

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

MONA LISA VENÂNCIO DE SOUZA DOS SANTOS

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FOLÍOLOS  
DE AROEIRA-DA-PRAIA (*Schinus terebinthifolius* Raddi)

RECIFE

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

MONA LISA VENÂNCIO DE SOUZA DOS SANTOS

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FOLÍOLOS  
DE AROEIRA-DA-PRAIA (*Schinus terebinthifolius* Raddi)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos na área de concentração Taxonomia Aplicada sob a orientação da Profa. Dra. Oliana Maria Correia Magalhães e co-orientação da Profa. Dra. Cristina Maria de Souza-Motta.

RECIFE

2013

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Santos, Mona Lisa Venâncio de Souza dos**  
**Potencial antifúngico de fungos endofíticos isolados de folíolos de**  
**aroeira-da-praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi)/ Mona Lisa Venâncio de**  
**Souza dos Santos– Recife: O Autor, 2013.**

**60 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Olíana Maria Correia Magalhães**

**Coorientadora: Cristina Maria de Souza-Motta**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,**  
**Centro de Ciências Biológicas, Biologia de Fungos, 2013.**

**Inclui bibliografia**

- 1. Fungos 2. Anacardiaceae 3. Fungicidas I. Magalhães, Olíane Maria**  
**Correia (orientadora) II. Souza-Motta, Cristina Maria de**  
**(coorientadora) III. Título**

**579.5**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB- 2013- 325**

MONA LISA VENÂNCIO DE SOUZA DOS SANTOS

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE  
FOLÍOLOS DE AROEIRA-DA-PRAIA (*Schinus terebinthifolius* RADDI)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos na área de concentração Taxonomia Aplicada sob a orientação da Profa. Dra. Oliana Maria Correia Magalhães e co-orientação da Profa. Dra. Cristina Maria de Souza-Motta.

Aprovada em: 07/03/2012

BANCA EXAMINADORA

---

Dra. Oliane Maria Correia Magalhães - Orientadora  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. José Odair Pereira - Membro externo ao programa  
Universidade Federal do Amazonas

---

Dra. Neiva Tinti de Oliveira – Membro interno ao programa  
Universidade Federal de Pernambuco

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha existência e por estar sempre ao meu lado cuidando de mim.

Aos meus pais, José Venâncio e Mônica, por todo o esforço realizado para me proporcionar sempre o melhor. Em especial à minha mãe pela paciência, incentivo, motivação, cuidado e amor a mim sempre dedicados, seu apoio sempre foi assencial em tudo que eu fiz até hoje e me dá forças para prosseguir.

A minha irmã Monique, que me acompanhou tantas vezes ao laboratório, pela assistência, paciência e compreensão nos momentos difíceis, e ao meu irmão pelo incentivo que sempre me deu em seguir em frente e orações feitas por mim, juntamente com minha cunhada Patrícia.

A minha família: Vovó, Vovô, tias, tios e primos que torceram e torcem pelo meu sucesso.

As minhas amigas Vanessa Régia e Rhosana Soriano que mesmo de longe nunca deixaram de se fazer presente na minha vida pela amizade e carinho. À minha amiga Luanna Ribeiro que tanto me motivou a prosseguir meus estudos e esteve sempre disposta a ajudar no que pudesse, e aos professores Ana Mendonça e Amâncio cuja amizade e carinho são sempre motivadores.

A minha orientadora a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Oliane Maria Correia Magalhães por ter me aceitado como orientanda, pela confiança que teve em mim, ensinamentos, disponibilidade e bom-humor diante das dificuldades. À minha co-orientadora a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Maria de Souza-Motta pelos ensinamentos e contribuição importantes neste trabalho e pelo suporte técnico da Micoteca. À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Janete Magali pela confiança e disponibilidade em ceder a mim um espaço no seu laboratório para a realização dos experimentos. Ao Prof. Dr. Bruno Severo pelos ensinamentos e amizade.

A minha amiga Dianny Vasconcelos por compartilhar comigo tantos momentos agradáveis e difíceis na realização deste trabalho, pela sua amizade sincera, compreensiva e sempre presente, a minha enorme gratidão e carinho.

À Tatianne Leite pela grande ajuda para iniciar este trabalho e pela disponibilidade em ouvir minhas dúvidas e me ajudar com os endofíticos no decorrer do mesmo e pela amizade. Ao Phelipe Oller pela contribuição imensa nas análises estatísticas. À Susane Chang pela disponibilidade em me ajudar em meio aos seus trabalhos.

À Ildnay, Michele, Daniela Buonafina, Adriana, Heloíza, Cyndy, Nadyr, Carla Bernardo, Evellin pelos momentos e conversas compartilhados, pela boa convivência no laboratório e apoio. A Thaís Feijó, Nelson e Fabíola que mesmo em laboratórios diferentes estiveram sempre muito próximos e solícitos.

Aos colegas do programa pelos momentos alegres e difíceis compartilhados na obtenção dos créditos.

À CAPES pela bolsa concedida.

Aos professores da Pós-graduação em biologia de fungos pelos conhecimentos transmitidos.

A todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

“Entrega teu caminho ao Senhor, confia Nele e o  
mais Ele fará.” Sl 37:5.

## RESUMO

Fungos endofíticos residem assintomaticamente na planta colonizando os tecidos internos durante algum momento do ciclo de vida. Plantas medicinais, como *Schinus terebinthifolius*, despertam interesse quanto às comunidades endofíticas pela relação entre suas propriedades e as de seus endófitos, contudo ainda é pouco estudada. Os objetivos deste trabalho foram isolar fungos endofíticos de *S. terebinthifolius* e caracterizá-los quanto à capacidade de inibir fungos filamentosos e leveduras patogênicos ao homem através de testes em meios sólido e líquido. Foram realizadas duas coletas, julho/2010 e fevereiro/2011 nos *Campi* da Universidade Federal de Pernambuco e da Universidade Federal Rural de Pernambuco, utilizando duas temperaturas de isolamento, 28°C e 18°C em ágar batata dextrose. Dos 960 fragmentos analisados, 364 (37,92%) foram colonizados, sendo isolados 397 fungos. