



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE BIOMAS TROPICAIS

ROGÉRIO LEONARDO RODRIGUES

Fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta*  
Mart. ex Schult. F. (*Velloziaceae*) presente em  
afloramentos rochosos nos estados de  
Minas Gerais e Tocantins

Ouro Preto, 2010

**Rogério Leonardo Rodrigues**

**Fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* Mart. ex Schult. f. (*Velloziaceae*)  
presente em afloramentos rochosos nos estados  
de Minas Gerais e Tocantins**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Ouro Preto,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ecologia de Biomas Tropicais para  
obtenção do título de Mestre em  
Ecologia de Biomas Tropicais.

**Orientador:** Dr. Luiz Henrique Rosa

**Ouro Preto - MG  
2010**

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho a todos aqueles que direta, ou indiretamente, contribuíram e contribuem para o desenvolvimento social.*

*Altruísmo nada mais é do que o reflexo da percepção egoísta daqueles que vêem que seu crescimento está vinculado no sentimento de gratidão recebido.*

## **PARA REFLETIR**

*“Para conhecermos os amigos é necessário passar pelo sucesso e pela desgraça. No sucesso, verificamos a quantidade e, na desgraça, a qualidade.”*  
Confúcio

*“O segredo é não correr atrás das borboletas... É cuidar do jardim para que elas venham até você.”*  
Mário Quintana

*“O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar de novo com mais inteligência.”*  
Henry Ford

*“É necessário ter o caos cá dentro para gerar uma estrela.”*  
Friedrich Nietzsche

*“Quem me rouba a honra priva-me daquilo que não o enriquece e faz-me verdadeiramente pobre.”*  
William Shakespeare

*“A dignidade pessoal e a honra não podem ser protegidas por outros. Devem ser zeladas pelo indivíduo em particular.”*  
Mahatma Gandhi

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, minha eterna gratidão aos meus pais, AMIGOS de total pureza e fidelidade e de todos os momentos, professores de vida e responsáveis pela base, o alicerce sobre o qual escrevo a minha história.

Quanto a Ouro Preto, tem uma frase tradicional que diz: “é o céu e o inferno”, pois pra mim foi o céu que me proporcionou os melhores anos de minha vida e as experiências mais enriquecedoras para minha emancipação como indivíduo.

Na mesma linha, à eterna República Partenon, singular em tudo pra mim, um dos poucos lugares onde a essência da democracia ainda se faz presente e, à Universidade Federal de Ouro Preto, onde tive a oportunidade de buscar o tão precioso conhecimento. Farei o possível para retribuir-lhe à altura.

Agradeço em especial, ao professor Dr. Luiz Henrique Rosa, exemplo de determinação, tranquilidade, acessibilidade e sensatez a ser seguido e que sempre se manteve pronto a direcionar quem quer que tenha interesse, ao fantástico mundo dos microrganismos.

Não menos importante, minha gratidão aos professores, Dr. Sérgio Pontes Ribeiro, Dra. Yasmine Antonini, Dra. Maria Célia Lanna, dentre outros, professores dentro e fora da escola.

Aos amigos e colegas do laboratório de Microbiologia da UFOP, Laurinha, Cérebro, Iara, Carol, Francisco, Mariana, Luizinho, Marli e todos os demais. Foi fantástico trabalhar com vocês.

Aos meus amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Biomas Tropicais: Canuto, Rodolfo, Thécia, Zé Colméia, Véio, Biskoito, ao secretário Rubens e todos os demais.

À Turma de Biologia 2003, Gastela, Maju, Auny, Miojo, Chico, Alexandre, vocês sempre serão grandes amigos, mesmo aqueles que estão longe.

Aos eternos irmãos e “amigos de rock”, Gasolina, Zé Colméia, Boca, Caxelê, Cera, às amigas republicanas em geral e a tantos outros que tornaram tudo isso extremamente agradável. Valeu meu povo!

Enfim, aos professores que tive dentro e fora das escolas, aos queridos e verdadeiros amigos e à minha querida família.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	4
SUMÁRIO.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS .....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT .....	12
LISTA DE ABREVEATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	13
1. INTRODUÇÃO .....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1. Ecologia microbiana .....	17
2.1.1. Ecologia de fungos .....	18
2.1.2. Os fungos endofíticos .....	19
2.2. <i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. f. ....	22
3. OBJETIVOS .....	24
3.1. Geral .....	24
3.2. Específicos .....	24
4. METODOLOGIA.....	25
4.1. Locais de coleta .....	25
4.1.1. Serra do Ouro Branco-MG .....	25
4.1.2. Parque Estadual do Jalapão-TO .....	26
4.2. Coleta dos espécimes vegetais .....	27
4.3. Isolamento, cultivo e preservação dos fungos endofíticos .....	27
4.4. Agrupamento em morfoespécies dos isolados endofíticos .....	28
4.5. Identificação dos fungos .....	28
4.5.1. Extração do DNA total.....	29
4.5.2. Obtenção dos amplicons.....	30
4.5.3. Purificação dos amplicons .....	30
4.5.4. Reações de seqüenciamento.....	31
4.5.5. Precipitação da reação de seqüenciamento.....	31
4.5.6. Análise computacional das seqüências.....	32
4.6. Análise dos dados .....	33

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1. Análise dos dados.....	55
6. CONCLUSÃO.....	57
6.1 Novas perspectivas de estudo:.....	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Área de coleta na Serra do Ouro Branco, Minas Gerais. Detalhe do campo de <i>Vellozia compacta</i> . L. H. Rosa.....	27
Figura 2: Colônias de fungos isolados saindo de folhas (a) e raízes (b) de <i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. f. ....	35
Figura 3: Número de fungos endofíticos isolados de folhas e raízes na Serra do Ouro Branco e no Parque Estadual do Jalapão. ....	35
Figura 4: Exemplos de algumas morfoespécies de fungos endofíticos isolados de folhas e raízes de <i>Vellozia compacta</i> . ....	37
Figura 5: Árvore filogenética demonstrando a proximidade entre o táxon UFOPCB 1615 e as espécies mais próximas a partir do alinhamento no BLAST. <i>Trametes versicolor</i> (AF042324) foi utilizado como grupo externo. ....	41
Figura 6: Árvore filogenética demonstrando a proximidade entre o táxon UFOPCB 1593 e as espécies mais próximas a partir do alinhamento no BLAST. <i>Trametes versicolor</i> (AF042324) foi utilizado como grupo externo. ....	43
Figura 7: Árvore filogenética demonstrando a proximidade entre o táxon UFOPCB 1628 e as espécies mais próximas a partir do alinhamento no BLAST. <i>Trametes versicolor</i> (AF042324) foi utilizado como grupo externo. ....	44
Figura 8: Árvore filogenética demonstrando a proximidade entre os táxons UFOPCB 1611 e 1619 e as espécies mais próximas a partir do alinhamento no BLAST. <i>Trametes versicolor</i> (AF042324) foi utilizado como grupo externo. ....	47
Figura 9: Árvore filogenética demonstrando a proximidade entre os táxons UFOPCB 1612 e 1627 e as espécies mais próximas a partir do alinhamento no BLAST. <i>Trametes versicolor</i> (AF042324) foi utilizado como grupo externo. ....	49
Figura 10: Árvore filogenética demonstrando a proximidade entre o táxon UFOPCB 1597 e as espécies mais próximas a partir do alinhamento no BLAST. <i>Trametes versicolor</i> (AF042324) foi utilizado como grupo externo. ....	50



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de isolados (Ni) e frequência relativa (fr) de fungos endofíticos obtidos de folhas e raízes de <i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. f. ( <i>Velloziaceae</i> ).....	36
Tabela 2: Identificação dos fungos endofíticos associados à <i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. f. ( <i>Velloziaceae</i> ) presente na Serra do Ouro Branco, Minas Gerais.....	39
Tabela 3: Identificação dos fungos endofíticos associados à <i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. f. ( <i>Velloziaceae</i> ) presente no Parque Estadual do Jalapão, Tocantins.....	40
Tabela 4: Resumo das principais relações ecológicas dos fungos associados à <i>Vellozia compacta</i> Mart. ex Schult. f., conforme comparação com a literatura.	53
Tabela 5: Taxa de Colonização (Tc) comparativa para os ambientes (SOB e PEJ) e para folhas e raízes de <i>V.compacta</i> .	56

## RESUMO

A *Vellozia compacta* Mart. ex Schult. & Schult. F. (*Velloziaceae*), popularmente conhecida como canela-de-ema, é uma monocotiledônea tropical, endêmica, comum nas formações quartzíticas e adaptada aos múltiplos estresses bióticos e abióticos do ambiente. Fungos endofíticos são microrganismos que habitam o interior dos tecidos vegetais, de forma inter ou intracelular, sem lhes causar danos aparentes e são pouco conhecidos, tanto quanto à biodiversidade, quanto aos diferentes fatores ecológicos envolvidos na associação fungo-hospedeiro e fungo-habitat da planta envolvida. No presente estudo foi avaliada a presença de fungos endofíticos associados a folhas e raízes de *V. compacta* presente em Afloramentos Rochosos dos estados de Minas Gerais e Tocantins. Fragmentos de folhas e raízes sem qualquer tipo de dano ou doença aparente foram alvos para o isolamento dos fungos endofíticos. Após coleta e isolamento foram obtidos 97 isolados de fungos endofíticos, 43 obtidos de velozias presentes na Serra do Ouro Branco e 54 de velozias presentes no Parque Estadual do Jalapão. Do total, 37 isolados foram obtidos das folhas e 60 das raízes. Todos os isolados foram devidamente preservados na Coleção de Culturas de Fungos do Laboratório de Microbiologia DECBI/ICEB/UFOP. Os fungos foram identificados por meio do seqüenciamento das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do gene rDNA e pertencem aos gêneros *Acarospora* A. Massal, *Chaetomium* Kunze, *Diaporthe* Nitschke, *Gelasinospora* Dowding, *Fusarium* Link, *Penicillium* Link, *Pestalotiopsis* Steyaert, *Phoma* Sacc., *Phomopsis* (Sacc.) Sacc., *Xylaria* Hill ex Schrank, *Alternaria* Nees, *Cladosporium* Link, *Simplicillium* Zare & W. Gams, *Teratosphaeria* Syd. & P. Syd. Dentre as espécies identificadas, *Fusarium oxysporum* foi a mais freqüente, seguida de *Pestalotiopsis microspora* e *Cladosporium cladosporioides*. Em nível de gênero, *Penicillium* e *Phomopsis* foram os mais freqüentes. A Taxa de Colonização ( $T_c$ ) obtida em *V. compacta* foi de 20 %, sendo 16,6 % maior no PEJ em relação à SOB e 22 % maior nas raízes do que nas folhas. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que *V. compacta* constitui um interessante e singular reservatório natural de fungos endofíticos.

Palavras-chave: fungos endofíticos, *Vellozia compacta*, ecologia de fungos, biodiversidade, endemismo.

## ABSTRACT

The *Vellozia compact* Mart. ex Schult. & Schult. F. (Velloziaceae), popularly known as canela-de-ema, is a tropical monocot, endemic, common in quartzite formations and adapted to multiple biotic and abiotic stresses. Endophytic fungi are microorganisms that live inside the vegetal tissues, in spaces inter or intracellular, without causing any apparent damage and they are poorly known, both in terms of biodiversity, as the various ecological factors involved in fungus-host and fungus-habitat of the plant involved association. In this study evaluated the presence of endophytic fungi associated with leaves and roots of *V. compact* on rocky outcrops of the states of Minas Gerais and Tocantins. Fragments of leaves and roots without any apparent damage or disease were targeted for isolation of endophytic fungi. After collection and isolation were obtained 97 isolates of endophytic fungi, 43 obtained from vellozias present in Serra do Ouro Branco and 54 of the vellozias present in Parque Estadual do Jalapão. Of the total, 37 isolates were obtained from the leaves and 60 from the roots. All isolates were properly preserved in the Culture Collection of Fungi of Microbiology Laboratory DECBI/ICEB/UFOP. The fungi were identified by sequencing of the regions ITS1-5.8S-ITS2 of rDNA gene and belong to the genus *Acarospora* A. Massal, *Chaetomium* Kunze, *Diaporthe* Nitschke, *Gelasinospora* Dowding, *Fusarium* Link, *Penicillium* Link, *Pestalotiopsis* Steyaert, *Phoma* Sacc., *Phomopsis* (Sacc.) Sacc., *Xylaria* Hill ex Schrank, *Alternaria* Nees, *Cladosporium* Link, *Simplicillium* Zare & W. Gams, *Teratosphaeria* Syd. & P. Syd. Among the identified species, *Fusarium oxysporum* was the most frequent, followed by *Pestalotiopsis microspora* and *Cladosporium cladosporioides*. In the genus level, *Penicillium* and *Phomopsis* were the most frequent. The Colonization Rate (Tc) obtained from *V. compact* was 20%, being 16.6% higher in PEJ than SOB and 22% higher in roots than in leaves. The results of this study showed that *V. compact* is an interesting and unique natural reservoir of endophytic fungi.

Keywords: endophytic fungi, *Vellozia compacta*, fungal ecology, biodiversity, endemism.

## LISTA DE ABREVEATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BDA: Agar Dextrose Batata

CTAB: Brometo de cetil trimetilamonio

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

HCl: Ácido clorídrico

HPJB: Herbário Professor José Badini

LBEM: Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular

M: molar

mg: miligrama

MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio

MgSO<sub>4</sub>: Sulfato de magnésio

mg/mL: miligrama/mililitro

mL: Mililitro

mM: Milimolar

mol/L : mol por litro

NaCl: Cloreto de sódio

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PEG: polietilenoglicol

PEJ: Parque Estadual do Jalapão - TO

p/v: peso por volume

rDNA: DNA ribossomal

r.p.m.: Rotações Por Minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SOB: Serra do Ouro Branco – MG

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto

UFOPCB: Coleção de Culturas de Fungos da Universidade Federal de Ouro Preto

µg: Micrograma

µg/mL: micrograma/mililitro

µl: Microlitro

%: Porcentagem

°C: Graus Celsius

## 1. INTRODUÇÃO

O reino *Fungi* representa um grupo microbiano pouco conhecido, tanto filogeneticamente quanto à ecologia específica e tem sido alvo crescente de estudos para o entendimento das suas interações com os seres vivos e com o meio que os cerca. Nas interações ecológicas (fungo-hospedeiro), por exemplo, pode haver a produção de metabólitos secundários por parte dos fungos em resposta às condições ambientais bióticas e/ou abióticas sofridas pelo hospedeiro. Por sua vez, esses metabólitos muitas vezes desempenham funções adaptativas essenciais ao hospedeiro, tanto em relação ao ambiente, quanto em relação à proteção contra predação e parasitismo por outros seres. Tais relações ecológicas no ambiente, em geral, são de extrema importância para o funcionamento e manutenção dos ecossistemas terrestres. As diferentes associações entre microrganismos e plantas, por exemplo, atuam no controle biológico de patógenos, influenciam na solubilização de minerais e contribuem para a estruturação ecológica dos ecossistemas.

