

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDÓFITOS  
ASSOCIADOS À PLANTA PARASITA  
*Phoradendron Perrottettii* (D.C.) EICHLER E SUA  
HOSPEDEIRA *Tapirira Guianensis* AUBL.**

**LUCAS MAGALHÃES DE ABREU**

**2005**

**LUCAS MAGALHÃES DE ABREU**

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDÓFITOS  
ASSOCIADOS À PLANTA PARASITA *Phoradendron  
Perrottettii* (D.C.) EICHLER E SUA HOSPEDEIRA  
*Tapirira Guianensis* AUBL.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Ludwig Heinrich Pfenning

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2005

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Abreu, Lucas Magalhães de

Diversidade de fungos endófitos associados à planta parasita *phoradendron perrottettii* (d.c.) eichler e sua hospedeira *tapirira guianensis* aubl. / Lucas Magalhães de Abreu. – Lavras : UFLA, 2005.

86 p. : il.

Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Fungo endófito. 2. Diversidade. 3. Taxonomia. 4. Erva-de-passarinho  
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-589.2

-630.276

-632.4

**LUCAS MAGALHÃES DE ABREU**

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDÓFITOS  
ASSOCIADOS À PLANTA PARASITA *Phoradendron  
Perrottettii* (D.C.) EICHLER E SUA HOSPEDEIRA  
*Tapirira Guianensis* AUBL.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 21 de Julho de 2005

Doutora Kátia F. Rodrigues

FIOCRUZ

Prof. Eduardo van den Berg

UFLA

Prof. Eustáquio Souza Dias

UFLA



Ludwig Heinrich Pfenning  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

## ***Nothing***

Inside.... deep inside that black atmosphere  
Ash consumes matter in a boiling acidic fermentation  
Expelling the poison of somber forms  
Abnormal regulation transmutes the clock of life-death pendulum  
There where black lights overcome  
The anti-matter blends with old gods' blood  
A flood of warm wine, thousand libations, organic pleasure  
Chemically bond are the black arts' adorers  
Meta-quarks in the original rancid soup  
Nowhere expanding to everywhere, a time-space break  
Androgenic spasmodic molecules invite all  
To the absent feast of fear, the pure reality of nonexistence

Lucas M. de Abreu 11/2002.

## ***Indecisão dos índices automáticos***

Sob o pêndulo de amora e interstícios de cálcio  
Mora a dinâmica paisagem imutável de Vênus  
Entre crises circenses e otimismo canibais dos isômeros ópticos  
Predomina a sucção holoblástica dos índices de desenvolvimento  
aquático  
Onde a quimiotaxia profilática de tamancos de couro verde  
Sobrepõe-se aos parâmetros cleistoteciais do pólen idiopático  
Nesta concepção, só resta aos quarks morderem as orelhas dos  
colêmbolas  
Sendo esta a prova mais perfeita do gozo social atingido no vácuo

Lucas M. de Abreu 04/2003.

A quem se interessa pelo assunto

**OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Antonio e Telma, meus irmãos e minha tia Mércia

À Universidade Federal de Lavras

Ao professor Ludwig H. Pfenning

À tríade da Microbiologia Agrícola, professores Rosane, Eustáquio e Romildo

Ao pessoal do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos da UFLA, em especial Mirian, Anderson, Larissa, Edson e Cristiano

À Cristina

Aos noctívagos bípedes Daniel, Rossano, Maza, Alex, Charlie e Douglas

Ao professor Eduardo van den Berg

À doutora Kátia Rodrigues

Aos colegas da Pós-graduação em Microbiologia Agrícola

Aos colegas João Paulo Rodrigues Alves... e Eric

Aos professores Mauro dos Santos de Carvalho e Mário César Guerreiro

À CAPES

Aos vinhos

À eterna noite

**Thanx**

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	04
2.1 Fungos endófitos.....	04
2.2 Métodos para detecção e isolamento de fungos endófitos.....	05
2.3 Fungos endófitos associados a gramíneas e ciperáceas.....	10
2.4 Fungos endófitos em outras famílias botânicas.....	12
2.4.1 Taxonomia.....	13
2.4.2 Padrões de colonização das plantas por fungos endófitos.....	16
2.5 Metabolismo secundário de fungos endófitos: interação com a planta hospedeira e potencial biotecnológico.....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Área de estudo.....	22
3.2 Espécies vegetais estudadas .....	22
3.3 Amostragem.....	24
3.4 Processamento das amostras.....	25
3.5 Identificação e preservação dos isolados.....	29
3.6 Meios de cultura.....	30
3.7 Análise dos dados .....	31
4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Metodologia de processamento das amostras.....	34
4.2 Biodiversidade de fungos endófitos associados a <i>Tapirira guianensis</i> e <i>Phoradendron perrottettii</i> .....	36

4.3 Influência da época de coleta sobre a quantidade de fungos endófitos recuperados.....	43
4.4 Composição de espécies de fungos endófitos associados a <i>P. perrottettii</i> e <i>T. guianensis</i> .....	44
4.5 Padrões de colonização.....	56
4.6 Coleção de culturas.....	70
5 CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74



## RESUMO

ABREU, Lucas Magalhães de. Fungos endófitos associados à planta parasita *Phoradendron perrottettii* (D.C.) Eichler e sua hospedeira *Tapirira guianensis* Aubl. 2005. 86 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG <sup>1</sup>.

Os fungos endófitos têm atraído a atenção de um crescente número de pesquisadores nos últimos anos porém, mesmo com a grande quantidade de informação a respeito dos endófitos associados a uma gama de plantas hospedeiras, a natureza desta relação simbiótica ainda não foi esclarecida. No presente trabalho são apresentados os resultados de um estudo comparativo da microbiota endófito associada à erva-de-passarinho *P. perrottettii* e sua hospedeira *T. guianensis* que objetivou a verificação da ocorrência de especificidade entre os fungos endófitos e suas hospedeiras, as quais encontram-se fisiologicamente conectadas. Dez amostras de folhas e caules das duas plantas foram coletadas próximo ao ponto de junção de ambas. As coletas foram realizadas em setembro de 2004 e janeiro de 2005 em corredores de vegetação localizados em valos de divisas entre propriedades no município de Lavras, MG. O material vegetal foi submetido à metodologia de trituração e filtração de partículas para isolamento dos fungos. 1678 UFCs foram detectadas e 128 morfo-espécies identificadas. As espécies mais frequentes em folhas de *P. perrottettii* foram *Cladosporium* spp., *Coniothyrium sporulosum*, *Paraconiothyrium* sp. e *Phomopsis* spl; as espécies mais abundantes em caules de *P. perrottettii* foram *Paraconiothyrium* sp., *Coniothyrium sporulosum*, *Cladosporium* spp. e *Acremonium bacillisporum*. Os fungos endófitos dominantes em folhas de *T. guianensis* foram cf. *Mycosphaerella*, *Verticillium psalliotae* e *Phomopsis* spl; as espécies mais abundantes em caules de *T. guianensis* foram *Phaeostagonospora* sp., *Phomopsis* spl e *Acremonium bacillisporum*. A taxa de colonização por fungos endófitos nas amostras de caule foi sempre superior àquela verificada nas amostras de folhas. O número de isolados recuperados foi significativamente superior na segunda coleta, provavelmente devido aos efeitos da estação chuvosa. Mesmo tendo havido sobreposição na composição das comunidades de fungos associadas às duas hospedeiras, as espécies mais abundantes mostraram claros padrões de recorrência ou exclusividade em relação a seus hospedeiros.

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Ludwig Heinrich Pfenning - UFLA (Orientador), Eduardo van den Berg - UFLA (Co-Orientador).

## ABSTRACT

ABREU, Lucas Magalhães de. **Fungal endophytes associated to the mistletoe *Phoradendron perrottettii* (D.C.) Eichler and its host *Tapirira guianensis* Aubl.** 2005. 86 p. Dissertation (Master Degree in Agricultural Microbiology) Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.<sup>2</sup>

Fungal endophytes have attracted much attention in recent years. Besides the large amount of data concerning endophytic fungi of several plants, the nature of this symbiotic association is not fully understood. Here are presented the results of a comparative survey of the endophytic mycobiota associated to the mistletoe *P. perrottettii* and its host *T. guianensis* with the aim to elucidate the occurrence of specificity between fungal endophytes and their hosts. Ten samples of stems and leaves of the two plants were collected near the point of junction of both. Collections were made on September 2004 and January 2005 in corridors of vegetation located near the city of Lavras, Minas Gerais state. Plant material was submitted to trituration and particle filtration for isolation of fungi. 1678 CFUs have been detected and 128 fungal morph species identified. The most frequent species associated with of *P. perrottettii* were *Cladosporium* spp., *Coniothyrium sporulosum*, *Paraconiothyrium* sp. and *Phomopsis* sp1 in leaves, and *Paraconiothyrium* sp., *Coniothyrium sporulosum*, *Cladosporium* spp. and *Acremonium bacillisporum* in stems. The dominant endophytic species of *T. guianensis* were cf. *Mycosphaerella*, *Verticillium psalliotae* and *Phomopsis* sp1 in leaves and *Phaeostagonospora* sp., *Phomopsis* sp1 and *Acremonium bacillisporum* in stems. Colonization by endophytes was always higher in stem tissues. A significant higher number of fungal isolates was recovered in the second collection, probably due the effects of wet season. Besides the overlap of fungal assemblages within the two plants, the dominant species showed clear patterns of recurrence or specificity in their hosts.

---

<sup>2</sup> Guidance Committee: Ludwig Heinrich Pfenning - UFLA (Advisor), Eduardo van den Berg - UFLA (Co-Advisor)

## 1 INTRODUÇÃO

O interior dos tecidos de plantas sadias, além de sua fascinante complexidade anatômica e fisiológica, tem-se revelado como um rico habitat para o desenvolvimento de uma gama de microrganismos, capazes de colonizar órgãos aéreos e subterrâneos de suas plantas hospedeiras sem causarem sintomas evidentes de enfermidades. Estes microrganismos endófitos vivem em uma estreita e dinâmica simbiose com seus hospedeiros, a qual tem sido classificada desde um parasitismo latente ao mutualismo.

A existência de fungos no interior de tecidos vegetais sadios já é conhecida há muito tempo, porém estes invariavelmente eram vistos como patógenos latentes ou saprófitos oportunistas, normalmente epífitos, que por ventura estivessem colonizando folhas, ramos, cascas, sementes ou raízes de plantas sem causarem maiores prejuízos. Somente a partir do final da década de 70, com os trabalhos conduzidos por Carroll e seus colaboradores, é que estudos taxonômicos e ecológicos mais aprofundados envolvendo fungos endófitos de coníferas foram iniciados. Atualmente, o enorme volume de literatura abrangendo tanto plantas do clima temperado como tropicais tem mostrado que a simbiose entre fungos endófitos e plantas encontra-se tão disseminada no reino vegetal quanto as associações do tipo micorriza. Muitas espécies de fungos têm sido consideradas tipicamente endófitas, recuperadas com grande regularidade em estudos com diversas espécies de vegetais. A especificidade entre fungo e planta hospedeira também foi demonstrada em alguns estudos, onde o conjunto de fungos endófitos isolado é característico de cada espécie vegetal pesquisada.

Estudos realizados em gramíneas e ciperáceas indicaram que muitas destas possuem uma relação de mutualismo com algumas espécies de fungos, os quais colonizam suas hospedeiras de maneira sistêmica e são disseminados

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Fungos endófitos

A colonização do interior de órgãos vegetais aéreos ou subterrâneos, aparentemente saudáveis, por diversas espécies de fungos é conhecida há muito tempo, porém a verdadeira significância deste tipo de relação planta-fungo só começou a receber a devida atenção dos pesquisadores nas últimas duas décadas. Inicialmente, os fungos que tipicamente colonizavam o interior de tecidos vegetais saudáveis eram geralmente considerados patógenos em estado de latência ou saprófitos, cuja eventual colonização epífita ou endófitica não causasse maiores danos à planta hospedeira. Contudo, mesmo na ausência de sintomas típicos de doenças, a colonização de plantas por espécies de fungos normalmente patogênicas era associada a efeitos como a senescência prematura de folhas e envelhecimento irregular de ramos e frutos (Rayner, 1948).

Estudos mais completos, envolvendo a taxonomia e ecologia de fungos endófitos, foram iniciados no final da década de 70, com os trabalhos pioneiros conduzidos por Carroll e seus colaboradores (Bernstein & Carroll, 1977; Carroll & Carroll, 1978), nos quais dezenas de espécies de fungos foram isoladas do interior de acículas saudáveis de várias coníferas. Posteriormente, diversos trabalhos confirmaram a presença generalizada de endófitos em várias famílias botânicas, sendo atualmente a simbiose planta-endófito considerada tão comum como as micorrizas (Carroll, 1988). Esta constatação, porém, não deixa de lado a polêmica envolvendo a definição do termo endófito e sua abrangência. Como muitas espécies de patógenos são normalmente recuperadas de tecidos vegetais saudáveis junto a outros fungos tipicamente endófitos, a separação entre fungos endófitos e patógenos latentes é, na maioria das vezes, bastante complicada de ser realizada. A simples presença do fungo no interior da planta não é indicativo

de fungos endófitos recuperados durante o estudo em uma coleção de culturas, visando a manutenção de recursos genéticos para utilização em estudos futuros.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Fungos endófitos

A colonização do interior de órgãos vegetais aéreos ou subterrâneos, aparentemente saudáveis, por diversas espécies de fungos é conhecida há muito tempo, porém a verdadeira significância deste tipo de relação planta-fungo só começou a receber a devida atenção dos pesquisadores nas últimas duas décadas. Inicialmente, os fungos que tipicamente colonizavam o interior de tecidos vegetais saudáveis eram geralmente considerados patógenos em estado de latência ou saprófitos, cuja eventual colonização epífita ou endófitica não causasse maiores danos à planta hospedeira. Contudo, mesmo na ausência de sintomas típicos de doenças, a colonização de plantas por espécies de fungos normalmente patogênicas era associada a efeitos como a senescência prematura de folhas e envelhecimento irregular de ramos e frutos (Rayner, 1948).

Estudos mais completos, envolvendo a taxonomia e ecologia de fungos endófitos, foram iniciados no final da década de 70, com os trabalhos pioneiros conduzidos por Carroll e seus colaboradores (Bernstein & Carroll, 1977; Carroll & Carroll, 1978), nos quais dezenas de espécies de fungos foram isoladas do interior de acículas saudáveis de várias coníferas. Posteriormente, diversos trabalhos confirmaram a presença generalizada de endófitos em várias famílias botânicas, sendo atualmente a simbiose planta-endófito considerada tão comum como as micorrizas (Carroll, 1988). Esta constatação, porém, não deixa de lado a polêmica envolvendo a definição do termo endófito e sua abrangência. Como muitas espécies de patógenos são normalmente recuperadas de tecidos vegetais saudáveis junto a outros fungos tipicamente endófitos, a separação entre fungos endófitos e patógenos latentes é, na maioria das vezes, bastante complicada de ser realizada. A simples presença do fungo no interior da planta não é indicativo

de que este, invariavelmente, causará prejuízos à sua hospedeira, pois obviamente o controle desta relação de antagonismo dependerá de fatores ambientais e daqueles relacionados com a virulência do fungo e o grau de resistência da planta hospedeira (Fisher & Petrini, 1992; Redman et al., 2001).

Para evitar complicações semânticas, Petrini *et al.* (1992) sugeriram uma definição mais abrangente do termo endófito, o qual incluía todos os organismos que, durante um período mais ou menos longo de seu ciclo de vida, colonizam o interior dos tecidos vivos de seus hospedeiros sem causarem sintomas de doenças. Como indicado pela definição, os endófitos não compreendem apenas os fungos filamentosos, mas também leveduras e especialmente bactérias endófitas, fato muitas vezes negligenciado na literatura atual (Chanway, 1995). Restringindo esta significação exclusivamente aos fungos endófitos, estes podem ser definidos como aqueles que estão presentes, em um determinado momento, no interior de tecidos vegetais aparentemente saudáveis (Schulz & Boyle, 2005).

## **2.2 Métodos para detecção e isolamento de fungos endófitos**

A maioria dos estudos envolvendo fungos endófitos baseia-se na observação indireta, em cultura axênica, do crescimento de colônias fúngicas a partir de fragmentos de tecido vegetal desinfestado superficialmente. A observação direta das estruturas de frutificação dos fungos endófitos em tecidos senescentes de seus hospedeiros é muitas vezes difícil de ser realizada, já que os tecidos vegetais senescentes são substrato para o crescimento e esporulação de várias espécies de saprófitos, o que atrapalha a distinção entre endófitos e saprófitos. A observação direta pode ser conseguida através do tratamento dos tecidos vegetais saudáveis com herbicidas como o paraquat, o que normalmente induz a esporulação precoce dos fungos colonizadores do interior dos tecidos (Sinclair & Cerkauskas, 1996).

A composição de espécies de fungos endófitos associadas a uma determinada espécie vegetal, pelo menos no que diz respeito às espécies dominantes, não se altera muito quando as amostragens são realizadas em sítios de coleta distantes. Contudo, a frequência relativa das espécies de fungos pode variar bastante entre os locais de coleta, ou mesmo entre plantas dentro de um mesmo local, o que indica que muitas vezes cada planta amostrada se comporta como um ecossistema individual (Petrini et al., 1992). No caso de inventários taxonômicos onde o isolamento de espécies raras é importante, o aumento da área amostral e a amostragem em diferentes épocas do ano facilitam a recuperação de um maior número de táxons raros (Bills & Polishook, 1991; Rodrigues, 1994). O número de plantas amostradas também é importante, sendo que um número aproximado de 40 plantas da mesma espécie é normalmente suficiente para a recuperação de pelo menos 80 % das espécies de fungos endófitos existentes em um determinado local (Petrini et al., 1992).

Depois de coletado, o material vegetal deve ser processado o mais rápido possível, evitando alterações na composição de espécies e na taxa de recuperação dos endófitos causadas por fatores relacionados ao período de estocagem do material. Porém, muitas vezes o processamento imediato não é possível, sendo necessário um correto armazenamento do material, evitando tanto o excesso de umidade, que leva à rápida proliferação de saprófitos, quanto a rápida secagem das amostras devido à exposição direta ao sol (Bills, 1996). Uma alternativa viável é uma pré-secagem do material vegetal em ambiente seco e sombreado, e sua posterior transferência para sacos de papel que permitam a troca gasosa entre o interior e o ambiente. Johnston (1998) verificou que a estocagem de folhas de *Leptospermum scoparium* não afetou a composição de espécies de endófitos recuperados, porém causou a diminuição na frequência de recuperação de um isolado de *Phyllosticta* sp., isolado com maior frequência neste estudo. A diminuição da frequência de isolamento das espécies de fungos



mais comuns com o aumento do tempo de estocagem também foi observada em trabalho realizado com fungos associados à liteira de *Neolitsea dealbata* (Paulus et al., 2003).

O primeiro passo no processamento das amostras para o isolamento de fungos endófitos é a desinfestação superficial dos tecidos para eliminação de bactérias e da micota epifítica. A lavagem seriada com álcool, seguida pela desinfestação com hipoclorito de sódio e uma rápida lavagem final com álcool, é a forma mais usada por vários pesquisadores. No entanto, muito variáveis são as concentrações e os tempos de exposição dos tecidos aos compostos químicos utilizados. Como regra deve se adequar estes parâmetros ao tipo de tecido em estudo; cascas de árvores podem ser imersas por períodos prolongados em soluções desinfetantes mais concentradas. O mesmo não é indicado para tecidos mais tenros como folhas, onde a possibilidade de disseminação dos produtos químicos para o interior dos tecidos vegetais, causando a morte dos organismos endófitos, é grande (Bills & Polishook, 1992). Outros métodos de desinfestação também são empregados com menor frequência, como o uso do peróxido de hidrogênio como agente desinfetante (Hata et al., 2002), a substituição do álcool por Tween bastante diluído (Bayman et al., 1998), ou a lavagem seriada dos tecidos em água destilada sob agitação (Petrini et al., 1990). O uso exclusivo de água destilada para lavagem de tecidos vegetais que apresentem uma camada de revestimento externa muito hidrofóbica pode impedir uma boa eliminação dos propágulos microbianos (Bills, 1996).

Finda a desinfestação dos tecidos, estes são fragmentados e transferidos assepticamente para placas de Petri contendo meio de cultura adequado. As folhas são normalmente cortadas em discos com poucos milímetros de diâmetro, os quais podem ser retirados de modo aleatório ou seguindo um padrão amostral mais apurado, como discos foliares com ou sem nervuras, na base ou no ápice da lâmina foliar (Photita et al., 2001; Hata et al., 2002). Tecidos mais rígidos como

cascas e ramos são também cortados em pedaços com alguns milímetros e posteriormente transferidos para meio de cultura (Bills & Polishook, 1991).

