
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA: MICROBIOLOGIA APLICADA)**

ANA MARIA LIMA CORREIA

**DIVERSIDADE E PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE
BEGONIA spp. ENCONTRADAS NA MATA ATLÂNTICA**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências, do Câmpus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas
(Área: Microbiologia Aplicada).

Abril - 2016

ANA MARIA LIMA CORREIA

**DIVERSIDADE E PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE
BEGONIA spp. ENCONTRADAS NA MATA ATLÂNTICA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, do
Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia
Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Possedente de Lira

Abril - 2016

589.2 Correia, Ana Maria Lima
C824d Diversidade e prospecção de fungos endofíticos de
Begonia spp. encontradas na Mata Atlântica / Ana Maria
Lima Correia. - Rio Claro, 2016
59 f. : il., figs., gráfs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Andre Rodrigues
Coorientadora: Simone Possedente de Lira

1. Fungos. 2. Comunidades. 3. Fitopatógenos. 4.
Bioensaio. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DIVERSIDADE E PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE
BEGONIA spp. ENCONTRADAS NA MATA ATLÂNTICA**

AUTORA: ANA MARIA LIMA CORREIA

ORIENTADOR: ANDRE RODRIGUES

CO-ORIENTADORA: SIMONE POSSEDENTE DE LIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



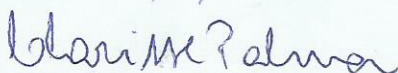
Prof. Dr. ANDRE RODRIGUES

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Prof. Dr. WELINGTON LUIZ DE ARAÚJO

Departamento de Microbiologia / Universidade de São Paulo



Profa. Dra. CLARISSE PALMA DA SILVA

Departamento de Ecologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 08 de abril de 2016

*Dedico este trabalho aos meus pais, por todo
apoio, carinho e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

À CAPES e, principalmente, à FAPESP pela bolsa concedida durante todo o meu mestrado, a qual foi muito importante para minha estadia em Rio Claro e desenvolvimento da minha pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Rodrigues, pela oportunidade de desenvolver meu projeto de mestrado sob sua orientação. Pelas horas de dedicação ao meu trabalho, por estar sempre presente, acompanhando desde as coletas, até a avaliação e discussão dos resultados. Agradeço pelas discussões científicas, tenho certeza de que aprendi muito durante esses dois anos e minha visão como cientista teve muita influência sua.

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Simone Possedente de Lira (ESALQ/USP, Piracicaba), pelas sugestões nesse trabalho e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório no desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Assis (UNESP, Rio Claro) pelas identificações das begonias pela dedicação e bom humor durante as coletas.

À Prof^a. Dr^a. Eliane Jacques pela identificação das begonias.

Ao Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck (USP, São Carlos), coordenador do projeto temático o qual este trabalho está vinculado.

Aos demais professores que participaram do meu Mestrado e demais funcionários envolvidos no programa de Microbiologia Aplicada e na UNESP como um todo.

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia Aplicada da UNESP de Rio Claro.

Ao Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), onde desenvolvi a maior parte da minha pesquisa.

Aos Laboratórios de Evolução Molecular e ao Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial.

Ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia como um todo e seus funcionários, pela oportunidade de formação acadêmica oferecida.

Ao doutorando Sergio Kakazu pela ajuda com as amostras colocadas no sequenciador.

Ao pessoal do laboratório de Química de Produtos Naturais da USP (Sérgio, Luciana, Gislaine e Flávio) por terem me ajudado com as coletas. Em especial, a Diana que acompanhou e ensinou os procedimentos da parte química deste trabalho.

Ao pessoal do LESF, alguns deles já não estão mais lá, mas com certeza deixaram suas marcas, pelo apoio, pelas discussões científicas e de vida (Rafael, Jaqueline, Sadala, Bárbara, Lucas, Mariana, Danilo, Bruna, Júlio, Daniel, Irina). Em especial ao meu grande

amigo Quimi, por toda sua paciência comigo, apoio e amizade, por ter me ensinado a fazer as melhores lâminas que eu jamais conseguiria sozinha; por fazer-me rir e ver o copo meio cheio, ao invés do contrário. E ao meu grande amigo Tássio, por ter me ajudado muito com a estatística desse trabalho, por me apoiar, pelo prazer da convivência ao seu lado, por ser uma das pessoas mais inteligentes que conheço e dividir esse conhecimento comigo, aprendi muito com você.

À minha família, em especial os meus pais, Francisco e Odete, por sempre me incentivarem com os estudos, e me apoiarem incondicionalmente em minhas escolhas. Aos meus irmãos, que fizeram muitas viagens por minha causa nos anos em que morei fora, e pelas esporádicas recepções maravilhosas que faziam quando eu voltava. Muito obrigada.

*“A tarefa não é tanto ver o que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê”.*
Arthur Schopenhauer

RESUMO

Fungos endofíticos vivem no interior dos tecidos das plantas sem causar dano aparente aos seus hospedeiros. É sabido que esses fungos podem estimular as defesas da planta frente a fitopatógenos, através da produção de compostos químicos; sendo uma promissora fonte para a descoberta de novos compostos bioativos. Utilizando método dependente de cultivo, o presente estudo avaliou a diversidade de fungos endofíticos associados à *Begonia fischeri*, *Begonia olsoniae* e *Begonia venosa* encontradas na Mata Atlântica. Adicionalmente, foram realizados bioensaios *in vitro* com frações acetato dos fungos endofíticos frente aos fitopatógenos *Phomopsis sojae* e *Colletotrichum gloeosporioides*, com o intuito de verificar a produção de compostos bioativos. Das 20 folhas analisadas de cada espécie de planta, um total de 426 fungos endofíticos foi obtido, sendo que 120 foram isolados de *B. fischeri*, 151 de *B. olsoniae* e 155 de *B. venosa*. Após a triagem dos isolados e sequenciamento da região ITS, as sequências foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs) e as métricas ecológicas aplicadas a 97% de similaridade. Utilizando tal abordagem, 46 taxa foram identificados, sendo *Colletotrichum* (51,6% do total de 426 isolados) e *Diaporthe* (22,5%) os gêneros mais abundantes, seguido por *Phyllosticta* (3,5%), *Neopestalotiopsis* (1,8%), *Stagonospora* (1,8%) e *Nigrospora* (1,6%) entre os gêneros com menor abundância. A riqueza e a diversidade de fungos foi maior em *B. fischeri*, quando comparada a *B. olsoniae* e *B. venosa*. Além disso, a análise de correspondência sugere que o tipo de hospedeiro pode explicar 24% das diferenças observadas entre as comunidades de endófitos, demonstrando que outras variáveis ecológicas (por exemplo, o local de coleta) também podem explicar a estrutura dessas comunidades. Dos 88 endófitos utilizados nos ensaios, as frações acetato de 26% deles (n= 23) inibiram pelo menos um fitopatógeno. Tais resultados são promissores e indicam que os fungos endofíticos dessas plantas são uma fonte ainda não explorada para a prospecção de compostos antifúngicos.

Palavras-chave: Endófitos. Comunidades. Fitopatógenos. Bioensaio.

ABSTRACT

Endophytic fungi live within plant tissues without causing any apparent disease symptoms. Fungal endophytes may stimulate host defenses towards pathogens through the production of chemical compounds; thus they are a promising source for the discovery of new bioactive compounds. Using culture dependent methods coupled with a polyphasic approach for fungal identification, we evaluated the diversity of endophytic fungi associated with *Begonia fischeri*, *Begonia olsoniae* and *Begonia venosa* found in the Atlantic Rain Forest. In addition, we carried out *in vitro* bioassays from acetate fractions of the endophytic fungi towards the plant pathogens *Phomopsis sojae* and *Colletotrichum gloeosporioides*, to verify the putative production of bioactive compounds. From 20 leaves analyzed of each species, a total of 426 endophytic fungi were obtained, comprehending 120 from *B. fischeri*, 151 from *B. olsoniae* and 155 from *B. venosa*. After screening the isolates and sequencing the ITS region, the sequences were clustered into Operational Taxonomic Units (OTUs) and ecological metrics applied at 97% similarity. Using this approach, we identified 46 taxa and the prevalent genera were *Colletotrichum* (51.6% of the total of 426 isolates) and *Diaporthe* (22.5%), followed by *Phyllosticta* (3.5%), *Neopestalotiopsis* (1, 8%), *Stagonospora* (1.8%) and *Nigrospora* (1.6%) among the genera found in minor abundance. Richness and diversity of fungi were higher in *B. fischeri* in comparison to *B. olsoniae* e *B. venosa*. Furthermore, correspondence analysis demonstrated that the host plant explains 24% of the observed differences among the endophytic community, suggesting that other environmental variables (e.g., sampling sites) may explain the community structure. From the 88 endophytes evaluated in the inhibition assays, 26% (n = 23) of the acetate fractions showed activity against at least one phytopathogen. These results are promising and indicate that endophytic fungi these plants are an untapped source for prospecting antifungal compounds.

Keywords: Endophytes. Communities. Pathogens. Bioassay.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 CAPÍTULO 1 - COMUNIDADES ENDOFÍTICAS ENCONTRADAS EM <i>BEGONIA</i> spp. DA MATA ATLÂNTICA	12
2.1 INTRODUÇÃO	13
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	15
2.2.1 Área de estudo	15
2.2.2 Coleta das amostras	15
2.2.3 Isolamento dos fungos endofíticos.....	17
2.2.4 Triagem, extração de DNA, sequenciamento e análise filogenética.....	18
2.2.5 Análise das comunidades de endófitos	20
2.3 RESULTADOS	20
2.3.1 Diversidade e ecologia dos fungos endófitos	20
2.3.2 Estrutura das comunidades de endófitos encontrados em begônias.....	25
2.4 DISCUSSÃO	27
2.5 REFERÊNCIAS	31
2.6 ANEXOS	35
3 CAPÍTULO 2 - PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ENCONTRADOS EM TRÊS ESPÉCIES DE <i>BEGONIA</i>.....	46
3.1 INTRODUÇÃO	47
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	49
3.2.1 Origem das linhagens.....	49
3.2.2 Obtenção da fração acetato e bioensaios in vitro.....	49
3.3 RESULTADOS	51
3.4 DISCUSSÃO	55
3.5 REFERÊNCIAS	57
4 CONSIDERAÇÕES	59
5 PERSPECTIVAS	59

1 INTRODUÇÃO

Micro-organismos endofíticos vivem no interior dos tecidos das plantas sem causar danos aparentes ao hospedeiro. Muitos desses micro-organismos podem auxiliar o desenvolvimento das plantas e promover a resistência frente a patógenos, devido à produção de compostos bioativos. Embora haja um grande interesse nos metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos, muitas questões relacionadas à biologia e ecologia desses organismos ainda não são compreendidas.

Devido à ampla diversidade taxonômica, os fungos endofíticos constituem uma fonte promissora de biocompostos, porém pouco explorada. Pesquisas apontam que esses micro-organismos são bons produtores de enzimas e metabólitos secundários, o que possibilita sua aplicação em diversas áreas como a indústria farmacêutica, agrônômica e química. Nesse contexto, os fungos endofíticos se destacam no controle de fitopatógenos, pois compartilham o mesmo nicho ecológico, portanto, úteis no combate dessas pragas que assolam diversas lavouras.

É sabido que a Mata Atlântica abriga uma grande diversidade biológica de plantas, animais e micro-organismos, devido às condições ambientais únicas. Considerado um *hotspot*, tal bioma apresenta grande relevância em estudos de diversidade e bioprospecção, pois é um refúgio de espécies ainda desconhecidas pela ciência e com amplo potencial biotecnológico. Tal bioma possui uma variedade de espécies de plantas endêmicas e não endêmicas. Dentre as endêmicas, destacamos *Begonia venosa* e *Begonia olsoniae* e a espécie não endêmica *Begonia fischeri*, as quais não foram estudadas do ponto de vista da diversidade e prospecção de fungos endofíticos.

Nesse contexto, ambientes diferenciados como as ilhas também são de grande relevância em estudos de diversidade, como é o caso do Arquipélago de Alcatrazes. Localizado a 43 km da costa de São Sebastião (SP), o arquipélago é constituído por cinco ilhas: Ilha da Sapata, do Paredão, do Porto, do Sul, e a principal, Ilha de Alcatrazes. Por fazer parte da Mata Atlântica, o arquipélago apresenta espécies de *Begonia*, incluindo *B. venosa*, a qual é considerada endêmica da ilha.

De ocorrência pantropical, o gênero *Begonia* é reconhecido como um dos maiores do grupo das angiospermas, quanto ao número de espécies descritas (cerca de 1.500). A maioria dos estudos enfatizou a taxonomia, a genética de populações e as propriedades do genoma desse gênero. Por outro lado, existem trabalhos que relataram o uso de espécies do gênero

Begonia para fins biotecnológicos. No entanto, até o momento não há estudos sobre a diversidade e prospecção de fungos endofíticos associados às espécies desse gênero.

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade das comunidades de fungos endofíticos presentes em *B. fischeri*, *B. olsoniae* e *B. venosa* encontradas em diferentes locais da Mata Atlântica (continente e ilha) e, posteriormente, avaliar o potencial desses micro-organismos na inibição do crescimento de fitopatógenos. Os resultados desse estudo estão divididos em dois capítulos, apresentados em formato de manuscritos, a saber:

Capítulo 1: Com um enfoque ecológico, avaliamos as comunidades endofíticas presentes nas espécies *B. fischeri*, *B. olsoniae* e *B. venosa*, uma vez que, segundo nossos conhecimentos, não há estudos sobre endófitos presentes nessas plantas. Portanto, neste capítulo tentamos responder como estão estruturadas as comunidades de fungos endofíticos de *Begonia* e se essas comunidades são semelhantes. Nossos resultados sugerem que cada espécie de planta abriga uma comunidade de endófitos específica. Embora demonstramos que o tipo de planta hospedeira seja um fator que module essas comunidades, discutimos que outros fatores, como as distâncias entre os locais de coleta, também contribuem para essa diferenciação.

Capítulo 2: Com base em frações acetato obtidas dos cultivos dos endófitos das três espécies de begônia, realizamos uma triagem para avaliar se tais fungos produzem metabólitos secundários capazes de inibir o crescimento de fitopatógenos. Nesse contexto, avaliamos a inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Phomopsis sojae* frente a frações de 88 fungos endofíticos. A pergunta deste capítulo é se os fungos endofíticos associados à *Begonia* produzem compostos ativos frente à fitopatógenos. Os resultados obtidos são promissores, pois 26% das frações foram capazes de inibir pelo menos um dos fitopatógenos. Os resultados sugerem que os endófitos presentes nessas plantas são uma fonte para prospecção de compostos antifúngicos.

2 CAPÍTULO 1 - COMUNIDADES ENDOFÍTICAS ENCONTRADAS EM *BEGONIA* spp. DA MATA ATLÂNTICA

Ana M. L. Correia¹, Simone P. Lira², Marco A. Assis³, Andre Rodrigues^{1*}

¹ UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Rio Claro, SP, Brasil.

² USP – Univ de São Paulo, Departamento de Produtos Naturais, Piracicaba, SP, Brasil.

³ UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Botânica, Rio Claro, SP, Brasil.

Palavras-chaves: Diversidade. Riqueza. Endófitos. Begoniaceae. Mata Atlântica

* Correspondência para:

Andre Rodrigues (andrerr@rc.unesp.br)

Universidade Estadual Paulista, UNESP, Câmpus de Rio Claro

Avenida 24-A, n. 1515, Bela Vista, Rio Claro, São Paulo, Brazil, CEP: 13.506-900

Tel.: +55 19 3526-4364; Fax: +55 19 3526-4176

RESUMO

Fungos endofíticos representam um grupo intrigante de micro-organismos. Os fatores que determinam a diversidade e a distribuição em seus hospedeiros ainda não são bem compreendidos. Neste trabalho, avaliamos as comunidades de fungos endofíticos associadas à *Begonia fischeri*, *Begonia olsoniae* e *Begonia venosa* encontradas em diferentes locais da Mata Atlântica. A primeira não é endêmica, já as duas últimas são endêmicas desse bioma. Dentre as 20 folhas analisadas de cada espécie, um total de 426 endófitos foi isolado. Após identificação polifásica dos fungos, um total de 19 gêneros foi identificado, sendo os mais abundantes *Colletotrichum* (51,6%) e *Diaporthe* (22,5%), seguido por, *Phyllosticta* (3,5%) *Neopestalotiopsis* (1,8%), *Stagonospora* (1,8%) e *Nigrospora* (1,6%). A diversidade e composição de espécies foram diferentes para cada planta hospedeira avaliada. Além disso, *B. fischeri* apresentou maior diversidade e riqueza de endófitos, quando comparado a *B. olsoniae* e *B. venosa*. De acordo com a análise de correspondência, 24% da estrutura observada das comunidades endofíticas pode ser atribuída aos hospedeiros. Tais diferenças entre as comunidades de fungos podem estar relacionadas às características intrínsecas de cada espécie de planta. No entanto, a maior parte da variação observada na estrutura das comunidades é devida a outros fatores, como o local de coleta que também pode atuar como fator determinante das comunidades endofíticas do gênero *Begonia*.

2.1 INTRODUÇÃO

Begonia é um dos maiores gêneros de plantas vasculares, pois compreende mais de 1.500 espécies descritas (HUGHES; HOLLINGSWORTH, 2008) de ocorrência pantropical, exceto na Austrália (GOODALL-COPESTAKE et al., 2010). Das 213 espécies que ocorrem no Brasil, 186 são encontradas apenas na Mata Atlântica (JACQUES, 2005). Dentre essas, a espécie *Begonia venosa* é usualmente encontrada em ilhas do litoral norte de São Paulo, e *Begonia olsoniae* apresenta registros apenas na região continental do sudeste brasileiro. Já, *Begonia fischeri* é encontrada em todos os biomas brasileiros, além disso, sua distribuição compreende das Antilhas até a Argentina e não é endêmica do Brasil (JACQUES, 2015).

As espécies de plantas avaliadas nesse estudo apresentam diferentes tipos de habitats sendo que, *B. venosa* ocorre em lugares de baixa declividade e maior acúmulo de matéria orgânica, tais como topo de morros e fendas de rochas. Ao passo que *B. olsoniae* é rupícola e preferencialmente ocorre em locais sombreados, já, *B. fischeri* apresenta habitat terrestre e ocorre principalmente em locais com incidência de luz e solos úmidos, geralmente relacionados a áreas alteradas ou em regeneração (WANDERLEY et al., 2012).

Os estudos realizados com *Begonia* sp. incluem aqueles com enfoque taxonômico como um indicador de variação biogeográfica, estudos de genética de populações de espécies endêmicas, hibridação e genômica, entre outros (DEWITTE et al., 2009; 2011). Alguns trabalhos apontam o potencial biotecnológico de *Begonia malabarica* no tratamento de diabetes (PANDIKUMAR et al., 2009). Além disso, extratos foliares dessa mesma espécie apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (RAMESH et al., 2002). No entanto, nada se sabe sobre os micro-organismos endofíticos associados às plantas do gênero *Begonia*.

Micro-organismos endofíticos compreendem fungos e bactérias que estão presentes nos tecidos das plantas, durante parte do ciclo de vida, sem causar sintomas visíveis (WILSON, 1995; ARAÚJO et al., 2010). Tais micro-organismos podem contribuir com a nutrição, crescimento e até resistência do hospedeiro frente a patógenos (ARNOLD, 2005). Considerados um grupo hiperdiverso, os micro-organismos endofíticos representam uma importante fonte de novos metabólitos secundários bioativos com aplicações em diversos setores da sociedade, como saúde, indústria, agricultura, entre outros (STROBEL; DAISY, 2003; WANI et al., 2015).

