal protege e fornece nutrientes para o endofítico, o qual, em contrapartida, produz compostos bioativos que favorecem o crescimento vegetativo e a competitividade do hospedeiro, protegendo-o também contra herbívoros e patógenos. A possibilidade de que a diversidade de microrganismos endofíticos seja influenciada pela

diversidade de espécies vegetais e de fatores ambientais sugere um grande potencial para descoberta de metabólitos secundários únicos a partir de endofíticos encontrados em associação com comunidades vegetais diversas até então não estudadas (BASHYAL et al., 2007).

Do ponto de vista ecológico é extremamente importante a descoberta de fontes microbianas produtoras de fármacos de alto valor agregado, porém produzidos em quantidades reduzidas por espécies vegetais. Muitas destas, devido ao extrativismo predatório, encontram-se ameaçadas de extinção. Os endófitos apresentam-se, nesse sentido, como uma alternativa promissora para garantir a preservação destas espécies, mantendo a produção de compostos úteis para a o tratamento de inúmeras doenças (NETO et al, 2002).

Além disso, com o objetivo de atenuar a degradação ambiental, causada pela utilização de defensivos agrícolas tóxicos, tem sido empregado, de forma bastante promissora, o controle biológico de insetos e patógenos. Existem vários relatos sobre endofíticos capazes de produzir substâncias antagonistas, as quais podem ser usadas em substituição aos compostos orgânicos tóxicos, além de serem úteis para prevenir a propagação de microrganismos nocivos, através da competição ou de outras interações ecológicas. Segundo Guo et al. (2008), endófitos também têm sido utilizados como agentes biorremediadores.

É comum no Brasil a utilização de plantas medicinais para o tratamento de inúmeras doenças. Acredita-se que algumas propriedades terapêuticas atribuídas ao vegetal também possam estar relacionadas à produção de metabólitos secundários por seus fungos endofíticos (ARNOLD et al, 2000). Dentre essas espécies de plantas, *Myrcia sellowiana* (Myrtaceae), conhecida popularmente como "grudento" ou "cascudinho", é utilizada pela população residente na região do Jalapão/Tocantins como cicatrizante para o tratamento de ferimentos em animais e seres humanos. Apesar do seu emprego na medicina popular, não se encontraram relatos na literatura comprovando sua eficácia terapêutica, assim como nenhum trabalho foi realizado até o momento com o objetivo de estudar a micota endofítica associada a esta planta.

Dessa forma, o estudo de fungos endofíticos associados a *M. sellowiana* coletada na região do Jalapão, Estado do Tocantins, e sua capacidade de produzir metabólitos secundários bioativos irá contribuir para o conhecimento da diversidade desse grupo de organismos e de seu potencial para usos biotecnológicos, o que pode

ressaltar a importância da conservação deste ambiente natural, tendo em vista que muitas espécies microbianas desconhecidas e com propriedades úteis para a humanidade podem estar presentes naquela área.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Microrganismos endofíticos

Os microrganismos endofíticos são aqueles que colonizam tecidos vegetais sadios, em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, sem causar sintomas ou danos aparentes aos mesmos (WILSON, 1995). Segundo Schulz e Boyle (2005), a estabilidade e a variabilidade da interação assintomática dependem de numerosos fatores, como estresse ambiental, senescência do hospedeiro, virulência do endofítico e a resposta de defesa do vegetal.

Embora os fungos micorrízicos e as bactérias fixadoras de nitrogênio também vivam associados aos seus hospedeiros e sejam considerados por alguns autores como endofíticos, eles se distinguem dos endofíticos considerados em sentido restrito por apresentarem estruturas típicas. Os fungos micorrízicos formam as hifas, enquanto que as bactérias fixadoras de nitrogênio, como *Rhizobium*, apresentam nódulos (AZEVEDO et al., 2000).

Os microrganismos endofíticos também se diferem dos fitopatógenos, que causam doenças nas plantas; e dos microrganismos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais. Estas distinções, no entanto, são meramente didáticas, uma vez que pode ocorrer sobreposição entre esses grupos microbianos, o que dificulta sua separação. Isso, porque, embora os epifíticos colonizem a superfície dos vegetais, muitos destes microrganismos podem, eventualmente, penetrar no interior da planta, permanecendo por certo período e causar ou não danos a ela (AZEVEDO, 1999). Os endófítos, por sua vez, para penetrarem no hospedeiro, em sua grande maioria, devem primeiro se localizar na superfície do vegetal, sendo durante esse estágio, semelhantes a epífitos, como foi descrito para o fungo *Beauveria bassiana* em milho (NETO et al., 2002). Assim, essas três classes de microrganismos podem, em alguns casos, se referir a uma mesma espécie, diferindo apenas o estádio de colonização apresentado pela cepa em determinado momento.

Hallmann et al. (1998), por outro lado, considera que, do ponto de vista evolucionário, os microrganismos endofíticos seriam originalmente derivados de fitopatógenos que perderam a virulência em consequência de um prolongado período de

crescimento dentro da planta ou, ainda, que os endofíticos seriam patógenos em potencial, incapazes de expressar genes específicos da doença.

A interação biológica mais simples e tradicionalmente considerada entre microrganismos endofíticos e planta hospedeira é uma relação mutualística, em que o vegetal fornece nutrição ao microrganismo e este provê alguma forma de proteção à planta. A energia perdida pelo vegetal na produção de biomassa endofítica é integralmente e adequadamente compensada pelas melhorias à saúde da planta derivadas da presença de micorganismos mutualísticos (STONE et al., 2000; CASTILLO et al., 2007; BACKMAN e SIKORA, 2008).

Para Backman e Sikora (2008), os endofíticos, por se encontrarem na região do organismo vegetal definida como endosfera, vivem em ambientes protegidos que conferem aos mesmos vantagens competitivas sobre os microrganismos presentes na rizosfera e na filosfera, tais como fluxo consistente de nutrientes, pH, umidade, assim como proteção contra grande número de competidores. Além disso, segundo os mesmos autores, eles não habitam a endosfera acidentalmente, mas, provavelmente, tenham se estabelecido neste nicho devido aos efeitos benéficos que os mesmos oferecem aos seus hospedeiros e também por sua habilidade para resistir aos mecanismos de defesa da planta.

Segundo Gundel et al. (2010), os endofíticos frequentemente induzem alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em seus hospedeiros, o que pode afetar a performance das plantas sob diferentes estresses bióticos ou abióticos, tais como déficit hídrico, salinidade e altas concentrações de metais no solo, herbicidas e herbívoros. Assim, estes microrganismos podem ser benéficos aos hospedeiros ao conferir resistência a insetos e herbívoros, tolerância à dessecação, proteção contra patógenos e, ainda, aumentar o crescimento vegetativo (RAKOTONIRIANA et al., 2007; BAYAT et al., 2009). Além disso, essa interação pode exercer importante influência sobre a composição da comunidade vegetal, sucessão e ciclagem de nutrientes (DAVITT et al., 2010).

Nos vegetais existentes no planeta, os fungos endofíticos mostram-se ubíquos, uma vez que todas as plantas examinadas até o momento, incluindo desde algas até plantas superiores, abrigam pelo menos uma espécie destes microrganismos, sendo que muitas espécies vegetais podem estar associadas a dezenas ou mesmo centenas de espécies endofíticas (ARNOLD, 2007; RAKOTONIRIANA et al., 2007; WANG et al.,

2007). Estimativas propõem a existência de aproximadamente 300.000 espécies vegetais na Terra, indiretamente podendo-se prever a ocorrência de cerca de 1,5 milhão de espécies endofíticas. Deste total, apenas 10 % foram descobertas e descritas até o momento e apenas 1 % examinada quanto ao seu espectro de metabólitos secundários (ARNOLD et al., 2000; HAWKSWORTH, 2001; GUO et al., 2008).

De acordo com Araújo et al. (2002), os endofíticos estão associados aos mais diversos órgãos e tecidos vegetais, incluindo folhas, ramos, caules, raízes e estruturas florais, como pólen, ovário, anteras e estames. É importante ressaltar que, normalmente, mais de uma espécie de fungo endofítico são isoladas do mesmo tecido de um único hospedeiro. Sabe-se, ainda, que os organismos endofíticos distribuem-se distintamente pelos órgãos e tecidos do vegetal. A preferência do endofítico pelo local de sua colonização pode ser um reflexo do conteúdo daquele tecido específico, uma vez que diferentes tecidos e órgãos vegetais podem, de fato, se assemelhar a *microhabitats* distintos (SANTOS et al., 2003).

Geralmente, os endofíticos de determinado hospedeiro constituem um grupo consistente caracterizado por poucas espécies dominantes. Em adição a este grupo, surgem as denominadas espécies transitórias, que são representadas por apenas um ou dois isolados entre centenas (BILLS e POLLISHOOK, 1992; VERMA et al., 2007).

Alguns estudos indicam que a abundância, diversidade e composição de espécies endofíticas podem ser influenciadas pela localidade onde a planta ocorre (HOFFMAN e ARNOLD, 2008). A maioria das pesquisas envolvendo endofíticos vem sendo conduzida, até recentemente, a partir de plantas encontradas em regiões temperadas. Porém, nos últimos anos tem se descoberto, em regiões tropicais, hospedeiros vegetais que abrigam uma grande diversidade destes microorganismos, muitos dos quais não foram ainda classificados e possivelmente pertençam a novos gêneros e espécies (CHAREPRASERT et al., 2006).

2. Produção de compostos bioativos

Os endofíticos são reconhecidos como valiosas fontes de metabólitos biologicamente ativos, com grande aplicabilidade para a indústria, medicina e agricultura. Algumas pesquisas mostraram que a porcentagem de isolados endofíticos produtores de substâncias com atividade antimicrobiana pode ser, em determinados

casos, superior a 30%. No entanto, somente alguns isolados são capazes de produzir altos índices de moléculas com atividade biológica. É importante ressaltar que as substâncias produzidas pelos fungos endofíticos geralmente apresentam reduzida toxicidade celular para organismos superiores, tendo em vista que a própria planta funciona como um sistema de seleção natural (HUANG et al., 2001; STROBEL, 2003; PELÁEZ, 2006; WANG et al., 2006).

Estudo realizado por Schutz (2001) mostra que 51% de compostos bioativos isolados de fungos endofíticos possuem estrutura química desconhecida, tratando-se, portanto, de novos compostos bioativos. Reforça-se, portanto, o grande potencial para a descoberta de substâncias antimicrobianas novas, altamente bioativas e de baixa toxicidade.

Alguns autores consideram de grande importância a utilização de métodos e critérios que racionalizem a busca de fungos endofíticos em meio à miríade de espécies vegetais existentes no planeta. Neste sentido, algumas estratégias têm sido empregadas, tais como (1) a escolha de plantas de ambientes peculiares, especialmente aquelas que apresentam estratégias de sobrevivência pouco comuns; (2) plantas que apresentam histórico etnobotânico conhecido, ou seja, que vêm sendo tradicionalmente utilizadas como medicamento por tribos, grupos étnicos e pela população de um modo geral; (3) plantas endêmicas; (4) plantas cujo desenvolvimento se dá em regiões de grande biodiversidade, tais como em florestas temperadas e tropicais (ARNOLD et al., 2000; TAN & ZOU, 2001; STROBEL, 2003; STROBEL, 2006a).

Tan e Zou (2001) acreditam que os endofíticos possam produzir metabólitos originalmente característicos de seus hospedeiros, o que pode estar relacionado a uma troca gênica ocorrida entre o endófito e a planta ao longo de anos de evolução. Neste contexto, é razoável supor que a atividade farmacológica atribuída a algumas espécies vegetais possa estar relacionada, de alguma forma, às substâncias produzidas por microrganismos endofíticos (incluindo fungos e bactérias) ou pela planta em resposta a uma infecção (ARNOLD et al., 2000; FERRARA, 2006).

Centenas de produtos naturais bioativos, como, por exemplo, novos tipos de alcalóides, terpenóides, flavonóides, esteróides, entre outros, têm sido descobertos, através de estudos relacionados a este grupo de micorganismos. Até o momento, as principais propriedades apresentadas pela maioria destes compostos estão relacionadas

com atividade antibiótica, antitumoral e controle biológico, citando apenas os exemplos mais importantes (GUO et al., 2008).

O fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado a partir da casca da árvore *Taxus brevifolia*, abriu uma nova etapa para a produção do paclitaxel (Taxol®), um diterpenóide utilizado contra determinados tipos de câncer e cuja síntese era, anteriormente, conhecida apenas a partir de algumas espécies vegetais. Isso permitiu a sua produção por fermentação, comprovando a importância dos endofíticos na obtenção de metabólitos bioativos (STIERLE et al., 1993). Posteriormente, Li et al. (1996) isolaram *Pestalotiopsis microspora* de *Taxus wallichiana*, planta nativa do Nepal, e observaram que este fungo endofítico produz taxol em nível próximo a sua utilização comercial. Atualmente, sabe-se que grande número de fungos endofíticos produzem comumente mais taxol do que diversas plantas superiores. A distribuição destes endófitos em outras plantas mostra que o taxol é de distribuição mundial e não confinada simplesmente a endofíticos de árvores da família das taxáceas (STROBEL e LONG, 1998).

Huang et al. (2001) isolaram 172 fungos endofíticos do interior da casca de *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* e *Torreya grandis*, plantas medicinais na China, dos quais 13,4% e 52,3% apresentaram, respectivamente, propriedades antitumoral e antifúngica. Em 2006, Dai et al. apud Guo et al. (2008) isolaram fungos endofíticos a partir de quatro tipos de plantas medicinais da família Euphorbiaceae e detectaram a atividade antibacteriana dos mesmos, encontrando onze linhagens de um total de 43 (25,6%), pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Coniothyium* e *Phomopsis*, com consistente atividade contra as bactérias testadas, dentre elas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Zeng et al. (2005) apud Guo et al. (2008) testaram 24 endofíticos isolados do rizoma de *Polygonum cuspidatum*, identificados como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Mycelia sterillia*, os quais também produziram substâncias com propriedades antibióticas. Outro estudo, realizado por Wang et al. (2006) apud Guo et al. (2008), testou a bioatividade de fungos endofíticos de *Sinopodophyllum hexandnim* e *Diphylleia sinensis*, encontrando variadas atividades, sendo que os isolados da primeira planta apresentaram maior atividade antifúngica, enquanto que os da outra espécie vegetal exibiram mais forte atividade antibacteriana. As linhagens mais ativas pertenciam aos gêneros *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Trichoderma* e *Torula*.

Importantes compostos bioativos têm sido obtidos a partir dos fungos endofíticos, dos quais podemos citar alguns exemplos. Três novos metabólitos antimicrobianos foram extraídos por Lu et al. (2000) a partir da cultura de *Colletotrichum* sp., um endofítico isolado da planta medicinal *Artemisia annua*, na China. As propriedades terapêuticas desta espécie vegetal, capaz de sintetizar artemisina, que é utilizada como droga antimalárica, já eram conhecidas. A descoberta dos metabólitos fúngicos, no entanto, se mostrou bastante promissora, tendo em vista que eles apresentaram atividade tanto contra fungos e bactérias patogênicos para seres humanos, como contra fungos fitopatogênicos.

Outro composto com propriedades antibióticas importantes foi descoberto a partir de *Streptomyces* sp., isolado como um endofítico de *Monstera* sp. Este metabólito apresentou atividade contra o patógeno *Cryptococcus neoformans* (agente etiológico da meningite) e também contra o parasita causador da malária, *Plasmodium falciparum*, com uma concentração inibitória 50% (IC_{50}) de 9,0 ng/mL (EZRA et al., 2004). Também em 2004, Weber et al. encontraram outro antibiótico novo ("phomol"), uma lactona policetídica, isolado a partir da fermentação de um fungo endofítico *Phomopsis* sp., obtido da planta medicinal *Erythrina crista*. Além deste, dois novos diterpenos denominados como pcriconicinas A e B com atividades antibacterianas foram isolados a partir do fungo *Periconia* sp., obtido de *Taxus cuspidata*. Outros dois novos antibióticos também foram descobertos a partir da fermentação de *Acremonium zeae*, os quais mostraram forte atividade contra *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* e foram identificados como pirrocidinas A e B (WICKLOW et al., 2005).

Recentemente, dois fungos endofíticos foram citados pela primeira vez como produtores de compostos voláteis bioativos (CVB's): *Muscodor roseus*, isolado de *Erythophelum chlorostachys* e *Grevillea pteridifolia* no norte da Austrália, e *Muscodor albus*, a partir de *Cinnamomum zeylanicum* em Honduras. Estes endofíticos produzem um complexo de antimicrobianos voláteis que sinergicamente são letais para um grande espectro de fungos e bactérias patógenos humanos e vegetais. Esta mistura de gases consiste primariamente de vários álcoois, ácidos, ésteres, cetonas e lipídeos (WORAPONG et al., 2001; STROBEL et al., 2001). A partir desta descoberta, outros fungos produtores de voláteis bioativos foram encontrados, como *Muscodor vitigenus*, obtido de *Paullinia paullinioides* (DAISY et al., 2002) e, ainda, o primeiro exemplo de fungo não-*Muscodor* também produtor de CVB's, um endofítico *Gliocladium* sp.,

associado a *Eucryphia cordifolia* (STINSON et al., 2003). Além destes, outros isolados do gênero *Muscodor* têm sido obtidos de plantas tropicais em várias partes do mundo, incluindo Tailândia, Austrália, Peru, Venezuela e Indonésia (STROBEL, 2006b).