Partindo do princípio de que os tecidos vegetais são alvo de múltiplas infecções por parte dos fungos endófitos, e que tais fungos normalmente apresentam distribuição bem restrita no interior de seus hospedeiros, o tamanho dos tecidos usados no isolamento em placa de Petri torna-se importante. O fato de que apenas um ou dois isolados de fungos são geralmente recuperados de fragmentos de tecidos vegetais com alguns milímetros quadrados, indica que a real densidade de colonização dos tecidos por diferentes espécies de fungos endófitos pode estar sendo subestimada. Muitos fungos presentes nestes fragmentos de alguns milímetros podem estar sendo inibidos pelo crescimento de outras espécies de crescimento mais rápido, ou simplesmente permanecem contidos no interior do fragmento vegetal, passando despercebidos pelos pesquisadores. Este problema é grave quando quase 100 % dos fragmentos vegetais apresentam-se colonizados por endófitos, já que a chance de que haja muito mais fungos do que o observado no isolamento é grande (Carroll, 1995). Uma solução para este problema é diminuição do tamanho dos fragmentos de tecido vegetal de maneira a aumentar a superfície de contato com o meio de cultura, aumentando também a chance de recuperação de um maior número de isolados por unidade de área amostrada (Gamboa et al., 2002). O tamanho ideal das partículas é aquele que proporciona uma taxa média de colonização de um fungo por partícula (Bååth, 1988) e deve ser determinado empiricamente para cada tipo de substrato estudado.

O método de filtração de partículas, mais usualmente empregado no isolamento de fungos de solo, baseia-se na lavagem e filtração dos colóides de solo e sua separação em uma série de filtros ou peneiras com aberturas de malha progressivamente menores; sendo as partículas recuperadas no filtro menor abertura de malha transferidas para meio de cultura adequado (Bååth, 1988).

Baseando-se neste método, Petrini et al. (1990) conseguiram recuperar 506 isolados de fungos pertencentes a 62 taxa distintos, a partir de uma amostra de apenas 17 gramas de líquens. A trituração do material vegetal e filtração de partículas permitiram a recuperação de 736 isolados pertencentes a 112 morfo-espécies, de amostras de liteira de *Neolitsea dealbata* (Paulus et al., 2003). Resultados semelhantes também foram obtidos por Bills e Polishook em estudos da diversidade de fungos associados a diversos tipos de liteira em florestas tropicais da Costa Rica e Porto Rico (Bills & Polishook, 1994 a,b; Polishook et al., 1996). Devido às suas vantagens, a filtração de partículas mostra grande potencial de aplicação no isolamento de fungos endófitos, mesmo que as expectativas de aumento da quantidade de fungos recuperados com esta técnica não sejam comparáveis aos resultados obtidos com a sua aplicação no isolamento de fungos de material vegetal morto ou em avançado estado de senescência (Carroll, 1995).

No isolamento dos fungos endófitos, o meio mais comumente usado é o MEA, tendo como fonte nutricional o extrato de malte, o qual poder ser enriquecido com extrato de levedura. Este meio de cultura é considerado não seletivo, e a sua adoção generalizada em diversos trabalhos é um bom indício de sua eficiência para recuperação de uma grande variedade de espécies de fungos. Obviamente, o uso de uma fonte nutricional restrita pode levar a uma seleção ou pelo menos ao favorecimento de algumas espécies de fungos, as quais acabam sendo isoladas com maiores frequências do que outras (Bills & Polishook, 1991, 1994 b; Petrini et al., 1992). Exemplos de outros meios de cultura já usados com sucesso no isolamento de fungos endófitos são o BDA (Batata dextrose Agar), CMA (farinha de milho e Agar) e CMD (farinha de milho, dextrose e Agar) (Bernstein & Carroll, 1977; Fröhlich et al., 2000; Rodrigues, 1994).

Além de um meio de cultura apropriado, outras substâncias químicas como antibióticos e compostos fungistáticos ou fungicidas em baixas

concentrações são normalmente utilizadas no isolamento dos fungos endófitos. Tais substâncias visam suprimir o crescimento bacteriano e impedir que algumas espécies de fungos cresçam muito rapidamente, inibindo o desenvolvimento daquelas espécies de crescimento mais lento. Dentre os antibióticos comumente empregados para este fim destacam-se a estreptomicina, clorotetraciclina, oxitetraciclina e o cloranfenicol (Bills & Polishook, 1991, 1992; Fisher et al., 1986; Fröhlich et al., 2000; Petrini & Fisher, 1986; Photita et al., 2001). Substâncias fungicidas como benomyl e cicloheximida, aplicadas em meio de cultura em baixas concentrações, são eficientes no controle do crescimento das colônias de fungos associados a tecidos rígidos como ramos e cascas de árvores (Bills & Polishook, 1991). O rosa de bengala é também um agente fungistático apropriado para o uso como controlador de crescimento no isolamento de fungos endófitos (Photita et al., 2001). Outra substância muito eficiente é a ciclosporina A, um composto capaz de restringir o crescimento de várias espécies de fungos promovendo um crescimento distorcido das hifas sem levá-las à morte (Bills, 1996). A ciclosporina foi empregada com sucesso no meio de cultura para isolamento dos fungos endófitos associados à palmeira *Euterpe oleracea*, e seu uso conjunto com a filtração de partículas, possibilitaram a recuperação de uma enorme quantidade de espécies de fungos de amostras de material vegetal morto ou senescente (Bills & Polishook, 1994 a, b; Rodrigues, 1994).

### **2.3 Fungos endófitos associados a gramíneas e ciperáceas**

Dois grupos bem característicos podem ser distinguidos entre os fungos endófitos. O primeiro deles compreende aquelas espécies de fungos associadas a várias espécies da família Poaceae e algumas pertencentes à família Cyperaceae. Este grupo restrito inclui ascomicetos da família Clavicipitaceae, pertencentes aos gêneros *Balansia*, *Balansiopsis*, *Myriogenospora*, *Atkinsonella*, *Echinodopsis* e *Epichloë*, além de muitas espécies exclusivamente anamórficas,

tradicionalmente incluídas no gênero *Neotyphodium* (*Acremonium* seção *Albolanosa*, Gams, 1997) e que de acordo com estudos filogenéticos recentes apresentam alto grau de parentesco com representantes do gênero *Epichloë* (Schardl & Clay, 1997).

Estes fungos colonizam seus hospedeiros de maneira sistêmica e muitas vezes são capazes de colonizar o interior de sementes, sendo transmitidos verticalmente de geração a geração conjuntamente com suas plantas hospedeiras. Como retribuição à proteção, nutrição e garantia de disseminação os fungos endófitos produzem toxinas que, uma vez dispersas pelos órgãos das plantas, evitam em grande parte o ataque de herbívoros como insetos e mamíferos (Clay, 1988; Barker & Addison, 1996). Outros efeitos benéficos como resistência a estresses abióticos e crescimento vegetativo aumentado também foram atribuídos à infecção de gramíneas por endófitos, mesmo que os efeitos fisiológicos dos fungos sobre seus hospedeiros ainda não tenham sido elucidados (Schardl & Clay, 1997).

Após vários estudos envolvendo gramíneas e seus endófitos, a idéia da existência de uma simbiose do tipo mutualismo entre estes organismos é bem aceita por vários autores. Carroll (1988) define esta relação como um mutualismo constitutivo, onde o fungo coloniza quase todos os órgãos de sua hospedeira, produz uma grande quantidade de biomassa e é disseminado através das sementes; em troca este favorece sua hospedeira, e fonte de nutrição, de diversas formas. Porém, dentro da família Clavicipitaceae existem desde espécies sempre patogênicas a espécies cuja interação com suas plantas hospedeiras pode variar de mutualismo a um parasitismo mais intenso, dependendo dos envolvidos na simbiose e das condições climáticas atuantes.

Esta simbiose variável recebeu o nome de simbiose pleiotrópica e parece ser bem comum naqueles endófitos de gramíneas que apresentam um ciclo de reprodução sexuado (Schardl & Clay, 1997). O desenvolvimento das estruturas

reprodutivas dos fungos endófitos normalmente coincide com a época de floração de seus hospedeiros. Nestas situações, os fungos geralmente colonizam e esporulam sobre os órgãos reprodutivos de suas plantas hospedeiras, prejudicando a reprodução sexual destas. O tipo de simbiose neste caso poderá variar de caso para caso, já que talvez o prejuízo na reprodução sexuada seja compensado por um crescimento mais vigoroso das gramíneas quando infectadas por fungos endófitos. Por outro lado, a vantajosa forma de disseminação por meio das sementes dos hospedeiros, apresentada por várias espécies de *Neotyphodium* pode, no longo prazo, levar a deteriorações destas espécies de fungos devido à ausência de trocas genéticas normalmente providas pelo ciclo sexual (Schardl & Clay, 1997).

#### **2.4 Fungos endófitos em outras famílias botânicas**

O segundo grupo de fungos endófitos inclui aquelas espécies associadas a arbustos, árvores e plantas herbáceas; além de espécies de fungos não pertencentes à família Clavicipitaceae, mas que também ocorrem como endófitos em gramíneas. Ao contrário do caso anterior, estes fungos normalmente colonizam porções restritas dos tecidos internos de suas plantas hospedeiras e raramente são transmitidos via semente (Fisher & Petrini, 1992; Petrini et al., 1992). Tais fungos têm seus propágulos dispersos pela ação do vento e chuva e penetram os tecidos das plantas hospedeiras através de aberturas naturais (ex. estômatos) ou rompem as barreiras cuticulares dos vegetais através do uso de um aparato enzimático muito semelhante ao presente em muitos fitopatógenos biotróficos e hemibiotróficos (Carroll & Petrini, 1983; Viret & Petrini, 1994). A diversidade taxonômica deste grupo de fungos é bem mais expressiva do que no caso do restrito grupo de espécies associadas a gramíneas e ciperáceas. Por causa desta diversidade, a maioria dos estudos tem focado mais a

composição de espécies de fungos e seus padrões de distribuição do que as relações e funções exercidas pelos endófitos sobre seus hospedeiros.

#### 2.4.1 Taxonomia

Grande parte das espécies de fungos endófitos isoladas e identificadas pertencem ao Filo Ascomycota, na maior parte das vezes recuperados em sua fase anamórfica. Basidiomicetos e zigomicetos são recuperados muito esporadicamente. No entanto, como observado por Petrini et al. (1992), a pequena taxa de recuperação de outros grupos de fungos que não ascomicetos nos estudos com endófitos pode estar relacionada à rígida metodologia padrão aplicada na maioria dos trabalhos, onde o isolamento é baseado em uma desinfestação superficial dos tecidos vegetais com produtos químicos, seguida do cultivo destes fragmentos em meio à base de malte.

As espécies de fungos mais comumente recuperadas como endófitos de diversas espécies vegetais pertencem aos gêneros *Glomerella* (anamorfo *Colletotrichum*), *Guignardia* (anamorfo *Phyllosticta*) e *Phomopsis* (Carroll & Carroll, 1978; Freire & Bezerra, 2001; Hata et al., 2002; Johnston, 1998), além de vários fungos pertencentes à família Xylariaceae, isolados em grande quantidade principalmente de plantas tropicais (Bayman et al., 1997, 1998; Fröhlich et al., 2000; Lodge et al., 1996; Rodrigues 1994). Em certas situações alguns fungos menos comuns, de identificação difícil, ou cuja descrição tenha sido feita somente após seu isolamento como endófito, estão entre os isolados com maiores frequências de recuperação. Este é o caso de um ascomiceto não identificado, isolado de *Pasania edulis* (Hata et al., 2002), *Letendraeopsis palmarum*, recuperado de *Euterpe oleracea* (Rodrigues, 1994) e *Rhabdocline parkeri*, obtido como endófito de *Pseudotsuga menziesii* (Sherwood-Pike et al., 1986).

Como pode ser verificado, entre os fungos endófitos comumente isolados são encontrados muitos fitopatógenos, dentre os quais destaca-se *Colletotrichum gloeosporioides* (teleomorfo *Glomerella cingulata*) espécie de fungo patogênico causador de antracnose em folhas e frutos de diversas espécies vegetais, e comumente recuperado em grande quantidade como endófito associado a tecidos sadios de plantas como cafeeiro (Gamboa et al., 2002; Almeida et al. 2004), bananeira selvagem (Photita et al., 2001), *Rhododendron* spp. (Okane et al., 1998), cajueiro, mangueira, umbuzeiro, mamona e mandioca (Freire & Bezerra, 2001).

*Guignardia citricarpa*, agente etiológico da pinta preta da laranja, é um patógeno quarentenário em países europeus. A recuperação de *Guignardia* sp. a partir da casca de frutos de laranja, aparentemente sadios, exportados para o consumo *in natura* foi muitas vezes o motivo de devolução de carregamentos de laranja aos países de origem e o enrijecimento de barreiras sanitárias para o comércio de laranja *in natura*. Em estudo conduzido por Baayen et al. (2002), o qual contou com participação de pesquisadores brasileiros, foi evidenciado que o fungo normalmente isolado a partir de laranjas sadias pertence à espécie *Guignardia mangiferae*, endófito de ocorrência disseminada em diversos hospedeiros. Este é um caso muito peculiar onde patógenos e endófitos colonizadores de um mesmo hospedeiro puderam ser claramente diferenciados. Esta separação já não é muito clara para outros fungos como *Colletotrichum gloeosporioides* discutido anteriormente.

Sendo considerados tipicamente endófitos os ascomicetos pertencentes à família Xylariaceae são recuperados em grande quantidade de diversas plantas hospedeiras, sendo muitas vezes indicadas apenas por denominações como *Xylaria* spp. ou fungos xylariáceos, devido a problemas na sua identificação (Petrini et al., 1992; Petrini et al., 1995). Esses fungos normalmente formam seus corpos de frutificação contidos em estromas cuja produção em cultura



axênica pode levar meses (Bayman et al., 1998). Além disso, a formação do estroma em meio de cultura nem sempre é acompanhada da formação das estruturas reprodutivas sexuais. Nestas circunstâncias, uma boa alternativa é a caracterização e identificação da fase anamórfica destes fungos, comumente produzidos sob a forma de uma massa branca sobre o ápice dos estromas, e sua posterior correlação com as espécies teleomórficas quando tal relação já estiver bem estabelecida (Petrini & Petrini, 1985).

A causa da ocorrência de muitos micélios estéreis nos isolamentos de endófitos pode estar relacionada à ausência de fatores nutricionais e condições ambientais favoráveis à esporulação dos fungos em meio de cultura. Normalmente, os micélios estéreis são agrupados de acordo com suas características culturais em morfo-espécies, o que muitas vezes pode levar a valores subestimados da diversidade de fungos recuperados (Bills & Polishook, 1994 a). A esporulação dos micélios estéreis pode ser conseguida transferindo-se pedaços de micélio para fragmentos autoclavados de sua planta hospedeira (Guo et al., 2000) ou apenas inserindo no meio de cultura pequenas tiras de material celulósico, como folhas de bananeira (Bills & Polishook, 1994 b). No caso de insucesso nestas estratégias, outros métodos como a extração e amplificação do DNA dos micélios estéreis, o sequenciamento de regiões do DNA contendo agrupamentos de genes dos RNAs ribossômicos e posterior comparação dos resultados em bases de dados especializadas podem permitir a identificação destes isolados, ou pelo menos sua colocação em uma categoria taxonômica superior como gênero ou família (Guo et al., 2000, 2001).

O conceito de morfo-espécies, geralmente usado para designação daqueles micélios que não produzem estruturas reprodutivas em meio de cultura, foi recentemente empregado de uma forma mais ampla por Arnold et al. (2000) que identificaram todos os fungos isolados como endófitos de *Heisteria concinna* e *Ouratea lucens* com base neste conceito. A justificativa dos autores

para este sistema de nomenclatura é a de que os conceitos de espécie baseados em caracteres morfológicos das estruturas reprodutivas têm-se mostrado insatisfatórios para definição e distinção entre espécies filogenéticas. Contudo, o abandono completo da identificação com base na morfologia não é justificável visto que muitos caracteres morfológicos diferenciadores têm-se mostrado eficientes na distinção de espécies filogeneticamente distintas (Jeewon et al., 2002; Jeewon et al., 2003). Outro fator a ser considerado é variabilidade morfológica apresentada por muitos isolados de uma mesma espécie fúngica, o que pode levar a valores superestimados da diversidade quando estes isolados um pouco diferentes são designados a morfo-espécies distintas. Este parece ter sido o caso do estudo conduzido por Arnold et al. (2000) onde 418 morfo-espécies foram identificadas de um total de 1472 isolados, o que levou os autores à hipótese de existência de uma hiper-diversidade de fungos endófitos em plantas tropicais. Outros estudos, realizados com dezenas de plantas em florestas tropicais empregando métodos tradicionais de identificação de fungos, têm sinalizado contra esta idéia de hiper-diversidade proposta por Arnold et al. (2000), uma vez que há uma grande redundância taxonômica dentre os fungos endófitos mais freqüentemente isolados de diversas hospedeiras tropicais (Cannon & Simmons 2002; Suryanarayanan et al., 2002; Suryanarayanan et al., 2003).

#### **2.4.2 Padrões de colonização das plantas por fungos endófitos**

O número de espécies isoladas nos diversos estudos com fungos endófitos varia bastante de acordo com a espécie de planta pesquisada e com as condições em que os experimentos tenham sido realizados. Apesar das variações no número absoluto de fungos endófitos isolados de diferentes plantas hospedeiras, geralmente apenas 2 a 5 espécies são recuperadas com grande freqüência e a grande maioria das espécies de endófitos é recuperada raramente,

um padrão de colonização comum a todos os estudos até agora realizados (Petrini et al., 1992; Suryanarayanan et al., 2002). Estes resultados foram obtidos através de observações indiretas dos fungos crescendo em cultura axênica. Nestas situações, sempre há a possibilidade de que algumas das espécies de fungos endófitos mais comumente isoladas não sejam realmente dominantes, mas sim melhor adaptadas ao rápido crescimento em meio de cultura (Carroll, 1995).

Dentre os fatores climáticos mais influentes na composição de espécies e na frequência de colonização por fungos endófitos em espécies arbustivas e arbóreas, a umidade mostra-se como o fator principal. Carroll & Carroll (1978) demonstraram haver uma correlação positiva entre a umidade e número de endófitos recuperados de várias espécies de coníferas do Pacífico norte. Da mesma forma, o número de fungos endófitos recuperados da palmeira *Euterpe oleracea* foi significativamente menor na estação seca do que na época chuvosa, fato que foi atribuído ao possível acúmulo, nos tecidos da planta hospedeira, de substâncias como taninos, normalmente associados à resistência à seca, e que provavelmente restrinjam a colonização dos tecidos da planta pelos fungos endófitos (Rodrigues, 1994). A umidade também é fator determinante na dispersão e germinação dos esporos, bem como na penetração e colonização inicial dos tecidos da planta hospedeira pelos fungos endófitos (Carroll & Carroll, 1978; Carroll, 1995).

Em geral, cada espécie de planta apresenta um conjunto de espécies de fungos endófitos bem característico. Johnston (1998) verificou que uma espécie de *Phyllosticta*, isolada como endófito mais abundante de *Leptospermum scoparium* não foi isolada de plantas de *Kunzea ericoides*, mesmo que as duas espécies vegetais estivessem muito próximas em uma floresta mista. Mesmo nos casos onde alguns fungos generalistas são isolados de vários hospedeiros distintos, a especificidade de algumas linhagens dentro da mesma espécie

fúngica a diferentes hospedeiros não deve ser descartada, já que uma melhor adaptação às condições morfofisiológicas da planta hospedeira é uma vantagem para os endófitos (Carroll & Carroll, 1978; Petrini et al., 1992).

Quando a análise dos padrões de colonização por endófitos se restringe a uma planta ou um pequeno grupo de plantas, outros fatores passam a ser determinantes na distribuição das espécies. Em geral a frequência de colonização por fungos endófitos aumenta com a idade dos tecidos vegetais, padrão observado em estudos com plantas tão diversas como coníferas (Bernstein & Carroll, 1977), bananeira selvagem (Photita *et al.*, 2001) ou palmeiras (Fröhlich et al., 2000). Este padrão de colonização evidencia que os tecidos das plantas hospedeiras são alvo de multi-infecções por parte dos fungos endófitos, e que os tecidos mais velhos acumulam um maior número destes fungos (Photita et al., 2001). Mesmo com esta diferença na frequência de colonização entre tecidos vegetais jovens e desenvolvidos, a composição de espécies é normalmente bastante similar (Bernstein & Carroll, 1977).

A preferência de alguns endófitos pela colonização de determinados órgãos da planta hospedeira também é comum, e provavelmente expressa um certo grau de especificidade por parte dos fungos a nichos restritos e bastante característicos em seus hospedeiros. Bernstein e Carroll (1977) verificaram que duas das três espécies de endófitos mais isoladas de *Pseudotsuga menziesii* eram isoladas preferencialmente das acículas, já o pecíolo era o tecido mais preferido pela terceira espécie de fungo endófito. A preferência de colonização de alguns fungos endófitos foliares por pecíolo, nervuras ou regiões entre nervuras também já foi verificada em outros trabalhos envolvendo plantas tropicais (Rodrigues, 1994; Fröhlich et al., 2000; Photita et al., 2001). Estas diferenças nos padrões de colonização são devidas não somente aos diferentes meios de infecção das folhas pelos esporos dos endófitos, mas também a prováveis

interações antagonistas entre as diferentes espécies de fungos, as quais poderiam restringir os seus nichos de colonização (Hata et al., 2002).

