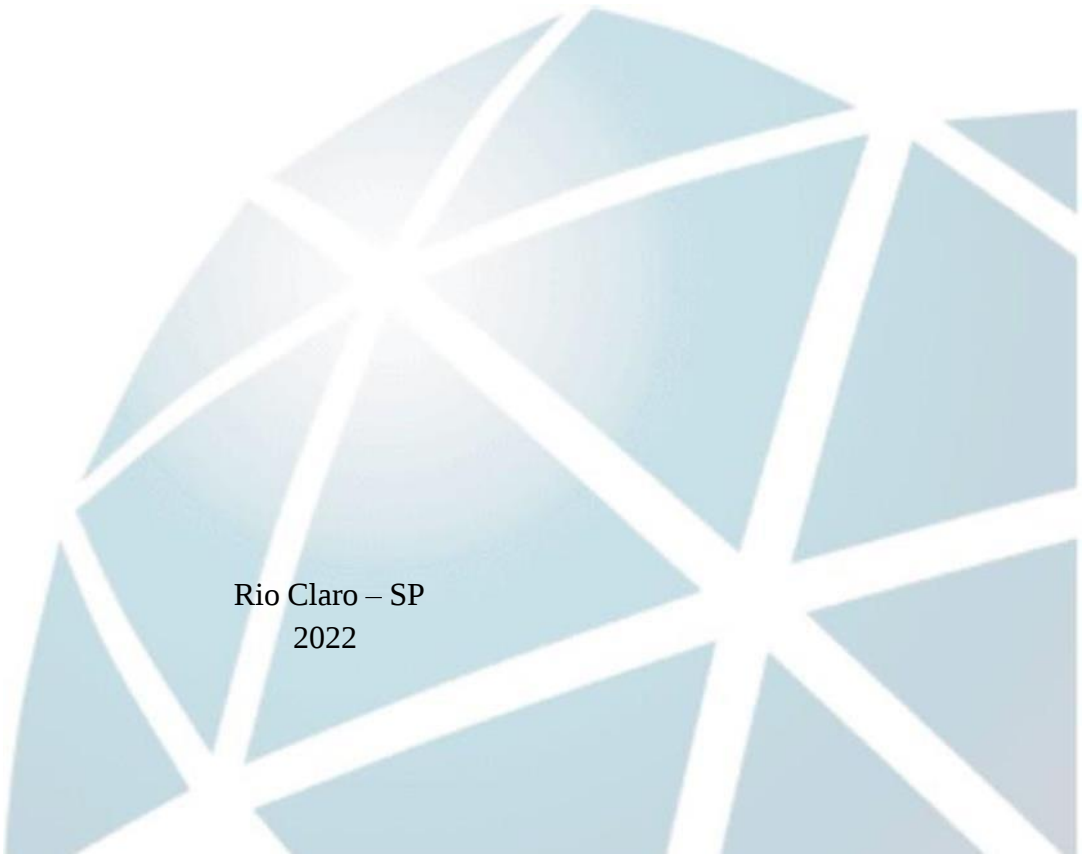

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Bianca Lariza Oliveira André

Diversidade de fungos endofíticos de *Psidium cattleianum* (Araçá)

Rio Claro – SP
2022



BIANCA LARIZA OLIVEIRA ANDRÉ

Diversidade de Fungos Endofíticos de *Psidium cattleianum* (Araçá)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Licenciada e Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Quimi Vidaurre Montoya

Supervisor: Prof. Dr. André Rodrigues

Rio Claro - SP

2022

A555d	André, Bianca Lariza Oliveira Diversidade de fungos endófitos de <i>Psidium cattleianum</i> (Araçá) / Bianca Lariza Oliveira André. -- Rio Claro, 2022 62 f. : tabs., fotos Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientador: Quimi Vidaurre Montoya 1. Fungos simbioses. 2. Myrtaceae. 3. Associação planta-fungo. 4. Morfologia de fungos. 5. Filogenia. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

BIANCA LARIZA OLIVEIRA ANDRÉ

Diversidade de Fungos Endofíticos de *Psidium cattleianum* (Araçá)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Licenciada e Bacharela em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Quimi Vidaurre Montoya (orientador)

Prof. Dr. André Rodrigues (supervisor)

Prof.^a Dr.^a Lara Durães Sette

Aprovado em: 09 de novembro de 2022

Bianca Lariza O. André

Assinatura da discente



Assinatura do orientador



Assinatura do supervisor

Dedico este trabalho aos meus pais, Everaldo Batista André e Maria Oliveira André, por sempre me incentivarem a seguir meus sonhos e me apoiarem em minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser meu amparo durante esses anos de graduação. Agradeço aos meus pais, Everaldo e Maria, por todo o amor, carinho, apoio, incentivo e conselhos que me deram durante toda minha vida. Vocês são meu porto seguro, sem vocês eu não estaria aqui e nem seria a mulher que sou hoje. Agradeço ao meu irmão, Luiz Henrique, por sempre acreditar em mim e sempre saber como me fazer rir, até nos momentos mais difíceis.

Agradeço ao professor André Rodrigues, pela oportunidade e por apoiar a ideia desse projeto. Agradeço a todo pessoal do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), por todo ensinamento, conselhos e ideias, vocês foram de grande ajuda durante todo esse percurso.

Agradeço ao meu orientador, Quimi Vidaurre Montoya, por sempre acreditar em mim e nesse projeto. Obrigada por toda a paciência que teve comigo durante esse processo. Obrigada por ter me apoiado e me escutado em momentos difíceis, sempre me incentivando a continuar quando pensava em desistir, obrigada também por todos os seus conselhos. Sou grata por tudo que me ensinou e pela amizade que construímos ao longo desse ano.

Agradeço também à Maria, por ter me auxiliado com a análise estatística deste trabalho, obrigada pela paciência ao me ensinar.

Agradeço às minhas amigas, Fernanda, Jennifer, Isabela, Larissa, Maria Clara, Rachel e Suzana da república Frô, morar com vocês durante esses anos de graduação foi uma experiência incrível, vivi momentos maravilhosos ao lado de vocês, que sempre estarão guardados no meu coração. Obrigada por todas as risadas, conversas e festas! Obrigada por terem me escutado e apoiado quando precisei, obrigada também pelos puxões de orelha necessários, sou uma pessoa melhor graças a eles.

Agradeço às minhas amigas, Ana Caroline, Daiane, Fernanda e Rafaela pelo companheirismo durante toda a graduação. Vocês tornaram minha graduação mais fácil e prazerosa, ser parte da turma de vocês foi um privilégio. Obrigada por todos os nossos momentos juntas e espero poder levar nossa amizade para a vida toda.

Agradeço também aos meus amigos e amigas, Aline, Gabriela, Gabriel, Matheus Antony, Matheus Camargo e Thainara, por todo carinho, risadas e cafés da tarde. Conhecer vocês foi um presente, levarei todos com muito carinho no meu coração.

Agradeço também aos meus amigos e amigas de Rio Claro, Alessandro Moretti, Anderson Gianezzi, Bruna Oliveira, Caio Bernardo, Caue Ferreira, Gabriel Martins, Flavia Pereira, Grazielle Lima, Hya Maciel, João Victor, João Rodrigues, Kenzo Nakamura, Victor

Albuquerque, Victor Hugo, Victor Rocha, Lucas Candiani, Matheus Airon, Plínio Oliveira e muitos outros por todos os momentos incríveis que vivemos juntos, obrigada por todas as conversas e risadas que pude compartilhar com vocês, foram momentos especiais que lembrarei sempre com muito carinho.

Agradeço aos meus amigos e amigas de Indaiatuba, Fabiane, Cristian, Eduardo, João Vitor, Vitória e Victor que sempre me apoiaram e me ajudaram em tudo que precisei. E mesmo apesar da distância, nossa amizade permaneceu forte, obrigada por isso.

Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro com a concessão da bolsa de estudo de iniciação científica (Processo 137247/2021-4), que originou este trabalho.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1. COLETA DAS AMOSTRAS	13
3.2. ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	14
3.2.1. Isolamento por filtração de partículas.....	14
3.2.2. Isolamento por diluição seriada.....	15
3.2.3. Isolamento por semeadura de fragmentos de folhas	15
3.3. PURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS	16
3.4. IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS.....	16
3.4.1. Identificação morfológica dos isolados	16
3.4.2. Identificação molecular dos isolados fúngicos.....	17
3.4.2.1. Extração de DNA.....	17
3.4.2.2. Reação de PCR e sequenciamento da região barcode ITS.....	17
3.4.2.3. Análise filogenética	18
3.5. ANÁLISE DAS COMUNIDADES DE FUNGOS ENDOFÍTICOS	18
4. RESULTADOS.....	19
4.1. ISOLAMENTO DOS FUNGOS.....	19
4.2. TRIAGEM DOS ISOLADOS POR MORFOTIPOS	19
4.3. ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	19
4.4. ANÁLISE DAS COMUNIDADES DE FUNGOS ENDOFÍTICOS	27
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	34
APÊNDICES	40

RESUMO

Os fungos endofíticos são um grupo diverso de microrganismos que vivem no interior dos tecidos das plantas e apresentam importância ecológica para desenvolvimento do seu hospedeiro. *Psidium cattleianum* (Myrtales: Myrtaceae: “Araçá”) é uma espécie nativa do Brasil que apresenta um potencial econômico devido ao uso dos seus frutos, madeira e óleos essenciais. Apesar dessa importância, a diversidade de fungos endofíticos associada *P. cattleianum* é ainda desconhecida. Neste estudo, acessamos a diversidade de fungos endofíticos de folhas de *P. cattleianum*, utilizando métodos de isolamento dependentes de cultivo, análise de caracteres macroscópicos dos isolados, bem como análises filogenéticas utilizando o marcador *barcode* ITS. Um total de 396 isolados pertencentes a 26 grupos de fungos foi obtido, i.e., *Alternaria*, *Amycosphaerella*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Coprinellus*, *Corioloropsis*, *Diaporthe*, *Induratia*, *Muyocoprom*, *Myrmecridium*, *Neofusicoccum*, *Pantospora*, *Paracamarosporium*, *Parapallidocercospora*, *Paraphaeosphaeria*, *Penicillium*, *Perenniporia*, *Phaeophleospora*, *Phomopsis*, *Phyllocista*, *Pseudofusicoccum*, *Talaromyces*, *Xylaria*, *Sordariomycetes* e *Xylariomycetes*. Os nossos resultados mostram uma grande diversidade de fungos associados às folhas de *P. cattleianum*, contudo, as análises sugerem que existe uma diversidade de fungos ainda maior nesta planta. Por outro lado, embora *P. cattleianum* esteja associada a fungos endofíticos semelhantes ao dos seus clados irmãos, esta planta apresenta uma comunidade fúngica própria, uma vez que existem alguns gêneros de fungos, assim como sete possíveis espécies novas, isoladas neste trabalho, que ainda não foram reportados em associação com o gênero *Psidium*. Este estudo preenche uma lacuna do conhecimento, sobre a diversidade de fungos endofíticos associados a *P. cattleianum*, que ajudará á futuros pesquisadores a compreender a diversidade de fungos endófitos associados ao gênero *Psidium*.

Palavras chave: Fungos simbioses. Myrtaceae. Associação planta-fungo. Morfologia de fungos. Filogenia.

ABSTRACT

Endophytic fungi are a diverse group of microorganisms that live inside plant tissues and are ecologically important because they can influence host development. *Psidium cattleianum* (Myrtales: Myrtaceae: “Araçá”) is a plant species native from Brazil that presents an economic potential due to the use of its fruits, wood, and essential oils. Despite this importance, the diversity of endophytic fungi associated with *P. cattleianum* is still unknown. Here we assessed the diversity of endophytic fungi in leaves of *P. cattleianum* using culture-dependent isolation methods, macroscopic character analysis, as well as phylogenetic analysis using the barcode ITS. A total of 396 isolates belonging to 26 groups of fungi were obtained, i.e., *Alternaria*, *Amycosphaerella*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Coprinellus*, *Corioloropsis*, *Diaporthe*, *Induratia*, *Muyocoprom*, *Myrmecridium*, *Neofusicoccum*, *Pantospora*, *Paracamarosporium*, *Parapallidocercospora*, *Paraphaeosphaeria*, *Penicillium*, *Perenniporia*, *Phaeophleospora*, *Phomopsis*, *Phyllocista*, *Pseudofusicoccum*, *Talaromyces*, *Xylaria*, *Sordariomycetes* and *Xylariomycetes*. Our results showed a great diversity of fungi associated with the leaves of *P. cattleianum*, yet the analyzes suggest that there is an even greater diversity of fungi associated with this plant. On the other hand, although *P. cattleianum* is associated with endophytic fungi similar to its sister clades, this plant has its own fungal community, since there are some fungal genera as well as seven possible new species, isolated in this work, which have not yet been reported in association with *Psidium*. This study fills a gap about the diversity of endophytic fungi associated with *P. cattleianum*, which will help future researchers to understand the diversity of endophytic fungi associated with the genus *Psidium*.

Keywords: Symbiotic fungi. Myrtaceae. Plant-fungus association. Fungal morphology. Phylogeny.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos abrigam uma grande diversidade de fungos de diferente clados filogenéticos e de importância ecológica (GUPTA et al., 2020). Estes microrganismos vivem no interior dos tecidos de todas as plantas terrestres (ARNOLD, 2007; ZHENG, 2012), sem produzirem infecções aparentes (CORREIA et al., 2017), como no caso das plantas da família Myrtaceae (PÉREZ et al., 2010). Os fungos endofíticos são transmitidos horizontalmente ou verticalmente pelas plantas (YANG; DAI, 2012, SHAH et al., 2018) e podem apresentar papéis importantes no desenvolvimento delas, contribuindo com o alongamento de caules e raízes (CHECCUCCI et al., 2017), o aumento do potencial de solubilização de nutrientes e na produção de óleos essenciais e micotoxinas, que evitam a infecção por outros fungos e bactérias (ESPINOSA-GARCIA; SALDIVAR-GARCIA; LANGENHEIM, 1991; SAIKKONEN; SAARI; HELANDER, 2010; SHAH et al., 2018). Além disso, estes fungos podem aumentar a tolerância do hospedeiro contra a seca, alta salinidade do solo e fitopatógenos (SAIKKONEN; SAARI; HELANDER, 2010; WAQAS et al., 2012; YAN et al., 2018) e estão presentes nas fases iniciais de senescência e decomposição em plantas hospedeiras (LACERDA; GUSMÃO; RODRIGUES, 2019).

A família Myrtaceae compreende 144 gêneros de plantas distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da América, Ásia e Austrália (SILVA; MAZINE, 2016). Este grupo de plantas apresenta uma grande importância devido ao seu potencial na indústria alimentar, medicinal, na ornamentação e a sua ecologia (MORAIS; CONCEIÇÃO; NASCIMENTO, 2014). Estudos mostraram uma grande diversidade de fungos endofíticos associados a família Myrtaceae (LACERDA; GUSMÃO; RODRIGUES, 2019; MARSBERG et al., 2014; PÉREZ et al., 2010; VAZ et al., 2014), contudo fungos endofíticos associados a alguns gêneros de plantas desta família, i.e., *Leptospermum*, *Feijoa* e *Psidium*, ainda foram pouco estudados.

O gênero *Psidium* é nativo da América tropical e subtropical, compreendendo cerca de 100 espécies de árvores e arbustos produtores de frutos comestíveis, além de madeira (LEDERMAN; SILVA-JUNIOR; FRANZON; SOUSA-SILVA; CAMPOS; PROENÇA, 2016). Essas plantas também são utilizadas na ornamentação de jardins e parques, sendo *Psidium guajava* (Goiabeira) a espécie mais conhecida e economicamente mais importante (LEDERMAN; SILVA-JUNIOR; FRANZON; SOUSA-SILVA; CAMPOS; PROENÇA, 2016). Uma grande diversidade de fungos endofíticos está associada com a goiabeira (TCHAMGOUE et al., 2020; GARBA et al., 2021; UJAM et al., 2021). O estudo desses grupos

de fungos é de importância, devidos as suas características para o uso no controle biológico de doenças e à produção de metabólitos secundários com propriedades antioxidantes, imunossupressoras e antimicrobianas (TCHAMGOUE et al., 2020).

Psidium cattleianum (Myrtales: Myrtaceae), popularmente conhecido como Araçá, é filogeneticamente próximo de *P. guajava* e é uma espécie nativa da Mata Atlântica distribuída desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul (LEDERMAN; SILVA-JUNIOR; FRANZON; SOUSA-SILVA; CAMPOS; PROENÇA, 2016). Esta planta possui frutos semelhantes aos da sua espécie irmã, *P. guajava*, mas com polpa branca, gosto azedo, ricos em vitamina C, minerais, ácidos graxos, compostos fenólicos e carotenoides (LIMA et al., 2020). Além disso, o Araçá apresenta fitoquímicos com diferentes funções biológicas, como antimicrobianas e antioxidantes (LIMA et al., 2020; ROCHA et al, 2020; SCUR et al., 2016). As plantas do Araçá também são usadas para produção de lenha e carvão, bem como as folhas para extração de óleos essenciais (SECRETARIA DE INFRAESTRUTURA E MEIO AMBIENTE, 2016). Apesar do potencial econômico de *P. cattleianum*, pouco se sabe sobre a diversidade dos fungos endofíticos associados (Figura 1).

Neste estudo avaliamos a diversidade de fungos endofíticos presentes nas folhas de *P. cattleianum* e os nossos resultados revelaram uma alta diversidade desses microrganismos. Embora *P. cattleianum* apresente gêneros de fungos endofíticos semelhantes aos da espécie irmã (41,66%), *P. guajava*, os nossos resultados mostram que esta planta apresenta grupos de fungos endofíticos encontrados em clados filogeneticamente distantes de *P. cattleianum*. Além disso, os nossos resultados sugerem a existência de espécies filogenéticas novas de fungos associadas as folhas do Araçá. Este trabalho preenche uma importante lacuna do conhecimento da diversidade de fungos endofíticos associados a *P. cattleianum*. Estudos futuros ajudarão a entender melhor a diversidade de endófitos de *P. cattleianum*, assim como corroborarão se os clados de fungos filogeneticamente distintos correspondem a espécies novas para a ciência. Além disso, estudos futuros poderão investigar o potencial desses fungos para o uso como biocontroladores ou na produção de novos compostos para indústria.

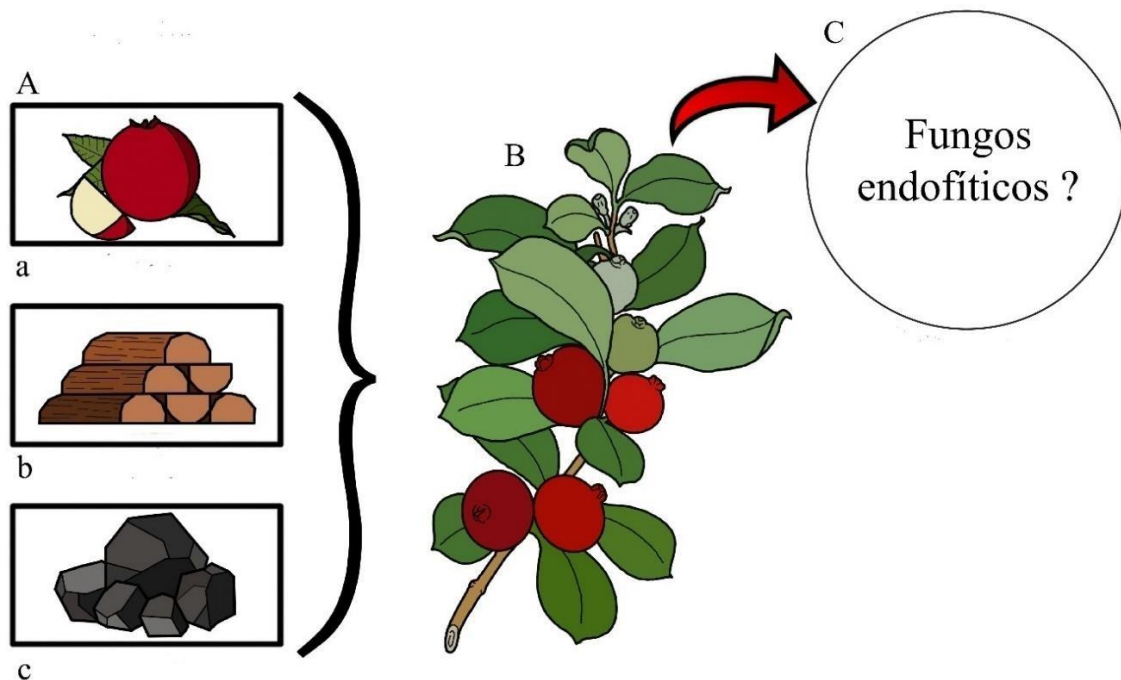


Figura 1. Características de *Psidium cattleianum* (Araçá): A) potencial econômico. a) fruto, b) lenha, e c) carvão. B) folhas e frutos de *P. cattleianum*. C) falta de conhecimentos da diversidade de fungos endofíticos associados a planta.

2. OBJETIVO

Descrever a diversidade de fungos endofíticos presentes nas folhas de *P. cattleianum*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletadas 50 folhas sadias de duas plantas de *P. cattleianum* (25 folhas de cada planta) com auxílio de um podão. As plantas estão localizadas no município de Rio Claro, São Paulo, no Câmpus da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP (22° 23' 47.9"S 47° 32' 38.9"W, planta 1) e no Parque Lago Azul (22° 23' 29.6"S 47° 33' 54.0"W, planta 2 – Figura 2). Após a coleta, as folhas foram dispostas em sacos plásticos esterilizados, identificados e transportados para o laboratório. Em seguida, as folhas foram lavadas em água corrente durante 5 min, para remoção de detritos após iniciar o processo de isolamento.