Quanto aos fungos endofíticos, estes são microrganismos que vivem inter ou intracelularmente nos tecidos de sua planta hospedeira, em algum tempo do seu ciclo de vida (PETRINI *et al.* 1992), sem causar sintomas aparentes de doenças (SINCLAIR *et al.* 1996; *apud* ESTEVES *et al.* 2007) e que podem estar associados à planta de forma neutra, simbiótica, ou antagônica.

Acredita-se que todas as plantas podem ser hospedeiras de um ou mais fungos endofitos, já que estes foram encontrados em todas as espécies de plantas pesquisadas até o momento, podendo haver ou não interespecificidade e/ou dependência. O conhecimento destes microrganismos, de sua biodiversidade, da filogenia e das relações ecológicas bióticas e abióticas, é promissor e de suma importância para se entender as diferentes interações e funcionalidades em um ecossistema, para a bioprospecção e para a biotecnologia.

*Vellozia compacta* é uma planta endêmica dos Campos Rupestres, presente em afloramentos rochosos e adaptada às condições limitantes de

sobrevivência, tais como: baixa disponibilidade de água e nutrientes, excesso de radiações solares (principalmente UV), entre outras.

De acordo com STROBEL *et al.* (2004), alguns critérios são utilizados para a escolha de plantas alvos para o isolamento de fungos endofíticos. Entre eles se destacam a seleção de plantas presentes em ecossistemas únicos e/ou adaptadas a condições limitantes de sobrevivência, quando comparadas à maioria das plantas terrestres. *Vellozia compacta* é uma espécie de planta adaptada a um ambiente singular por suas características abióticas peculiares e restritivas, como alta radiação UV, baixa disponibilidade hídrica e de nutrientes, dentre outras, e devido a estas características foi selecionada neste estudo como alvo para o conhecimento da sua comunidade de fungos endofíticos associados. Quanto aos ambientes, comparativamente estes apresentam localização geográfica, condições climáticas, composição faunística e da flora, consideravelmente distintas e de grande valor ecológico, singulares a cada um.

*Ao final deste trabalho espera-se responder às seguintes perguntas:*

- A espécie *Vellozia compacta* constitui uma fonte de fungos endofíticos em seus tecidos vegetais?
- Qual a diversidade de espécies de fungos endofíticos em *V. compacta*?
- *V. compacta* abriga possíveis novas espécies de fungos endofíticos? Ou endêmicas?
- Existe uma similaridade entre as espécies de fungos presentes nos afloramentos rochosos dos estados de Minas Gerais e Tocantins?
- Baseado na literatura, as espécies de fungos associados à *V. compacta* apresentam alguma importância ecológica, evolutiva ou biotecnológica?



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Ecologia microbiana

O funcionamento dos ecossistemas terrestres depende de uma intrincada e complexa rede formada pelo balanço entre os diferentes fatores físicos, químicos e biológicos do ambiente. A fração biológica é composta por anelídeos, insetos, nematóides e, principalmente por microrganismos (bactérias e fungos). Os microrganismos realizam diversas funções ecológicas essenciais, tais como decomposição da matéria orgânica, liberação de nutrientes em formas disponíveis às plantas e degradação de substâncias tóxicas. Além disso, formam diferentes associações com plantas, atuam no controle biológico de patógenos, influenciam na solubilização de minerais e contribuem para a estruturação ecológica do ecossistema, a exemplo dos fungos endofíticos (KENNEDY *et al.* 2002; *apud* ARAUJO *et al.* 2007).

A partir da segunda metade do século XX a ecologia microbiana se desenvolveu como uma disciplina independente, demonstrando que os princípios gerais da ecologia são aplicáveis aos microrganismos e que estes princípios podem ser integrados aos atuais paradigmas ecológicos. Desde então, mudanças revolucionárias surgiram devido ao impacto das novas tecnologias dentro das áreas da biologia celular e molecular e têm contribuído profundamente para melhorar e aprofundar o conhecimento acerca das relações entre os microrganismos e o ambiente (ECO QUÍMICA: Portal de Química e Meio Ambiente, 2009). Além disso, as ferramentas moleculares possibilitaram as condições necessárias para expandir o conhecimento relativo à composição, à fisiologia e à filogenia das comunidades microbianas, o que é fundamental para as investigações na área da ecologia microbiana e para o entendimento e a determinação da forma como se desenvolve o equilíbrio em comunidades microbianas que é de suma importância para o equilíbrio dos ecossistemas como um todo.

### 2.1.1. *Ecologia de fungos*

Os fungos, “organismos aclorofilados, nucleados, produtores de esporos, que geralmente se reproduzem sexuadamente e assexuadamente e cujas estruturas somáticas filamentosas e ramificadas são envolvidas por paredes celulares contendo celulose, quitina, ou ambas” (ALEXOUPOULOS *et al.* 1996; *apud* DIAS, 2005), são objeto de estudo da Micologia, possuindo ainda ramificações, aplicações e disciplinas na medicina, veterinária, bioquímica, genética, citologia, ecologia, dentre outras.

Estes organismos são heterotróficos e, portanto não podem sintetizar moléculas orgânicas a partir de moléculas inorgânicas como fazem as plantas. Eles alimentam-se pela secreção de exoenzimas digestivas no substrato ao seu redor e então absorvem os nutrientes digeridos.

Estes organismos desempenham funções ecológicas únicas nos ecossistemas e ocorrem em todos os ambientes da Terra, seja dispersos no meio ambiente, associados a vegetais, no ar atmosférico, no solo, ou na água. Eles são os principais intervenientes no seqüestro de carbono, reciclagem de nutrientes, sucessão ecológica e apresentam uma ampla gama de comportamentos e interações, podendo ser decompositores ou saprófitos, parasitas, predadores, simbioses, mutualistas e comensais (HAWKSWORTH, 2004).

A maioria dos fungos são decompositores ou saprófitos primários em seus habitats, alimentando-se de matéria morta ou em decomposição, como folhas e outros detritos que se acumulam no solo, e assim promovendo a ciclagem biogeoquímica dos nutrientes que se tornam disponíveis para outros organismos. Muitos fungos são parasitas e se alimentam de organismos vivos sem matá-los e são responsáveis por doenças em plantas e animais como a ferrugem do milho, doença de olmo holandês, as micoses, dentre outras. Outros fungos, usualmente Ascomycetes, vivem como líquens, uma relação simbiótica muito estreita entre um fungo e um organismo fotossintético, ou como as micorrizas (SILVA, 2007).

A ecologia dos fungos é especialmente importante para as plantas. Por exemplo, as sementes de orquídeas não germinam até serem invadidas por fungos endomicorrízicos do gênero *Rhizoctonia*. Mais de 90% das espécies vegetais do planeta são dependentes de pelo menos um dos diferentes tipos de micorrizas, que é uma espécie de relação mutualística entre fungos e plantas, em que as raízes das plantas estão intimamente associadas com hifas e outras estruturas de fungos. A planta fornece os nutrientes, enquanto o fungo obtém água e minerais que a rede de hifas é capaz de encontrar muito mais eficientemente do que as raízes da planta (PEREIRA *et al.* 2005).

Hoje, mediante os inúmeros avanços e descobertas acerca do mundo ecológico microbiano nos ecossistemas, tem se tornado possível estudos e aplicabilidades destes microrganismos como ferramentas na biodegradação, na biorremediação e no biocontrole, temas de suma importância para a conservação e restauração ambiental. A biodiversidade fúngica é um componente chave na manutenção dos ecossistemas, pois os fungos estão intimamente envolvidos no seu adequado funcionamento, desempenhando funções no controle populacional e nas inúmeras sucessões ecológicas.

### 2.1.2. Os fungos endofíticos

#### 2.1.2.1. Biodiversidade de endofíticos

Os microrganismos endofíticos: protistas, insetos, bactérias e fungos que passam parte ou todo o seu ciclo de vida colonizando os espaços inter ou intracelulares de tecidos vivos de uma planta hospedeira, onde desempenham diferentes interação sem contudo causar efeitos negativos (SCHULZ *et al.* 2005; STROBEL *et al.* 2003).

Estes microrganismos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, mas foi em 1866 que Bary delineou pela primeira vez a diferença entre estes e os patógenos de plantas. Entretanto, foi apenas no final dos anos 70, do presente século, que os microrganismos endofíticos começaram a adquirir importância, quando foi então verificado que estes apresentavam interações simbióticas com os hospedeiros (AZEVEDO, 1999).

O Reino *Fungi*, de maneira geral, foi inicialmente estimado entre  $1 \pm 5$  milhões de espécies e posteriormente em cerca de 1,5 milhões espécies, das quais menos de 10 por cento foram descritas até o presente momento (HAWKSWORTH, 1991; HAWKSWORTH, 2004). Enquanto isso, as estimativas da diversidade de fungos endofíticos giram em torno de um milhão de espécies, o que corresponde a quatro endofíticos por cada uma das 250.000 espécies de plantas existentes. Estes organismos colonizam inúmeros habitats (águas doces e salgadas, terra, madeira, estrume, resíduos queimados) e organismos vivos (plantas, animais, e outros microrganismos) desempenhando funções primordiais nos ecossistemas, sendo inclusive capazes de retirar nutrientes e se disseminarem por meio das sementes da planta hospedeira (GANLEY *et al.* 2004).

O taxa dos fungos endofíticos, que são mais freqüentemente relatados, tendem a pertencer a grupos de fungos compostos tanto por endofíticos, quanto por parasitas morfológicamente semelhantes. Deste modo, é plausível que endófitos são conhecidos parasitas em uma fase latente dentro do hospedeiro (GANLEY *et al.* 2004).

A biodiversidade dos fungos endofíticos é composta por representantes dos filos *Ascomycota*, *Zygomycota*, *Basidiomycota*, *Glomerulomycota* e *Dothideomycete* (HUANG *et al.* 2001; SURYANARAYANAN *et al.* 2005; GUNATILAKA, 2005; *apud* ARNOLD, 2007) e por vários gêneros como: *Arthrobotrys*, *Dendrophora*, *Diatrypella*, *Oudemansiella*, *Mucor* e *Phlebiopsis*, *Botryosphaeria*, *Coprinus*, *Curvularia*, *Eutypella*, *Fusarium*, *Microdochium* e *Phoma*, *Bipolaris*, *Petriella*, *Phanerochaete* *Collethotrichum* e seu anamorfo *Glomerella* (VIEIRA. 2008), e também *Fusarium*, *Neotyphodium*, *Epicoccum*, *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Neotyphodium*, dentre vários outros que são freqüentemente relatados em outros trabalhos (ALMEIDA *et al.* 2005).

#### 2.1.2.2. *Relações ecológicas dos fungos endofíticos*

De acordo com STROBEL *et al.* (2003), as florestas tropicais e temperadas constituem os ecossistemas terrestres com maior biodiversidade do planeta e para muitos autores a diversidade fúngica atinge seu ápice em

florestas tropicais (ARNOLD *et al.* 2000; STROBEL *et al.* 2003). Para HAWKSWORTH (2001), dentre os ecossistemas do planeta, aqueles com maior biodiversidade são também aqueles que têm apresentado maiores riquezas e freqüências de fungos endofíticos. Está implícito também que as plantas lenhosas provavelmente apresentem maior riqueza de fungos endofíticos que as plantas herbáceas e que a localização geográfica parece influenciar de várias formas significativas a produção de moléculas bioativas na planta, tanto do ponto de vista qualitativo quanto quantitativo (STROBEL, 2006). Estudos estatísticos em outros trabalhos mostraram que endofíticos de regiões tropicais produzem maior número de metabólitos ativos quando comparados àqueles presentes em outras regiões, já que estes estariam expostos a um ambiente de maior biodiversidade.

Durante a evolução das plantas, associações mutualísticas com fungos endofíticos ocorreram e promoveram adaptações relacionadas à capacidade de defesa da planta contra predadores e patógenos, aumentando a taxa de crescimento vegetal, enraizamento e resistência a estresses bióticos e abióticos. Os fungos endofíticos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que se destacam por melhorar o desempenho de seu hospedeiro, protegendo-o de herbívoros, patógenos e situações ambientais adversas (CLAY *et al.* 2002). Em contrapartida, endofíticos podem receber proteção e nutrientes do hospedeiro (BACON, 1993; REDMAN *et al.* 2002; *apud* HANADA, 2006; SOUZA *et al.* 2004). Vários estudos indicam que a riqueza de fungos endofíticos aumenta conforme aumenta a idade foliar e que a diversidade pode variar sazonalmente e em relação às variações abióticas e bióticas (ARNOLD *et al.* 2003; COLLADO *et al.* 1999 *apud* ESTEVES *et al.* 2007).

Apenas alguns poucos estudos têm focado determinar as relações ecológicas de endofíticos associados a plantas lenhosas ou em usar estas informações para orientar o cultivo e a inoculação de fungos endofíticos benéficos em tecidos vegetais. Como exemplo, e de acordo com ALMEIDA *et al.* (2005), o tratamento *in vivo* com fungos endofíticos em *Theobroma cacao* mostraram quase 50% a menos de danos devido ao patógeno *Phytophthora* sp. quando comparado com as folhas sem endofíticos.

Algumas espécies de fungos como *E. nigrum* e *Neotyphodium* sp. podem ser utilizadas no controle biológico contra patógenos de plantas. Em muitas dessas associações, a produção de alcalóides pelos fungos resulta na redução da herbivoria por insetos ou mamíferos, e isso beneficia a planta hospedeira e os fungos, que por sua vez se beneficiam pelo acesso aos nutrientes produzidos pela planta (BREEN, 1994; BUSH *et al.* 1997 *apud* ALMEIDA *et al.* 2005). Outro exemplo seria o efeito repelente de metabólitos produzidos por fungos endofíticos da família *Xylariaceae*, contra as larvas dos besouros vetores de doenças em plantas do gênero *Fagus* (AZEVEDO *et al.* 2000). Existem outras características importantes atribuídas a esses organismos, como produção de fitormônios, toxinas, fármacos e compostos de interesse biotecnológico ainda a serem investigados.

## **2.2. *Vellozia compacta* Mart. ex Schult. f.**

A família *Velloziaceae*, popularmente conhecida por canelas-de-ema, é constituída por mais de 270 espécies de plantas herbáceas e arbustos perenes. Destas, 230 são espécies endêmicas do Brasil e mais de 160 são endêmicas dos Campos Rupestres de Minas Gerais, o que certamente tem influenciado para que diversas espécies sejam relacionadas como ameaçadas, já que a destruição de seus habitat é uma ameaça direta às espécies endêmicas presentes (GIULIETTI *et al.* 2005; *apud* SOARES *et al.* 2007).