## **2.5 Metabolismo secundário de fungos endófitos: interação com hospedeiro e potencial biotecnológico**

O delicado equilíbrio entre endófitos e plantas é afetado por fatores climáticos como seca ou má nutrição mineral, o que pode levar a uma mudança na simbiose entre o fungo e sua hospedeira, passando de um mutualismo ou simples neutralidade para um antagonismo. Fatores químicos podem estar relacionados ao controle desta simbiose, com substâncias fungicidas produzidas pelas plantas sendo contrabalançadas por compostos de ação herbicida secretados pelos fungos endófitos (Schulz et al., 1999). O fato de os fungos endófitos habitarem um nicho ecológico pouco estudado, aliado à própria natureza desta relação de simbiose, onde os fungos têm que se desenvolver e se propagar em um ambiente químico complexo e adverso, tem despertado o interesse de pesquisadores de diversas áreas de atuação, desde ecólogos e fitopatologistas, interessados na caracterização e possível controle desta simbiose (Arnold et al., 2003; Redman et al., 2001; Rubini et al., 2005), até químicos e profissionais das indústrias farmacêutica e agroquímica, em busca de novos compostos bioativos (Schulz et al., 2002; Strobel 2002).

Taxol é um diterpenóide de comprovada ação anticancerígena inicialmente isolado e caracterizado a partir de extratos de plantas de *Taxus brevifolia* na década de 70 (Strobel et al., 1996). A baixíssima concentração de Taxol nos tecidos das plantas de teixo criou algumas barreiras para sua extração e utilização em larga escala, como o alto custo do produto final e a necessidade de corte de uma grande quantidade de árvores para obtenção de quantidades razoáveis do Taxol. Stierle et al. (1993) mostraram que *Taxomyces adreanne*, uma espécie isolada e descrita pela primeira vez como fungo endófito de *Taxus*

*brevifolia*, era capaz de produzir Taxol *in vitro*. O composto químico também foi isolado de *Pestalotiopsis microspora*, isolado como endófito *Taxus wallachiana* (Strobel et al., 1996).

A descoberta de co-produção de metabólitos por plantas e seus endófitos serviu de grande incentivo para inúmeros trabalhos de bios prospecção química envolvendo estes fungos, além de suscitar diversas questões a respeito da simbiose, como a possibilidade de transferências genéticas horizontais entre fungos e plantas e o questionamento a respeito das funções ecológicas destes metabólitos. O Taxol age no processo de divisão celular impedindo a despolimerização das fibras de tubulina e por isso possui ação anticancerígena. Estudos mostraram que o processo de divisão celular em mamíferos é muito semelhante àquele que ocorre em ‘fungos’ do filo Oomycota, como os importantes fitopatógenos *Phytophthora* e *Pythium*. Tal constatação levou Strobel (2002) a hipotetizar que o Taxol produzido pelos endófitos teria como função a proteção da planta hospedeira contra o ataque de patógenos. Em outro trabalho Long et al. (1998) mostraram que um isolado de *Pestalotiopsis microspora* produtor de Taxol era capaz de adquirir genes estranhos e ainda adicionar a estes seqüências teloméricas, capacitando-os a funcionar como pequenos cromossomos independentes. Este fenômeno é um forte argumento a favor da teoria da transferência horizontal de genes entre plantas e fungos endófitos (Strobel & Daisy, 2003).

A co-produção de compostos bioativos por plantas e endófitos em outros sistemas ainda não foi claramente comprovada, porém vários compostos biologicamente ativos com ação antimicótica, antibacteriana e herbicida como fenóis, quinonas, terpenóides, citocalasinas etc., têm sido isolados de fungos endófitos nos últimos anos. Como exemplos destes compostos podem ser citados os antitumorais citocalasina E (Wagenaar et al., 2000), ácido torriânico e ácido oregânico (Lee et al., 1996); geniculol e citocalasina F caracterizados pela

bioatividade algicida (König et al., 1999); citosporona D (Brady & Clardy, 2000), fomopsolida A e ácido coletotrico (Zou et al., 2000) com atividade antibacteriana; leucinostatina A (Strobel et al., 1997), criptocandina e criptocina (Li et al., 2000) com atividade antifúngica.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Área de estudo

As coletas do material vegetal foram efetuadas em uma área localizada a 5 km da sede do município de Lavras, em corredores de vegetação associados a valos de divisas entre propriedades rurais, os quais interligam fragmentos florestais. A vegetação local foi previamente identificada e caracterizada em estudo anterior, sendo que as parcelas pré-estabelecidas dentro dos corredores de vegetação foram aproveitadas para a amostragem das plantas (Castro, 2004).

### 3.2 Espécies vegetais estudadas

As espécies vegetais escolhidas para este estudo foram uma espécie de erva-de-passarinho e uma de suas plantas hospedeiras. A planta hemiparasita *Phoradendron perrottettii* encontra-se bastante disseminada nos corredores de vegetação estudados além de possuir um alto grau de especificidade à hospedeira *Tapirira guianensis*. A opção pela erva-de-passarinho deveu-se à constatação de que espécies do gênero *Phoradendron*, além de possuírem um ciclo de vida especializado no parasitismo do lenho de outras plantas, são produtoras de muitos metabólitos secundários, provavelmente envolvidos na proteção das plantas contra herbivoria, o que torna o interior de seus tecidos um nicho ecológico restritivo e ao mesmo tempo muito interessante para o estudo de fungos adaptados à vida em um ambiente químico complexo. Já a opção pelo estudo dos endófitos de uma hospedeira da erva-de-passarinho foi feita visando a comparação das populações de fungos isoladas de duas plantas intimamente ligadas, permitindo a verificação da hipótese de que cada espécie vegetal abriga um conjunto de fungos endófitos distinto.



*Phoradendron perrottettii* (D.C.) Eichler.

Esta espécie de planta parasita pertence à família Loranthaceae, sendo conhecida vulgarmente como erva-de-passarinho, um epíteto utilizado para nomear uma grande quantidade de espécies de plantas hemiparasitas pertencentes a esta mesma família. *Phoradendron perrottettii* é uma espécie sub-arbustiva que normalmente se desenvolve sobre ramos e galhos de suas plantas hospedeiras, dentre as quais se destacam as do gênero *Tapirira* (Anacardiaceae). Várias espécies pertencentes à família Loranthaceae, como a europeia *Viscum album* e diversas plantas pertencentes ao gênero *Phoradendron* são de longa data reconhecidas por suas capacidades medicinais, bem como pelos seus princípios tóxicos. Estudos têm demonstrado o potencial do uso dos extratos de ervas de passarinho no controle de enfermidades como câncer, diabetes etc. Lectinas, toxinas como viscotoxinas e phoratoxinas, flavonóides e outros compostos já foram isolados de plantas da família Loranthaceae. (González et al., 2000; Johansson et al., 2003; Richter, 1992; Schultz, 1977).

*Tapirira guianensis* Aubl.

O gênero *Tapirira* pertence à família Anacardiaceae, sendo composto por aproximadamente 15 espécies com ampla distribuição na América do Sul. Conhecida popularmente como pau peito-de-pombo, *Tapirira guianensis* é uma planta de porte arbóreo, podendo atingir até 12 m de altura e está distribuída em diversos habitats, com predomínio em locais mais úmidos (Lorenzi, 1992). A planta foi identificada como uma das espécies arbóreas mais frequentes em corredores de vegetação na região do alto Rio Grande (Castro, 2004), logo sua escolha facilitou bastante o processo de amostragem.

### 3.3 Amostragem

Para avaliar a composição de espécies e os padrões de colonização por fungos endófitos associados a *Phoradendron perrottettii* e *Tapirira guianensis* foi amostrado um conjunto total de 10 pares *P. perrottettii* – *T. guianensis*. As 10 amostras foram coletadas de forma aleatória em árvores de *Tapirira guianensis* localizadas nas parcelas dos corredores previamente analisados quanto à estrutura arbórea (Castro, 2004). Somente foram amostradas árvores aparentemente saudas, com diâmetro de caule superior a 20 cm, sem sinais de senescência e parasitadas por plantas da espécie *Phoradendron perrottettii* bem desenvolvidas.

Ramos e folhas de *Phoradendron perrottettii* e *Tapirira guianensis* foram amostrados próximo ao ponto de inserção da planta parasita. As unidades amostrais foram nomeadas com o código TP (Tapirira-Phoradendron) e numeradas de 1 a 10. Cada par de plantas amostrado originou 4 tipos de amostras, folha de *P. perrottettii* (FP), caule de *P. perrottettii* (CP), folha de *T. guianensis* (FT) e caule de *T. guianensis* (CT). Somente caules e folhas aparentemente saudas foram amostrados. O tamanho das folhas foi critério observado para a garantia de amostragem de folhas adultas e saudas.

O efeito de variações climáticas, como temperatura e umidade, sobre a diversidade e quantidade de fungos endófitos isolados dos vegetais em estudo foi avaliado em duas coletas realizadas nas mesmas plantas em épocas distintas do ano. As primeiras coletas foram realizadas nos dias 17/08/2004 (TP 1 a TP 5) e 06/09/2004 (TP6 a TP10) contemplando o final do período de estiagem e de baixas temperaturas. Já as coletas da época chuvosa e quente foram feitas nos dias 12 e 13/01/2005.

Após a coleta, todo material foi transportado em embalagens de papel para o laboratório de Micologia no Departamento de Fitopatologia da

Universidade Federal de Lavras e submetido ao processamento para isolamento dos fungos endófitos em um período de 12 horas.

### 3.4 Processamento das amostras

As etapas do processamento são sucintamente mostradas na Figura 1 e a descrição de cada passo do processo é feita no texto que se segue. No laboratório as folhas foram inicialmente lavadas com água e sabão e os caules cortados em fragmentos de aproximadamente 15 cm e submetidos a um processo mais drástico de limpeza. Caules de *P. perrottetii* foram raspados superficialmente com auxílio de um bisturi e as amostras de caule de *T. guianensis* foram descascadas manualmente. A limpeza superficial, seguida do processo de desinfestação, tem como objetivo a eliminação da maior parte dos fungos epífitos e saprófitos comumente presentes na camada externa dos tecidos vegetais. Porém, como pôde ser observado pelos resultados da primeira coleta, o procedimento de descascamento dos caules de *T. guianensis* foi muito drástico, já que não somente a casca externa mas também o floema do caule foi extirpado, o que resultou em uma recuperação muito baixa de fungos das amostras de caule de *T. guianensis* na primeira amostragem. O número de fungos isolados a partir de amostras de xilema é geralmente bem menor do que o obtido para amostras de folhas ou caules contendo casca (Fisher & Petrini, 1987; Smith et al., 1996). Como consequência, a limpeza inicial dos caules de *T. guianensis* na segunda amostragem foi realizada apenas com uma raspagem superficial a exemplo do procedimento aplicado às amostras de caule de *P. perrottetii*.

Para a desinfestação superficial do material vegetal, este foi lavado seqüencialmente em álcool etílico 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 3% por 6 minutos para o material foliar e 2 minutos para caules, e álcool etílico 96° GL por mais 0,5 minuto (Schulz et al., 1993). Após a desinfestação, as amostras foram postas para secar em papel de filtro e então processadas segundo o

protocolo adaptado de trituração do material vegetal, seguido da filtração de partículas e transferência do material particulado para meio de cultura apropriado (Bills & Polishook, 1994a,b; Paulus et al., 2003; Petrini et al., 1990; Polishook et al., 1996).

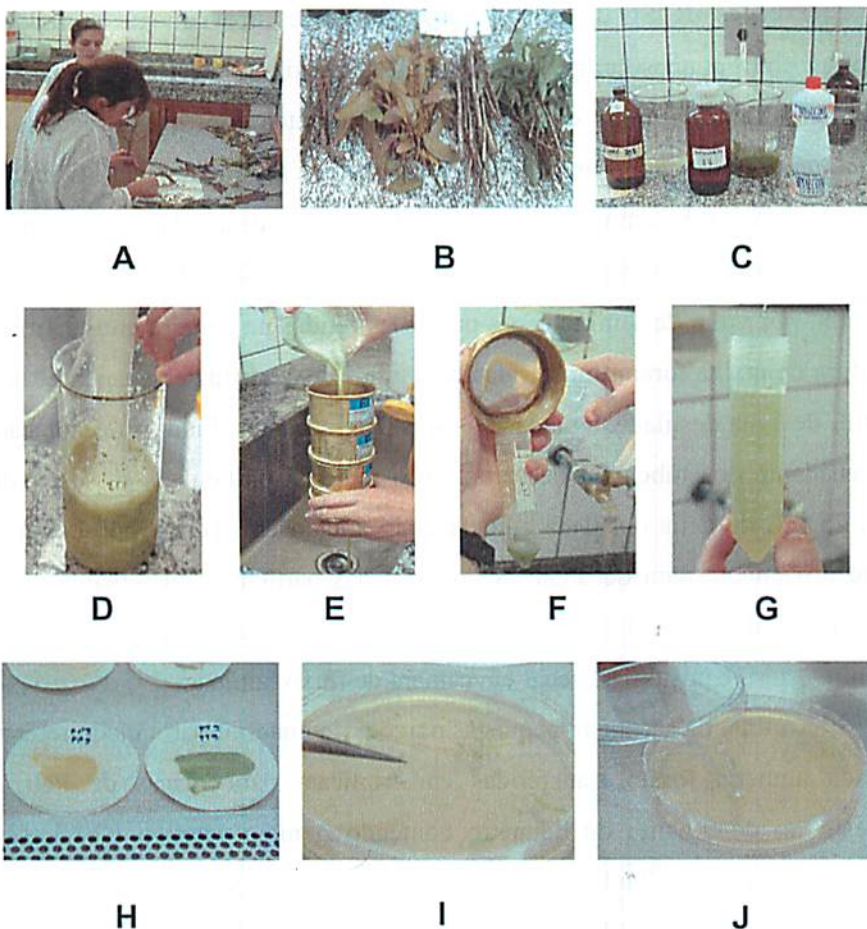


FIGURA 1 Processamento das amostras para isolamento de fungos endófitos. A - limpeza inicial das amostras; B - separação das 4 amostras geradas por cada par *P. perrottetii* / *T. guianensis* amostrado; C - Desinfestação superficial; D - Trituração das amostras; E - Lavagem e filtração das partículas; F - Transferência do material particulado para tubos de centrifuga; G - Tríplice lavagem das partículas com água destilada autoclavada; H - Secagem das partículas em câmara de fluxo laminar; I - Transferência de pequenas porções de material particulado para placas de Petri contendo CYCL; J - Espalhamento das partículas com auxílio de uma alça de Drigalsky.

Porções de 5g de folhas e 10g de caules previamente cortados em pedaços com poucos milímetros foram transferidas para Beckers contendo 100mL de água destilada e trituradas por 2 minutos com o emprego de um *mixer* (um liquidificador também foi empregado na segunda coleta). O material foi então submetido a uma lavagem com jato de água destilada em um conjunto filtrante composto por 5 peneiras com aberturas de malha de 1,0, 0,7, 0,5, 0,2 e 0,1 mm, por volta de 1 minuto. As partículas retidas na peneira com 0,1mm de abertura de malha foram transferidas para tubos de centrifuga e suspensas em 50 mL de água destilada, agitadas e postas para decantar. Finda a decantação, o sobrenadante dos tubos foi descartado e o material particulado re-suspenso com 25 mL de água destilada autoclavada, agitado em *vortex* por 1 minuto e posto novamente para decantar. A lavagem das partículas foi repetida mais 2 vezes e o material residual em cada tubo assepticamente transferido para papel de filtro estéril e posto para secar em câmara de fluxo laminar.

Ao final da secagem, pequenas porções de material particulado referente a cada amostra foram transferidas em triplicata para placas de Petri de poliestireno de 90 mm de diâmetro contendo o meio seletivo CYCL (*Malt Cyclosporine*) e espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalsky. Em cada coleta foram utilizadas 120 placas de Petri referentes a 10 amostras, 4 tipos de tecido por amostra e 3 placas por tipo de tecido.

As placas de Petri foram incubadas em câmara de crescimento (BOD) a 22°C com fotoperíodo de 12 horas. O crescimento das colônias de fungos endófitos a partir das partículas foi verificado diariamente durante 20 dias e todo micélio identificado foi transferido assepticamente para placas de Petri de poliestireno de 30 mm de diâmetro contendo o meio MYE (*Malt Yeast Extract*), para verificação da pureza e identificação. Após o isolamento da placa mãe, o ponto de onde cada micélio foi retirado foi marcado com caneta no verso da placa para impedir o re-isolamento dos fungos. Este procedimento de isolamento

foi modificado na segunda coleta, pois o número muito grande de unidades formadoras de colônia obtidas das amostras de CP e CT impossibilitou o isolamento de todos os micélios. Assim, os micélios foram agrupados de acordo com suas características morfológicas macroscópicas e representantes de cada grupo foram isolados. O meio de cultura MYE também foi substituído pelo MA que se mostrou mais eficiente para crescimento e esporulação, principalmente de celomicetos.

Nas duas coletas, amostras de folhas das duas plantas foram processadas de acordo com o método tradicional para isolamento de endófitos com o objetivo de se verificar a influência do método de isolamento sobre a composição de espécies. Para tal, as folhas foram lavadas e desinfestadas como descrito acima. Discos foliares de 2mm de diâmetro foram retirados com auxílio de um fino tubo de metal esterilizado em chama e transferidos em número de 5 por placa para placas de poliestireno de 90 mm contendo o meio CYCL. Os resultados não mostraram diferenças na composição das espécies de fungos isolados com maior frequência pelos dois métodos e, portanto, esta segunda metodologia de isolamento não será mais discutida neste trabalho.

### **3.5 Identificação e preservação dos isolados**

Após o crescimento, os isolados foram verificados quanto a sua pureza e separados em grupos de acordo com suas características culturais e morfológicas. A identificação dos fungos foi realizada através da avaliação do crescimento em cultura axênica e de caracteres morfológicos de suas estruturas reprodutivas, com o auxílio de manuais de identificação e literatura especializada (Arx, 1981; Barnett & Hunter, 1987; Domsch et al., 1980; Ellis, 1971, 1976; Gams, 1997; Hanlin, 1990, 1998; Nag Raj, 1993; Sutton, 1980). Os micélios estéreis foram transferidos para os meios de cultura V8 ou OA acrescidos ou não de fragmentos autoclavados de folhas de sua planta

hospedeira, na tentativa de induzir a esporulação. Aqueles isolados que mesmo assim não apresentaram esporulação foram sortidos em morfotipos de acordo com suas características culturais em meio de cultura definido (Bills & Polishook 1994a; Guo et al., 2000, 2001).

Para a preservação dos isolados, representantes de todas as espécies recuperadas no estudo foram depositados na coleção de culturas da Coleção Micológica de Lavras. Já a preservação em massa e em longo prazo dos fungos foi realizada pelo método Castellani, com a transferência de pequenos discos de micélio e Agar de culturas puras para água destilada esterilizada e seu armazenamento em tubos de vidro lacrados, mantidos a temperatura ambiente (Castellani, 1967).

### **3.6 Meios de cultura**

**CYCL** (*Malt Cyclosporin* - meio para recuperação de fungos endófitos do material vegetal) Para 1 L de meio, são adicionados 10 g de extrato de malte, 2 g de extrato de levedura e 20 g de Agar, completando o volume com água destilada. Após o meio ter sido autoclavado, são a ele adicionados 50 mg de Sulfato de Estreptomicina e 10 mg de Ciclosporina A (Sigmosporin Microoral 100 mg/mL, Novaquímica - Sigma Pharma).

**MYE** (*Malt Yeast Extract* - meio para isolamento dos fungos após a recuperação do material vegetal) - Composição idêntica àquela do meio CYCL, porém sem adição de antibióticos (Bills & Polishook, 1994 a).

**MA** ou **MEA** (*Malt Extract Agar* - meio para purificação e identificação dos fungos usado em substituição ao MYE na segunda coleta). Para 1 L de meio, são adicionados 20 g de extrato de malte e 20 g de Agar, completando o volume com água destilada (Gams et al., 1998).



V8 (*V8 Juice* - meio empregado para indução de esporulação dos fungos). Para 1 L de meio, são adicionados 120 mL de V8 Juice e 20 g de Agar, completando o volume com água destilada (Gams et al., 1998).

OA (*Oatmeal Agar* - meio empregado para indução de esporulação dos fungos). Para 1 L de meio, são adicionados 20g de farelo de aveia e 20 g de Agar, completando o volume com água destilada (Gams et al., 1998).

### 3.7 Análise dos dados

Planilhas foram montadas relacionando a composição de espécies e as frequências de isolamento de fungos endófitos em cada amostra. A comparação da riqueza de espécies de fungos em amostras com diferentes tamanhos foi realizada através da construção de curvas de rarefação (Bills & Polishook, 1994a; Heck Junior et al., 1975). Para a construção de cada curva é calculado o número esperado de espécies a ser obtido em amostras aleatórias de  $n$  isolados retirados de amostras com  $N$  isolados através da fórmula:

$$E(s) = \sum_i \left\{ 1 - \left[ \frac{(N - ni / n)}{(N / n)} \right] \right\},$$

Onde  $ni$  refere-se ao número de isolados da espécie  $i$ . A abrangência e eficiência da amostragem também foram avaliadas através das curvas de rarefação onde o aspecto geral de cada curva, demonstrando ou não a tendência de formar uma assíntota com o eixo X, dá boas indicações se a amostragem utilizada foi suficientemente representativa da comunidade de fungos associadas àquela amostra. A abundância relativa das espécies foi comparada entre os quatro tipos de tecidos vegetais amostrados através da construção de um gráfico de distribuição de frequências de ocorrência, onde as espécies de fungos são sortidas em ordem decrescente de sua relativa abundância em cada amostra (Bills & Polishook, 1994a). O índice de diversidade de Shannon foi calculado para cada um dos tecidos amostrados e os valores comparados, dois a dois, através do teste  $t$  (Zar, 1984; Magurran, 1988).