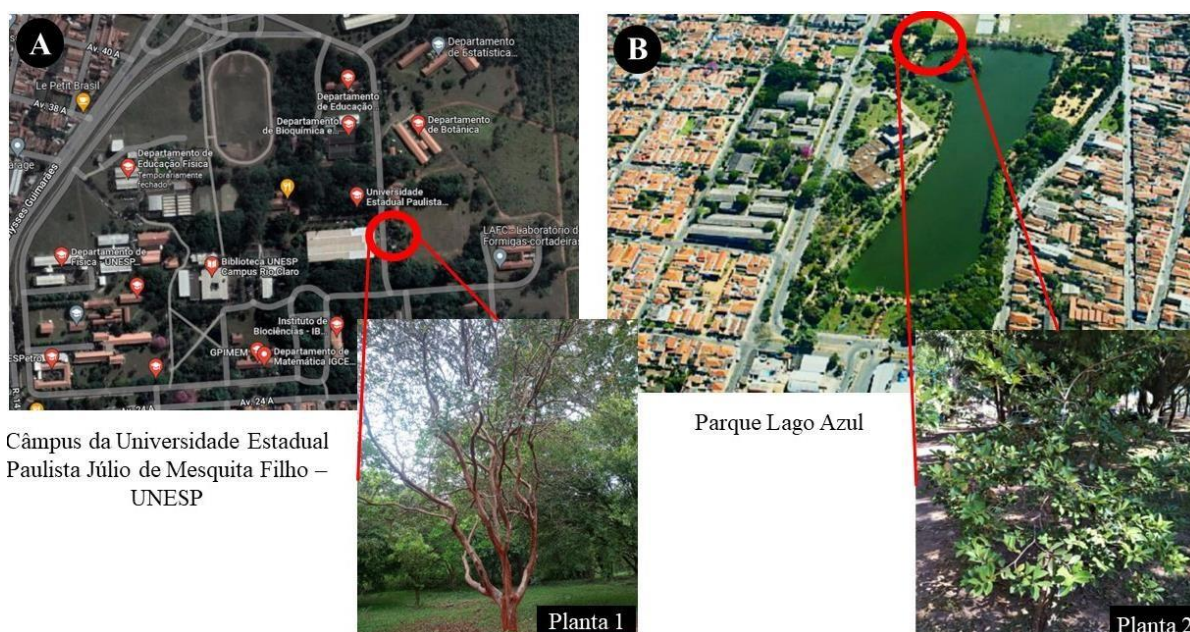


Figura 2. Localização geográfica das plantas coletadas: A) Planta 1, localizada no Campus da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP (22° 23' 47.9"S 47° 32' 38.9"W). B) Planta 2, localizada no Parque Lago Azul (22° 23' 29.6"S 47° 33' 54.0"W).

3.2. ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Três métodos foram utilizados para o isolamento dos fungos: i) filtração por partículas, ii) semeadura de fragmento e iii) diluição seriada. Além disso, foram utilizados cinco meios de cultivo para cada método [Ágar Nutriente Sintético (SNA – 0,2 g de KH_2PO_4 , 0,2 g de KNO_3 , 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de KCl, 0,04 g de glicose, 0,04 g de sacarose e 3g de ágar), Ágar Dicloran Rosa Bengala, sem Dicloran (DRB – 1 g de peptona, 2 g de glicose, 0,2 de KH_2PO_4 , 0,1 g de MgSO_4 , 0,25 g de Rosa Bengala e 3 g de ágar), Ágar Malte 2% (MA 2% - 4 g de extrato de malte, 4 g de dextrose e 3 g de ágar), Ágar Batata Dextrose (BDA – 40 g de infusão de batata, 4 g de glicose e 3,4 g de ágar) e Ágar Batata-Cenoura (BCA – 40 g de infusão de cenoura, 50 g de infusão de batata e 3 g de ágar)].

3.2.1. Isolamento por filtração de partículas

Primeiramente, a superfície foliar foi desinfetada para remoção dos microrganismos externos. Assim, as folhas foram imersas durante 1 min em 2% de NaOCl, em seguida 30 s em etanol (70%). Após este processo, as folhas foram lavadas três vezes (cada lavagem com duração de 1 min) com água destilada esterilizada (CROUS; KENDRICK; ALFENAS; 1997; LACERDA; GUSMÃO; RODRIGUES, 2018). Para verificar a ausência de fungos epífitos

(controle), 100 μL da água de lavagem foi espalhada em placas contendo o meio de cultivo BDA. Em seguida, duas gramas de folhas foram trituradas em 50 mL de água destilada esterilizada com ajuda de um liquidificador. Os fragmentos maiores de folhas foram filtrados através de um conjunto de quatro peneiras com malhas de aberturas decrescentes (1,0, 0,7, 0,25 e 0,18 mm). As partículas retidas na malha com menor abertura foram dispostas em tubos com água destilada esterilizada, agitadas por 1 min e permaneceram em repouso durante 10 min. O sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 50 mL de água destilada esterilizada. Esse último processo foi repetido quatro vezes e, na lavagem final, os fragmentos foram ressuspensos em 20 mL de água destilada estéril nos tubos e agitados por 1 min. Alíquotas de 100 μL dessa suspensão foram espalhadas nos meios de cultivo SNA, DRB, MA 2%, BDA e BCA com ajuda de uma alça de Drigalski. Todos os meios foram suplementados com 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ cloranfenicol para evitar a contaminação por bactérias. Todas as placas inoculadas foram incubadas a 25 °C, no escuro, durante sete dias, sendo observadas diariamente para o isolamento das colônias fúngicas. Finalmente, as colônias que cresceram nas placas foram transferidas para uma nova placa contendo meio BDA sem cloranfenicol.

3.2.2. Isolamento por diluição seriada

Duas gramas de folhas foram trituradas no liquidificador em 50 mL de água destilada esterilizada, durante 1 min. Em seguida, diluições seriadas até 10^{-5} do conteúdo foram efetuadas em tubos de microcentrífuga de 2 mL estéreis. Alíquotas de 100 μL das diluições 10^{-3} e 10^{-5} foram espalhadas nas placas contendo os meios SNA, DRB, MA2%, BDA e BCA (com cloranfenicol), com o auxílio da alça de Drigalski. Após esse processo, as placas foram incubadas a 25 °C, no escuro durante sete dias e observadas diariamente para o isolamento das colônias fúngicas. As colônias que cresceram foram transferidas para novas placas contendo BDA sem cloranfenicol.

3.2.3. Isolamento por semeadura de fragmentos de folhas

Para este método, folhas previamente desinfetadas foram secas em papel estéril e cortadas em pequenas secções de 5 a 10 mm^2 (AGRIOS, 2004). Esse material foi inoculado nos meios de cultivo SNA, DRB, MA2%, BDA e BCA (com cloranfenicol). Cada placa foi inoculada com cinco fragmentos de folha equidistantes. Finalmente, as placas foram incubadas a 25 °C, no escuro, durante sete dias e observadas diariamente, afim de ver o crescimento dos

fungos. Quando as colônias fúngicas iniciaram o crescimento, estas foram transferidas para placas novas contendo meio BDA sem cloranfenicol.

3.3. PURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Os isolados obtidos foram purificados pelo método de diluição seriada de conídios (quando o fungo os produziu) e de hifas (no caso de fungo que não apresentaram conídios). Assim, os conídios ou fragmentos de micélio de cada isolado foram suspensos em água destilada esterilizada. Tais diluições foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 2 mL esterilizados, até atingir diluições de 10^{-5} . Em seguida, alíquotas de 100 μ L das diluições 10^{-3} e 10^{-5} foram espalhadas na superfície da placa contendo meio de cultivo BDA, sem cloranfenicol. As placas de espalhamento foram incubadas a 25 °C, no escuro, durante sete dias. Colônias fúngicas isoladas foram transferidas para uma nova placa com BDA e incubados no escuro, a 25 °C, durante sete dias. Após o crescimento das colônias axênicas, estas foram transferidas para novas placas contendo BDA para extração de DNA e avaliação dos caracteres morfológicos.

3.4. IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

Para a identificação dos fungos isolados utilizamos uma abordagem combinando análises morfológicas e filogenéticas.

3.4.1. Identificação morfológica dos isolados

As culturas puras dos fungos foram primeiramente triadas com base na observação das características macroscópicas e microscópicas (separação em morfotipos). Os caracteres macroscópicos das colônias de todos os morfotipos foram observados no meio BDA. As características macroscópicas analisadas foram: pigmentação, superfície, textura, velocidade de crescimento, aspecto e diâmetro da colônia.

3.4.2. Identificação molecular dos isolados fúngicos

3.4.2.1. Extração de DNA

O DNA de colônias axênicas foi extraído utilizando o método CTAB descrito por Möller et al. (1992). Para isso, o micélio fúngico foi triturado com auxílio de esferas de vidro (Sigma, diâmetro de 500 – 600 μm) em 600 μL de tampão de lise. Após, foi adicionado 10 μL de proteinase K (20 mg/mL^{-1}) nas amostras e estas foram incubadas a 65 °C, durante 30 min. A fase orgânica foi separada adicionando 600 μL de solução de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) com centrifugação das amostras. O DNA genômico foi coletado do sobrenadante, e purificado mediante duas lavagens sucessivas com etanol 70%. Finalmente, o DNA foi suspenso em 30 μL de tampão TE (Tris 10mM e EDTA 1 mM) e estocado a -20 °C.

3.4.2.2. Reação de PCR e sequenciamento da região barcode ITS

O marcador molecular *barcode* para fungos *internal transcribed spacer* (ITS – SCHÖCH et al., 2012) foi amplificado utilizando os *primers* ITS4 e ITS5 (WHITE et al., 1990). A amplificação da região ITS foi realizada em um volume final de 25 μL (4 μL de dNTPs [1,25 mM cada]; 5 μL de tampão 5 $\times$; 1 μL de albumina sérica bovina (BSA) [1 mg mL^{-1}]; 2 μL de MgCl_2 [25 mM]; 1 μL de cada *primer* [10 μM]; 0,5 μL de Taq polimerase [5 U μL^{-1}], 2 μL de DNA genômico diluído [1:10] e 8,5 μL de água ultrapura estéril). As condições de amplificação de PCR foram: 94 °C/3 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C/1 min, 55 °C/1 min, 72 °C/ 2 min, 10 °C/ ∞ . Em seguida, os produtos de PCR foram purificados com o kit *Wizard SV Gel e PCR Clean-up System* (Promega, Madison), seguindo o protocolo do fabricante.

A reação de sequenciamento foi realizada pelo método de Sanger no sequenciador ABI3500 (Life Technologies) em um volume final de 10 μL (0,5 μL de BigDye v 3.1; 2 μL de Buffer 5x; 0,32 μL de *primer* [10 μM]; 1 μL de DNA [10-20 ng/ μL]; 6,18 μL de água ultrapura esterilizada). As condições para o sequenciamento foram: 95 °C/1 min seguido de 28 ciclos a 95 °C/15 s, 50 °C/45 s, 60 °C/4 min, 10 °C/ ∞ . As sequências *forward* e *reverse* foram combinadas em sequências *contigs* no *software* Bio Edit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999).

3.4.2.3. Análise filogenética

Os *contigs* foram comparados com sequências homólogas disponíveis no NCBI-GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Sequências com maior identidade com as nossas foram recuperadas e alinhadas utilizando o *software* MAFFT v. 7 (KATO, STANDLEY, 2013). As regiões de íntrons foram editadas no programa GBLOCKS (CASTRESANA, 2000). Árvores filogenéticas preliminares foram inferidas para cada grupo de fungos usando o método *neighbor-joining* com modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros no MEGA v.7.1 (KIMURA, 1980). A robustez das árvores foi calculada pelo método de *bootstrap*, com 1000 pseudorréplicas. As árvores finais foram reconstruídas utilizando inferência Bayesiana (BI), no MrBayes v.3.2.2 (RONQUIST et al., 2012), utilizando o modelo GTR para todos os alinhamentos. O modelo matemático foi calculado no jModelTest 2 (DARRIBA et al., 2012), utilizando AIC (Critério de Informação Akaike) com 95% de confiabilidade. As análises de BI foram inferidas usando 2.000.000 de gerações com o qual se atingiu a convergência (desvio padrão abaixo de 0,01) em todas as árvores. Para a reconstrução da melhor árvore, 25% das árvores iniciais geradas foram descartadas mediante *burn-in*. As árvores finais foram editadas no FigTree v.1.4 e Adobe Illustrator CC v. 17. 1.

3.5. ANÁLISE DAS COMUNIDADES DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

A caracterização e comparação das comunidades de fungos encontradas em cada planta foram realizadas no *software* R v. 3. 4. (R Development Core Team, 2013). A caracterização foi realizada considerando as plantas das quais os fungos foram isolados, os meios de cultivo, e os métodos de isolamento. Assim, foram geradas curvas de rarefação referentes à riqueza de espécies observadas para cada uma das plantas, bem como para calcular o número estimado de espécies (estimador de Chao-1). As análises de diversidade alfa das comunidades foram realizadas utilizando índices de riqueza e de diversidade (Shannon, Simpson e Pielou). A comparação entre as comunidades encontradas foi realizada utilizando os índices de diversidade beta (Bray-Curtis e Jaccard). Finalmente, as comunidades fúngicas considerando tanto o método de isolamento, quanto o meio de cultura utilizado em ambas as coletas, foram comparadas mediante escalonamento multidimensional e dendrograma (utilizando a distância euclidiana).

4. RESULTADOS

4.1. ISOLAMENTO DOS FUNGOS

Um total de 396 isolados fúngicos foi obtido, sendo 141 provenientes da planta 1 e 255 da planta 2. Tendo em consideração os métodos de isolamento, 371 isolados foram obtidos utilizando o método de semeadura de fragmentos (93,68% do total), 24 foram obtidos mediante a filtração por partículas (6,06%) e 1 isolado obtido com o método de diluição seriada (0,25%). Devido à baixa taxa de crescimento de fungos no último método, este foi usado somente na (Planta 1). Todos os meios de cultivo proporcionaram um número semelhante de isolados de fungos (Apêndice A).

4.2. TRIAGEM DOS ISOLADOS POR MORFOTIPOS

Os isolados fúngicos foram inicialmente separados em 86 morfotipos (numerados de 1 a 86) com base nos caracteres macroscópicos das colônias. Os morfotipos que tiveram maiores quantidades de isolados fúngicos foram os morfotipos 1 (n= 208), 2 (n= 22), 3 (n= 26), 4 (n= 15), 5 (n= 6), 9 (n= 9) e 80 (n= 7). Os demais morfotipos apresentaram entre um e dois isolados cada (Apêndice B).

4.3. ANÁLISE FILOGENÉTICA

A análise filogenética evidenciou que os 396 isolados pertencem a 26 gêneros de fungos (Figuras 3-9 e Apêndices C-V) a saber: *Alternaria* (n= 2 - Apêndice C), *Amycosphaerella* (n= 1 - Apêndice D), *Aspergillus* (n= 1 - Apêndice E), *Cladosporium* (n= 2 - Figura 5), *Colletotrichum* (n= 80 - Apêndice F), *Coprinellus* (n= 1 - Apêndice G), *Coriolopsis* (n= 1 - Apêndice H), *Diaporthe* (n= 9 - Apêndice I), *Induratia* (n= 1 - Apêndice J), *Muyocoprom* (n= 2 - Apêndice K), *Myrmecridium* (n= 1 - Apêndice L), *Neofusicoccum* (n= 20 - Apêndice M), *Pantospora* (n= 2 - Apêndice N), *Paracamarosporium* (n= 2 - Apêndice O), *Parapallidocercospora* (n= 208 - Apêndice P), *Paraphaeosphaeria*. (n= 1 - Apêndice Q), *Penicillium* (n= 6 - Figura 6), *Perenniporia* (n= 2 - Figura 7), *Phaeophleospora* (n= 1 isolado - Figura 8), *Phomopsis* (n= 2 - Apêndice R) *Phyllocista* (n= 31 - Apêndice S), *Pseudofusicoccum* (n= 1 - Apêndice T), *Talaromyces* (n = 1 - Apêndice U), *Xylaria* (n= 3 - Apêndice V). Além

disso, dois isolados foram agrupados em clados de *Sordariomycetes* (n = 1 - Figura 9) e *Xylariomycetes* (n= 1 - Figura 10), próximos de *Phomatospora* BLA431 e *Leptosillia/Asteromella* BLA125, respectivamente.

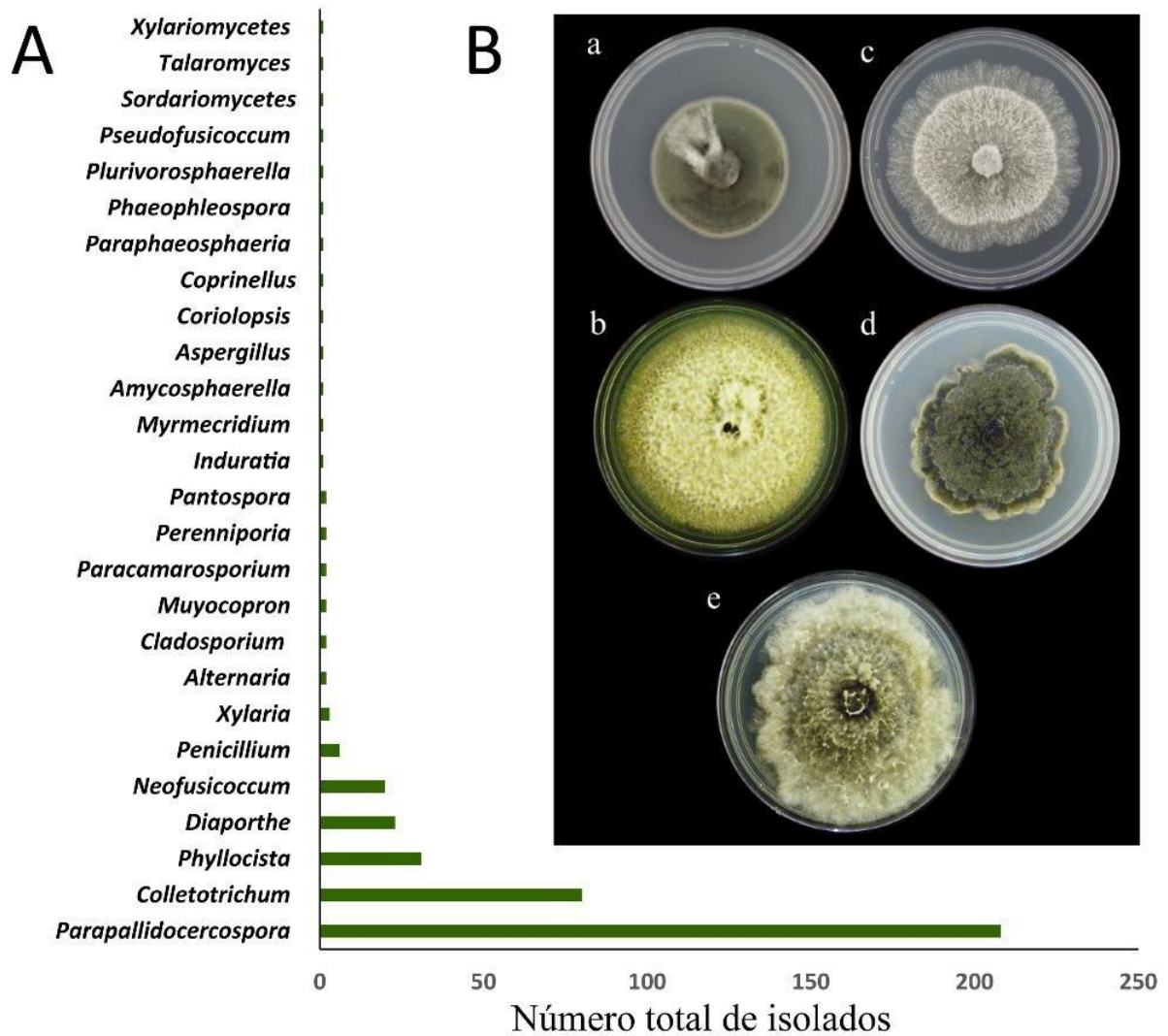


Figura 3. Fungos endofíticos isolados de folhas de *Psidium cattleianum*. A. Grupo de fungos ordenados segundo a abundância (número total de isolados obtidos). B. Culturas dos grupos mais abundantes: a) *Parapallidocercospora*, b) *Colletotrichum*, c) *Diaporthe*, d) *Phyllocista* e e) *Neofusicoccum*.

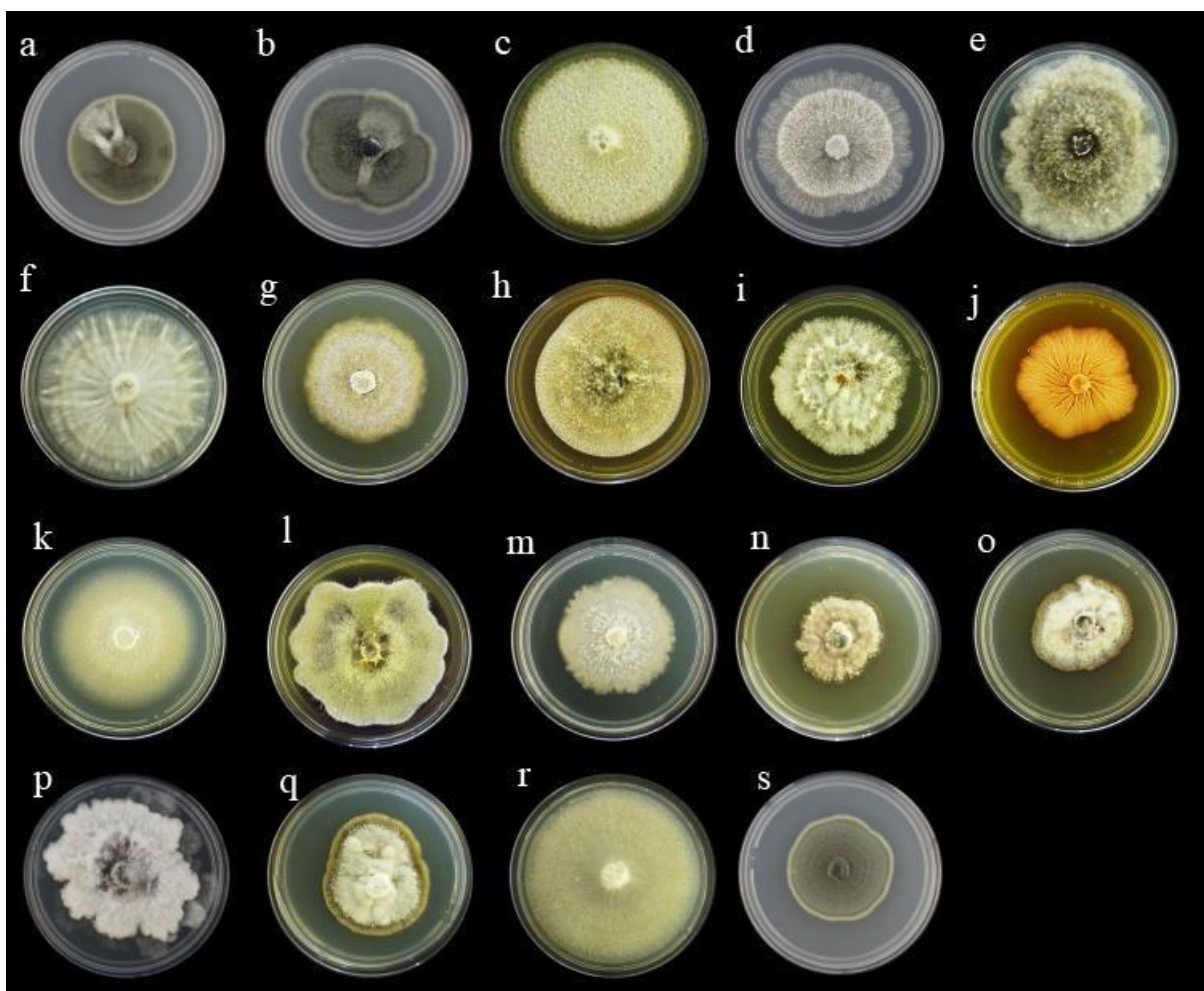


Figura 4. Colônias dos gêneros de fungos isolados de *Psidium cattleianum*. a) *Parapallidocercospora*, b) *Phyllocista*, c) *Colletotrichum*, d) *Diaporthe*, e) *Neofusicoccum*, f) *Xylaria*, g) *Muyocopron*, h) *Paracamarosporium*, i) *Induratia*, j) *Myrmecridium*, k) *Corioloipsis*, l) *Coprinellus*, m) *Sordariomycetes*, n) *Phaeophleospora*, o) *Amycosphaerella*, p) *Pseudofusicoccum*, q) *Pantospora*, r) *Perenniporia* e s) *Cladosporium*.