No geral, as velózias são plantas essencialmente tropicais que vivem preferencialmente em afloramentos rochosos localizados em regiões de altitudes elevadas, em condições de alta irradiação solar, baixa disponibilidade hídrica e estão concentradas principalmente nas formações quartzíticas da Cadeia do Espinhaço, um importante complexo de montanhas que abrigam ecossistemas de Campo Rupestre, Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga, uma mistura de ambientes com extrema diversidade biológica e que, ao mesmo tempo, encontram-se entre os mais ameaçados do planeta, sendo por tudo isso considerada pela UNESCO - United Nations Educational, Scientific and Cultural

Organization, patrimônio mundial da biodiversidade (MELLO-SILVA 1995; *apud* GARCIA *et al.* 2003).

Nos campos ferruginosos do Quadrilátero Ferrífero, onde o substrato conhecido como canga é constituído por uma camada de rocha hematítica com alto teor de ferro, escassez de solo, baixa umidade e ampla variação de temperatura, existem várias espécies de *Velloziaceae* (VINCENT *et al.* 2002). Apesar das condições ambientais com múltiplos fatores de estresse, como alta radiação solar, baixa disponibilidade hídrica e de nutrientes que ocorrem durante a estação seca (AYENSU, 1973; *apud* DANTAS *et al.* 2005), estas plantas apresentam alta longevidade e permanecem sempre vistosas, o que pode estar associado à presença de determinados metabólitos que provêm defesa química aos seus tecidos vegetais (GILBERT, 1977; *apud*. RIEHL *et al.* 2000). Em particular, o gênero *Vellozia* é neotropical e consiste de mais de 140 espécies, encontradas principalmente na região do Espinhaço, no estado de Minas Gerais (MELLO-SILVA, 1996).

*Vellozia compacta* espécie escolhida para o estudo dos fungos endofíticos associados, é uma planta subarborescente, de arquitetura peculiar com cerca de 2 m. de altura, possui frutos com cápsulas do tipo loculicidas com paredes espessas e duras, ocorre apenas sobre afloramentos rochosos com altitudes superiores a 1.000 m. e apresenta predomínio da polinização cruzada (xenogamia) Além disso, é uma espécie endêmica e que exibe a capacidade intrínseca em lidar com a ocorrência dos estresses múltiplos nos ambientes de Campos Rupestres, como solos pobres em recursos, formados de rochas areníticas e quartzíticas, rasos, arenosos e com baixa capacidade de retenção de água (MATIAS, 1992).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Avaliar a presença e a composição da biodiversidade de fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* Mart. ex Schult. f. (*Velloziaceae*).

#### **3.2. Específicos**

1. Isolar fungos endofíticos de *V. compacta* de dois ambientes distintos: Campo Rupestre e Afloramento Rochoso de Cerrado, nos estados de Minas Gerais e Tocantins, respectivamente;
2. Incluir todos os isolados obtidos na Coleção de Culturas de Fungos do Laboratório de Microbiologia do DECBI/ICEB/UFOP para preservação *ex situ* da diversidade de fungo tropicais;
3. Identificar por meio de técnicas morfológicas e moleculares em nível de espécies os isolados obtidos;
4. Avaliar a distribuição geográfica das espécies de fungos endofíticos obtidos;
5. Calcular a similaridade e a taxa de colonização entre as comunidades de fungos endofíticos das duas regiões;
6. Analisar a colonização entre as comunidades de fungos endofíticos provenientes de folhas e raízes;
7. Avaliar a presença de possíveis espécies novas e/ou endêmicas de fungos associados à *V. compacta*.



## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Locais de coleta

#### 4.1.1. Serra do Ouro Branco-MG

Na Serra do Ouro Branco os fragmentos de folhas e raízes de *V. compacta* foram coletados em março de 2007, a 20° 30' 369' latitude Sul, 43° 37.837' longitude Oeste e a uma altitude de 1.152 m.

Tombada pelo Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais, em 07 de novembro de 1978, a Serra do Ouro Branco possui uma área aproximada de 1.614 hectares e está localizada no município de Ouro Branco, Minas Gerais. É uma elevação abrupta, formada por um paredão com cerca de 20 km de extensão a sudeste, que delimita um planalto cuja altitude varia entre 1.250 e 1.568 m e encostas íngremes a nordeste. Os solos, em sua grande maioria, são arenosos, oriundos de rochas quartzíticas e uma pequena porção, a nordeste, é constituída de solos argilosos, provenientes da formação mineral tipo itabirito.

A Serra do Ouro Branco é onde nasce a cadeia de montanhas denominada Espinhaço, que compreende um grupo de serras com altitudes variáveis, ao longo de 1.100 km de extensão, até a Bahia. Essa cadeia abriga um dos mais ricos ecossistemas do mundo, os Campos rupestres.

A vegetação de Campos Rupestres, caracterizada por um mosaico de formações vegetais que se desenvolvem em solo arenoso e pedregoso de origem quartzítica. Esse mosaico é constituído de cinco formações: Grupos Graminóides, Afloramentos Rochosos, Matas de Galerias e Capões, Campos Brejosos e Campos de Velózias (canela-de-ema). Essa diversidade de ambientais condiciona uma flora rica, diversificada e endêmica.

A Serra do Ouro Branco é uma importante área de recarga das bacias do rio Paraopeba e rio Doce. Apresenta uma grande quantidade de nascentes e cursos d'água, que, em sua maioria, formam o Lago Soledade. Além disso, fornece toda a água que é consumida pela cidade de Ouro Branco.

#### *4.1.2. Parque Estadual do Jalapão-TO*

No Parque Estadual do Jalapão, localizado no município de Mateiros – TO, os fragmentos foram coletados em maio de 2007, a 10° 36' 043" latitude Sul, 46° 35' 836" longitude Oeste. O Jalapão, situado no coração do Brasil, estado do Tocantins, na divisa com Bahia, Maranhão e Piauí, é uma área com grande dificuldade de acesso, fator responsável pela preservação deste santuário, onde de veredas virgens aflora água cristalina e abundante formando inúmeros rios, riachos e ribeirões, todos de água límpida e transparente, em meio a uma paisagem árida e bela. Estas condições proporcionam vida a uma diversidade incrível de animais e plantas totalmente adaptada a esta região do cerrado e promete, graças a diversas Unidades de Conservação e ao Turismo Sustentável, se consolidar como a maior área de preservação contínua da savana brasileira.

O Parque Estadual do Jalapão foi criado em 12 de janeiro de 2001, abrange uma área de 159 mil hectares, sendo o maior parque estadual do estado do Tocantins. A vegetação é predominantemente de campo de cerrado ralo e campo limpo com veredas, o solo é arenoso úmido, altitude variando de 200 a 400 metros acima do nível do mar e com temperatura média de 30° C.



Figura 1: Área de coleta na Serra do Ouro Branco, Minas Gerais. Detalhe do campo de *Vellozia compacta*. L. H. Rosa

#### 4.2. Coleta dos espécimes vegetais

Folhas e raízes aparentemente saudáveis de 60 exemplares distintos de *V. compacta* de ambas as regiões (entre indivíduos jovens e adultos) foram coletadas e transportadas, separadamente, em sacos plásticos para o processamento. Como referência taxonômica para o material coletado foi utilizado o exemplar de *V. compacta* depositado no Herbário Professor José Badini, tombado com o número 4.145, originado do Planalto do Itacolomi, Ouro Preto, Minas Gerais.

#### 4.3. Isolamento, cultivo e preservação dos fungos endofíticos

Para desinfecção superficial e retirada de possíveis microrganismos epifíticos das amostras coletadas, as folhas e raízes foram lavadas com água destilada e detergente e em seguida, em local asséptico, enxaguadas com água destilada estéril. Após esta etapa foi cortado um fragmento de 1,5 cm da porção mediana de cada folha e raiz e então os fragmentos foram desinfetados com álcool 70% por 2 minutos, hipoclorito de sódio 2,5% por 3 minutos e água destilada estéril por 30 segundo. Como controle de efetividade do processo de

desinfecção, 50 µL da água destilada estéril (última etapa do processo) foi esgotado em Agar Sabouraud (Himedia).

Os fragmentos de cada espécime foram plaqueados independentemente (três fragmentos de folhas ou três de raízes, de cada espécime, por placa) em meio Agar Sabouraud, acrescido do antibacteriano Cloranfenicol (Sigma - Alemanha) a 100 mg/L e incubados a 28° C por até 60 dias (COLLADO *et al.* 1996). Após o aparecimento das hifas dos fungos endofíticos nas extremidades dos fragmentos de folhas e raízes, foram realizados repiques de todos os isolados para novas placas contendo meio Agar Sabouraud, agora sem Cloranfenicol. Após purificação, as culturas foram incubadas por 15 dias a 28° C ± 2 para crescimento.

Para preservação dos fungos endofíticos obtidos, discos de meio de cultura de 5 mm de diâmetro de todos os isolados foram mantidos submersos em 10 mL de água destilada estéril em frascos lacrados, à temperatura ambiente e em duplicata (CASTELANI, 1967). Os mesmos fungos também foram preservados em glicerol 30% a -80° C e então incluídos na Coleção de Culturas de Fungos da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOPCB).

#### **4.4. Agrupamento em morfoespécies dos isolados endofíticos**

Os isolados obtidos foram caracterizados e agrupados em morfoespécies (ARNOLD *et al.* 2000), observando-se os aspectos macromorfológicos das culturas, como a coloração superficial e do verso do micélio, a borda, o relevo, a coloração do meio de cultura, a formação de estruturas de reprodução e a liberação de exudatos.

#### **4.5. Identificação molecular dos fungos**

Para identificação dos fungos, uma parte da biomassa miceliana de todos os isolados foi devidamente preservada em tampão de extração para obtenção do DNA genômico e armazenada a -80° C.

#### 4.5.1. Extração do DNA total

A extração do DNA total foi feita em duas etapas, de acordo com DE HOOG *et al.* (2005). Fragmentos de micélio dos fungos filamentosos crescidos por sete dias em Agar Sabouraud foram colocados em tubo de 1,5 mL, acrescidos de 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl - trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS – sódio dodecil sulfato 1%) e armazenados a – 20° C por aproximadamente 10 min. O micélio foi triturado com o auxílio de um pistilo e então acrescido de 5 µL de Proteinase K (50µg/mL). Após homogeneização, o tubo foi colocado por 30 min. a 60° C em Banho-maria. Feito isso, foram adicionados 162 µL de CTAB de Hoog (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%), seguido de homogeneização e incubação por 10 minutos a 65°C. Em seguida, foram acrescentados 570 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), procedeu-se a homogeneização e a incubação do tubo por mais 30 minutos em gelo.

Na etapa seguinte, o conteúdo foi centrifugado a 13.200 r.p.m. por 10 minutos e o líquido sobrenadante transferido para um novo tubo de 1,5 mL, onde foi acrescido de uma fração de 10% do volume total de uma solução de acetato de sódio 3M. O tubo foi vertido para homogeneização e incubado a 0° C por no mínimo 30 minutos. Os tubos foram centrifugados a 13.200 r.p.m. por 10 minutos e temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 50% do volume de isopropanol e centrifugado a 13.200 r.p.m. por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão, a seguir foram adicionados 200 µL de etanol (Merck) 70% p/v a 4° C e com o auxílio de uma pipeta, a suspensão foi gentilmente homogeneizada. Após este procedimento a amostra foi centrifugada a 13.200 r.p.m. por 5 minutos e o sobrenadante desprezado por inversão, seguido por homogeneização com etanol 70% p/v. A amostra foi seca por aproximadamente 15 minutos. Um volume de 100 µL de Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M) foram adicionados e a mesma foi incubada a 65 °C

por 60 minutos para hidratação do DNA. As amostras foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.5.2. Obtenção dos amplicons

Os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) foram utilizados para amplificação da região ITS do rDNA, conforme descrito por White *et al.* (1990). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 50  $\mu\text{L}$  contendo 2,0  $\mu\text{L}$  de DNA, 1,0  $\mu\text{L}$  de cada iniciador ITS1 e ITS4  $10\ \mu\text{mol}^{-1}$  (MWG Biotech), 5,0  $\mu\text{L}$  de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 2,0  $\mu\text{L}$  de dNTP 10 mM, 0,3  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água destilada estéril. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Express (Thermo Hybaid). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a  $94^{\circ}\text{C}$  por 5 min, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$ , 1 minuto de anelamento a  $55^{\circ}\text{C}$  e 1 minuto de extensão a  $72^{\circ}\text{C}$ , e uma extensão final por 5 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ . Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5 X, eluídos durante aproximadamente 1 hora a 120 V. Os géis foram corados com solução de brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, France).

#### 4.5.3. Purificação dos amplicons

Os amplicons gerados pela reação de PCR foram purificados utilizando-se Polietilenoglicol (PEG). Ao produto de PCR foi adicionado igual volume de uma solução de Polietilenoglicol 20% em NaCl 2,5 M, que foi mantido em banho-maria à  $37^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. O tubo foi centrifugado a 13.500 r.p.m. por 15 minutos e o sobrenadante foi retirado e descartado. A seguir, foram adicionados 125  $\mu\text{L}$  de etanol 70-80% resfriado a  $4^{\circ}\text{C}$ , o tubo foi centrifugado a

13.500 r.p.m. por dois minutos e o etanol retirado. Este passo foi repetido mais uma vez e a amostra foi novamente centrifugada a 13.200 r.p.m. por um segundo (*spin down*). O tubo foi deixado à temperatura ambiente para evaporação de todo o excesso de etanol. Foram adicionados 10 µL de água deionizada estéril e o conteúdo do tubo foi homogeneizado em vórtex por 15 segundos. Em seguida, o tubo foi incubado em banho-maria a 37°C por 40 minutos. O produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) para ser utilizado nas reações de seqüenciamento.

#### *4.5.4. Reações de seqüenciamento*

O seqüenciamento foi realizado no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM – UFMG), utilizando-se o Kit DYEnamic™ (Amersham Biosciences, USA) em combinação com o sistema de seqüenciamento automatizado MegaBACE™ 1000. Para as reações de seqüenciamento foram utilizados 100-150 ng do DNA purificado e os reagentes presentes no Kit DYEnamic™ (Amersham Biosciences, USA).

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 4 µL do pré-mix (presente no kit de seqüenciamento) e 1 µL do iniciador (5 µmol<sup>-1</sup>), completando-se o volume final com água deionizada estéril. O programa consistiu de 36 ciclos de uma desnaturação inicial a 95° C por 25 minutos, seguido por 15 segundos de anelamento a 50° C e 3 minutos de extensão a 60° C. Após término da ciclagem, os produtos da reação foram transferidos para uma placa de seqüenciamento de 96 poços para serem precipitados.

#### *4.5.5. Precipitação da reação de seqüenciamento*

Para precipitação das reações de seqüenciamento, 1 µL de acetato de amônio 7,5 M foi adicionado em cada poço da placa de 96 poços. A solução de acetato de amônio foi dispensada na parede lateral dos poços e a placa batida levemente sobre a bancada para que as gotas do acetato de amônio se

misturassem à reação. Em seguida, foram adicionados 28 µL de etanol absoluto (Merck). A placa foi submetida à agitação em vórtex e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz.