Uma relação dos principais fungos endofíticos produtores de substâncias com atividades biológicas importantes é apresentada na Tabela 1.

3. Hospedeiro vegetal: *Myrcia sellowiana*

A ordem Myrtales é constituída por 12 famílias e aproximadamente 9.000 espécies, sendo Myrtaceae e Melastomataceae as duas maiores famílias da ordem, pois abrigam juntas dois terços do total de espécies (JUDD et al., 1999 apud DE-CARVALHO, 2008).

Myrtaceae constitui-se em uma família com cerca de 3.000 espécies, subordinadas a cerca de 100 gêneros, apresentando ampla distribuição pelo globo, mas preferencialmente distribuídas pelas zonas tropicais e subtropicais. É uma das mais importantes famílias no Brasil, sendo freqüentemente uma das famílias lenhosas dominantes em diversas formações naturais, particularmente na Mata Atlântica. No Brasil, estima-se que ocorram aproximadamente 1.000 espécies e 19 gêneros (LANDRUM e KAWASAKI, 1997; MAZINE e SOUZA, 2008). No Cerrado, Myrtaceae contribui com 211 espécies distribuídas em 14 gêneros, sendo a sétima família mais representativa em número de espécies para este bioma (MENDONÇA et al., 1998).

Tabela 1. Exemplos de atividades biológicas caracterizadas a partir de endofíticos, adapatado de Tejesvi et al. (2007).

Hospedeiro vegetal	Endofítico	Bioatividade testada	Fonte
Artemisia annua	*Colletotrichum* spp.	antimalárico	Lu et al. (2000)
Artemisia mongolica	*Colletotrichum gloeosporioides*	antibacteriano e antifúngico	Zou et al. (2000)
Bontia daphnoides	*Nodulisporium* spp.	inseticida	Bills et al. (2002)
Cinnamomum zeylanicum	*Muscodor albus*	antibacteriano e antifúngico	Strobel et al. (2001)
Erythophelum chlorostachys	*Muscodor roseus*	antibacteriano e antifúngico	Strobel (2002)
Grevillea pteridifolia	*Muscodor roseus*	antibacteriano e antifúngico	Worapong et al. (2002)
Paullina paullinioides	*Muscodor vitigenus*	repelente de inseto	Daisy et al. (2002)
Quercus súber	*Diplodia mutila*	fitotóxico	Evidente et al. (2003)
Selaginella pallescens	*Fusarium* spp.	antifúngico	Brady e Clardy (2000)
Taxus baccata	*Acremonium* spp.	anti-oomicetos e anticancerígeno	Strobel et al. (1998)
Taxus brevifolia	*Taxomyces andreanae*	anticancerígeno	Rodrigues (1996)
Taxus mairie	*Tubercularia* spp.	anticancerígeno	Wang et al. (2000)
Taxus wallachiana	*Pestalotiopsis microspora*	anticancerígeno	Strobel et al. (1996)
Taxus wallachiana	*Phoma* spp.	antibacteriano	Yang et al. (1994)
Taxus wallachiana	*Sporormia minima*, *Trichothecium* spp.	desconhecido	Shrestha et al. (2001)
Terminalia morobensis	*Pestalotiopsis microspora*	antioxidante, antifúngico	Strobel et al. (2002); Harper et al. (2003)
Torreya taxifolia	*Pestalotiopsis microspora*	anticancerígeno e antibiótico	Lee et al. (1996)
Tripterygium wilfordii	*Cryptosporiopsis quercina*	antifúngico	Li et al. (2000)
Tripterygium wilfordii	*Cryptosporiopsis quercina*	antifúngico	Strobel et al. (1999)
Tripterygium wilfordii	*Rhinocladiella* spp.	anticancerígeno	Wagenaar et al. (2000)
Fragraea bodenii	*Pestalotiopsis jesteri*	antioomicetos	Strobel et al. (2000)
Torreya grandifolia	*Periconia* spp.	anticancerígeno	Li et al. (1998)
Taxodium distichum	*Pestalotiopsis microspora*	anticancerígeno	Li et al. (1996)
Tripterygium wilfordii	*Fusarium Subglutinans*	imunossupressor	Lee et al. (1995)

As Myrtaceae podem ser consideradas de grande importância ecológica, uma vez que apresentam características apícolas e produzem frutos comestíveis, muito apreciados pela fauna silvestre e, também, pelo homem, sendo consumidos principalmente por aves, roedores, macacos, morcegos e peixes. Diante disso, têm sido, frequentemente, indicadas para a revegetação de áreas perturbadas (BARROSO et al., 1999; LORENZI, 1998).

Esta família possui significativo número de espécies empregadas para fins medicinais. Espécies de Myrtaceae são utilizadas principalmente em distúrbios gastrointestinais, estados hemorrágicos e doenças infecciosas, sendo que sua ação pode estar relacionada às propriedades adstringentes da planta. As partes mais usadas são as folhas, cascas e também os frutos, que são comumente consumidos (CRUZ E KAPLAN, 2004). Segundo Limberger et al. (1998), as espécies desta família são ricas em sesquiterpenos, que apresentam um amplo espectro de efeitos biológicos, como atividade antineoplásica, antimalárica, antiviral e antimicrobiana.

O gênero *Myrcia* apresenta mais de 400 espécies distribuídas nas Américas tropical e subtropical, concentradas especialmente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (MAZINE e SOUZA, 2008). Ocorre em diversos ecossistemas como campos, cerrados, floresta ombrófila mista montana (floresta de Araucária), floresta ombrófila densa montana, florestas ripárias, brejos e várzeas (SOARES-SILVA, 2000 apud DE-CARVALHO, 2008).

A espécie *Myrcia sellowiana* (Figura 1) é conhecida na região do Jalapão, Estado do Tocantins, com o nome popular de “grudento” ou “cascudinho”. A comunidade local relata o uso da planta para o tratamento de ferimentos em animais e seres humanos, devido ao seu efeito cicatrizante. A parte do vegetal utilizada é a entrecasca, a qual é triturada para a formação de um pó fino, o qual é diretamente aplicado na região afetada. Apesar do uso etnobotânico, não existem relatos na literatura acerca das propriedades terapêuticas desta espécie vegetal.

Figura 1. Folhas (A), inflorescência (B), caule (C) e visão geral (D) de um indivíduo de *Myrcia sellowiana*.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Contribuir para o conhecimento da assembléia microbiana endofítica associada a *Myrcia sellowiana* (Myrtaceae) e avaliar o potencial destes microrganismos para produção de metabólitos com atividade antimicrobiana.

Objetivos específicos

- Caracterizar a diversidade de fungos endofíticos associados a amostras de caules e folhas de *M. sellowiana* e depositar os isolados obtidos em coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins;
- Calcular a frequencia de colonização dos tecidos de *M. sellowiana*;
- Verificar a atividade antimicrobiana de compostos fúngicos produzidos em meio de cultura e vegetais contra microrganismos alvos patógenos humanos e vegetais;
- Identificar as morfoespécies de fungos endofíticos que apresentarem atividade em mais de um dos ensaios biológicos realizados.

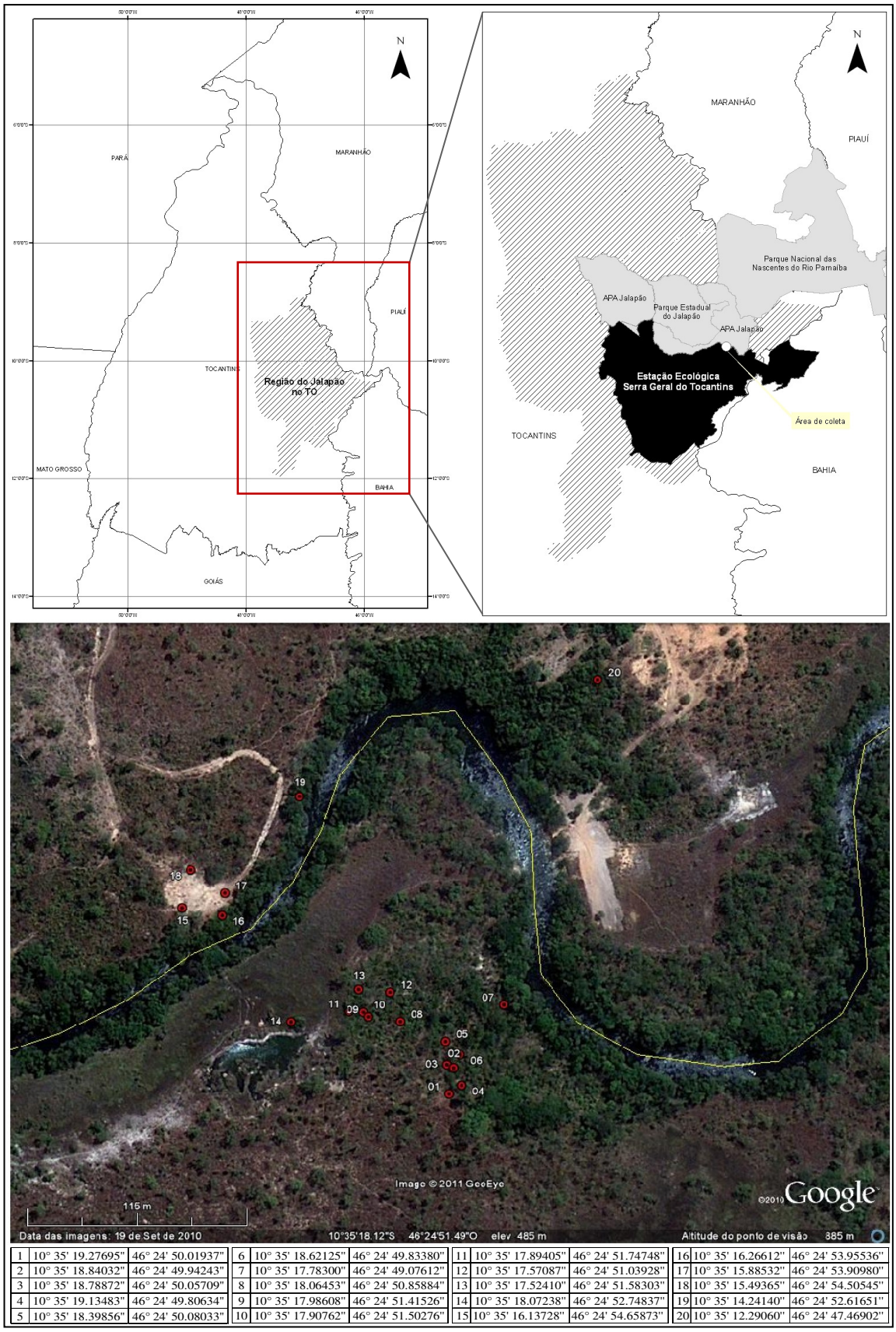
MATERIAL E MÉTODOS

1. Área de coleta

O Jalapão é uma região situada entre os paralelos 10º e 12º S e os meridianos 45º e 47º W no leste do estado do Tocantins. Ocupa uma área de aproximadamente 53 mil Km², com altitude média de cerca de 450 metros, na região de divisa entre os estados do Piauí, Maranhão e Bahia (Figura 2). A região está inserida na bacia hidrográfica do Araguaia-Tocantins, especificamente na bacia do rio Sono, o maior da região, muito rica em recursos hídricos com vários rios, cachoeiras, nascentes e, principalmente, veredas (CI, 2011).

Nesta região está inserida a Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins, unidade de conservação de proteção integral, criada por decreto presidencial em 27 de setembro de 2001 com o objetivo de proteger e preservar amostras dos ecossistemas de cerrado, bem como propiciar o desenvolvimento de pesquisas científicas. A unidade abrange os municípios de Almas, Ponte Alta do Tocantins, Rio da Conceição e Mateiros, no estado do Tocantins, e Formosa do Rio Preto, no estado da Bahia. É uma das maiores do Brasil, sendo que sua área totaliza 716.306 hectares. A gestão da unidade é de competência do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (MMA, 2011).

A região onde se localiza a Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins está parcialmente inserida no polígono de importância extremamente alta para a conservação da biodiversidade, denominado "Águas Emendadas do Rio do Sono", reconhecido pelo workshop "Ações Prioritárias para a Conservação do Cerrado e Pantanal", realizado emBrasília em março de 1998. A Estação também é uma das áreas núcleo da Reserva da Biosfera do Cerrado e compõe parte do Corredor Ecológico do Jalapão (CI, 2011).



1	10° 35' 19.27695"	46° 24' 50.01937"	6	10° 35' 18.62125"	46° 24' 49.83380"	11	10° 35' 17.89405"	46° 24' 51.74748"	16	10° 35' 16.26612"	46° 24' 53.95536"
2	10° 35' 18.84032"	46° 24' 49.94243"	7	10° 35' 17.78300"	46° 24' 49.07612"	12	10° 35' 17.57087"	46° 24' 51.03928"	17	10° 35' 15.88532"	46° 24' 53.90980"
3	10° 35' 18.78872"	46° 24' 50.05709"	8	10° 35' 18.06453"	46° 24' 50.85884"	13	10° 35' 17.52410"	46° 24' 51.58303"	18	10° 35' 15.49365"	46° 24' 54.50545"
4	10° 35' 19.13483"	46° 24' 49.80634"	9	10° 35' 17.98608"	46° 24' 51.41526"	14	10° 35' 18.07238"	46° 24' 52.74837"	19	10° 35' 14.24140"	46° 24' 52.61651"
5	10° 35' 18.39856"	46° 24' 50.08033"	10	10° 35' 17.90762"	46° 24' 51.50276"	15	10° 35' 16.13728"	46° 24' 54.65873"	20	10° 35' 12.29060"	46° 24' 47.46902"

Figura 2. Área de coleta, representando a localização geográfica em que se encontra inserida, os limites das unidades de conservação adjacentes e as coordenadas geográficas dos indivíduos vegetais amostrados.

O clima na unidade é o tropical semi-úmido do Brasil Central, com precipitação anual oscilando entre 1250-1750 mm e temperatura de 21 a 25ºC (média de 23ºC). Predomina o relevo das coberturas meta-sedimentares do São Francisco/Tocantins, conhecidos como Patamares do São Francisco/Tocantins. O relevo é levemente ondulado a ondulado. Os solos são arenoquatzosos profundos e latosolos. Segundo o mapa de vegetação do IBGE, ocorrem na região savana gramíneo-lenhosa, savana parque e savana arborizada, que correspondem às fisionomias de cerrado aberto, campo sujo e cerrado (MMA, 2011).

2. Amostragem

A coleta do material botânico foi realizada no mês de agosto de 2009 no interior e entorno da Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins. Para tanto, foi solicitada licença ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO, a qual foi concedida por meio da Autorização para atividades com finalidade científica n° 16508-2.

Foram amostrados 20 indivíduos de *Myrcia sellowiana* (Myrtaceae). Foram coletadas três frações de caule e três folhas aparentemente saudáveis de cada indivíduo, os quais foram armazenados em sacos plásticos e posteriormente processados no Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins em um período de até 24 horas após a coleta. A localização dos indivíduos vegetais foi determinada em coordenadas geográficas obtidas através de um aparelho de localização global "GPS" ("Global Positioning System") modelo Garmin E-trex.

3. Isolamento e preservação dos microrganismos

As folhas e frações de caules coletados foram imersos em detergente neutro e enxaguados com água destilada estéril. Em seguida, foram retirados 10 fragmentos com aproximadamente 1 cm^2 de cada folha e de cada fração de caule com o auxílio de tesoura e pinça estéreis. Estes fragmentos foram, então, imersos em álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio 2 % (3 minutos) e água destilada estéril (2 minutos), a fim

de eliminar os microrganismos epifíticos presentes na superfície das amostras (ARAÚJO et al., 2002).

Após a desinfecção superficial descrita acima, os fragmentos foram transferidos, em triplicata, para placas de Petri contendo ágar Dextrose-Batata (BDA, Difco/USA) ou ágar Extrato de Malte e Levedura (YMA - extrato de levedura 0,3 %, extrato de malte 0,3 %, glicose 1 %, peptona 0,5 %, ágar ágar 2 %), suplementados com 100 µg/mL de cloranfenicol, este utilizado para inibir o crescimento de bactérias. Ao final do plaqueamento, foram produzidas 240 placas no total, sendo 120 contendo meio BDA e 120 com meio YMA, cada uma delas inoculada com cinco fragmentos de caule ou folha desinfectados, gerando, no total, 1.200 fragmentos inoculados. Alíquotas da água destilada estéril utilizada ao final do processo de desinfecção foram também plaqueadas em meio BDA e YMA para verificar a eficiência desse processo.

As placas foram incubadas a 25 ºC por um período de até 60 dias. Os isolados fúngicos obtidos após a incubação foram individualmente transferidos para novas placas de Petri contendo BDA e incubados a 25 ºC por 7 dias para purificação. Em seguida 6 fragmentos do micélio junto com o meio de cultura foram retirados com o auxílio de um furador de rolha estéril e acondicionados em tubos criogênicos de 2,5 mL contendo glicerol a 30 % e mantidos sob refrigeração a -80 ºC em triplicata.

4. Cálculo da frequência de colonização

A frequência de colonização, que corresponde ao número de fragmentos colonizados, foi calculada utilizando-se a fórmula: *N*d/*N*t x 100, onde *N*d e *N*t correspondem, respectivamente, ao número de amostras das quais foi possível isolar um ou mais fungos endofíticos e ao número total de fragmentos amostrados para folha e caule individualmente e para o vegetal como um todo (TAYLOR et al., 1999).