Um total de 56 morfotipos, inicialmente separados como sendo gêneros diferentes, foi agrupado nos gêneros *Phyllocista* (morfotipos 8, 79, 82 e 83), *Colletotrichum* (morfotipos 5, 7, 9, 10, 11, 14, 19, 24, 25, 34, 35, 36, 37, 40, 42, 43, 44, 45, 48, 51, 52, 53, 59, 70, 72 e 84), *Diaporthe* (morfotipos 12, 18, 20, 41, 54, 57 e 71.), *Neofusicoccum* (morfotipos 74, 75, 76, 77, 78, 80 e 81), *Xylaria* (morfotipos 31 e 61), *Muyocopron* (morfotipos 15 e 26), *Paracamosporium* (morfotipos 16 e 55), *Penicillium* (morfotipos 39, 63 e 69), *Alternaria* (morfotipo 56), *Pantospora* (morfotipo 71) e *Perenniporia* (morfotipo 67).

A maioria dos fungos isolados foi identificada em gêneros previamente descritos em outros estudos, a saber: *Alternaria* (Apêndice C), *Amycosphaerella* (Apêndice D), *Aspergillus* (Apêndice E), *Cladosporium* (Figura 5), *Colletotrichum* (Apêndice F), *Diaporthe* (Apêndice I), *Neofusicoccum* (Apêndice M), *Pantospora* (Apêndice N), *Parapallidocercospora* (Apêndice O), *Penicillium* (Figura 6), *Phaeophleospora* (Figura 8), *Phyllocista* (Apêndice S),

Pseudofusicoccum (Apêndice T), *Talaromyces* (Apêndice U) e *Xylaria* (Apêndice V). Por outro lado, os isolados BLA82, BLA85, BLA132, BLA 193, BLA199, BLA321, BLA385, BLA336 e BLA413 formaram clados separados nos gêneros *Cladosporium* (Figura 5), *Penicillium* (Figura 6), *Perenniporia* (Figura 7), *Phaeophleospora* (Figura 8), *Sordariomycetes* e *Xylariomycetes* (Figura 9).

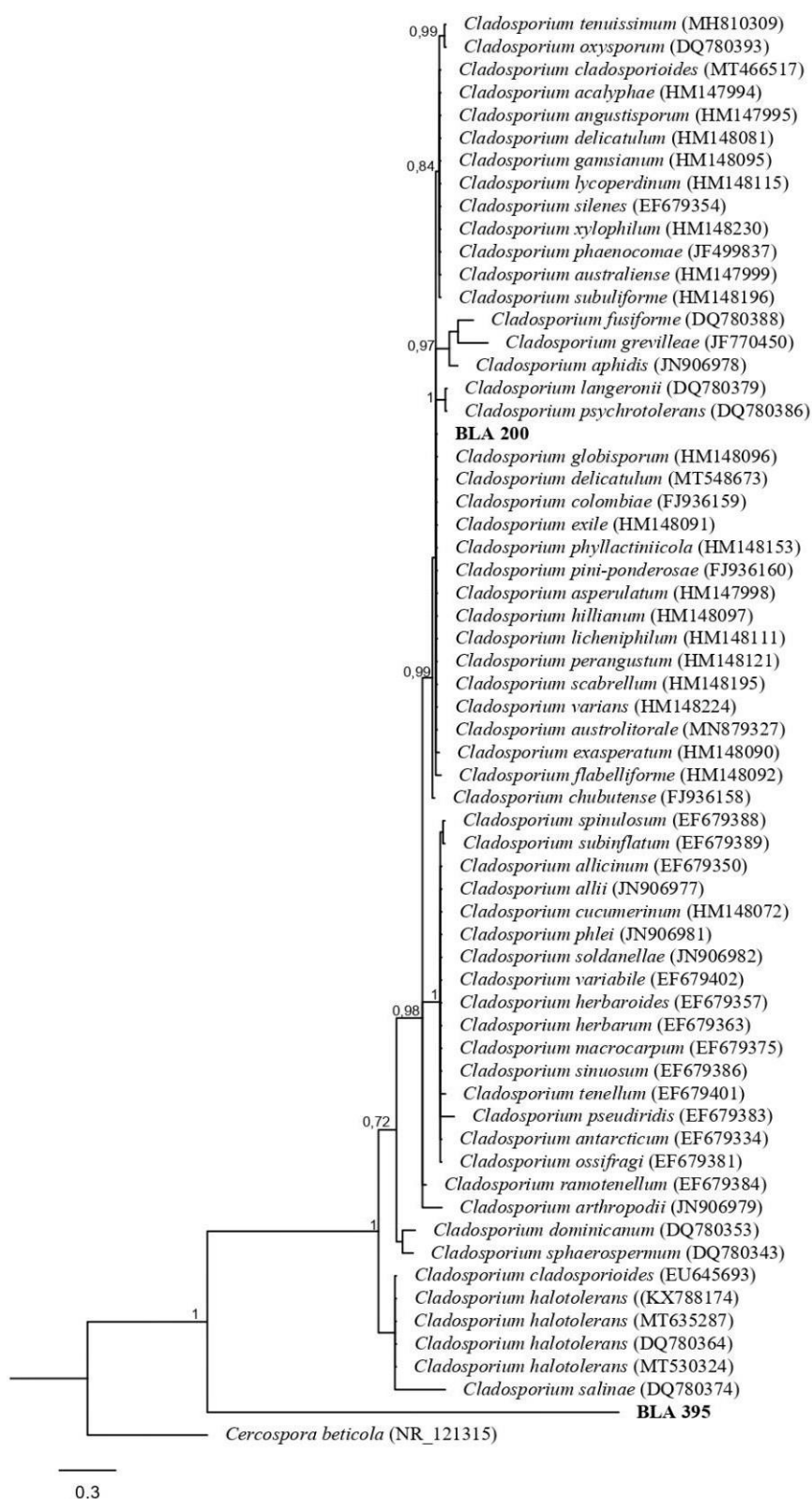


Figura 5. Árvore filogenética do gênero *Cladosporium* baseado na região ITS. A figura mostra o isolado BLA 200 (em negrito) próximo de *C. psychrotolerans* e *C. globisporum*, e o isolado BLA 395 (em negrito) formando um clado separado. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 63 sequências ITS (562 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *Cercospora beticola* (NR 121315) foi utilizada como *outgroup*.

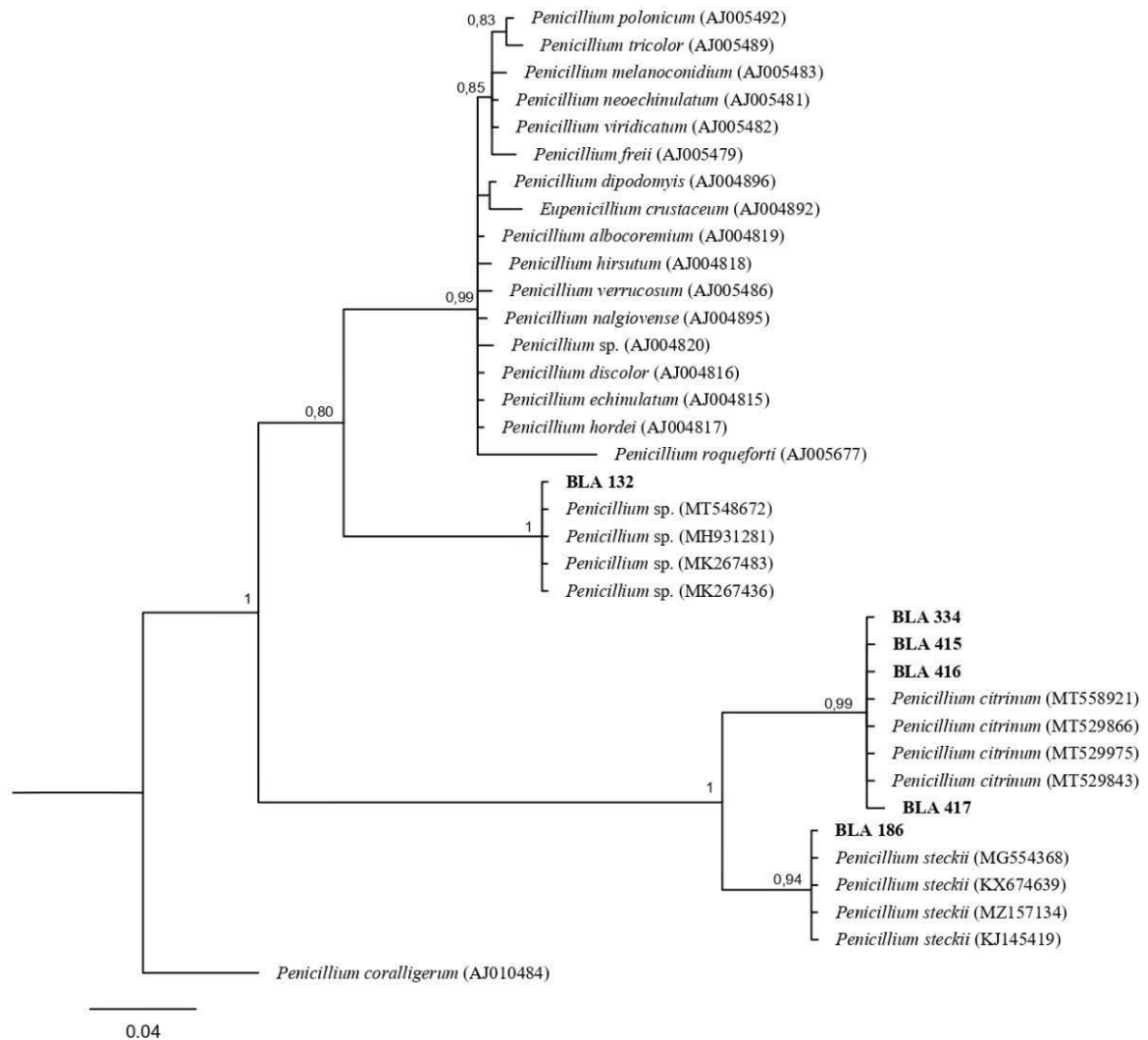


Figura 6. Árvore filogenética do gênero *Penicillium* baseada na região ITS. A figura mostra os isolados (em negrito) BLA 334, 415, 416 e 417 dentro do clado de *P. citrinum*, BLA 186 dentro de *P. steckii*, BLA 132 formando um clado monofilético junto a isolados ainda não identificados formalmente. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 36 sequências ITS (532 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *P. coralligerum* (AJ010484) foi utilizada como outgroup.

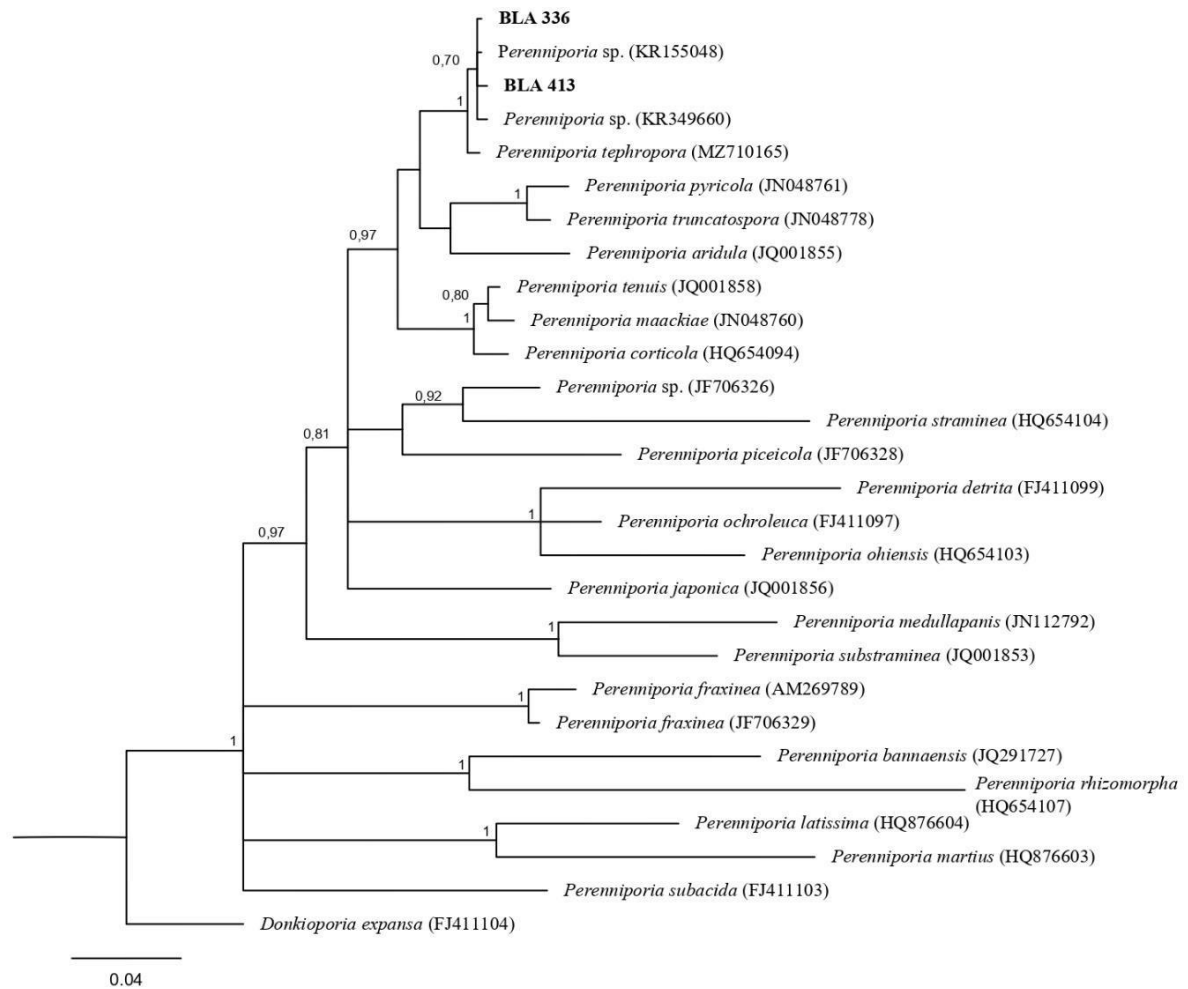


Figura 7 Árvore filogenética do gênero *Perenniporia* baseada na região ITS. A figura mostra os isolados BLA 336 e 413 (em negrito) formando um clado monofilético com isolados ainda não descritos formalmente. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 28 sequências ITS (663 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *Donkioporia expansa* (FJ411104) foi utilizada como *outgroup*.

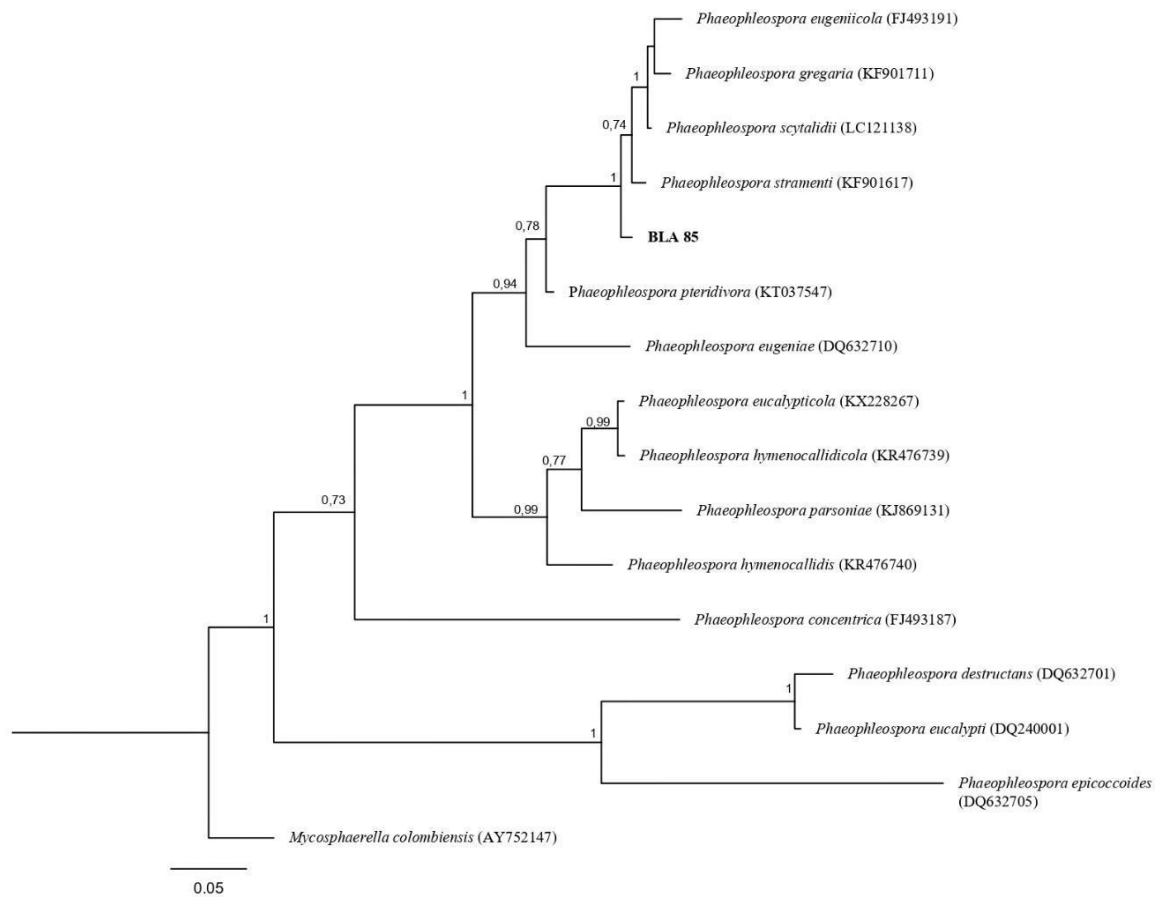


Figura 8. Árvore filogenética do gênero *Phaeophleospora* baseada em região ITS. A figura mostra o isolado BLA 85 (em negrito) formando um clado separado (próximo de *P. stramentii*). A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 16 sequências ITS (474 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *Mycosphaerella colombiensis* (AY752147) foi utilizada como *outgroup*.

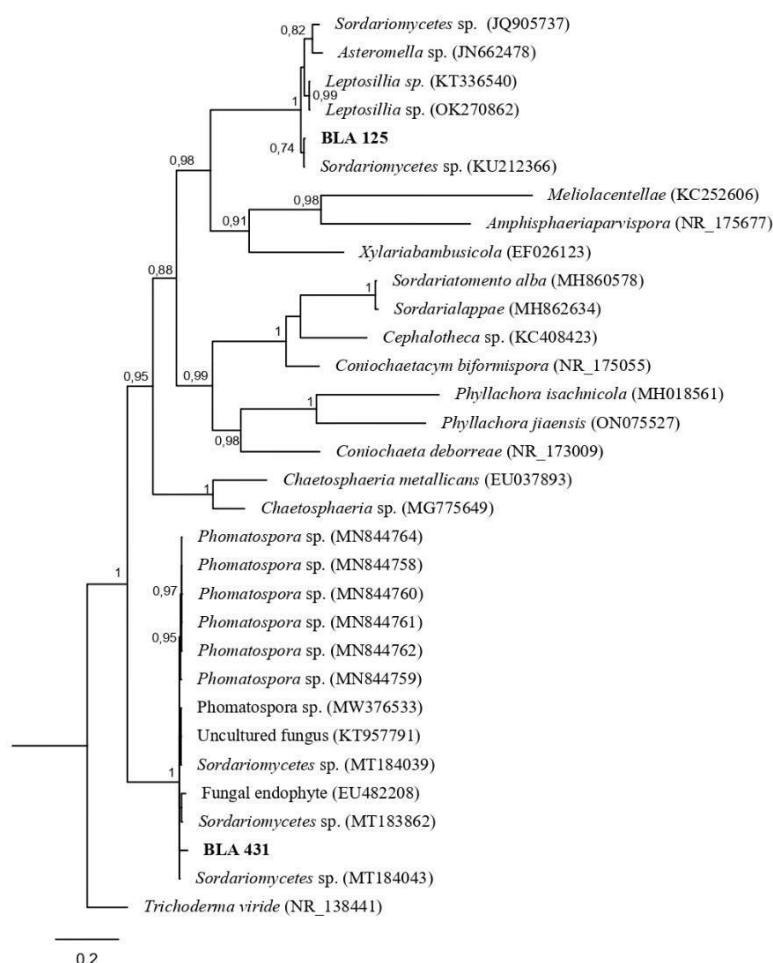


Figura 9. Árvore filogenética de *Sordariomycetes* e *Xylariomycetes* baseada na região ITS. A figura mostra os isolados (em negrito) BLA 125 e BLA 431, próximo a *Leptosilla* sp. (*Xylariomycete*) e de *Phomatospora* sp. (*Sordariomycetes*), respectivamente. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 30 sequências ITS (704 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *Trichoderma viride* (NR 138441) foi utilizada como *outgroup*.

4.4 ANÁLISE DAS COMUNIDADES DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

A curva de rarefação mostra que existe mais fungos associados a *P. cattleianum*, além daqueles que foram isolados no nosso trabalho (Figura 10A). Assim seria necessário um esforço amostral maior para conseguir isolar tais fungos e atingir o platô da curva. O diagrama de Venn mostrou que existe um compartilhamento de gêneros de fungos entre as duas plantas (n= 8). Além disso, o diagrama revelou que nove gêneros estão apenas associados à planta 1, enquanto que oito foram encontrados apenas na planta 2 (Figura 10B).