Após o período de incubação, a placa foi centrifugada por 45 minutos a 4000 r.p.m. O sobrenadante foi descartado, virando-se a placa sobre um papel absorvente e em seguida foram adicionados 150 µL de etanol 70% (Merck). A placa foi novamente centrifugada por 15 minutos a 4000 r.p.m e o sobrenadante descartado. Para remoção do excesso de etanol, a placa foi invertida sobre um papel absorvente, e submetida a um pulso em centrífuga a 900 r.p.m. durante 1 segundo. Em seguida, a placa foi mantida em repouso durante 20-40 minutos, protegida da luz, para evaporação do etanol.

O DNA das amostras precipitado em cada poço da placa foi então ressuspendido em 10 µL de *Loading buffer* (presente no kit de seqüenciamento). A placa foi submetida à agitação em vórtex por 2 minutos, pulsada em centrífuga por 1 segundo a 900 r.p.m. e armazenada a 4° C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado MegaBACE™ 1000.

#### 4.5.6. Análise computacional das seqüências

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

Os isolados que apresentaram identidade inferior a 98% no BLAST foram analisados no Programa MEGA 4, onde suas seqüências de bases do rDNA foram igualadas e comparadas com o banco de dados. No MEGA 4, as seqüências que apresentaram menos de 10% de diferença foram consideradas como mesma espécie.



#### 4.6. Análise dos dados

Para análise do número de fragmentos de *V. compacta* que apresentaram ausência ou presença de colonização por fungo endofítico, em relação ao número total de fragmentos amostrados, utilizou-se a Taxa de Colonização ( $T_c$ ) (TAYLOR *et al.* 1999):  $[(N_d / N_t) \times 100]$ ; onde  $N_d$  e  $N_t$  correspondem, respectivamente, ao número de amostras das quais foi possível isolar um ou mais fungos endofíticos, e ao número total de fragmentos amostrados (VIEIRA, 2008). Foi feita análise total da Taxa de Colonização e parcial, comparando-se os dois ambientes (Serra do Ouro Branco - SOB e Parque Estadual do Jalapão - PEJ) e o local de colonização na planta (raízes e folhas)

Os índices de similaridade são calculados com o objetivo de avaliar o quanto duas comunidades têm em comum em termos de táxons encontrados. Para calcular a similaridade entre os dois ambientes, utilizou-se o índice de Sorensen ( $S_s$ ), que é dado pela fórmula  $S_s = 2a / (2a + b + c)$ , onde “a” corresponde ao total de táxons comuns aos dois locais, “b”, ao total de táxons encontradas apenas no primeiro (SOB) e, “c”, ao total de táxons registradas somente no segundo (PEJ), considerando apenas ausência e presença (variação de 0 = nenhuma similaridade, a 1 = completa similaridade).

Os Índices de Diversidade como o de *Simpson*, que é um índice de dominância que reflete a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie, não foi calculado devido ao baixo número de táxons identificados, onde houve variação apenas para três dos 23 taxons.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ambos os locais de coleta dos espécimes de *V. compacta* (Serra de Ouro Branco e Parque Estadual do Jalapão) são caracterizados por abrigarem uma vegetação peculiar, característica de um ambiente único. A partir deste contexto, os afloramentos rochosos representam um nicho interessante para comunidades de fungos endofíticos, as quais podem ter sua diversidade relacionada às necessidades adaptativas das espécies vegetais em relação ao ambiente. Nestes locais foram obtidos indivíduos de *V. compacta* adultos, saudáveis e que apresentavam raízes adventícias expostas. Esta medida foi utilizada para tentar evitar a obtenção de fungos fitopatogênicos e/ou oportunistas.

A partir do quarto dia de incubação dos fragmentos de folhas e raízes em meio de cultura BDA, foram obtidos os primeiros isolados de fungos endofíticos (Figura 2). Dos 360 fragmentos (180 de folhas e 180 de raízes) coletados de 60 exemplares de *V. compacta*, foram obtidos 97 isolados de fungos, como mostra a Tabela 1. Deste total, 37 foram obtidos das folhas e 60 das raízes (Figura 3).

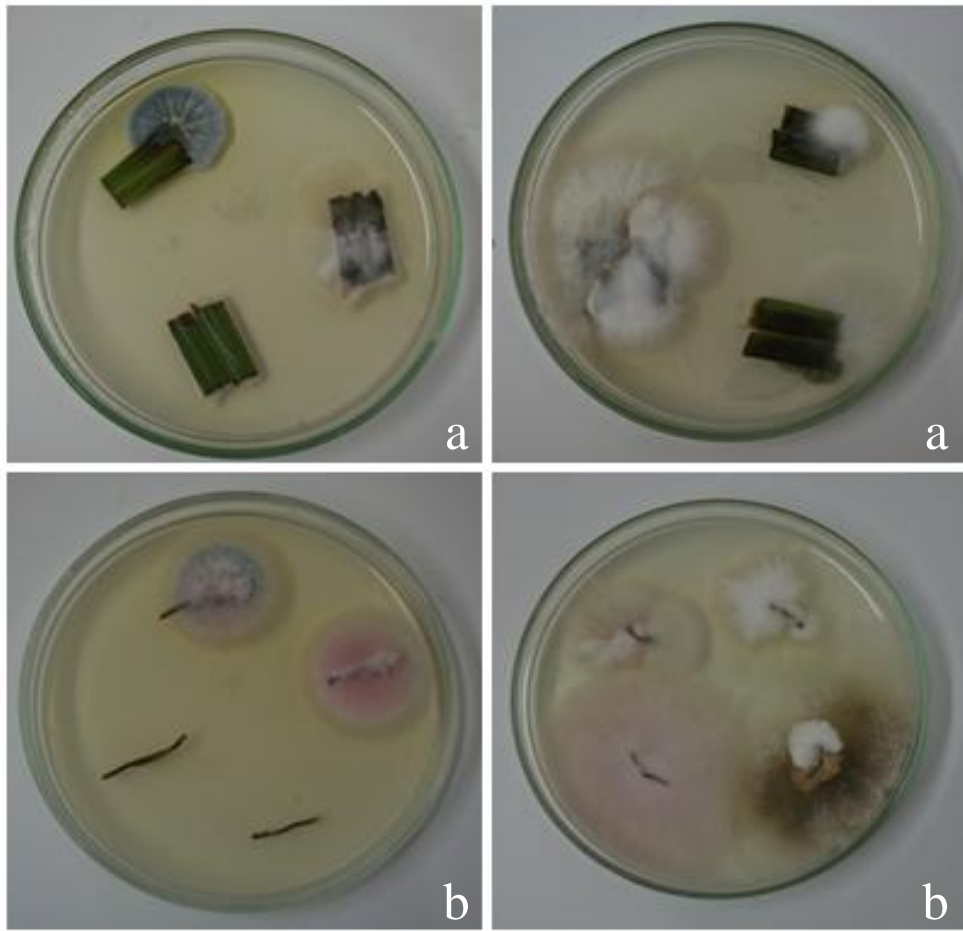


Figura 2: Colônias de fungos isolados saindo de folhas (a) e raízes (b) de *Vellozia compacta* Mart. ex Schult. f.

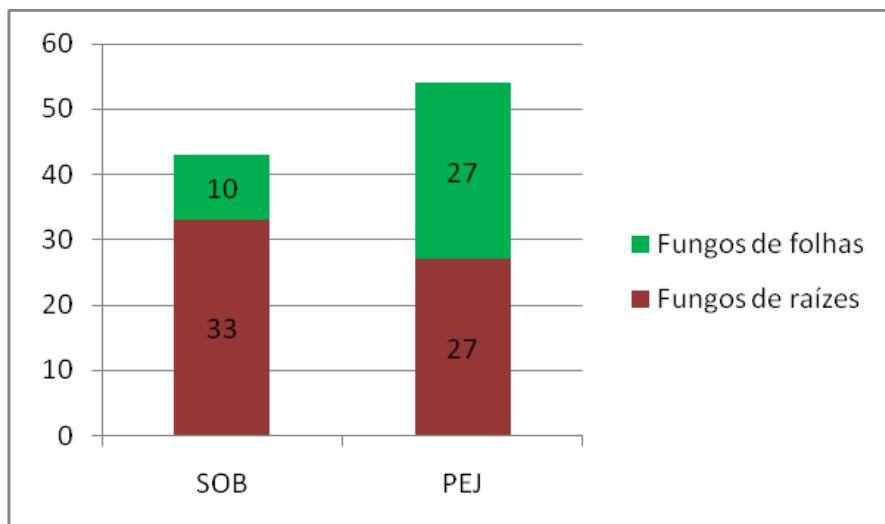


Figura 3: Número de fungos endofíticos isolados de folhas e raízes na Serra do Ouro Branco e no Parque Estadual do Jalapão.

Tabela 1: Número de isolados (Ni) e freqüência relativa (fr) de fungos endofíticos obtidos de folhas e raízes de *Vellozia compacta* Mart. ex Schult. f. (*Velloziaceae*).

Fragmentos da planta	Número de isolados (Ni)	fr (%)
180 de folhas	37 (27 do PEJ <sup>1</sup> + 10 da SOB <sup>2</sup> )	38,1
180 de raízes	60 (27 do PEJ + 33 da SOB)	61,9
<b>Total = 360</b>	<b>97</b>	<b>100%</b>

1 (PEJ): Parque Estadual do Jalapão; 2 (SOB): Serra do Ouro Branco.

Estes resultados utilizaram métodos que estão de acordo com outros trabalhos realizados para diferentes espécies vegetais (PETRINI, 1991; SAIKKONEN, *et al.* 1998; *apud* WIYAKRUTTA *et al.* 2004). O controle de efetividade do processo de desinfecção dos fragmentos coletados de *V. compacta* mostrou-se eficaz eliminando possíveis microrganismos epifíticos e garantindo assim o crescimento seletivo dos fungos endofíticos. Tal fato foi constatado devido à metodologia de isolamento dos fungos endofíticos que, após a desinfecção, o grupo controle, constituído de 10 microlitros de água do último processo de desinfecção superficial, não apresentou crescimento de fungos, ou qualquer outro tipo de microrganismo após o seu esgotamento em meio de cultura Agar Sabouraud.

Pela caracterização e agrupamento em morfoespécies verificou-se que os isolados obtidos eram bem distintos e por tanto, todos os isolados de fungos endofíticos obtidos foram para identificação por meio do seqüenciamento da região ITS do DNA ribossômico (fungos filamentosos) (Figura 4). Destes, não foi possível a produção dos amplicons de 23 isolados. A não obtenção dos amplicons destes isolados pode ser devido a erros durante o processo de extração de DNA ou inerente aos fungos, tais como características dos constituintes da parede celular, excesso de proteínas, presença de DNAses,

entre outras. Estes isolados terão que ser re-submetidos ao processo de extração de DNA e produção de seus amplicons para identificação.



Figura 4: Exemplos de algumas morfoespécies de fungos endofíticos isolados de folhas e raízes de *Vellozia compacta*.

As espécies de fungos filamentosos identificadas e isoladas a partir dos exemplares de *V. compacta* coletados na Serra do Ouro Branco e no Parque Estadual do Jalapão estão relacionadas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. A identificação baseada no seqüenciamento da região ITS foi definida por meio do percentual de similaridade, sendo considerada como mesma espécie as seqüências iguais ou acima de 99% de similaridade, mesmo gênero as seqüências entre 93 e 98% de similaridade e abaixo de 93%, inconclusivo (JUNE, 2007).

Tabela 2: Identificação dos fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* Mart. ex Schult. f. (*Velloziaceae*) presente na Serra do Ouro Branco, Minas Gerais.

UFOPCB	Número de isolados	Parte da planta	Espécie mais próxima (BLAST)	Identidade máxima % (BLAST)	Identificação (MEGA 4)
1615	1	Raiz	<i>Acarospora smaragdula</i> [AY853354]	87	<i>Acarospora</i> sp.
1593	1	Folha	Fungal endophyte [EU686935]	84	<i>Chaetomium</i> sp.
1608	1	Raiz	<i>Diaporthe</i> sp. [EF423524]	85	<i>Diaporthe</i> sp.
1628	1	Raiz	<i>Dothideomycetes</i> sp. [GQ153228]	83	<i>Dothideomycetes</i> sp.
1632	1	Raiz	<i>Gelasinospora seminuda</i> [AY681186]	97	<i>G. seminuda</i>
1604	4	Raiz	<i>Fusarium oxysporum</i> [GQ922564]	97	<i>F. oxysporum</i>
1619	3	Raiz	<i>Penicillium funiculosum</i> [GQ337425]	93	<i>Penicillium</i> sp.1
1611	1	Raiz	<i>Penicillium miczynskii</i> [AY373924]	92	<i>Penicillium</i> sp.2
1616	2	Raiz	<i>Pestalotiopsis microspora</i> [GQ855796]	97	<i>P. microspora</i>
1618	1	Raiz	<i>Pestalotiopsis</i> sp. [AF409961]	99	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
1624	1	Raiz	<i>Phoma herbarum</i> [AB369456]	99	<i>P. herbarum</i>
1612	1	Raiz	<i>Phomopsis</i> sp. [FJ785458]	89	<i>Phomopsis</i> sp.1
1627	1	Raiz	<i>Phomopsis</i> sp. [DQ872669]	92	<i>Phomopsis</i> sp.2
1597	1	Folha	<i>Xylaria</i> sp. [EU678663]	83	<i>Xylariaceae</i> sp.

UFOCB = Coleção de Culturas de Fungos da Universidade Federal de Ouro Preto.

Tabela 3: Identificação dos fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* Mart. ex Schult. f. (*Velloziaceae*) presente no Parque Estadual do Jalapão, Tocantins.

UFOPCB	Número de isolados	Parte da planta	Espécie mais próxima (BLAST)	Identidade máxima % (BLAST)	Identificação (MEGA 4)
378	1	Raiz	<i>Alternaria</i> sp. [FJ210503]	88	<i>Alternaria</i> sp.
655	1	Folha	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [EF568045]	97	<i>C. cladosporioides</i>
517	1	Raiz	<i>Cladosporium cladosporioides</i> [EF568045]	95	<i>C. cladosporioides</i>
379	1	Folha	Não encontrada	-	Endofítico sp.1
701	1	Raiz	Não encontrada	-	Endofítico sp.2
736	1	Raiz	Não encontrada	-	Endofítico sp.4
696	1	Folha	<i>Penicillium</i> sp. [AY210338]	86	<i>Penicillium</i> sp.
773	1	Raiz	<i>Simplicillium</i> sp. [AB378537]	95	<i>Simplicillium</i> sp.
659	1	Raiz	<i>Teratosphaeria miniata</i> [GQ852803]	88	<i>Teratosphaeria</i> sp.

UFOCB = Coleção de Culturas de Fungos da Universidade Federal de Ouro Preto.