Esses micro-organismos estão amplamente distribuídos entre as plantas terrestres. Estima-se que cada espécie de planta abriga ao menos uma espécie de fungo endofítico, entretanto esse número pode variar de dezenas a centenas, dependendo do hospedeiro (ARNOLD, 2005). Muitos estudos abrangendo a distribuição biogeográfica dos hospedeiros e seus micro-organismos endofíticos foram realizados (ARNOLD; LUTZONI, 2007; DAVIS; SHAW, 2008; U'REN et al., 2012; ZHANG et al., 2013). Contudo, compreender o funcionamento dessas associações é uma tarefa desafiadora, pois às diversas interações que ocorrem entre o endófito e a planta, e também as interações que acontecem entre os endófitos, fazem dessas associações uma rede de interações (SANCHEZ-AZOFEIFA et al., 2012).

É sabido que vários fatores bióticos e abióticos influenciam a estrutura das comunidades endofíticas. Por exemplo, hospedeiros não relacionados filogeneticamente (i.e. plantas de gêneros diferentes) e o tipo de órgão da planta foram os fatores mais determinantes nas diferenças entre as comunidades endofíticas estudadas por Peršoh (2013). Além disso, diferenças no local de coleta também influenciam na estrutura, pois hospedeiros mais próximos tendem a ter comunidades mais similares, do que aquelas encontradas em hospedeiros distantes (HIGGINS et al., 2014). Embora, estudando diferentes hospedeiros, tais resultados demonstram a complexidade das interações fungo, planta e ambiente.

Muitos trabalhos discutem sobre os endófitos presentes em diferentes famílias de plantas (ARNOLD; HERRE, 2003; HIGGINS et al., 2011; ZHANG et al., 2013; MELLO et al., 2014). Porém, nada se sabe sobre os endófitos presentes em *Begonia* sp., o qual é um dos dez maiores gêneros em número de espécies e também amplamente conhecido por sua importância ornamental. Assim, é de grande relevância o estudo desses micro-organismos em plantas pouco avaliadas, como as begônias, uma vez que o interior dos tecidos dessas plantas constitui em um ambiente para encontrar novas espécies de fungos e que apresentem novos metabólitos bioativos (CANTRELL et al., 2011).

Levando em consideração que *B. fischeri*, *B. olsoniae* e *B. venosa* são encontradas no mesmo bioma, porém em locais distintos (ilha e continente), neste trabalho avaliamos as comunidades de fungos endofíticos associadas a essas plantas, a fim de compreender como estão estruturadas essas comunidades e se apresentam semelhanças entre si. Este é o primeiro estudo a avaliar comunidades de fungos endofíticos em espécies de begônias.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Área de estudo

O bioma Mata Atlântica é reconhecido como um *hotspot* mundial de diversidade, devido à riqueza de espécies e variedade de fitofisionomias (MYERS et al., 2000). Muitas espécies encontradas na Mata Atlântica são endêmicas, o que revela as características únicas desse ambiente (MYERS et al., 2000). O presente estudo foi realizado em dois locais do bioma Mata Atlântica. A região de Ubatuba localizada no litoral norte de São Paulo e a Ilha de Alcatrazes que localiza-se próximo ao município de São Sebastião, a 43 km dos pontos mais próximos do litoral centro-norte de São Paulo. A Ilha de Alcatrazes compõe juntamente com outras quatro ilhas, o Arquipélago de Alcatrazes, o qual pertencente à Estação Ecológica Tupinambás, a gestão, proteção e conservação do arquipélago é de responsabilidade do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, 2015).

2.2.2 Coleta das amostras

As coletas de amostras foram organizadas em duas expedições. A primeira coleta foi realizada no continente em junho de 2014, nas proximidades do Núcleo Picinguaba, Parque Estadual da Serra do Mar, Ubatuba-SP, Brasil, sob a autorização de coleta (SISBio) número 21774 (emitida para André Rodrigues). Um total de 10 plantas foi coletado e georreferenciado (Tabela 1), sendo cinco indivíduos de *B. fischeri* e cinco de *B. olsoniae* (Figura 1). As plantas

foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas sob refrigeração até o processamento, este realizado no mesmo dia da coleta.

Tabela 1. Dados referentes às coletas de espécies de *Begonia* na região de Ubatuba-SP e Ilha de Alcatrazes.

Código	Espécie	Data da coleta	Coordenadas geográficas	
B1a	<i>Begonia fischeri</i>	24/06/2014	S23°28'27.1"	W45°10'21.0"
B1b	<i>Begonia fischeri</i>	24/06/2014	S23°28'27.3"	W45°10'21.1"
B1c	<i>Begonia fischeri</i>	24/06/2014	S23°28'28.1"	W45°10'22.0"
B1d	<i>Begonia fischeri</i>	24/06/2014	S23°28'27.9"	W45°10'22.2"
B1e	<i>Begonia fischeri</i>	24/06/2014	S23°28'28.6"	W45°10'22.6"
B2a	<i>Begonia olsoniae</i>	24/06/2014	S23°28'18.2"	W45°10'20.4"
B2b	<i>Begonia olsoniae</i>	24/06/2014	S23°28'18.2"	W45°10'20.4"
B2c	<i>Begonia olsoniae</i>	24/06/2014	S23°28'18.2"	W45°10'20.4"
B2d	<i>Begonia olsoniae</i>	24/06/2014	S23°28'18.2"	W45°10'20.4"
B2e	<i>Begonia olsoniae</i>	24/06/2014	S23°28'18.11"	W45°10'20.49"
B3a	<i>Begonia venosa</i>	09/02/2015	S24°05.926'	W45°41.511'
B3b	<i>Begonia venosa</i>	09/02/2015	S24°05.926'	W45°41.511'
B3c	<i>Begonia venosa</i>	09/02/2015	S24°05.929'	W45°41.516'
B3d	<i>Begonia venosa</i>	09/02/2015	S24°05.902'	W45°41.540'
B3e	<i>Begonia venosa</i>	09/02/2015	S24°05.898"	W45°41.533'

B1: *Begonia fischeri*; B2: *Begonia olsoniae*; B3 *Begonia venosa*. As letras em minúsculo referem-se aos diferentes indivíduos coletados.

Figura 1. Espécies de *Begonia* avaliadas neste estudo.



Begonia fischeri

Begonia olsoniae

Begonia venosa

A segunda coleta foi realizada em fevereiro de 2015 na Ilha de Alcatrazes, sob a autorização de coleta (SISBio) número 37256-1 (emitida para Simone Possedente de Lira). Cinco indivíduos de *B. venosa* foram localizados, coletados e transportados da mesma forma que as plantas da primeira coleta (Figura 1).

As duas espécies de *Begonia* coletadas no continente estavam localizadas em dois pontos distintos da área estudada. As populações de *B. fischeri* foram encontradas em local aberto com alta incidência de luz, ao passo que *B. olsoniae* foi encontrada na borda da mata no sub-bosque sombreado. Os espécimes de *B. venosa* coletadas na ilha estavam localizados sobre rochas e expostas à alta incidência de luz.

Ramos, folhas e flores foram coletados e constituíram os *vouchers* para identificação das plantas e também material de partida para o isolamento dos fungos. Os exemplares de *Begonia* foram identificados pelo Prof. Dr. Marco Antônio de Assis (Departamento de Botânica, UNESP – Rio Claro) e pela Prof^a. Dra. Eliane Jacques (Departamento de Botânica, UFRJ- Rio de Janeiro). Os *vouchers* estão depositados no Herbário Rioclarence (HRCB) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Rio Claro, SP, número de tombo HRCB 64226 (*B. fischeri*) HRCB; 64227 (*B. venosa*) e HRCB 64229 (*B. olsoniae*).

2.2.3 Isolamento dos fungos endofíticos

Quatro folhas aparentemente sadias foram selecionadas de cada indivíduo, totalizando 60 folhas, considerando os 15 indivíduos das três espécies de *Begonia*. As folhas foram lavadas em água corrente para remoção de partículas de solo e/ou outros detritos. Posteriormente, as folhas foram submetidas ao processo de desinfecção superficial, o qual consistiu na imersão durante 1 minuto em água destilada esterilizada, 1 minuto em etanol 70%, 2 minutos em NaOCl (2,5%), 1 segundo em etanol 70% e 2 minutos em água destilada esterilizada (PETRINI, 1991 com modificações). A fim de comprovar a eficiência do processo de desinfecção, 100 µL da última água de lavagem foi semeada em ágar malte 2% (MA2%) e as placas incubadas em B.O.D à 25 °C, para verificar a ausência de fungos epifíticos.

Após o processo de desinfecção, cada folha foi cortada em fragmentos de 0,8-1,0 cm com auxílio de estilete esterilizado. Cinco fragmentos de cada folha foram inoculados em meio batata-dextrose ágar (BDA – Acumedia, meio rico em nutrientes). Portanto, para o meio BDA foram analisados 20 fragmentos de folhas para cada um dos 15 indivíduos de begônia. O restante das folhas foi cortado em vários fragmentos menores e incorporados em ágar malte 2% fundido (MA2% – Acumedia, meio intermediário em nutrientes). Semelhante à técnica de

placa derramada, este método foi realizado no doutorado de Sérgio Birello Sartori, o qual recuperou um maior número de fungos endofíticos comparado aos demais meios utilizados (dados não publicados).

Os meios utilizados neste estudo são comumente empregados para o isolamento de fungos endofíticos (ARNOLD; HERRE, 2003). No entanto, diferente da maioria dos estudos, optamos por utilizar duas técnicas de isolamento a fim de recuperar uma maior diversidade de endófitos. Os meios de cultivo foram suplementados com os antibióticos tetraciclina (100 mg L^{-1}) e sulfato de estreptomicina (20 mg L^{-1}) para evitar o crescimento de bactérias.

As placas de isolamento foram incubadas em B.O.D à 25°C , durante 10 dias, no escuro, e observadas diariamente. Uma vez detectado o crescimento de hifas, estas foram transferidas para placas adicionais contendo MA2% e incubadas nas mesmas condições. Após incubação, para os fungos que apresentaram esporulação foram preparadas culturas monospóricas para garantir a pureza da cultura. Para aqueles fungos que não apresentaram esporulação, a pureza da cultura foi checada através de transferências sucessivas em MA2%. Após a purificação dos isolados, estes foram submetidos em dois métodos de preservação: (a) em tubos de ensaio contendo MA2% inclinado e mantidos à 10°C e (b) criopreservação à -80°C , em glicerol 10%. Os isolados estão mantidos no acervo de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP).

2.2.4 Triagem, extração de DNA, sequenciamento e análise filogenética

Neste estudo, foram realizadas duas triagens: morfológica e molecular, a última baseada em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs), posteriormente, os dados foram refinados com análises filogenéticas. Primeiramente os isolados obtidos foram agrupados em morfoespécies e caracterizados com base em observações macroscópicas (aspectos gerais da colônia) e microscópicas (estruturas reprodutivas). As observações microscópicas foram realizadas a partir de preparações de lâminas a fresco utilizando água ou azul de algodão como líquido de montagem. As estruturas observadas foram comparadas com as encontradas em chaves taxonômicas (ELLIS, 1971; 1976; WATANABE, 2002). O DNA genômico de todas as morfoespécies foi extraído e sequenciado em proporção à sua abundância.

Para classificar os fungos foi utilizado o marcador molecular ITS (*internal transcribed spacer*, SCHOCH et al., 2012). No entanto, para fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, amplificamos o gene que codifica para a β -tubulina (*primers* βT2a e βT2b). Para o gênero *Trichoderma* o gene que codifica para o fator alfa de alongação – *tef1* (*primers* *tef1r* e 728f) foi escolhido. Esses marcadores apresentam uma melhor resolução intraespecífica

para esses gêneros, quando comparados com ITS. As reações de amplificação consistiram em: 0,2 mM de cada dNTP, tampão KCl 5x, MgCl₂ 1,5 mM, 0,5 µM de cada *primer* e 1U da enzima Taq polimerase em volume final de 25 µL; as condições de amplificação foram aquelas descritas em Montoya et al. (2016).

Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% corado com *GelRed*[®] (Biotium). A purificação dos amplicons foi realizada com *Wizard*[®] *Genomic DNA Purification Kit* (Promega) e quantificado em *NanoDrop* (Thermo Scientific). Uma quantidade de 20 ng de DNA molde foi utilizada na reação de sequenciamento empregando *BigDye*[®] *Terminator Cycle Sequencing Kit* v. 3.1 (Life Technologies), seguindo o protocolo do fabricante e aplicados em sequenciador ABI 3500 (Life Technologies).

Após sequenciamento, os *contigs* foram montados utilizando o software BioEdit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). Os *contigs* foram comparados com sequências homólogas presentes no NCBI-GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando a ferramenta MEGA BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências pertencentes aos fungos do gênero *Trichoderma* foram comparadas com outras depositadas no banco de dados do *International Subcommission on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy* (ISTH), utilizando o aplicativo *TrichOKEY* (DRUZHININA et al., 2005).

As sequências foram agrupadas em (UTOs) no software MOTHUR, considerando um ponto de corte de 97% de similaridade. Para auxiliar na afiliação taxonômica de alguns grupos de fungos (a saber, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Epicoccum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Stemphylium* e *Trichoderma*), foram realizadas análises filogenéticas a partir das UTO's obtidas pelo *software* MOTHUR. Desse modo, para cada UTO foram geradas árvores para determinar os taxa mais relacionados com os examinados.

Análises preliminares foram realizadas para com sequências obtidas do NCBI-GenBank (baseado nos hits obtidos) e também sequências obtidas de outros estudos (WANG et al., 2014; CANNON et al., 2012; WALTHER et al., 2013; UDAYANGA et al., 2012; FÁVARO et al., 2011; INDERBITZIN et al., 2009; DODD et al., 2003). As sequências foram alinhadas com a ferramenta MAFFT (KATO; STANDLEY, 2013), seguido de refinamento manual. As filogenias foram inferidas utilizando o método de *neighbor-joining*, calculando a distância evolutiva com o modelo Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980). O suporte dos clados foi calculado com 1.000 pseudorepetições de *bootstrap* e as árvores inferidas utilizando MEGA v. 6.0 (TAMURA et al., 2013).

2.2.5 Análise das comunidades de endófitos

Diferentes métricas ecológicas foram utilizadas para avaliar a riqueza e diversidade de fungos nas comunidades examinadas. A riqueza estimada de espécies foi calculada utilizando Chao1 (MAGURRAN, 2004). Curvas de rarefação foram geradas para comparar a riqueza de espécies de fungos encontradas em cada espécie de begônia. Além disso, com relação à diversidade alfa foram calculados os índices de Simpson (inverso= $1/D$) e Shannon. Para determinar o compartilhamento das espécies (diversidade beta) foram utilizados os índices de Jaccard, Sorensen e Bray-Curtis (MAGURRAN, 2004).

As curvas de rarefação e todos os índices foram calculados no *software* EstimateS v. 9.1.0 (COLWELL, 2013). Para verificar diferenças significativas entre os índices de diversidade e compartilhamento entre as comunidades avaliadas foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, empregado no *software* R v. 3.0.1. Além dessas métricas, o número de taxa obtidos de cada comunidade foi utilizado para a construção de um diagrama de Venn, com o intuito de visualizar o compartilhamento dos taxa entre as comunidades estudadas. Tal análise também foi realizada no *software* R v. 3.0.1.

A fim de investigar possíveis relações entre as comunidades foi realizada uma análise de correspondência (AC) no *software* Past v. 2.17c (HAMMER et al., 2001). Essa análise representa os dados em dois planos a partir de uma matriz de distância (coeficiente de similaridade de Bray-Curtis) utilizando dados de abundância para cada amostra, no caso, para cada planta. Nessa análise, o índice de similaridade é calculado a partir de cada par de amostras para se mapear a inter-relação destas (PODANI; MIKLOS, 2002). A análise de similaridade ANOSIM também foi gerada no *software* Past v. 2.17c, utilizando a mesma matriz de dados calculada para AC, para avaliar as diferenças estatísticas entre as comunidades presentes nas três espécies de plantas estudadas (CLARKE; GORLEY, 2001).

A Porcentagem de Similaridade (SIMPER) foi gerada no *software* Past v. 2.17c. Tal análise verifica quais taxa são os principais responsáveis pela diferença observada entre as amostras, considerando principalmente o índice de Bray-Curtis (CLARKE, 1993).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Diversidade e ecologia dos fungos endófitos

Nesse estudo foram avaliadas 60 folhas (20 de cada uma das três espécies de planta), sendo que todas apresentaram crescimento de endófitos. Não foi observado crescimento de fungos nas placas inoculadas com a água de lavagem das folhas, demonstrando que o

processo de desinfecção foi efetivo para eliminar os micro-organismos epifíticos. Das 60 folhas analisadas, foi obtido um total de 426 isolados, sendo 120 de *B. fischeri* e 151 de *B. olsoniae* e 155 de *B. venosa*, considerando os dois meios de cultivo utilizados.

Baseado em caracteres morfológicos, os 426 isolados foram agrupados em 71 morfoespécies (Figura A1) e os isolados representativos de cada morfoespécie foram sequenciados (total de 302 isolados). As sequências geradas foram agrupadas em 46 UTOs, as quais compreendem os filos *Ascomycota* (93,5% do total de 426 isolados), *Basidiomycota* (4,3%) e “*Mucoromycota*” (2,2%). Dos representantes do filo *Ascomycota* foram encontradas nove ordens: Botryosphaerales, Capnodiales, Diaporthales, Eurotiales, Hypocreales, Pleosporales, Sordariales, Trichosphaerales e Xylariales. O filo *Basidiomycota* foi representado com apenas dois isolados, sendo um da ordem Cantharellales e o outro um basidiomycota não identificado. O filo *Mucoromycota* apresentou apenas um isolado, o qual pertence à ordem Mucorales (Tabela 2).

Dentre as 46 UTOs foi possível identificar 19 gêneros, sendo os mais abundantes: *Colletotrichum* (51,6% do total de 426 isolados) e *Diaporthe* (22,5%, Tabela 2). As sequências que apresentaram baixa similaridade (< 97%) com aquelas disponíveis nos bancos de dados, cujos isolados não puderam ser identificados pelas estruturas de reprodução, estão aqui representadas como *Ascomycota* não identificado.

Para auxiliar na afiliação taxonômica das UTOs obtidas pelo *software* MOTHUR, foram realizadas análises filogenéticas para alguns gêneros (Figuras A2-A9). Os resultados mostraram que o *software* MOTHUR (a 97% de similaridade na região ITS) foi eficiente na distinção de todas as sequências analisadas.

Com relação à riqueza observada de taxa, foi possível notar que nenhuma das curvas de rarefação atingiu uma assíntota, considerando um intervalo de confiança de 95%, o que sugere que a riqueza de taxa continuaria a aumentar conforme o esforço amostral (Figura 2). Esse resultado indica a importância de estudar essas plantas, uma vez que abrigam um grande número de endófitos diferentes. Segundo o índice de Simpson, as comunidades de endófitos presentes em *B. fischeri*, *B. olsoniae* e *B. venosa* diferem significativamente entre si. Com relação ao índice de Shannon, as comunidades de *B. fischeri* e *B. olsoniae*, coletadas no continente, apresentaram diferenças significativas (Kruskal-Wallis, $P > 0,1$, Figura 3). Já o índice Chao1 não foi significativo entre as espécies de plantas (Kruskal-Wallis, $P > 0,1$, Figura 3), o que indica que espera-se encontrar mais espécies raras em proporções semelhantes nas três espécies e plantas.

Neste estudo, as comunidades endofíticas presentes em *B. fischeri* apresentaram a maior diversidade para ambos os índices avaliados. O índice de Shannon também mostrou que a diversidade de endófitos variou segundo os hospedeiros, uma vez que, *B. fischeri* e *B. olsoniae*, coletadas no continente apresentaram diferenças significativas entre si em relação a esse índice. Ao passo que, *B. venosa* coletada na ilha de Alcatrazes não apresentou diferenças significativas em relação às plantas do continente.