5. Preparação de extratos vegetais de *M. sellowiana*

As partes remanescentes de folhas e caules dos vinte indivíduos de *M. sellowiana*, ou seja, não utilizadas para o isolamento de fungos endofíticos, foram transferidas para tubos cônicos de 50 mL, sendo adicionados 25 mL de metanol P.A. Estes tubos foram mantidos ao abrigo da luz e, após 15 dias, o sobrenadante (extrato

metanólico) foi filtrado em esferas de algodão previamente imersas em metanol por três dias e secas em estufa. Os extratos brutos obtidos foram transferidos para um tubo de ensaio de 10 mL e dois tubos cônicos de 2 mL para cada extrato. Posteriormente, estes tubos foram colocados para secar em estufa a temperatura inferior a 35ºC até evaporação total do solvente.

6. Preparação de extratos fúngicos

Os fungos endofíticos obtidos foram cultivados em meio BDA a 25 °C por um período de 14 dias. Após esse período, realizou-se a fragmentação do micélio fúngico juntamente com o meio de cultura utilizando espátula estéril. Os fragmentos de micélio e meio de cultura foram transferidos para tubos cônicos de 50 mL, sendo adicionados 25 mL de metanol P.A. Estes tubos foram mantidos refrigerados e ao abrigo da luz. Após 7 dias, o sobrenadante (extrato metanólico) foi filtrado com o uso de esferas de algodão previamente imersas em metanol por três dias e secas em estufa. Os extratos brutos obtidos foram transferidos para um tubo de ensaio de 10 mL e dois tubos cônicos de 2 mL para cada. Posteriormente, estes tubos foram colocados para secar em estufa a temperatura inferior a 35 ºC. Os extratos secos obtidos, tanto vegetais quanto fúngicos, foram solubilizados em solução de água:metanol (9:1) para uma concentração final de 10 mg/mL e mantidos a –20 °C para a utilização nos ensaios antimicrobianos.

7. Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos e vegetais

A determinação da atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos e vegetais foi realizada pelo método de difusão em disco, utilizando-se os seguintes microrganismos alvos: *Candida albicans* (ATCC 18804), *C. krusei* (ATCC 20298), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600). Foi testada ainda a atividade antifúngica dos extratos contra o fungo filamentoso patógeno de humanos *Cladosporium sphaerospermum* (CCT 1740), utilizado o método bioautográfico descrito por Homans e Fuchs (1970), com modificações, conforme descrito nos itens abaixo.

7.1. Padronização dos inóculos de microrganismos alvos

O inóculo das leveduras (*Candida albicans* e *C. krusei*) foi padronizado por meio da escala de Mac Farland nº 1 em densidade óptica, o que corresponde a 3 x 10^8 UFC/mL (YARROW, 1998). Para isso, as leveduras foram crescidas em ágar Sabouraud a 28ºC por 48 h. Cinco colônias foram, então, suspensas em solução salina estéril 0,145 mol/L (salina a 0,85%), sendo a suspensão resultante homogeneizada em agitador de vórtex durante 15 s e a densidade celular ajustada, acrescentando-se solução salina suficiente para obter turbidez equivalente à de uma solução-padrão da escala de Mc Farland nº 1 (NCCLS, 2002).

O inóculo das bactérias (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) foi padronizado por meio da escala de Mc Farland nº 0,5 em densidade ótica, o que corresponde a 1 a 2 x 10^8 UFC/mL. Para isso, as bactérias foram crescidas em ágar BHI (infuso coração e cérebro), através de incubação em estufa bacteriológica a 35ºC por 24 horas. Três colônias foram suspensas em solução salina estéril 0,145 mol/L (salina a 0,85%), sendo a suspensão resultante homogeneizada em agitador de vórtex durante 15 s e a densidade celular ajustada, acrescentando-se solução salina suficiente para obter turbidez equivalente à de uma solução-padrão da escala de Mc Farland nº 0,5 (NCCLS, 2003).

Para a padronização do inóculo do fungo filamentoso, culturas puras de *C. sphaerospermum* foram previamente crescidas em meio ágar BDA, através de incubação em estufa a 28ºC no escuro. Ao atingir a fase de maior esporulação (10-14 dias), cerca de 10-20 mL de polissorbato-20 (Tween®) a 0,05% foram adicionados sobre as culturas e, com o auxílio de uma alça de semeadura, o crescimento fúngico foi raspado e os esporos coletados em condições assépticas. Esta suspensão foi filtrada em gaze estéril para erlenmeyers também estéreis, para eliminação de fragmentos de meio de cultura e de micélio fúngico. Para contagem do número de esporos, uma alíquota desta suspensão foi transferida para câmara de Neubauer com o auxílio de uma micropipeta. Utilizando-se um microscópio óptico, com aumento de 40 X, foram contados os esporos presentes em 25 áreas de 1/16 mm. O número total de esporos/mL da suspensão foi calculado utilizando-se a fórmula: Nº total de esporos/mL = [Total de esporos contados x (1 / 0,00025) x diluição x 10^3] / Nº total de retículos.

A esta suspensão de esporos foi adicionada quantidade suficiente de uma solução contendo 60 mL de uma solução de sais (7g de KH_2PO_4, 3g de $Na_2HPO.2H_2O$, 4g de KNO_3, 1g de $MgSO_4.7H_2O$ e 1g de NaCl em 1000 mL de água) e 10 mL de uma solução de glicose 30%, de forma a se obter uma suspensão com a concentração final de $5x10^7$ esporos/mL para ser utilizada no ensaio.

7.2. Ensaio antimicrobiano

Para a realização do ensaio antimicrobiano, um "swab" foi imerso nas suspensões celulares de leveduras e bactérias previamente padronizadas, conforme descrito no item 7.1. Esses microrganismos alvos foram inoculados em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud para as leveduras e meio ágar BHI para as bactérias (ROSA et al., 2003). Discos de papel estéreis (6,2 mm de diâmetro) foram colocados sobre a superfície seca das placas inoculadas com os microrganismos alvos e 10 µL da solução em água:metanol (9:1) de cada extrato fúngico e vegetal (10 mg/mL) foram aplicados sobre os discos (100 µg/disco). Foram considerados ativos os extratos que apresentaram halo de inibição após um período de incubação de 24 e 48 horas a 37ºC e 28ºC para as bactérias e leveduras, respectivamente.

Para a determinação da atividade antifúngica com a utilização do fungo filamentoso, 100 µg de cada extrato fúngico e vegetal foram aplicados em papel de filtro e secos à temperatura ambiente. A suspensão contendo esporos de *C. sphaerospermum* na concentração final de $5x10^7$ esporos/mL foi borrifada sobre o papel de filtro onde as amostras foram aplicadas e, em seguida, o mesmo foi incubado durante 72 horas a 28ºC em câmara úmida. Após este período, foi observada a presença/ausência de crescimento fúngico próximo às áreas de aplicação dos extratos.

Como controles positivos foram aplicados 100 µg de cloranfenicol (Sigma/EUA) para as bactérias e 100 µg de anfotericina B (Sigma/EUA) para as leveduras e para o fungo filamentoso. O extrato do meio de cultura sem crescimento fúngico e 10 µL da solução água:metanol (9:1) foram utilizados como controles negativos.

Todos os extratos brutos foram avaliados em triplicata para a atividade antimicrobiana. Foram considerados ativos os extratos que apresentaram halos de

inibição contra pelo menos um dos microrganismos alvo, nas três repetições realizadas, vez que todos os testes foram executados em triplicata.

8. Determinação da atividade antagonista direta dos fungos endofíticos

Para a realização dos ensaios de antagonismo, todos os fungos endofíticos isolados foram testados quanto à produção de substâncias difusíveis e voláteis contra os seguintes fitopatógenos: *Monilinia fructicola* (mfa3635) e *Colletotrichum gloeosporioides* (CG-incoper02).

Os isolados endofíticos foram previamente cultivados em ágar Sabouraud (glicose 4%, peptona 1%, agar 2%) durante sete dias. No teste de verificação de substâncias difusíveis, um disco de ágar de 5 milímetros de diâmetro contendo micélio de cada fungo endofítico foi inoculado em um lado de uma placa de Petri contendo meio ágar Sabouraud e incubado em estufa por três dias a 25ºC. Em seguida, um disco similar de cada fitopatógeno foi inoculado no outro lado da placa. Após três dias de incubação a 25ºC, o raio do micélio fúngico foi medido e comparado com o controle.

O teste de produção de substâncias voláteis foi realizado utilizando placas de Petri das quais foi cortado o meio de cultura, removendo uma faixa na porção central do mesmo, a fim de evitar o efeito de difusão. Estas placas foram seladas com parafilme, após a inoculação do endofítico e do fitopatógeno, da mesma forma como mencionado anteriormente.

Os controles negativos dos dois tipos de ensaio descritos foram feitos com a inoculação de cada fitopatógeno no meio de cultura sem o antagonista. A inibição do crescimento foi constatada medindo-se o raio do micélio do fitopatógeno incubado na presença do endofítico teste, comparando-se com o controle.

Todos os testes foram realizados em triplicata. Foram considerados ativos os fungos endofíticos que inibiram o crescimento de pelo menos um dos fitopatógenos alvos, *Monilinia fructicola* ou *Colletotrichum gloeosporioides*, nas três repetições realizadas.

9. Caracterização, agrupamento morfológico e identificação dos fungos endofíticos

Todos os isolados de fungos filamentosos tiveram as colônias fotografadas (frente e verso) e agrupadas em morfoespécies, de acordo com as seguintes características macromorfológicas: cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e verso), aspecto da borda e produção de pigmentos. As morfoespécies que apresentaram atividade em mais de um dos ensaios biológicos realizados (produção de extrato com atividade antimicrobiana, inibição de crescimento fúngico por antagonismo direto e produção de compostos voláteis bioativos) tiveram um isolado selecionado como representante para identificação molecular por meio do sequenciamento da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS4) do DNA ribossomal, conforme descrito nos itens a seguir.

9.1. Extração do DNA total

A extração do DNA total foi realizada de acordo com De Hoog et al. (2003). Os fungos endofíticos selecionados, representantes das 50 morfoespécies encontradas, foram crescidos por sete dias em ágar Sabouraud. Fragmentos de micélio foram colocados em tubos de 1,5 mL acrescidos de 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl - trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA - ácido etilenodiamino tetraacético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS – sódio dodecil sulfato 1 %) e deixado a – 20 ºC por aproximadamente 10 min. O micélio foi triturado com o auxílio de um pistilo e foram acrescidos 5 µL de Proteinase K (50 µg/mL). Após homogeneização, o tubo foi colocado por 30 minutos a 60 ºC em banho-maria. Após essa etapa, foram adicionados 162 µL de CTAB de Hoog (Tris 2M, NaCl 8,2 %, EDTA 2M e CTAB 0,2 %), seguido de homogeneização e incubação por 10 min a 65 ºC. Em seguida, foram acrescentados 570 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização, o tubo foi incubado por 30 min em gelo. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 13.200 r.p.m. por 10 min e o líquido sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e acrescentado 10 % do volume de uma solução de acetato de sódio 3 M. O tubo foi vertido para homogeneização, incubado a 0 ºC por 30 min e centrifugado a 13.200 r.p.m. por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi

adicionado 50 % do volume de isopropanol e centrifugado a 13.200 r.p.m. por 5 min. O sobrenadante foi desprezado por inversão. A seguir, foram adicionados 200 μL de etanol 70 % p/v e a suspensão foi gentilmente homogeneizada. Após este procedimento, a amostra foi centrifugada a 13.200 r.p.m. por 5 min e o sobrenadante desprezado por inversão, seguido por homogeneização com etanol 70 % p/v. A amostra foi seca por aproximadamente 15 min, 50 μL de Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M) foram adicionados e a mesma foi incubada a 65 ºC por 60 min para hidratação do DNA. As amostras foram armazenadas em freezer a –20 ºC.

9.2. Obtenção dos amplicons

Os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATT GATATGC) foram utilizados para amplificação da região ITS do rDNA, conforme descrito por White et al. (1990). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 50 μL, contendo 4 % de DNA, 2 % de cada iniciador, ITS1 e ITS4 10 μmol^{-1} (MWG Biotech), 10 % de tampão de PCR 5X (Fermentas), 4 % de $MgCl_2$ 25mM, 4 % de dNTP 10 mM, 0,6 % de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água destilada estéril. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Express (Thermo Hybaid). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 ºC por 5 min, seguida por 35 ciclos de 1 min de desnaturação a 94 ºC, 1 min de anelamento a 55 ºC e 1 min de extensão a 72 ºC, e uma extensão final por 5 min a 72 ºC. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1 %, em tampão TBE 0,5 X, eluídos durante aproximadamente 1 h a 120 V. Os géis foram corados com solução de brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados.

9.3. Purificação dos amplicons

Os amplicons gerados pela reação de PCR foram purificados utilizando-se polietilenoglicol (PEG). Ao produto de PCR foi adicionado igual volume de uma solução de polietilenoglicol 20 % em NaCl 2,5 M, que foi mantido em banho-maria a 37 ºC por 15 min. O tubo foi centrifugado a 13.500 r.p.m. por 15 min e o sobrenadante foi retirado e descartado. A seguir, foram adicionados 125 μL de etanol 70-80% resfriado a

4 ºC. O tubo foi centrifugado a 13.500 r.p.m. por 2 min e o etanol foi retirado. Este passo foi repetido mais uma vez e a amostra foi novamente centrifugada a 13.200 r.p.m. por 1 min. O tubo foi deixado à temperatura ambiente para evaporação de todo o excesso de etanol. Foram adicionados 10 μL de água deionizada estéril e o conteúdo do tubo foi homogeneizado em vórtex por 15 s. Em seguida, o tubo foi incubado em banho-maria a 37 ºC por 40 min. O produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Thecnologies) para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

9.4. Reações de sequenciamento

O sequenciamento foi realizado utilizando-se o Kit DYEnamicTM (Amersham Biosciences, USA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado MegaBACETM 1000, no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM –UFMG). Para as reações de sequenciamento foram utilizados 100-150 ng do DNA purificado e os reagentes presentes no Kit DYEnamicTM (Amersham Biosciences, USA). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 10 μL contendo 40 % do pré-mix (presente no kit de sequenciamento) e 10 % do iniciador (5 μmol^{-1}), completando-se o volume final com água deionizada estéril. O programa consistiu de 36 ciclos de uma desnaturação inicial a 95 ºC por 25 min, seguido por 15 s de anelamento a 50 ºC e 3 min de extensão a 60 ºC. Em seguida, os produtos da reação foram transferidos para uma placa de sequenciamento de 96 poços para serem precipitados.

9.5. Precipitação da reação de sequenciamento

Para precipitação das reações de sequenciamento, 1 μL de acetato de amônio 7,5 M foi adicionado em cada poço da placa de 96 poços. A solução de acetato de amônio foi dispensada na parede lateral dos poços e a placa levemente batida sobre a bancada para que as gotas do acetato de amônio se misturassem à reação. Em seguida, foram adicionados 28 μL de etanol P.A. (Merck). A placa foi submetida à agitação em vórtex e incubada por 20 min à tempertaura ambiente, protegida da luz.

Após período de incubação, a placa foi centrifugada por 45 min a 4000 r.p.m. O sobrenadante foi descartado virando-se a placa sobre um papel absorvente. Em seguida, foram adicionados 150 μL de etanol 70% (Merck). A placa foi novamente

centrifugada por 15 min a 4000 r.p.m e o sobrenadante foi então descartado. Para remoção do excesso de etanol, a placa foi invertida sobre um papel absorvente, e submetida a um pulso em centrífuga a 900 r.p.m. durante 1 s. Em seguida, a placa foi mantida em repouso durante 20-40 min, protegida da luz, para evaporação do etanol.

O DNA das amostras precipitado em cada poço da placa foi então ressuspendido em 10 μL de tampão de carga do kit (*Loading buffer*). A placa foi submetida à agitação em vórtex por 2 minutos, centrifugada por 1 segundo a 900 r.p.m. e armazenada a 4ºC, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado MegaBACETM 1000.

9.6. Análise computacional das sequências

As sequências de DNA foram analisadas utilizando-se o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) desenvolvido pelo National Center For Biothecnology.

10. Avaliação da riqueza de morfoespécies

A avaliação da riqueza encontrada foi feita a partir dos dados de agrupamento morfológico em morfoespécies, utilizando-se o estimador de riqueza Jaccknife 1, obtido através do programa EstimateS, versão 8.20 para Windows. Para se revelar a suficiência do esforço amostral, foi produzida curva de acumulação de morfoespécies por indivíduo vegetal coletado a partir dos valores de Mao-Tau com 200 aleatorizações, obtidas também por meio do programa EstimateS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Coleta e isolamento dos fungos endofíticos

Ao final da coleta foram obtidas 60 amostras de caules e 60 de folhas, no total, sendo três frações de caule e três folhas por indivíduo. De cada uma destas amostras foram retirados 10 pequenos fragmentos, totalizando, portanto, 1.200 fragmentos, os quais foram desinfectados superficialmente para, então, serem transferidos para placas de Petri contendo meio BDA ou YMA. O BDA tem sido o meio de escolha para o isolamento de fungos endofíticos em importantes trabalhos realizados neste âmbito (STROBEL et al., 1999; HUANG et al., 2001; SOUZA et al., 2004; VIZCAÍNO et al., 2005; PHONGPAICHIT et al., 2006, LI et al., 2007; VERMA et al., 2007). Já o meio YMA foi utilizado como estratégia para favorecer o isolamento de leveduras endofíticas. Quanto ao processo de desinfecção superficial, este tem sido eficientemente empregado para o isolamento dos endofíticos, vez que se mostra adequado para a eliminação dos micorganismos epifíticos (RAVIJARA et al., 2006; STROBEL et al.,1999). Isso foi confirmado neste trabalho, pois nenhuma das alíquotas da água destilada estéril utilizada no final do processo de desinfecção, as quais foram plaqueadas tanto em meio BDA quanto YMA, apresentou crescimento microbiano após incubação.