O número de fungos isolados em cada época de coleta foi usado para a avaliação da influência dos fatores climáticos temperatura e umidade sobre as frequências de isolamento em cada um dos quatro tipos de tecido analisados. Para tal análise foi empregado o teste não paramétrico de análise de variância Kruskal-Wallis (Petrini & Carroll, 1981; Sokal & Rolf, 1995).

Para análise geral da comunidade de fungos endófitos associados às duas hospedeiras foi empregada a análise estatística multivariada de ordenação DCA - *Detrended Correspondence analysis* (Análise de Correspondência Retificada), análise similar a mais conhecida análise de correspondência, porém com algumas correções para evitar desvios na apresentação gráfica dos dados originados exclusivamente do modelo matemático (Gauch Junior, 1982; Kent & Coker, 1992). Os padrões de colonização por fungos endófitos dos quatro tipos e tecidos estudados nas duas épocas de coleta também foram analisados pelo método de estatística multivariada de classificação hierárquica com utilização do algoritmo *Single Linkage* e cálculo das distâncias entre as amostras pelo método Bray-Curtis (Hammer & Harper, 2004).

Para tais análises, foram escolhidas as espécies de fungos que contribuíram com no mínimo 1% do total de isolados. Algumas amostras que apresentaram números muito baixos de fungos isolados, dentre as quais todas amostras de CT da primeira coleta, foram excluídas da análise. Esta eliminação de amostras fora do padrão (*outliers*) apesar de não ser ideal, é uma forma de diminuir o ruído muitas vezes presente em dados originados de amostras de campo (Gauch Junior, 1982).

A verificação dos padrões de colonização por alguns fungos endófitos mais abundantes nos diferentes tecidos e plantas hospedeiras amostrados foi realizada com auxílio do método gráfico *box plot* (Fisher & Petrini 1987; Fröhlich et al., 2000). Neste método os dados originais de frequência de isolamento de cada espécie de endófito em cada um dos 4 tipos de tecidos

amostrados são dispostos graficamente em caixas cujos limites superior e inferior contém 75% da variância amostral e a posição mediana da distribuição de frequência da espécie em cada amostra é indicada por um traço no interior da caixa. Tal análise também foi realizada apenas com as espécies de fungos que contribuíram com no mínimo 1% do total de isolados. A verificação de padrões de colonização por espécies raras além de difícil pode levar a erros de interpretação já que a presença ou não de uma espécie rara em algumas amostras pode indicar um padrão de ocorrência ou simples acaso.

As análises foram realizadas com o auxílio dos programas PC-ORD 3.12. (MC Cune & Mefford, 1997), PAST 1.26 (Hammer & Harper, 2004), Biodiversity Pro 2 (Mc Aleece, 1997) e Minitab 14 (Minitab, 2003).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Metodologia de processamento das amostras

Ao contrário de grande maioria dos trabalhos até hoje publicados com fungos endófitos, a metodologia de isolamento de fungos a partir de fragmentos vegetais com alguns milímetros de extensão foi trocada por uma adaptação da metodologia de trituração e filtração de partículas. Esta última, inicialmente desenvolvida para o isolamento de fungos de solo, apresenta como vantagens a eliminação do excesso de esporos e células bacterianas da amostra durante a lavagem e filtração, além do aumento da superfície específica do material vegetal, o que facilita a recuperação de um maior número de isolados por unidade de área e aumenta a chance de recuperação de espécies menos abundantes (Bååth, 1988; Bills & Polishook, 1994a,b; Paulus et al., 2003; Petrini et al., 1990).

Um total de 1678 unidades formadoras de colônia pertencentes a 128 espécies e morfotipos distintos foram detectados durante o estudo. Este é um número alto de fungos endófitos isolados a partir de apenas alguns gramas de material vegetal e em apenas duas épocas de coleta. Fröhlich et al. (2000) isolaram 2237 fungos pertencentes a 135 espécies e morfotipos distintos de um total de 1830 fragmentos de 5mm de extensão de pecíolo e lâmina foliar de palmeiras do gênero *Licuala*, em um estudo realizado em quatro coletas durante um período de 3 anos. É visível a discrepância entre quantidade de material vegetal empregado por estes autores em comparação com os poucos gramas utilizados no presente trabalho, para a obtenção de quantidades semelhantes de isolados e número de espécies em duas coletas. Os resultados aqui obtidos evidenciam que a trituração e homogeneização das partículas foram eficientes em gerarem reduzidas amostras de material particulado representativas do total

de folhas e caules inicialmente amostrados, por volta de 600g. Tal constatação indica a eficácia da metodologia de filtração de partículas tanto na recuperação de uma enorme quantidade de isolados como na abrangência da amostragem. Além do aumento da superfície específica do material vegetal conseguido com a trituração, a recuperação de muitas espécies raras e de crescimento lento foi possível, em grande parte, devido ao uso da ciclosporina como controlador de crescimento. A grande maioria dos fungos apresentou crescimento lento e restrito no meio CYCL, permitindo a correta identificação e isolamento dos morfotipos na maioria dos casos. A inclusão de controladores de crescimento talvez possa introduzir fatores de seleção que mascarem a presença ou relativa abundância de algumas espécies nas amostras. Porém, é geralmente assumido que ciclosporina retarda o crescimento micelial sem causar a morte dos fungos (Bills, 1996).

O grande número de isolados e espécies obtidos é semelhante ao relatado em outros estudos, onde a metodologia de trituração e filtração de partículas foi utilizada para o isolamento de fungos a partir de material vegetal. A fragmentação do material vegetal permitiu que Bills e Polishook recuperassem 1709 isolados pertencentes a 177 morfo-espécies e 3337 isolados pertencentes a 275 morfo-espécies de amostras de 20 g de liteira coletadas em florestas da Costa Rica e Porto Rico, respectivamente (1994a; Polishook et al., 1996). O mesmo procedimento foi usado por estes autores para o estudo dos fungos associados a quatro folhas senescentes de *Heliconia mariae*, das quais foram recuperados 1676 isolados pertencentes a 122 morfo-espécies (Bills & Polishook, 1994 b). O fato de que tais números recordes de isolamento tenham sido obtidos a partir de material vegetal senescente ou em decomposição levou Carroll (1995) a considerar que o emprego da filtração de partículas para o isolamento de fungos endófitos não resultaria em um número de espécies similar ou superior ao encontrado em amostras de liteira, já que a colonização dos

tecidos internos dos vegetais é mais restrita. Porém, os resultados aqui obtidos evidenciam que os tecidos vegetais sadios são capazes de abrigar uma diversidade de fungos comparável àquela presente em material vegetal em decomposição e que a diminuição do tamanho dos fragmentos vegetais é uma aproximação interessante para uma melhor amostragem da real diversidade de fungos endófitos, como corroborado anteriormente por Gamboa e colaboradores (Gamboa & Bayman, 2001; Gamboa et al., 2002).

#### **4.2 Biodiversidade de fungos endófitos associados a *P. perrottettii* e *T. guianensis***

Do total de 128 morfo-espécies isoladas foram identificadas 107 espécies e 21 morfotipos estéreis distintos. Em uma avaliação apenas da presença ou ausência das espécies de fungos nas amostras das duas plantas hospedeiras, verifica-se que há uma sobreposição de 51% na composição das duas comunidades de endófitos; com 43 e 34 espécies exclusivamente associadas a *P. perrottettii* e *T. guianensis*, respectivamente. Petrini et al. (1992) citaram resultados não publicados obtidos por I. H. Chapela em um estudo comparativo dos fungos endófitos associados a ervas-de-passarinho da espécie *Viscum album* que parasitavam plantas de abeto (*Abies alba*). Neste estudo foi verificada a ocorrência de menos de 15% de sobreposição das comunidades de endófitos associadas às duas plantas. Estes resultados indicam que as comunidades de endófitos associadas a *P. perrottettii* e *T. guianensis* são bem mais semelhantes entre si do que aquelas associadas a *Viscum album* e *Abies alba*. No entanto, a falta de mais informações a respeito do estudo conduzido por Chapela não permite que outras comparações sejam feitas.

A comparação das comunidades de endófitos entre duas ou mais espécies de plantas hospedeiras baseada apenas na presença ou ausência das espécies de fungos apresenta falhas, pois a maioria das espécies é de rara

ocorrência e sua presença em uma ou outra amostra pode ser simples questão de acaso. Um aspecto importante da comparação é a relativa frequência de isolamento das espécies fúngicas, ou recorrência, em cada hospedeiro, já que muitas vezes os padrões de colonização preferencial são bem mais comuns do que a exclusividade de ocorrência ou especificidade entre endófitos e hospedeiros (Lodge, 1997; Zhou & Hyde, 2001). A recorrência em hospedeiros, tecidos e épocas de amostragem pelos fungos endófitos recuperados em maior frequência neste trabalho é analisada no item 4.5 desta discussão.

Amostras de FP originaram o menor número de isolados, porém o maior número de espécies, como observado na Tabela 1.

TABELA 1 Totais de isolados e morfo-espécies de fungos endófitos recuperados de *P. perrottettii* e *T. guianensis*.

Amostras*	Totais morfo-espécies		Totais espécies		Totais morfotipos	
	isolados	espécies	isolados	espécies	isolados	espécies
FP	266	72	210	56	56	16
CP	458	55	407	46	51	9
<b>Phor.</b>	<b>724</b>	<b>94</b>	<b>616</b>	<b>77</b>	<b>107</b>	<b>17</b>
FT	375	46	352	38	23	8
CT	579	57	537	48	42	9
<b>Tap.</b>	<b>954</b>	<b>85</b>	<b>889</b>	<b>72</b>	<b>65</b>	<b>13</b>
<b>Total</b>	<b>1678</b>	<b>128</b>	<b>1505</b>	<b>107</b>	<b>172</b>	<b>21</b>

\* FP, CP - folhas e caules de *P. perrottettii*; FT e CT - folhas e caules de *T. guianensis*; Phor. - *Phoradendron perrottettii*; Tap. - *Tapirira guianensis*.

O número de isolados obtidos das amostras de FP - 266 - foi bem menor do que nos outros tecidos amostrados, como visto na Tabela 1, mesmo que tal diferença só possua significância estatística na comparação entre FP e CT ( $P = 0,000$ , pelo teste de Kruskal-Wallis). Como uma quantidade padronizada de 5g de tecido foliar foi utilizada para as amostras das duas plantas em estudo, esta menor taxa de recuperação de fungos a partir de FP indica uma menor densidade de colonização dos tecidos foliares de *P. perrottetii* por parte dos fungos endófitos. Talvez haja uma restrição à colonização extensiva dos tecidos foliares de *P. perrottetii* por fungos endófitos devido, em parte, à complexa composição química das folhas desta planta. Além de peptídeos de baixo peso molecular e comprovada ação tóxica como phoratoxinas e viscotoxinas; alcalóides com propriedades bioativas como ácido morânico já foram isolados de folhas de plantas do gênero *Phoradendron* (Johansson et al., 2003). A questão a respeito do caule de *P. perrottetii*, se este tecido é também produtor e acumulador de metabólitos secundários fica em aberto. A maior produção de compostos secundários pelas folhas é bem justificável já que estas são as unidades fotossintéticas primárias das plantas, são bem mais tenras do que os tecidos caulinares e muito mais susceptíveis ao ataque por fungos. Outro aspecto importante a ser observado é que os tecidos caulinares possuem uma casca normalmente inerte e bastante propensa à colonização por bactérias, algas e fungos saprófitos em geral; logo, uma maior colonização dos tecidos internos da casca por fungos endófitos é bastante plausível.

Pela análise da Tabela 1 é observado que a proporção do número de espécies em relação ao total de fungos isolados é bem maior em FP do que nos outros tipos de tecido amostrados. Tal constatação dá indicações de que este tecido é o que abriga a maior diversidade taxonômica de fungos endófitos. Uma melhor comparação da riqueza de espécies obtida nas diferentes amostras é feita pela análise das curvas de rarefação, mostradas na Figura 2. A curva de



acumulação de espécies segue um padrão semelhante para as amostras de CP, FT e CT mesmo que em escalas um pouco diferentes. Por outro lado, a curva de FP afasta-se bastante de uma assintota e parece estar longe de chegar a uma saturação do número possível de espécies. Este fato é indicativo também de que as folhas de *P. perrottetii* foram sub-amostradas e que futuras coletas e isolamentos poderiam resultar em um incremento significativo de novas taxa.

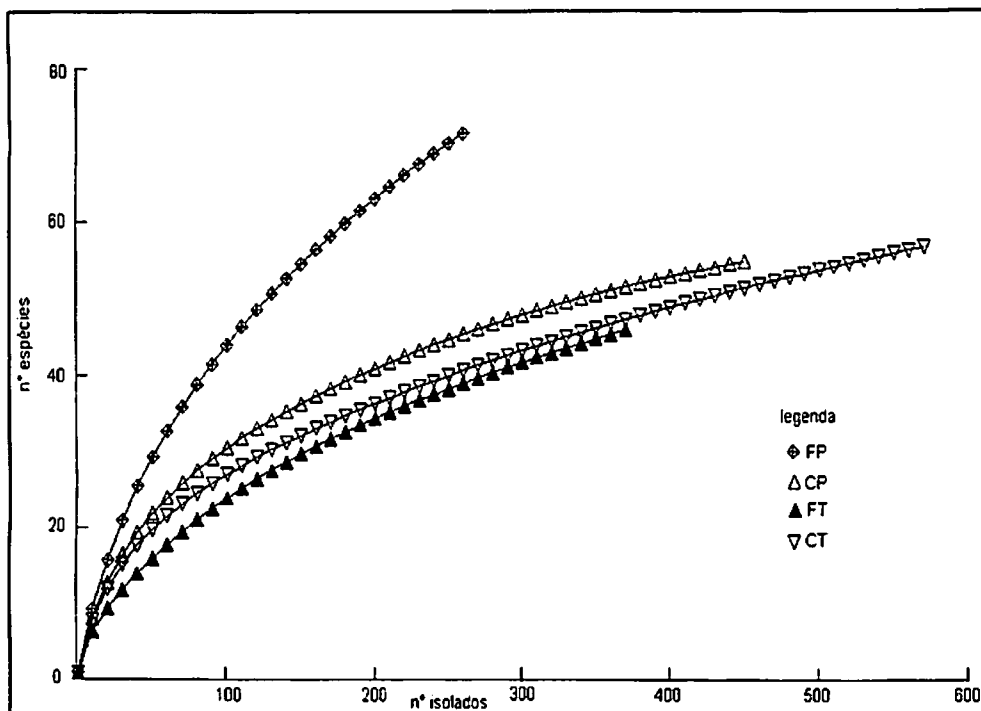


FIGURA 2 - Curvas de rarefação para os quatro tipos de tecidos amostrados.

FP, CP - folhas e caules de *P. perrottetii*; FT e CT - folhas e caules de *T. guianensis*.

A equabilidade de distribuição das espécies foi pequena, a exemplo do que normalmente ocorre em estudos com fungos endófitos, com um pequeno número de espécies dominantes e um elevado número de espécies representadas poucos isolados. A baixa equabilidade na distribuição das espécies é um fenômeno comum a vários sistemas biológicos e não uma exclusividade da interação endófito - planta hospedeira (Fröhlich et al., 2000; Magurran, 1988). A Figura 3 traz a distribuição de abundância de espécies nos quatro tipos de tecidos. A dominância de espécies foi bem menos acentuada para as amostras de folha de *P. perrottettii*, com uma maior proporção de espécies de ocorrência moderada e uma diferença bem menos marcante entre a abundância das espécies mais freqüentes e aquela das espécies com freqüência intermediária de isolamento. A menor densidade de colonização nas amostras de FP contrasta com a maior riqueza e melhor distribuição de abundância das espécies isoladas deste tipo de tecido. Estes padrões são característicos de habitats menos ricos e mais estáveis onde não há dominância muito marcante de algumas espécies colonizadoras (Huston, 1993). Assim, talvez a maior limitação ao crescimento micelial imposta pelos tecidos foliares de *P. perrottettii* favoreça uma colonização menos específica e efêmera por um maior número de espécies, o que caracterizaria as folhas de *P. perrottettii* como um nicho pouco favorável à colonização por fungos endófitos e menos sujeito à dominância por algumas espécies colonizadoras.

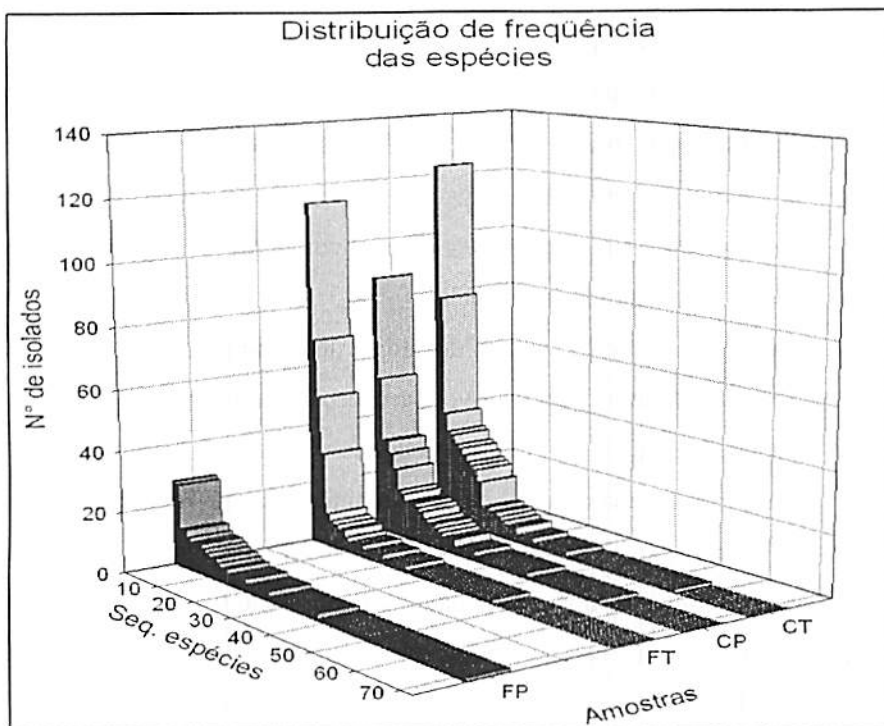


FIGURA 3 Distribuição de frequência de isolamento das espécies de fungos endófitos nos quatro tecidos amostrados.  
FP, CP - folhas e caules de *P. perrottettii*; FT e CT - folhas e caules de *T. guianensis*.

A definição de diversidade em uma determinada comunidade natural está baseada em dois parâmetros, a riqueza ou número de espécies presentes e a equabilidade de ocorrência das espécies. A comparação entre a diversidade ecológica de dois ou mais habitats pode ser feita com auxílio dos índices de diversidade os quais tentam, através de um valor numérico, resumir as informações sobre a diversidade de um determinado habitat (Magurran, 1988). O Índice de Shannon ( $H'$ ) é um índice muito utilizado para o cálculo da diversidade em estudos ecológicos diversos. Seu cálculo leva em conta tanto a

riqueza de espécies como a equabilidade de distribuição das espécies, sendo, portanto, um índice ideal para os dados de frequência de isolamento dos endófitos obtidos no presente estudo. Os valores  $H'$  para cada amostra podem ser comparados pelo teste estatístico t, o que dá um suporte para as comparações entre as diversidades (Magurran, 1988; Zar, 1984). Os valores do Índice de Shannon calculados para cada tipo de tecido e as comparações entre os tecidos feitas duas a duas são mostrados na Tabela 2

A comparação entre os valores do Índice de Shannon através do teste t originou resultados bastante significativos, a exceção da comparação entre as amostras de caule das duas plantas hospedeiras. Os dados apresentados na Tabela 2 dão suporte à idéia original de que a comunidade de fungos associada às folhas de *P. perrottetii* possui a maior diversidade ecológica. De maneira oposta FT apresentou a menor diversidade. CP apresentou o segundo maior valor de  $H'$ , o qual foi ligeira, porém significativamente superior ao calculado para CT ( $P < 0, 05$ , pelo teste t). A estrutura da comunidade de endófitos associada aos tecidos de caule parece ser bem mais homogênea, como evidenciado pelos valores semelhantes de diversidade apresentados por CP e CT.

TABELA 2 Índices de Shannon ( $H'$ ) e sua comparação pelo teste t entre os quatro tipos de tecidos estudados.

Amostras <sup>o</sup>	$H'$	Comparações	t calculado
FP	1,60535124	$H' FP \times H' CP$	6,287873364***
CP	1,36798011	$H' FP \times H' FT$	11,68725232***
FT	1,092577838	$H' FP \times H' CT$	8,299458326***
CT	1,301607056	$H' CP \times H' FT$	6,662621295***
-	-	$H' CP \times H' CT$	1,980573596 *
-	-	$H' FT \times H' CT$	5,188687787***

<sup>o</sup> FP, CP - folhas e caules de *P. perrottetii*; FT e CT - folhas e caules de *T. guianensis*.

\* Significativo a 5%. \*\*\* Significativo a 0,1%.