Figura 2. Riqueza de espécies de fungos endofíticos associados à *Begonia fischeri* (A), *Begonia olsoniae* (B) e *Begonia venosa* (C). Riqueza estimada em um intervalo de confiança de 95% (linhas tracejadas).

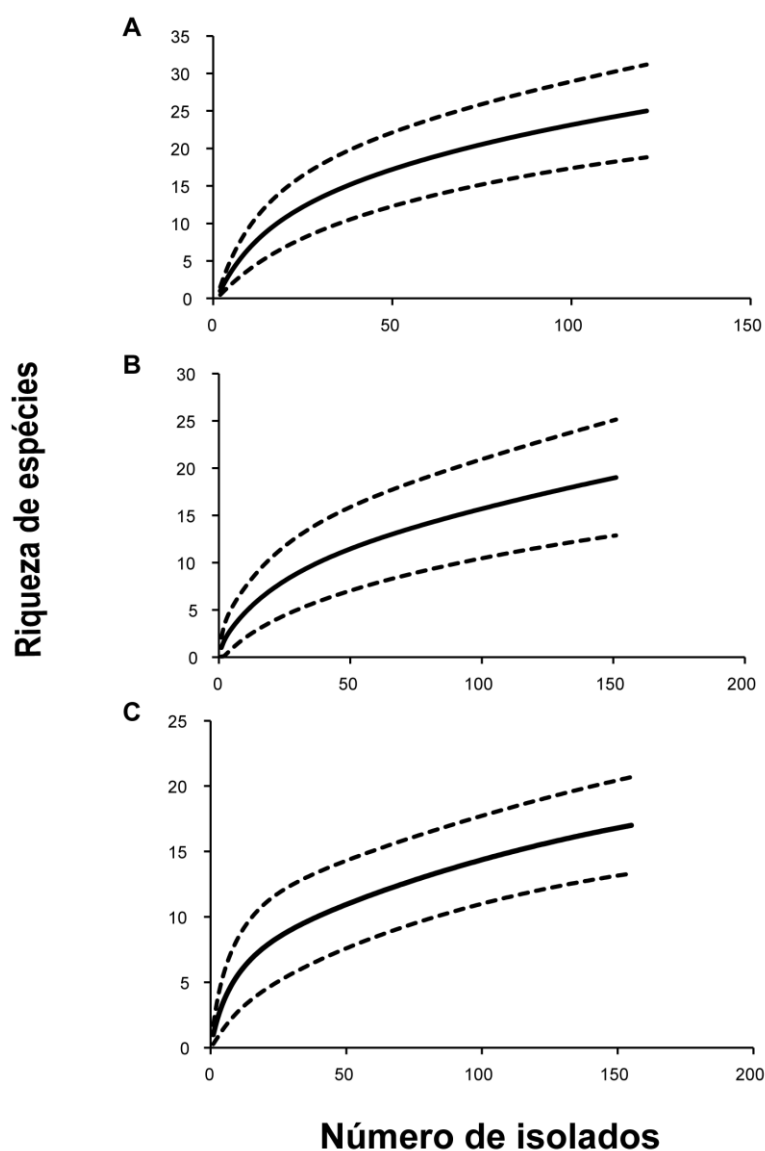
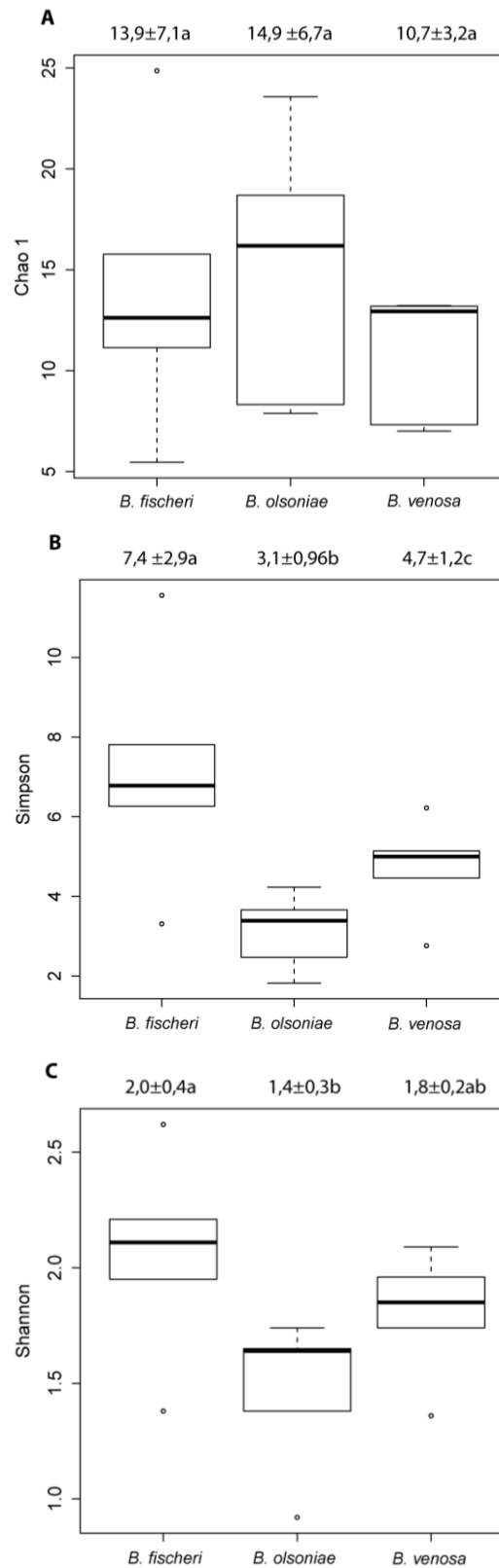


Figura 3. Riqueza estimada (Chao1) e diversidade (índices de Simpson e Shannon) de fungos endofíticos encontrados em *Begonia fischeri*, *Begonia olsoniae* e *Begonia venosa*.



A média e o desvio padrão para cada espécie de planta estão indicados acima dos *boxplots*. Letras iguais demonstram diferenças não significativas (Kruskal-Wallis, $p > 0,1$). Círculos indicam valores *outliers*. A: Chao1, B: Simpson, C: Shannon.

Tabela 2. Classificação e distribuição das 46 UTOS de fungos endofíticos obtidas de *Begonia fischeri*, *Begonia olsoniae* e *Begonia venosa*.

Taxa	<i>Begonia fischeri</i>	<i>Begonia olsoniae</i>	<i>Begonia venosa</i>	Total
Ascomycota não identificado 1		10		10
Ascomycota não identificado 2			1	1
Ascomycota não identificado 3			1	1
Ascomycota não identificado 4	1			1
<i>Aspergillus niger</i>	3			3
<i>Aspergillus</i> sp.	1			1
<i>Bartalinia</i> sp.			1	1
Basidiomycota não identificado			1	1
Cantharellales	1			1
<i>Cladosporium</i> sp.	3			3
<i>Colletotrichum</i> sp. 1	13	81	2	96
<i>Colletotrichum</i> sp. 2	12	6	53	71
<i>Colletotrichum</i> sp. 3	24	7	14	45
<i>Colletotrichum</i> sp. 4		7		7
<i>Colletotrichum</i> sp. 5		1		1
<i>Curvularia</i> sp. 1	3			3
<i>Curvularia</i> sp. 2	1			1
<i>Diaporthe</i> sp. 4		5		5
<i>Diaporthe</i> sp. 1	14	19	21	54
<i>Diaporthe</i> sp. 2			11	11
<i>Diaporthe</i> sp. 3			22	22
<i>Diaporthe</i> sp. 5	1			1
<i>Diaporthe</i> sp. 6		1		1
<i>Diaporthe</i> sp. 7	1			1
<i>Diaporthe</i> sp. 8		1		1
<i>Endomelanconiopsis</i> sp.		3		3
<i>Epicoccum nigrum</i>	2	1		3
<i>Mucor bainieri</i>		1		1
<i>Neofusicoccum</i> sp.			5	5
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	8			8
<i>Neurospora</i> sp.		2		2
<i>Nigrospora</i> sp.	6	1		7
<i>Penicillium thomii</i> var. <i>flavescens</i>	4			4
<i>Phoma</i> sp.			2	2
<i>Phyllosticta</i> sp.			15	15
Pleosporales	6	2		8
<i>Stagonospora</i> sp.	8			8
<i>Stemphylium</i> sp.			1	1
<i>Trichoderma atroviride</i>			2	2
<i>Trichoderma</i> sp.		1		1
Xylariales 1	1	1	2	4
Xylariales 2	2	1		3

Xylariales 3	2			2
Xylariales 4	1		1	2
Xylariales 5	1			1
Xylariales 6	1			1
Total	120	151	155	426

2.3.2 Estrutura das comunidades de endófitos encontrados em begônias

A frequência dos gêneros e UTOs dominantes variaram entre as espécies de plantas. No entanto, todas as begônias apresentaram como gêneros dominantes *Colletotrichum* e *Diaporthe*. *Begonia fischeri* apresentou as UTOs, *Colletotrichum* sp. 3 (20%) e *Diaporthe* sp. 1 (11,6 %) como as mais abundantes. *Begonia olsoniae* apresentou *Colletotrichum* sp.1 (53,6%) e *Diaporthe* sp. 1 (12,5%); já *Begonia venosa* apresentou *Colletotrichum* sp. 2 (34%) e *Diaporthe* sp. 3 (14%), sendo esta última encontrada apenas nesta espécie de planta.

O compartilhamento dos taxa entre as espécies de plantas foi baixo, uma vez que os valores dos índices estavam abaixo de 0,5 (Tabela 3). Esses resultados corroboram com aqueles obtidos pela análise de SIMPER. Esta última demonstrou que as comunidades de endófitos encontradas nas três espécies de *Begonia* diferem entre si em 77,16 % em relação aos taxa encontrados. Desse total de dissimilaridade, a UTO (*Colletotrichum* sp. 1) é a responsável por 24,58 % da diferença, o que demonstra a importância desse taxa para todas as comunidades.

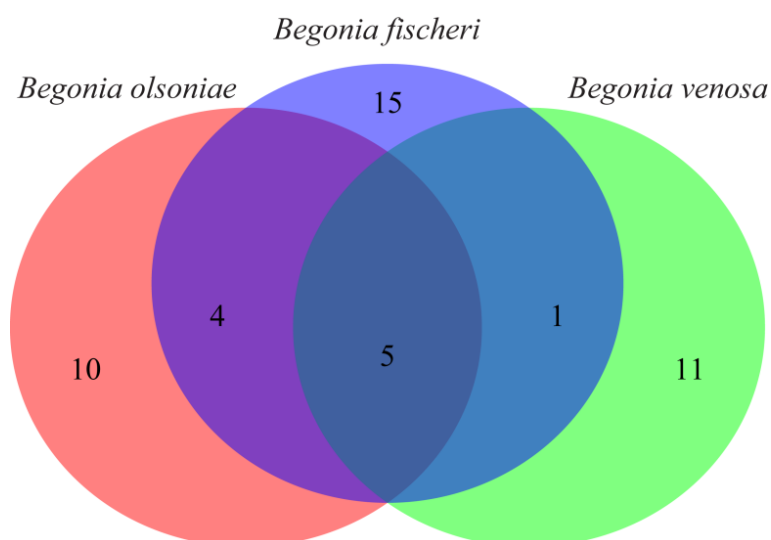
A análise par a par gerada pela SIMPER mostrou que *B. fischeri* e *B. venosa* apresentam dissimilaridade de 74 %, sendo que desse total as UTOs *Colletotrichum* sp. 2 e *Diaporthe* sp. 3 colaboram com 15 % e 8 %, respectivamente. Ainda, *B. olsoniae* e *B. venosa* diferem em 83,6% dos quais *Colletotrichum* sp. 1 (25,9%), *Colletotrichum* sp. 2 (15%). Já *B. fischeri* e *B. olsoniae* diferem em 73,8 %, *Colletotrichum* sp. 1 (26,8) e *Colletotrichum* sp. 3 (6,9%). Isso demonstra a importância desses gêneros para todas as comunidades endofíticas de begônias avaliadas no presente estudo.

Um total de cinco taxa (*Colletotrichum* sp. 1, *Colletotrichum* sp. 2, *Colletotrichum* sp. 3, *Diaporthe* sp. 1 e Xylariales 1) foram compartilhados entre as três espécies de *Begonia*, os quais representam 270 isolados do total de 426 obtidos no estudo. Já *B. fischeri* e *B. olsoniae* compartilharam quatro taxa, os quais não foram compartilhados com *B. venosa* (*Epicoccum nigrum*, *Nigrospora* sp., Pleosporales e Xylariales 2; n = 21 isolados). No entanto, apenas um taxa (Xylariales 4; n = 2 isolados) foi compartilhado entre *B. fischeri* e *B. venosa*, o qual não foi compartilhado com *B. olsoniae*. Nenhum taxa foi compartilhado entre *B. venosa* e *B. olsoniae*. Dentre as UTOs encontradas em *B. fischeri*, oito delas são singletons, já *B. olsoniae*

e *B. venosa* apresentaram cinco e seis singletons, respectivamente, demonstrando que os endófitos exclusivos de cada planta hospedeira compreendem taxa raras (Figura 4).

As comunidades de fungos endofíticos presentes nas espécies de begônias avaliadas compreendem, em sua maioria, taxa raras (Figura 4). Além disso, pelo menos um indivíduo de cada espécie de planta apresentou ao menos um isolado o qual não foi possível à identificação, tais isolados apresentaram baixa similaridade com as sequências encontradas na base de dados, além de não apresentarem esporulação. Esses resultados sugerem que begônias podem abrigar espécies novas para a ciência.

Figura 4. Diagrama de Venn representando o número de Unidades Taxonômicas Operacionais compartilhadas entre *Begonia fischeri*, *Begonia olsoniae* e *Begonia venosa*.

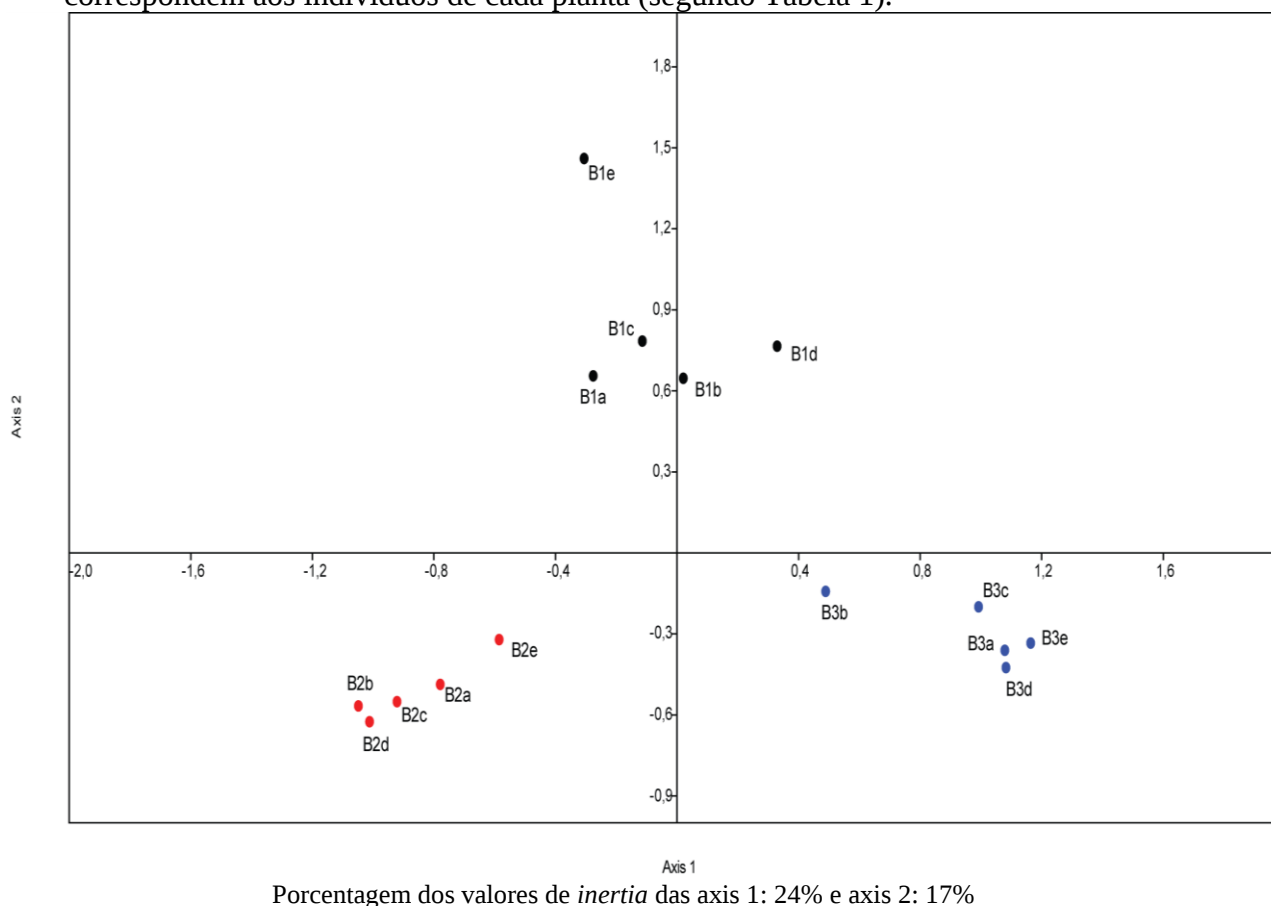


A AC apresenta-se em dois planos, onde cada eixo (horizontal e vertical) considera uma variável. A julgar pelo eixo 1 (Figura 4), a análise sugere que as comunidades de *B. venosa* (Ilha - endêmica) e *B. olsoniae* (continente - endêmica) são claramente divergentes. Além disso, o eixo 2 separou as comunidades de fungos de *B. fischeri* (continente – não-endêmica) das outras duas espécies. Os eixos 1 e 2 correspondem a 24% e 17 % da variação observada nessas comunidades, respectivamente, o que sugere que outros fatores, como características ambientais, também podem explicar os outros 59%. Contudo, o valor de R calculado pela ANOSIM, o qual mede o quão separados estão os grupos em uma escala de 0 (não há diferença) a 1 (diferença máxima), confirmou as diferenças significativas entre as três comunidades de begônia (R= 0,937; P= 0,001).

Tabela 3. Compartilhamento de fungos endofíticos entre as espécies de plantas.

Plantas		Jaccard	Sorensen	Bray-Curtis
<i>Begonia fischeri</i>	<i>Begonia olsoniae</i>	0,257	0,409	0,339
<i>Begonia fischeri</i>	<i>Begonia venosa</i>	0,167	0,286	0,32
<i>Begonia olsoniae</i>	<i>Begonia venosa</i>	0,161	0,278	0,229

Figura 4. Distribuição das comunidades de fungos endofíticos de *Begonia olsoniae* (B2 - vermelho), *Begonia fischeri* (B1 - preto) e *Begonia venosa* (B3 - azul). Os códigos correspondem aos indivíduos de cada planta (segundo Tabela 1).



2.4 DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisados os endófitos presentes em três espécies de *Begonia*, a saber: *B. fischeri*, *B. olsoniae* e *B. venosa*, encontradas em diferentes locais de Mata Atlântica, continente e Ilha de Alcatrazes. Utilizando método dependente de cultivo, foi possível comparar a diversidade, composição e estrutura das comunidades dos endófitos presentes nessas plantas.