Foram obtidos, no total, 152 isolados de fungos endofíticos, sendo todos fungos filamentosos, dos quais 145 (95,4%) foram obtidos de caules e apenas 7 (4,6%) de folhas. Estas têm sido as partes vegetais mais utilizadas para a obtenção de fungos endofíticos em estudos de diversidade e bioprospecção (RODRIGUES, 1994; SURYANARAYANAN et al., 2002; SANTOS et al., 2003; LIU et al., 2004; SANTAMARÍA E BAYMAN, 2005; RAVIJARA et al., 2006; GOND et al., 2007; PROMPUTTHA et al., 2007; RAKOTONIRIANA et al., 2007; WANG et al., 2007). Comparativamente a estes estudos, o isolamento de fungos a partir das amostras de folhas no presente trabalho foi considerado excessivamente baixo. Isso ocorreu, provavelmente, devido à idade das folhas coletadas, uma vez que as mesmas eram jovens e, possivelmente, ainda não significativamente colonizadas por microrganismos.

Isso se justifica porque, à época da coleta, as folhas maduras apresentavam sinais evidentes de ataque por herbívoros, tendo sido evitadas a fim de não acarretar o isolamento de microrganismos transitórios e ou patogênicos ao hospedeiro vegetal.

Sabe-se que a incidência de fungos endofíticos cresce proporcionalmente à idade do tecido hospedeiro (FISHER et al., 1986). Chareprasert et al. (2006), por exemplo, estudaram a diversidade de fungos endofíticos associados a duas espécies de plantas na Tailândia, *Tectona grandis* e *Samanea saman* Merr., levando em consideração a idade das folhas coletadas. Descobriu-se que a frequência de colonização de folhas maduras é maior do que de folhas jovens, recém-emergidas. Resultados semelhantes foram encontrados por Suryanarayanan e Thennarasan (2004), avaliando a variação temporal na assembléia endofítica de folhas de *Plumeria rubra*. Isto pode ser explicado, porque, além das folhas maduras apresentarem uma área maior para captura de inóculo em sua superfície, elas ainda estariam expostas durante um período mais longo do que folhas jovens e, consequentemente, receberiam maiores quantidades de fungos. Além disso, existem outras características do tecido vegetal, como espessura da cutícula, biomassa e substâncias secundárias, relacionadas à idade foliar, que podem justificar a baixa colonização de folhas jovens (OKI et al., 2009).

Não foi obtido, ao final do processo de isolamento, nenhum isolado de levedura endofítica. Poucos estudos com o objetivo de caracterizar leveduras endofíticas foram realizados até o momento. Sartori-Camatti et al. (2005) estudaram a diversidade de leveduras e fungos filamentosos endofíticos associados a folhas, flores e frutos de *Malus domestica* (maçã), sendo que uma proporção de 12% dos fungos obtidos correspondeu a leveduras. Por sua vez, Zhao et al. (2002) avaliaram as populações de leveduras endofíticas de *Pinus tabulaeformis*, onde aproximadamente 1.000 placas foram inoculadas com fragmentos de casca e xilema de 30 árvores, e somente três isolados de leveduras foram obtidos a partir do xilema. Raviraja et al. (2006) obtiveram fungos endofíticos de oito plantas medicinais presentes em três regiões da Índia, de 160 fragmentos de folhas e de caules plaqueados, foi possível o isolamento de apenas um isolado de levedura endofítica.

A frequência de isolamento de leveduras endofíticas pode ser influenciada por diferentes fatores, como pH, temperatura e umidade, entre outros, os quais podem constituir parâmetros determinantes para a obtenção deste grupo de microrganismos. Outro ponto a ser considerado é que muitos fungos filamentosos apresentam rápido

desenvolvimento após emergirem dos fragmentos de folhas e caules, sobrepondo, no meio de cultura, o crescimento das colônias de leveduras, o que dificulta o isolamento das mesmas. Além disso, leveduras podem constituir um grupo escasso na comunidade de microrganismos endofíticos de folhas e caules, justificando, assim, o fato de não ter sido obtido nenhum isolado de levedura através do método empregado.

Neste trabalho, o número de isolados obtidos por indivíduo vegetal variou de 0 a 18, conforme pode ser observado na Tabela 2. Sabe-se que este número de isolados por indivíduo pode ser ainda maior, uma vez que o isolamento destes microrganismos pode ser influenciado pela habilidade dos mesmos de crescerem fora do tecido vegetal, em meios de cultura convencionais. Além disso, fungos que crescem mais lentamente, ou mesmo que não crescem no meio de cultura proposto para isolamento, não podem ser isolados (PROMPUTTHA et al., 2007), o que constitui uma limitação do método de plaqueamento para avaliação da diversidade destes microrganismos. Embora não se saiba exatamente qual a proporção de fungos endofíticos pode ser efetivamente isolada e cultivada com as técnicas atuais, estima-se que ela seja inferior a 17% do total de microrganismos associados a determinado hospedeiro vegetal (ARNOLD, 2007).

Tabela 2. Frequência de fungos endofíticos obtidos de amostras de caules e folhas de *Myrcia sellowiana*.

Hospedeiro	**Frequência de fungos endofíticos**		**Total de isolados por hospedeiro**
	Caule	**Folha**	
1	17	0	17
2	17	1	18
3	7	0	7
4	16	0	16
5	7	0	7
6	14	0	14
7	12	1	13
8	4	1	5
9	2	0	2
10	13	0	13
11	10	0	10
12	10	0	10
13	1	1	2
14	4	0	4
15	1	0	1
16	1	2	3
17	0	1	1
18	0	0	0
19	6	0	6
20	3	0	3
Total	**145**	**7**	**152**
%	**95,4**	**4,6**	**100**

A frequência de colonização (TAYLOR et al., 1999) é normalmente dada em porcentagem e pode ser amplamente variável em decorrência de inúmeros fatores, como a localização geográfica da planta, as condições climáticas do local de coleta, a idade e parte das plantas utilizadas. A frequência de colonização global obtida neste trabalho para *Myrcia sellowiana* foi de 12,7 %, o que reflete, de fato, o inexpressivo número de isolados obtidos a partir das amostras de folhas. Efetuando-se o cálculo da frequência de colonização separadamente para as amostras de caules e folhas, esta equivale, respectivamente, a 24,2 % e 1,2 %.

Taylor et al. (1999) obtiveram frequências de colonização que variaram de 23,4 a 57,3 % em *Trachycarpus fortunei,* em função do local e das condições climáticas onde a planta foi coletada. Em ecossistemas tropicais, Gamboa e Bayman (2001) relataram altas taxas de colonização (95-98 %) em folhas de *Guarea guidonia*, coletadas em Porto Rico. Lodge et al. (1996) obtiveram também altas frequências de colonização em *Manilkaria bidentata* (90-95 %). Por outro lado, taxas inferiores foram registradas por Brown et al. (1998) em outros hospedeiros tropicais, como *Musa acuminata*, banana, (29-67 %) e por Rodrigues (1994), o qual obteve um máximo de 30 % de colonização em *Euterpe oleracea*, uma planta da Amazônia brasileira.

2. Cultivo dos fungos e obtenção dos extratos metanólicos

Foram produzidos extratos metanólicos para avaliação da atividade antimicrobiana dos fragmentos de caule e folha de todos os indivíduos de *M. sellowiana* e também de todos os isolados fúngicos obtidos. Ao final dos procedimentos de extração das amostras vegetais foram obtidos 40 extratos, no total, sendo 20 extratos de caule e 20 de folhas. A extração a partir do micélio e meio de cultivo dos endofíticos gerou um total de 152 extratos fúngicos. O rendimento do processo de extração variou de 39,56 a 288,68 mg (média: 122,4 ± 62,3) para os extratos vegetais e de 0,9 a 54,96 mg (média: 14 ± 7,8) para os extratos fúngicos.

Existem diferentes técnicas para produção de extratos brutos a partir de organismos vegetais e de microrganismos. A forma de extração dos metabólitos constitui uma importante etapa na detecção de substâncias bioativas em ensaios de triagem. Vários solventes já foram utilizados para a extração de metabólitos secundários

de fungos endofíticos, tais como metanol (PELÁEZ et al.,1998), acetato de etila (ROSA et al., 2003; RAVIJARA et al., 2006; PHONGPAICHIT et al., 2006; WANG et al., 2006), etanol (GAMBOA e BAYMAN, 2001) e diclorometano (SETTE et al., 2006). Neste trabalho, foi utilizado o metanol devido à sua polaridade e afinidade por moléculas de baixo e médio peso molecular, além do satisfatório poder de penetração em meios de cultura sólidos (VIZCAÍNO et al., 2005).

Além do tipo de solvente utilizado no processo de extração, outros fatores relacionados às condições de cultivo dos microrganismos influenciam na obtenção de metabólitos bioativos. Fatores como a composição do meio de cultura, pH, umidade e tempo de crescimento das culturas podem resultar em diferenças significativas na produção destes metabólitos, uma vez que tais condições ativam vias metabólicas distintas (WIYAKRUTTA et al., 2003). O meio de cultura selecionado para cultivo dos fungos e produção dos extratos foi o meio BDA. Este é considerado por Ezra e Strobel (2003) como um meio altamente nutritivo, tendo sido o substrato que permitiu a detecção de um maior número de metabólitos bioativos nos estudos desenvolvidos por estes autores.

3. Atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos e vegetais

Dentre os extratos fúngicos produzidos, 71 (46,7 %) foram ativos contra pelo menos um dos microrganismos alvos (Tabela 3). Destes, 62 (40,8 %) mostraram atividade contra *S. aureus*, 20 (13,1 %) contra *E. coli* e 11 (7,2 %) foram ativos simultaneamente contra estes dois microrganismos. Nenhum extrato foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. sphaerospermum*. Na Figura 3 visualizamos halos de inibição produzidos por extratos de fungos endofíticos contra o microrganismo *S. aureus*.

Acredita-se que as bactérias Gram-negativas sejam mais resistentes à inibição por extratos fúngicos do que as Gram-positivas (PELÁEZ et al., 1998). Isto pode ser explicado por: (1) presença de membrana externa na parede celular das Gram-negativas, constituindo uma barreira à penetração de antibióticos; (2) presença de enzimas capazes de degradar antibióticos no espaço periplasmático destes microrganismos; (3) alto grau de resistência intrínseca a um grande número de agentes antimicrobianos que essas bactérias apresentam (SARTORI et al., 2003). Resultados semelhantes foram obtidos

nesta pesquisa, uma vez que o número de extratos ativos contra *S. aureus* (62) foi superior ao número de extratos ativos contra *E. coli* (20).

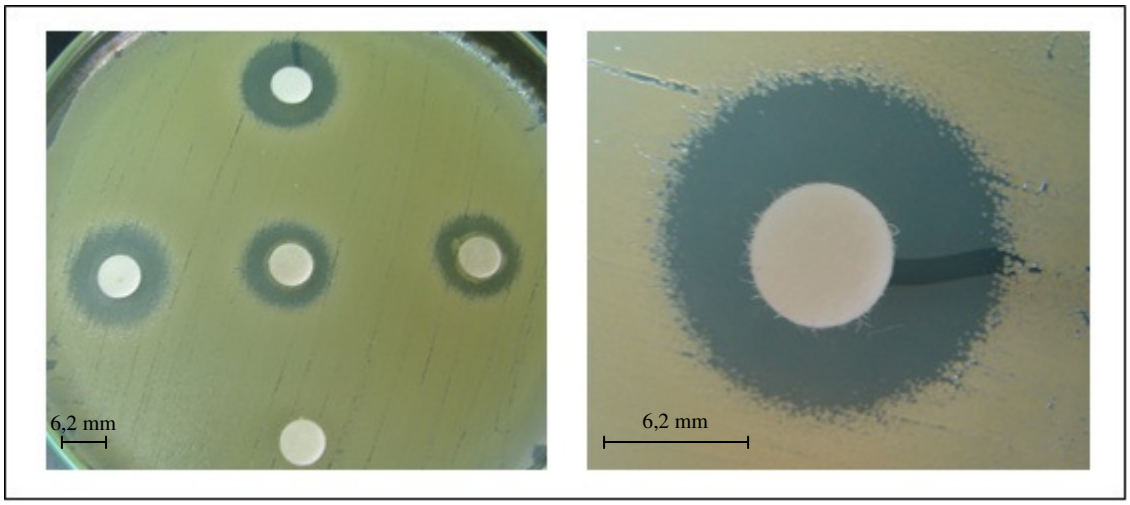


Figura 3. Halos de inibição produzidos por extratos brutos de fungos endofíticos isolados de *M. selloviana* contra S. aureus (ATCC 12600) após incubação a 37 ºC por 24 h.

Tabela 3. Fungos endofíticos obtidos de amostras de caules e folhas de *Myrcia sellowiana* produtores de extratos com atividade antimicrobiana.

Isolado	**Presença/ausência de halos de inibição**				
(UFT2009F)	**SA**	**EC**	**CA**	**CK**	**CS**
2401	+	-	-	-	-
2402	+	+	-	-	-
2404	+	-	-	-	-
2406	+	+	-	-	-
2407	+	-	-	-	-
2408	+	-	-	-	-
2409	+	-	-	-	-
2410	+	-	-	-	-
2411	+	-	-	-	-
2413	+	-	-	-	-
2414	+	-	-	-	-
2415	+	-	-	-	-
2416	+	+	-	-	-
2417	+	-	-	-	-
2418	+	+	-	-	-
2419	+	-	-	-	-
2420	+	-	-	-	-
2422	+	-	-	-	-
2424	+	-	-	-	-
2425	+	-	-	-	-
2426	+	-	-	-	-
2427	+	-	-	-	-
2428	+	-	-	-	-

Isolado	Presença/ausência de halos de inibição				
(UFT2009F)	SA	EC	CA	CK	CS
2429	-	+	-	-	-
2430	-	+	-	-	-
2431	+	+	-	-	-
2432	+	-	-	-	-
2433	+	+	-	-	-
2434	+	-	-	-	-
2435	+	-	-	-	-
2437	+	-	-	-	-
2439	+	-	-	-	-
2441	+	-	-	-	-
2442	+	-	-	-	-
2449	+	-	-	-	-
2450	+	-	-	-	-
2451	+	-	-	-	-
2463	+	-	-	-	-
2464	+	-	-	-	-
2466	+	-	-	-	-
2467	+	-	-	-	-
2468	+	-	-	-	-
2469	+	-	-	-	-
2470	+	-	-	-	-
2471	+	-	-	-	-
2475	+	-	-	-	-
2476	+	-	-	-	-
2488	+	-	-	-	-
2491	+	-	-	-	-
2493	-	+	-	-	-
2494	-	+	-	-	-
2496	-	+	-	-	-
2498	+	-	-	-	-
2507	+	-	-	-	-
2508	+	-	-	-	-
2509	+	-	-	-	-
2510	+	-	-	-	-
2515	+	-	-	-	-
2519	+	-	-	-	-
2523	+	-	-	-	-
2524	-	+	-	-	-
2526	+	+	-	-	-
2527	-	+	-	-	-
2529	+	+	-	-	-
2530	+	+	-	-	-
2531	-	+	-	-	-
2532	+	+	-	-	-
2533	-	+	-	-	-
2535	+	+	-	-	-
2548	+	-	-	-	-
2550	+	-	-	-	-
Total	**62**	**20**	**0**	**0**	**0**

UFT2009F: código da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins;

SA: *Staphylococcus aureus*; EC: *Escherichia coli*; CA: *Candida albicans*; CK: *Candida Krusei*; CS: *Cladosporium sphaerospermum*;

(+): presença de halo de inibição; (-): ausência de halo de inibição.

Endofíticos de plantas medicinais obtidos em diferentes regiões do mundo vêm sendo caracterizados e selecionados como fontes promissoras de metabólitos bioativos. Como exemplo, Huang et al. (2001) avaliaram a atividade antifúngica de fungos endofíticos isolados das plantas medicinais *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* e *Torreya grandis* coletadas na China, encontrando 52,3 % extratos ativos contra pelo menos um fungo patogênico. Em outro estudo, envolvendo fungos endofíticos de oito plantas medicinais coletadas na China, Ravijara et al. (2006) produziram extratos a partir do cultivo dos fungos em meio sólido, dos quais 26 % apresentaram atividade contra pelo menos um dos seguintes microrganismos: *Bacillus subtilis, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, S. aureus* e *C. albicans.* Por sua vez, Phongpaichit et al. (2006) obtiveram 18,6 % do total de isolados fúngicos de plantas medicinais do gênero *Garcinia* com atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *S. aureus* MRS, *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans*. No Brasil, Souza et al. (2004) obtiveram 571 fungos endofíticos de folhas e caules das plantas tóxicas da Amazônia *Palicourea longiflora* (Rubiaceae) e *Strychnos cogens* (Loganiaceae) e 24 % dos extratos apresentaram atividade contra os microrganismos testados.