### **4.3 Influência da época de coleta sobre a quantidade de fungos endófitos recuperados**

A umidade é fator crucial na definição das taxas de colonização dos tecidos vegetais por fungos endófitos (Suryanarayanan et al., 2002). Na região sul do estado de Minas Gerais, o clima é bem sazonal e a época de menor precipitação pluviométrica coincide com o período de inverno. Para a avaliação dos efeitos das flutuações climáticas sobre o número de fungos e espécies recuperados como endófitos das duas plantas em estudo, duas coletas foram realizadas em estações distintas do ano. A primeira coleta, realizada entre a segunda quinzena de agosto e a primeira quinzena de setembro de 2004, coincidiu com final da estação de inverno. Já a segunda coleta foi realizada em pleno verão, nos dias 12 e 13 de janeiro de 2005, não sendo esta adiada para o final da estação devido à limitação de tempo para execução do estudo.

O número de isolados obtidos como endófitos das amostras de CP, FT e CT foi significativamente maior na segunda coleta, como observado na Tabela 3. A maior recuperação de fungos endófitos na época chuvosa é comum e deve estar relacionada a melhores condições para esporulação, dispersão e germinação de esporos e colonização do tecido hospedeiro oferecidas pela maior umidade (Carroll, 1988, 1995; Suryanarayanan et al., 2002). Adaptações dos tecidos vegetais à época seca, através da produção de substâncias como taninos também podem restringir a sua colonização por endófitos (Rodrigues, 1994).

Por outro lado, a frequência de isolamento de fungos endófitos de FP não variou nas duas épocas, sendo até um pouco superior na primeira coleta. Talvez esta semelhança entre os números de fungos isolados nas duas épocas se deva a uma menor e constante densidade de colonização dos tecidos foliares de *P. perrottettii*, como hipotetizado anteriormente. Como já ressaltado no item 5.4 dos materiais e métodos, o pequeno número de fungos recuperados das amostras de CT na primeira coleta tem como causa um erro metodológico.

TABELA 3 Diferenças entre o número de fungos endófitos isolados nas duas coletas

Amostras*	Nº isolados	Índice Kruskal-Wallis	Valor- p**
FPA	138		
FPB	128	0,06	0,806
FTA	112		
FTB	263	5,62	0,018
CPA	110		
CPB	348	8,45	0,004
CTA	42		
CTB	537	9,44	0,002

\* FP, CP - folhas e caules de *P. perrottettii*; FT e CT - folhas e caules de *T. guianensis*; A - amostras da primeira coleta; B - amostras da segunda coleta.

\*\* Probabilidade de erro ao se rejeitar a hipótese de que o número de isolados recuperados é semelhante nas duas épocas de coleta.

#### 4.4 Composição de espécies de fungos endófitos associados a *P. perrottettii* e *T. guianensis*.

Todas as morfo-espécies identificadas e suas respectivas frequências de isolamento nos diferentes tecidos amostrados são mostradas na Tabela 4. Pela inspeção da Tabela 4 se percebe que na verdade existem mais do que 128 morfo-espécies, já que a distinção e identificação das espécies pertencentes aos gêneros cosmopolitas *Cladosporium* e *Penicillium* não foram realizadas. A justificativa para tal procedimento é que estes são gêneros muito comuns, isolados em grande quantidade de amostras de solo, ar, água e matéria orgânica, e muitas vezes a sua distinção como endófitos ou epífitos sobreviventes ao processo de desinfestação não é possível (Petrini, 1992). Como a frequência de isolamento de fungos do gênero *Cladosporium* foi bem maior, uma amostra de 17 isolados obtidos dos quatro tecidos estudados foi submetida ao processo de identificação, sendo

identificadas apenas duas espécies, *Cladosporium cladosporioides*, representada por 14 isolados e mais 3 isolados pertencentes a *Cladosporium sphaerospermum*, duas espécies de fungos saprófitos, muito semelhantes entre si e extremamente comuns (Ellis, 1971).

Também não foram diferenciadas as espécies dentro do gênero *Pestalotiopsis*, sendo todos os isolados do gênero designados ao epíteto *Pestalotiopsis* spp. Fungos do gênero *Pestalotiopsis* são saprófitos, sendo também comumente encontrados como endófitos (Strobel, 2002). A identificação das espécies é normalmente realizada de acordo com o hospedeiro onde são encontradas, muitas vezes não baseada em uma análise morfológica criteriosa, levando ao fato que uma mesma espécie, comum a vários hospedeiros, receba nomes distintos (Jeewon et al., 2003).

Para verificação da existência de mais de uma espécie de *Pestalotiopsis* dentre os isolados pertencentes a este gênero uma amostra de 20 isolados recuperados dos 4 tipos de tecido amostrados e que haviam sido preservados em coleção de culturas foi submetida à caracterização morfológica. Os critérios utilizados foram taxa de crescimento das colônias em meio OA, comprimento e largura dos conídios, número de septos, tamanho das células medianas, presença de células medianas concoloridas ou versicoloridas, medição e contagem dos apêndices e posição dos apêndices apicais (Nag Raj, 1993). Foram feitas 20 medições microscópicas para cada isolado analisado, sendo todos dados obtidos posteriormente organizados em matrizes e submetidos à análise estatística multivariada de Correspondência para uma melhor distinção dos morfotipos (Sieber et al., 1998). Os resultados obtidos permitiram a identificação da espécie *Pestalotiopsis palustris* e mais dois morfotipos distintos. Infelizmente os 3 tipos diferenciados não mostraram padrões de ocorrência ou especificidade em relação às plantas hospedeiras, o que impediu a inferência sobre a identidade dos demais isolados de *Pestalotiopsis* não submetidos ao procedimento de caracterização.

TABELA 4 Relação das morfo-espécies de fungos endófitos recuperados de *P. perrottettii* e *T. guianensis* e suas respectivas freqüências de isolamento.

Espécies	Códigos*	Amostras**				Total
		FP	CP	FT	CT	
<i>Phomopsis</i> sp.1	Phom_sp1	13	13	50	78	154
<i>Phaeostagonospora</i> sp. cf. <i>Mycosphaerella</i>	Pheo Myco?	4 9	8 0	0 114	123 1	135 124
<i>Paraconiothyrium</i> sp.	Parac	13	87	0	23	123
<i>Cladosporium</i> spp.	Clad	28	32	31	31	122
<i>Verticillium psalliotae</i> Treschow	Vert_psa	4	7	69	32	112
<i>Coniothyrium sporulosum</i> (Gams & Domsch) van der Aa	Con_spo	27	53	0	25	105
<i>Acronium bacillisporum</i> (Onions & GL Barron) Gams	Acr_bac	10	32	3	38	83
<i>Pestalotiopsis</i> spp. micélio cinza 3	Pest mcin_alg	10 11	16 23	5 0	17 9	48 43
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc.	Fus_ave	1	28	0	9	38
<i>Phomopsis</i> sp.2 micélio marrom 1	Phom_sp2 m_mar1	0 6	3 5	7 1	28 21	38 33
<i>Phomopsis</i> sp.4	Phom_sp4	0	0	4	27	31
<i>Microsphaeropsis olivacea</i> (Bonord.) Höhn.	Mic_oli	3	15	2	5	25
<i>Penicillium</i> spp.	Pen	8	5	9	3	25
<i>Phomopsis</i> sp.5	Phom_sp5	4	13	0	7	24
<i>Phomopsis</i> sp.3	Phom_sp3	0	0	0	22	22
<i>Aposphaeria</i> sp.	Apo	4	12	0	0	16
<i>Coniothyrium minitans</i> Campbell micélio branco 1	Con_min m_br1	2 4	13 8	0 0	1 3	16 15
micélio preto	m_pre	3	6	4	2	15
<i>Geotrichum</i> sp.	Geo	10	2	2	0	14
<i>Haematonectria ipomoeae</i> (Halst.) Samuels & Nirenberg	-	0	11	2	0	13
micélio cinza 1	-	5	3	3	1	12
micélio cinza 2	-	7	3	0	2	12
<i>Phomopsis</i> sp.6	-	7	2	0	3	12
<i>Sporothrix</i> sp.1	-	1	0	3	8	12
<i>Bipolaris</i> sp.	-	0	0	11	0	11
<i>Tubercularia</i> sp. micélio cinza 4	- -	1 0	9 0	0 8	1 2	11 10

Continua...



TABELA 3 cont.

Espécies	Códigos*	Amostras**				Total
		FP	CP	FT	CT	
<i>Guignardia mangiferae</i> Roy	-	2	0	7	0	9
<i>Phoma glomerata</i> (Corda)						
Wollenweber & Hochapfel	-	0	2	0	6	8
<i>Phoma</i> sp.1	-	0	0	0	8	8
hifomiceto branco 1	-	2	2	0	2	6
<i>Acremonium</i> sp.1	-	0	3	0	2	5
<i>Alternaria</i> sp.	-	2	0	3	0	5
<i>Clonostachys solani</i> (Harting)						
Schroers & Gams	-	0	1	4	0	5
<i>Leptosphaeria</i> sp.2	-	3	1	1	0	5
micélio bege 1	-	3	1	0	1	5
micélio marrom 2	-	5	0	0	0	5
micélio verde 2	-	1	0	4	0	5
<i>Phialocephala</i> sp.	-	0	0	0	5	5
<i>Phoma</i> sec <i>paraphoma</i>	-	0	5	0	0	5
<i>Sporothrix</i> sp.2	-	0	0	0	5	5
cf. <i>Epicocum</i>	-	2	2	0	0	4
micélio branco 2	-	3	1	0	0	4
<i>Microsphaeropsis arundinis</i> (Ahmad)						
Sutton	-	0	2	1	1	4
<i>Periconia</i> cf. <i>glyceriicola</i> Mason & Ellis	-	1	0	3	0	4
<i>Phomopsis</i> sp.7	-	3	0	1	0	4
<i>Pithomyces chartarum</i> (Berk. & Curtis) Ellis	-	2	0	0	2	4
<i>Acremonium</i> sp.2	-	0	1	1	1	3
<i>Diaporthe</i> sp.	-	0	2	0	1	3
<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman)						
Spaulding & v. Schrenk	-	1	1	0	1	3
<i>Microsphaeropsis</i> sp.1	-	1	2	0	0	3
<i>Microsphaeropsis</i> sp.3	-	0	0	0	3	3
<i>Monochaetinula sterculiae</i> Nag Raj	-	2	0	0	1	3
<i>Phoma</i> sec <i>pilosa</i>	-	0	3	0	0	3
<i>Ramichloridium subulatum</i> de Hoog	-	0	1	2	0	3
<i>Torula herbarum</i> f. <i>quartenella</i> Sacc.	-	1	1	0	1	3
<i>Trichoderma</i> sp.	-	0	2	0	1	3
<i>Aphanocladium</i> sp.	-	2	0	0	0	2
<i>Arthrinium phaeospermum</i> (Corda)						
Ellis	-	1	0	1	0	2

Continua...

TABELA 3 cont.

Espécies	Códigos*	Amostras**				Total
		FP	CP	FT	CT	
<i>Aschochyta</i> sp.	-	0	0	0	2	2
<i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin	-	0	0	2	0	2
<i>Coleophoma</i> cf. <i>crateriformis</i> (Durieu & Mont.) Höhn.	-	2	0	0	0	2
<i>Didymosphaeria</i> sp.	-	1	1	0	0	2
<i>Epicocum nigrum</i> Link	-	2	0	0	0	2
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc. hifomiceto laranja	-	0	2	0	0	2
micélio bege 3	-	1	0	0	1	2
micélio branco 7	-	2	0	0	0	2
micélio verde 1	-	0	1	1	0	2
<i>Monochaetina terminaliae</i> (Bat. & Bezerra) Muthumary, Abbas & Sutton	-	2	0	0	0	2
<i>Myrothecium verrucaria</i> (Alb. & Schwein.) Ditmar	-	0	2	0	0	2
<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) E.W. Mason	-	0	0	1	1	2
<i>Periconia byssoides</i> Pers.	-	1	0	1	0	2
<i>Phialophora</i> sp.2	-	0	0	0	2	2
cf. <i>Phialophora</i>	-	0	0	2	0	2
<i>Phoma leonuri</i> Letendre	-	0	2	0	0	2
<i>Phoma chrysanthemicola</i> Hollós	-	0	2	0	0	2
<i>Phoma</i> sp.6	-	1	0	0	1	2
Xylariaceae sp.1	-	0	1	0	1	2
<i>Acremonium alternatum</i> Link	-	1	0	0	0	1
<i>Acremonium</i> sp.3	-	0	0	1	0	1
cf. <i>Acremonium</i>	-	0	0	0	1	1
<i>Acremonium potronii</i> Vuillemin	-	0	1	0	0	1
<i>Acremonium strictum</i> Gams	-	0	0	1	0	1
<i>Amorphotheca</i> c.f. <i>resinae</i> Parbery	-	0	0	1	0	1
<i>Aspergillus</i> sp.	-	0	0	1	0	1
Celomiceto sp.1	-	0	0	0	1	1
Celomiceto sp.2	-	0	0	0	1	1
<i>Curvularia pallescens</i> Boedijn	-	0	1	0	0	1
<i>Didymella abieticola</i> Vain.	-	1	0	0	0	1
<i>Didymella</i> sp.1	-	1	0	0	0	1

Continua...

TABELA 3 cont.

Espécies	Códigos*	Amostras**				Total
		FP	CP	FT	CT	
<i>Eupenicillium</i> sp.	-	1	0	0	0	1
<i>Fusarium subglutinans</i> (Wollenw. & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas	-	1	0	0	0	1
hifomiceto branco 3	-	1	0	0	0	1
hifomiceto branco 2	-	0	0	1	0	1
<i>Leptosphaeria</i> sp.1	-	1	0	0	0	1
micélio amarelo	-	1	0	0	0	1
micélio bege 2	-	1	0	0	0	1
micélio branco 3	-	0	0	0	1	1
micélio branco 4	-	0	0	1	0	1
micélio branco 5	-	0	0	1	0	1
micélio branco 6	-	1	0	0	0	1
micélio marrom 3	-	1	0	0	0	1
<i>Microsphaeropsis sarcinellae</i> (Sahni) Morgan-Jones	-	0	0	0	1	1
<i>Microsphaeropsis</i> sp.2	-	1	0	0	0	1
<i>Monodictys castaneae</i> (Wallr.) Hughes	-	1	0	0	0	1
<i>Nodulisporum</i> sp.	-	1	0	0	0	1
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	-	1	0	0	0	1
<i>Periconia minutissima</i> Corda	-	1	0	0	0	1
<i>Phialophora</i> sp.1	-	0	1	0	0	1
<i>Phoma exigua</i> Desm.	-	0	1	0	0	1
<i>Phoma herbarum</i> Westend.	-	0	0	0	1	1
<i>Phoma leveillei</i> Boerema & Bollen	-	0	1	0	0	1
<i>Phoma</i> sp.4	-	0	0	1	0	1
<i>Phoma</i> sp.5	-	1	0	0	0	1
<i>Phomopsis</i> sp.8	-	1	0	0	0	1
<i>Phomopsis</i> sp.9	-	1	0	0	0	1
<i>Pithomyces maydicus</i> (Sacc.) Ellis	-	0	0	1	0	1
<i>Pleurophomopsis</i> cf. <i>salicina</i> Petr.	-	0	0	1	0	1
<i>Pseudohalonectria</i> sp.	-	0	0	0	1	1
<i>Scolecobasidium constrictum</i> Abbott	-	0	0	1	0	1
<i>Stagonospora</i> sp.1	-	0	0	0	1	1
<i>Stagonospora</i> sp.2	-	1	0	0	0	1
Xylariaceae sp.2	-	0	0	1	0	1

\* Só foram codificadas as primeiras 23 espécies, as quais foram utilizadas na análise multivariada DCA (Figura 4). \*\* FP, CP - folhas e caules de *P. perrottettii*; FT e CT - folhas e caules de *T. guianensis*.

Noventa e cinco das 107 espécies identificadas são de ascomicetos em sua fase anamórfica (41 'celomicetos' e 54 'hifomicetos'), sendo que as doze espécies restantes produziram a fase teleomórfica em meio de cultura. A produção conjunta das fases sexuada e assexuada na mesma placa só ocorreu em alguns isolados das espécies *Diaporthe* sp. - *Phomopsis* sp., *Glomerella cingulata* - *Colletotrichum gloeosporioides*, *Guignardia mangiferae*. - *Phyllosticta capitalensis*. e *Leptosphaeria* sp.2 - anamorfo tipo *Phoma*. A existência de basidiomicetos como endófitos é bem plausível e, na verdade, vários dos micélios estéreis apresentaram características morfológicas que demonstram 'afinidades' com basidiomicetos (Arx, 1981; Cannon & Simmons, 2002).

Espécies de fungos comumente recuperadas em diversos estudos com fungos endófitos, como *Cladosporium* e *Phomopsis*, encontraram-se entre aquelas com maiores frequências de isolamento. Por outro lado, a alta frequência de isolamento de fungos como *Phaeostagonospora* sp., cf. *Mycosphaerella*, *Paraconiothyrium* sp., *Verticillium psalliotae*, *Coniothyrium sporulosum* e *Acremonium bacillisporum* parece bem característica do sistema estudado.

A espécie com maior frequência de isolamento neste estudo foi *Phomopsis* sp.1. Fungos do gênero *Phomopsis* são frequentemente recuperados como endófitos ou associados a doenças de um grande número de plantas hospedeiras (Farr et al., 1995; Mendes et al., 1998; Rehner & Uecker, 1994; Suryanarayanan et al., 2002). O conceito de espécie dentro do gênero *Phomopsis* é bastante complicado devido à falta de caracteres morfológicos diferenciadores, sendo a nomenclatura das espécies baseada na premissa de especificidade entre o

fungo e sua planta hospedeira. Como resultado deste critério de nomenclatura cerca de 800 epítetos específicos já foram validados (Rehner & Uecker, 1994). O resultados obtidos com auxílio de métodos moleculares têm mostrado a inconsistência desta sistemática de nomenclatura mesmo em patossistemas bem caracterizados como no caso da escoriose da videira. O agente etiológico desta doença é conhecido como *Phomopsis viticola*, porém, análises morfológicas e baseadas em métodos moleculares realizadas com uma coleção com 61 isolados evidenciaram a existência de 5 espécies de *Phomopsis* associadas à patologia das videiras (Mostert et al., 2001).

Dentro deste complicado contexto taxonômico a designação das espécies fica muito dificultada e, por isso, tanto neste trabalho como em muitos outros estudos, os distintos morfotipos e possíveis espécies diferentes são designados de *Phomopsis* 1, 2, 3,... (Cannon & Simmons, 2002; Gamboa & Bayman, 2001; Suryanarayanan et al., 2002).

*Guignardia* (anamorfos *Phyllosticta*, *Leptodothiorella*) é um gênero que abriga fungos endófitos cosmopolitas, isolados em grande quantidade de plantas de clima temperado (Bernstein & Carroll, 1977; Bills & Polishook, 1991; Carroll & Carroll, 1978; Fisher et al., 1986; Petrini & Carroll, 1981; Okane et al., 1998) subtropical e tropical (Freire & Bezerra, 2001; Hata et al., 2002; Photita et al., 2001; Suryanarayanan & Kumaresan 2000; Suryanarayanan et al., 2002). Estudos feitos com auxílio de métodos moleculares têm mostrado que a maioria dos isolados recuperados como endófitos pertencem à espécie cosmopolita *Guignardia mangiferae* (anamorfo *Phyllosticta capitalensis*) (Baayen et al. 2002; Pandey et al., 2003), também incorretamente descrita com o sugestivo nome de *Guignardia endophyticolla* por Okane et al. (2001). Além dos isolados identificados como *Guignardia mangiferae* durante este estudo (Tabela 4), muitos isolados morfológicamente semelhantes a esta espécie não produziram estruturas reprodutivas típicas do gênero ou de seus anamorfos em meio de

cultura, limitando-se à produção de estruturas pseudo-estromáticas onde, algumas vezes, eram produzidos esporos hialinos, unicelulares, de formato elipsoidal a cilíndrico apresentando similaridades com *Phoma* e *Leptodothiorella*. Estes isolados foram inicialmente designados como cf. *Guignardia*. Posteriormente foram empregados métodos de biologia molecular na tentativa de elucidar este problema taxonômico. Três isolados de cf. *Guignardia* foram escolhidos aleatoriamente, cultivados em meio malte líquido por 4 dias sob agitação de 100 rpm e submetidos ao processo de extração de DNA, de acordo com protocolos adaptados de Lee et al. (1990) e Moller et al. (1992). As amostras de DNA extraído foram enviadas ao Laboratório Central de Biologia Molecular da UFLA onde foram amplificadas, purificadas e submetidas ao sequenciamento, com a utilização dos primers ITS4 e ITS5 que amplificam a região ITS do rDNA. As seqüências obtidas foram comparadas com o banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) americano através do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, disponível no sítio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). De maneira inesperada as três seqüências mostraram alta semelhança com seqüências pertencentes ao gênero *Mycosphaerella* (anamorfo *Pseudocercospora*), porém como a similaridade máxima obtida entre as seqüências foi de 89% e a produção de estruturas reprodutivas bem desenvolvidas não foi conseguida *in vitro*, a aproximação mais parcimoniosa foi a designação cf. *Mycosphaerella* para tais isolados.