Dados moleculares e filogenéticos foram utilizados para caracterizar taxonomicamente os isolados de fungos endofíticos e para o alinhamento dos fragmentos da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA gene. Para isso foram utilizadas seqüências com mais de 300 nucleotídeos. Dentre os isolados obtidos neste estudo foram identificados como pertencentes aos gêneros *Acarospora* A. Massal., *Chaetomium* Kunze, *Diaporthe* Nitschke, *Gelasinospora* Dowding, *Fusarium* Link , *Penicillium* Link, *Pestalotiopsis* Steyaert, *Phoma* Sacc., *Phomopsis* (Sacc.) Sacc., *Xylaria* Hill ex Schrank, *Alternaria* Nees, *Cladosporium* Link, *Simplicillium* Zare & W. Gams, *Teratosphaeria* Syd. & P. Syd.

O isolado UFOPCB 1615 foi identificado como *Acarospora* sp., pois apresentou identidade máxima de 87% com a espécie *Acarospora smaragdula* (AY853354). A partir de inferências filogenéticas, o táxon *Acarospora* sp. UFOPCB 1615, com 87 % de similaridade em relação à *Acarospora smaragdula*, também se encontra próximo das espécies *Spencermartinsia* sp. (EU673321) e *Neodeightonia subglobosa* (U673337) com 83% de similaridade. A partir da análise filogenética, o táxon UFOPCB 1615 apresentou 94 nucleotídeos de diferença quando comparado com *A. smaragdula* (AY 853354) (Figura 4).

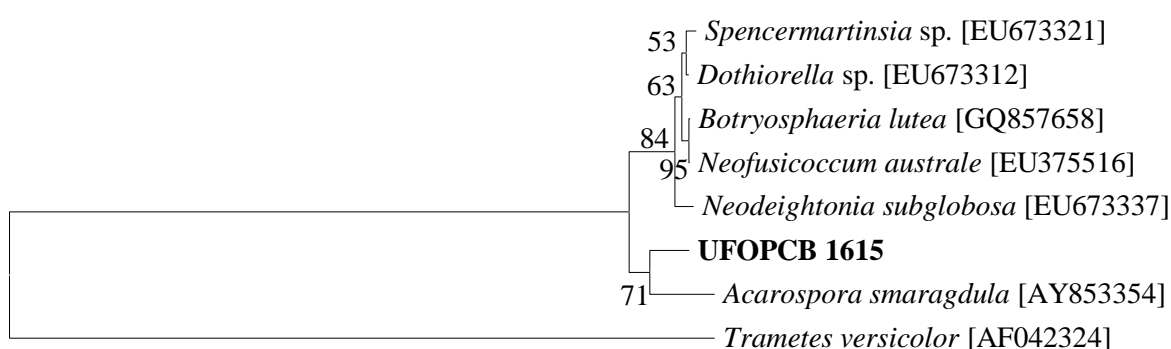


Figura 5: Árvore filogenética demonstrando a proximidade entre o táxon UFOPCB 1615 e as espécies mais próximas a partir do alinhamento no BLAST. *Trametes versicolor* (AF042324) foi utilizado como grupo externo.

O gênero *Acarospora* A. Massal. pertence ao filo *Ascomycota* e possui cerca de 100 espécies descritas (KIRK *et al.* 2001 *apud* WEDIN *et al.* 2005). Espécies *Acarospora* são encontradas como fungos liquenizados e sugeridas como bioindicadores de ambientes contaminados por metais (PURVIS *et al.* 2000). Alguns representantes do gênero são conhecidos por acumular quantidades significativas de metais potencialmente tóxicos como ferro e cobre, resultando em populações com coloração e morfologia altamente divergentes (WEDIN *et al.* 2009). Várias espécies de *Velloziaceae* apresentam substratos e abrigo, às vezes únicos, para espécies de *Orchidaceae* e de fungos liquenizados, como é o caso da *Vellozia gigantea*, onde foram encontradas 42 morfoespécies de epífitas (RIBEIRO *et al.* 2005). Por outro lado, ARNOLD (2007) encontrou a espécie *Acarospora complanata* H. Magn como endofítico de *Pinus taeda* L., mas concluíram que esta espécie poderia representar uma contaminação e não uma espécie endofítica. A obtenção de *Acarospora* sp. como endofítico de *V. compacta* pode ser o indicativo da descoberta de uma interessante associação entre fungos liquenizados e suas plantas hospedeiras. Entretanto, serão necessários mais estudos para comprovar esta observação, onde o fungo liquenizado seria capaz de penetrar no tecido vegetal de *V. compacta* e se estabelecer como um endofítico.

A partir do alinhamento com seqüências previamente depositadas no *GenBank*, o isolado UFOPCB 1593 apresentou 84% de identidade com os táxons Fungal endophyte (EU686935), *Chaetomium* sp. (AM944353), *Chaetomium globosum* (DQ854987) e Fungal endophyte (AY452982). Entretanto as análises filogenéticas demonstraram que o táxon UFOPCB 1593 apresentou 60 e 64 nucleotídeos, de um total de 300, de diferença com os táxons Fungal endophyte (EU686935) e *Chaetomium* sp. (AM944353), respectivamente, e foi identificado como *Chaetomium* sp. (Figura 5).

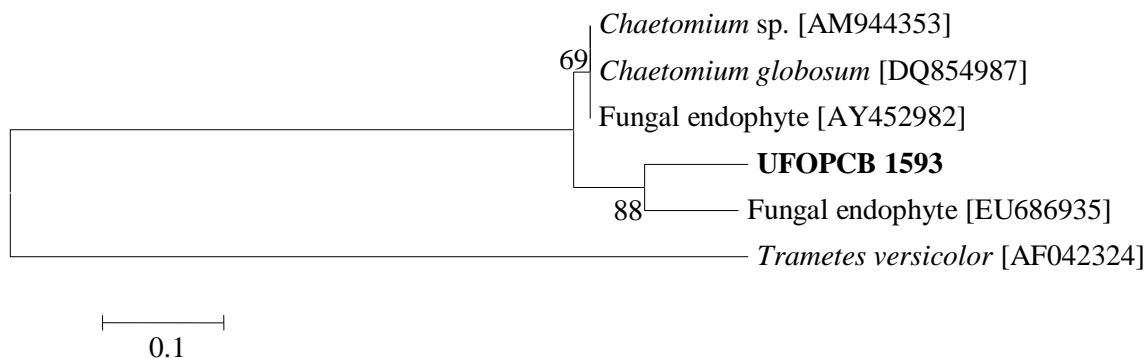


Figura 6: Árvore filogenética demonstrando a proximidade entre o táxon UFOPCB 1593 e as espécies mais próximas a partir do alinhamento no BLAST. *Trametes versicolor* (AF042324) foi utilizado como grupo externo.

O gênero *Chaetomium* (Ascomycota) apresenta cerca 250 espécies e subespécies descritas (NCBI), das quais algumas já foram relatadas como fungos endofíticos, como é o caso da espécie *C. globosum*, endofítico associado às folhas de *Viguiera robusta* Gardn (Asteraceae), espécie endêmica no cerrado brasileiro e capaz de produzir citocalasanas com atividade citotóxica (MOMESSO *et al.* 2008) e também da conhecida *Ginkgo biloba* (QIN *et al.* 2009). Algumas espécies do gênero *Chaetomium* foram citadas como potenciais agentes de controle biológico. De acordo com JÚNIOR *et al.* (2007), fungos do gênero *Chaetomium* podem atuar no controle biológico de patógenos radiculares. Além disso, o tratamento de sementes com a espécie *Chaetomium globosum* reduz os danos produzidos pelo ataque de *Pythium* spp. Em outros estudos, constatou-se a eficiência de *C. globosum* como agente no biocontrole contra o tombamento de plântulas de beterraba (*Beta vulgaris* L.) causado por *P. ultimum* Trow. *C. globosum* era o fungo responsável pela produção na beterraba de substâncias antibióticas, entre as quais se encontram o Butil Hidroxitolueno (BHT) e a chaetomina. Além disso, seis isolados endofíticos *Chaetomium* spp. inibiram *in vitro* o fungo patógeno *Pyrenophora tritici-repentis* (ISTIFADAH *et al.* 2006; HUBBARD *et al.* 1982; Di PIETRO *et al.* 1992; *apud* S. JÚNIOR *et al.* 2007).

O isolado UFOPCB 1608 apresentou 85% de similaridade com o táxon *Diaporthe* sp. (EF423524) e foi identificado como *Diaporthe* sp. O gênero *Diaporthe* (Ascomycota) é caracterizado por produzir ascos longos e escuros e

os ascósporos são elípticos hialinos e septados. Sua forma anamorfa é representada pelo gênero *Phomopsis*. RUBINI *et al.* (2005), isolaram *Diaporthe* sp. como endofítico de cacauzeiros (*Theobroma cacao* L.), porém muitas espécies de *Diaporthe* são parasitas e causam manchas em várias partes das plantas, tal como *Diaporthe helianthi-Phomopsis helianthi*, espécie capaz de infectar várias partes das plantas de girassol. Depois da infecção do tecido foliar, as hifas do fungo progridem pelo sistema vascular e então se espalham, invadindo outros tecidos (ANOLA-CVETKOVIC *et al.* 1989). A melanose é uma doença de citros (*Citrus* spp.) causada pelo fungo *Diaporthe citri* Wolf. Todas as espécies de citros são suscetíveis a este fungo, sendo que, pomelos (*Citrus paradisi* Macf) e limões (*Citrus limon* Burmann) tendem a ser mais afetados que outras (WHITESIDE *et al.* 1993; BUSHONG *et al.* 2000; TIMMER, 2000 *apud* NOZAKI *et al.* 2004). A produtividade da soja é afetada pela podridão de sementes, queima da haste e da vagem e o cancro da haste, todas, doenças causadas por espécies de fungos do complexo *Diaporthe/Phomopsis* (PLOFFER, 1989).

O isolado UFOPCB 1628 apresentou 83% de identidade com o táxon *Dothideomycetes* sp. (GQ153228). A partir das análises filogenéticas (Figura 6) este isolado apresentou 126 nucleotídeos de diferença em relação a *Dothideomycetes* sp. (GQ153228) e 129 em relação à *Botryosphaeria lutea* (FJ481610). Para a identificação em nível de espécie deste isolado serão necessários novos estudos moleculares e morfológicos.

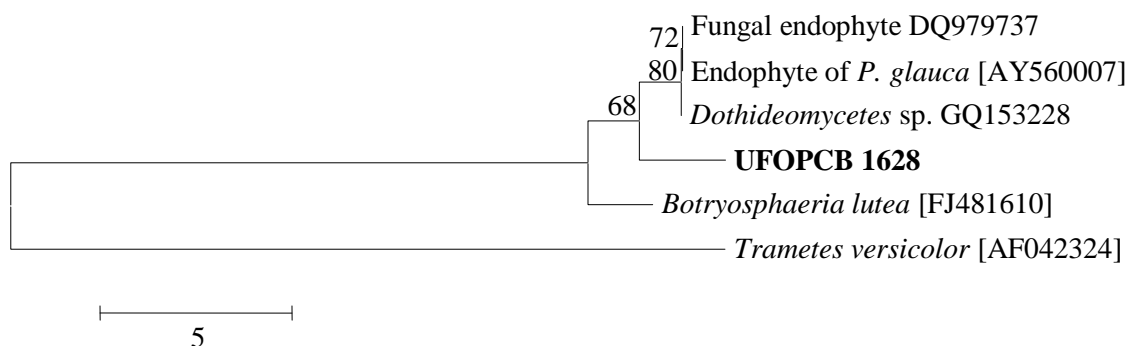


Figura 7: Árvore filogenética demonstrando a proximidade entre o táxon UFOPCB 1628 e as espécies mais próximas a partir do alinhamento no BLAST. *Trametes versicolor* (AF042324) foi utilizado como grupo externo.

*Dothideomycetes* (*Ascomycota*) é um grupo composto por cerca de 50 famílias, 650 gêneros e 6.300 espécies conhecidas. A classe contém vários fitopatogênicos importantes como *Phaeosphaeria nodorum* e *Venturia inaequalis* (LUMBSCH *et al.* 2007). Em geral, os membros da classe *Dothideomycetes* são descritos como agentes fitopatogênicos, endofíticos, ou epifíticos de plantas vivas, bem como saprófitos degradadores de celulose e outros carboidratos complexos de matéria morta ou parcialmente digerida na serrapilheira ou no esterco. Algumas espécies são liquenizadas, enquanto outras ocorrem como parasitas de fungos ou membros do reino *animalia*. (SCHOCH *et al.* 2006)

Os isolados UFOPCB 1604, 1616, 1618, 1624 e 1632 apresentaram identidade igual ou superior a 97% quando suas seqüências foram alinhadas no BLAST e, portanto, foram identificados como *Fusarium oxysporum*, *Pestalotiopsis microspora*, *Pestalotiopsis* sp., *Phoma herbarum* e *Gelasinospora seminuda*, respectivamente (Tabela 2).

O isolado UFOPCB 1632 apresentou identidade igual a 97% quando sua seqüência foi alinhada no BLAST e, portanto foi identificado em nível específico como *G. seminuda*. *Gelasinospora* (*Sordariaceae*) é um gênero bem conhecido e importante, sendo que suas espécies são predominantemente terrícolas e freqüentemente coletadas em regiões tropicais e subtropicais (LUNDQVIST, 1972; KRUG *et al.*, 1994; *apud.* CAI *et al.*, 2006). Este gênero foi sinonimizado com *Neurospora* e ambos estão intimamente relacionados e não resolvidos como grupos monofiléticos, não havendo provas suficientes para colocá-los como espécies do mesmo gênero, já que apresentam distinção nos padrões de ornamentação da superfície de seus ascósporos (MANOCH *et al.* 2009; CAI *et al.*, 2006). Algumas espécies foram isoladas a partir da associação com plantas, na forma de saprófitos e como epifíticos, mas não foram encontrados na literatura como endofíticos. O fato corrobora para a hipótese de que algumas espécies de fungos epifíticos possam invadir os tecidos vegetais e neles permanecerem em estado de latência, ou como endofíticos, e que após a morte da planta, passem à condição de saprófitos.

O isolado UFOPCB 1604 apresentou 97% de identidade com a espécie *Fusarium oxysporum* (GQ922564), sendo, portanto identificado em nível específico. *F. oxysporum* Schlecht (*Ascomycota*) é uma espécie responsável por uma das doenças mais importantes economicamente e generalizada em mais de uma centena de espécies de plantas como a popularmente conhecida murcha-de-fusário. Este fungo coloniza o sistema de condução de água na planta (xilema) provocando o bloqueio destes canais e conseqüentemente o murchamento foliar, amarelecimento e finalmente morte da planta, sendo, historicamente conhecido pelo extermínio de vários cultivares de banana e por resistir aos fungicidas usados na época (GALTON, 2006). *F. oxysporum* é também responsável pela podridão radicular da alfafa e da batata, pela murcha do feijoeiro (*Medicago sativa* L.) (MENDES *et al.* 2001); do tomateiro no Brasil e no mundo (REIS *et al.* 2005), e outras. Dentre as várias estirpes de *F. oxysporum*, algumas são tidas como não patogênicas e até mesmo encontradas como endofíticas, como é o caso da linhagem testada no controle biológico do nematóide cavernícola da bananeira *Radopholus similis* (STOLF *et al.* 2006). Além disso, *F. oxysporum* foi também isolado como endofítico de *Ananas lucidus* (ananás), de *Bactris gasipaes* Kunth (pupunheira), e outras espécies, onde teve seus metabólitos e a atividade biológica avaliados no biocontrole (ALMEIDA *et al.* 2005).