O ciclo de vida do endófito é crucial para o conhecimento de quando e como esses fungos realizam a fase de esporulação e são transmitidos para outros hospedeiros, bem como compreender o real papel que desempenham na planta (MÁRQUEZ et al., 2012). Contudo, o ciclo de vida dos fungos não é estável, mas dinâmico, sendo influenciado por características específicas dos fungos, dos hospedeiros, bem como pelas mudanças no ambiente, já que alguns endofíticos também são encontrados fora da planta (KUO et al., 2014). Portanto, compreender o ciclo de um endófito é uma tarefa arduosa. O estágio endofítico em particular, representa um equilíbrio entre hospedeiro e fungo, quando esse equilíbrio é afetado os endófitos podem vir a se tornar patógenos ou sapróbios (KUO et al., 2014; SCHULZ; BOYLE, 2005).

Nesse contexto, os gêneros *Colletotrichum* e *Diaporthe* são frequentemente reportados como endófitos e patógenos de diversas plantas, sendo de grande importância econômica (EUGÉNIO et al., 2010; CANNON et al., 2012, MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Além disso, gêneros tais como *Cladosporium* e *Penicillium*, também encontrados nesse estudo, são considerados cosmopolitas habitantes do solo, mas também constantemente isolados como endófitos. Essas disparidades revelam a intrigante e ainda desconhecida biologia dos fungos endofíticos (MARQUEZ et al., 2012).

Os gêneros *Colletotrichum* e *Diaporthe* foram os dominantes para todas as plantas avaliadas. Entretanto, as UTOs dominantes para cada planta foram diferentes, com exceção de *Diaporthe* sp 1., o qual foi dominante em *B. fischeri* e *B. olsoniae*. Embora, as folhas coletadas para o isolamento dos fungos endofíticos não apresentavam sintomas aparente de doenças, é sabido que esses gêneros podem ocorrer como endófitos de folhas e patógenos latentes (CANNON et al., 2012, HATA et al., 2002). No entanto, estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa encontraram com prevalência esses dois gêneros em *B. venosa* da ilha de Alcatrazes (dados não publicados), o que pode sugerir que esses fungos podem ser naturalmente prevalentes em espécies de *Begonia*.

Algumas espécies do gênero *Fusarium* são conhecidas por causarem doenças em begônias. Por exemplo, a espécie *Fusarium foetens* responsável pela murcha em begônias cultivadas em casa de vegetação (SCHROERS et al., 2004). Curiosamente, nenhuma das begônias avaliadas neste estudo apresentou espécies de *Fusarium*, o qual também é comumente isolado como endófito em diversas plantas (ARNOLD; HERRE, 2003). Pesquisas futuras poderão avaliar se os endófitos encontrados nessas plantas protegem-nas do ataque de *Fusarium*, ou se hospedeiros em seu habitat natural são resistentes a esse fungo.

Em relação aos taxa *Xylaria*, *Nigrospora*, *Epicoccum*, *Curvularia*, entre outros encontrados em baixas proporções neste estudo, já foram reportados como endófitos em outras plantas (DAVIS; SHAW, 2008; BOTELLA; DIEZ, 2011; U'REN et al., 2012). Igualmente, *Colletotrichum* e *Diaporthe* foram os gêneros prevalentes no estudo de Ferreira et al. (2015), o qual avaliou a comunidade endofítica de *Carapa guianensis* (popularmente conhecida como Andiroba), o que sugere que esses gêneros de fungos são comuns como endófitos.

Dentre os gêneros encontrados somente em *B. venosa*, destacamos *Phyllostica* (9,6% do total de 155 isolados). Espécies desse gênero são reconhecidas por serem patógenos de uma ampla gama de hospedeiros, entretanto, também são encontradas como endófitos generalistas. Trabalhos demonstraram que este gênero foi encontrado em 70 famílias de plantas (WIKKE et al., 2013; MOTOHASHI et al., 2009). No entanto, essa parece ser a primeira vez que este gênero é encontrado na família *Bignoniaceae*.

Neste estudo alguns taxa não puderam ser identificados e estão aqui representados como Ascomycota e Basidiomycota não identificados. Além desses, um taxa da ordem Pleosporales, um da ordem Cantharellales e seis taxa diferentes pertencentes à ordem Xylariales foram distinguidos, entretanto, para um melhor refinamento da identificação desses isolados, é necessário avaliar outros marcadores moleculares para saber se tais isolados se tratam de espécies novas. Desse modo, estudos realizados com hospedeiros pouco explorados como *Begonia* são de grande importância, uma vez que a descoberta de espécies novas de fungos corrobora com o conhecimento sobre a diversidade de fungos e também do ponto de vista biotecnológico no sentido de que esses são uma nova maquinaria metabólica a ser explorada.

Embora poucas UTOs tenham sido compartilhadas entre as três espécies de planta, as begônias coletadas no continente apresentaram maior compartilhamento de UTOs, quando comparado à begônia da ilha. Isso pode sugerir que as comunidades variaram de acordo com o local de coleta, uma vez que, embora encontradas na mesma área, *B. fischeri* e *B. olsoniae* estavam aproximadamente 270 m distantes entre si. Entretanto, as coletas do continente aconteceram oito meses antes da coleta realizada na ilha de Alcatrazes, além da primeira coleta ter ocorrido no inverno e a segunda no verão, tal fato pode explicar o porquê do maior compartilhamento de espécies entre as begônias do continente. Contudo, o agrupamento gerado pela análise de correspondência (Figura 4) foi significativamente diferente (ANOSIM, $R = 0,937$, $p < 0,01$), demonstrando que as comunidades endofíticas variaram entre os

hospedeiros de ambientes próximos, o que mostra que cada uma das três espécies de planta possui uma comunidade singular de endófitos.

Muitos trabalhos sugerem que a comunidade de endófitos difere segundo o tipo de hospedeiro (U'REN et al., 2012; LAU et al., 2013; ZHANG et al., 2013; PERŠOH, 2013). Contudo, a maioria dos hospedeiros avaliados nesses trabalhos não era relacionada, ou seja, eram plantas de grupos filogeneticamente distintos. Embora, no presente estudo as três espécies de plantas pertençam ao mesmo gênero, nossos resultados mostraram diferenças significativas entre as comunidades de cada hospedeiro. As espécies *B. olsoniae* e *B. venosa* pertencem ao mesmo clado filogenético (MOONLIGHT et al., 2015). No entanto, essas apresentaram o maior valor de dissimilaridade entre suas comunidades (83,6%). Ou seja, relações filogenéticas e genotípicas dos hospedeiros parecem não ter uma correlação com a composição das comunidades endofíticas, podendo ser diferente entre hospedeiros da mesma espécie, porém semelhantes entre outros gêneros ou até mesmo hospedeiros de outras famílias (PERŠOH, 2015).

A diferença na diversidade entre as comunidades de fungos de *B. fischeri*, *B. olsoniae* e *B. venosa* pode estar relacionada às características intrínsecas de cada hospedeiro, como a espessura da folha e quantidade de tricomas, os quais podem interferir na entrada de endófitos. Por exemplo, *B. olsoniae* e *B. venosa* apresentam folhas mais grossas e com mais tricomas que *B. fischeri*, porém não encontramos na literatura estudos sobre endófitos dessas plantas ou tais características associadas. Além disso, metabólitos secundários presentes nas folhas de cada planta pode também apresentar o papel de selecionar a comunidade endofítica, de modo que, alguns fungos consigam resistir às condições desse ambiente e outros não.

No estudo sobre endófitos de *Taxus chinensis* var. *mairei*, Wu e colaboradores (2013) sugeriram que as características ambientais de cada local influenciaram na estrutura das comunidades de endófitos, uma vez no interior da planta estes podem ser selecionados por diferentes tipos de tecidos. De modo semelhante, as comunidades de fungos estudadas neste trabalho podem variar conforme o local, porém serem “selecionadas” pelo hospedeiro, de modo que alguns endófitos consigam se alojar dentro do tecido vegetal, no caso as folhas, e outros não.

Nesse trabalho, observamos que cada uma das espécies avaliadas apresenta uma comunidade distinta de endófitos independente da área de coleta. No entanto, o fato de *B. fischeri* e *B. olsoniae* compartilharem um número considerado de espécies, comparado a *B. venosa* sugerimos que, embora o hospedeiro seja um dos principais fatores para as diferenças observadas na composição de espécies, o local de coleta também pode atuar como fator

determinante nas comunidades endofíticas de *Begonia*. Compreender a estrutura das comunidades endofíticas exige um olhar dinâmico, portanto, estudos futuros visando o conhecimento do microbioma endofítico em *Begonia* poderiam ser realizados, a fim de obter um conhecimento mais profundo sobre os fungos endofíticos dessas plantas.

2.5 REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, W. L. et al. Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. 1. ed. Piracicaba: CALO, 2010, p.167.
- ARNOLD, A. E.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v.88, n.3, p. 541–549, 2007.
- ARNOLD, A. E. Diversity and ecology of fungal endophytes in tropical forests. In: DESHMUKH, S.; RAI, M.K. (eds) **Biodiversity of fungi: their role in human life**. New Hampshire: Ed Science Publishers., 2005, s/n, p. 49-68.
- ARNOLD, A. E.; HERRE, E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, v. 95, n.3, p. 388–398, 2003.
- BOTELLA, L.; DIEZ, J. J. Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. **Fungal Diversity**, v.47, s/n, p.9–18, 2011.
- CANNON, P. F. et al. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, v.73, s/n, p.181–213, 2012.
- CANTRELL, S. A. et al. Unusual fungal niches. **Mycologia**, v.103, n.5, p.1161-1174, 2011.
- CLARKE, K. R. Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. **Australian Journal of Ecology**, v. 18, s/n, p.117-143, 1993.
- CLARKE, K. R.; GORLEY, R.N. PRIMER v.5: user manual/tutorial Primer-E, Plymouth, U.K. 2001.
- COLWELL, R. K. **EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples**. Version 9. User's Guide and application published at: <http://purl.oclc.org/estimates>, 2013.
- DAVIS, E. C.; SHAW, J. Biogeographic and phylogenetic patterns in diversity of liverwort-associated endophytes. **American Journal of Botany**, v.95 n.8 p.914–924, 2008.
- DEWITTE, A. et al. Genome size variation in *Begonia*. **Genome**, v.52, n.10, 2009.
- DEWITTE, A. et al. The origin of diversity in *Begonia*: genome dynamism, population processes and phylogenetic patterns. In Grillo, O.; Venora, G. (eds) **The Dynamical Processes of Biodiversity: Case studies of evolution and spatial distribution**. Durham: Intech, 2011. p. 27-52.
- DODD, S.L., LIECKFELDT, E.; SAMUELS, G.J. *Hypocrea atroviridis* sp. nov. the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. **Mycologia**, v. 95, n/s, p. 27–40, 2003.
- DRUZHININA, I. et al. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 10, p. 813–828, 2005.
- ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608p.
- ELLIS, M. B. **More Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1976. 507p.

EUGÉNIO, L. F. et al. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal. **Fungal Diversity**, v. 44, s/n, p.107–115, 2010.

FÁVARO, L. C. L. et al. Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. **PLoS ONE**, v. 6, n.8, p. 1-18, 2011.

FERREIRA, M. C. et al. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59 s/n. p. 36-44, 2015.

GOODALL-COPESTAKE, W. P. et al. The early evolution of the mega-diverse genus *Begonia* (Begoniaceae) inferred from organelle DNA phylogenies. **Biological journal of the linnean society**, v.101, n.2, p. 243-250, 2010.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, n. 48, p. 95-98, 1999.

HAMMER, Ø. et al. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.

HATA K, ATARI R, SONE K. Isolation of endophytic fungi from leaves of *Pasania edulis* and their within-leaf distributions. **Mycoscience**, v.43, n.5, p. 369–373, 2002.

HIGGINS, K. L. et al. Communities of fungal endophytes in tropical forest grasses: highly diverse host- and habitat generalists characterized by strong spatial structure. **Fungal ecology**, v 8, s/n. p. 1-11, 2014.

HIGGINS, K. L. et al. Culturing and direct PCR suggest prevalent host generalism among diverse fungal endophytes of tropical forest grasses. **Mycologia**, v. 103, n. 2, p. 247–260, 2011.

HUGHES, M.; HOLLINGSWORTH, P. M. Population genetic divergence corresponds with species-level biodiversity patterns in the large genus *Begonia*. **Molecular Ecology**, v.17, n.11, p.2643-2651, 2008.

ICMBio, 2015. **MMA defende criação de parque em Alcatrazes**. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/comunicacao/noticias/20-geral/4062-camara-debate-criacao-de-parque-em-alcatrazes.html>. Acesso 12 agosto, 2015.

INDERBITZIN, P.; MEHTA, Y. R.; BERBEE, M. L. *Pleospora* species with *Stemphylium* anamorphs: a four locus phylogeny resolves new lineages yet does not distinguish among species in the *Pleospora herbarum* clade. **Mycologia**, v. 101, n.3, p. 329- 339, 2009.

JACQUES, E. L.; MAMEDE, M. C. H. Notas nomenclaturais em *Begonia* L. (Begoniaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.3, n. 28, p. 579-588, 2005.

JACQUES, E. L. **Begoniaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5616>>. Acesso em: 16 Ago. 2015.

KATO, K., STANDLEY, D. M. Mafft Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, n. 4. p.772-780, 2013.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980.

KUO, HSIAO-CHE et al. Secret lifestyles of *Neurospora crassa*. **Scientific Reports**, v. 4, p. 5135, 2014.

LAU, K. M. et al. Factors influencing communities of foliar fungal endophytes in riparian woody plants. **Fungal Ecology**, v. 6, s/n, p.365-378, 2013.

MAGURRAN, A. E. **Measuring biological diversity**. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2004, 256 p.

- MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N. et al. *Pestalotiopsis* revisited. **Studies in mycology**, v.79, p.121–186, 2014.
- MÁRQUEZ, S. S. et al. Non-systemic fungal endophytes of grasses. **Fungal Ecology**, v.5, n.3, p. 289-297, 2012.
- MELLO, I. S. et al. Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpina* strain from the Antarctic moss *Schitidium antarctici*. **Extremophiles**, v.18, n.1, p.15-23, 2014.
- MONTOYA, Q. V. et al. Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 109, n. 5, p. 633-651, 2016.
- MOTOHASHI K. et al. Phylogenetic analyses of Japanese species of *Phyllosticta* sensu Stricto. **Mycoscience**, v.50, s/n, p.291–302, 2009.
- MOONLIGHT, P. W. et al. Continental-scale diversification patterns in a megadiverse genus: the biogeography of Neotropical *Begonia*. **Journal of Biogeography**, v. 42 s/n p.1137–1149, 2015.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403 n. 6772 p. 853-858, 2000.
- PANDIKUMAR, P.; BABU, N. P.; IGNACIMUTHU, S. Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of *Begonia malabarica* Lam. in normal and streptocotocin induced diabetic rats. **Jornal of Ethnopharmacology**, v.124, s/n, p.111-115, 2009.
- PERŠOH, D. Plant-associated fungal communities in the light of meta'omics. **Fungal Diversity**, v. 75, s/n, p. 1-25, 2015.
- PERŠOH, D. Factors shaping community structure of endophytic fungi—evidence from the *Pinus-Viscum*-system. **Fungal Diversity**, v. 60 p.55–69, 2013.
- PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDRENA, J.; HIRANO, S. S. (Eds.). Microbial ecology of leaves. Berlin: Springer-Verlag. p.179-97, 1991.
- PODANI, J.; MIKLOS, I. Resemblance coefficients and the horseshoe effect in principal coordinates analysis. **Ecology**, v. 83, n. 12, p. 3331-3343, 2002.
- RAMECH, N. et al. Phytochemical and antimicrobial studies of *Begonia malabarica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 1, p.129-132, 2002.
- SANCHEZ-AZOFEIFA, A. et al. Relationships between endophyte diversity and leaf optical properties. **Trees**, v. 26 p. 291–299, 2012.
- SCHOCH, C.L., et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v.109, p.661-686, 2005.
- SCHROERS, H. J. et al. *Fusarium foetens*, a new species pathogenic to begonia elatior hybrids (*Begonia x hiemalis*) and the sister taxon of the *Fusarium oxysporum* species complex. **Mycologia**, v. 96, n.2 , p. 393-406, 2004.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology Molecular Biology**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.
- SURESH, S. N.; NAGARAJAN, N. Antimicrobial activity and preliminary phytochemical analysis of *Begonia malabarica* lam. **Journal of pure and applied microbiology**, v. 3 n. 2 p. 801-803, 2009.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2735-2729, 2013.

- UDAYANGA, D. et al. A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). **Fungal Diversity**, v. 56, s/n, p. 157- 171, 2012.
- U 'REN, J.M. et al. Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a continental scale **American Journal of Botany**, v.99, n.5 p. 898–914, 2012.
- WANDERLEY, M.G.L. Flora fanerogâmica do estado de São Paulo. São Paulo: **Flora**, 2012. p. 363.
- WALTHER, G. et al. DNA barcoding in *Mucorales*: an inventory of biodiversity. **Persoonia**, v.30, p. 11–47, 2013.
- WANI, Z.A. et al. Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.99, s/n, p.2955–2965, 2015.
- WANG, B. YU, Y. WANG, L. *Penicillium fusisporum* and *P. zhuangii*, Two New Monoverticillate Species with Apical-Swelling Stipes of Section *Aspergilloides* Isolated from Plant Leaves in China. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1-12, 2014.
- WATANABE, T. **Pictorial atlas of soil and seed fungi morphologies of cultured fungi and key to species**. 2 ed. London, UK: CRC Press, 2002.
- WILSON, D. Endophyte-The evolution of a term and clarification of its use and definition. **Oikos**, v. 73, n. 2, p.274–276, 1995.
- WIKKEE, S. et al. *Phyllosticta capitalensis*, a widespread endophyte of plants. **Fungal Diversity**, v.105, s/n, p. 60-91, 2013.
- WU, L. et al. Geographic and tissue influences on endophytic fungal communities of *Taxus chinensis* var. *mairei* in China. **Curr Microbiol**, v. 66, p. 40–48, 2013.
- ZHANG, T. et al. Molecular analysis of fungal diversity associated with three bryophyte species in the Fildes Region, King George Island, maritime Antarctica. **Extremophiles**, v.17, s/n, p.757–765, 2013.

