

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 08/04/2018.

**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

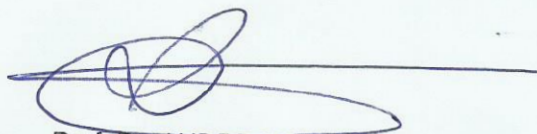
**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DIVERSIDADE E PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE
BEGONIA spp. ENCONTRADAS NA MATA ATLÂNTICA**

AUTORA: ANA MARIA LIMA CORREIA

ORIENTADOR: ANDRE RODRIGUES

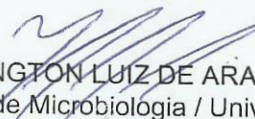
CO-ORIENTADORA: SIMONE POSSEDENTE DE LIRA

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

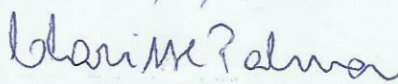


Prof. Dr. ANDRE RODRIGUES

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 Possidente 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.

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.