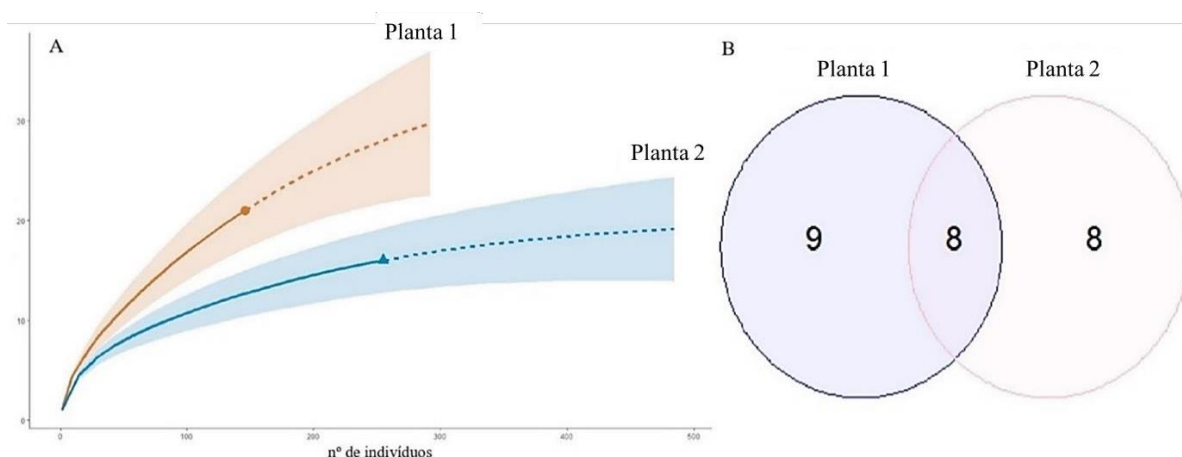


Figura 10. Curva de rarefação do total de fungos encontrados na planta 1 e planta 2 (A); e Diagrama de Venn de todos os gêneros associados as plantas (B).

A análise da diversidade alfa para às duas coletas mostrou que a planta 1 apresentou uma riqueza relativamente maior ($n = 17$) que a da planta 2 ($n = 16$, Apêndice X). No entanto, o índice de Chao 1 indica que a riqueza esperada na planta 1 é maior que a da planta 2 (41.8 e 20.4, respectivamente - Apêndice X). Embora a diversidade encontrada na planta 1 ($H = 1.69$) foi maior que a da planta 2 ($H = 1.33$), observamos que a segunda planta apresentou uma abundância maior que a da primeira (planta 1 = 141 isolados, planta 2 = 255) (Apêndice X). O índice de Simpson mostrou que a dominância de gêneros na planta 1 foi menor ($1-D = 0.72$) que na planta 2 ($1-D = 0.54$) (Apêndice X). Assim, planta 2 foi considerada uma amostra menos diversa porque obteve uma maior dominância de gêneros e isto foi corroborado com o índice de equabilidade de Pielou, o qual mostrou que a primeira planta foi mais homogênea ($J = 0.59$), do que a segunda ($J = 0.48$) (Apêndice X).

Considerando apenas a planta 1, a análise da diversidade alfa evidenciou que o método de semeadura de fragmento de folhas recuperou uma maior riqueza e abundância de gêneros, quando comparado aos demais métodos (Apêndice W). Assim, nesse método observamos que os meios de cultura BCA e BDA permitiram isolar uma maior riqueza ($n = 8$) e diversidade de gêneros ($H = 1.469$), respectivamente (Apêndice W). Considerando o tipo de meio de cultura e do método de semeadura de fragmento de folha utilizado, o índice de Simpson ($1-D$) mostrou que não houve dominância de gêneros (> 0.5). Isso significa que nenhum dos meios favoreceu o crescimento de um gênero de fungo em específico. Já no caso do método de filtração por partículas, este apresentou uma menor diversidade, com poucos isolados para cada um dos meios de cultura (Apêndice W).

Considerando a planta 2, a análise alfa também evidenciou que o método de semeadura de fragmento de folha recuperou uma maior riqueza e abundância de gêneros, quando comparado aos demais métodos. Nesse método observamos que o meio de cultura SNA permitiu isolar uma maior riqueza ($n=9$) e diversidade ($H=1,46$) de gêneros, embora o índice de Chao 1 sugere que existe uma maior riqueza esperada ($n=16$). O índice de Simpson ($1-D=0,62$) mostrou uma maior homogeneidade de gêneros nessa planta comparado com a primeira. Considerando o tipo de meio de cultura e dos métodos de semeadura de fragmento de folha e de filtração de partículas, o índice de Simpson mostrou que houve dominância de gêneros ($1-D<0,5$), $MA=0,37$ (no método de semeadura de fragmentos) e $BDA=0,48$ (no método de filtração de partículas). Da mesma forma, o índice de Pielou corroborou que não houve homogeneidade na abundância e número de gêneros.

A combinação dos resultados dos índices das duas plantas mostra que a planta 2 apresentou mais isolados ($n=255$), embora a riqueza ($n=16$) e a diversidade foi menor que a da primeira (Figuras 11 e 12). Este resultado foi corroborado com os valores da dominância de gêneros na maioria dos meios de cultura da segunda coleta (Figura 11, 12). A planta 1 apresentou uma maior diversidade de gêneros de fungos (Figuras 11 e 12).

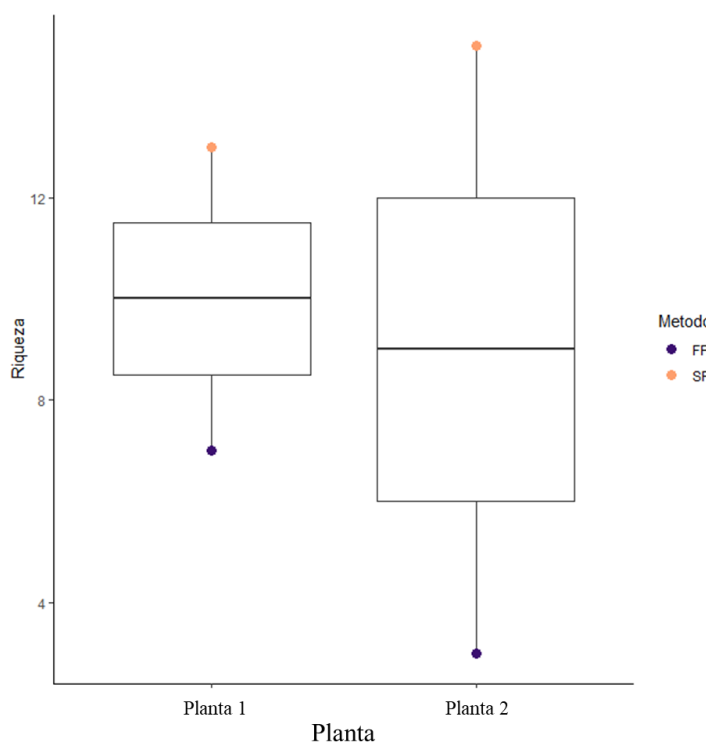


Figura 11. Diversidade alfa referente a riqueza entre as plantas 1 e 2 considerando o método de isolamento de semeadura de folhas (SF) e filtração de partículas (FP).

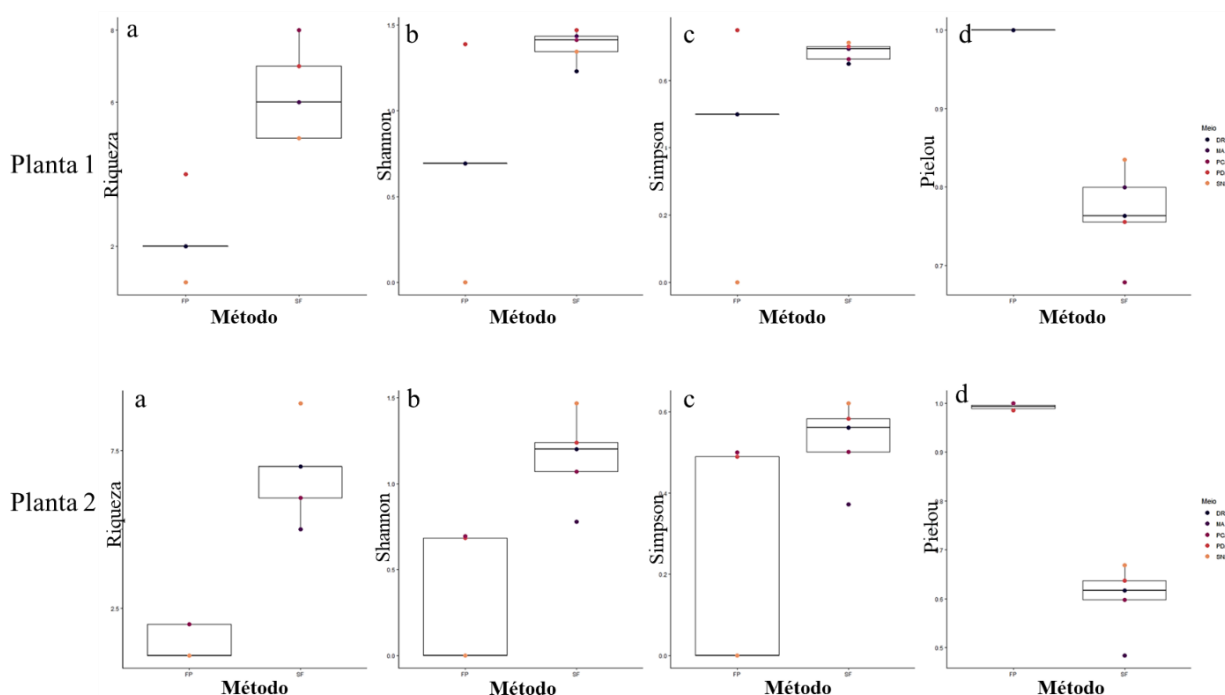


Figura 12. Análise de diversidade alfa da planta 1 e 2, considerando o método de isolamento. a) riqueza, b) Shannon, c) Simpson, d) Pielou. Meios de cultivos: Ágar Nutriente Sintético (SNA), Ágar Dicloran Rosa Bengala, sem Dicloran (DRB), Ágar Malte 2% (MA 2%), Ágar Batata Dextrose (BDA) e Ágar Batata-Cenoura (BCA).

Quando comparadas a diversidade beta entre as plantas, tanto os índices de Bray-Curtis, quanto de Jaccard mostraram que ambas as plantas são ligeiramente similares, mostrando uma similaridade de 58% para Bray-Curtis e uma similaridade de 68% para Jaccard. Comparando-se os métodos de isolamento utilizando o índice Bray-Curtis, observamos que houve uma similaridade de 58% para o método de filtração por partículas, para ambas as plantas. Enquanto na planta 2, o grau de similaridade entre os dois métodos foi de 94%, o que foi corroborado também usando o método de Jaccard que deu um valor ligeiramente menor (87%) de similaridade para as mesmas amostras (Apêndice Y).

Conforme a análise de escalamento multidimensional não-métrico baseada tanto no método de isolamento, quanto no meio de cultura utilizado, observamos uma maior similaridade entre as amostras retiradas do método de semeadura de fragmentos. Estas estão agrupadas mais próximas tanto na planta 1, quanto na planta 2 (Figura 13A). Enquanto os dados referentes ao método de filtração por partículas, estes estão mais espalhados pelo gráfico (Figura 13A). Quando comparada as amostras usando a distância euclidiana, a análise mostrou três ramos, sendo um pertencente a planta 2 com método SF, outro grupo contendo o método FP para as plantas 1 e 2 e um terceiro grupo contendo a planta 1, com método SF. Essas análises corroboram a análises anteriores (Figura 13B).

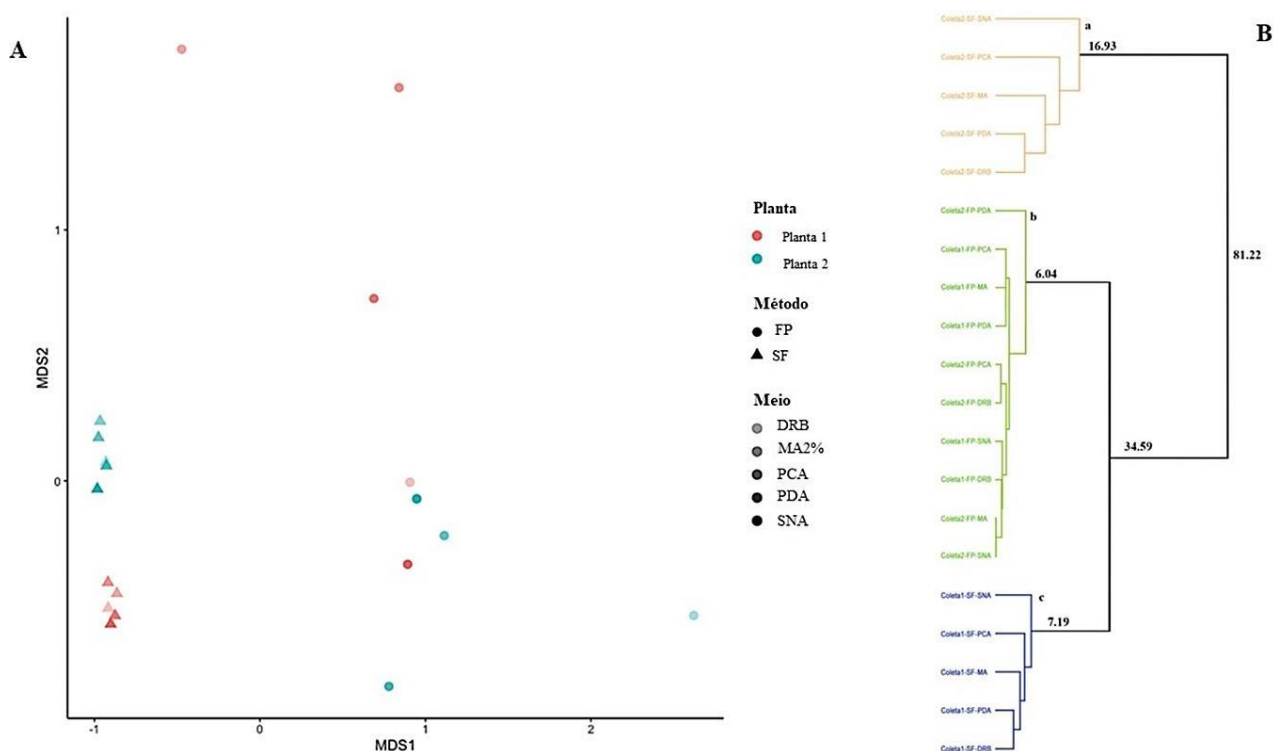


Figura 13. Escalamento multidimensional não-métrico das amostras da planta 1 e da planta 2 (A). Dendrograma de similaridade utilizando a distância euclidiana das amostras (B): a) planta 2 com método SF (rosa), b) Método FP para as coletas 1 e 2 (verde) e c) planta 1 com método SF. FP: filtração de partículas e SF: semeadura de folhas. Meios de cultivo: Ágar Nutriente Sintético (SNA), Ágar Dicloran Rosa Bengala, sem Dicloran (DRB), Ágar Malte 2% (MA 2%), Ágar Batata Dextrose (BDA) e Ágar Batata-Cenoura (BCA).

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, acessamos a diversidade de fungos endofíticos de *Psidium cattleianum* (Myrtales: Myrtaceae: Araçá) utilizando métodos de isolamento dependentes de cultivo, análise de caracteres macroscópicos dos isolados, bem como análise filogenética com o marcador *barcode* ITS. Nossos resultados evidenciaram que *P. cattleianum* apresenta uma grande diversidade de fungos endofíticos, semelhante àquela encontrada em outros gêneros da família Myrtaceae, principalmente os clados filogeneticamente mais próximos, como de *P. guajava*. Além disso, os nossos resultados sugerem que o Araçá apresenta uma comunidade de fungos própria, quando comparada com aquela dos seus clados irmãos, inclusive quando comparado com indivíduos diferentes da mesma planta, apresentando assim possíveis taxa novos para a ciência.

A família Myrtaceae compreende um grupo diverso de plantas que apresenta uma elevada diversidade de fungos endofíticos, a saber: *Aspergillus*, *Botryosphaeria*, *Fusarium*,

Neoscytalidium, *Xylaria*, *Phyllosticta capitalensis*, *Cercospora apii*, *Xylaria longipes*, *Phomopsis* sp., *Phomopsis asparagi*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Candida albicans*, *Epidermophyllum floccosum*, *Mucor circinelloides*, *Pallidocercospora thailandica* e *Rhizopus arrhizus* (TCHAMGOUE et al., 2020; GARBA et al., 2021; UJAM et al., 2021). Apesar do potencial econômico da família Myrtaceae (MORAIS; CONCEIÇÃO; NASCIMENTO, 2014) e do potencial econômico de alguns fungos endofíticos associados a ela (YANG et al., 2019; UJAM et al., 2021), a diversidade desses microrganismos de algumas espécies de plantas dessa família ainda foi pouco estudada, no caso, *P. cattleianum*.

Os nossos resultados evidenciaram 26 gêneros de fungos endofíticos associados as folhas de *P. cattleianum*: *Alternaria*, *Amycosphaerella*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Coprinellus*, *Corioloropsis*, *Diaporthe*, *Induratia*, *Muyocopron*, *Myrmecridium*, *Neofusicoccum*, *Pantospora*, *Paracamarosporium*, *Parapallidocercospora*, *Paraphaeosphaeria*, *Penicillium*, *Perenniporia*, *Phaeophleospora*, *Phomopsis*, *Phyllocista*, *Pseudofusicoccum*, *Sordariomycete*, *Talaromyces*, *Xylaria* e *Xylariomycetes*. Curiosamente, as análises estatísticas sugerem que a riqueza de espécies de fungos encontrados nas folhas de *P. cattleianum* é maior à obtida neste estudo, pois os nossos esforços para o isolamento dos fungos não foram suficientes para que a curva de rarefação atingisse um platô (Figura 11). Esses resultados podem ser influenciados pelo número limitado de plantas avaliadas neste trabalho, pela necessidade de se amostrar mais folhas das plantas avaliadas ou até o uso de meio de cultivos mais pobres em nutrientes. Futuros estudos, incluindo uma amostragem maior, poderão confirmar a nossa hipótese de que existe um número maior de gêneros de fungos associados a *P. cattleianum*.

A identificação morfológica de fungos é um processo difícil devido à diversidade morfológica que este reino apresenta (CHETHANA et al., 2020). O uso de ferramentas moleculares como da região ITS trouxe um avanço para a taxonomia de fungos (SENANAYAKE et al. 2020, RAJA et al., 2021). Nesse sentido, o uso combinado de ambas as ferramentas resulta ser a abordagem mais apropriada para a identificação destes organismos (LÜCKING et al., 2021). Os isolados obtidos neste estudo (n= 396) foram inicialmente separados em 86 morfotipos, com base nos caracteres macroscópicos e microscópicos das colônias. Contudo, as análises filogenéticas baseadas na região ITS agruparam os 396 isolados em 26 gêneros de fungos diferentes. Assim, vários dos morfotipos inicialmente considerados como sendo diferentes foram agrupados em um único gênero. Este resultado corrobora a importância do uso combinado de várias ferramentas para a identificação mais acurada dos

fungos. Por outro lado, embora a região ITS foi proposta como a região *barcode* de fungos, ela não é a mais apropriada para avaliar alguns grupos como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Sordariomycetes* e *Xylariomycetes*, entre outros. Considerando que neste estudo foi utilizado apenas a região ITS para todos os grupos de fungos, existe a possibilidade de que os resultados da análise de diversidade de fungos associadas a *P. cattleianum* possam mudar caso outros marcadores moleculares sejam incluídos em uma análise mais robusta. Estudos futuros, portanto, devem considerar o uso de outros marcadores moleculares na identificação dos fungos.

A maioria dos gêneros de fungos encontrados neste estudo corresponde a fungos fitopatógenos (NAKASAKI et al., 2007; CHURCHILL et al., 2010; MINNIS et al., 2011; TAN et al., 2012; KOOK et al., 2013; SPARRAT et al., 2014; BARONCELLI et al., 2017; MEENA et al., 2017; ROSADO et al., 2019; PENNERMAN et al., 2020). No entanto, alguns dos gêneros isolados estão relacionados positivamente com plantas, como é o caso de *Coprinellus* (previne doenças de vegetais causadas por fungos patogênicos - NAKASAKI et al., 2007), *Coriolopsis* (favorece o crescimento de algumas plantas – SPARRAT et al., 2014) e *Induratia* (ajuda no controle biológico de doenças do feijão – MOTA et al. 2020). Por outro lado, alguns gêneros de fungos, como o caso de *Muyocopron*, *Paracamarosporium* e *Perenniporia* podem viver no interior da planta como endófitos, em material vegetal morto como sapróbios e também podem ocasionar doenças nas suas plantas hospedeiras (MOTTA et al., 2020; JIANG et al., 2022). Os fungos isolados neste trabalho foram obtidos de folhas sem presença aparente de doenças, o que sugere que esses passam parte da sua vida como endófitos (sem causar danos aparentes às plantas), mas, eventualmente, podem se tornar fitopatógenos ou sapróbios uma vez que a planta inicia o processo de senescência. Este resultado está em concordância com a hipótese do *endophytic continuum* que sugere que há interações neutras entre os fungos que vivem na parte interna das plantas e que tais interações entre os fungos e o seu hospedeiro podem mudar dependendo das condições bióticas e abióticas (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Embora a diversidade de endófitos encontrados em *P. cattleianum* é semelhante à aquela observada na espécie irmã, *P. guajava* (goiabeira), nossos resultados mostram que o Araçá apresenta uma comunidade de fungos própria, uma vez que os gêneros *Coprinellus*, *Coriolopsis*, *Induratia*, *Muyocopron*, *Myrmecridium*, *Pantospora*, *Paracamarosporium*, *Paraphaeosphaeria* e *Perenniporia*, não foram ainda reportados no gênero *Psidium*. Além disso, os isolados BLA431 e BLA125 formaram clados filogenéticos separados dentro dos *Sordariomycetes* e *Xylariomycetes*, respectivamente. *Sordariomycetes* e *Xylariomycetes* são

classes de fungos ascomicetos que apresentam uma ampla gama de papéis ecológicos, incluindo patógenos e endófitos de plantas (SUNG et al., 2006). Assim, a grande questão seria: qual é o papel ecológico desses fungos em *P. cattleianum*? Estudos futuros, poderão desvendar o papel ecológico desses, bem como estudos com uma abordagem polifásica com análises filogenéticas *multilocus*, poderão corroborar se esses isolados realmente correspondem com espécies novas para a ciência.