Embora a porcentagem de fungos endofíticos bioativos seja significativamente variável entre os diferentes estudos encontrados na literatura, o que ocorre por diversos fatores, inclusive considerando os métodos empregados nos ensaios biológicos, têm-se alcançado satisfatórios índices de atividade antimicrobiana, chegando a ultrapassar 30 % em ensaios realizados pelo método de difusão em disco (HUANG et al., 2001; PELÁEZ et al., 1998; WANG et al, 2006). Neste estudo, a porcentagem de fungos endofíticos ativos é compatível e até mesmo superior aos resultados encontrados por outros autores em ensaios semelhantes.

Os extratos vegetais, diversamente do que ocorreu com os extratos fúngicos, não apresentaram atividade contra nenhum dos microrganismos alvos. Apesar do amplo uso popular desta planta, não foi encontrado nenhum estudo avaliando a possível atividade antimicrobiana de suas folhas e caules. Este trabalho, por sua vez, não identificou este tipo de atividade, a partir do ensaio antimicrobiano realizado com os extratos metanólicos vegetais. No entanto, estudos adicionais empregando diferentes ensaios e utilizando outros microrganismos alvos devem ser realizados a fim de avaliar mais detalhadamente a possível propriedade antimicrobiana desse vegetal.

Sabe-se que a população endofítica é muito menor no hospedeiro do que no meio de cultura, tendo em vista que neste encontram-se reunidos vários fatores e condições controladas que favorecem o crescimento do fungo, diversamente do que ocorre no ambiente natural, onde interações com a planta e outros organismos, além de fatores nutricionais, limitam o seu desenvolvimento. Isso pode justificar a atividade de extratos obtidos dos fungos cultivados em contraposição à inatividade dos extratos vegetais, onde os fungos também estariam presentes, no entanto em proporções muito reduzidas.

Alguns autores sugerem que a atividade farmacológica atribuída às plantas possa estar relacionada às substâncias produzidas pelos fungos endofíticos que habitam este hospedeiro (ARNOLD et al., 2000; FERRARA, 2006). Para Tejesvi et al. (2007), é muito provável que a fonte destas drogas sejam realmente os fungos endofíticos, diante da extensa capacidade metabólica dos microrganismos, e que o vegetal esteja simplesmente fornecendo um ambiente apropriado para o crescimento fúngico.

4. Atividade antagonista direta dos fungos endofíticos

Dentre os isolados testados quanto à produção de substâncias difusíveis no meio, 35 (23 %) inibiram o crescimento de pelo menos um dos fitopatógenos alvos. Destes, 34 (22,4 %) foram ativos contra *Colletotrichum gloeosporioides* e apenas 1 (0,6 %) contra *Monilinia fructicola*. No teste de produção de voláteis bioativos, foram encontrados 32 (21,0 %) fungos endofíticos capazes de inibir o crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides*. Nenhum endofítico, no entanto, produziu compostos voláteis ativos contra *Monilinia fructicola* (Tabela 4).

Tabela 4. Fungos endofíticos obtidos de amostras de caules e folhas de *Myrcia sellowiana* produtores de substâncias difusíveis e voláteis capazes de inibir o crescimento de *Monilinia fructicola* e/ou *Colletotrichum gloeosporioides*.

Isolado (UFT2009F)	**Presença/ausência de atividade**			
	Substâncias difusíveis		**Compostos voláteis**	
	CG	**MF**	**CG**	**MF**
2432	+	-	+	-
2435	+	-	+	-
2438	+	-	+	-
2439	+	-	+	-
2440	+	-	+	-

Isolado (UFT2009F)	Presença/ausência de atividade			
	Substâncias difusíveis		Compostos voláteis	
	CG	MF	CG	MF
2441	+	-	+	-
2442	+	-	-	-
2443	+	-	+	-
2446	+	-	+	-
2447	+	-	-	-
2448	+	-	+	-
2449	+	-	+	-
2450	+	-	+	-
2451	+	-	+	-
2452	+	-	+	-
2458	+	-	+	-
2459	-	-	+	-
2460	+	-	+	-
2461	+	-	+	-
2462	+	-	+	-
2463	+	-	+	-
2464	+	-	+	-
2465	+	-	-	-
2468	+	-	+	-
2469	+	-	+	-
2470	+	-	+	-
2472	-	-	+	-
2473	+	-	+	-
2484	+	-	+	-
2489	+	-	+	-
2490	+	-	-	-
2495	+	-	+	-
2496	+	-	+	-
2501	+	-	+	-
2505	+	-	+	-
2514	-	+	-	-
2535	+	-	+	-
Total	**34**	**1**	**32**	**0**

UFT2009F: código da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins;

CG: *Colletotrichum gloeosporioides*; MF: *Monilinia fructicola*;

(+): presença de atividade inibitória de crescimento; (-): ausência de atividade inibitória de crescimento.

O fitopatógeno *C. gloeosporioides* é o mais expressivo agente causador da antracnose, principal doença de frutos em pós-colheita nas regiões tropicais e sub-tropicais do mundo, e pode degradar: banana (*Musa* spp.), caju (*Anacardium occidentale* L.), manga (*Mangifera indica* L.), mamão (*Carica papaya* L.), maracujá (*Passiflora edulis* f. flavicarpa Deg.), entre outras (BENATO, 1999). Já *Monilinia fructicola* é responsável pela podridão parda, a qual constitui a doença mais importante das rosáceas de caroço, como o pêssego, representando também significativas perdas para a economia mundial (MOREIRA e MAY-DE MIO, 2009).

Foi observado um grande número de isolados capazes de inibir o crescimento de *C. gloeosporioides.* Em contraste, foi observada uma baixa frequência de isolados ativos contra *M. fructicola*. Isso pode ser justificado pela influência da pressão evolutiva sobre o primeiro fitopatógeno, o qual ocorre com grande frequência no Brasil, e pela ausência ou inexpressiva pressão seletiva sobre o segundo, de ocorrência menos frequente em nosso país.

O controle biológico através da utilização de microrganismos que ocorrem naturalmente na superfície das plantas tem sido proposto como medida alternativa de controle de *M. fructicola*. No controle desse patógeno, já foram selecionados como antagonistas *Penicillium frequentans* Westling, *Epicoccum nigrum* Link, *Trichothecium roseum* (Pers.:Fr.) Link, *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud, *E. purpurascens* Ehrenberg, e *Gliocladium roseum* Bainier (MOREIRA e MAY-DE MIO, 2006).

Martins-Corder e Melo (1998) realizaram diferentes testes de antagonismo *in vitro* utilizando *Trichoderma* sp. contra *Verticillium dahlie* Kleb, demonstrando ampla capacidade antagonista. Através da secreção de metabólitos tóxicos por *Trichoderma* spp., ocorreu a degradação das hifas do microrganismo alvo, inibindo o desenvolvimento de *V. dahlie*. Arnold et al. (2003), por sua vez, comprovaram o antagonismo entre fungos endofíticos do cacau (*Theobroma cacao*) e o fitopatógeno *Phytosphora infestans*. Estes autores isolaram microrganismos associadas a este hospedeiro e os inocularam em mudas estéreis, as quais foram, posteriormente, inoculadas com o fitopatógeno. As mudas inoculadas com os endófitos tiveram uma pequena colonização pelo fitopatógeno em suas folhas, comprovando que a interação entre os microrganismos endofíticos e o hospedeiro têm efeito negativo sobre o fitopatógeno, resultando na inibição do seu crescimento.

No presente trabalho, conforme pode ser visualizado através da Figura 4, foi observada similaridade entre os resultados do ensaio de antagonismo por produção de substâncias difusíveis no meio e voláteis bioativos, sendo que a grande maioria dos isolados ativos em um destes testes foi também ativo no outro e contra o mesmo microrganismo alvo. Apenas os isolados 2459 e 2472 foram ativos contra o fitopatógeno *C. gloeosporioides* no teste de produção de voláteis bioativos, mas não no de difusão em ágar, enquanto que os isolados 2442, 2447, 2465 e 2490, ao contrário, foram ativos contra este fitopatógeno no ensaio de substâncias difusíveis, porém não apresentaram atividade quanto à produção de compostos voláteis.

Isso pode ser justificado pela metodologia característica destes ensaios, uma vez que o antagonismo por substâncias difusíveis requer a difusão de metabólitos secundários originados do endofítico pelo meio de cultura a fim de inibir o crescimento do microrganismo alvo no outro pólo da placa de Petri. Essa difusão de metabólitos, no entanto, não ocorre no ensaio de produção de compostos voláteis, devido ao isolamento físico promovido no meio de cultivo através da remoção de uma faixa central do meio, o que interrompe a continuidade do mesmo. Isso garante que, ocorrendo inibição de crescimento do microrganismo alvo neste tipo de ensaio, esta se dará exclusivamente pela ação de compostos voláteis produzidos pelo endofítico, os quais alcançarão as células do fitopatógeno por dispersão aérea, diante da impossibilidade de difusão em meio. No entanto, a inibição ocorrida no teste de antagonismo direto por difusão pode ter se dado sinergicamente ou até exclusivamente pela produção de voláteis, uma vez que a possibilidade de produção destes compostos não foi eliminada no teste de difusão.

Considerando os três tipos de ensaio biológico realizados (produção de extratos antimicrobianos, substâncias difusíveis bioativas e compostos voláteis), podemos constatar que a porcentagem de fungos endofíticos ativos por indivíduo de *M. sellowiana* variou drasticamente, ocorrendo desde indivíduos vegetais dos quais não foi isolado nenhum endofítico com atividade antimicrobiana até indivíduos dos quais a grande maioria ou até todos os isolados obtidos foram ativos contra pelo menos um microrganismo alvo (Tabela 5). A Figura 4 representa o número de isolados de fungos endofíticos ativos em relação ao total de isolados obtidos de cada indivíduo vegetal para os três ensaios.

Tabela 5. Frequência absoluta e frequência relativa de fungos endofíticos por indivíduo de *Myrcia sellowiana* que apresentaram atividade biológica nos três ensaios realizados.

Hospedeiro	**Total de isolados**	**A**		**B**		**C**	
		F	**F %**	**F**	**F %**	**F**	**F %**
1	17	14	82,4	0	0,0	0	0,0
2	18	15	83,3	1	5,6	1	5,6
3	7	2	28,6	1	14,3	1	14,3
4	16	7	43,8	14	87,5	12	75,0
5	7	0	0,0	0	0,0	0	0,0
6	14	8	57,1	10	71,4	10	71,4
7	13	2	15,4	1	7,7	2	15,4
8	5	1	20,0	1	20,0	1	20,0
9	2	0	0,0	2	100,0	1	50,0
10	13	5	38,5	3	23,1	3	23,1
11	10	4	40,0	1	10,0	1	10,0

Hospedeiro	Total de isolados	A		B		C	
		F	F %	F	F %	F	F %
12	10	3	30,0	1	10,0	0	0,0
13	2	1	50,0	0	0,0	0	0,0
14	4	2	50,0	0	0,0	0	0,0
15	1	0	0,0	0	0,0	0	0,0
16	3	1	33,3	0	0,0	0	0,0
17	1	0	0,0	0	0,0	0	0,0
18	0	0	-	0	-	0	-
19	6	5	83,3	0	0,0	0	0,0
20	3	1	33,3	0	0,0	0	0,0
Total	**152**	**71**	-	**35**	-	**32**	-

Ensaios biológicos: A – produção de extratos antimicrobianos; B – produção de substâncias bioativas difusíveis no meio; C – produção de compostos voláteis bioativos;

F: frequência absoluta de isolados de fungos endofíticos com atividade biológica; F %: frequência relativa de isolados de fungos endofíticos ativos dentre o total de isolados obtidos por indivíduo vegetal.

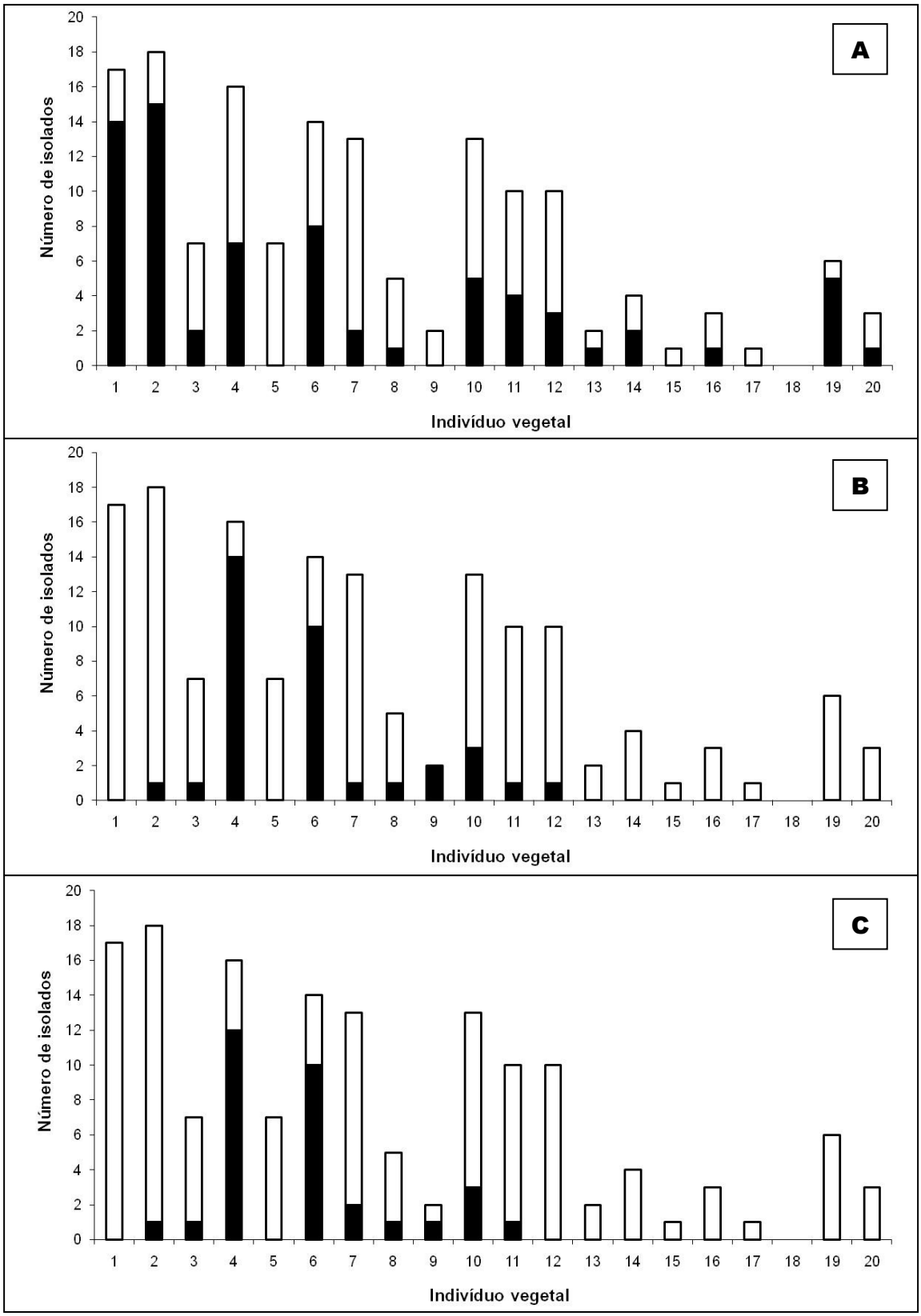


Figura 4. Número de isolados de fungos endofíticos ativos (■) e que não apresentaram atividade biológica (□) por indivíduo de *Myrcia sellowiana*, considerando os três ensaios realizados: produção de extratos com atividade antimicrobiana (A), produção de substâncias bioativas difusíveis no meio (B) e produção de compostos voláteis bioativos (C).

5. Agrupamento morfológico e identificação molecular

Os isolados fúngicos obtidos foram agrupados em 50 morfoespécies, de acordo com as seguintes características macromorfológicas: cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e verso) e aspecto da borda e produção de pigmentos (Figura 5).

A Tabela 6 representa o número de isolados de fungos endofíticos e de morfoespécies obtidos para cada indivíduo vegetal. A partir da curva de riqueza de morfoespécies por indivíduo vegetal podemos visualizar o crescimento contínuo no número de morfoespécies com o aumento da amostragem sem, no entanto, se aproximar de uma assíntota e, portanto, distante de uma estabilização. Isso indica a grande probabilidade de que fossem encontradas mais morfoespécies caso o esforço amostral tivesse sido maior, o que foi confirmado a partir do resultado obtido através do estimador de riqueza empregado (Jackknife 1), o qual se baseia no número de espécies que ocorrem em somente uma amostra (Figura 6). Com isso, percebemos que o método de coleta não atingiu o limite de saturação, embora tenha se adequado aos objetivos propostos neste trabalho e demonstrado resultados satisfatórios.