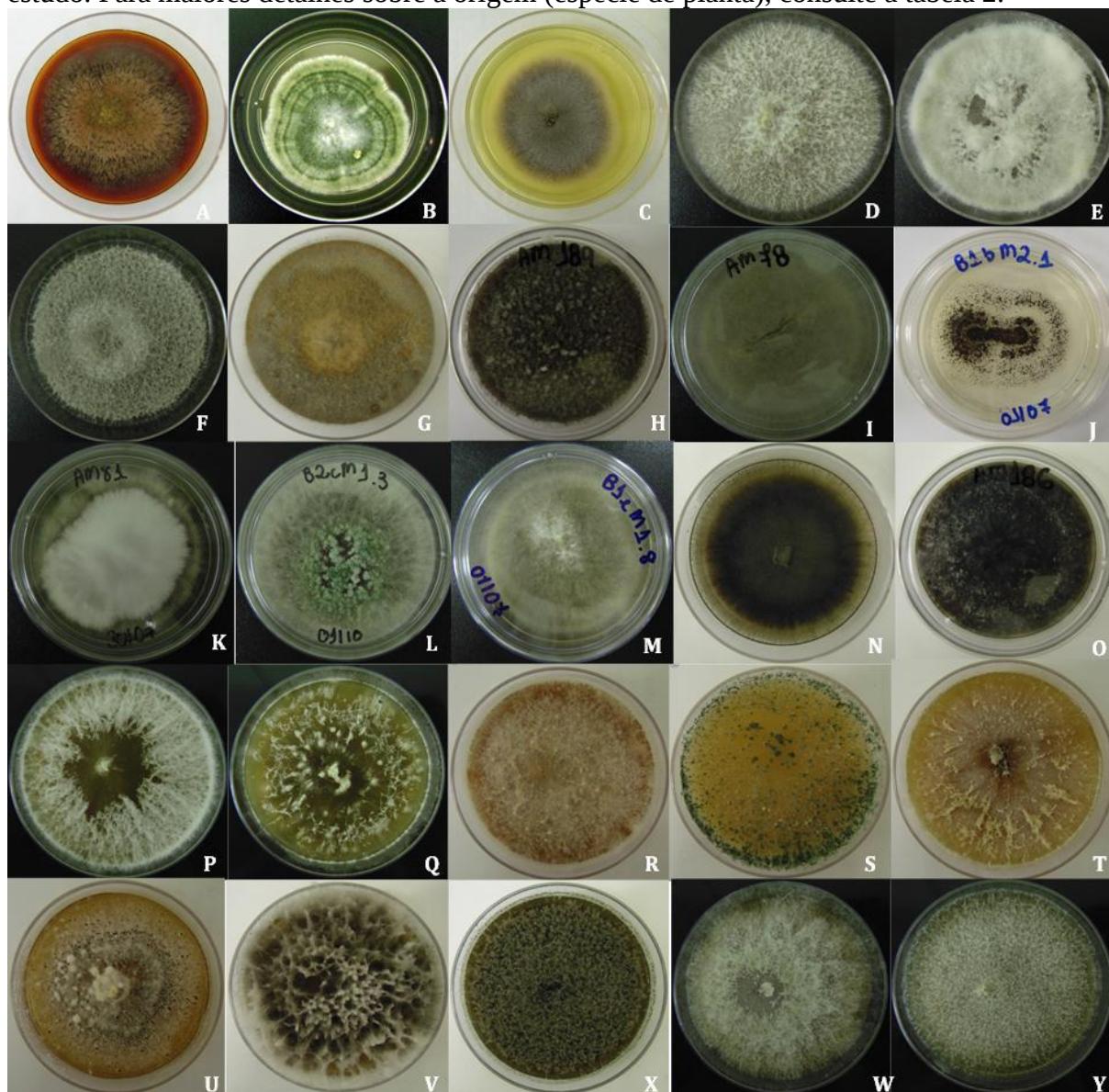
2.6 ANEXOS

Tabela A1. Endófitos isolados de *Begonia fischeri*, *Begonia olsoniae*, *Begonia venosa* encontradas na Mata Atlântica.

Identificação	ID (%)	Resultado da busca no NCBI-GenBank	N. de acesso	Total de isolados
Ascomycota				
Ascomycota não identificado 1	94	<i>Mycoleptodiscus terrestres</i>	JN711860	10
Ascomycota não identificado 2	98	<i>Mycoleptodiscus indicus</i>	KJ471483	1
Ascomycota não identificado 3	98 99	<i>Sporormiella isomera</i> CBS 166.73 <i>Preussia africana</i>	AY943053 JQ031265	1
Ascomycota não identificado 4	98 98	<i>Microsphaeropsis olivacea</i> CBS 303.68 <i>Ascochyta viciae-pannonicae</i>	JX681101 EU167559	1
<i>Aspergillus niger</i>	100 99	<i>Aspergillus niger</i> CBS 12049 <i>Aspergillus lacticoffeatus</i> CBS 101884	AY585535 AY819999	3
<i>Aspergillus</i> sp.	100	<i>Aspergillus niger</i> CBS 12049	AY585535	1
<i>Bartalinia</i> sp.	97	<i>Bartalinia</i> sp. UFMGCB 6427 <i>Bartalinia pondoensis</i>	KJ471560 JQ425386	1
<i>Cladosporium</i> sp.	100 99	<i>Cladosporium perangustum</i> CBS 126364 <i>Cladosporium colombiae</i> CBS 274.80B	HM148122	3
<i>Colletotrichum</i> sp. 1	99 99	<i>Colletotrichum brevisporum</i> <i>Glomerella magna</i>	NR_119729 NR_111637 HM163188	96
<i>Colletotrichum</i> sp. 2	99 99	<i>Colletotrichum boninense</i> <i>Colletotrichum nicotianae</i>	JX258728 HG798903	71
<i>Colletotrichum</i> sp. 3	100 99	<i>Colletotrichum</i> <i>aeschynomenes</i> CBS 130418 <i>Colletotrichum asianum</i>	NR_120133 NR_119731	45
<i>Colletotrichum</i> sp. 4	100 99	<i>Colletotrichum thailandicum</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	JN050242 JQ936128	7
<i>Colletotrichum</i> sp. 5	99 98	<i>Colletotrichum magnisporum</i> CBS 398.84 <i>Colletotrichum arxii</i> CBS 132511	NR_132056 NR_132055	1
<i>Curvularia</i> sp. 1	99 96	<i>Curvularia trifolii</i> <i>Curvularia luneta</i>	KM246257 KJ418360	3
<i>Curvularia</i> sp. 2	99	<i>Curvularia geniculate</i> CBS187_50	KJ909781	1
<i>Diaporthe</i> sp. 1	98 98	<i>Diaporthe terebinthifolii</i> CBS 133180 <i>Diaporthe endophytica</i> CBS 133811	NR_111862 NR_111847	54
<i>Diaporthe</i> sp. 2	99 98	<i>Diaporthe arengae</i> CBS 114979 <i>Diaporthe musigena</i> CBS 129519	NR_111843 NR_111853	11
<i>Diaporthe</i> sp. 3	99 98	<i>Diaporthe ceratozamia</i> CBS 131306 <i>Diaporthe arecae</i> CBS 161.64	JQ044420 KC343032	22
<i>Diaporthe</i> sp. 4	99	<i>Diaporthe mayteni</i> CBS 133185	NR_111852	5
<i>Diaporthe</i> sp. 5	96 95	<i>Diaporthe phaseolorum</i> CBS 113425 <i>Diaporthe endophytica</i> CBS 133811	KC343174 NR_111847	1
<i>Diaporthe</i> sp. 6	96	<i>Diaporthe sclerotoides</i> CBS 296.67	KC343193	1

<i>Diaporthe</i> sp. 7	96	<i>Diaporthe phaseolorum</i> CBS 113425	KC343174	1
<i>Diaporthe</i> sp. 8	99	<i>Diaporthe anacardii</i> CBS 720.97	NR_111841	1
	98	<i>Diaporthe foeniculacea</i> CBS 111554	KC343102	
<i>Endomelanconiopsis</i> sp.	99	<i>Endomelanconiopsis endophytica</i> CBS 120397	KF766164	3
	99	<i>Endomelanconiopsis microspora</i> CBS 353.97	KF766165	
<i>Epicoccum nigrum</i>	99	<i>Epicoccum nigrum</i>	KP132016	3
<i>Phoma</i> sp.	100	<i>Phoma</i> sp.	KM507776	2
<i>Neofusicoccum</i> sp.	98	<i>Neofusicoccum ribis</i> CBS 115475	KF766205	5
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	100	<i>Neopestalotiopsis cubana</i> CBS 600.96	KM199347	8
	99	<i>Neopestalotiopsis ellipsospora</i> CBS 115113	KM19934	
<i>Neurospora</i> sp.	99	<i>Neurospora tetraspora</i> CBS 178.33	NR_077163	2
	99	<i>Neurospora africana</i> CBS 571.69	GQ922531	
<i>Nigrospora</i> sp. 1	99	<i>Nigrospora oryzae</i> CBS 113884	DQ219433	7
<i>Penicillium thomii</i> var. <i>flavescens</i>	99	<i>Penicillium flavescens</i>	KF769402	4
	99	<i>Penicillium thomii</i> CBS n 347.59	GQ367510	
<i>Phyllosticta</i> sp.	100	<i>Phyllosticta capitalensis</i> CBS 123373	JQ743587	15
Pleosporales	97	<i>Leptosphaerulina chartarum</i> CBS 329.86	KJ79640	8
	99	<i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i> CBS 118.94	EU167567	
<i>Stagonospora</i> sp.	99	<i>Stagonospora trichophoricola</i> CBS 136764	KJ869110	8
<i>Stemphylium</i> sp.	100	<i>Stemphylium lycopersici</i>	KR911818	1
<i>Trichoderma</i> sp.	97	<i>Trichoderma ovalisporum</i>	FJ463280	1
	97	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	FJ463288	
<i>Trichoderma atroviride</i>	99	<i>Trichoderma atroviride</i> UTHSC:10-2682	HG931223	2
Xylariales 1	98	<i>Xylaria</i> sp.	AB743839	4
Xylariales 2	95	<i>Xylaria</i> sp.	EU747724	3
Xylariales 3	98	<i>Xylaria berteri</i> UFMG 5268	JQ327861	2
Xylariales 4	97	<i>Muscodor vitigenus</i>	KC771503	2
	100	<i>Muscodor yucatanensis</i>	FJ917287	
Xylariales 5	99	<i>Xylaria arbuscula</i>	JN601145	1
	99	<i>Xylaria venosula</i>	AB462754	
Xylariales 6	99	<i>Xylaria apiculata</i>	KP133329	1
Basidiomycota				
<i>Cantharellales</i>	95	<i>Ceratobasidium</i> sp.	HQ630980	1
	95	<i>Rhizoctonia</i> sp.	AJ318421	
<i>Basidiomycota</i> não identificado	90	<i>Basidiomycota</i> sp.	KP814442	1
Mucormycotina				
<i>Mucor bainieri</i>	100	<i>Mucor bainieri</i> CBS 293.63	NR_103628	1
TOTAL				426

Figura A1. Aspecto geral das colônias de algumas UTOs representativas obtidas no presente estudo. Para maiores detalhes sobre a origem (espécie de planta), consulte a tabela 2.



A: *Epicoccum nigrum*, B: *Penicillium thomii* var. *flavescens*, C: *Cladosporium* sp., D: *Diaporthe* sp.1, E: *Neopestalotiopsis* sp., F: *Colletotrichum* sp.1, G: fungo não identificado, H: *Nigrospora* sp.1, I: *Mucor bainieri*, J: *Aspergillus niger*, K: *Xylaria* sp. 1, L: *Trichoderma* sp. M: *Cantharellales*, N: *Curvularia* sp.1, O: *Endomelanconiopsis* sp, P: *Diaporthe* sp. 2, Q: *Diaporthe* sp. 2, R: *Epicoccum soghi*, S: *Trichoderma atroviride*, T: *Diaporthe* sp. 2, U: *Neopestalotiopsis* sp., V: *Neofusicoccum* sp., X: *Colletotrichum* sp. 1, W: *Diaporthe* sp. 6, Y: Ascomycota não identificado 2

Figura A2. Árvore filogenética de sequências de *Aspergillus* spp. inferida com o gene que codifica para a proteína beta tubulina. A árvore foi baseada no algoritmo de *Neighbor-Joining*, inferida com o modelo de Kimura 2 parâmetros. O suporte dos clados foi calculado com 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*. Em negrito estão os isolados analisados no presente estudo.

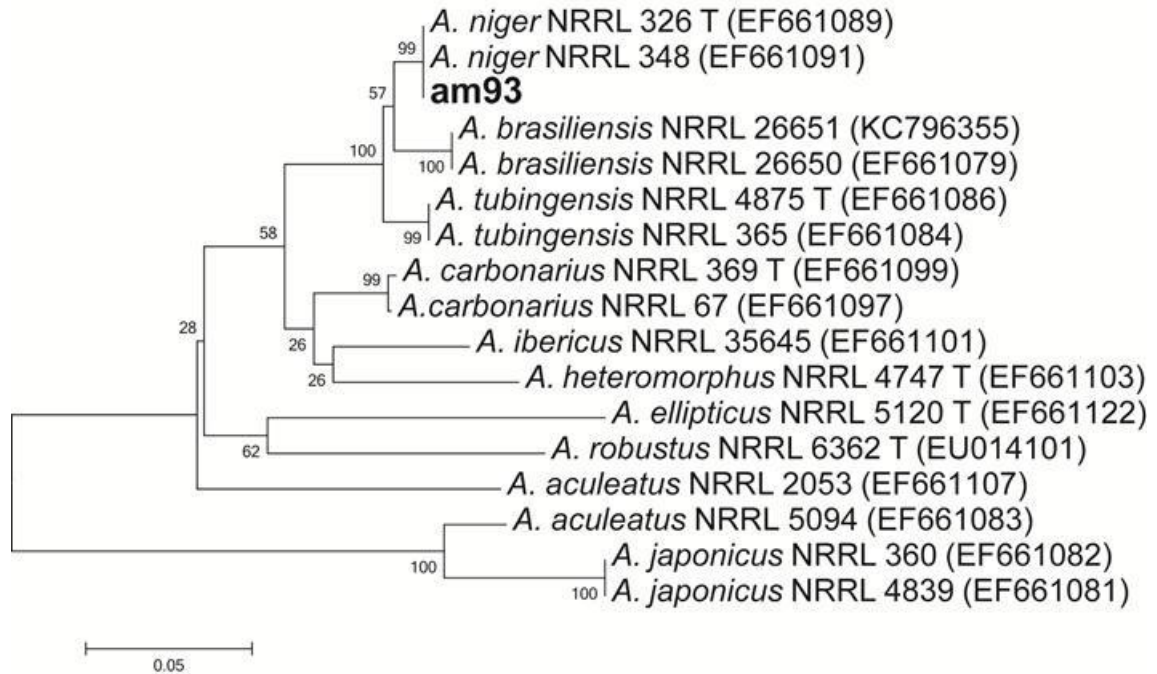


Figura A3. Árvore filogenética de sequências de *Colletotrichum* spp. inferida com o marcador ITS. A árvore foi baseada no algoritmo de *Neighbor-Joining* e inferida com o modelo de Kimura 2 parâmetros. O suporte dos clados foi calculado com 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*. Em negrito estão os isolados analisados no presente estudo

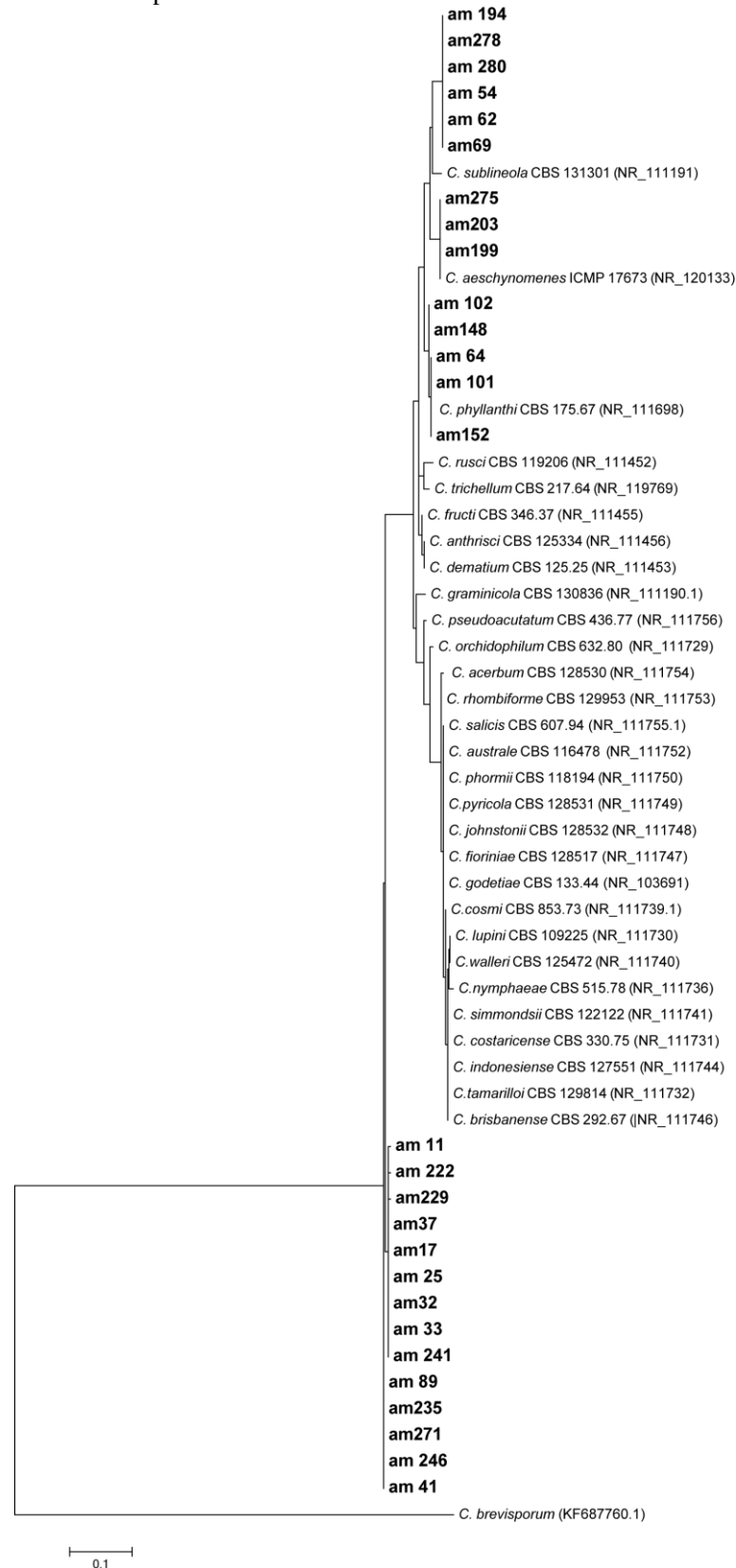


Figura A4. Árvore filogenética de sequências de *Diaporthe* spp. inferida com o marcador ITS. A árvore foi baseada no algoritmo de *Neighbor-Joining* e inferida com o modelo de Kimura 2 parâmetros. O suporte dos clados foi calculado com 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*. Em negrito estão os isolados analisados no presente estudo.

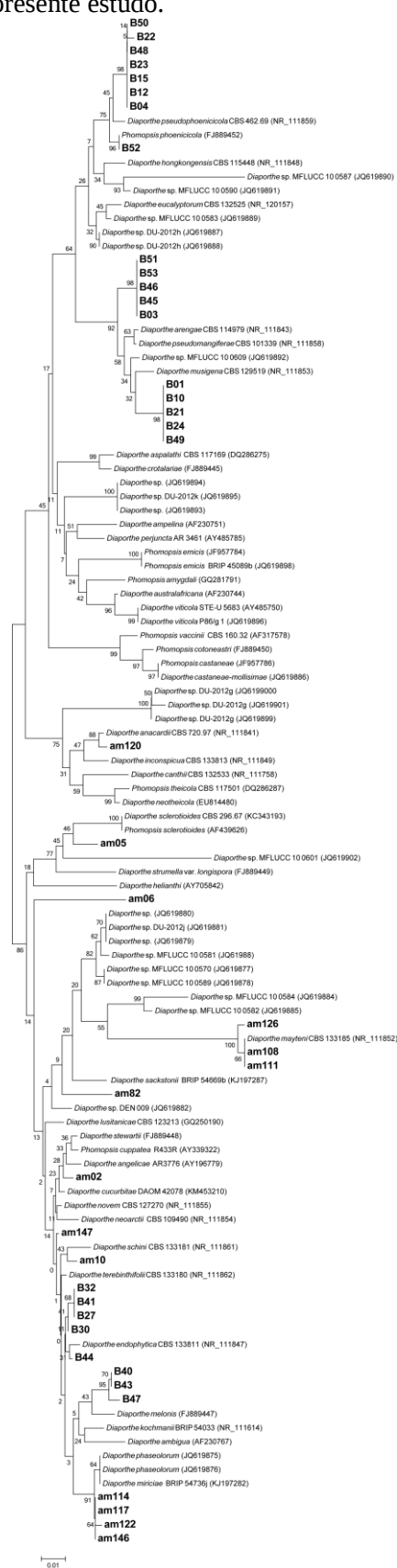


Figura A5. Árvore filogenética de sequências de *Epicoccum* spp. inferida com o marcador ITS. A árvore foi baseada no algoritmo de *Neighbor-Joining* e inferida com o modelo de Kimura 2 parâmetros. O suporte dos clados foi calculado com 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*. Em estão os isolados analisados no presente estudo.