6. CONCLUSÃO

Psidium cattleianum abriga uma grande diversidade de fungos endofíticos, assim como outros gêneros de plantas da família Myrtaceae. Nossos dados sugerem que essa planta apresenta uma comunidade de fungos própria que inclui clados filogenéticos novos, ainda não reportados em outras espécies dessa família.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. PLANT DISEASES CAUSED BY FUNGI. In: AGRIOS, George N. **Plant Pathology**. 5. ed. EUA: Elsevier Academic Press, 2004. Cap. 11. p. 386-613.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, [S.L.], v. 21, n. 2-3, p. 51-66, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.003>.
- BARONCELLI, R. et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex as a model system to study evolution and host specialization in plant pathogens. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 8, n. 2001, p. 1-7, 11 out. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.02001>.
- CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 17, n. 4, p. 540-552, 2000.
- CORREIA, A. M. L. et al. Fungal endophyte communities in *Begonia* species from the Brazilian Atlantic Rainforest. **Current Microbiology**, [S.L.], v. 75, n. 4, p. 441-449, 20 nov. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-017-1400-1>.
- COOK, D. et al. An assessment of the benefits of yellow Sigatoka (*Mycosphaerella musicola*) control in the Queensland Northern Banana Pest Quarantine Area. **Neobiota**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 67-81, 13 set. 2013. Pensoft Publishers. <http://dx.doi.org/10.3897/neobiota.18.3863>.

CH AISIRI, C. et al. *Diaporthe citri*: A Fungal Pathogen Causing Melanose Disease. **Plants**, [S.L.], v. 11, n. 1600, p. 1-20, jun. 2022.

CHECCUCCI, A. et al. Is the plant-associated microbiota of *Thymus* spp. adapted to plant essential oil? **Research In Microbiology**, [S.L.], v. 168, n. 3, p. 276-282, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2016.11.004>.

CHETHANA, K.W.T. et al. Hurdles in fungal taxonomy: effectiveness of recent methods in discriminating taxa. **Megataxa**, [S.L.], v. 1, n. 2, p. 114-122, 31 mar. 2020. Magnolia Press. <http://dx.doi.org/10.11646/megataxa.1.2.2>.

CHURCHILL, A. C. L. *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. **Molecular Plant Pathology**, [S.L.], v. 12, n. 4, p. 307-328, 18 nov. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00672.x>.

CROUS, P. W.; KENDRICK, W. B.; ALFENAS, A. C. New species of hyphomycetes associated with *Eucalyptus*. **South African Journal of Botany**, v. 63, n. 5, p. 286-290, 1997.

ESPINOSA-GARCIA, F. J.; SALDIVAR-GARCIA, P.; LANGENHEIM, J. H. Effects of Sabinene and γ -Terpinene from Coastal Redwood Leaves Acting Singly or in Mixtures on the Growth of some of their Fungus Endophytes. **Biochemical Systematics and Ecology**, Grã Bretanha, v. 19, n. 8, p. 643-650, 15 Maio 1991.

GARBA, L. et al. Isolation and evaluation of in vitro antibacterial potential of endophytic fungi from the leaves of *Psidium guajava* (Guava). **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 13, n. 1, p. 20-24, 2021

GUPTA, S. et al. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 39, n. 20, p. 107-134, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107462>.

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.

JIANG, H. et al. First report of *Muyocopron laterale* causing a new leaf disease of *Camellia sinensis* in China. **Beverage Plant Research**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 1-4, jun. 2022. Maximum Academic Press. <http://dx.doi.org/10.48130/bpr-2022-0010>.

KATOH, 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.

LACERDA, L. T.; GUSMÃO, L. F. P.; RODRIGUES, Andre. Diversity of endophytic fungi in *Eucalyptus microcorys* assessed by complementary isolation methods. **Mycological Progress**, [S.L.], v. 17, n. 6, p. 719-727, 2 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11557-018-1385-6>

LACERDA, L. T.; GUSMÃO, L. F. P.; RODRIGUES, A.. Fungal communities in different aged leaves of *Eucalyptus microcorys* F. Muell. **Brazilian Journal of Botany**, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 499-508, set. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40415-019-00557-8>.

LEDERMAN, J. E. F. B. & Ildo Eliezer; SILVA-JUNIOR, J. F. da; FRANZON, R. C.; SOUSA-SILVA, J.C.; CAMPOS, L. Z. de O.; PROENÇA, C. El. B.. *Psidium* spp.: Araçá. In: FONTES, V., R.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Centro-Oeste**. Brasília, DF: MMA, 2018. (Série Biodiversidade; 44), 2016. Cap. 5.

LIMA, A. S. de et al. Action mechanism of Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) hydroalcoholic extract against *Staphylococcus aureus*. **Lwt**, [S.L.], v. 119, p. 108884, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108884>.

LÜCKING, R. et al. Fungal taxonomy and sequence-based nomenclature. **Nature Microbiology**, [S.L.], v. 6, n. 5, p. 540-548, 26 abr. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-021-00888-x>.

LÜCKING, R. et al. Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding?. **IMA Fungus**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-32, 10 jul. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s43008-020-00033-z>.

MARSBERG, A. et al. Endophyte isolations from *Syzygium cordatum* and a *Eucalyptus* clone (Myrtaceae) reveal new host and geographical reports for the *Mycosphaerellaceae* and *Teratosphaeriaceae*. **Australasian Plant Pathology**, [S.L.], v. 43, n. 3, p. 503-512, mar. 2014.

MEENA, M. et al. *Alternaria* Toxins: potential virulence factors and genes related to pathogenesis. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 8, n. 1451, p. 1-14, 8 ago. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01451>.

MINNIS, A.M. et al. *Asperisporium* and *Pantospora* (*Mycosphaerellaceae*): epitypifications and phylogenetic placement. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 1-8, 31 dez. 2011. Naturalis Biodiversity Center. <http://dx.doi.org/10.3767/003158511x602071>.

MÖLLER, E. M. et al. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 22, p. 6115, 1992.

MONTOYA, Q. V. et al. Fungi inhabiting attine ant colonies: reassessment of the genus *Escovopsis* and description of *Luteomyces* and *Sympodiorosea* gens. nov. **IMA Fungus**,

[S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-18, 24 ago. 2021. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1186/s43008-021-00078-8>.

MORAIS, L.; CONCEIÇÃO, G.; NASCIMENTO, J.. FAMÍLIA MYRTACEAE: ANÁLISE MORFOLÓGICA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE UMA COLEÇÃO BOTÂNICA. **Agrarian Academy**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 317-346, 4 abr. 2014.

NAKASAKI, K. et al. *Coprinellus curtus* (Hitoyo-take) prevents diseases of vegetables caused by pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, [S.L.], v. 275, n. 2, p. 286-291, out. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00899.x>.

MOTA, S. F. et al. Biological control of common bean diseases using endophytic *Induratia* spp. **Biological Control**, [S.L.], v. 159, n. 2021, p. 104629, ago. 2021. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104629>.

PENNERMAN, K. K. et al. Identifying candidate *Aspergillus* pathogenicity factors by annotation frequency. **BMC Microbiology**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 1-11, 11 nov. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-020-02031-y>.

PÉREZ, C. A. et al. Endophytic and canker-associated *Botryosphaeriaceae* occurring on non-native *Eucalyptus* and native Myrtaceae trees in Uruguay. **Fungal Diversity**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 53-69, 15 jan. 2010. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s13225-009-0014-8>.

RAJA, H. A. et al. Occasional comment: fungal identification to species-level can be challenging. **Phytochemistry**, [S.L.], v. 190, n. 2021, p. 1-3, out. 2021. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112855>.

REIS, C. da S.. **Fungos associados ao besouro ambrosia, *Euplatypus parallelus***. 2017. 47 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de São Paulo, [S. l.], 2017.

ROCHA, C. H. r da et al. Óleo essencial de *Psidium cattleianum* no controle de fitopatógenos em sementes de feijão. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 14-19, 1 jan. 2020. Grupo Verde de Agroecologia e Abelhas.
<http://dx.doi.org/10.18378/rvads.v15i1.7365>.

ROSADO, A. W. C. et al. *Cladosporium* species associated with disease symptoms on *Passiflora edulis* and other crops in Brazil, with descriptions of two new species. **Phytotaxa**, [S.L.], v. 409, n. 5, p. 239-260, 15 jul. 2019. Magnolia Press.
<http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.409.5.1>.

SAIKKONEN, K.; SAARI, S.; HELANDER, M. Defensive mutualism between plants and endophytic fungi? **Fungal Diversity**, [S.L.], v. 2010, n. 41, p. 101-113, 30 jan. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-010-0023-7>.

SALVATORE, M.M. et al. Secondary Metabolites Produced by *Neofusicoccum* Species Associated with Plants: a review. **Agriculture**, [S.L.], v. 11, n. 149, p. 1-19, fev. 2021.

SAMSUDDIN, M. et al. Internal Transcribed Spacer (ITS) as a Molecular Marker for Identification of *Dioscorea hispida* Dennst. (*Dioscoreaceae*). **J. Agrobiotech**, [S.L.], v. 3, p. 47-55, jan. 2012.

SAPARRAT, M. C. N. et al. *Coriolopsis rigida*, a potential model of white-rot fungi that produce extracellular laccases. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 41, n. 4, p. 607-617, 1 abr. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-014-1408-5>.

SECRETARIA DE INFRAESTRUTURA E MEIO AMBIENTE. (org.), São Paulo. Araçá, um pequeno notável. 2016. Disponível em: <https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/2016/03/araca-um-pequeno-notavel/#:~:text=A%20casca%20pode%20ser%20usada,usado%20no%20combate%20%C3%A0s%20bact%C3%A9rias>. Acesso em: 1 mar. 2022.

SENANAYAKE, I. C. et al. Morphological approaches in studying fungi: collection, examination, isolation, sporulation and preservation. **Mycosphere**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 2678-2754, dez. 2020. Mushroom Research Foundation. <http://dx.doi.org/10.5943/mycosphere/11/1/20>.

SILVA, A.T. da; MAZINE, Fiorella Fernanda. A família Myrtaceae na Floresta Nacional de Ipanema, Iperó, São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**, Sorocaba, v. 1, n. 67, p. 203-223, mar. 2016.

SUNG, G. et al. An overview of the systematics of the *Sordariomycetes* based on a four-gene phylogeny. **The Mycological Society of America**, Lawrence, v. 6, n. 98, p. 1076-1087, 27 set. 2006

SCUR, M. C. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. **Brazilian Journal of Biology**, [S.L.], v. 76, n. 1, p. 101-108, 12 fev. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.13714>.

SHAH, S. et al. Isolation and Characterization of Plant Growth-Promoting Endophytic Fungi from the Roots of *Dendrobium moniliforme*. **Plants**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 5, 28 dez. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants8010005>.

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 USA**, [S.L.], v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 27 mar. 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.. The endophytic continuum. **Mycological Research**, [S.L.], v. 109, n. 6, p. 661-686, jun. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1017/s095375620500273x>.

SUN, X.; GUO, L. D.. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. **Mycology**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 65-76, mar. 2012.

TAN, X.M. et al. Isolation and Identification of Endophytic Fungi in Roots of Nine *Holcoglossum* Plants (*Orchidaceae*) Collected from Yunnan, Guangxi, and Hainan Provinces

of China. **Current Microbiology**, [S.L.], v. 64, n. 2, p. 140-147, 6 nov. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-011-0045-8>.

TCHAMGOUE, E. N. et al. Diversity of Endophytic Fungi of *Psidium guajava* (Myrtaceae) and Their Antagonistic Activity against Two Banana Pathogens. **Journal of Advances in Microbiology**, [S.L.], p. 86-101, 31 dez. 2020. Sciencedomain International. <http://dx.doi.org/10.9734/jamb/2020/v20i1130304>.

UJAM, N. T. et al. Antioxidant and immunosuppressive activities of extracts of endophytic fungi isolated from *Psidium guajava* and *Newbouldia laevis*. **Phytomedicine Plus**, [S.L.], v. 1, n. 2, p. 100028, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100028>

VAZ, Aline B. M. et al. Fungal endophytes associated with three South American *Myrtae* (Myrtaceae) exhibit preferences in the colonization at leaf level. **Fungal Biology**, [S.L.], v. 118, n. 3, p. 277-286, set. 2014.

WAQAS, M. et al. Endophytic Fungi Produce Gibberellins and Indoleacetic Acid and Promotes Host-Plant Growth during Stress. **Molecules**, [S.L.], v. 17, n. 9, p. 10754-10773, 7 set. 2012. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules170910754>.

YANG, T.; DAI, C.C.. Interactions of two endophytic fungi colonizing *Atractylodes lancea* and effects on the host's essential oils. **Acta Ecologica Sinica**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 87-93, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chnaes.2013.01.004>.

YAN, L. et al. Production of bioproducts by endophytic fungi: chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.L.], v. 102, n. 15, p. 6279-6298, 29 maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-018-9101-7>.

YANG, Z. et al. Antifungal Metabolites from *Alternaria atrans*: an endophytic fungus in *Psidium guajava*. **Natural Product Communications**, [S.L.], v. 14, n. 5, p. 1-5, maio 2019. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1934578x19844116>.

ZHENG, Y.K. et al. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. **Annals Of Microbiology**, [S.L.], v. 66, n. 2, p. 529-542, 25 set. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-015-1153-7>.

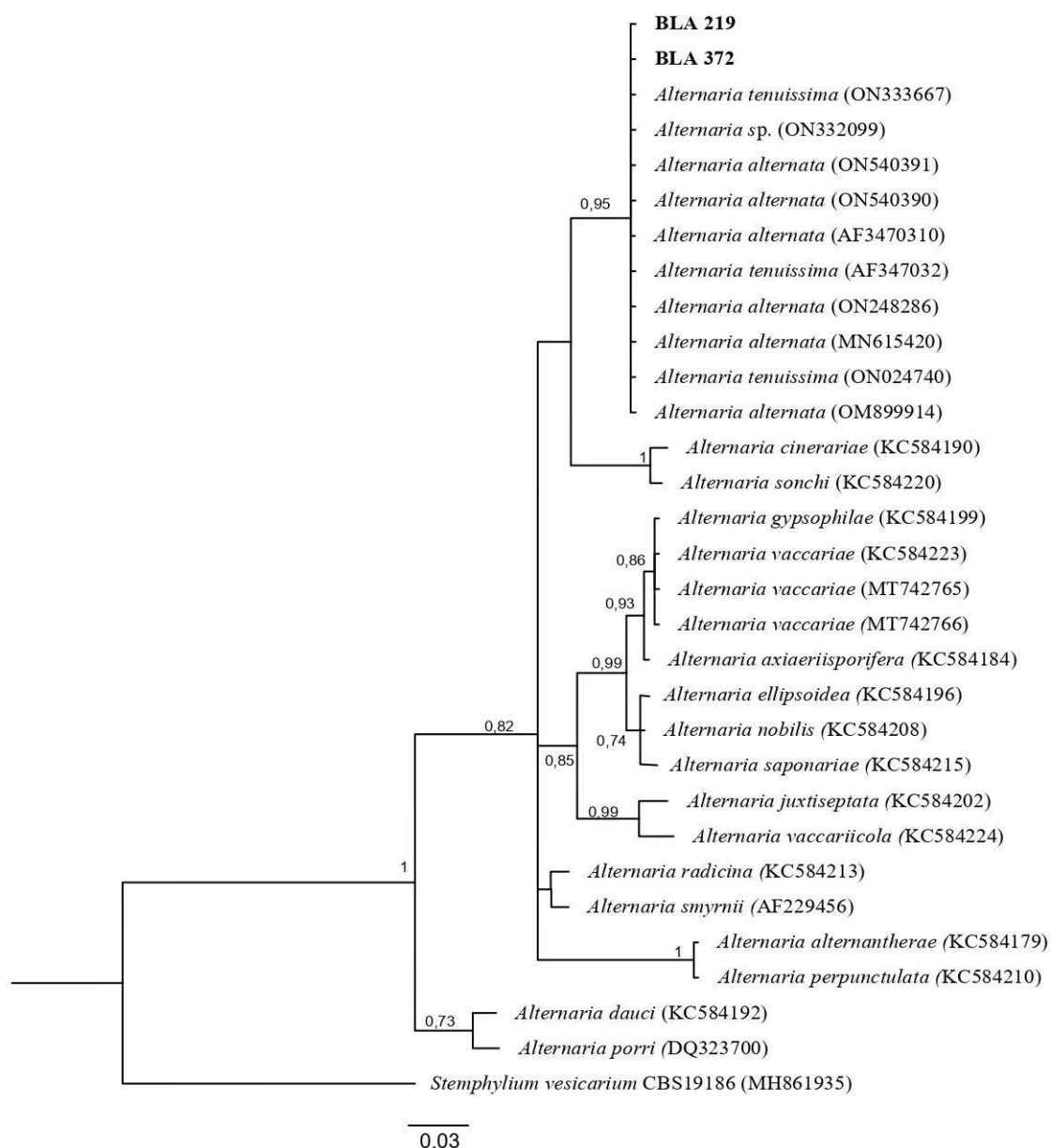
APÊNDICES

Apêndice A: Número total de isolados separados por método de isolamento e meio de cultivo.

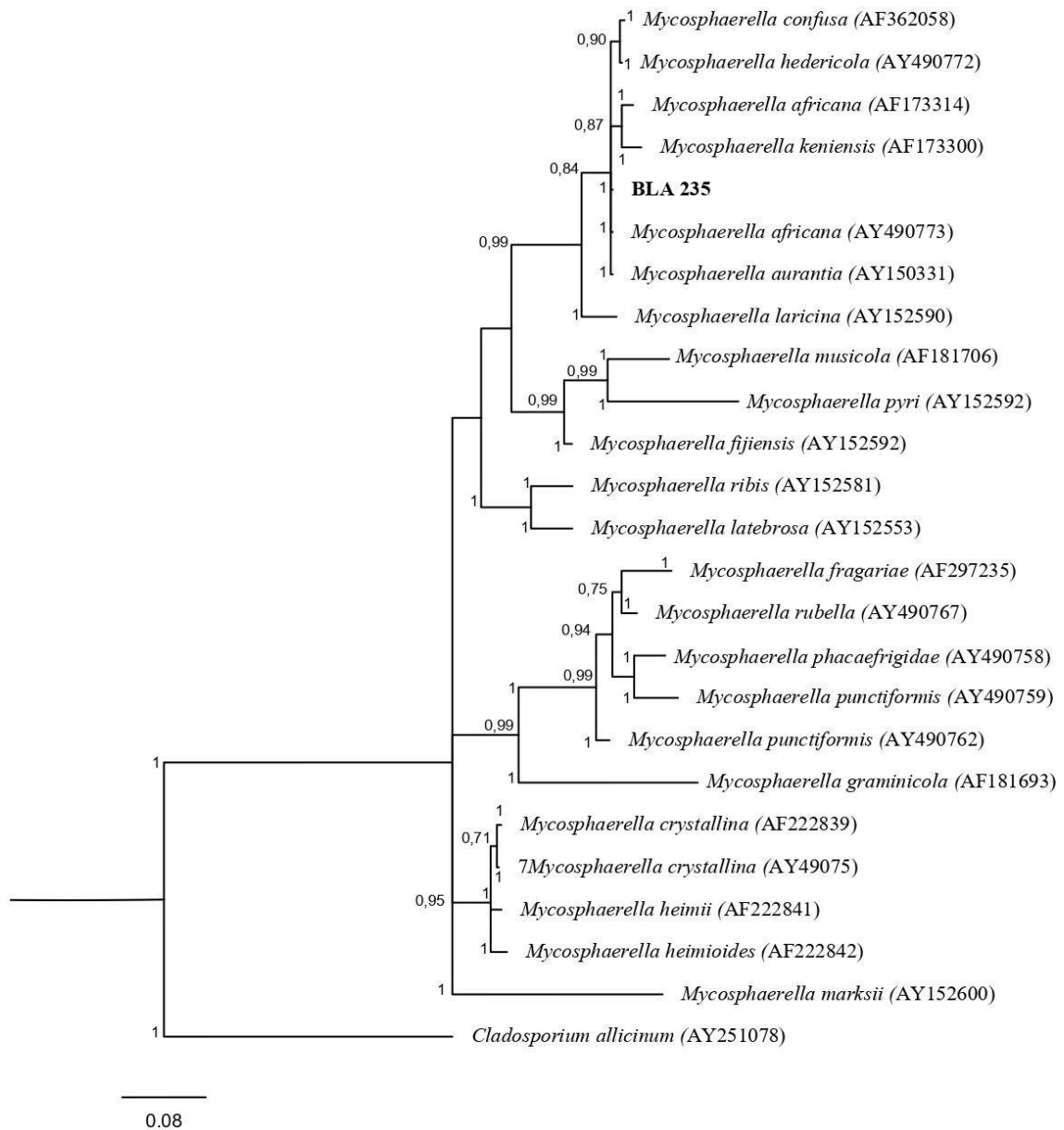
Plantas	semeadura de fragmentos					filtração de partículas					diluição seriada					Total
	MA2%	BDA	BCA	DRB	SNA	MA2%	BDA	BCA	DRB	SNA	MA2%	BDA	BCA	DRB	SNA	
Planta 1	21	29	29	25	24	2	4	2	2	2	0	1	0	0	0	141
Planta 2	41	49	61	55	37	1	7	2	1	1	0	0	0	0	0	255
Total	62	78	90	80	61	3	11	4	3	3	0	1	0	0	0	396

Apêndice B: Número total de isolados fúngicos (396) agrupados em 86 morfotipos, com base nos caracteres morfológicos da colônia.