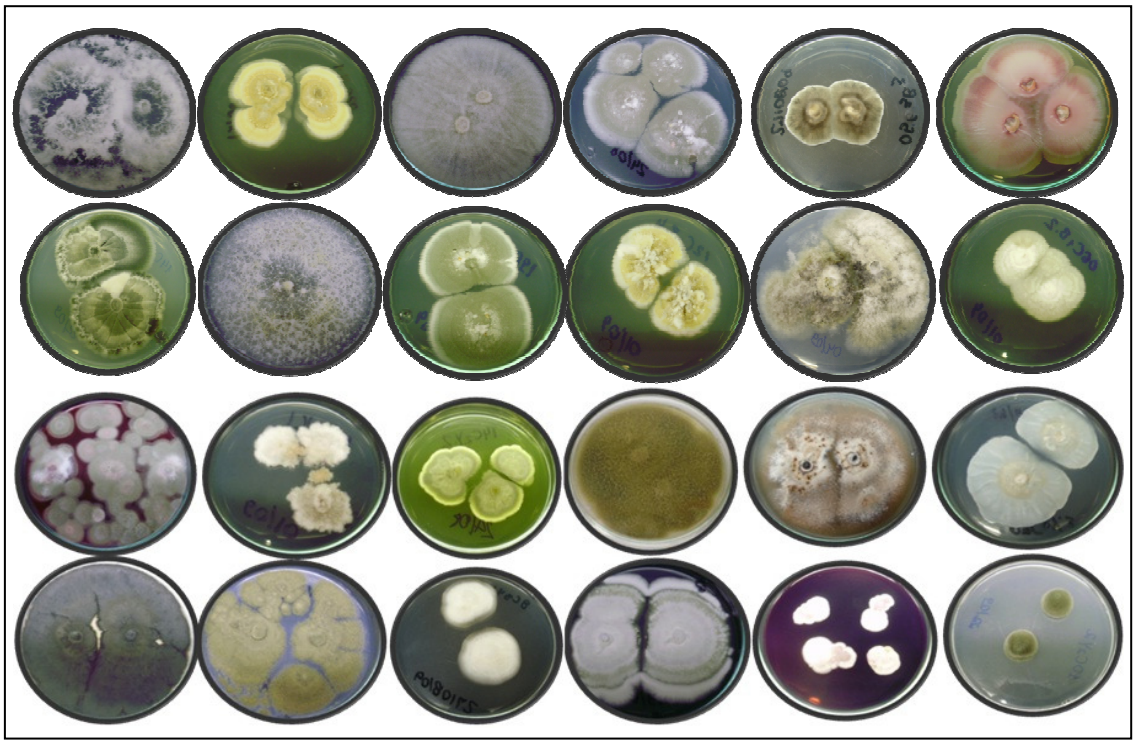


Figura 5. Exemplos de isolados de fungos endofíticos obtidos de *Myrcia sellowiana* pertencentes a diferentes morfoespécies.

Tabela 6. Número de fungos endofíticos e morfoespécies obtidos por indivíduo de *Myrica sellowiana*.

Nº do indivíduo vegetal	Nº de isolados	Nº de morfoespécies
1	17	8
2	18	8
3	7	2
4	16	1
5	7	3
6	14	3
7	13	5
8	5	4
9	2	1
10	13	7
11	10	6
12	10	8
13	2	2
14	4	4
15	1	1
16	3	3
17	1	1
18	0	0
19	6	4
20	3	3
Total	**152**	**-**

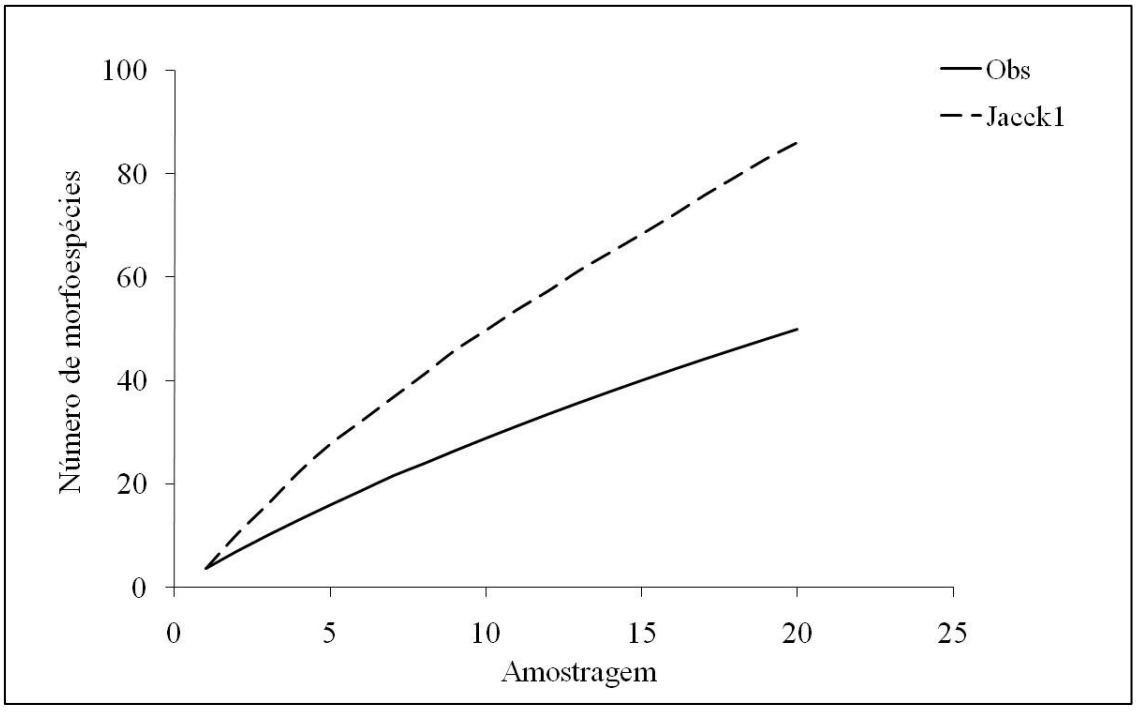


Figura 6. Curva de riqueza de morfoespécies observada (Obs) por indivíduo de *Myrcia sellowiana*, comparativamente ao número de morfoespécies estimado através do estimador Jaccknife 1 (Jacck 1).

Dentre as morfoespécies encontradas, uma foi abundante, tendo apresentado 54 isolados de fungos endofíticos, o que equivale a 35,5 % de todos os fungos obtidos. Outras morfoespécies apresentaram número de isolados bem inferior, com 8, 7 e 6 isolados A grande maioria das morfoespécies, no entanto, apresentou apenas 1 isolado, conforme pode ser observado na Figura 7.

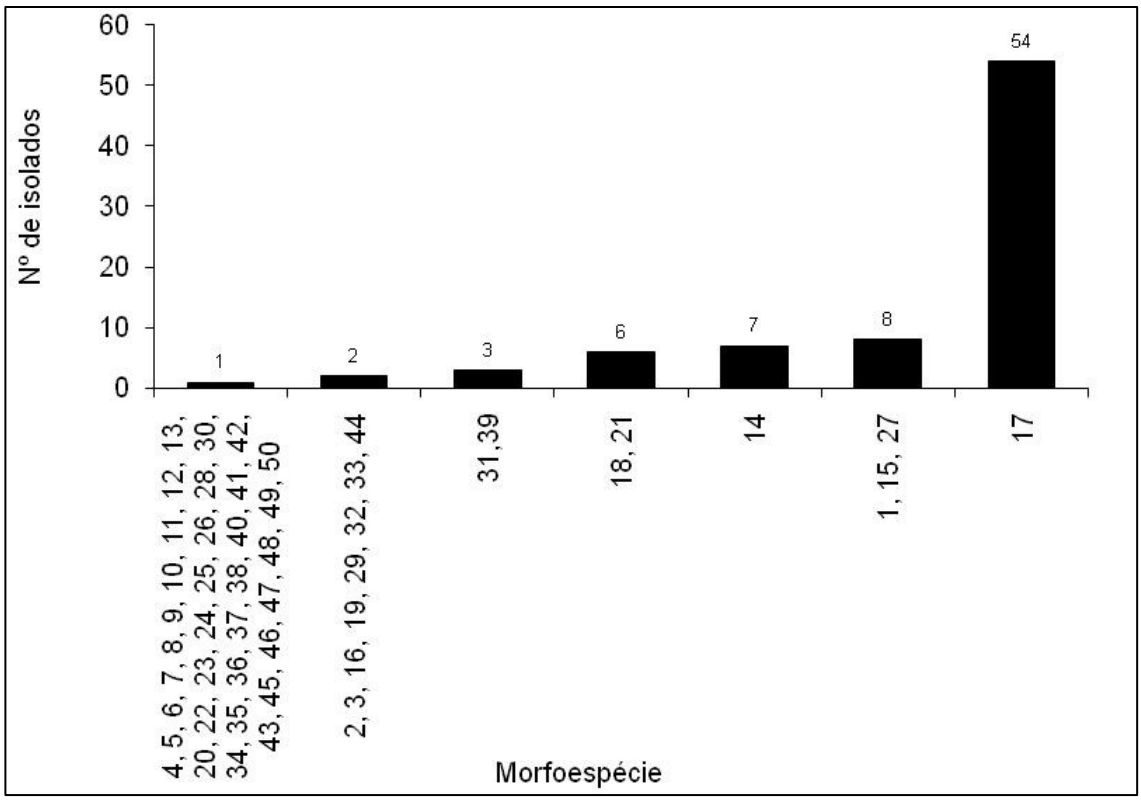


Figura 7. Número de isolados de fungos endofíticos obtidos de *Myrcia sellowiana* por morfoespécie.

Esses dados corroboram com a afirmação de alguns autores, segundo os quais, geralmente, a assembléia de endofíticos para determinado hospedeiro compreende um grupo relativamente consistente de gêneros e espécies de fungos, caracterizado por poucas espécies dominantes e outras denominadas transitórias, que são representadas por apenas um ou dois isolados entre centenas (BILLS e POLLISHOOK, 1992; VERMA et al., 2007). Padrão semelhante de distribuição de fungos endofíticos foi encontrado por Rakotoniriana et al. (2007) em *Centella asiatica*, caracterizado por duas

espécies endofíticas mais frequentes e numerosas outras com rara ocorrência, sendo que aquelas com frequência de isolamento menor do que 1 % foram reconhecidas como espécies cosmopolitas, relatadas como endofíticos de uma grande variedade de hospedeiros vegetais distintos. Arnold (2007) também observou a dominância encontrada na caracterização de comunidades endofíticas associadas a diferentes espécies de hospedeiros, sendo que para plantas do gênero *Quercus* foi observada a prevalência de uma única espécie de fungo em 54,5 % do total de isolados, enquanto que em *Pinus ponderosa* houve a ocorrência de uma mesma espécie endofítica para 58,6 % do total obtido.

Importante ressaltar, ainda, que a morfoespécie 17, além ser a mais abundante, apresentou grande proporção de isolados com atividade biológica nos ensaios realizados, uma vez que 41 (75,9 %) dos 54 isolados desta morfoespécie foram ativos contra pelo menos um dos microrganismos alvos. Isso pode ser interpretado como uma vantagem competitiva eficiente, a qual, muito provavelmente, favoreceu o estabelecimento da espécie como dominante nesta comunidade microbiana através da inibição do desenvolvimento de outros microrganismos naquele ambiente.

O fato dos demais isolados desta morfoespécie não ter apresentado atividade nos ensaios realizados pode ser justificado pela enorme diversidade genética e bioquímica existente neste grupo de microrganismos. A título de exemplificação, Strobel e Long (1998) obtiveram de uma única árvore de cipreste (*Taxodium distictuns*) 20 isolados de *P. microspora* e apenas dois apresentaram características fenotípicas idênticas, uma vez que, enquanto alguns destes isolados produziram quantidades significativas de paclitaxel, outros foram incapazes de sintetizar este agente terapêutico.

Os isolados fúngicos mais ativos, ou seja, aqueles que apresentaram resultados positivos em mais de um tipo de ensaio, foram ordenados em ordem decrescente de acordo com o número de microrganismos alvos sensíveis ao endofítico ou seu extrato. Estes dados estão representados na Tabela 7 e permitem inferir que os 31 isolados mais ativos são todos representantes da morfoespécie 17. Além disso, todos os isolados que produziram compostos voláteis bioativos pertencem a esta morfoespécie.

Tabela 7. Fungos endofíticos obtidos de amostras de caules e folhas de *Myrcia sellowiana* que apresentaram atividade em mais de um dos ensaios realizados.

Isolado (UFT2009F)	Morfoespécie	A		B	C
		SA	EC	CG	CG
2535	17	+	+	+	+
2432	17	+	-	+	+
2435	17	+	-	+	+
2439	17	+	-	+	+
2441	17	+	-	+	+
2449	17	+	-	+	+
2450	17	+	-	+	+
2451	17	+	-	+	+
2463	17	+	-	+	+
2464	17	+	-	+	+
2468	17	+	-	+	+
2469	17	+	-	+	+
2473	17	+	-	+	+
2470	17	+	-	+	+
2496	17	-	+	+	+
2438	17	-	-	+	+
2440	17	-	-	+	+
2443	17	-	-	+	+
2446	17	-	-	+	+
2448	17	-	-	+	+
2452	17	-	-	+	+
2458	17	-	-	+	+
2460	17	-	-	+	+
2461	17	-	-	+	+
2462	17	-	-	+	+
2484	17	-	-	+	+
2489	17	-	-	+	+
2495	17	-	-	+	+
2501	17	-	-	+	+
2505	17	-	-	+	+
2442	17	+	-	-	+

UFT2009F: código da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins;

Ensaios biológicos: A – produção de extratos antimicrobianos; B – produção de substâncias bioativas difusíveis no meio; C – produção de compostos voláteis bioativos;

SA: *Staphylococcus aureus*; EC: *Escherichia coli*; CG: *Colletotrichum gloeosporioides*;

(+): presença de atividade inibitória de crescimento; (-): ausência de atividade inibitória de crescimento.

Um representante da morfoespécie 17 foi submetido a identificação molecular, a qual foi realizada em duplicata. A identificação baseada no sequenciamento da região ITS foi definida por meio do percentual de identidade com as linhagens registradas no GenBank, sendo considerada como mesma espécie se a sequência apresentar identidade igual ou superior a 99 %; mesmo gênero entre 93 e 98 % e, para valores inferiores a 93 %, a identificação não é concluída, sendo o isolado considerado como não identificado

(JUNE et al., 2007). Após a análise computacional da sequência de DNA, o isolado 2505 foi identificado como *Muscodor albus*, com 99 % de similaridade com a cepa GP 100, registrada com o número de acesso AY555731.1.

Muscodor albus é um fungo endofítico recentemente descoberto, tendo sido descrito pela primeira vez em 2001 por Strobel. Este microrganismo foi obtido a partir de pequenos ramos de *Cinnamomum zeylanicum* (árvore da canela). Trata-se de um fungo pertencente à família Xylariaceae, não produtor de esporos. A descoberta inovadora relacionada a esta espécie diz respeito à sua capacidade de produzir compostos voláteis bioativos, os quais apresentaram atividade contra um variado espectro de bactérias e fungos patogênicos pertencentes aos gêneros *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Geotrichum*, *Monilinia*, *Penicillium* e *Rhizopus*. Tais compostos (CVB's) consistem em uma mistura de substâncias voláteis com propriedades biológicas muito promissoras. O gênero *Muscodor* tem sido encontrado, até o momento, apenas como endofítico associado a determinadas espécies vegetais em regiões da América Central e do Sul, Austrália e Tailândia. Recentemente, várias outras espécies do gênero têm sido identificadas com base na sequência do rDNA 18S, assim como pelas suas propriedades fisiológicas e bioquímicas únicas. Além disso, outros isolados de *M. albus* têm sido também obtidos. Este fungo é atualmente reconhecido como um promissor microrganismo pra ser empregado como agente de controle biológico por micofumigação a fim de controlar doenças pós-colheita (ATMOSUKARTO ET al., 2005; FIRÁKOVÁ et al., 2007; STROBEL, 2006a).

O isolado 2530, representante da morfoespécie 14, e o isolado 2533, pertencente à morfoespécie 8, cujos extratos metanólicos apresentaram atividade biológica simultaneamente contra *S. aureus* e *E. coli*, foram identificados, respectivamente, como *Penicillium adametzii* (100 % de similaridade com o acesso AF033401.1 do GenBank) e *P. citrinum* (99 % de similaridade com o acesso HQ248193.1). Fungos endofíticos desse gênero têm sido isolados a partir de várias plantas, como *Azadirachta indica*, *Oryza sativa*, *Melia azedarach* e *Prumnopitys andina* (MAHESH et al., 2005; TIAN et al., 2004; SANTOS et al., 2003; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2005). O microrganismo *P. adametzii* é produtor de enzimas com importantes aplicações biotecnológicas, como, por exemplo, glicose oxidase (ERYOMIN et al., 2009). Já *P. citrinum* foi encontrado como endofítico em *Scoparia dulcis* por Mathew et al. (2010). Este microrganismo é conhecido por produzir o

metabólito secundário citrinina, uma micotoxina nefrotóxica relacionada à contaminação de alimentos e animais, além do metabólito ácido tanzawaico A (MALMSTRØM et al., 2000). Embora os relatos sobre toxicidade da citrinina estejam relacionados à intoxicação pela ingestão de alimentos contaminados, há que se considerar a toxicidade potencial acarretada pelo uso tópico de amostras de *M. sellowiana*, como observado na região de estudo, diante da presença do microrganismo produtor da citrinina. Estudos adicionais devem ser delineados, no sentido de testar a produção de citrinina pelo isolado obtido de *P. citrinum*, tendo em vista que esta confirmação pode constituir importante subsídio para discutir a inviabilidade do uso desta espécie vegetal devido aos riscos decorrentes.

As demais morfoespécies que apresentaram atividade biológica nos ensaios realizados encontram-se em processo de identificação, tendo sido até o momento extraído DNA e concluída a reação de PCR para um total de 37 amostras do total de 50 morfoespécies obtidas.