*Phaeostagonospora* sp. figurou entre os fungos dominantes neste trabalho, exibindo alta recorrência em CT. Esta espécie apresenta esporos tri-septados de coloração caramelo, e não hialinos como na definição do gênero *Stagonospora* dada por Sutton (1980); e a ausência de esporos realmente marrons e as características da conidiogênese apresentadas por *Phaeostagonospora* sp. (células conidiogênicas holoblásticas, anelídicas, indeterminadas) deram suporte à manutenção desta no gênero

*Phaeostagonospora* e não em *Sclerostagonospora* como proposto por Sutton (1980). O gênero *Phaeostagonospora* foi descrito por Ramaley em 1997 (Câmara *et al.* 2001) para abrigar as espécies do complexo *Paraphaeosphaeria* que apresentavam anamorfos contendo esporos marrons, multiseptados e com conidiogênese anelídica, produzidos em picnídios. Posteriormente Câmara *et al.* (2003), de posse de dados morfológicos e moleculares, propuseram a transferência das espécies contendo anamorfos em *Phaeostagonospora* para o novo gênero *Phaeosphaeriopsis*.

Um celomiceto estromático caracterizado por rápido crescimento, abundante produção de micélio aéreo, inicialmente hialino adquirindo tons de marrom com o envelhecimento da cultura, e produção abundante de esporos marrons unicelulares em fiálides simples, foi recuperado em grande quantidade de quase todos os tecidos amostrados, à exceção de FT (Tabela 4). Com tais características a espécie foi designada, de uma forma pouco confortável, ao gênero *Cyclothyrium*. Felizmente as características apresentadas pelos isolados se mostraram bastante consistentes com aquelas diagnósticas do gênero *Paraconiothyrium* descrito recentemente por Verkley *et al.* (2004).

No mesmo artigo supracitado é discutida a posição taxonômica de *Coniothyrium sporulosum*, a sétima espécie mais freqüente neste trabalho. Junto com *Paraconiothyrium*, espécies de celomicetos com picnídios bem formados, esporos simples e marrons produzidos em abundância em fiálides simples constituíram os maiores entraves para identificação e separação na fase inicial do trabalho. No entanto, a padronização das avaliações através do cultivo destes isolados em meio OA (Domsch *et al.*, 1980) permitiu a correta separação daqueles pertencentes a *Coniothyrium sporulosum*. Todas as outras espécies semelhantes foram tentativamente designadas ao gênero *Microsphaeropsis*. As definições e contradições a respeito da delimitação entre os gêneros *Coniothyrium* e *Microsphaeropsis*, bem como suas relações filogenéticas

inferidas com a ajuda da biologia molecular, não serão aqui abordadas, podendo ser encontradas nas seguintes referências Câmara et al. (2001, 2003), Domsch et al. (1980), Sutton (1980), Verkley et al. (2004).

De interesse particular, *Coniothyrium sporulosum* é uma espécie de ocorrência muito comum no solo, sendo também recuperada de material vegetal em decomposição. Através da análise da sequência de bases do DNA ribossomal, Verkley et al. (2004) propuseram a redistribuição de *Coniothyrium sporulosum* e *Coniothyrium minutans*, também isolado no presente estudo, no gênero *Paraconiothyrium*, englobando os anamorfos do gênero *Paraphaeosphaeria*. A manutenção das duas espécies no gênero *Coniothyrium* foi preferida, pois são duas espécies bem caracterizadas, e a aceitação generalizada das propostas feitas por Verkley et al. (2004) dependerá de outros trabalhos comprobatórios.

De modo geral, a identificação das espécies de celomicetos foi bastante dificultada por fatores como escassez de literatura, principalmente em micologia tropical, e de estudos realizados com o cultivo dos fungos *in vitro* (Cannon & Simmons, 2002), já que a maior parte das descrições é baseada na observação das estruturas de reprodução dos fungos em suas plantas hospedeiras (Sutton, 1980). Uma exceção neste cenário é dada pelos extensivos trabalhos de Borema e colaboradores (cujos resultados foram compilados por de Gruyter et al., 2004), que há mais de 3 décadas vêm se dedicando à identificação e caracterização *in vitro* e *in vivo* das espécies do gênero *Phoma*. Assim, de posse de boa parte da literatura publicada, com a padronização dos meios e condições de cultivo e obviamente com o auxílio da pesquisadora Mirian Salgado, especialista em *Phoma*, do laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos da UFLA foi possível a distinção e identificação de 6 espécies de *Phoma* recuperadas como fungos endófitos neste trabalho.



*Verticillium psalliotae* e *Acremonium bacillisporum* estão entre as dez espécies mais freqüentemente isoladas no presente estudo (Tabela 4). Junto com *Geotrichum* sp., estes fungos podem ser designados como típicos da estação chuvosa. Esta denominação se justifica pelo fato de que nenhuma das espécies supracitadas foi recuperada na primeira coleta. Estes fungos são ascomicetos anamorfos que produzem seus mitósporos em grande quantidade, em estruturas mais ou menos diferenciadas, diretamente sobre as hifas (hifomicetos) e seus esporos unicelulares, hialinos, com parede fina são facilmente dispersos pelo vento e altamente dependentes de umidade para sua germinação (Domsch et al., 1980; Gams, 1997). Estas espécies estão presentes no solo e também associadas à decomposição de matéria orgânica (Arx, 1981; Domsch et al., 1980); logo, o material vegetal em acelerado processo decomposição, propiciado pelas condições de temperatura e umidade do verão, deve servir como fonte de inóculo destes fungos na época chuvosa.

O reduzido número de isolados pertencentes ao complexo *Glomerella cingulata* - *Colletotrichum gloeosporioides* e à família Xylariaceae recuperado das duas plantas estudadas é um fato bastante intrigante. Abundantes exemplos na literatura e a própria experiência adquirida pelo nosso grupo de pesquisa com fungos endófitos da arnica mineira, cafeeiro (Almeida et al., 2004) e cacauero indicavam inicialmente que estes fungos seriam isolados em grande quantidade. *Colletotrichum gloeosporioides* é uma morfo-espécie genotipicamente heterogênea (Sreenivasaprasad et al., 1996) que abriga fitopatógenos associados a enfermidades normalmente conhecidas como antracnoses em um grande número de plantas hospedeiras (Agris, 2004). Por outro lado, fungos pertencentes a este complexo têm figurado entre os endófitos mais comuns de uma gama de plantas hospedeiras de clima tropical (Cannon & Simmons, 2002; Freire & Bezerra, 2001; Guo et al., 2000, 2001; Hata et al., 2002; Lodge et al.,

1996; Photita et al., 2001; Rodrigues & Samuels, 1999; Suryanarayanan et al., 2002).

Fungos xylariáceos em sua fase anamórfica são também regularmente recuperados como endófitos de diversos hospedeiros (Fröhlich et al., 2000; Gamboa & Bayman, 2001; Lodge et al., 1996; Rodrigues, 1994; Suryanarayanan et al., 2002). A dificuldade na identificação e a ocorrência muito comum de Xylárias como endófitos até inspiraram Petrini & Petrini (1985) a formularem uma chave para identificação de fungos endófitos da família Xylariaceae baseada nas características da fase anamórfica normalmente produzida em cultura axênica.

A baixa frequência de isolamento de *Colletotrichum* e *Xylaria* em amostras das duas plantas hospedeiras estudadas dá indicativas de que, mesmo pertencendo a famílias botânicas muito distintas, *P. perrottettii* e *T. guianensis* possuem uma certa homogeneidade quanto à estrutura das comunidades de fungos por elas abrigadas, fato talvez explicado pela conexão fisiológica entre ambas.

#### **4.5 Padrões de colonização**

A comparação entre as comunidades de endófitos associadas aos diferentes tecidos e plantas amostrados, nas duas coletas distintas, foi também realizada pela análise estatística multivariada DCA, para qual foram utilizadas as espécies com frequência de isolamento de até 1%, o que correspondeu a 23 morfo-espécies. Os resultados obtidos estão dispostos graficamente na Figura 4.

O programa PC-ORD não mostra em seus resultados qual a porcentagem da variabilidade dos dados é explicada pelas primeiras três componentes geradas pela análise de DCA. Apenas os autovalores absolutos de cada componente, e não a proporção que estes autovalores representam diante da variabilidade total,

é mostrada. Os autovalores obtidos na análise representada na Figura 4 foram 0,644 para componente 1, 0,330 para componente 2 e 0,212 para componente 3.

A disposição gráfica obtida na DCA permitiu que fossem identificados três grupos mais ou menos homogêneos de amostras. O grupo mais destacado é aquele formado pelas amostras de folhas de *T. guianensis*. As espécies cf. *Mycosphaerella*, *Verticillium psalliotae* e *Phomopsis* sp.1 foram isoladas em alta frequência de amostras de FT e contribuíram para o seu agrupamento espacial no gráfico. Em uma análise mais detalhada pode ser observado que as amostras de FT da segunda coleta formaram um subgrupo bem menos disperso, fato explicado pela alta frequência de isolamento de *Verticillium psalliotae* nestas amostras, como constatado pela proximidade entre esta espécie e o subgrupo.

O segundo grupo distinto no gráfico corresponde às amostras de CT da segunda coleta. Espécies de *Phomopsis* e *Phaeostagonospora* sp., com alta recorrência nestas amostras, parecem ter contribuído em maior grau para o agrupamento dos pontos.

O terceiro grande grupo evidenciado no gráfico é formado pelas amostras de CP das duas épocas de coleta. As amostras da primeira coleta formam claramente um subgrupo bastante homogêneo posicionado no centro da dispersão dos pontos referentes à segunda coleta. De fato, a composição da comunidade de fungos endófitos associados a CP na época seca foi bastante homogênea, com dominância das espécies *Coniothyrium sporulosum* e *Paraconiothyrium* sp. Tais fungos também foram recuperados em grande quantidade na época chuvosa, porém as altas frequências de isolamento de espécies como *Acremonium bacillisporum* e *Fusarium avenaceum*, de forma localizada em algumas amostras, contribuíram para uma maior dispersão dos pontos referentes à segunda amostragem.

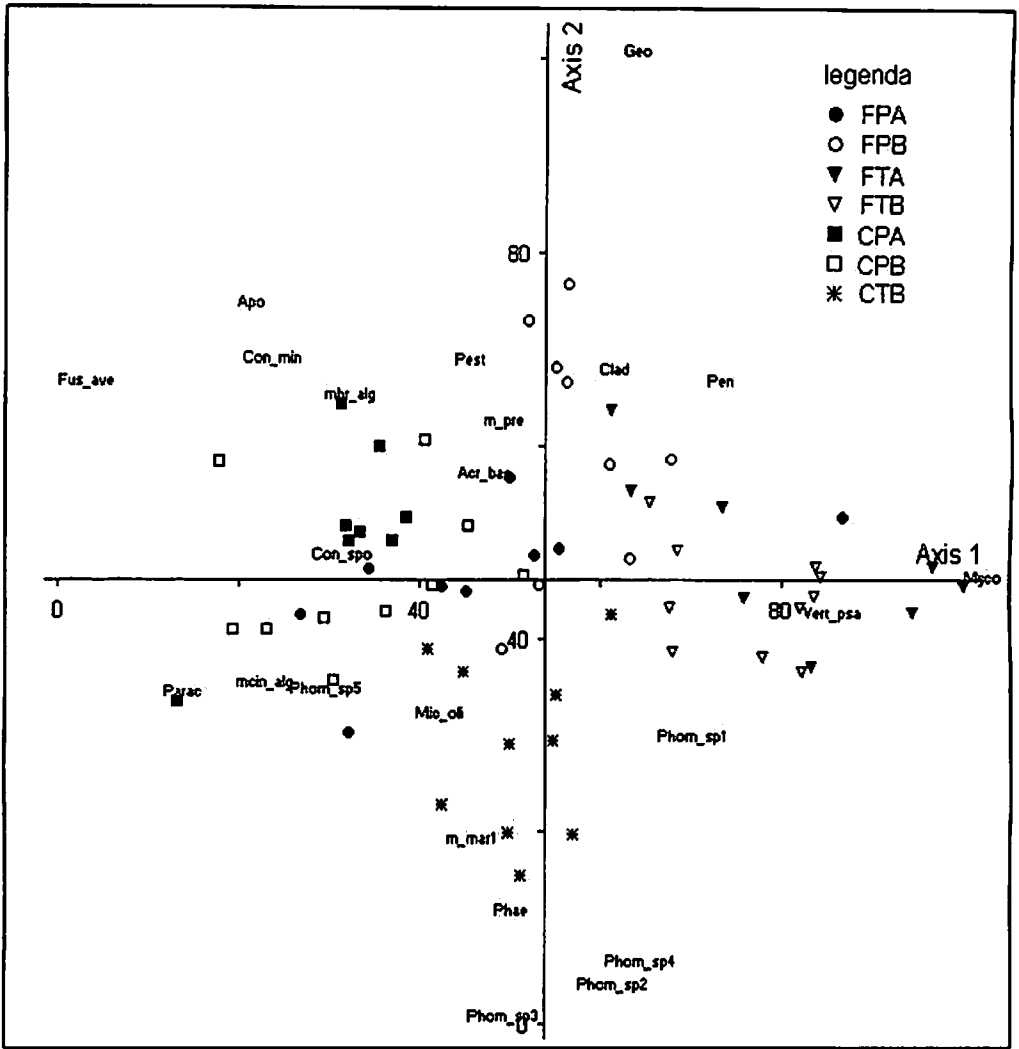


FIGURA 4 Gráfico gerado pela análise estatística multivariada DCA mostrando as semelhanças entre amostras e espécies de fungos endófitos. FP, CP - folhas e caules de *P. perrottetii*; FT e CT - folhas e caules de *T. guianensis*; A - amostras da primeira coleta; B - amostras da segunda coleta.

Como antecipado em discussões anteriores, as amostras mais heterogêneas foram aquelas obtidas de folhas de *P. perrottettii*. Pela análise da Figura 4 pode-se verificar que, mesmo com uma grande dispersão dos pontos, as amostras de FP da primeira coleta tendem a se agrupar com aquelas originadas de caule da mesma planta. A amostra de FP da primeira coleta que se distingue completamente das demais e se agrupa claramente com aquelas de FT corresponde à amostra da planta 10, a qual originou apenas 4 isolados dentre os quais 2 pertencentes a cf. *Mycosphaerella*.

Já os pontos referentes a FP da segunda coleta, em sua maioria, se distinguem daqueles da primeira coleta, sendo mais semelhantes às amostras de FT. Logo, a alternância climática representada pelas duas épocas de coleta parece ser fator determinante na composição de espécies de fungos endófitos associados a FP, uma vez que o número de isolados obtidos nas duas épocas não diferiu significativamente, como discutido no item 4.3.

Os padrões gerais apresentados pelas amostras na DCA indicam que, apesar de não diferirem grandemente na composição de fungos endófitos, os diferentes tecidos estudados abrigam comunidades de fungos características. Caules de *P. perrottettii* e *T. guianensis* abrigam muitas espécies em comum e se distinguem em grande parte das amostras de FT pelo fato destas últimas serem dominadas por cf. *Mycosphaerella*, isolada apenas uma vez de CT. A separação no gráfico das amostras de caule e folha de *T. guianensis* parece plausível diante a grande diferença existente entre estes dois tecidos. De maneira inversa, as folhas carnosas de *P. perrottettii* se assemelham bastante ao seu caule, com exceção da porção basal da copa da planta onde o caule se encontra mais lignificado. Esta maior uniformidade entre os tecidos pode explicar a semelhança existente entre a comunidade de fungos endófitos de FP e CP verificada na primeira coleta. Já a dessemelhança entre CP e FP na segunda coleta pode ser mais bem entendida com a análise individual do padrão de

colonização das amostras pelos fungos endófitos mais abundantes. Esta análise mais refinada dos padrões de colonização por alguns dos fungos endófitos mais abundantes foi feita através da construção de gráficos box plot, mostrados na Figura 5, onde a variação no número de isolados obtidos nas amostras de cada tecido e ou data de coleta é mostrada para cada espécie de endófito individualmente.

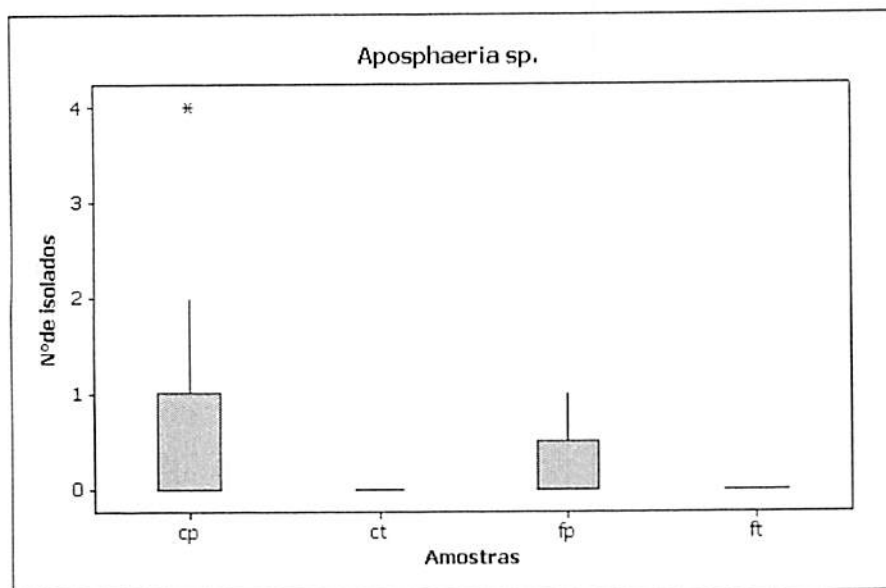
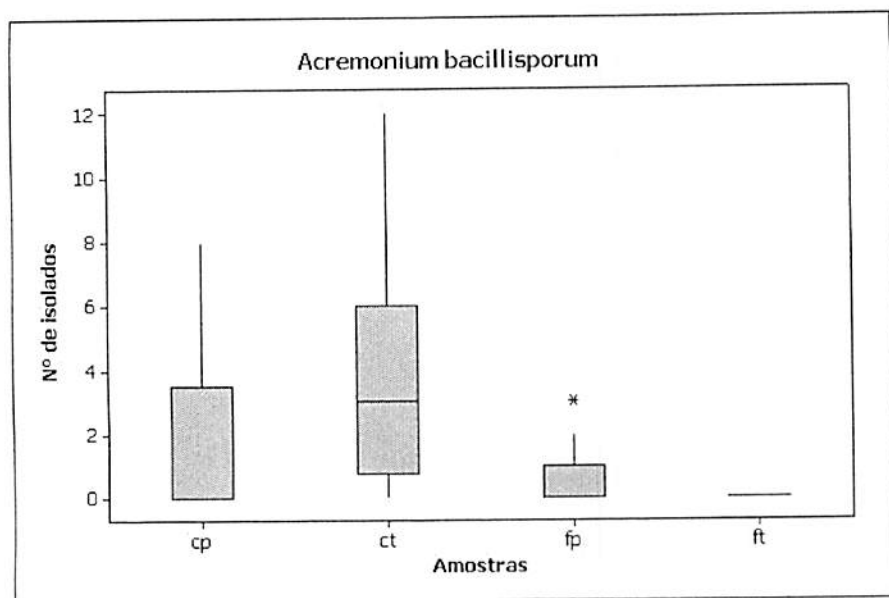


FIGURA 5 Box plot mostrando a variação no número de isolados recuperados em cada tecido para alguns fungos mais freqüentemente isolados (continua...).

FIGURA 5 cont.

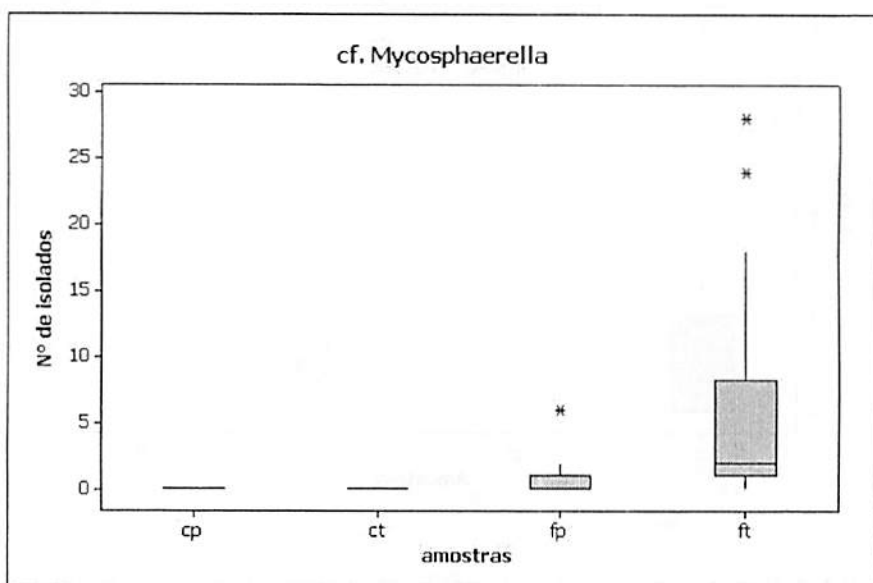
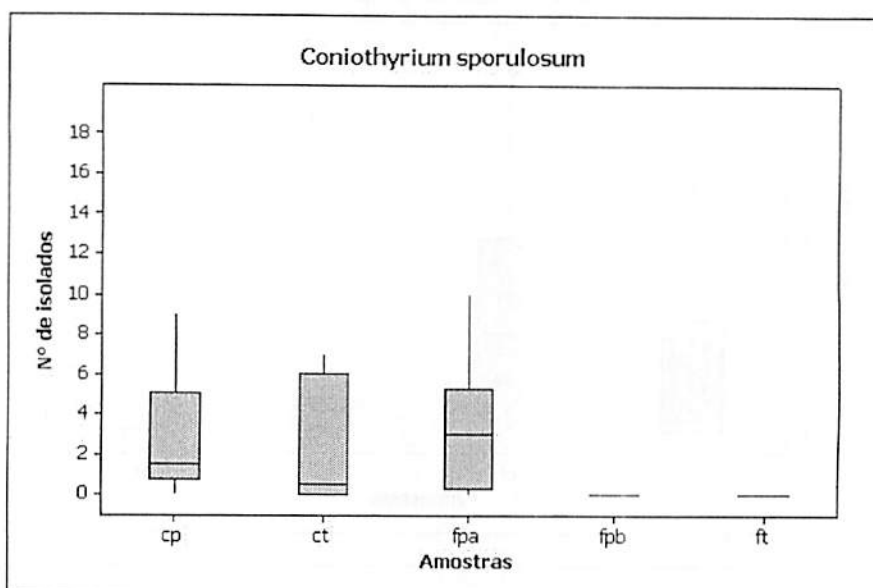




FIGURA 5 cont.