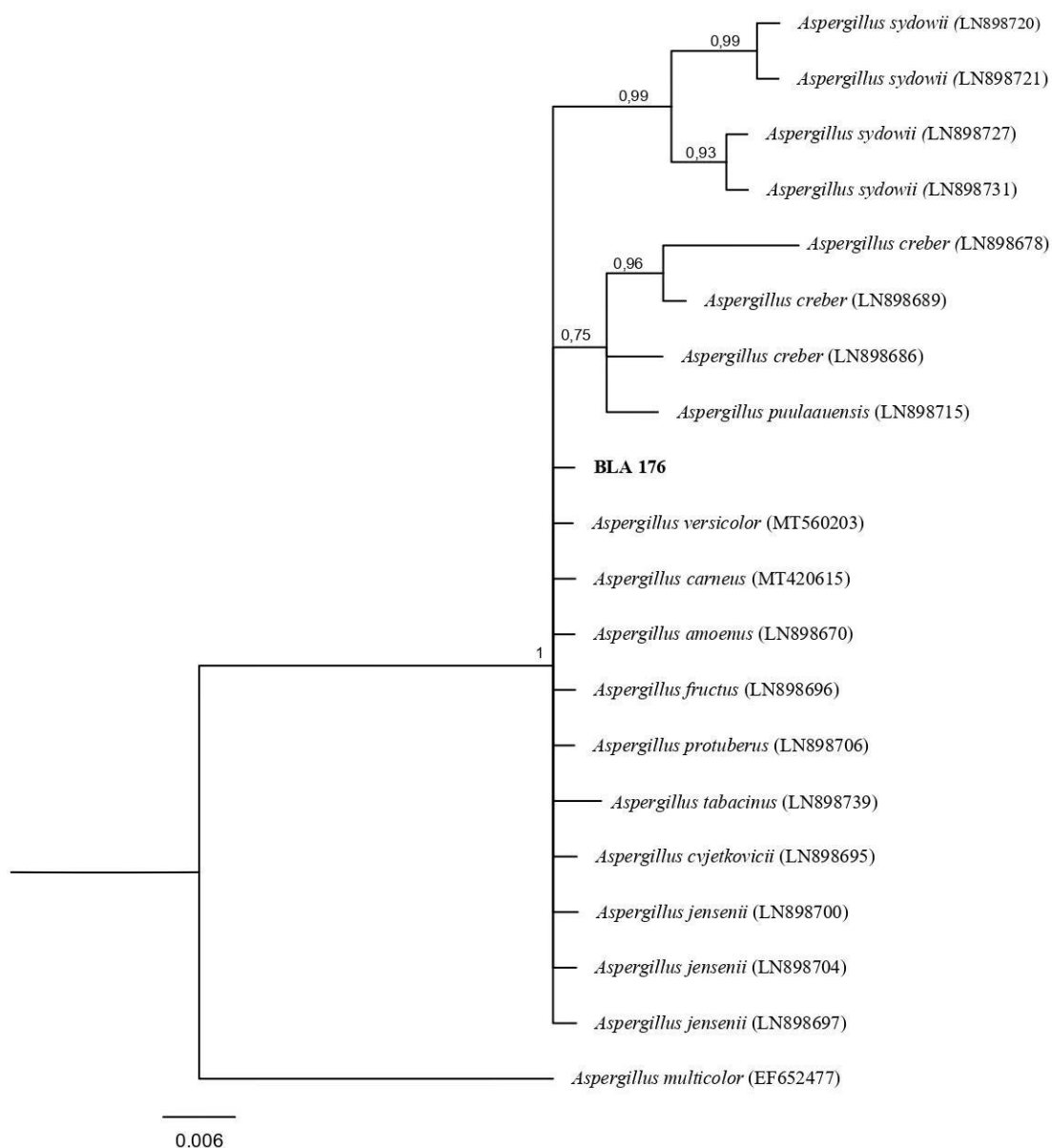
Morfotipo	Total de indivíduos	Morfotipo	Total de indivíduos	Morfotipo	Total de indivíduos	Morfotipo	Total de indivíduos
1	208	23	1	45	1	67	1
2	22	24	1	46	1	68	1
3	26	25	1	47	1	69	3
4	15	26	2	48	1	70	3
5	6	27	1	49	1	71	2
6	4	28	1	50	1	72	2
7	4	29	2	51	1	73	1
8	2	30	1	52	1	74	1
9	9	31	1	53	3	75	3
10	3	32	1	54	1	76	2
11	1	33	1	55	1	77	1
12	1	34	1	56	1	78	1
13	1	35	1	57	2	79	2
14	5	36	1	58	2	80	7
15	1	37	1	59	1	81	3
16	1	38	1	60	1	82	1
17	1	39	1	61	1	83	5
18	1	40	1	62	1	84	1
19	1	41	1	63	1	85	1
20	1	42	1	64	1	86	1
21	1	43	1	65	1		
22	1	44	1	66	1		



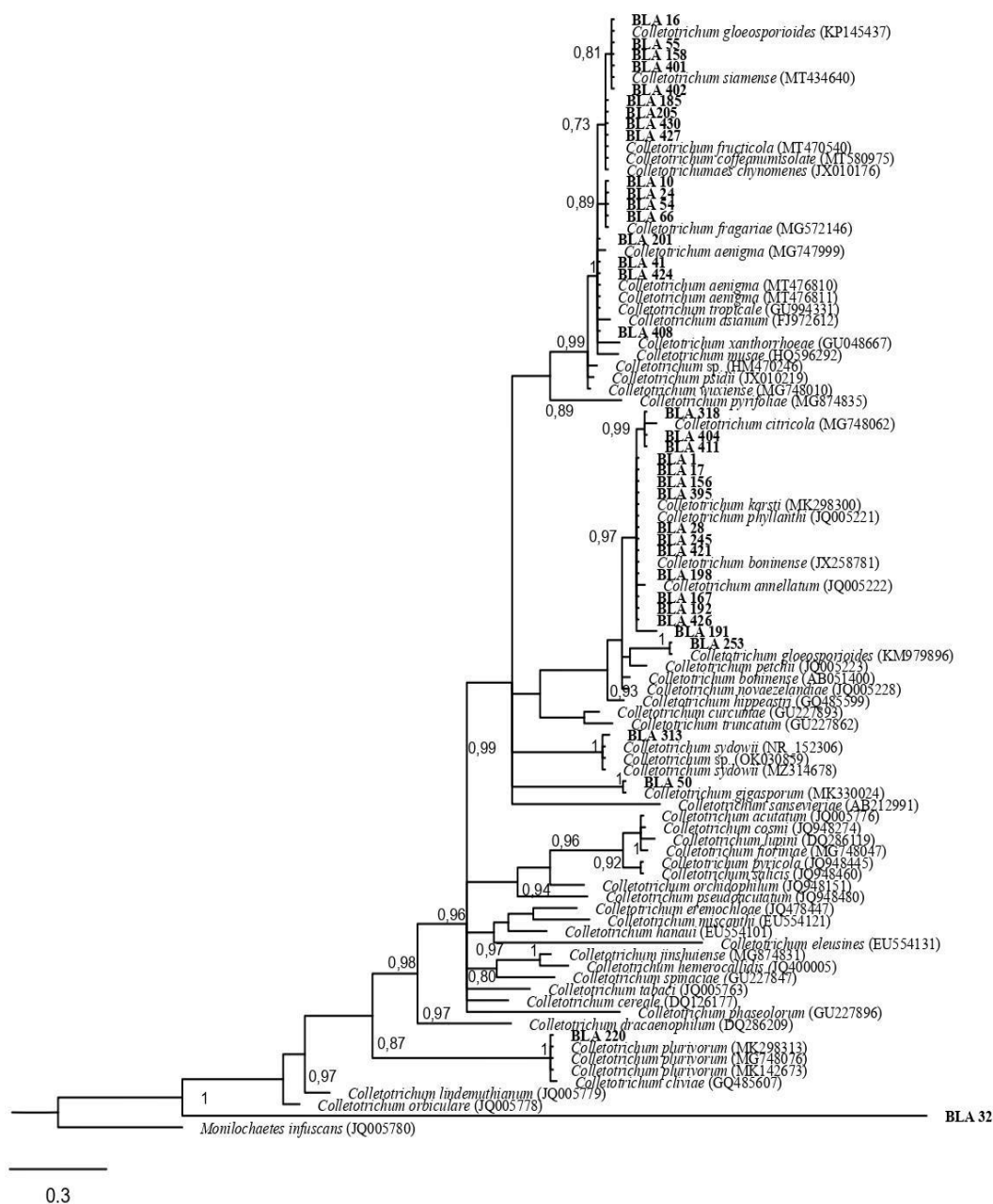
Apêndice C: Árvore filogenética do gênero *Alternaria* baseada na região ITS. A figura mostra os isolados BLA 219 e 372 (em negrito) dentro do clado de *Alternaria alternata* e *A. tenuissima*. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 31 sequências de ITS (540 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0,7 foram excluídos). A linhagem *Stemphylium vesicarium* (CBS 19186) foi utilizada como *outgroup*.



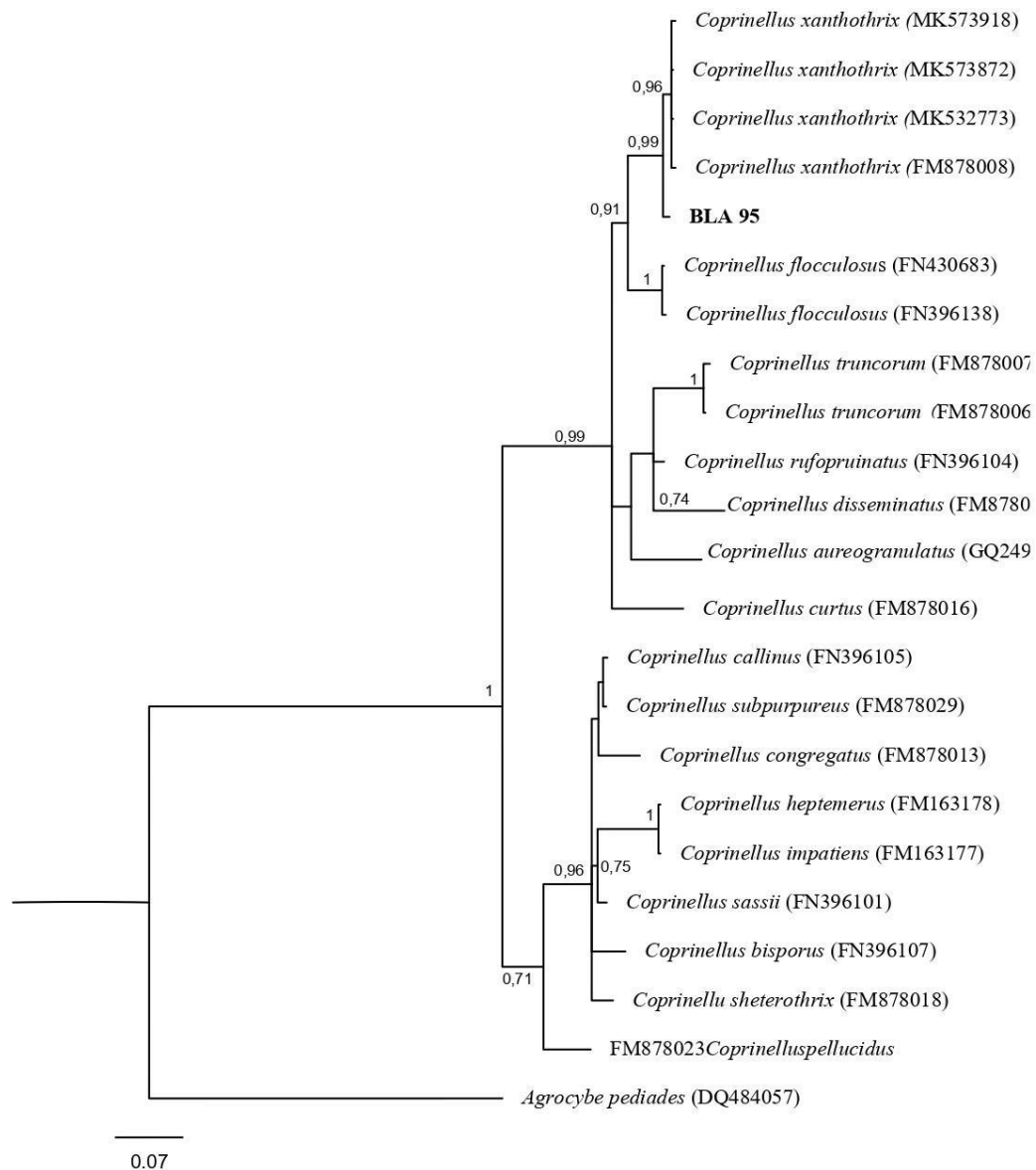
Apêndice D: Árvore filogenética do gênero *Amycosphaerella* baseada na região ITS. A figura mostra o isolado BLA 235 (em negrito) próximo de *Amycosphaerella keniensis*, e *A. africana*. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 25 sequências de ITS (516 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *Cladosporium allcium* (AY251078) foi utilizada como *outgroup*.



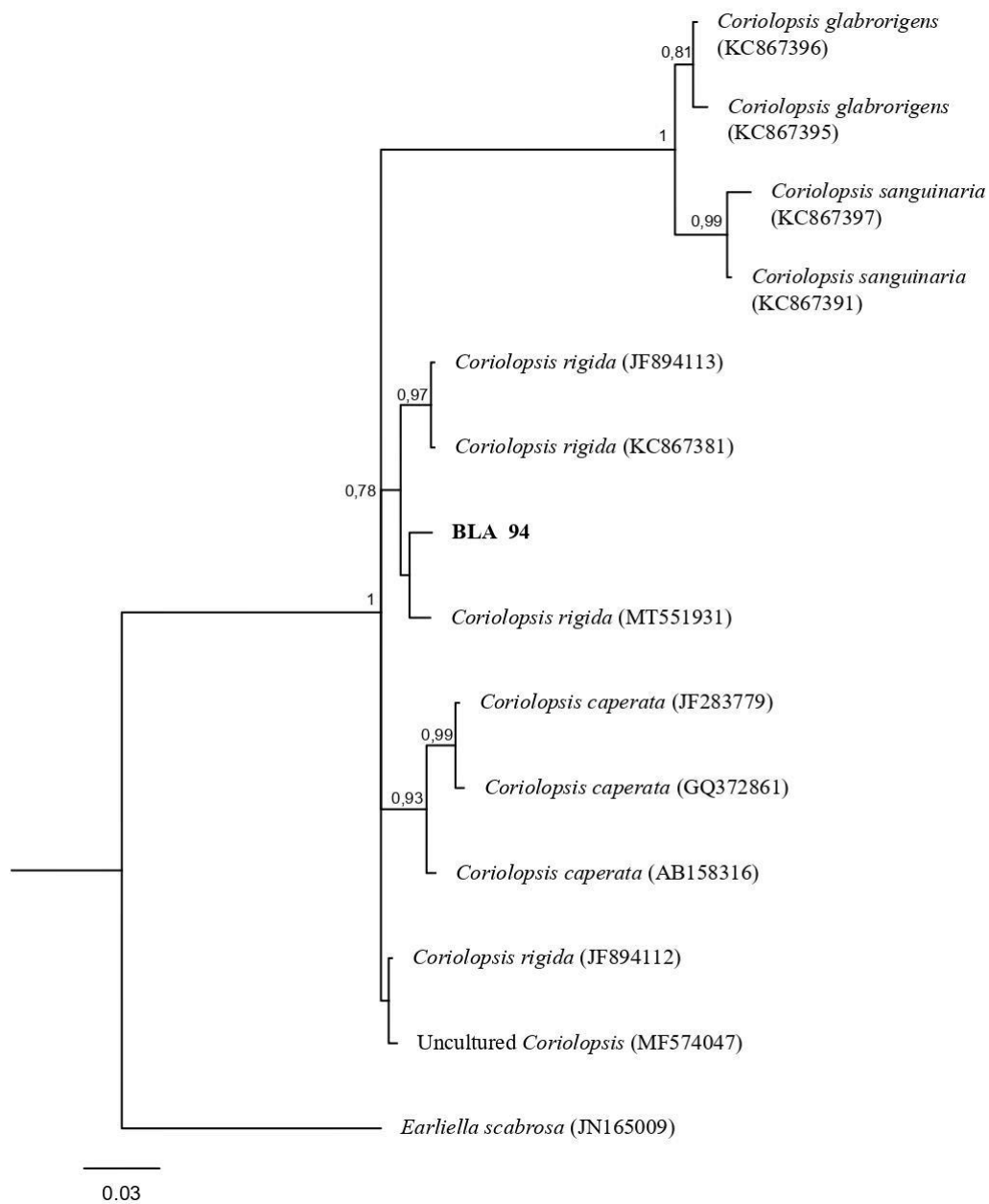
Apêndice E: Árvore filogenética do gênero *Aspergillus* baseada na região ITS. A figura mostra o isolado BLA 176 (em negrito) dentro do clado de *Aspergillus* sp.. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 20 sequências de ITS (517 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *Aspergillus multicolor* (EF652477) foi utilizada como *outgroup*.



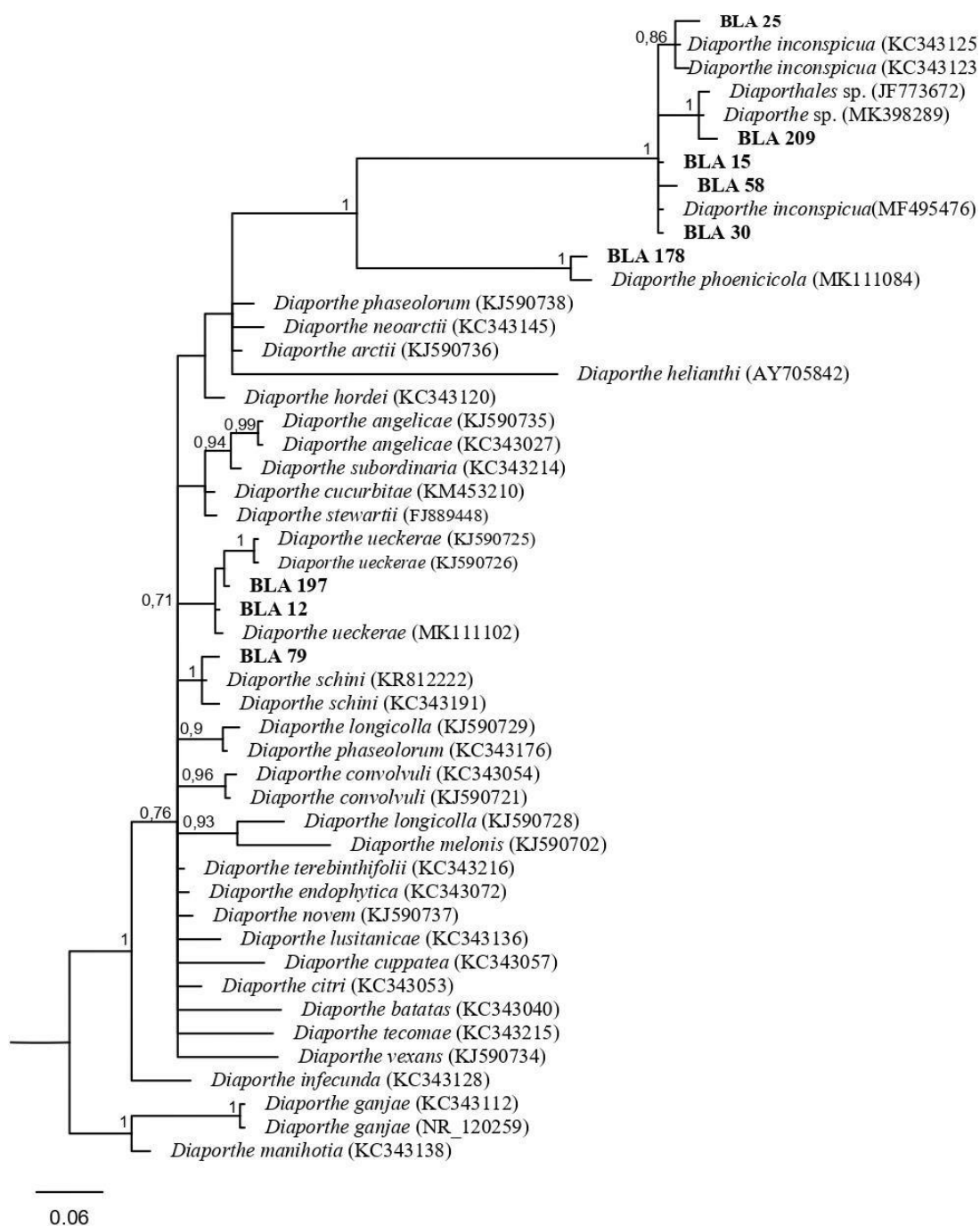
Apêndice F: Árvore filogenética do gênero *Colletotrichum* baseada na região ITS. A figura mostra os isolados BLA 1, 10, 16, 17, 24, 28, 50, 54, 55, 66, 156, 158, 167, 185, 191, 192, 198, 201, 205, 220, 245, 253, 313, 318, 395, 401, 402, 404, 408, 411, 421, 424, 426, 427, 430 (em negrito) dentro dos clados de *Colletotrichum* sp., *Colletotrichum fragariae*, *Colletotrichum aenigma*, *Colletotrichum sydowii* e *Colletotrichum plurivorum*. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 97 sequências de ITS (519 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *Monilochaetes infuscans* (JQ005780) foi utilizada como outgroup.



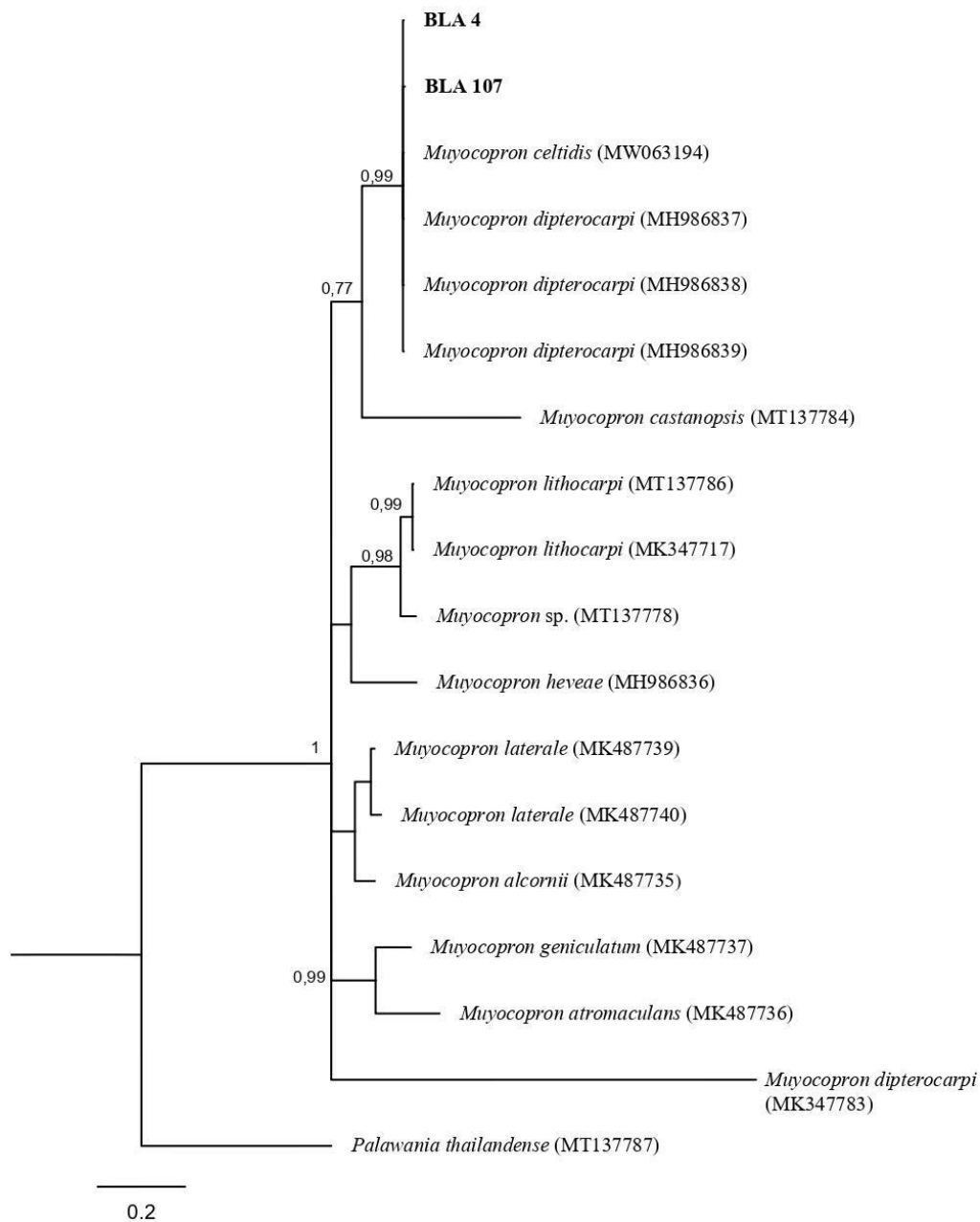
Apêndice G: Árvore filogenética do gênero *Coprinellus* baseada na região ITS. A figura mostra o isolado BLA 95 (em negrito) formando um clado separado próximo de *Coprinellus xanthothrix*. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 23 sequências de ITS (615 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *Agrocybe pediades* (DQ484057) foi utilizada como *outgroup*.