Os isolados UFOPCB 1611, 1619 e 696 apresentaram seqüências similares às espécies do gênero *Penicillium* sp. O isolado UFOPCB 1611 apresentou 92% de identidade e 26 nucleotídeos diferentes nas análises filogenéticas, quando comparado com a espécie *Penicillium miczynskii* (AY373924) (Figura 7). O isolado UFOPCB 1619 foi similar em 93% e apresentou 22 nucleotídeos diferentes quando comparado com a espécie *Penicillium funiculosum* Thom (GQ337425) (Figura 7). O isolado UFOPCB 696, pertencente à *V. compacta* do PEJ, apresentou 86% de identidade. Desta forma, os isolados UFOPCB 1611, 1619 e 696 foram identificados como *Penicillium* sp. 1, *Penicillium* sp. 2 e *Penicillium* sp., respectivamente.

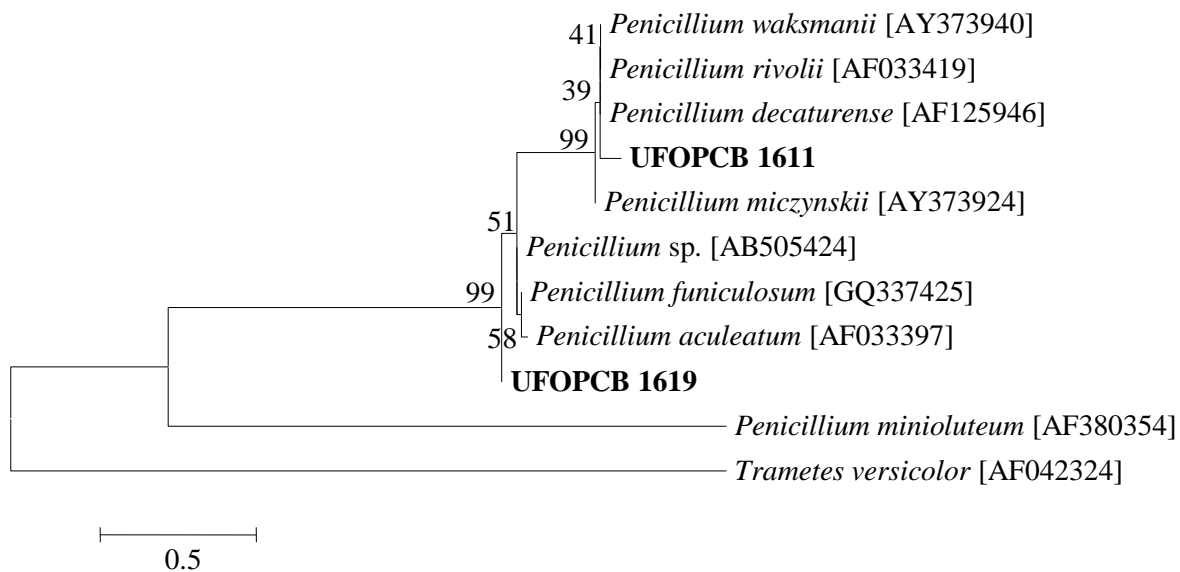


Figura 8: Árvore filogenética demonstrando a proximidade entre os táxons UFOPCB 1611 e 1619 e as espécies mais próximas a partir do alinhamento no BLAST. *Trametes versicolor* (AF042324) foi utilizado como grupo externo.

*Penicillium* é um gênero muito comum como endofítico, amplamente investigado quanto à produção de substâncias bioativas e isolado de várias espécies de plantas, como: *Murraya paniculata* (*Rutaceae*) (MARINHO *et al.* 2007); *Melia azedarach* (*Meliaceae*), de onde verificou-se a produção de substâncias com atividade antibiótica (FILL *et al.* 2003); de *Turnera ulmifolia* L. (*Turneraceae*) (MARINS *et al.* 2008); e também do café (*Coffea arabica* L.), de onde foram isoladas 13 espécies de *Penicillium* (VEGA *et al.*, 2006). Especificamente, a espécie *P. funiculosum* é produtora da enzima celulase, sendo, possivelmente um fitopatógeno em algum período de seu ciclo de vida e esse metabolismo tem sido investigado em vários trabalhos relacionados à sacarificação de produtos de papel, como papel almaço, papel-filtro, jornal e papel de escritório, os quais são convertidos enzimaticamente a glicose (WYK, 1999).

Espécies do gênero *Pestalotiopsis* são conhecidas como endofíticas em diferentes espécies vegetais. *P. microspora*, por exemplo, é um endofítico já isolado a partir de *Taxus wallichiana*, uma planta medicinal de elevadas altitudes, nativa do Himalaia e que produz o taxol, um importante quimioterápico utilizado no tratamento de câncer de mama e de ovário (METZ

*et al.* 2000). No presente trabalho, *P. microspora* foi encontrada em *V. compacta* nos isolados UFOPCB 1616 e 1617, além de ter sido identificado o mesmo gênero no isolado UFOPCB 1618, todos isolados de raízes. Como patógeno, *Pestalotiopsis* sp. apresenta espécies causadoras da chamada "mancha de pestalotiopsis em helicônia", uma nova fitopatologia brasileira (CHARCHAR *et al.* 2003; SERRA *et al.* 2007). Tal fungo foi também isolado do fruto de *Gustavia* cf. *elliptica*, uma planta associada a diversos usos, incluindo o tratamento da leishmaniose, o qual foi demonstrado em coerência com resultados de ensaios das cascas e lenho do caule, ativos contra as formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e *L. guyanensis*. Espécies de *Pestalotiopsis* produzem ainda substâncias com importantes atividades biológicas, como os imunossupressores e citotóxicos pestalotiosina A e derivado 2-4, os anticancerígenos taxol e ácido torreiânico e os anti-patógenos ácido ambuico, jesterona e hidroxijesterona (SILVA *et al.* 2009).

O gênero *Phoma* é conhecido por causar enfermidades como "seca dos ponteiros" e "mancha de *Phoma*" no cafeeiro (*Coffea arabica*). Espécies deste gênero são freqüentemente investigadas nas relações fitopatogênicas, tanto em plantas de interesse econômico, quanto ecológico, tendo sido isoladas de papaya (*Carica papaya*); jatobá (*Hymenaea courbaril*); em sementes de espécies comuns nos Cerrados, como baru (*Dipteryx alata* Vog.) e caroba [*Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Mart.] (SANTOS, 1996); e a mancha foliar em aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr.All.) (ANJOS *et al.* 2001 *apud* CHARCHAR *et al.* 2003)

Os isolados UFOPCB 1612 E 1627 apresentaram identidade de 89% e 92% com os táxons *Phomopsis* sp. (FJ785458) e *Phomopsis* sp. (DQ872669), respectivamente (Figura 8). O isolado UFOPCB 1612 apresentou 33 nucleotídeos de diferença quando comparado com *Phomopsis* sp. (FJ785458) e o isolado UFOPCB 1627 apresentou 34 nucleotídeos de diferença quando comparado com *Phomopsis* sp. (DQ872669). Os isolados foram identificados como *Phomopsis* sp. 1 e *Phomopsis* sp. 2. Entretanto, serão necessários novos estudos taxonômicos para a determinação exata em nível de espécie destes táxons.



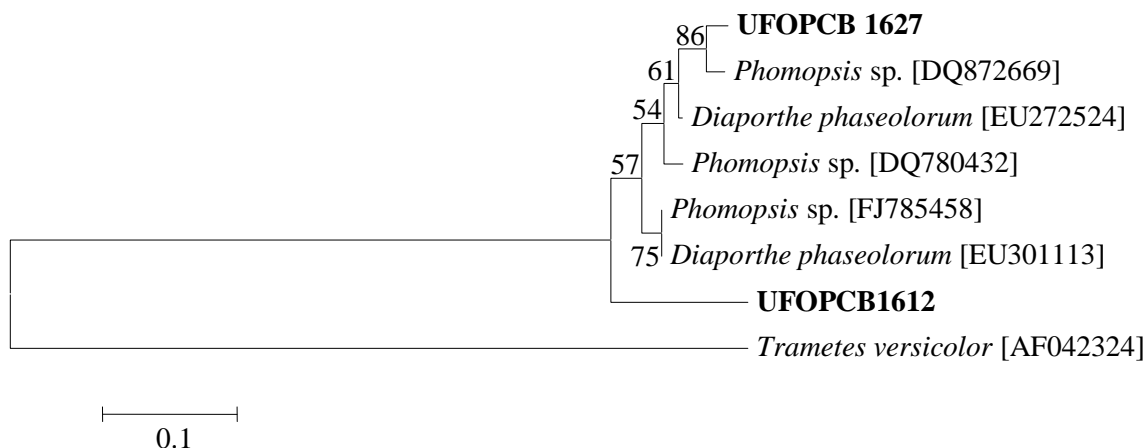


Figura 9: Árvore filogenética demonstrando a proximidade entre os táxons UFOPCB 1612 e 1627 e as espécies mais próximas a partir do alinhamento no BLAST. *Trametes versicolor* (AF042324) foi utilizado como grupo externo.

O gênero *Phomopsis* é freqüentemente investigado em relações fitopatogênicas em plantas de interesse econômico e ecológico, tendo sido isoladas espécies associadas a mamoeiros papaya (*Carica papaya*) (DANTAS *et al.* 2003); em lesões foliares de jatobá (*Hymenaea stigonocarpa*); a sementes de espécies comuns nos Cerrados, como baru (*Dipteryx alata* Vog.) e caroba [*Cybistax antisyphilitica* (Mart.) Mart.]; à mancha foliar em aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) (ANJOS *et al.* 2001. *apud.* CHARCHAR *et al.* 2003); e a várias outras espécies vegetais. Em tal gênero foram encontrados metabólitos secundários bioativos com forte atividade antimicobacteriana. Como endofítico, várias espécies do gênero *Phomopsis* são constantemente encontradas em inúmeras variedades de plantas, tendo sido isolada em outros estudos a partir de *Cassia spectabilis* (DC) Irwin et Barn (*Leguminosae*) (ZANARDI *et al.*, 2005); de *Borreria verticillata* (*Rubiaceae*) L., popularmente conhecida como vassourinha-de-botão; de *Annona squamosa* L., uma variedade de pinha (KAMEI *et al.*, 2008); de *Lippia sidoides* Cham, uma planta medicinal popularmente conhecida como alecrim-pimenta (SIQUEIRA, 2008); dentre outras. Em muitos desses estudos, o gênero mostrou-se como um excelente produtor de metabólitos novos e até bioativos.

O isolado UFOPCB 1597 apresentou 83% de similaridade com o táxon *Xylaria* sp. (EU678663) e 72 nucleotídeos de diferença (Figura 9). Por

apresentar identidade abaixo de 90%, o isolado UFOPCB 1597 foi identificado como *Xylariaceae*.

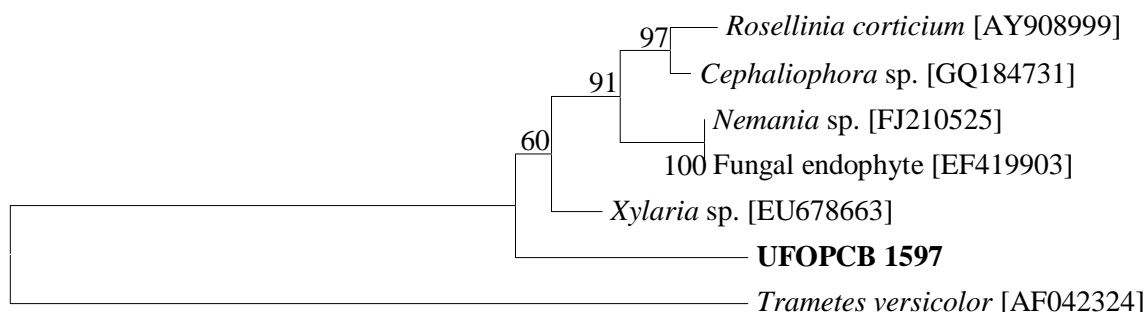


Figura 10: Árvore filogenética demonstrando a proximidade entre o táxon UFOPCB 1597 e as espécies mais próximas a partir do alinhamento no BLAST. *Trametes versicolor* (AF042324) foi utilizado como grupo externo.

A família *Xylariaceae* (*Ascomycota*) é um grupo comumente encontrado em todas as regiões temperadas e tropicais do mundo, sendo isolado de plantas tropicais com maior frequência que de plantas de clima temperado. Várias espécies são normalmente encontrados em árvores em decomposição, em madeiras, sementes, frutos e folhas de angiospermas. Muitas são decompositoras, outras patógenos de plantas e muitas delas são encontradas como endofíticas. Existe a hipótese de que alguns endofíticos *Xylariaceae* sejam colonizadores latentes e que mais tarde, quando a planta comece a senescer, passem à condição de decompositores de celulose e lignina (PETRINI *et al.*, 1995; WHALLEY, 1996; *apud*. DAVIS *et al.*, 2003). Como endofíticos, várias espécies do gênero *Xylaria* têm sido isoladas. Dentre elas, *Xylaria* sp. foi isolada a partir dos frutos de *Sapindus saponaria* (SANTOS *et al.* 2002); de *Borreria verticillata* (*Rubiaceae*) L.; de *Annona squamosa* L.; de *Palicourea marcgravii* (KAMEI *et al.*, 2008); foi também obtida da espécie vegetal *Palicourea marcgravii* (*Rubiaceae*), conhecida popularmente como "erva de rato" ou "café bravo", de onde foram extraídas substâncias antifúngicas frente a fitopatogênicos (DAVIS *et al.*, 2003). Algumas espécies de *Xylaria* são produtoras de metabólitos bioativos, como novos sesquiterpenóides

capazes de inibir a enzima integrase do vírus HIV-1, a qual representa um alvo potencial para o desenvolvimento de agentes anti-HIV de alta seletividade (SINGH *et al.* 1999; *apud* SOUZA *et al.* 2004). Além disso, endofíticos do gênero *Xylaria* são conhecidos por produzir metabólitos de interesse farmacológico com atividade antifúngica. A partir de processos fermentativos, utilizando-se espécies de *Xylaria* já foram obtidas diferentes substâncias, como a griseofulvina, com atividade antimicótica (CAFÊUI *et al.* 2005).