CONCLUSÕES

- A espécie vegetal selecionada para estudo representa um importante hospedeiro, constituindo uma boa fonte de fungos endofíticos, pois demonstrou abrigar uma ampla variedade de morfoespécies deste grupos de microrganismos. Além disso, ela pode ser considerada promissora para estudos complementares, a fim de conhecer mais detalhadamente sua diversidade endofítica, principalmente a partir de tecidos e órgãos não examinados ou insuficientemente analisados, como ocorreu com as folhas;

- Foi possível c*alcular a fre*quência de colonização dos tecidos de *M. sellowiana* amostrados, sendo que a de caules se mostrou compatível com as taxas relatadas na literatura e a das folhas, no entanto, foi mais baixa do que as encontradas em outros estudos.

- Os isolados fúngicos obtidos apresentaram grande potencial para produção de substâncias bioativas contra bactérias e fungos patógenos de humanos e vegetais, sendo promissores para estudos futuros no sentido de avaliar a utilização dos mesmos como agentes de controle biológico ou para produção de compostos úteis para a medicina;

- O isolamento e identificação do fungo endofítico *Muscodor albus*, assim como a confirmação de propriedades bioativas no ensaios realizados representa uma descoberta importante, corroborando os estudos prévios que reconhecem a importância deste microrganismo;

- Os fungos endofíticos isolados nesta pesquisa permitiram ampliar a coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins (LAMBIO/UFT), uma vez que todos foram depositados na referida coleção;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; LACAVA, P. T. Manual de isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba, 86p., 2002.

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

ARNOLD, E. A.; MEJÍA, C. L.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS*, v. 100, p. 15649-15654, 2003.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, v. 21, p. 51-66, 2007.

ATMOSUKARTO, I.; CASTILLO, U.; HESS, W. M.; SEARS, J.; STROBEL, G. Isolation and characterization of *Muscodor albus* I-41.3s, a volatile antibiotic producing fungus. *Plant Science*, v. 169, p. 854-861, 2005.

AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? *Revta Brasil Bot*, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 225-229, 1999.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR, W.; PEREIRA, J. O.; LUIZ DE ARAÚJO, W. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.

BACKMAN, P. A.; SIKORA, R. A. Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control*, v. 46, p. 1-3, 2008.

BACON, C. W.; WHITE, J. F. *Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker Inc., 2000.

BARROSO, G. M.; MORIN, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. *Editora UFV*: Viçosa, 1999.

BASHYAL, B. P.; BURNS, A. M.; LIU, M. X.; PARANAGAMA, P. A.; SELIGA, C. J.; TURBYVILLE, T. J.; WIJERATNE, E. M. K.; ZHAN, J.; GUNATILAKA, M. K.; ARNOLD, A. E.; FAETH, S. H.; WHITESELL, L.; GUNATILAKA, A. A. L. Discovery of small molecule bioactive agents from endophytic fungi of the Sonoran Desert. *Grassland Research and Practice Series*, v.13, p. 211-214, 2007.

BAYAT, F.; MIRLOHI, A.; KHODAMBASHI, M. Effects of Endophytic Fungi on Some Drought Tolerance Mechanisms of Tall Fescue in a Hydroponics Culture. *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 56, n. 4, pp. 510-516, 2009.

BENATO, E. A. Controle de doenças pós-colheita em frutas tropicais. *Summa Phytopathologica*, v. 25, p. 90-92, 1999.

BILLS, G. F.; POLLISHOOK, J. D. Recovery of endophytic fungi from *Chamaecyparis thyoides*. *Sydowia*, v. 44, p. 1-12, 1992.

BROWN, K. B.; HYDE, K. D.; GUEST, D. I. Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. *Fungal Divers*, v. 1, p. 27-58, 1998.

CASTILLO, U.F.; BROWNE, L.; STROBEL, G.; HESS, W.M.; EZRA, S.; PACHECO, G.; EZRA, D. Biologically Active Endophytic Streptomycetes from *Nothofagus* spp. and Other Plants in Patagonia. *Microbial Ecology*, v. 53, p. 12-19, 2007.

CHAREPRASERT, S.; PIAPUKIEW, J.; THIENHIRUN, S.; WHALLEY, A. J. S.; SIHANONTH, P. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. *World J Microbiol Biotechnol*, v. 22, p. 481-486, 2006.

CI - Conservação Internacional Brasil. Unidades de Conservação. Disponível em: <http://www.conservation.org.br/onde/cerrado/index.php?id=169>. Acesso em: janeiro de 2011.

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. *Floresta e Ambiente*, v. 11, n. 1, p. 47-52, 2004.

DAISY, B. H.; STROBEL, G. A.; EZRA, D., CASTILLO, U.; BAIRD, G.; HESS, W. M. *Muscodor vitigenus*, sp. nov., an endophyte from *Paullinia*. *Mycotaxon*, v. 84, p. 39-50, 2002.

DAVITT, A. J.; STANSBERRY, M.; RUDGERS, J. Do the costs and benefits of fungal endophyte symbiosis vary with light availability? *New Phytologist*, v. 188, p. 824-834, 2010.

DE-CARVALHO, P. S. *Myrcia* DC. ex Guill. (seção *Myrcia*, Myrtaceae) no Distrito Federal, Brasil. Dissertação (Mestrado). *Universidade de Brasília - UnB*, 2008.

DE HOOG, G. S.; GOTTLICH, E.; PLATAS, G.; GENILLOUD, O.; LEOTTA G.; BRUMMELEN, J. Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antartica. *Studies in Mycology*, v. 51, p. 29-66, 2003.

ERYOMIN, A. N.; ZHUKOVSKAYA, L. A.; MIKHAILOVA, R. V. Effect of Salts and Triton X-100 on Ultrafiltration Purification and Properties of Extracellular Glucose Oxidase from *Penicillium adametzii* LF F-2044.1. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 45, n. 3, p. 248-257, 2009.

EZRA, D.; STROBEL, G. A. Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. *Plant Science*, v. 165, p. 1229-1238, 2003.

EZRA, D.; CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; CONDRON, M. A.; TEPLOW, D. B.; SEARS, J.; MARANTA, M.; HUNTER, M.; WEBER, B.; YAVER, D. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology*, v. 150, p. 785-793, 2004.

FERRARA, M. A. Fungos Endofíticos. Potencial para a Produção de Substâncias Bioativas. *Revista Fitos*, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 73-79, 2006.

FIRÁKOVÁ, S.; ŠTURDÍKOVÁ, M.; MÚČKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia*, v. 62, n. 3, p. 251-257, Bratislava, 2007.

FISHER, P. J.; ANSON, A. E.; PETRINI, O. Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. *Transactions British Mycological Society*, v. 86, p. 153-193, 1986.

GAMBOA, M. A.; BAYMAN, P. Communities of endophytic fungi in leaves of tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). *Biotropica*, v. 33, p. 352-360, 2001.

GOND, S. K.; VERMA, V. C.; KUMAR, A.; KUMAR, V.; KHARWAR, R. N. Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Correae (Rutaceae) from Varanasi (India). *World J Microbiol Biotechnol*, v. 23, p. 1371-1375, 2007.

GUNDEL, P. E.; MARTÍNEZ-GHERSAL, M. A.; BATISTA, W. B.; GHERSA, C. M. Dynamics of *Neotyphodium* endophyte infection in ageing seed pools: incidence of differential viability loss of endophyte, infected seed and non-infected seed. *Annals of Applied Biology*, p. 199-209, 2010.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J. W. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 30, p. 925-937, 1998.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, v. 105, p. 1422-1432, 2001.

HOFFMAN, M. T.; ARNOLD, A. E. Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycological Research*, v. 112, p. 331-344, 2008.

HOMANS, A. L.; FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of chromatography*, v. 51, p. 327-329, 1970.

HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 31, p. 163-167, 2001.

JUNE, I.; POUNDER, J. I.; SIMMON, K. E.; BARTON, C. A.; HOHMANN, S. L.; BRANDT, M. E.; PETTI, C. A. Discovering Potential Pathogens among Fungi Identified as Nonsporulating Molds. *Journal of Clinical Microbiology,* v. 45, p. 568-571, 2007.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an ilustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*, v. 49, n. 4, p. 508-536, 1997.

LI, J. Y.; STROBEL, G.; SIDHU, R. S.; HESS, W. M; FORD, E. J. Endophytic taxol producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology*, v. 142, p. 2223-2226, 1996.

LI, J.; ZHAO, J.; XU, L.; ZHOU, L.; LI, X.; WANG, J. Endophytic fungi from rhizomes of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2007.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Quim. Nova*, v. 27, p. 916-919, 1998.

LIN, X.; LU, C.; HUANG, Y.; ZHENG, Z.; SU, W.; SHEN, Y. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity. *World J Microbiol Biotechnol*, v. 23, p.1037-1040, 2007.

LIU, J. Y.; SONG, Y. C.; ZHANG, Z.; WANG, L.; GUO, Z. J.; ZOU, W. X.; TAN, R. X. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology*, v. 114, p. 279-287, 2004.

LODGE, D. J.; FISHER, P. J.; SUTTON, B. C. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia,* v. 88, p. 733-738, 1996.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed., *Ed. Plantarum*, Nova Odessa, v. 2, 480p., 1998.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Science*, v. 151, p. 67-73, 2000.

MAHESH, B.; TEJESVI, M. V.; NALINI, M. S.; PRAKASH, H. S.; KINI, K. R.; SUBBIAH, V.; SHETTY, H. S. Endophytic mycoflora of inner bark of *Azadirachta indica*. Juss. *Current Science*, v. 88, p. 218-219, 2005.

MALMSTRØM, J.; CHRISTOPHERSEN, C.; FRISVAD, J. C. Secondary metabolites characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. *Phytochemistry*, v. 54, p 301-309, 2000.

MARTINS-CORDER, M. P.; MELO, I. S. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* KLEB. *Science Agriculture*, v. 55, n. 1, 1998.

MATHEW, A. J.; JAYACHANDRAN, K.; MATHEW, J**.** Endophytic *Penicillium citrinum* Thom. from *Scoparia dulcis* Linn. *Indian J. Microbiol*., v. 50, suppl. 1, p. 99-102, 2010.

MAZINE, F. F.; SOUZA, V. C. Myrtaceae dos Campos de Altitude do Parque Nacional do Caparaó - Espírito Santo/Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia*, v. 59, n. 1, p. 57-74, 2008.

MENDONÇA, R. C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JUNIOR, M. C.; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. Flora vascular do Cerrado. In: SANO, S. M.; & ALMEIDA, S. P. (eds.) Cerrado: Ambiente e Flora. *Embrapa*, 1998.

MOREIRA, L. M.; MAY-DE MIO, L. L. Efeito de fungos antagonistas e produtos químicos no controle da podridão parda em pomares de pessegueiro. *Floresta*, v. 36, n. 2, p. 287-293, 2006.

MOREIRA, L. M.; MAY-DE MIO, L. L. Controle da podridão parda do pessegueiro com fungicidas e fosfitos avaliados em pré e pós-colheita. *Ciênc. Agrotec.*, v. 33, n. 2, p. 405-411, 2009.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Unidades de Conservação. Disponível em: <www.icmbio.gov.br>. Acesso em: janeiro de 2011.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada - Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

NCCLS. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NETO, P. A. S. P.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 29, p. 62-76, 2002.

NETO, P. A. S. P.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.

OKI, Y.; SOARES, N.; BELMIRO, M. S.; CORRÊA JUNIOR, A.; FERNANDES, G. W. Influência dos fungos endofíticos sobre os herbívoros de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). *Neotropical Biology and Conservation*, v. 4, n. 2, p. 83-88, 2009.

PELÁEZ, F.; COLLADO, J.; ARENAL, F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; DÍEZ MATAS, M. T.; GARCÍA, J. B.; GONZÁLES DEL VAL, A.; GONZÁLES, V.; GORROCHATEGUI, J.; HERNÁNDEZ, P.; MARTÍN, I.; PLATAS, G.; VICENTE, F. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. *Mycological Research*, v. 102, p. 755-761, 1998.

PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products – Can history repeat? *Biochemical Pharmacology*, v. 30, p. 981-990, 2006.

PHONGPAICHIT, S.; RUNGJINDAMAI, N.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SAKAYAROJ, J. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *FEMS Immunology and Medical Microbiology,* v. 48, p. 367-372, 2006.

PROMPUTTHA, I.; LUMYONG, S.; DHANASEKARAN, V.; HUGE, E.; MACKENZIE, C.; HYDE, K. D.; JEEWON, R. A. Phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology*, v. 53, p. 579-590, 2007.

RAKOTONIRIANA, E. F.; MUNAUT, F.; DECOCK, C.; RANDRIAMAMPIONONA, D.; ANDRIAMBOLOLONIAINA, M.; RAKOTOMALALA, T.; RAKOTONIRINA, E. J.; RABEMANANTSOA, C.; CHEUK, K.; RATSIMAMANGA, S. U.; MAHILLON, J.; EL-JAZIRI, M.; QUETIN-LECLERCQ, J.; CORBISIER, A. M. Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2007.

RAVIJARA, N. S.; MARIA, G. L.; SRIDHAR, K. R. Antimicrobial Evaluation Of Endophytic Fungi Inhabiting Medicinal Plants of the Western Ghats of India. *Eng. Life Science*, v. 5, p. 515-520, 2006.

REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L. E. Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science*, v. 289, p. 1920-1921, 2000.

RODRIGUES, K. F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*, v. 86, p. 376-385, 1994.

ROSA, L. H.; MACHADO, K. M. G.; JACOB, C. C.; CAPELARI, M.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Screening of brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz,* v. 98, p. 967-974, 2003.

SANTAMARÍA, J.; BAYMAN, P. Fungal Epiphytes and Endophytes of Coffee Leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology*, v. 50, p. 1-8, 2005.

SANTOS, R. M. G.; RODRIGUES-FO, E.; ROCHA, W. C.; TEIXEIRA, M. F. S. Endophytic fungi from *Melia azedarach*. *World J Microbiol Biotechnol*, v. 19, p. 767-770, 2003.

SARTORI, M. R. K.; PRETTO, J. B.; BELLA CRUZ, A.; BRESCIANI, L. F. V.; YUNES, R. A.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S. A.; CECHINEL FILHO, V. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). *Pharmazie*, v. 58, p. 567-569, 2003.

SARTORI-CAMATTI, V.; RIBEIRO, R. T. S.; SANHUEZA, R. M. V.; PAGNOCCA, F. C.; ECHEVERRIGARAY, S.; AZEVEDO, J. L. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. *Journal of Basic Microbiology*, v. 45, p. 397-402, 2005.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; HORMAZABAL, E.; ASTUDILLO, L.; RODRIGUEZ, J.; THEODULOZ, C. Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). *World J Microbio Biotechnol*, v. 21, p. 27-32, 2005.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continnum. *Mycological Reserch*, v. 109, p. 661-686, 2005.

SCHUTZ, B. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *British Mycological Society*, International Symposium Proceedings, Bioactive Fungal Metabolites-Impact and Exploitation, University of Wales, Swansea, 2001.

SETTE, L. D.; PASSARINI, M. R. Z., DELARMELINA, C. SALATI, F.; DUARTE, M. C. T. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* v. 22, p. 1185-1195, 2006.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos

endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham. *Acta Amazônica*, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

STIERLE A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, na endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, v. 260, p. 214-216, 1993.

STINSON, M.; EZRA, D.; HESS, W. M.; SEARS, J.; STROBEL, G. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. *Plant Science*, v. 165, p. 913-922, 2003.

STONE, J. K., BACON, C. W.; WHITE, J. F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: BACON, C.W. & WHITE, J.F. (Eds.). *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker, p. 3-30, 2000.

STROBEL, G. A.; LONG, D. M. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. *American Society of Microbiology News*, v. 64, p. 263-268, 1998.

STROBEL, G.; MILLER, R. V.; MARTINEZ-MILLER, C.; CONDRON, M. M.; TEPLOW, D. B.; HESS, W. M. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Microbiology*, v. 145, p. 1919-1926, 1999.

STROBEL G. A.; DIRKSIE E.; SEARS J.; MARKWORTH C. Volatile antimicrobials from a novel endophytic fungus. *Microbiology*, v. 147, p. 2943-2950, 2001.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, v. 5, p. 535-544, 2003.

STROBEL, G. A. Muscodor albus and its biological promise. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 33, p. 514-522, 2006a.

STROBEL, G. A. Harnessing endophytes for industrial microbiology. *Current Opinion in Microbiology*, v. 9, p. 240-244, 2006b.

SURYANARAYANAN, T. S.; MURALI, T. S.; VENKATESAN, G. Ocurrence and distribution of fungal endophytes in tropical across a rainfall gradient. *Canadian Journal of Botany*, v. 80, p. 818-826, 2002.

SURYANARAYANAN, T. S.; THENNARASAN, S. Temporal variation in endophyte assemblages of *Plumeria rubra* leaves. *Fungal Diversity*, v. 15, p. 197-204, 2004.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, v. 18, p. 448-459, 2001.

TAYLOR, J. E.; HYDE, K. D.; JONES, E. B. G. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. *New Phytologist*, v. 142, p. 335-346, 1999.

TEJESVI, M. V.; NALINI, M. S.; MAHESH, B.; PRAKASH, H. S.; KINI, K. R.; SHETTY, H. S.; SUBBIAH, V. New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. *Bol. Soc. Quím. Méx.*, v. 1, n. 1, p. 19-26, 2007.

TIAN, X. L.; CAO, L. X.; TAN, H. M.; ZENG, Q. G.; JIA, Y. Y.; HAN, W. Q.; ZHOU, S. N. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities in vitro. *World J Microbiol Biotechnol*, v. 20, p. 303-309, 2004.