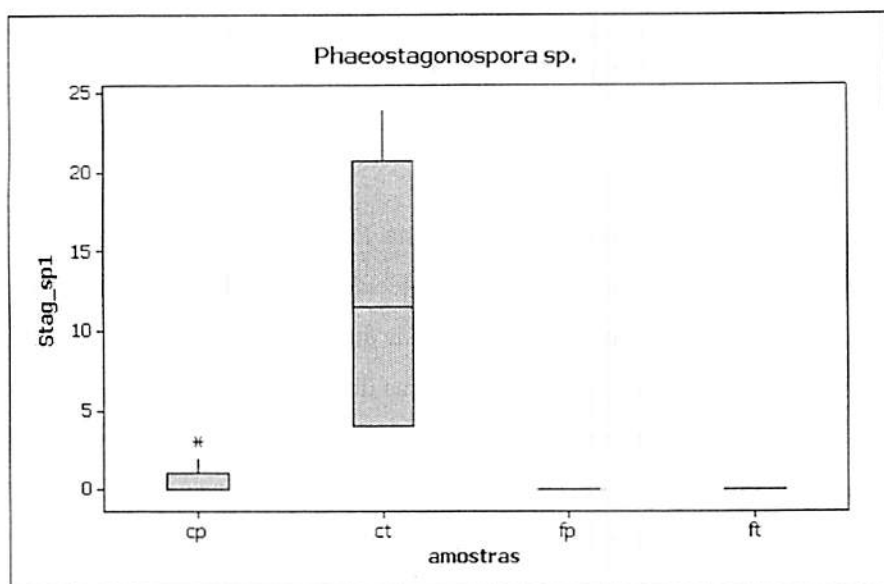
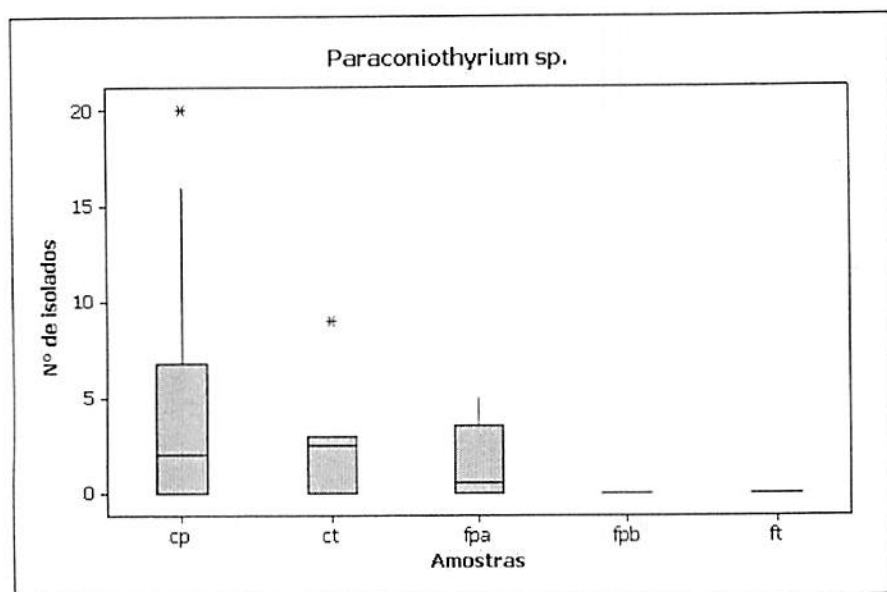
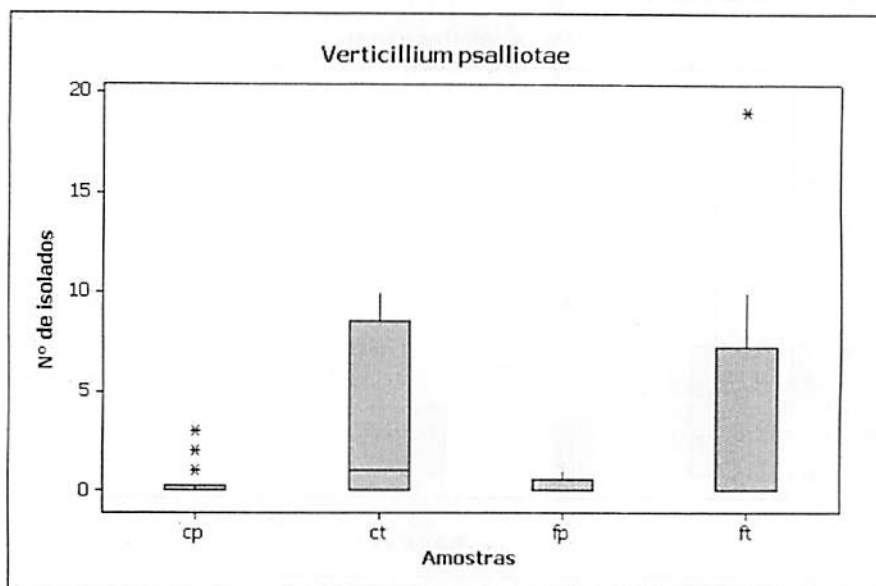


FIGURA 5 cont.



FP, CP - folhas e caules de *P. perrottetii*; FT e CT - folhas e caules de *T. guianensis*; A - amostras da primeira coleta; B - amostras da segunda coleta. \* Indica amostras fora do padrão (Outliers).

Confirmando o padrão observado na DCA, a Figura 5 mostra que cf. *Mycosphaerella* possui alta recorrência nos tecidos de FT ( $P = 0,000$ , pelo teste de Kruskal-Wallis), sendo isolada esporadicamente em amostras de FP. A segunda espécie mais abundante nas amostras de FT foi *Verticillium psalliotae*. Esta espécie demonstrou alta recorrência nas plantas de *T. guianensis*, sendo isolada em quantidades muito semelhantes de FT e CT.

A espécie mais abundante neste trabalho, *Phomopsis* sp.1, mostrou alta recorrência em *T. guianensis* ( $P = 0,000$ , pelo teste de Kruskal-Wallis), com um maior número de isolados em CT. Uma espécie de *Phomopsis* foi a segunda

mais abundantemente isolada dos tecidos foliares de *Spondias mombin* (Anacardiaceae) (Rodrigues & Samuels, 1999). Além de *Phomopsis* sp.1, *Phomopsis* sp.2 mostrou alta recorrência de colonização em CT. Já a espécie *Phomopsis* sp.3 foi isolada exclusivamente de amostras de caule de *T. guianensis*.

O fungo mais freqüentemente isolado das amostras de CT foi *Phaeostagonospora* sp., o qual também foi isolado muito esporadicamente de amostras de FP e CP e nunca recuperado de amostras de FT (Tabela 4, Figura 5).

*Acremonium bacillisporum* foi isolado em quantidades semelhantes de amostras de CP e CT, sendo recuperado em uma quantidade bem menos expressiva de amostras de FP.

Dentre as 20 espécies isoladas com maior freqüência somente *Aposphaeria* sp. apresentou exclusividade de colonização em *P. perrottettii*. Este fungo de crescimento lento e que demora em média 2 meses para esporular em cultura foi isolado em uma baixa, porém constante freqüência, de amostras de FP e CP nas duas amostragens.

As duas espécies com maiores recorrências em CP foram *Paraconiothyrium* sp. e *Coniothyrium sporulosum*, respectivamente. Tais espécies também foram isoladas em menor proporção do caule de *T. guianensis*. Já o comportamento destes fungos em amostras de FP nas duas coletas é, no mínimo, intrigante. Como mostrado na Tabela 4 e na Figura 5 *Coniothyrium sporulosum* foi o endófito mais freqüentemente isolado das folhas de *P. perrottettii* na primeira coleta, não sendo isolado uma única vez deste tecido na segunda amostragem. De forma análoga, *Paraconiothyrium* sp. foi a segunda espécie mais freqüentemente isolada das amostras de FP na primeira coleta, e representada por apenas um isolado na época chuvosa. Estas duas espécies parecem ser as responsáveis pela dicotomia entre as amostras de inverno e de verão obtidas de folhas das mesmas plantas. Uma hipótese para explicação de tal

fenômeno pode ser elaborada partindo-se da premissa de que as folhas de *P. perrottettii* amostradas nas duas coletas possuíam idades diferentes.

Dados fenológicos sobre *P. perrottettii* não são conhecidos, porém é fato nitidamente observado que *P. perrottettii* não é uma planta decídua. Suas copas se mantêm aparentemente exuberantes e retêm suas folhas durante a seca, em contraste com a sazonal perda de folhas por *T. guianensis* (Prof. Eduardo van den Berg, comunicação pessoal). Contudo, uma renovação foliar naturalmente existe e é bem provável que esta ocorra, mesmo que de forma pouco sincronizada, no início da época chuvosa. Assim, o critério do tamanho das folhas não parece ter sido eficiente para indicar a idade destas, indicando que provavelmente folhas recém formadas foram amostradas no verão e folhas maduras e sadias, que no entanto tinham sido formadas há quase um ano, constituíram as amostras na primeira coleta.

Neste contexto, um modelo hipotético pode ser idealizado para explicar os padrões de colonização das folhas de *P. perrottettii* por fungos endófitos. As folhas são formadas no início da época chuvosa e, ao contrário do que ocorre entre as folhas de *T. guianensis* e cf. *Mycosphaerella*, estas não são colonizadas preferencialmente por espécies dominantes, mas sim por hifomicetos cosmopolitas que esporulam em grande quantidade e dispersam milhões de esporos no ambiente, como *Acremonium bacillisporum* e *Geotrichum* sp. Com o passar dos meses, as condições climáticas se tornam mais adversas e os fungos oportunistas de verão, provavelmente pouco adaptados à colonização dos tecidos vegetais vivos, tendem a perecer e serem eliminados. Esta tendência pode ser confirmada pelo fato de que nenhuma das aqui chamadas espécies de verão, *Acremonium bacillisporum*, *Geotrichum* e *Verticillium psalliotae*, foram isoladas na época seca.

Concomitantemente, com o amadurecimento, as folhas de *P. perrottettii* se tornam bem mais semelhantes aos tecidos do caule, adquirindo aspecto mais

rijo e coriáceo. Fungos endófitos sempre presentes nos tecidos caulinares de *P. perrottettii* como *Coniothyrium sporulosum* e *Paraconiothyrium* se propagam através destes e colonizam os tecidos internos das folhas da erva-de-passarinho. É possível também que estes celomicetos esporulem na época seca e seus esporos colonizem as folhas de *P. perrottettii*.

A presença de *Coniothyrium sporulosum* e *Paraconiothyrium* sp. nas folhas mais velhas poderia ser vista como uma vantagem competitiva destes fungos na colonização inicial das folhas após a sua queda e talvez até contribuam para a aceleração do processo de senescência foliar, como sugerido por alguns autores (Carroll, 1988; Petrini et al., 1992).

Análises detalhadas das freqüências de isolamento dos fungos nas diversas amostras indicam a existência de vários padrões de colonização. Alguns fungos generalistas (ex. *Cladosporium* spp.) foram isolados em quantidades semelhantes de vários tecidos nas duas amostragens. Outras espécies de ocorrência mais generalizada têm sua distribuição bastante dependente das condições climáticas, mesmo que apresentem tendências de colonização preferencial por alguns hospedeiros, como *Acremonium bacillisporum* em *P. perrottettii* e CT, e *Verticillium psalliotae* em *T. guianensis*. Alguns fungos foram recuperados preferencialmente de amostras de caules (ex. *Fusarium avenaceum*) ou folhas (ex. cf. *Mycosphaerella*) e outros isolados exclusivamente de *P. perrottettii* (ex. *Aposphaeria* sp.) ou *T. guianensis* (*Phomopsis* sp.4). Muitos fatores aleatórios como falhas no processo de amostragem, no processamento das amostras e até na identificação de alguns fungos podem ter contribuído para constituição destes aparentes padrões ecológicos. Porém, somente outras amostragens e isolamentos poderão confirmar ou refutar os resultados obtidos neste estudo. Muitas evidências indicam que os fungos endófitos associados a plantas lenhosas e sub-arbustivas são disseminados como esporos pelo ambiente e colonizam porções mais ou menos restritas dos tecidos

internos de seus hospedeiros, sendo a colonização sistêmica e transmissão dos fungos via sementes considerados eventos raros nestes sistemas (Petrini et al., 1992; Carroll, 1995). Desse modo, a colonização preferencial de alguns hospedeiros por fungos endófitos em ambientes contendo diversas espécies vegetais indica relações simbióticas mais estreitas entre alguns endófitos e suas hospedeiras, já que a presença e densidade de esporos são praticamente as mesmas em um ambiente restrito (Johnston, 1998). O grande número de espécies isoladas de ambas as plantas hospedeiras estudadas neste trabalho é indicativo de que realmente a maioria dos fungos deva ser disseminada pelo ambiente por meio de esporos e colonize porções restritas dos tecidos de seus hospedeiros. Contudo, a comparação entre os quatro tecidos amostrados pela análise multivariada de classificação mostrada na Figura 6 suscita algumas especulações a respeito do modo de transmissão de alguns endófitos entre as duas plantas.

Na Figura 6 são distintos dois agrupamentos uniformes e mais três ramos contendo as amostras de FT nas duas épocas de coleta e de FP da segunda coleta. As amostras de FT das duas coletas se diferenciaram bastante dos outros agrupamentos e também mostraram grande diferença entre si, já que a similaridade entre FTA e FTB é de apenas um pouco mais de 50%. A provável razão para esta dessemelhança é a alta taxa de isolamento de *Verticillium psalliotae* em FTB e sua ausência em FTA. Por outro lado, as amostras de caule de *T. guianensis* se agruparam juntamente com as amostras oriundas de *P. perrottettii*, sendo particularmente semelhantes às amostras de CP. Infelizmente, com a indisponibilidade dos dados referentes a CT da primeira coleta, não é possível averiguar se a comunidade de fungos endófitos é mais semelhante entre os caules nas duas épocas amostradas.

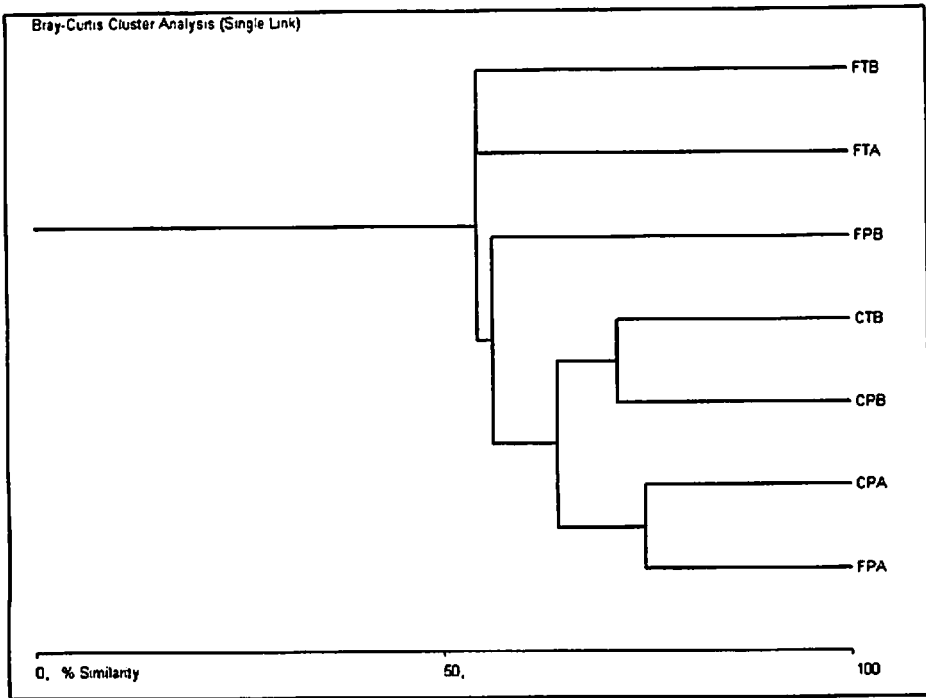


FIGURA 6 Análise multivariada de classificação comparando os diferentes tecidos amostrados de acordo com a comunidade de fungos endófitos a eles associados.

FP, CP - folhas e caules de *P. perrottettii*; FT e CT - folhas e caules de *T. guianensis*; A - amostras da primeira coleta; B - amostras da segunda coleta.

Como discutido anteriormente, a diferenciação das amostras de FT deve-se provavelmente a uma maior 'preferência' de colonização por alguns fungos a este tecido, já que a composição e a quantidade de esporos que chegam às copas de *P. perrottettii* e *T. guianensis* devem ser as mesmas devido à proximidade entre as plantas. Também já foi salientado que as diferenças entre as comunidades de endófitos associados a FT e CT devem ser oriundas das enormes diferenças anatômicas entre estes dois tecidos. No entanto, tal

argumento, caso correto, indica também que as comunidades de fungos associados a FP e CP deveriam ser distintas daquela presente em CT. Logo, a maior semelhança entre a erva-de-passarinho e o substrato onde esta se desenvolve, ou seja o caule de *T. guianensis*, principalmente entre CP e CT, indica que, em pelo menos alguns casos, deve haver transmissão direta de fungos endófitos entre os vegetais conectados fisiologicamente. Esta transmissão deve ser dependente da capacidade que cada endófito possui de colonizar mais extensivamente os tecidos vegetais e se desenvolver em ambos hospedeiros, o parece ser verdade para fungos como *Coniothyrium sporulosum*, *Fusarium avenaceum*, *Phomopsis* sp. 5, *Paraconiothyrium* sp. e *Phaeostagonospora* sp.

Em uma análise final dos resultados pode ser inferido que a complexidade mostrada pelas comunidades de fungos recuperados como endófitos das duas plantas hospedeiras evidencia a existência de diversos grupos ecológicos com estilos de vida diferenciados que co-habitam o mesmo nicho. Contudo, inferências a respeito das funções destes fungos endófitos, se são fitopatógenos, saprófitos, epífitos, simbioses comensais, simbioses mutualistas ou eventuais colonizadores são difíceis de serem feitas com base apenas em um inventário.

#### **4.6 Coleção de culturas**

Cumprindo um dos objetivos deste trabalho, foi composta uma coleção de culturas, contendo representantes de todas as morfo-espécies isoladas e identificadas. Os isolados depositados na coleção foram designados com o código FEL (Fungos Endófitos Lucas) e numerados de acordo com a ordem em que eram depositados. A coleção possui 395 isolados os quais são mantidos viáveis e metabolicamente inativos em recipientes hermeticamente fechados, contendo água destilada esterilizada (Castellani, 1967). Representantes de espécies de rara ocorrência também foram preservados em tubos de vidro



contendo o meio de cultura MA e serão depositados na Coleção Micológica de Lavras. Ambas as coleções são mantidas nas dependências do laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. O objetivo principal da composição e manutenção desta coleção de recursos genéticos (Hawksworth, 2004) é a preservação dos fungos em longo prazo visando sua aplicação em trabalhos futuros de bioprospecção química.

## 5 CONCLUSÕES

- ✓ A metodologia de trituração e filtração de partículas mostrou-se eficiente para recuperação de um grande número de isolados de fungos endófitos de *P. perrottettii* e *T. guianensis*.
- ✓ *P. perrottettii* e *T. guianensis* abrigam expressiva diversidade taxonômica de fungos endófitos.
- ✓ As variações climáticas sazonais tiveram grande influência sobre o número de fungos isolados e a composição de espécies de endófitos associados às duas plantas hospedeiras, com efeitos mais pronunciados nos tecidos foliares do que caulinares.
- ✓ A comunidade de fungos endófitos de folhas de *P. perrottettii* apresentou o menor número total de isolados, o maior número de espécies e a melhor equabilidade de distribuição das espécies de fungos endófitos, sendo caracterizada como a comunidade com maior diversidade ecológica dentre os tecidos analisados.
- ✓ Dentre os fungos endófitos mais freqüentemente isolados figuraram espécies comumente associadas a vários hospedeiros (ex. *Phomopsis* sp.1) e outras geralmente isoladas em menores freqüências de outras plantas (ex. *Microsphaeropsis olivacea*) ou ainda não identificadas como endófitos (ex. *Acremonium bacillisporum*).
- ✓ Os fungos endófitos mais abundantes apresentaram três padrões de colonização distintos: colonização generalista (ex. *Cladosporium* spp.),

alta recorrência em um hospedeiro ou tecido (exs. *Phomopsis* sp.1 em *T. guianensis*; cf. *Mycosphaerella* em folhas de *T. guianensis*) e exclusividade de ocorrência em um hospedeiro ou tecido (exs. *Aposphaeria* sp. em *P. perrottettii*; *Phomopsis* sp.4 em caules de *T. guianensis*).