O isolado UFOPCB 378 apresentou 88% de similaridade com o táxon *Alternaria* sp. [FJ210503]. Algumas espécies do gênero *Alternaria* têm sido isoladas como endofíticos associados a ápices caulinares de pupunheiras sadias (ALMEIDA *et al.* 2005) e também à espécie vegetal *Trixis vauthieri*, dentre várias outras espécies. Em alguns estudos *Alternaria* sp. apresentou bioatividade inibitória em ensaios, como é o caso da enzima tripanotiona redutase (TR) de *Trypanosoma cruzi* (COTA *et al.* 2006).

Os isolados UFOPCB 655 e 517 apresentaram, respectivamente, 97 e 95 % de similaridade com o táxon *Cladosporium cladosporioides* [EF568045 e por tanto foram identificados como *C. cladosporioides*. *C. cladosporioides* é um dos fungos mais comuns, com ocorrência registrada em todas as partes do mundo. O fungo é encontrado como saprófita, fitopatogênico (CAFÊUI *et al.* 2005), contaminante do ar e alimentos, endofítico com função biológica importante na decomposição de matéria orgânica sendo também forte competidor com outros microrganismos (DOMSCH *et al.* 1993; ELLIS, 1971; SAMSON *et al.* 2000 *apud* PEREIRA *et al.* 2005).

O isolado UFOPCB 773 apresentou 95 % de similaridade com o táxon *Simplicillium* sp. [AB378537] e por tanto foi identificado como *Simplicillium* sp. Estudos recentes indicam que *Simplicillium* é um novo gênero e que passou a englobar quatro táxons com fiálides ramificadas que dão origem a uma única célula e conídio conidiogênese, uma morfologia que é mais adequadamente acomodada no taxon *Simplicillium* Gams & Zare (ZARE *et al.* 2001; SUNG *et al.* 2004). De acordo com WARD *et al.* (2010) a espécie *S. lanosoniveum* é um parasita de urediniosporos do agente causador da ferrugem asiática da soja, logo, este pode ser útil como um agente de controle biológico. Pelo nosso

conhecimento não foram encontrados dados na literatura em relação a este gênero tendo seu papel como endofítico.

O isolado UFOPCB 659 apresentou 88 % de similaridade com o táxon *Teratosphaeria miniata* [GQ852803] e por tanto foi identificado como *Teratosphaeria* sp. Algumas espécies de *Teratosphaeria* são comumente encontradas como fitopatógenos, como é o exemplo de *Teratosphaeria nubilosa* e outras espécies amplamente estudadas como um sério patógeno foliar de diversas espécies de *Eucalyptus* spp. (HUNTER *et al.* 2009). Como endofítico não há estudos relatando indivíduos do gênero.

Na natureza, muitos fungos endofíticos colonizam seus hospedeiros de forma simbiótica neutra. Entretanto, quando os hospedeiros entram em senescência, estes fungos podem atuar como fitopatógenos ou decompositores. Este fenômeno pode representar uma alternativa adaptativa e que faria parte do ciclo de vida do fungo. Outra hipótese seria a de que fungos, por exemplo, epifíticos, seriam capazes, em algum momento de seu ciclo de vida, penetrar no tecido vegetal e se estabelecerem como endofíticos. As relações ecológicas entre fungos e hospedeiros são tão variáveis e complexas que uma mesma espécie de fungo pode parasitar determinadas espécies vegetais e, paralelamente, agir como simbionte assintomático em outras, como é o caso do fungo *Fusarium oxysporum* (Tabela 4).

Tabela 4: Resumo das principais relações ecológicas dos fungos associados à *Vellozia compacta* Mart. ex Schult. f., conforme comparação com a literatura.

<b>Espécie</b>	<b>UFOPCB e origem</b>	<b>Nicho</b>	<b>Referência</b>
<i>Acarospora</i> sp.	1615 SOB-R*	Fungo liquenizado	PURVIS, 2000
<i>Chaetomium</i> sp.	1593 SOB-F**	Endofítico	MOMESSO <i>et al.</i> 2008; QIN <i>et al.</i> 2009
<i>Diaporthe</i> sp.	1608 SOB-R	Parasita e endofítico	RUBINI <i>et al.</i> 2005
<i>Dothideomycetes</i> sp.	1628 SOB-R	Fitopatogênico, endofítico, epifítico, sapróbio, liquenizado	SCHOCH <i>et al.</i> 2006
<i>Gelasinospora seminuda</i>	1632 SOB-R	Sapróbio e epifítico	CAI <i>et al.</i> 2006
<i>Fusarium oxysporum</i>	1604 SOB-R	Fitopatogênico e endofítico	MENDES <i>et al.</i> 2001; REIS <i>et al.</i> 2005; STOLF <i>et al.</i> 2006; ALMEIDA <i>et al.</i> 2005.
<i>Penicillium</i> sp.	1619, 1611 (SOB-R) e 696 (PEJ-F)	Endofítico	MARINHO <i>et al.</i> 2007; FILL <i>et al.</i> 2003; MARINS <i>et al.</i> 2008; VEGA <i>et al.</i> , 2006.
<i>Pestalopsis microspora</i>	1616 SOB-R	Endofítico e fitopatogênico	METZ <i>et al.</i> 2000; CHARCHAR <i>et al.</i> 2003; SERRA <i>et al.</i> 2007.

<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1618 SOB-R	Endofítico e fitopatogênico	METZ <i>et al.</i> 2000; CHARCHAR <i>et al.</i> 2003; SERRA <i>et al.</i> 2007.
<i>Phoma herbarum</i>	1624 SOB-R	Fitopatogênico	SANTOS, 1996; CHARCHAR <i>et al.</i> 2003.
<i>Phomopsis</i> sp.	1612 e 1627(SOB-R)	Endofítico e fitopatogênico	SUZANA <i>et al.</i> , 2003; CHARCHAR <i>et al.</i> 2003; ZANARDI <i>et al.</i> , 2005; KAMEI <i>et al.</i> , 2008; SIQUEIRA, 2008
<i>Xylariaceae</i>	1597 SOB-F	Sapróbio, patógeno e endofítico	DAVIS <i>et al.</i> , 2003
<i>Alternaria</i> sp.	378 PEJ-R	Endofítico	ALMEIDA <i>et al.</i> 2005; COTA <i>et al.</i> 2006
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	655 PEJ-F e 517 PEJ-R	Endofítico, epifítico, saprófita e fitopatogênico	PEREIRA <i>et al.</i> 2005; CAFÊUI <i>et al.</i> 2005
<i>Simplicillium</i> sp.	773 PEJ-R	Novo gênero (parasita)	ZARE <i>et al.</i> 2001; WARD <i>et al.</i> 2010
<i>Teratosphaeria</i> sp.	659 PEJ-R	Fitopatogênico	HUNTER <i>et al.</i> 2009

\*R: isolado obtido a partir do fragmento de raiz; \*\*F: isolado obtido a partir do fragmento de folha.

## 5.1. Análise dos dados

A Taxa de Colonização ( $T_c$ ), número de amostras das quais foi possível isolar um ou mais fungos endofíticos, normalmente varia com a localização geográfica da planta, com as condições climáticas do local de coleta, com a idade da planta e/ou com a parte anatômica utilizada para extração dos endofíticos. No presente trabalho, observou-se que, comparativamente, as freqüências de isolamento de fungos endofíticos relativas ao número amostral, entre os dois ambientes (SOB e PEJ), tiveram uma diferença de 16,6 % maior no PEJ. Esta diferença é pouco significativa para caracterizar a variação entre os dois ambientes como consequência peculiar e usual de cada ambiente devido ao baixo número do esforço amostral. Essa variação na Taxa de Colonização poderia ser significativamente diferente e maior comparando se a freqüência de fungos endofíticos de espécies diferentes, mas não a mesma espécie em diferentes regiões (Tabela 5).

Quanto à diferença na freqüência da Taxa de Colonização de isolados entre folhas e raízes, esta foi 22 % maior nas raízes de *V. compacta* do que nas folhas, porém, também não foi uma diferença significativamente considerável como usual e peculiar, já que, no PEJ folhas e raízes apresentaram o mesmo número de isolados (27 de folhas e 27 de raízes).

TAYLOR *et al.* (1999) obtiveram taxas de colonização que variaram de 23,4 a 57,3% em *Trachycarpus fortunei*. Neste estudo, a taxa de colonização obtida em *V. compacta* foi de 20 %, o que torna evidente, no geral, que a freqüência estimada de fungos endofíticos de *V. compacta* é considerada baixa em relação a outras espécies vegetais já estudadas (PETRINI, 1991; SAIKKONEN *et al.*, 1998; *apud* WIYAKRUTTA *et al.* 2004. VAZ, 2008; RODRIGUES, 1994; *apud* VIEIRA, 2008). Este fato pode dever-se às condições restritivas e estressantes do ambiente nos afloramentos rochosos, que seriam mais seletivos quanto às espécies de fungos endofíticos capazes de colonizar *V. compacta*.

Tabela 5: Taxa de Colonização (Tc) comparativa para os ambientes (SOB e PEJ) e para folhas e raízes de *V.compacta*.

<b>Taxa de Colonização (Tc): <math>[(Nd / Nt) \times 100]</math></b>			
	<b>Nd</b>	<b>Nt</b>	<b>Tc (%)</b>
Serra do Ouro Branco	30	180	16,7
Parque Estadual do Jalapão	42	180	23,3
Folhas	28	180	15,6
Raízes	44	180	24,4
<b>Total</b>	<b>72</b>	<b>360</b>	<b>20</b>

Nd: número de isolados obtidos; Nt: número de fragmentos plaqueados para isolamento.

No presente trabalho, foi observado baixo índice de similaridade entre os dois ambientes (SOB e PEJ), tendo o índice de Sorensen [ $S_s = 2a / (2a + b + c)$ ] determinado similaridade máxima de 9% ( $S_s = 0,086$ ), considerando a possível similaridade entre os táxons UFOPCB 1611 e 696, ou UFOPCB 1619 e 696. Lembrando ainda que o máximo de similaridade possível, nesse caso, seria de 78% ( $S_s = 0,78$ ), já que o número de táxons identificados é diferente entre os dois ambientes amostrados.



## 6. CONCLUSÃO

Pelo constatado no presente trabalho, *Vellozia compacta* apresenta uma fonte única e diversa de fungos endofíticos em seus tecidos vegetais e, possivelmente, pode abrigar espécies de fungos ainda desconhecidas. Quanto à similaridade, cada um dos ambientes mostrou-se bastante singular em relação à comunidade de fungos endofíticos de seus tecidos. Além disso, o estudo dos fungos endofíticos é de grande importância, não só pela contribuição para o conhecimento da micota tropical, muito diversa e ainda pouco explorada e conhecida, como também pelo conhecimento da ecologia dessas comunidades e pelas inúmeras possibilidades de aplicação em estudos biotecnológicos de fármacos, no biocontrole de pragas, dentre outros. Pelo nosso conhecimento, este trabalho representa o primeiro relato da presença de fungos endofíticos em *V. compacta*, uma planta endêmica e que traz consigo características únicas e restritivas, as quais estão relacionadas ao ambiente onde a espécie ocorre. A comunidade de fungos endofíticos associados à *V. compacta* representa uma fonte interessante para estudos ecológicos, evolutivos e biotecnológicos, devido à peculiar capacidade de *V. compacta* em lidar com os múltiplos estresses característicos dos ambientes de Campos Rupestres. Além disso, a comunidade de fungos endofíticos de *V. compacta* pode exercer diferentes papéis na defesa da planta hospedeira contra estresses bióticos e abióticos, tais como o aumento da tolerância à seca, aumento da taxa fotossintética e conseqüentemente do crescimento, no biocontrole de pragas, entre outros. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar estas possibilidades. Este estudo da riqueza da micota endofítica associada à *V. compacta* é uma pequena contribuição, perto da gama de possibilidades para continuidade do trabalho.

### 6.1 Novas perspectivas de estudo:

- Expandir o conhecimento da comunidade de fungos endofíticos associados a espécies de *Velloziaceae* presentes em biomas tropicais, por meio de isolamento e técnicas moleculares de identificação;

- Avaliar o potencial biotecnológico da comunidade de fungos endofíticos associados a esta espécie vegetal, testando se as possíveis atividades de seus metabólitos primários e secundários, contra patógenos de forma geral;
- Investigar as relações simbióticas entre os fungos endofíticos e a planta hospedeira, tal como a produção ou indução de metabólitos capazes de conferir vantagens adaptativas e de sobrevivência à planta, tais como tolerância aos estresses bióticos e abióticos, como diminuição da herbivoria e tolerância à insuficiência de água, entre outras

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, Cristina Vieira de; YARA, Ricardo; ALMEIDA, Marcílio de. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada in vivo e in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 5, p.467-470, 2005.

ARAÚJO, Ademir Sérgio Ferreira de; MONTEIRO, Regina Teresa Rosim. INDICADORES BIOLÓGICOS DE QUALIDADE DO SOLO. **Journal Of Biosciences**, Uberlândia - Mg, v. 23, n. 3, p.66-75, 20 set. 2007.

ARAÚJO, Ademir Sérgio Ferreira de. **Ecologia microbiana do solo**. Informativo Científico da FAPEPI: Sapiência. Teresina, 2006. 12 v.

ARNOLD, A. Elizabeth *et al.* Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Blackwell Publishing**: Blackwell Synergy, Tucson, v. 3, n. 4, p.267-274, jul. 2000.

ARNOLD, A. Elizabeth *et al.* Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. **Mycologia**, v. 99, p. 185-206, 2007.

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

AZEVEDO, João Lúcio. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p.225-229, ago. 1999.

AZEVEDO, João Lúcio *et al.* Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Environmental Biotechnology**, São Paulo, v. 3, n.1, p. 40-65, 2000.

CAFÊU, Mariana C. *et al.* SUBSTÂNCIAS ANTIFÚNGICAS DE *Xylaria* sp., UM FUNGO ENDOFÍTICO ISOLADO DE *Palicourea marcgravii* (RUBIACEAE). **Química Nova**, Araraquara, v. 28, n. 6, p.991-995, 10 ago. 2005.

CAI, Lei; JEEWON, Rajesh; HYDE, Kevin D.. Phylogenetic investigations of Sordariaceae based on multiple gene sequences and morphology. **Elsevier**, Hong Kong, n. , p.137-150, 2006.

CHARCHAR, Maria José D'a.; ANJOS, José R. N.; MELO, José T.. Infecção Natural de Jatobá por *Phomopsis* sp. no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. , p.316-318, jun. 2003.

CLAY, Keith; SCHARDL, Christopher. Evolutionary Origins and Ecological Consequences of Endophyte Symbiosis with Grasses. **The American Naturalist**, Chicago, v. 160, n. , p.99-127, 2002.

COLLADO G., R. *et al.* Biologically active sesquiterpenoid metabolites from the fungus *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry**, v. 41, n. , p. 513–517, 1996.

COTA, Betania Barros *et al.* Estudo da atividade inibitória dos extratos do fungo endofítico *Alternaria* sp. sobre a enzima tripanotona redutase. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29. 2006, Águas de Lindóia - SP. **Anais...** . Águas de Lindóia: Sdq, 2006.