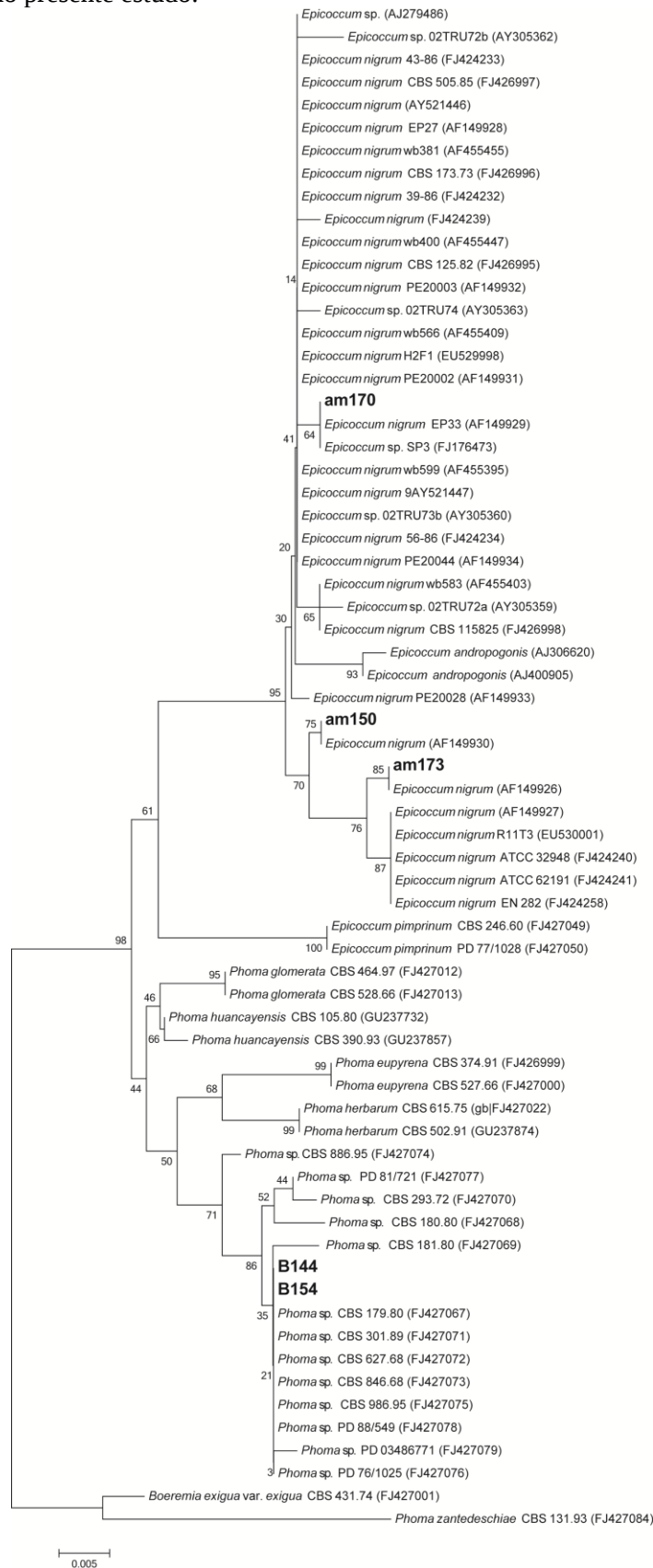


Figura A6. Árvore filogenética de sequências de *Mucor* spp. inferida com o marcador ITS. A árvore foi baseada no algoritmo de *Neighbor-Joining* e inferida com o modelo de Kimura 2 parâmetros. O suporte dos clados foi calculado com 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*. Em negrito estão os isolados analisados no presente estudo. Grupo externo *Rhizomucor*.

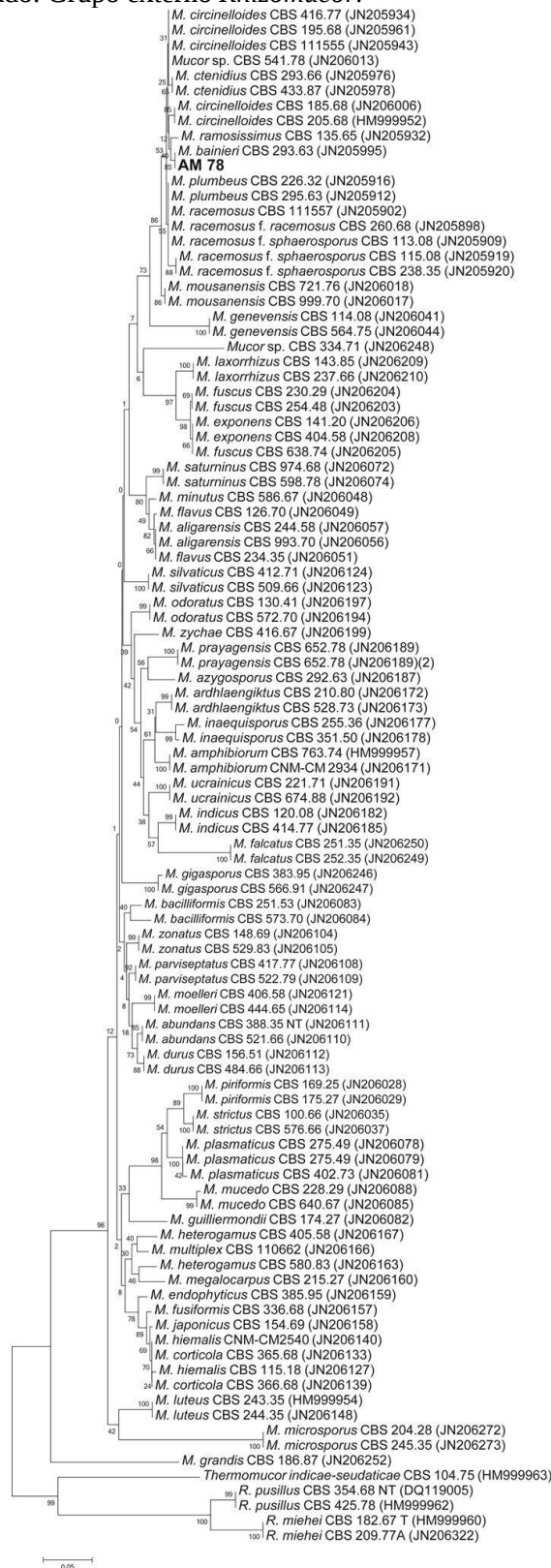


Figura A7. Árvore filogenética de sequências de *Penicillium* spp. inferida com o gene que codifica para a proteína Beta tubulina. A árvore foi baseada no algoritmo de *Neighbor-Joining* e inferida com o modelo de Kimura 2 parâmetros. O suporte dos clados foi calculado com 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*. Em negrito estão os isolados analisados no presente estudo.

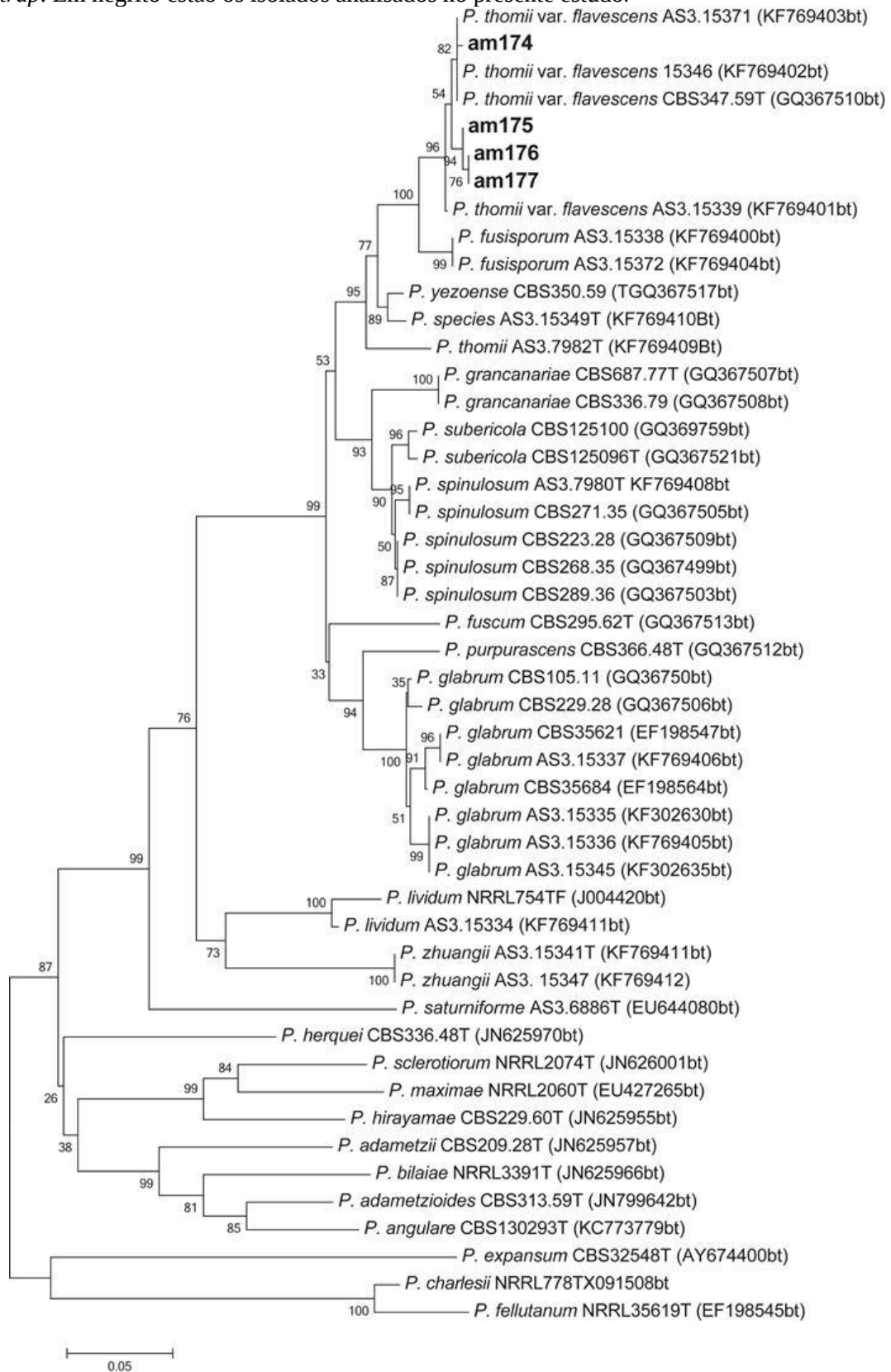


Figura A8. Árvore filogenética de sequências de *Stemphylium* spp. inferida com o marcador ITS. A árvore foi baseada no algoritmo de *Neighbor-Joining* e inferida com o modelo de Kimura 2 parâmetros. O suporte dos clados foi calculado com 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*. Em negrito estão os isolados analisados no presente estudo

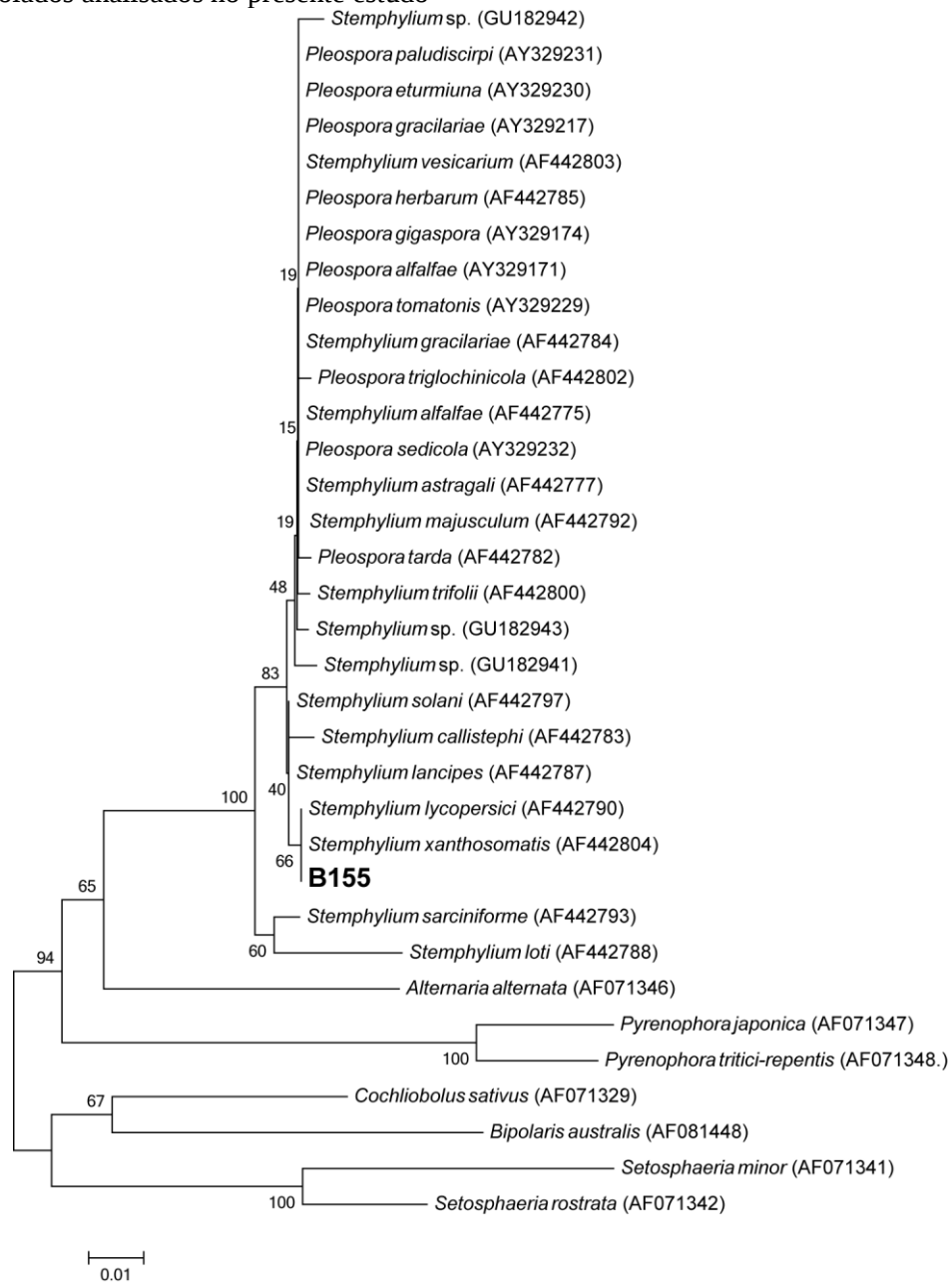
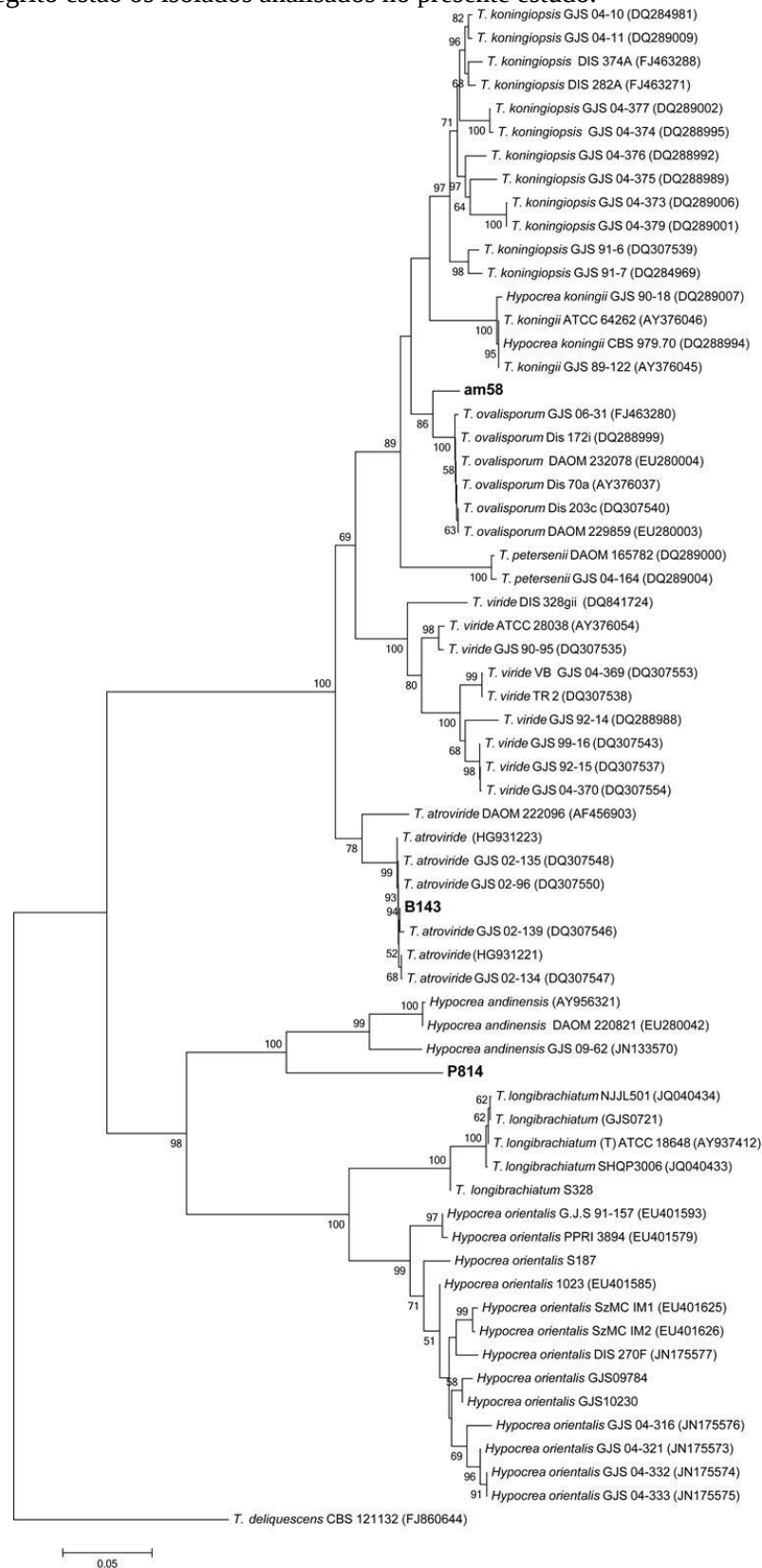


Figura A9. Árvore filogenética de sequências de *Trichoderma* spp. inferida com o gene que codifica para a proteína fator alfa. A árvore foi baseada no algoritmo de *Neighbor-Joining*, inferida com o modelo de Kimura 2 parâmetros. O suporte dos clados foi calculado com 1000 pseudoréplicas de *bootstrap*. Em negrito estão os isolados analisados no presente estudo.



3 CAPÍTULO 2 - PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ENCONTRADOS EM TRÊS ESPÉCIES DE *BEGONIA*

Ana M. L. Correia¹, Simone P. Lira², Diana Fortkamp², Andre Rodrigues^{1*}

¹ UNESP – Univ Estadual Paulista, Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Rio Claro, SP, Brasil.

² USP – Univ de São Paulo, Departamento de Produtos Naturais, Piracicaba, SP, Brasil.