- ✓ Apesar da sobreposição entre as comunidades de fungos endófitos associadas às duas plantas hospedeiras, padrões distintos de colonização por fungos nos diferentes tecidos amostrados foram detectados com auxílio de técnicas de estatística multivariada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. New York: Academic Press, 2005. 922 p.

ALMEIDA, A. R.; SALGADO, M.; LIMA, C. S.; ABREU, L. M. de; PFENNING, L. H. Comunidade de fungos endófitos em folhas e hastes do cafeeiro (*Coffea arabica*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 4., 2004, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto, 2004. p. 25-25.

ARNOLD, A. E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Are tropical endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*, Oxford, v. 3, n. 4, p. 267-274, July 2000.

ARNOLD, A. E.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of The National Academy of Science**, St. Paul, v. 100, n. 26, p. 15649-15654, Dec. 2003.

ARX, J. A. von. **The genera of fungi sporulating in pure culture**. 3. ed. Alemanha: J. Cramer, 1981. 424 p.

BÄÄTH, E. A critical examination of the soil washing technique with special reference to the effect of the size of the soil particles. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 66, n. 8, p. 1566-1569, Aug. 1988.

BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G. C.; van der Aa, H. A.; WEERDT, M. De.; van BROUWERSHAVEN, I. R.; SCHUTTTE, G. C.; MACCHERONI JR., W.; de BLANCO, C. G.; AZEVEDO, J. L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, St. Paul, v. 92, n. 5, p. 464-477, May 2002.

BARKER G. M.; ADDISON P. J. Influence of clavicipitaceous endophyte infection in ryegrass on development of the parasitoid *Microctonus hyperodae* Loan (Hymenoptera: *Braconidae*) in *Listronotus Bonariensis* (Kuschel) (Coleoptera: *Curculionidae*). **Biological Control**, San Diego, v. 7, n. 3, p. 281-287, Dec. 1996.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi.** New York: MacMillan, 1987. 218 p.

BAYMAN, P.; ANGULO-SANDOVAL, P.; BÁEZ-ORTIZ, Z.; LODGE, J. D. Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, n. 8, p. 944-948, Aug. 1998.

BAYMAN, P.; LEBRÓN, L. L.; TREMBLAY, R.; LODGE, J. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). **New Phytologist**, Cambridge, v. 135, n. 1, p. 143-149, Jan. 1997.

BERNSTEIN, M. E.; CARROLL, G. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 55, p. 644-653, 1977.

BILLS, G. F. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. In: REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. (Ed.) **Endophytic fungi in grasses and woody plants.** St. Paul: APS Press, 1996. p. 31-65.

BILLS, G. F.; POLISHOOK, J. D. Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. **Mycologia**, New York, v. 86, n. 2, p. 187-198, Mar. /Apr. 1994a.

BILLS, G. F.; POLISHOOK, J. D. Microfungi from *Carpinus caroliniana*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 7, p. 1477-1482, July 1991.

BILLS, G. F.; POLISHOOK, J. D. Microfungi from decaying leaves of *Heliconia mariae* (Heliconiaceae). **Brenesia**, San Jose, v. 41/42, p. 27-43, 1994b.

BILLS, G. F.; POLISHOOK, J. D. Microfungi from decaying leaves of two rain forest trees in Puerto Rico. **Journal of Industrial Microbiology**, Hampshire, v. 17, n. 3/4, p. 284-294, Sept. /Oct. 1996.

BILLS, G. F.; POLISHOOK, J. D. Recovery of endophytic fungi from *Chamaecyparis thyooides*. **Sydowia**, Horn, v. 44, n. 1, p. 1-12, 1992.

BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR377, a new pentakide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 63, n. 10, p. 1447-1448, Oct. 2000.

CÂMARA, M. P. S.; PALM, M. E.; BERKUM, P. van.; STEWART. Systematics of *Paraphaeosphaeria*: a molecular and morphological approach. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 1, p. 41-56, Jan. 2001.

CÂMARA, M. P. S.; RAMALEY, A. W.; CASTLEBURY, L. A.; PALM, M. E. *Neophaeosphaeria* and *Phaeosphaeriopsis*, segregates of *Paraphaeosphaeria*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, n. 5, p. 516-522, May 2003.

CANNON, P. F.; SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 2, p. 210-220, Mar. /Apr. 2002.

CARROLL, G. C. Forest endophytes: pattern and process. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. S1316-S1324, 1995. Supplement 1.

• CARROLL, G. C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogens to mutualistic symbiont. **Ecology**, Washington, v. 69, n. 7, p. 2-9, Oct. 1988.

◦ CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 56, n. 24, p. 3034-3043, Dec. 1978.

CARROLL, G. C.; PETRINI, O. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. **Mycologia**, New York, v. 75, n. 1, p. 53-63, Jan. /Feb. 1983.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungal in sterile distilled water, for the researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 70, n. 8, p. 181-184, 1967.

CASTRO, G. C. de. *Análise da estrutura, diversidade florística e variações espaciais do componente arbóreo de corredores de vegetação na região do Alto Rio Grande*. 2004. 83 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

• CHANWAY, C. P. Endophytes: they're not just fungi! **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 74, n. 3, p. 321-322, Mar. 1996.

CLAY, K. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. **Ecology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 10-16, Feb. 1988.

DE GRUYTER, J.; NOORDELOOS, M. E.; HAMERS, M. E. C.; BOOREMA, G. H. (Ed.) **Phoma identification manual: differentiation of specific and infra-specific taxa in culture.** Wallingford: CABI Publishing, 2004. 470 p.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi.** London: Academic Press, 1980. 2v. Reprint 1993

ELLIS, M. B. **Dematiaceous hyphomycetes.** Wallingford: CAB International, 1971. 608 p.

ELLIS, M. B. **More dematiaceous hyphomycetes.** Wallingford: CAB International, 1976. 507 p.

FARR, D. F.; BILLS, G. F.; CHAMURIS, G. P.; ROSSMAN, A. Y. **Fungi on plants and plant products in the United States.** St. Paul: APS Press, 1995. 1251 p.

FISHER, P. J.; ANSON, A. E.; PETRINI, O. Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 86, n. 1, p. 153-156, 1986.

FISHER, P. J.; PETRINI, O. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). **New Phytologist**, Cambridge, v. 120, n. 1, p. 137-143, Jan. 1992.

FISHER, P. J.; PETRINI, O. Location of fungal endophytes in tissues of *Suaeda fruticosa*: a preliminary study. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 89, n. 2, p. 246-249, Sept. 1987.

FREIRE, F. C. O.; BEZERRA, J. L. Foliar endophytic fungi of Ceará State (Brazil): a preliminary study. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 304-308, jul. /set. 2001.

FRÖHLICH, J.; HYDE, K.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with palms. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 10, p. 1202-1212, Oct. 2000.

GAMBOA, M. A.; BAYMAN, P. Communities of endophytic fungi in leaves of tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). **Biotropica**, St. Louis, v. 33, n. 2, p. 352-360, June 2001.

GAMBOA, M. A.; LAUREANO, S.; BAYMAN, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 156, n. 1, p. 41-45, 2003.

GAMS, W. **Cephalosporium-like hyphomycetes**. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1997. 122 p. Apostila.

GAMS, W.; HOEKSTRA, E. S.; APTROOT, A. **CBS course of mycology**. 4. ed. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1998. 165 p. Apostila.

GAUCH JUNIOR, H. G. **Multivariate analysis in community ecology**. New York: Cambridge University Press, 1982. 298 p.

GONZÁLES, E.; IGLESIAS, I.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. Oxford, v. 70, n. 3, p. 329-333, June 2000.

GUO, L. D.; HYDE, K. D.; LIEW, E. C. Y. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, San Diego, v. 20, n. 1, p. 1-13, July 2001.

GUO, L. D.; HYDE, K. D.; LIEW, E. C. Y. Identification of endophytic fungi from *Livistonia chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytologist*, Cambridge v. 147, n. 3, p. 617-630, Sept. 2000.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T. **PAST - Palaeontological STatistics** v. 1,26. 2004. Disponível em: <<http://folk.uio.no/ohammer/past/>> Acesso em: 13 jun. 2005.

HANLIN, R. T. **Combined keys to illustrated genera of Ascomycetes**. Saint Paul: American Phytopathology Society, 1998. 2v, 120 p.

HANLIN, R. T. **Illustrated genera of Ascomycetes**. Saint Paul: American Phytopathology Society, 1990. v. 1, 263 p.

HANLIN, R. T. **Illustrated genera of Ascomycetes**. Saint Paul: American Phytopathology Society, 1998. v. 2, 268 p.

HATA, K.; ATARI, R.; SONE, K. Isolation of endophytic fungi from leaves of *Pasania edulis* and their within-leaf distributions. *Mycoscience*, Tokyo, v. 43, p. 369-373, 2002.



HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and its implication for genetic resource collections. In: CROUS, P. W.; SAMSON, R. A.; GAMS, W.; SUMMERBELL, R. C.; BOEKHOUT, T.; HOOG, G. S. de; STALPERS, J. A. (Ed.). **CBS Centenary: 100 Years of Fungal Biodiversity and Ecology**. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2004. p. 9-18. (Studies in Mycology, n. 50).

HECK JUNIOR, K. L.; BELLE, G. van; SIMBERLOFF, D. Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. **Ecology**, Washington, v. 56, n. 6, p. 1459-1461, 1975.

HUSTON, M. Biological diversity, soils, and economics. **Science**, Washington, v. 262, n. 5140, p. 1676-1679, Dec. 1993.

JEEWON, R.; LIEW, E. C. Y.; HYDE K. D. Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 25, n. 3, p. 378-392, Dec. 2002.

JEEWON, R.; LIEW, E. C. Y.; SIMPSON, J. A.; HODGKISS, I. J.; HYDE K. D. Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San diego, v. 27, n. 3, p. 372-383, June 2003.

JOHANSSON, S.; GULLBO, J.; LINDHOLM, P.; EK, B.; THUNBERG, E.; SAMUELSSON, G.; LARSSON, R.; BOHLIN, L.; CLAESON, P. Small, novel proteins from the mistletoe *Phoradendron tomentosum* exhibit highly, selective cytotoxicity to human breast cancer cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 60, n. 1, p. 165-175, Jan. 2003.

JOHNSTON, P. R. Leaf endophytes of manuka (*Leptospermum scoparium*). **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, n. 8, p. 1009-1016, Aug. 1998.

KENT, M.; COKER, P. **Vegetation description and analysis: a practical approach**. London: Belhaven Press, 1992. 363 p.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J. A. (Ed.). **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**. 9. ed. Wallingford: CAB International, 2001. 655 p.

KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; AUST, H. J.; DRAGER, S.; SCHULZ, B. Geniculol, a new biologically active diterpene from the endophytic fungus *Geniculosporium* sp. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 62, n. 1, p. 155-157, Jan. 1999.

LEE, J. C.; LOBOKOVSKY, E.; STROBEL, G. A.; CLARDY, J. Torreyanic acid: a selectively cytotoxic quinone dimmer from the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 61, n. 10, p. 3232-3233, May 1996.

LEE, S. B., AND J. W. TAYLOR. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In M. A. INNIS, D. H. GELFAND, J. T. SNINSKY, AND T. J. WHITE (ED.), **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 282-287.

LI, J. Y.; STROBEL, G.; HARPER, J. K. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. **Organic Letters**, Washington, v. 2, n. 6, p. 767-770, Mar. 2000.

LODGE, D. J. Factors related to diversity of decomposer fungi in tropical forests. **Biodiversity and Conservation**, Washington, v. 6, n. 5, p. 681-688, May 1997.

LODGE, D. J.; FISHER, P. J.; SUTTON, B. C. Endophytic fungi on *Manilkara bidentata* in Puerto Rico. **Mycologia**, New York, v. 88, n. 5, p. 733-738, Sept./Oct. 1996.

LONG, D. M.; SMIDMANSKY, E. D.; ARCHER, A. J.; STROBEL, G. A. In vivo addition of telomeric repeats to foreign DNA generates chromosomal DANs in the taxol-producing fungus *Pestalotiopsis microspora*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 24, n. 3, p. 335-344, Aug. 1998.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352 p.

MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton: Princeton University Press, 1988. 179 p.

MC ALEECE, N. **Biodiversity Profesional Beta 1**. The Natural History Museum & The Scottish Association for Marine Science, 1997.

MC CUNE, B.; MEFFORD, M. J. **PC ORD - Multivariate analysis of ecological data**. Version 3. 12. Glenenden Beach, Oregon: M. J. M Software, 1997.

MENDES, M. A. S.; SILVA, V. L.; DIANESE, J. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; SANTOS, C. E. N.; GOMES NETO, E.; URBEN, A. F.; CASTRO, C. (Ed.). **Fungos em plantas no Brasil**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa Cenargen, 1998. 555 p.

MINITAB INC. MINITAB<sup>®</sup> Release 14. 2003.

MOLLER EM, BAHNWEIG G, SANDERMANN H, AND GEIGER HH. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, v 20, p. 6115-6116. 1992

MOSTERT, L.; CROUS, P. W.; KANG, J.; PHILLIPS, A. J. L. Species of *Phomopsis* and a *Libertella* sp. occurring on grapevines with specific reference to South Africa: morphological, cultural, molecular and pathological characterization. **Mycologia**, Lawrence, v. 93 n. 1, p. 146-167, Jan./Feb. 2001.

NAG RAJ, T. R. **Coelomycetous anamorphs with appendage-bearing conidia**. Waterloo: Mycologue Publications, 1993. 1101 p.

OKANE, I.; NAKAGIRI, A.; ITO, T. Endophytic fungi in leaves of ericaceous plants. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 76, n. 4, p. 657-663, Apr. 1998.

OKANE, I.; NAKAGIRI, A.; ITO, T. Identity of *Guignardia* sp. inhabiting ericaceous plants. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 79, n. 1, p. 101 - 109, Jan. 2001.

PANDEY, A. K.; REDDY, M. S.; SURYANARAYANAN, T. S. ITS-RFLP and ITS sequence analysis of a foliar endophytic *Phyllosticta* from different tropical trees. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, n. 4, p. 439-444, Apr. 2003.

PAULUS, B.; GADEK, P.; HYDE, K. Estimation of microfungi diversity in tropical rainforest leaf litter using particle filtration: the effects of leaf storage and surface treatment. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, n. 6, p. 748-756, June 2003.

- PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Ed.). **Microbial ecology of leaves**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. p. 179-197.
  
- PETRINI, O.; CARROLL, G. C. Endophytic fungi in foliage of some *Cupressaceae* in Oregon. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 59, n. 5, p. 629-636, May 1981.
  
- PETRINI, O.; FISHER, P. J. Fungal endophytes in *Salicornia perennis*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 87, n. 4, p. 647-651, Dec. 1986.
  
- PETRINI, O.; HAKE, U.; DREYFUSS, M. M. An analysis of fungal communities isolated from fruticose lichens. **Mycologia**, New York, v. 82, n. 4, p. 444-451, July/Aug. 1990.
  
- PETRINI, O.; PETRINI, L. Xylariaceous fungi as endophytes. **Sydowia**, Horn, v. 38, p. 216-234, 1985.
  
- PETRINI, O.; PETRINI, L.; RODRIGUES, K. F. Xylariaceous endophytes: an exercise in biodiversity. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 531-539, dez. 1995.
  
- PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, Hoboken, v. 1, p. 185-196, 1992.
  
- PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, K. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 12, p. 1508-1513, Dec. 2001.
  
- POLISHOOK, J. D.; BILLS, G. F.; LODGE, D. J. Microfungi from decaying leaves of two rain forest trees in Puerto Rico. **Journal of Industrial Microbiology**, v 17, p. 284-294, 1996.
  
- RAYNER, R. W. Latent infection in *Coffea arabica* L. **Nature**, London, v. 161, n. 4085, p. 245-246, 1948.
  
- REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist**, Cambridge, v. 151, n. 3, p. 705-716, Sept. 2001.

REHNER, S. A.; UECKER, F. A. Nuclear ribosomal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 72, n. 11, p. 1666-1674, Nov. 1994.

RICHTER, A. Viscumitol, a dimethyl-ether of mucoinositol from *Viscum album*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, n. 11, p. 3925-3927, Nov. 1992.

RODRIGUES, K. F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. **Mycologia**, New York, v. 86, n. 3, p. 376-385, May/June 1994.

RODRIGUES, K. F.; SAMUELS, G. J. Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 39, n. 2, p. 131-135, 1999.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R. dos; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom disease. **International Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v. 1, n. 1, p. 24-33, 2005.

SCHARDL, C. L.; CLAY, K. Evolution of mutualistic endophytes from plant pathogens. In: CARROL & TUDZYNSKI (Ed.) **The Mycota V Part B Plant Relationships**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. p. 221-236.

SCHULTZ, A. R. **Introdução ao estudo da botânica sistemática**. 4. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1977. 539 p.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n. 6, p. 661-686, June. 2005.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, n. 9, p. 996-1004, Sept. 2002.

SCHULZ, B.; RÖMMERT, A.; DAMMANN, U.; AUST, H.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? **Mycological Research**, Cambridge, v. 103, n. 10 p. 1275-1283, Oct. 1999.

SCHULZ, B.; WANKE, U.; DRAEGER, S.; AUST, H. J. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 12, p. 1447-1450, Dec. 1993.

SHERWOOD-PIKE, M.; STONE, J. K.; CARROLL, G. C. *Rhabdocline parkeri*, a ubiquitous foliar endophyte of Douglas fir. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 64, n. 9, p. 1849-1855, Sept. 1986.

SIEBER, T. N.; PETRINI, O.; GREENACRE, M. J. Correspondence Analysis as a tool in fungal taxonomy. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 21, n. 3, p. 433-441, Aug. 1998.

- SINCLAIR, J. B.; CERKAUSKAS, R. F. Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. In: REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. (Ed.) **Endophytic fungi in grasses and woody plants**. St. Paul: APS Press, 1996. p. 03-29.

SMITH, H.; WINGFIELD, M. J.; PETRINI, O. *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus nitens* in South Africa. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 89, n. 1/3, p. 189-195, Dec. 1996.

SOKAL, R. R.; ROHLF, J. F. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. 3. ed. New York: W. H. Freeman, 1995. 887 p.

SREENIVASAPRASAD, P. R.; MILLS, B. M.; BROWN, A. E. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. **Genome**, Ottawa, v. 39, n. 3, p. 499-512, June 1996.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, Washington, v. 260, n. 5105, p. 214-216, Apr. 1993.

STROBEL, G.; DAYSI, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, n. 4, p. 491-502, Dec. 2003.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, Washington, v 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

STROBEL, G. A.; TORCZYNSKI, R.; BOLLON, A. *Acremonium* sp. – a lecinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). **Plant Science**, Clare, v. 128, n. 1, p. 97-108, Sept. 1997.

STROBEL, G. A.; YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R. S.; HESS, W. M. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology**, Reading, v. 142, n. 2, p. 435-440, Feb. 1996.

SURYANARAYANAN, T. S.; MURALI, T. S.; VENKATESAN, G. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 80, n. 8, p. 818-826, Aug. 2002.

SURYANARAYANAN, T. S.; VENKATESAN, G.; MURALI, T. S. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution. **Current Science**, Bangalore, v. 85, n. 4, p. 489-493, Aug. 2003.

SUTTON, B. C. **The coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia acervuli and stromata**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.

VERKLEY, G. M.; SILVA, M. da; WICKLOW, D. T.; CROUS, P. W. *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. In: CROUS, P. W.; SAMSON, R. A.; GAMS, W.; SUMMERBELL, R. C.; BOEKHOUT, T.; HOOG, G. S. de; STALPERS, J. A. (Ed.). **CBS Centenary: 100 Years of Fungal Biodiversity and Ecology**. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2004. p. 323-335. (Studies in mycology, n. 50).

VIRET, O.; PETRINI, O. Colonization of beech leaves (*Fagus sylvatica*) by the endophyte *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomia errabunda*). **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, n. 4, p. 423-432, Apr. 1994.

WAGENAAR, M. M.; CORWIN, J.; STROBEL, G.; CLARDY, J. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinocladiella*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 63, n. 12, p. 1692-1695, Dec. 2000.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 2. ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1984. 718 p.

ZHOU, D.; HYDE, K. Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 12, p. 1449 - 1457, Dec. 2001.

ZOU, W. X.; MENG, J. C.; LU, H.; CHEN, G. X.; SHI, G. X.; ZHANG, T. Y.; TAN, R. X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 63, n. 11, p. 1529-1530, Nov. 2000.