DANTAS, Ana Letícia Almeida *et al.* In Vitro Study of *Vellozia pusilla* Pohl (Velloziaceae), a. **Brazilian Archives Of**, Rio de Janeiro, v. 48, n. , p.57-61, 2005.

DANTAS, Suzana A. F. *et al.* Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na Central de Abastecimento do Recife. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília - Df, v. 28, n. 5, p.528-534, out. 2003.

DAVIS, E. Christine *et al.* Endophytic Xylaria (Xylariaceae) Among Liverworts And Angiosperms: Phylogenetics, Distribution, and Symbiosis. **American Journal Of Botany**, North Carolina, v. 90, n. 11, p.1661-1667, 2003.

DIAS, Allan Kardec Carlos. **Efeito Inibitório de Compostos Organoestânicos sobre Fungos Isolados de Câmaras de Maturação**. 2005. 108 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

ECO QUÍMICA: PORTAL DE QUÍMICA E MEIO AMBIENTE (Ed.). **Microbiologia:** Ecologia Microbiana. Disponível em: <[http://ube-164.pop.com.br/repositorio/4488/meusite/micro/ecologia\\_microbiana.htm](http://ube-164.pop.com.br/repositorio/4488/meusite/micro/ecologia_microbiana.htm)>. Acesso em: 12 nov. 2009.

ESTEVES, Daniela *et al.* Fungos Endofíticos como Mediadores na Relação entre *Baccharis Dracunculifolia* e Herbívoros no Parque Nacional da Serra do Cipó, MG. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**. Caxambu: Seb, 2007.

FILL, Taícia P. *et al.* Atividade antibiótica de substâncias produzidas pelo fungo *Penicillium* sp., um endofítico de *Melia azedarach*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30., 2007, Águas de Lindóia - Sp. **Anais...** . Águas de Lindóia - Sp: Sdq, 2007.

GALTON, Richard (Ed.). **Panama Disease:** Fusarium Wilt 'tropical' race 4. Northern Territory Government. Disponível em: <[http://www.nt.gov.au/d/Primary\\_Industry/index.cfm?header=Panama%20Disease](http://www.nt.gov.au/d/Primary_Industry/index.cfm?header=Panama%20Disease)>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2010.

GANLEY, Rebecca J.; BRUNSFELD, Steven J.; NEWCOMBE, George. A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. **Pnas**, Moscow, v. 101, n. 27, p.10107-10112, 6 jul. 2004.

GARCIA, Queila Souza; DINIZ, Izabella Scalabrini Saraiva. Comportamento germinativo de três espécies de Vellozia da Serra do Cipó, MG. **Scielo Brasil: Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 17, n. 4, p.487-494, 2003.

GUIMARÃES, Denise Oliveira *et al.* Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **Blackwell Publishing Ltd: Federation of European Microbiological Societies**, Ribeirão Preto, p. 134-144. 13 dez. 2007.

HAWKSWORTH, David L. The Fungal Dimension of Biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycological Research**, Madrid v. 95, n. , p.641-655, 1991.

HAWKSWORTH, David L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies In Mycology**, Madrid, v. 50, n. , p.9-18, 2004.

HAWKSWORTH, David L. The magnitude of fungal diversity : the 1±5 million species estimate revisited. **Mycol. Res.**, Madrid, Spain, v. 105, n. 12, p.1422-1432, 14 dez. 2001.

HANADA, Rogério Eiji. **Controle de *Phytophthora Palmivora*, Agente Causal da Podridão-Parda dos Frutos de Cacaueiro com Fungos Endofíticos.** 2006. 114 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Do Amazonas, Manaus - Am, 2006.

HUANG Y. J. *et al.* Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, China, v. 31, n. , p. 163–167, 2001.

HUNTER, Gavin C. *et al.* *Teratosphaeria nubilosa*, a serious leaf disease pathogen of *Eucalyptus* spp. in native and introduced areas. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 10, n. 1, p.1-14, 2009.

KAMEI, S. H. *et al.* *Nectria* sp., *Phomopsis* sp. e *Xylaria* sp. fungos endofíticos isolados de *Borreria verticillata* (Rubiaceae) L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008, Salvador - BA. **Congresso**. Salvador: Sbg, 2008.

LUMBSCH H. T., HUHNDORF S. Whatever happened to the pyrenomycetes and loculoascomycetes? **Mycological Research**, v. 111, p. 1064–1074, 2007.

MANOCH, Leka *et al.* Morphological Studies of Slime Molds, Sordariaceous Fungi, and an Endophytic Synnemata Fungus. **Journal Of Microscopy Society Of Thailand**, Bangkok, v. 23, n. 1, p.25-29, 2009.

MARINHO, Andrey Moacir do Rosário; MARINHO, Patrícia Santana Barbosa; RODRIGUES FILHO, Edson. Constituintes Químicos de *Penicillium* sp, um Fungo Endofítico Isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, São Carlos, v. 9, n. 2, p.189-200, dez. 2007.

MARINS, E. F. C. *et al.* *Penicillium purpurogenum* como endofítico de *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008, Salvador - Ba. **Anais...** . Salvador: Sbg, 2008.

MATIAS, L. Q.. **Biologia e estratégia para conservação de *Constantia cipoensis* Porto & Brade (Orchidaceae)**. 1992. 112 f. Tese (Mestrado) - Departamento de Ecologia, Conservação e Manejo da Vida Silvestre, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1992.

MELLO-SILVA, R. 1996. Revisão das *Vellozia tubifloras* (*Vellozia* sect. *Radia*) e caracteres para o aprimoramento da filogenia de Velloziaceae. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, São Paulo.

MENDES, Marta. A. S. *et al.* ERRADICAÇÃO DE *Fusarium oxysporum* EM SEMENTES DE ALFAFA UTILIZANDO TERMO E QUIMIOTERAPIA. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília - Df, v. 26, n. 2, p.148-152, 11 abr. 2001.

METZ, Anneke M. *et al.* Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, a taxol-producing fungus. **Microbiology**, Bozeman, v. 146, n. , p.2079-2089, 2000.

MOMESSO, Luciano da Silva *et al.* Chaetoglobosinas produzidas por *Chaetomium globosum*, fungo endofítico associado a *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae). **Química Nova**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 7, p.1680-1685, 19 set. 2008.

MORAKOTKARN, Doungporn; KAWASAKI, Hiroko; SEKI, Tatsuji. Molecular diversity of bamboo-associated fungi isolated from Japan. **Blackwell Publishing Ltd: Federation of European Microbiological Societies**, Suita-city, p. 10-19. 8 nov. 2007.



NOZAKI, Márcia de H.; CAMARGO, Margarete; BARRETO, Modesto. Caracterização de *Diaporthe citri* em Diferentes Meios de Cultura, Condições de Temperatura e Luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, São Paulo - Sp, v. 29, n. 4, p.429-434, 2 fev. 2004.

PEREIRA, Olinto Liparini *et al.* Isolamento e identificação de fungos micorrízicos rizotonióides associados a três espécies de orquídeas epífitas neotropicais no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa - Mg, v. 29, n. 2, p.191-197, abr. 2005.

PEREIRA, Ricardo Tadeu Galvão; PFENNING, Ludwig Heinrich; CASTRO, Hilário Antônio de. Caracterização e dinâmica de colonização de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de vries em frutos do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 6, p.1112-1116, 15 fev. 2005.

PETRINI, O. *et al.* Ecology metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, New York, v. 1, n. , p.185-196, 1992.

PURVIS, O. W. *et al.* Bioaccumulation of Lead by the Lichen *Acarospora smaragdula* from Smelter Emissions. **New Phytologist**, London, v. 147, n. 3, p.591-599, set. 2000.

QIN, Jian-chun *et al.* Polyhydroxylated steroids from an endophytic fungus, *Chaetomium globosum* ZY-22 isolated from *Ginkgo biloba*. **Elsevier**, Shaanxi - Ch, v. 74, n. , p.786-790, 7 maio 2009.

REIS, Ailton *et al.* First Report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Race 3 on Tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Venda Nova do Imigrante - Es, v. 30, n. 4, p.426-429, 13 maio 2005.

RIBEIRO, L. C. *et al.* Riqueza e abundância de epífitas sobre canelas de ema gigantes (*Vellozia gigantea* NL Menezes e Mello-Silva) na Serra do Cipó (MG): três populações sob diferentes níveis de proteção. In: VII Congresso de Ecologia do Brasil, 2005, Caxambu. Anais do VII Congresso de Ecologia do Brasil, 2005.

RIEHL, Carlos A. S.; PINTO, Angelo C. A cleistanthane diterpene lactone from *Vellozia compacta*. **Elsevier: Phytochemistry**, Rio de Janeiro, n. , p.917-919, 2000.

RUBINI, Marciano R. *et al.* Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciososa*, causal agent of Witches. **International Journal Of Biological Sciences**, Caxias do Sul - Rs, p. 24-33. 1 fev. 2005.

SALES JÚNIOR, Rui *et al.* Controle biológico de *Monosporascus cannonballus* com *Chaetomium*. **Fitopatologia Brasileira**, Mossoró, v. 32, n. 1, p.70-75, 1 fev. 2007.

SANTOS, Luiz Fernando Arruda *et al.* Degradação de Oligoglicosídeos Sesquiterpênicos Acíclicos (OGSA) por *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Sapindus saponaria*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., 2006, Águas de Lindóia - SP. **Anais...** . Águas de Lindóia: Sdq, 2006.

SANTOS, M. F. **Análises da microflora associada ao baru (*Dipetryx alata* Vog.) e à caroba [(*Cybastax antisiphilitica* (Mart.) Mart.) Mart.]**. 1996. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, 1996.

SCHOCH, Conrad L. *et al.* A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. **Mycologia**, Corvallis, v. 98, n. 6, p.1041-1052, 4 ago. 2006.

SCHULZ, Barbara; BOYLE, Christine. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Germany, v. 6, n. 109, p.661-686, 2005.

SERRA, Ilka Márcia R.s.; COELHO, Rildo S.b.. Mancha de *Pestalotiopsis* em Helicônia: Caracterização da Doença e Potenciais Fontes de Resistência. **Fitopatologia Brasileira**, Dois Irmãos - Pe, v. 32, n. 1, p.44-50, 1 fev. 2007.

SILVA, Adriana da Silva e *et al.* Estudo químico do fungo *Pestalotiopsis* sp. isolado do fruto de *Gustavia* cf. *elliptica*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009, Fortaleza - Ce. **Anais...** . Fortaleza: Sdq, 2009.

SILVA, Priscila Da. **Fungos Anamorfos decompositores do folheto de *Caesalpinia echinata* Lam. provenientes de exemplares estabelecidos em áreas com e sem impacto de poluição aérea.** 2007. 166 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2007.

SIQUEIRA, Virgínia Medeiros de. **Fungos endofíticos de folhas e caules de *Lippia sidoides* Cham. e avaliação da atividade antimicrobiana.** 2008. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

S. JÚNIOR, Rui *et al.* Controle biológico de *Monosporascus cannonballus* com *Chaetomium*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília - Df, v. 32, n. 1, p.70-75, fev. 2007.

SOARES, Letícia Anselmo; GARCIA, Queila Souza. Germinação de Quatro Espécies de Velloziaceae Ocorrentes em Diferentes Ambientes. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu - Mg. **Anais... .** Caxambu: Seb, 2007.

SOUZA, Antonia Queiroz Lima de *et al.* Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from amazonian toxic plants: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich and *Strychnos cogens* bentham. **Scientific Electronic Library Online**, São Paulo, v. 34, n. 2, p.185-195, 2004.

SOUZA, Cynthia Domingues de; FELFILI, Jeanine Maria. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Scientific Electronic Library Online**, Goiânia, v. 20, n. 1, p.135-142, 2006.

STOLF, E. C.; POCASANGRE, L. E.; GUERRA, M. P.. Efeito De Re-Inoculações De Fungos Endofíticos Sobre O Controle Do Nematóide Cavernícola Da Bananeira (*Radopholus Similis*). In: Reunião Internacional Da Associação Para A Cooperação, 17., 2006, Joinville - Sc. **Anais... .** Joinville: Acorbat, 2006. p. 393 - 406.

Strobel, Gary. Harnessing endophytes for industrial microbiology. **Current Opinions in Microbiology**, Californy, v. 9, n. , p. 240-244. 2006.

STROBEL, Gary *et al.* Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal Of Natural Products**, Salt Lake City, p. 257-268. 2 jun. 2004.

STROBEL, Gary; DAISY, Bryn. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, Montana, v. 67, n. 4, p.491-502, dez. 2003.

SUNG, Gi-ho; SPATAFORA, Joseph W. *Cordyceps cardinalis* sp. nov., a new species of *Cordyceps* with an east Asianeastern North American distribution. **Mycologia**, Oregon, v. 96, n. 3, p.658-666, 2004.

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

VEGA, Fernando E. *et al.* *Penicillium* species endophytic in coffee plants and ochratoxin A production. **Mycologia**, Lawrence, v. 98, n. 1, p.31-42, 2006.

VIEIRA, Mariana de Lourdes Almeida. **BIOPROSPECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A *Solanum cernuum* Vell. (SOLANACEAE)**. 2008. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

VINCENT, C. R.; JACOBI, C. M.; & ANTONINI, Y. Diversidade na adversidade. **Ciência Hoje**. Ouro Preto, v. 31, n. , p.64-67, 2002.

WARD, N. A. *et al.* Mycoparasitism of *Phakopsora pachyrhizi* by *Simplicillium lanosoniveum*. In: NATIONAL SOYBEAN RUST SYMPOSIUM, 11. 2009, Louisiana - No. **Proceedings...** . Louisiana: Copyright, 2010.

WEDIN, Mats *et al.* Phylogenetic relationships of Lecanoromycetes (Ascomycota) as revealed by analyses of mtSSU and nLSU rDNA sequence data. **Mycol. Res.**, Umea, v. 109, n. 2, p.159-172, fev. 2005.

WEDIN, Mats *et al.* Species delimitation and evolution of metal bioaccumulation in the lichenized *Acarospora smaragdula* (Ascomycota, Fungi) complex. **Cladistics**, London, v. 25, n. , p.161-172, 25 jul. 2008.

WIYAKRUTTA, Suthep *et al.* Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated. **World Journal Of Microbiology & Biotechnology**, Bangkok, v. 20, n. , p.265-272, 2004.

WYK, J.p.h. Van. Saccharification of paper products by cellulase from *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma reesei*. **Biomass And Bioenergy**, Medunsa - Af, v. 16, n. , p.239-242, 28 ago. 1998.

ZANARDI, Lisinéia Maria *et al.* Metabólitos produzidos por *Phomopsis cassiae*, um fungo endofítico isolado de *Cassia spectabilis* (DC) Irwin et Barn. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., 2002, Araraquara. **Anais...** . Araraquara: Sdq, 2002.

ZARE, R. and GAMS, W. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov, **Nova Hedwigia**, v. 73, n. , p. 1–50, 2001.