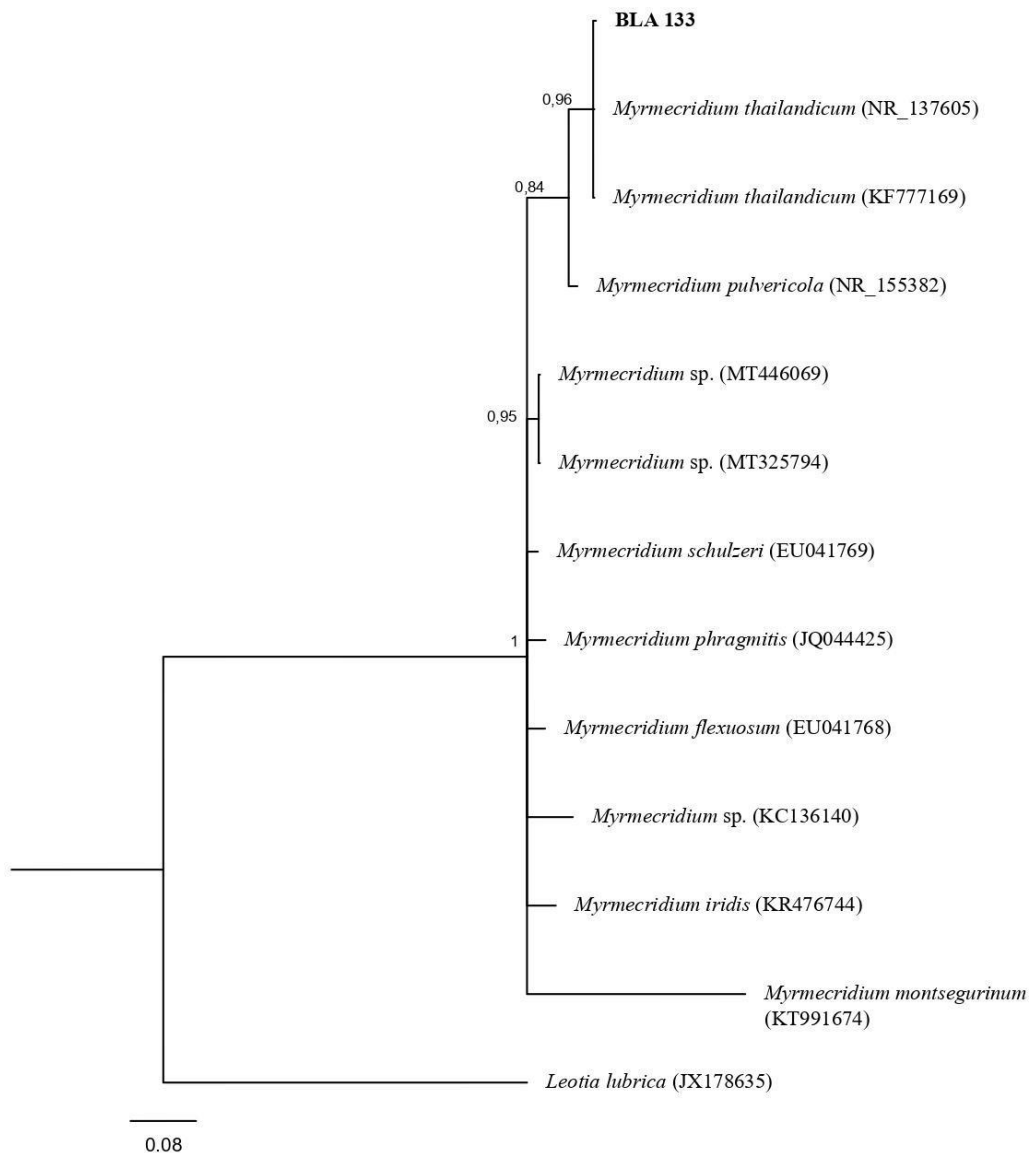
Apêndice H: Árvore filogenética do gênero *Coriopsis* baseada na região ITS. A figura mostra os isolados BLA 94 (em negrito) formando um clado monofilético com *Coriopsis rigida*. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 14 sequências de ITS (555 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *Earliella scabrosa* (JN165009) foi utilizada como *outgroup*.



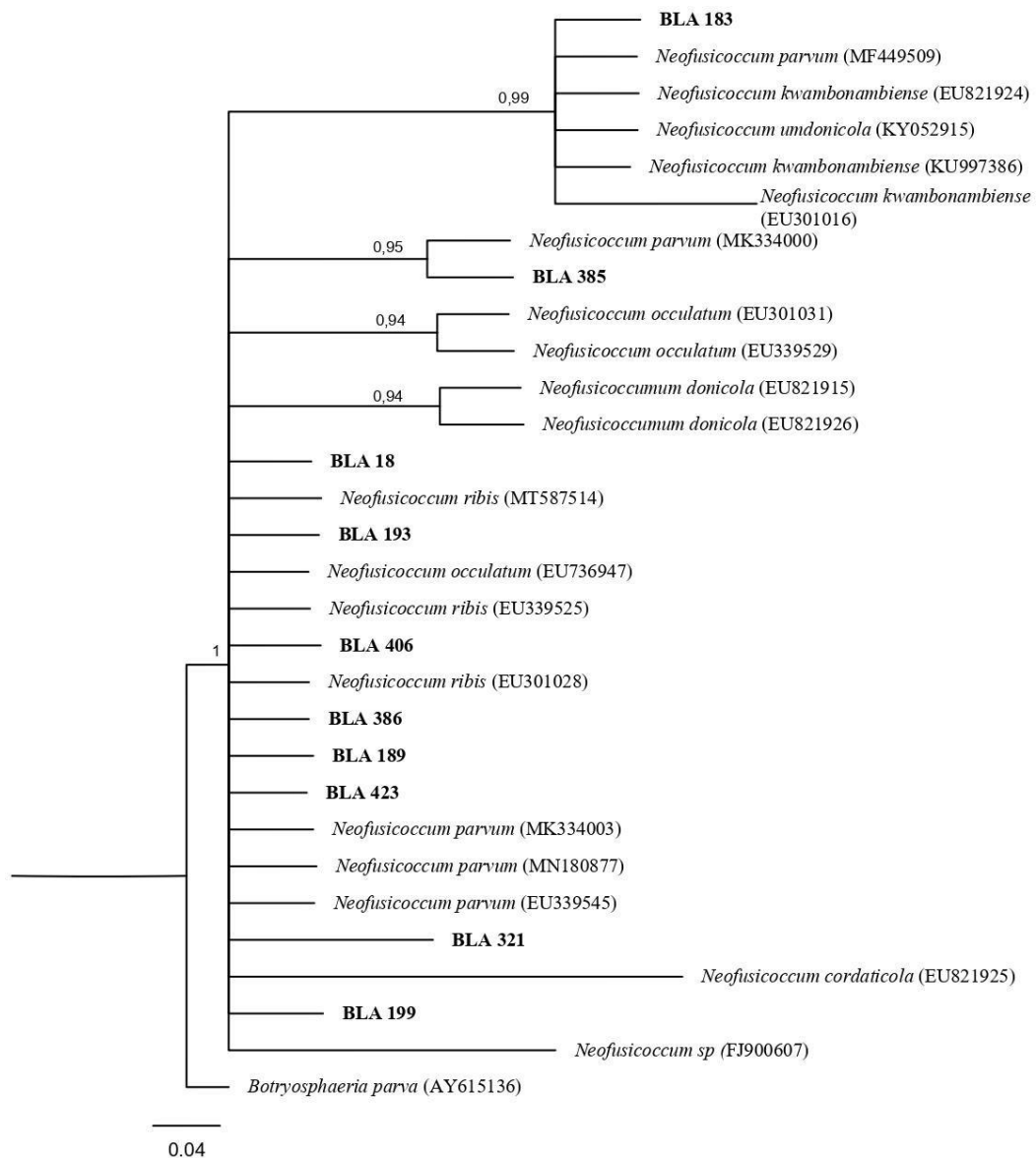
Apêndice I: Árvore filogenética do gênero *Diaporthe* baseada na região ITS. A figura mostra os isolados BLA 12, 15, 25, 30, 58, 79, 178, 197, 209 (em negrito) dentro dos clados de *D. inconspicua*, *Diaporthe* sp., *D. ueckerae* e *D. schini*. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 49 sequências de ITS (562 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). O clado de *D. manihotia* e *D. ganjae* foi utilizada como *outgroup*.



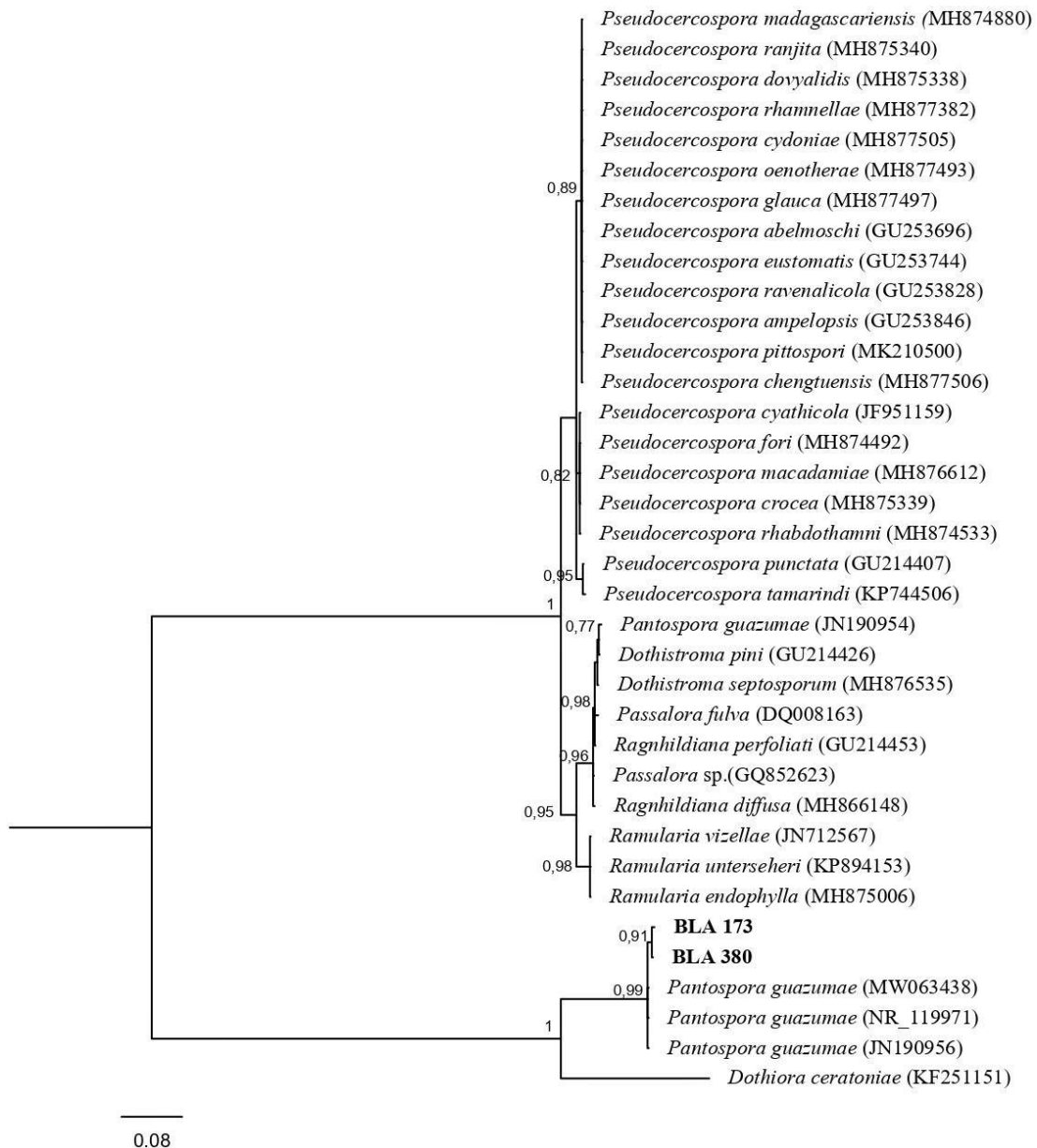
Apêndice K: Árvore filogenética do gênero *Muyocopron* baseada na região ITS. A figura mostra os isolados BLA 4 e 107 (em negrito) dentro do clado formado por *M. celtidis*, e *M. diptercarpi*. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 18 sequências de ITS (581 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *Palawania thailandense* (MT137787) foi utilizada como *outgroup*.



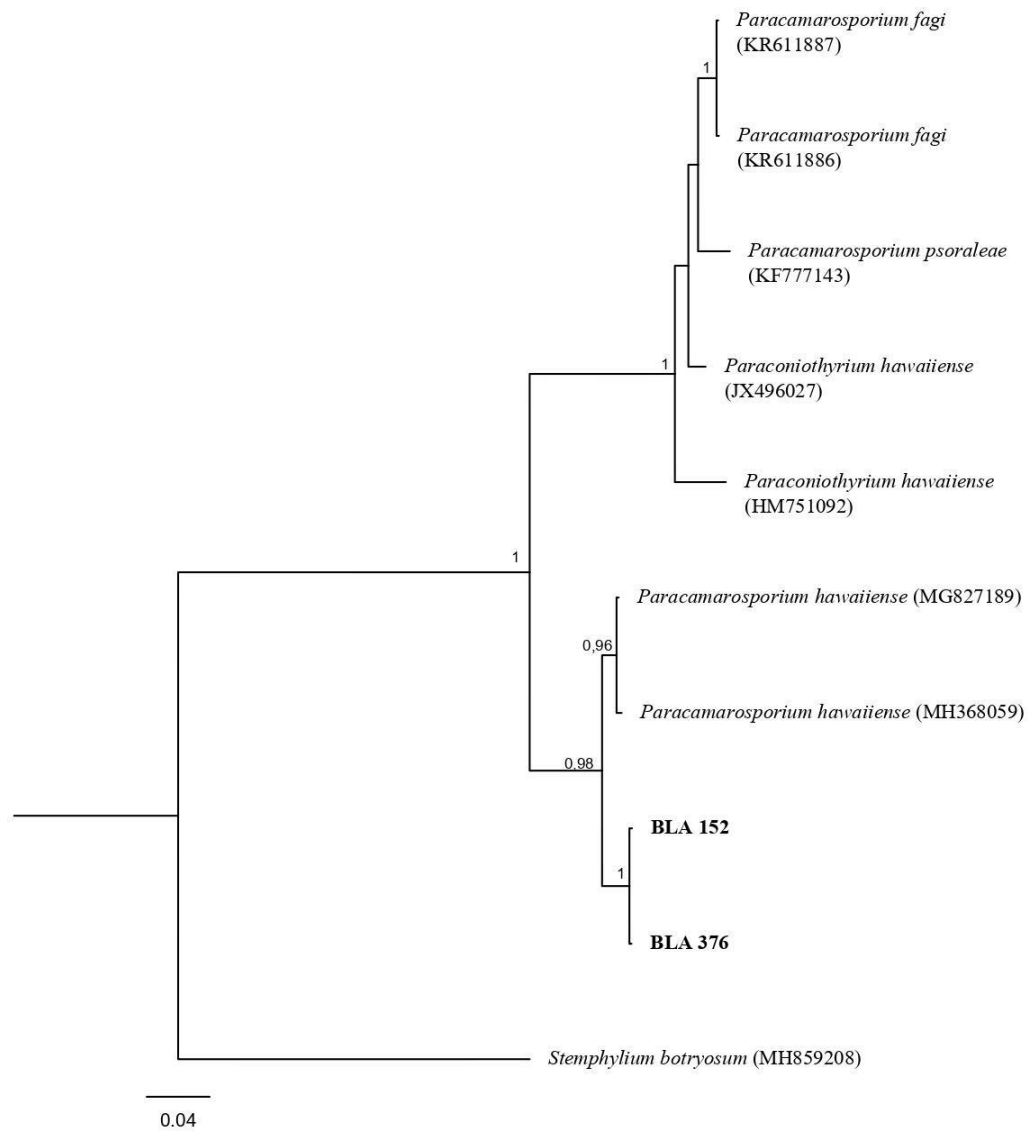
Apêndice L: Árvore filogenética do gênero *Myrmecridium* baseada na região ITS. A figura mostra os isolados BLA 133 (em negrito) dentro do clado de *Myrmecridium thailandicum*. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 13 sequências de ITS (558 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *Leotia lubrica* (JX178635) foi utilizada como *outgroup*.



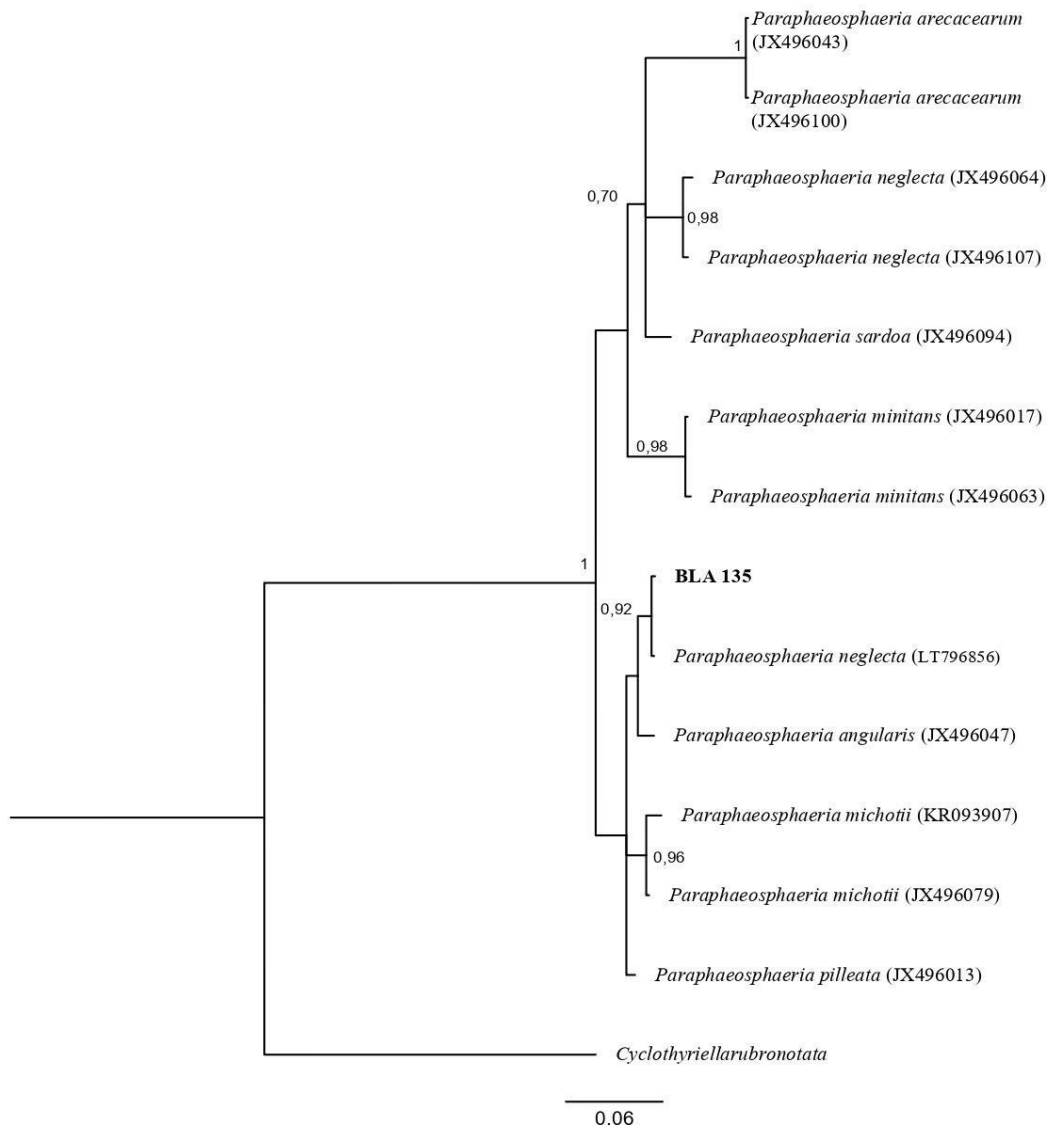
Apêndice M: Árvore filogenética do gênero *Neofusicoccum* baseada na região ITS. A figura mostra os isolados BLA 18, 183, 189, 193, 199, 321, 386, 406 e 423 (em negrito) dentro do clado de *Neofusicoccum* sp.. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 30 sequências de ITS (450 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *Botryosphaeria parva* (AY615136) foi utilizada como *outgroup*.