Palavras-chaves: Bioensaio. Fitopatógenos. Bioprospecção. Fração acetato.

* Correspondência para:

Andre Rodrigues (andrer@rc.unesp.br)

Universidade Estadual Paulista, UNESP, Câmpus de Rio Claro

Avenida 24-A, n. 1515, Bela Vista, Rio Claro, São Paulo, Brazil, CEP: 13.506-900

Tel.: +55 19 3526-4364; Fax: +55 19 3526-4176

RESUMO

Fungos endofíticos vivem dentro do tecido das plantas sem causar sintomas aparente de doença. Tais fungos são conhecidos por serem excelentes produtores de metabólitos secundários capazes de combater micro-organismos patogênicos, além de constituírem uma fonte pouco explorada em relação aos compostos bioativos que produzem. Nesse contexto, o presente trabalho avaliou frações acetato obtidas de fungos endofíticos isolados de *Begonia fischeri*, *Begonia olsoniae* e *Begonia venosa*, plantas encontradas em diferentes áreas da Mata Atlântica. As frações foram obtidas de cultivos em meio líquido e submetidas a teste de antagonismo em placa frente aos fitopatógenos *Phomopsis sojae* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Das 88 frações acetato avaliadas, 26% apresentaram atividade inibitória significativa em relação ao controle, dessas 14,7% inibiram *C. gloeosporioides* e 11,3 % inibiram *P. sojae*. Neste trabalho destacamos a importância de estudos com hospedeiros não usuais como fonte de endófitos não explorados. Aqui, demonstramos que esses endófitos são capazes de produzir compostos que podem eventualmente serem empregados no controle desses fitopatógenos.

3.1 INTRODUÇÃO

Micro-organismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que habitam, pelo menos em um período de seu ciclo de vida, o interior das plantas sem causar sintomas de doenças (ARAÚJO et al., 2010). Recentemente, o interesse nos fungos endofíticos deve-se ao seu potencial uso como biocatalizadores para transformação química de produtos naturais, uma vez que produzem enzimas com atividade de modificação esteroespecífica de compostos químicos (ALY et al., 2011). Além disso, vários estudos levaram à descoberta de centenas de produtos naturais incluindo alcaloides, terpenoides, flavonoides e esteroides oriundos de fungos endofíticos (NAIR, PADMAVATHY, 2014; JOSEPH, MINI PRIYA, 2011). Muitos desses compostos são também reconhecidos por suas funções antibiótica, imunossupressora, anticancerígena e de repelência de insetos pragas (BARTHOLDY et al., 2001).

Endófitos podem sintetizar metabólitos bioativos frente a diferentes doenças do hospedeiro, possibilitando o controle biológico através de fatores de indução da resistência sistêmica e resistência adquirida, o que pode culminar na redução dos patógenos na planta (STEPNIEWSKA; KUŹNIAR, 2013). No entanto, a produção de biocompostos pode variar entre linhagens fúngicas isoladas de habitats diferentes, como relatado por Higginbotham e colaboradores (2013). Esses autores observaram que endófitos de florestas úmidas

apresentaram maior antagonismo a *Plasmodium falciparum* e *Leishmania donovani*, quando comparados a isolados obtidos das mesmas ordens de hospedeiros encontradas em florestas de planícies.

Estudos demonstram que endófitos isolados de *Theobroma cacao* possuem atividade antagonista frente a fitopatógenos, como *Moniliophthora perniciosa*, causador da vassoura-de-bruxa, uma doença muito comum em cacaueiros (ARNOLD; HERRE, 2003; HANADA et al., 2010). Desse modo, os endófitos são relevantes para o controle de fitopatógenos, pois colonizam um nicho ecológico semelhante ao ocupado pelos mesmos (ARAÚJO et al., 2010).

Devido ao potencial dos endófitos em auxiliar seus hospedeiros na proteção de fitopatógenos, faz-se necessário uma busca sistemática por fungos que produzem substâncias bioativas. Tendo em vista o estudo de Higginbotham et al. (2013), avaliar o potencial antifúngico de endófitos isolados de diferentes locais, é de grande interesse para a prospecção de bioativos.

Dentre os diversos fitopatógenos que ocasionam prejuízos para o setor agroeconômico brasileiro, *Phomopsis sojae* e *Colletotrichum gloeosporioides* são os que acarretam o maior descarte de lotes de sementes (EMBRAPA, 2004). O fungo *Phomopsis sojae* é um fitopatógeno que ocasiona a seca da haste e da vagem da soja, influenciando na qualidade das sementes e ocasionando importantes perdas econômicas em nosso país (EMBRAPA, 2004). O fungo *C. gloeosporioides* é o agente responsável pela antracnose, uma doença que ataca diversas culturas, como abacate, morango, berinjela, café, caju, citros, etc; podendo afetar o hospedeiro na fase de seu desenvolvimento no campo, como também na pós-colheita (FREEMAN et al., 1998). Devido aos prejuízos causados por tais fitopatógenos, a busca por biocompostos ativos que possam combatê-los é importante, uma vez que, podem corroborar com alternativas de biocontrole, diminuindo o impacto causado por agrotóxicos.

Nesse sentido, o presente estudo avaliou o potencial dos fungos endofíticos isolados de *Begonia fischeri*, *Begonia olsoniae* e *Begonia venosa* coletadas em duas regiões diferentes de Mata Atlântica, a fim de saber se os fungos endofíticos associados a *Begonia* produzem compostos ativos frente a fitopatógenos. Embora alguns estudos tenham evidenciado o uso biotecnológico de algumas espécies de begônias (PANDIKUMAR et al., 2009; SURESH; NAGARAJAN, 2009; RAMESH et al., 2002), além de várias patentes que fazem uso de espécies como *Begonia fimbristipula*, nada se sabe sobre os micro-organismos endofíticos associados a essas plantas.

O estudo de endófitos em hospedeiros pouco explorados pode levar à descoberta de novos compostos bioativos, portanto, o presente trabalho avaliou a ação antagonista de

frações acetato obtidas de fungos endofíticos frente aos fitopatógenos *P. sojae* e *C. gloeosporioides*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Origem das linhagens

Um total de 88 endófitos provenientes do acervo de pesquisa da CRM-UNESP foi utilizado para os bioensaios de antagonismo frente aos fitopatógenos *P. sojae* e *C. gloeosporioides*. Dentre esses, 36 endófitos foram selecionados de *B. fischeri*, 24 de *B. olsoniae* e 28 de *B. venosa*. O número de endófitos selecionados de cada planta foi designado de acordo com a diversidade de endófitos recuperados dessas plantas no estudo apresentado no capítulo 1. Portanto, quanto mais diversas foram comunidades, maior o número de isolados selecionados para o teste de bioensaio. Os fitopatógenos utilizados nesse estudo foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Genética de Micro-organismos e Laboratório de Fitopatologia da ESALQ- USP. Além disso, ambos foram isolados de hospedeiros que apresentavam sintomas de podridão da haste e antracnose, ocasionados pelos respectivos fitopatógenos.

3.2.2 Obtenção da fração acetato e bioensaios in vitro

Os fungos endofíticos utilizados neste estudo estão preservados pela técnica de Castellani (CASTELLANI, 1939). Primeiramente, os isolados foram inoculados em MA2% e incubados a 25 °C, no escuro, durante sete dias. Uma vez que estes apresentaram-se viáveis, (crescimento uniforme e livre de contaminações) um disco de ágar com micélio fúngico (5 mm de diâmetro) foi transferido para novas placas de Petri contendo MA2% e incubadas nas mesmas condições..

Em seguida, três discos (5 mm de diâmetro) de ágar com micélio dos fungos foram transferidos para 150 mL de meio Caldo Extrato de Malte 2%, pH 6,0 e cultivados a 28 °C, em agitação (150 rpm), durante sete dias. Após esse período, os caldos de cultivo foram filtrados e submetidos à partição entre água e acetato de etila. Para cada 150 mL de filtrado foram adicionados 100 mL de acetato de etila em funil de separação. Esse procedimento foi repetido três vezes para a extração máxima e ao final a fase aquosa foi descartada. Por fim, a fração acetato foi seca em rotoevaporador e pesada.

A triagem de atividade biológica foi realizada em placas de Petri contendo MA2%. No centro da placa foi inserido um disco de ágar contendo o fitopatógeno alvo, já com sete dias

de crescimento. Entre o fitopatógeno e a borda da placa foi inserido um disco de papel filtro esterilizado, onde foi depositado 2 mg da fração acetato obtida de cada isolado. Também foram realizados controles dos fitopatógenos (somente o fitopatógeno) e do acetato de etila (fitopatógeno mais disco com o solvente). As placas de Petri foram incubadas em B.O.D. a 28 °C, durante sete dias, no escuro.

Para avaliar o crescimento dos fitopatógenos na presença das frações foram determinados escores qualitativos de inibição, os quais foram baseados no tamanho do halo de inibição formado e se o crescimento micelial do fitopatógeno alcançou o disco de papel ou não (Figura 1). Optou-se por esse tipo de avaliação, uma vez que é sabido que os resultados obtidos através de bioensaios variam segundo a capacidade de difusão do composto no meio de cultivo e quantidade do composto ativo formado. A fim de verificar a reprodutibilidade do ensaio, as frações que foram capazes de inibir o crescimento dos fitopatógenos foram submetidas a um novo bioensaio. Esse foi realizado do mesmo modo que o anterior, porém para cada fração foram realizadas três réplicas.

Figura 1. Escores de inibição dos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* de *Phomopsis sojae* por frações acetato obtidas de cultivos de fungos endofíticos

Escores de inibição	Descrição	Foto
+	Fitopatógeno chegou até o disco. Halo de inibição muito pequeno	
++	Fitopatógeno não chegou até o disco de papel. Pequeno halo de inibição	
+++	Fitopatógeno não chegou até o disco de papel. Grande inibição	

O crescimento dos fitopatógenos foi registrado digitalizando-se as placas com sete dias de crescimento (momento em que o controle atingiu a borda da placa), utilizando *scanner* HP Deskjet F2050. Após a digitalização, as imagens das colônias foram analisadas no *software* ImageJ v. 1.38 (SCHNEIDER et al., 2012), onde foi realizado a medição da área de crescimento (em mm²). As médias da área de crescimento dos fitopatógenos frente aos diferentes extratos foram avaliadas utilizando-se ANOVA dois fatores. As comparações múltiplas entre as médias foram realizadas pelo teste de Tukey HSD. As análises estatísticas foram realizadas no programa Past v. 2.17c (HAMMER et al., 2001). Para representar os dados foram gerados *boxplots* no programa R.

3.3 RESULTADOS

Dentre os 88 endófitos, 24 frações acetato apresentaram atividade antagonista frente a pelo menos um dos fitopatógenos. Dessas frações, seis demonstraram atividade para ambos os fitopátogenos, porém apresentaram diferentes escores de inibição (Tabela 1); exceto o isolado am80 (*Xylaria* sp. 2) que apresentou inibição média (++) tanto para *P. sojae*, quanto para *C. gloeosporioides* (Tabela 1). Resultado interessante foi o fato de que os endófitos que apresentaram maiores escores de inibição (++++) não foram os mesmos para cada fitopatógeno (Tabela 1).

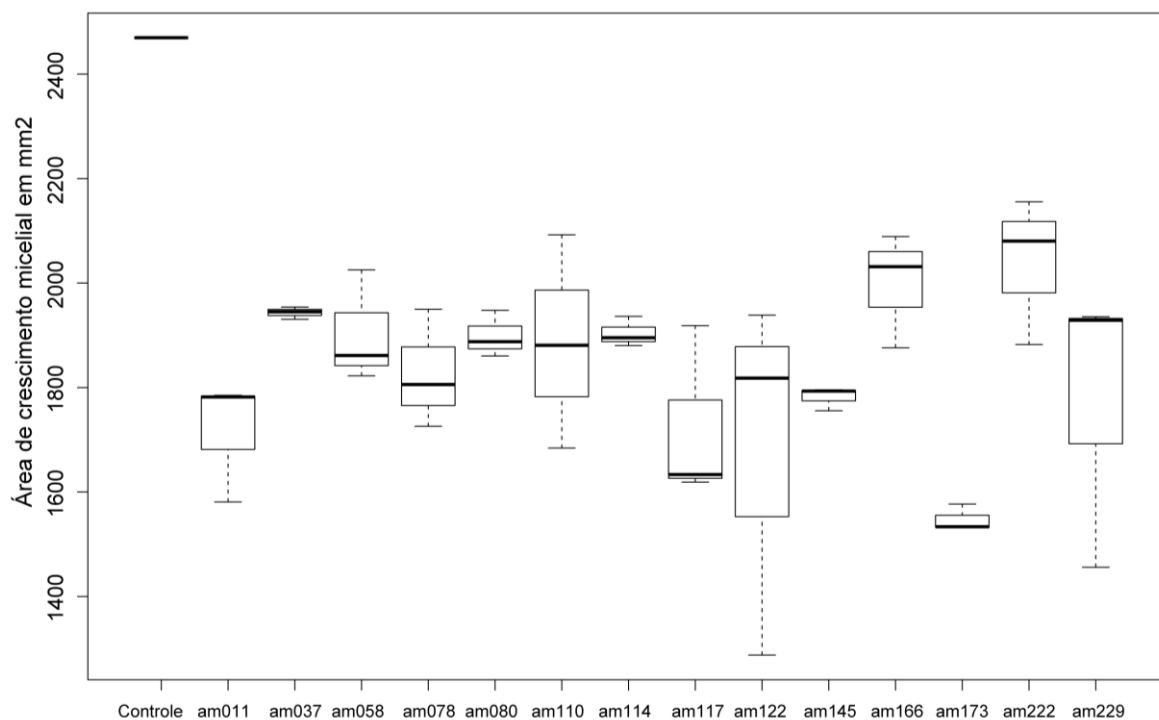
Em relação à origem dos isolados, dos 36 endófitos selecionados de *B. fischeri*, as frações acetato de 10 deles inibiram o crescimento de pelo menos um dos fitopatógenos estudados. Dos 24 endófitos de *B. olsoniae*, as frações acetato de 12 deles foram capazes de inibir o crescimento dos fitopatógenos. Para *B. venosa* das 28 frações avaliadas, apenas duas foram capazes de inibir somente *P. sojae*.

Todas as frações que apresentaram inibição (n= 24) foram submetidas a um novo bioensaio, dessa vez em triplicata. Como demonstrado nas Figuras 2 e 3, a maior parte das frações continuaram ativas mesmo após quatro a cinco meses de armazenamento em freezer, quando o teste foi reavaliado. Isso sugere que os metabólitos extraídos são estáveis e não degradam facilmente. No entanto, em relação ao fitopatógeno *C. gloeosporioides* o ensaio com a fração am222 (*Colletotrichum* sp. 1) não apresentou atividade no segundo bioensaio. Já para *P. sojae* os tratamentos am078, am95, am120, am122, am173 e am273, não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. Desse modo, das 88 frações avaliadas 13 (14,7%) apresentaram atividade inibitória significativa em relação ao controle contra *C. gloeosporioides* e 10 (11,3 %) contra *P. sojae*.

Tabela 1. Atividade inibitória de 24 fungos endofíticos isolados de *Begonia fischeri*, *Begonia olsoniae* e *Begonia venosa* frente aos fitopatógenos *Phomopsis sojae* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Em negrito, isolados que inibiram ambos os fitopatógenos.

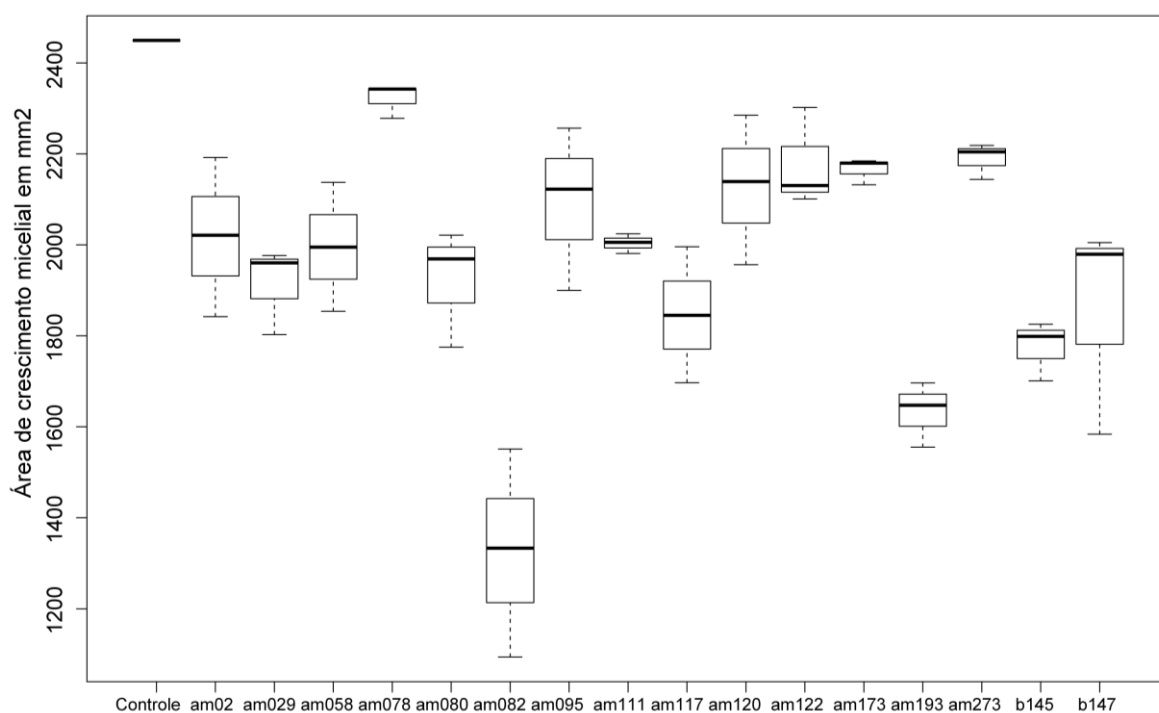
Isolado	Fungo	Hospedeiro	<i>Phomopsis sojae</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
am 11	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	<i>B. olsoniae</i>	-	+
am 222	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	<i>B. olsoniae</i>	-	+
am 229	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	<i>B. olsoniae</i>	-	+
am 37	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	<i>B. olsoniae</i>	-	++
am 273	<i>Curvularia</i> sp. 1	<i>B. fischeri</i>	+++	-
am 193	<i>Curvularia</i> sp. 2	<i>B. fischeri</i>	+++	-
am 02	<i>Diaporthe</i> sp. 1	<i>B. fischeri</i>	++	-
am 114	<i>Diaporthe</i> sp. 1	<i>B. olsoniae</i>	-	++
am 117	<i>Diaporthe</i> sp. 1	<i>B. fischeri</i>	++	+++
am 122	<i>Diaporthe</i> sp. 1	<i>B. olsoniae</i>	+	+
am 111	<i>Diaporthe</i> sp. 2	<i>B. olsoniae</i>	++	-
am 120	<i>Diaporthe</i> sp. 3	<i>B. olsoniae</i>	++	-
am 82	<i>Diaporthe</i> sp. 5	<i>B. olsoniae</i>	+++	-
am 173	<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>B. fischeri</i>	+	+++
am 78	<i>Mucor bainieri</i>	<i>B. olsoniae</i>	+	+
am 110	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	<i>B. fischeri</i>	-	++
am 29	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	<i>B. fischeri</i>	+++	-
am 95	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	<i>B. fischeri</i>	++	-
am 58	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>B. olsoniae</i>	++	+
am 166	<i>Xylariales</i>	<i>B. olsoniae</i>	-	+
am 80	<i>Xylaria</i> sp. 2	<i>B. fischeri</i>	++	++
am 145	<i>Xylariales</i>	<i>B. fischeri</i>	-	++
b145	Ascomycota não identificado	<i>B. venosa</i>	+++	-
b147	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	<i>B. venosa</i>	++	-

Figura 2. Área de crescimento micelial do fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* exposto às frações acetato dos endófitos encontrados em *Begonia fischeri* e *Begonia olsonie*.