VERMA, V. C.; GOND, S. K.; KUMAR, A.; KHARWAR, R. N.; STROBEL, G. The Endophytic Mycoflora of Bark, Leaf, and Stem Tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Varanasi (India). *Microbial Ecology*, v. 54, p. 119-125, 2007.

VIZCAÍNO, J. A.; SANZ, L.; BASILIO, A.; VICENTE, F.; GUTIÉRREZ, S.; HERMOSA, M. R.; MONTE, E. Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections. *Mycological Research*, v. 109, p. 1397-1406, 2005.

WANG, F. W.; JIAO, R. H.; CHENG, A. B.; TAN, S. H.; SONG, Y. C. Antimicrobial potential of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, p. 79-83, 2006.

WANG, F. W.; JIAO, R. H.; CHENG, A. B.; TAN, S. H.; SONG, Y. C. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World J Microbiol Biotechnol*, v. 23, p. 79-83, 2007.

WEBER, D.; STERNER, O.; ANKE, T.; GORZALCZANCY, S.; MARTINO, V.; ACEVEDO, C. Phomol, a New Antiinflammatory Metabolite from an Endophyte of the Medicinal Plant *Erythrina crista-galli*. *The Journal of Antibiotics*, vol. 57, p. 559-563, 2004.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: *Academic Press*, p. 315-322, 1990.

WICKLOW, D. T.; ROTH, S.; DEYRUP, S. T.; GLOER, J. B. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*, v. 109, p. 610-618, 2005.

WILSON, D. Endophyte - the evolution of a term, and clarification. *Oikos*, v. 73, p. 274-276, 1995.

WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; PANPHUT, W.; THONGON, N.; DANWISETKANJANA, K.; RUANGRUNGSI, N.; MEEVOOTISOM, V. Endophytic fungi with antimicrobial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. v. 20, p. 265-272, 2003.

WORAPONG, J.; STROBEL, G. A.; FORD, E. J.; LI, J. Y.; BAIRD, G.; HESS, W. M.

Muscodor albus anam. nov. an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. *Mycotaxon*, v. 79, p. 67-79, 2001.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeast. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Ed.). The Yeasts: A Taxonomic Study. Amsterdam: *Elsevier*, p. 77-100, 1998.

ZHAO, J. H.; BAI, F. Y.; GUO, L. D.; JIA, J. H. *Rhodotorula pinicola* sp. nov., a basidiomycetous yeast species isolated from xylem of pine twigs. *FEMS Yeast Research*, v. 2, p. 159-163, 2002.

APÊNDICES

Appalachia Fruit Research Station
Kearneysville, WV

Dept. Postharvest Science
ARO, the Volcani Center

October 29, 2010

This is to certify the Poster Presentation and Abstract Publication

Dr. Raphael Pimenta

Diversity and antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Myrcia sellowiana* in Tocantins, Brazil

Winicius S. Pinto, Luiz H. Rosa, Juliana F. M. Silva, Michele C. Perim, Joelma C. Borges, Wojciech J. Janiewicz, and Raphael S. Pimenta.

at the
BARD/ARS-USDA/ARO/ISHS
International Workshop on Biological Control of Postharvest Diseases:
Challenges and Opportunities
October 25 -28, 2010

National Conference Center
Leesburg, Virginia
USA

Michael Wisniewski
Co-Organizer, US
USDA-ARS-AFRS
Appalachian Fruit Research Station
Kearneysville, WV 25430 USA
michael.wisniewski@ars.usda.gov
Tel: 304-725-3451 x320

Samir Droby
Co-organizer, IS
ARO, The Volcani Center
P.O.Box 6
Bet Dagan, Israel
samird@volcani.agri.gov.il
Tel: 972-3-968361

United States Department of Agriculture

Research, Education and Economics
Agricultural Research Service

January 27, 2011

This letter is being written to formally acknowledge acceptance of your manuscript, entitled, "**Diversity and Antimicrobial Activities of Endophytic Fungi Isolated from *Myrcia Sellowiana* in Tocantins, Brazil,**" by the authors W.S. Pinto., M.C. Perim., J.C. Borges., L.H. Rosa., J.F.M. Silva., W.J. Janisiewicz & R.S. Pimenta. The article will appear in an issue of Acta Horticulturae which will be dedicated to the Proceedings of the ISHS meeting on Postharvest Biological Control, held in Washington DC in October, 2010.

On behalf of the conveners of the workshop and the editors of the proceedings, I thank you for submitting your manuscript. It represents a valuable contribution to the proceedings. As a reminder, all registered participants will receive a copy of the proceedings once it is published.

Sincerely,

Michael Wisniewski
Co-Chair ISHS Working Group

Appalachian Fruit Research Station
2217 Wiltshire Road, Kearneysville, West Virginia, US • 25430
Phone: 304-725-3451 • Fax: 304-728-2340

An Equal Opportunity Employer

Diversity and Antimicrobial Activities of Endophytic Fungi Isolated from *Myrcia Sellowiana* in Tocantins, Brazil

W.S. Pinto, M.C. Perim, J.C. Borges, R.S. Pimenta
Universidade Federal do Tocantins, (UFT), Palmas, TO, Brazil, email: raphael.pimenta@pq.cnpq.br

L.H. Rosa, J.F.M. Silva
Universidade Federal de Minas Gerais, (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

W.J. Janisiewicz
Appalachian Fruit Research Station, U.S. Department of Agriculture, ARS, Kearneysville, WV 25430 USA.

Keywords: bioactive substances, volatile, *Monilinia fructicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus parasiticus*, biological control.

Abstract

One hundred forty six isolates of endophytic fungi were recovered from leaves and branches of the medicinal plant, *Myrcia sellowiana,* in Brazil. All isolates were purified on PDA and the strains were grouped into 51 morphotypes. Each isolate was tested for production of volatiles and agar diffusible substances inhibitory to *Monilinia fructicola* (MF), *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) and *Aspergillus parasiticus* (AP). Antagonistic activity was exhibited by 41 strains belonging to 4 morphotypes. Thirty eight of these strains were from one morphotype and each from the remaining three strains were from different morphotypes. Thirty one produced diffusible substances these inhibited growths of both CG and AP, 6 were active only against AP, 3 against CG and only one against MF. Thirty-five

strains produced inhibitory volatiles substances, thirty-one of them produced volatiles against both CG and AP, two only against CG, and other two only against AP. No strain produced antagonistic volatile substance against MF. All strains that produced inhibitory volatiles also produced diffusible inhibitory substances in PDA medium. Only 6 strains produced diffusible active substances but no inhibitory volatiles. Interestingly, the high number of inhibitory interactions against CG and AP (27.3 %) of total isolates tested is in contrast to the low number of inhibitory interactions against MF (only 0.6 %). This may result from the presence of the evolutionary pressure from frequently occurring CG and AP, and the absence of the pressure from MF in this region of Brazil. These results indicate that medicinal plants in Brazilian ecosystems are a good source of antagonistic endophytic fungi producing diffusible and/or volatile substances against postharvest pathogens. Currently our research are focused on molecular identification of strains, determining biocontrol efficacy on fruits, and characterization of the inhibitory substances.

INTRODUCTION

Endophytes are microorganisms that reside in the internal tissues of living plants without causing any immediate overt negative effects, are relatively unstudied and potential sources of novel natural products for exploitation in medicine, agriculture and industry (Pimentel et al., 2010). Several fungi producing volatile antifungal substances have the potential of being used as biofumigants and to be a source of new bioactive agents for controlling plant diseases (LEE et al., 2009). The ethnobotanical knowledge can support new sources for bioactive endophytes, one time these plants are usually used

as medicinal resources from humans. Recent studies have demonstrated that endophytic fungi living in medicinal plants exert a wide range of biological activities (STROBEL and DAISY, 2003; Rosa et al., 2010). *Myrcia sellowiana* was usually utilized as food for rural populations in Brazil (Aquino et al., 2007). The leaves, branches and roots of this plant is used by Jalapão population against infections. The objective of this study was to obtain and test endophytic fungi from *Myrcia sellowiana* (Myrtaceae) (Fig. 1) for production of volatiles and diffusible substances against *Monilinia fructicola* (MF), *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) and *Aspergillus parasiticus* (AP).

MATERIALS AND METHODS

Three leaves and three branches were collected from each twenty *Myrcia sellowiana* plants localized on "Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins" an Estate Park localized in Jalapão region in Mateiros city, Tocantins, Brazil. Only Healthy tissues were collected and the fresh-cut ends of plant samples were stored in sterile plastic bags and transported under refrigeration to the laboratory over a period of no more than 24 h. The surface of fragments was submitted to a sterilization using a successive dipping in 2% Extran (Sigma, USA) detergent (2 min), 70% ethanol (1 min), 2 % sodium hypochlorite (3 min), and washing with sterile distilled water (2 min). The sterilized fragments were placed on Petri plates containing potato dextrose agar (PDA, Difco, USA) plus chloramphenicol at 100 mg/ml. The plates were incubated at 25 °C up to 60 days, and individual fungal isolates were purified on PDA plates. The isolates were stored at 4°C in PDA tubes. Mycelia fragments from each isolate were also preserved in 30% glycerol sterile aqueous suspension at –80°C (Rosa et al., 2010). All fungal isolates were

deposited in the Collection of Microorganisms of the Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia from Universidade Federal of Tocantins, Brazil.

To perform the antagonistic tests, all endophytic fungi isolated were tested by diffusible and volatile inhibitory substances against *Monilinia fructicola* (mfa3635), *Colletotrichum gloeosporioides* (CG-incoper02) and *Aspergillus parasiticus* (IMI 242695). To verification of diffusible substances, an agar plug (5 mm in diameter) of each endophytic fungus was inoculated on one side of the plate and incubated for 3 days at 25°C. Subsequently, a similar plug of each phytopatogen was placed on the other side of plate. After 3 days of incubation at 25°C, the radii of fungal mycelia were measured and compared with the control. To volatile tests, the Petri dishes were cut in the middle and the stripe was removed, to avoid diffusible effect, then the plates were sealed with Parafilm. The controls were performed with the inoculation of each phytopatogen in the media without the antagonist. All positive tests were repeated three times.

RESULTS AND DISCUSSION

We isolated 146 strains, that were grouped into fifty one morphotypes. Forty one strains from four morphotypes had antagonistic activity against one or more pathogens. Thirty eight of these strains were from one morphotype and each from the remaining three strains were from different morphotypes. The average number of endophytes and various morphotypes isolated per tree was 7.5 and 3.5, respectively. However, the number of morphotypes, most likely, was not totally exhausted and a larger sampling size could result in isolation of additional morphotypes (fig.1).

We found forty one isolates producing agar diffusible inhibitory substances and/or thirty five isolates producing inhibitory volatiles (Fig. 2). For isolates producing

inhibitory volatiles, thirty three were inhibitory against AP, but only two exclusively inhibited AP. Thirty one inhibited growth of both AP and CG. Thirty three inhibited CG, but only two exclusively inhibited CG. We do not found any volatile substance inhibitory to MF.

Thirty seven isolates producing diffusible inhibitory substances in PDA medium were inhibitory to AP, with six isolates exclusively inhibiting AP, and thirty one inhibiting AP and CG. Thirty four isolates produced agar diffusible inhibitory substances against CG, but only three of them exclusively inhibited CG. Only one endophyte produces diffusible substance inhibitory to MF.

Only two isolates that produced volatiles inhibitory to CG didn't produced diffusible inhibitory substances in PDA medium against this pathogen. Only seven isolates that produced agar diffusible inhibitory substances in PDA medium did not produced inhibitory volatiles.

Interestingly, we observed a high number of isolates inhibitory to CG and/or AP (48.6 %) in contrast to the low number of isolates inhibitory to MF (only 0.6 %). This may result from the presence of the evolutionary pressure from frequently occurring CG and AP, and the absence of the pressure from MF in this region of Brazil.

CONCLUSIONS

These results indicate that medicinal plants such as *Myrcia sellowiana* in Brazilian ecosystems are a good source of endophytic fungi producing diffusible and/or volatile substances inhibitory to important postharvest pathogens of fruit and grain. Current research are focused on determining efficiency of the pathogens inhibition on fruit, and characterization of the inhibitory substances.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr. Carlos A. Rosa for strains identifications and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support

Literature Cited

Aquino, F. G., Walter, B. M. T., Ribeiro, J. F. 2007. Espécies Vegetais de Uso Múltiplo em Reservas Legais de Cerrado - Balsas, MA. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 147-149.

Lee S.O., Kim, H.Y., Choi, G.J., Lee, H.B., Jang, K.S., Choi, Y.H. and Kim, J.-C. 2009. Mycofumigation with Oxyporus latemarginatus EF069 for control of postharvest apple decay and Rhizoctonia root rot on moth orchid. Journal of Applied Microbiology 106 1213–1219.

Pimentel, M. R., Molina, G., Dionísio, A. P., Maróstica Junior, M. R., Pastore, G. M. 2007. The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process. Biotechnology Research International, v. 5, p. 147-149.

Rosa, L. H., Gonçalves,V. N., Caligiorne, R. B., Alves, T. M. A., Rabello, A., Sales, P. A., Romanha, A. J., Sobral, M. E. G., Rosa, C. A., Zani, C. L. 2010. Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 41: 420-430.

Strobel, G. and Daisy, B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. Microbiology and Molecular Biology Reviews. V. 67, p. 491–502.

Figures

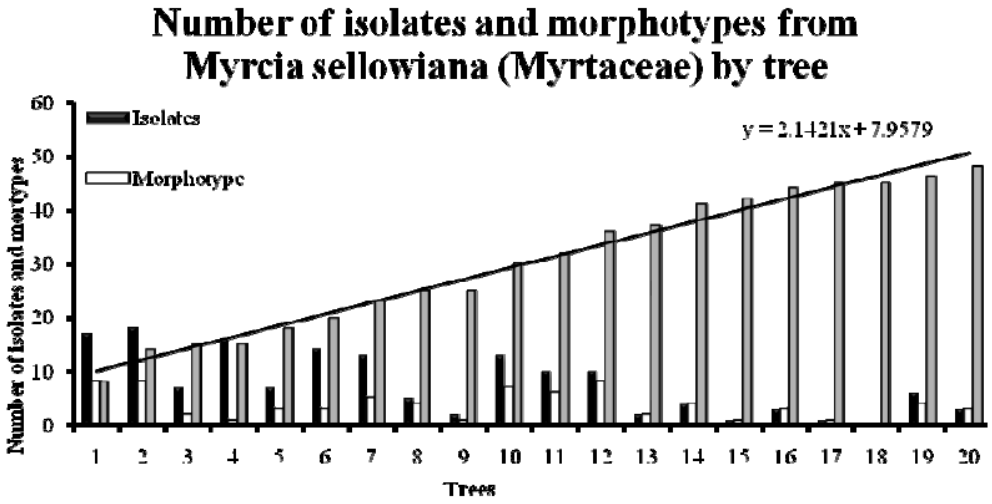


Fig. 1. Number of isolates, morphotypes and cumulative frequency of morphotypes of endophytic fungi from *Myrcia sellowiana*, a medicinal plant, from Tocantins, Brazil

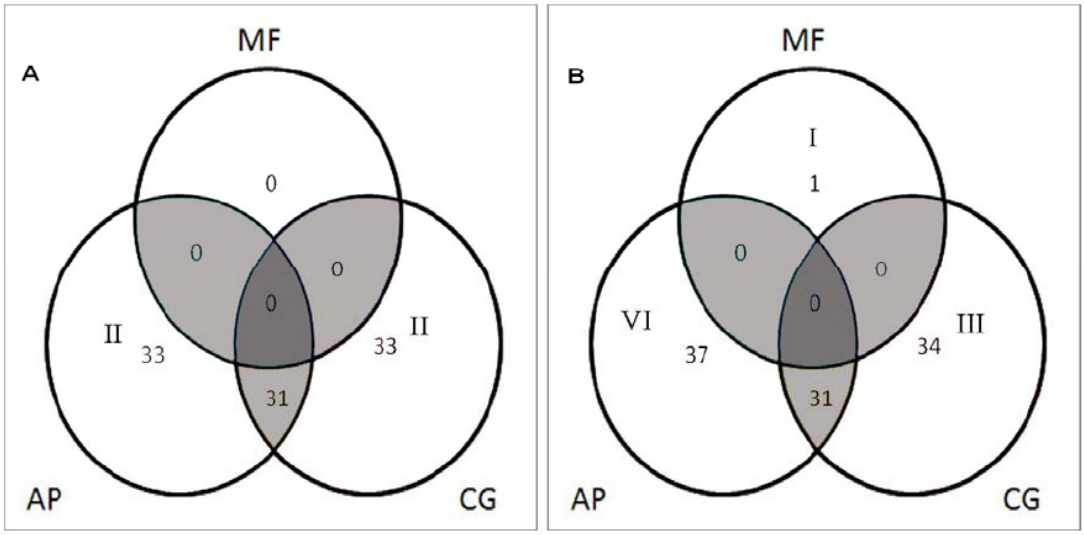


Fig. 2. Venn diagram of: A) inhibitory volatiles produced by the endophytic fungi against *Monilinia fructicola* (MF), *Aspergillus parasiticus* (AP), and *Colletotrichum gloeosporioides* (CG); B) agar diffusible inhibitory substances produced by the endophytic fungi against MF, AP, and CG. The roman numbers indicate number of isolates with exclusive inhibitory activities against particular fungus and the black numbers indicate number of inhibitory isolates out of 146 isolates tested.