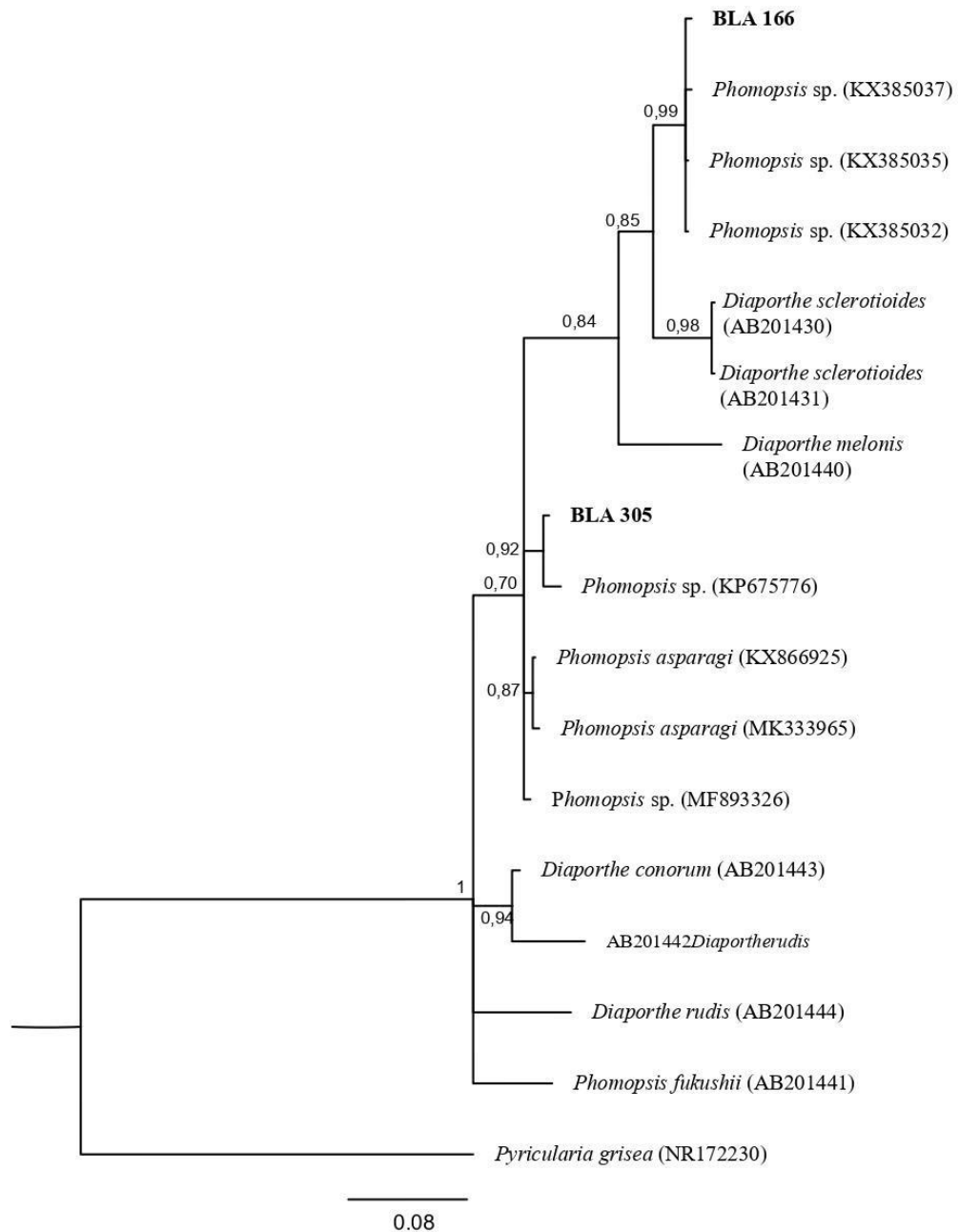
Apêndice N: Árvore filogenética do gênero *Pantospora* baseada na região ITS. A figura mostra os isolados BLA 173 e 380 (em negrito) dentro do clado de *Pantospora guazumae*. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 36 sequências de ITS (819 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *Dothiora ceratoniae* (KF251151) foi utilizada como *outgroup*.



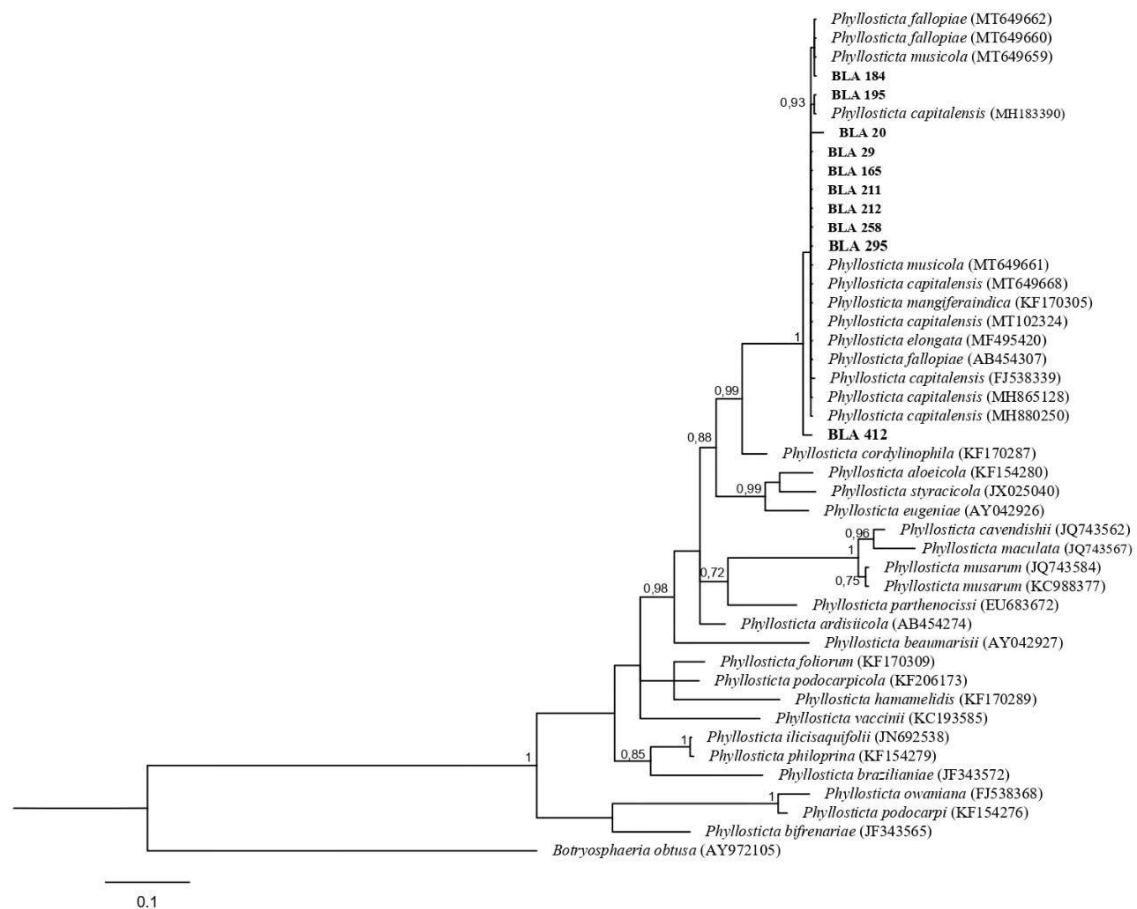
Apêndice O: Árvore filogenética do gênero *Paracamarosporium* baseada na região ITS. A figura mostra os isolados BLA 152 e 376 (em negrito) formando um clado monofilético com *Paracamarosporium hawaiiense*. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 42 sequências de ITS (815 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *Stemphylium botryosum* (MH859208) foi utilizada como *outgroup*.



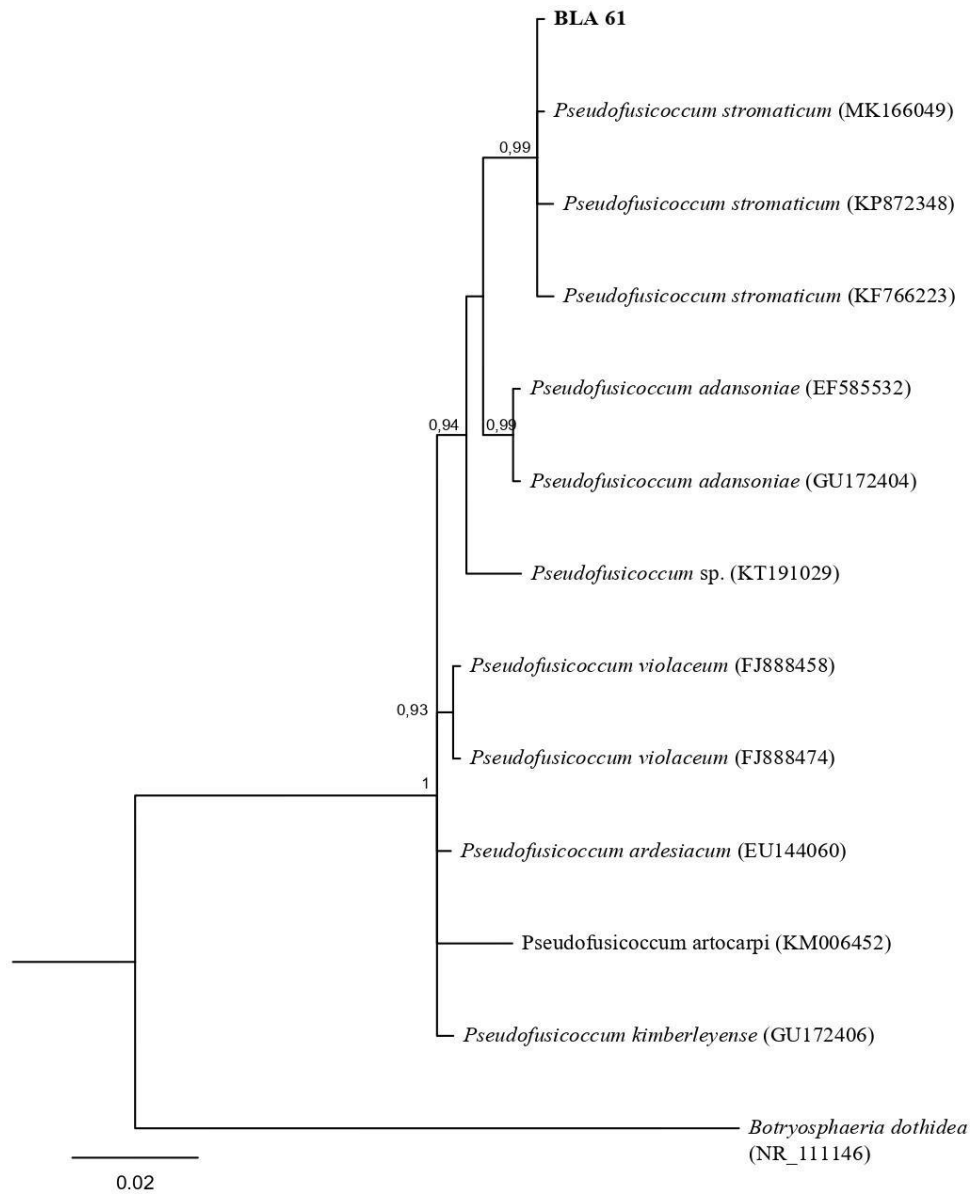
Apêndice Q: Árvore filogenética do gênero *Paraphaeosphaeria* baseada na região ITS. A figura mostra o isolado BLA 135 (em negrito) dentro do clado de *Paraphaeosphaeria neglecta*. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 14 sequências de ITS (552 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *Cyclothyriella rubronotata* foi utilizada como outgroup.



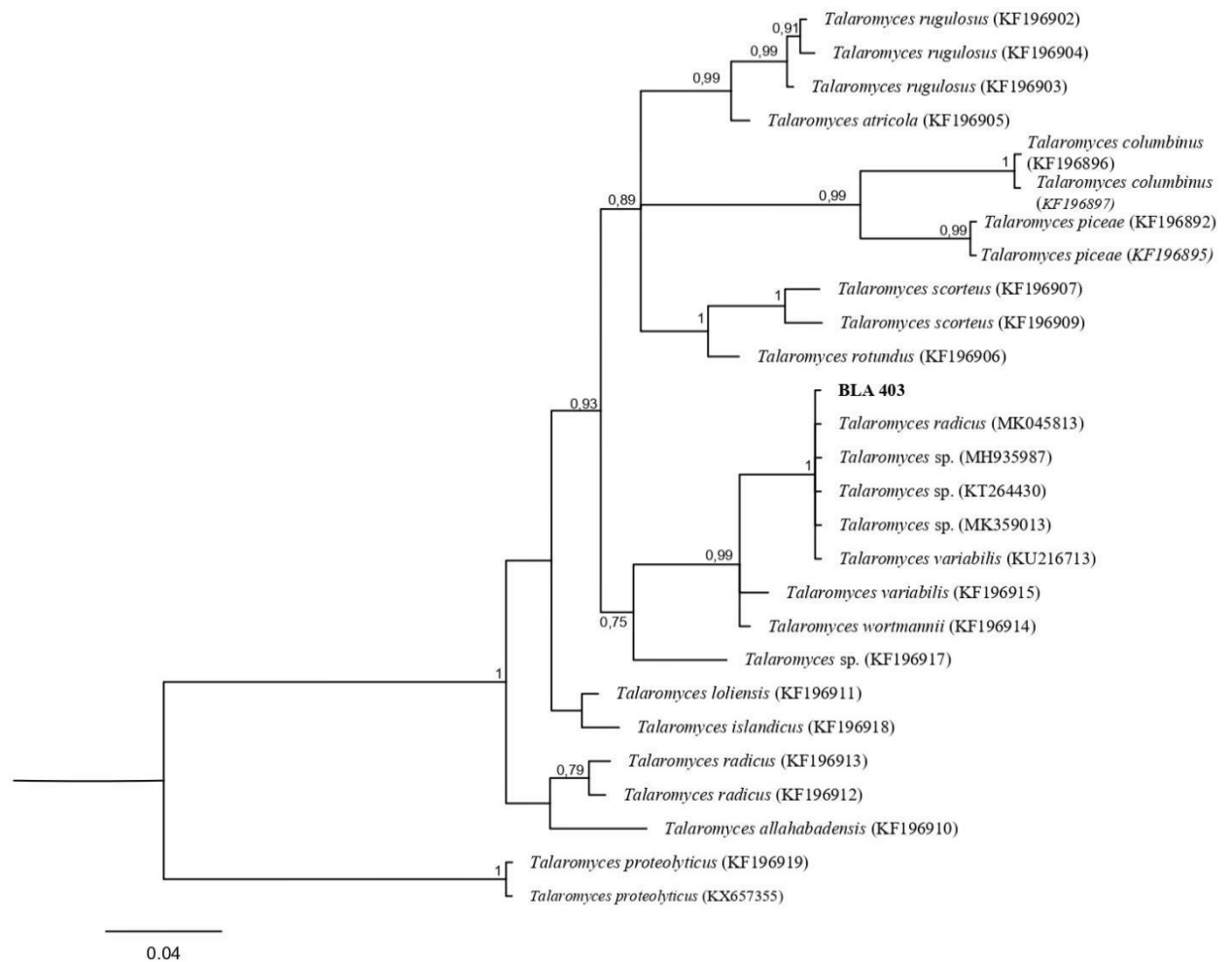
Apêndice R: Árvore filogenética do gênero *Phomopsis* baseada na região ITS. A figura mostra os isolados BLA 166 e 305 (em negrito) dentro do clado de *Phomopsis* sp.. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 17 sequências de ITS (535 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *Pyricularia grisea* (NR172230) foi utilizada como *outgroup*.



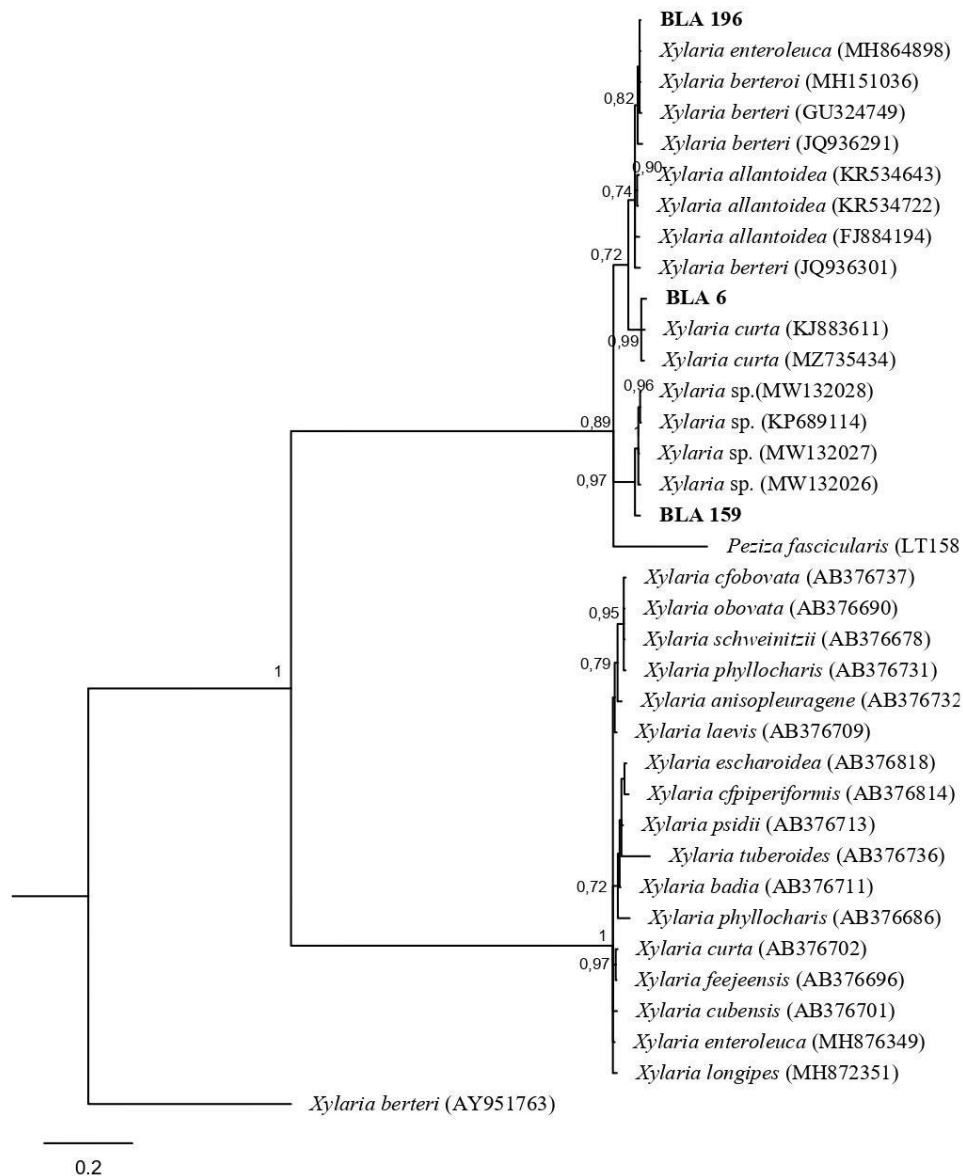
Apêndice S: Árvore filogenética do gênero *Phyllosticta* baseada na região ITS. A figura mostra os isolados BLA 20, 29, 165, 184, 195, 211, 212, 258, 295, 412 (em negrito) dentro do clado de *Phyllosticta* sp.. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 45 sequências de ITS (592 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *Botryosphaeria obtusa* (AY972105) foi utilizada como *outgroup*.



Apêndice T: Árvore filogenética do gênero *Pseudofusicoccum* baseada na região ITS. A figura mostra o isolado BLA 61 (em negrito) dentro de *P. stromaticum*. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 13 sequências de ITS (527 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *Botryosphaeria dothidea* (NR 111146) foi utilizada como *outgroup*.



Apêndice U: Árvore filogenética do gênero *Talaromyces* baseada na região ITS. A figura mostra os isolados BLA 403 (em negrito) dentro do clado de *T. radicus* e *T. variabilis*. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 27 sequências de ITS (560 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *T. protelyticus* foi utilizada como *outgroup*.



Apêndice V: Árvore filogenética do gênero *Xylaria* baseada na região ITS. A figura mostra os isolados BLA 6, 159 e 196 (mostrados em negrito) dentro do clado de *Xylaria curta* e *Xylaria* sp.. A árvore foi reconstruída usando a inferência bayesiana com o modelo evolutivo GTR. A árvore apresenta um total de 36 sequências de ITS (740 pb). Os números nos ramos indicam valores de probabilidade a posteriori (valores abaixo de 0.7 foram excluídos). A linhagem *Xylaria berteri* (AY951763) foi utilizada como *outgroup*.

Apêndice X. Diversidade alpha de fungos endofíticos associados as plantas 1 e 2 de *Psidium cattleianum*.

Indivíduo	Riqueza	Chao1	Abundância	Shannon	Simpson 1-D	Pielou
Planta 1	17	41.8	139	1.69	0.72	0.59
Planta 2	16	20.4	255	1.34	0.55	0.48

Apêndice W. Diversidade alfa dos fungos associados a planta 1 e 2. A análise está organizado com base no método SF (semeadura de fragmentos) ou FP (filtração por partículas) e meio. A sigla NaN (Not a Number) foi adicionada nos casos onde números não puderam ser representados.

	Método	Meio	Riqueza	Abundância	Chao1	Shannon	Simpson 1-D	Pielou
Primeira planta	SF	MA	6	21	6.95	1.43	0.69	0.79
		BDA	7	28	12.78	1.47	0.7	0.75
		BCA	8	29	22.48	1.41	0.66	0.68
		DRB	5	25	5.96	1.23	0.65	0.76
		SNA	5	24	5.95	1.34	0.71	0.83
	FP	MA	2	2	2.5	0.69	0.5	1
		BDA	4	4	8.5	1.39	0.75	1
		BCA	2	2	2.5	0.69	0.5	1
		DRB	2	2	2.5	0.69	0.5	1
		SNA	1	2	1	00	0	NaN
Segunda planta	SF	MA	5	41	6.95	0.78	0.37	0.48
		BDA	7	49	9.94	1.24	0.58	0.64
		BCA	6	61	6.49	1.07	0.5	0.59
		DRB	7	55	9.94	1.2	0.56	0.62
		SNA	9	37	16.78	1.47	0.62	0.67
	FP	MA	1	1	1	0	0	NaN
		BDA	2	7	2	0.68	0.49	0.98
		BCA	2	2	2.5	0.69	0.5	1
		DRB	1	1	1	0	0	NaN
		SNA	1	1	1	0	0	NaN

Apêndice Y. Distância de similaridade entre as plantas 1 e 2 com base na análise de Jaccard e Bray-Curtis.

		Bray-Curtis		Jaccard			
		Planta 1		Planta 2	Planta 1		Planta 2
		SF	FP	SF	SF	FP	SF
Planta 1	FP	0.8992806			0.8235294		
	SF	0.6054054	0.9294118		0.7272727	0.7058824	
Planta 2	FP	0.9136691	0.5833333	0.9450980	0.9333333	0.7500000	0.8750000