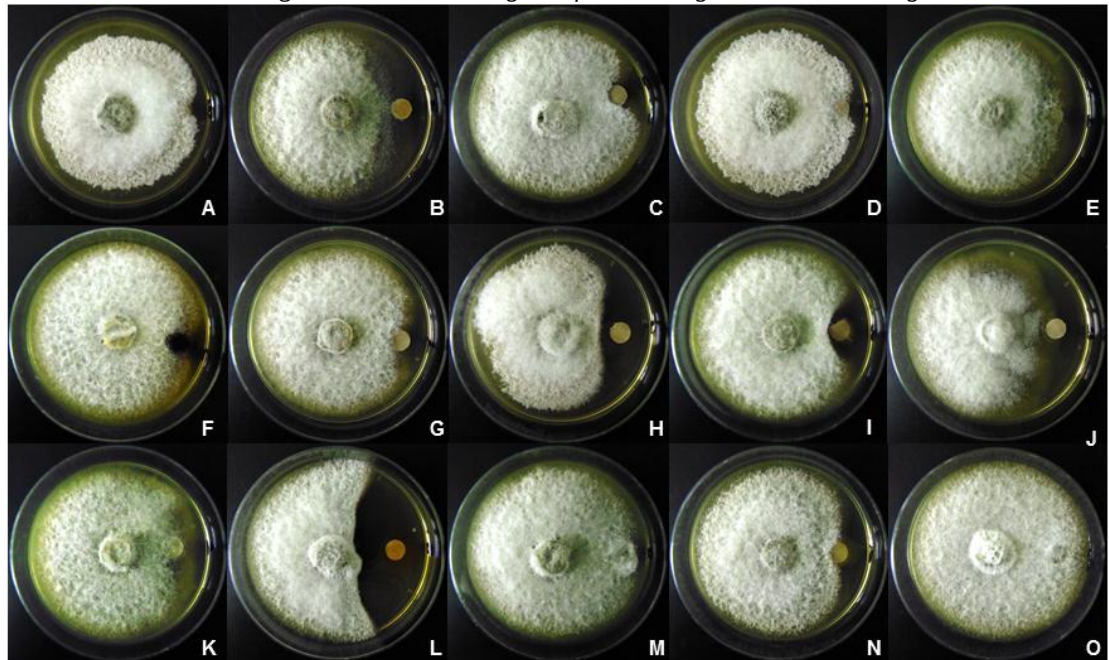
Os (*) sobre os *boxplots* indicam diferença não significativa em relação ao controle (Anova, $p > 0,05$). O tratamento am222 apresentou resultado no primeiro bioensaio, no entanto, não apresentou atividade quando submetido ao novo bioensaio em triplicata.

Figura 3. Área de crescimento do fitopatógeno *Phomopsis sojae* exposto às frações acetato dos endófitos encontrados em *Begonia fischeri*, *Begonia olsonie* e *Begonia venosa*.



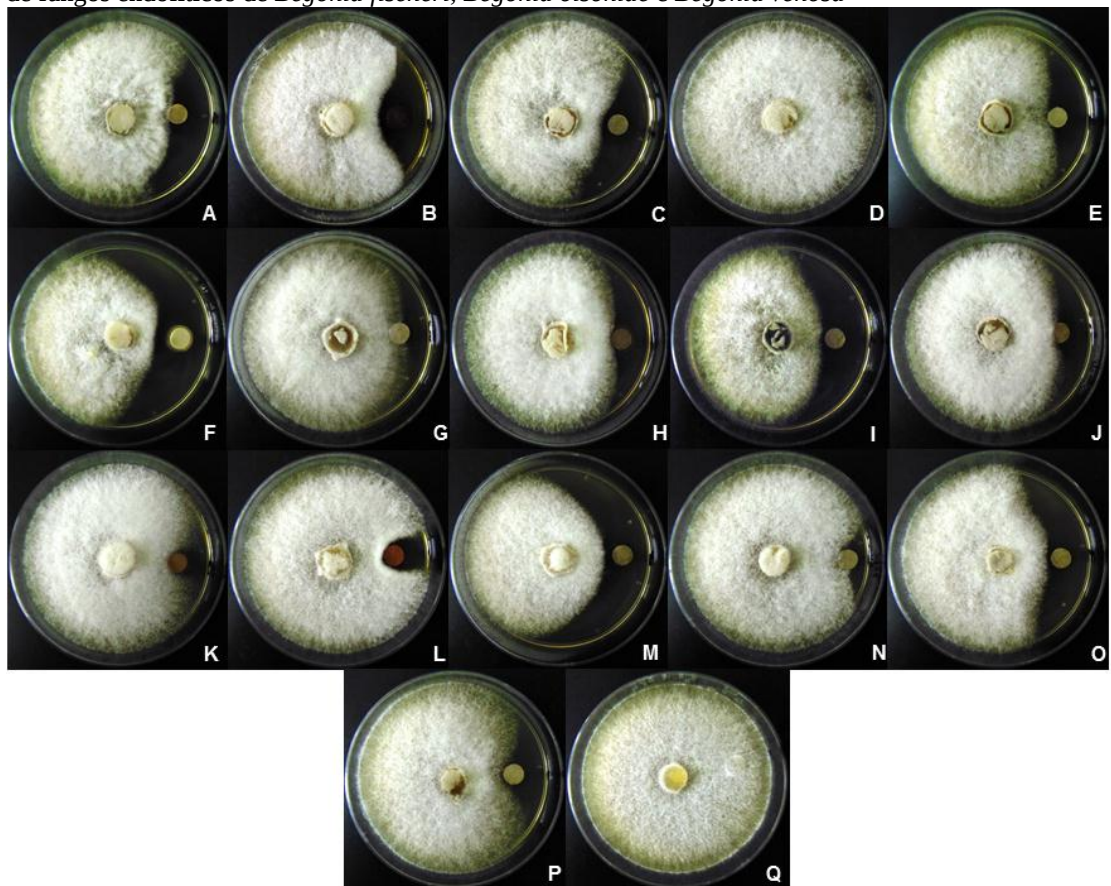
Os (*) sobre os *boxplots* indicam diferença não significativa em relação ao controle (Anova, $p > 0,05$).

Figura 4. Crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* na presença de frações acetato obtidas de cultivos de fungos endofíticos de *Begonia fischeri*, *Begonia olsoniae* e *Begonia venosa*



A: am011, B: am037, C: am058, D: am078, E: am080, F: am110, G: am114, H: am117, I: am122, J: am145, K: am166, L: am173, M: am222, N: am229, O: Controle

Figura 5. Crescimento micelial de *Phomopsis sojae* na presença de frações acetato obtidas de cultivos de fungos endofíticos de *Begonia fischeri*, *Begonia olsoniae* e *Begonia venosa*



A: am02, B: am29, C: am58, D: am78, E: am80, F: am82, G: am95, H: m111, I: am117, J: am120, K: am122, L: am173, M: am193, N: am 273, O: b 145, P: b147, Q: Controle

3.4 DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliadas as frações acetato obtidas de fungos endofíticos depositados no acervo de pesquisa da CRM-UNESP. Os fungos foram isolados de espécies de plantas do gênero *Begonia*, a saber: *B. fischeri*, *B. olsoniae* e *B. venosa*. Os bioensaios de antagonismo foram realizados frente aos fitopatógenos *P. sojae* e *C. gloeosporioides*. Os resultados obtidos mostraram que alguns desses endófitos produzem metabólitos capazes de inibir o crescimento de fitopatógenos de interesse agroeconômico.

No primeiro bioensaio 24 frações apresentaram atividade, no entanto, quando submetida ao segundo teste de antagonismo, a fração am222 não apresentou atividade. Isso sugere que o composto responsável pela inibição inicial degradou com o decorrer do tempo, uma vez, que o segundo teste foi realizado quatro a cinco meses depois do primeiro. Logo, dentre as frações avaliadas, 26% delas (23 de um total de 88) foram ativas para pelo menos um fitopatógeno. Além disso, algumas dessas frações formaram halos de inibição maiores que outros, o que sugere que diferentes metabólitos secundários ativos sejam produzidos por cada uma das linhagens de fungos, conforme observado por Higginbotham et al. (2013) também em experimentos *in vitro*.

Em relação ao bioensaio realizado frente a *C. gloeosporioides*, podemos observar que os tratamentos utilizados formaram poucos halos bem definidos (em comparação os tratamentos am173 e am117 para o mesmo fitopatógeno, por exemplo, Figura 4). No entanto, para os tratamentos am11 e am078, o crescimento micelial do fitopatógeno apresenta-se diferente do controle, além de não atingir a borda da placa. Essa observação sugere que os compostos presentes nessas frações atuem como retardadores de crescimento (fungistáticos). Já para *P. sojae*, de modo geral, os halos de inibição formados foram definidos (Figura 5). Embora os tratamentos am173 e am120 não tenham apresentado diferenças significativas em relação ao controle, pode-se observar halos bem definidos, indicando provavelmente que o composto responsável pela inibição é produzido em pouca quantidade ou não se difunde em meio de cultivo. Em ambos os casos, para afirmações mais consistentes é necessário uma busca pelos compostos responsáveis pela inibição.

Os bioensaios de antagonismo realizados frente a *P. sojae* demonstraram que as frações acetato obtidas dos endófitos *Curvularia* sp. 1, *Curvularia* sp. 2, *Diaporthe* sp. 5 e *Neopestalotiopsis* sp. inibiram fortemente esse fitopatógeno. Ao passo que *Diaporthe* sp. 1 e *Epicoccum nigrum* apresentaram maior inibição para o fitopatógeno *C. gloeosporioides*. Nesse contexto, os endófitos apresentaram certa especificidade inibitória, uma vez que, os

melhores inibidores para *P. sojae* não foram os mesmos para *C. gloeosporioides*, o que do ponto de vista do controle biológico é interessante. Baseado nesses resultados é provável que os compostos ativos desses endófitos sejam diferentes, o que mostra um potencial biotecnológico a ser explorado.

Em relação ao gênero *Neopestalotiopsis*, embora a similaridade das sequências obtidas no presente estudo aponte para espécies desse gênero, é necessário que outras regiões do genoma sejam avaliadas para confirmar a identificação, visto que muitas espécies de *Pestalotiopsis* foram transferidas para *Neopestalotiopsis*, seguido da descrição de 11 espécies novas (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Espécies do gênero *Pestalotiopsis* são consideradas excelentes produtores de metabólitos secundários, pois cerca de 160 metabólitos secundários com atividade antitumoral, antifúngica e antimicrobiana foram descobertos entre os anos de 2010 e 2013 provenientes desse gênero (XU et al., 2014).

O gênero *Diaporthe* é encontrado comumente como endófito em várias plantas (GOMES et al., 2013). Muitos trabalhos reportaram a atividade antagonista de espécies desse gênero frente a vários micro-organismos patogênicos. Dettrakul et al. (2003) isolaram o composto Diaporthein B, o qual inibiu o crescimento de *Mycobacterium tuberculosis*, o agente etiológico da tuberculose. Desse modo, devido *Diaporthe* ser um dos gêneros que apresenta um grande número de espécies endofíticas, esse é um grupo promissor na busca de novos compostos bioativos. Portanto, trabalhos futuros poderão explorar esse potencial nos isolados obtidos de begônias.

Neste estudo, observamos que linhagens de *Curvularia* e *Epicoccum* apresentaram atividades antagonistas ao fitopatógeno *P. sojae*. Semelhante a *Curvularia pallescens*, isolado como endófito de *Calotropis procera*, destacou-se pela inibição das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e o fungo fitopatogênico *Colletotrichum dematium* (NASCIMENTO et al., 2015). Já, *E. nigrum* foi capaz de inibir o crescimento de vários fitopatógenos da cana-de-açúcar, além de ocasionar o aumento de biomassa da raiz (FÁVARO et al., 2012). Isso sugere que tais gêneros também são promissores na busca por compostos bioativos.

O gênero *Xylaria* é comumente encontrado como sapróbio, entretanto, algumas espécies são encontradas com endófitos ou patógenos (CHEN et al., 2014). Além disso, representantes desse gênero são reconhecidos por apresentarem compostos bioativos, como o antifúngico *xyloide* isolado do endófito *Xylaria feejeensis*, encontrado em plantas da Amazônia (BARABAN et al., 2013). No presente trabalho, também observamos a atividade antagonista de *Xylaria* sp. frente aos fitopatógenos estudados, o que demonstra que esses

fungos endofíticos são uma fonte a ser explorada na busca de compostos para fungos fitopatogênicos.

Nesse contexto, embora várias espécies de fungos sejam conhecidas pela produção de metabólitos secundários, pouco se sabe sobre a interação desses compostos na associação fungo-planta e de que modo tais fungos podem atuar como agentes de defesa naturais para as plantas (FÁVARO et al., 2012). Desse modo, é de grande relevância estudos interdisciplinares, associando tanto os aspectos ecológicos envolvendo fungo-planta, quanto metabólicos para melhor compreensão, desse diverso e intrigante grupo de fungos.

Embora houve um aumento no número de estudos sobre os fungos endofíticos nos últimos anos, este grupo ainda permanece pouco explorado (CORRÊA et al., 2014). Neste trabalho destacamos a importância de estudos com hospedeiros não usuais como fonte de endófitos não explorados. Aqui, demonstramos que esses endófitos são capazes de produzir compostos que podem eventualmente atuar no controle de *C. gloeosporioides* e *P. sojae*. No entanto, é necessário exaurir os potenciais de tais endófitos, não somente avaliando quais são os compostos que estes produzem, como também, avaliar os efeitos em outros micro-organismos de interesse médico ou biotecnológico.

3.5 REFERÊNCIAS

ALY, A. H., DEBBAD, A.; PROKSCH, P. Fifty years of drug discovery from fungi. **Fungal Diversity**, v. 50, n.1, p. 3-19, 2011.

ARAÚJO, W. L. et al. Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. 1. ed. Piracicaba: CALO, 2010, p.167.

ARNOLD, A. E.; HERRE, E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, v. 95, n.3, p. 388–398, 2003.

BARABAN, E. G. et al. Xyolide, a bioactive nonenolide from an Amazonian endophytic fungus, *Xylaria feejeensis*. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 31, p. 4058–4060, 2013.

BARTHOLDY, B. A.; BERRECK, M.; HASELWANDTER, K. Hydroxamate siderophore synthesis by *Phialocephala fortinii*, a typical dark septate fungal root endophyte. **BioMetals**, v. 14, n. 1, p.33–42, 2001.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.42, p.225-226, 1939.

CHEN, J. et al. Diversity and taxonomy of endophytic xylariaceous fungi from medicinal plants of *Dendrobium* (Orchidaceae). **PLoS ONE**, v. 8, n.3, p. 1-11, 2013.

CORRÊA, R. C. G. et al. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 41, s/n, p.1467–1478, 2014.

DETTRAKUL, S. et al. Antimycobacterial pimarane diterpenes from the fungus *Diaporthe* sp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, s/n, p. 1253–1255, 2003.

EMBRAPA. **Tecnologia de Produção de Soja Região Central do Brasil 2004**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/doenca.htm>> Acesso em: 13/05/2014.

FÁVARO, L. C. L.; SEBASTIANES, F. L. S.; ARAÚJO, W. L. *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. **Plos one**, v. 7, s/n, p. 1-10, 2012.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Sciences**, v. 82, n. 6, p.596-605, 1998.

GOMES, R. R. et al. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**, v. 31, s/n, p.1–41, 2013.

HAMMER, Ø. et al. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.

HANADA et al. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. **Fungal biology**, v.114, s/n, p.901-910, 2010.

HIGGINBOTHAM, S. J. et al. Bioactivity of fungal endophytes as a function of endophyte taxonomy and the taxonomy and distribution of their host plants. **PloS One**, v. 8, n.9, p. e73192, 2013.

JOSEPH, B.; MINI PRIYA, R. Bioactive compounds from endophytes and their potential in Pharmaceutical effect: a review. **The American Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 3, s/n, p. 291- 309, 2011.

MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N. et al. *Pestalotiopsis* revisited. **Studies in mycology** v.79, p.121–186, 2014.

NAIR, D. N.; PADMAVATHY, S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. **The Scientific World Journal**, v. 2014, s/n, p. 1-11, 2014.

NASCIMENTO, T. L. et al. Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. **Fungal Ecology**, v. 14, s/n, p 79- 86, 2015.

PANDIKUMAR, P.; BABU, N. P.; IGNACIMUTHU, S. Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of *Begonia malabarica* Lam. in normal and streptocotocin induced diabetic rats. **Jornal of thnopharmacology**, v.124, s/n, p.111-115, 2009.

RAMESH, N. et al. Phytochemical and antimicrobial studies of *Begonia malabarica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 1, p.129-132, 2002.

SCHNEIDER, C.A., et al. NIH image to imageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.

STEPNIEWSKA, Z.; KUŹNIAR, A. Endophytic microorganisms – promising applications in bioremediation of greenhouse gases. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, n. 22, p.9589-9596, 2013.

SURESH, S. N.; NAGARAJAN, N. Antimicrobial activity and preliminary phytochemical analysis of *Begonia malabarica* lam. **Journal of pure and applied microbiology**, v. 3 n. 2 p. 801-803, 2009.

XU, J.; YANG, X.; LIN, Q. Chemistry and biology of *Pestalotiopsis*-derived natural products. **Fungal Diversity**, v. 66, s/n, p.37–68, 2014.

4 CONSIDERAÇÕES

- As espécies *Begonia fischeri*, *Begonia olsoniae* e *Begonia venosa* apresentaram fungos endofíticos de ocorrência comum em outras plantas. Porém, cada hospedeiro também apresenta uma comunidade singular de fungos endofíticos, os quais são representados por taxa raros.
- Esses hospedeiros são uma fonte pouco explorada do ponto de vista dos fungos endofíticos, visto que, não foi possível identificar alguns dos fungos obtidos no presente estudo, além disso, a maioria dos isolados foi identificada até gênero o que sugere que esses hospedeiros podem abrigar espécies ainda desconhecidas para a ciência. Estudos posteriores com os fungos depositados no acervo da CRM-UNESP poderão revelar se esses isolados são taxa ainda não descritos.
- As diferenças na riqueza, composição e diversidade das comunidades endofíticas presentes nas espécies de plantas avaliadas, parecem estar relacionadas com o tipo de hospedeiro. No entanto, fatores abióticos como localidade geográfica e o período de coleta também podem explicar as diferenças observadas.
- Os endófitos das plantas estudadas são agentes promissores no controle de crescimento de fitopatógenos como *Phomopsis sojae* e *Colletotrichum gloeosporioides*.

5 PERSPECTIVAS

O presente trabalho contribuiu com a criação de uma coleção de micro-organismos isolados de hospedeiros pouco estudados. Esse importante patrimônio genético está em avaliação por discentes que compõem o projeto temático FAPESP – Processo n. 13/50228-8 (Componentes da biodiversidade, e seus caracteres metabólicos, de ilhas do Brasil - uma abordagem integrada), o qual está inserido o presente trabalho. Resultados preliminares revelaram que um total de dez linhagens apresentou atividade anti-leishmania e cinco isolados estão sendo quimicamente avaliados. Estudos futuros poderão continuar a explorar o potencial dessa coleção de micro-organismos. Além disso, muitos dos endófitos recuperados das begônias incluem isolados que não foram totalmente caracterizados, portanto, estudos futuros de taxonomia e sistemática poderão revelar espécies novas contidas nessa coleção.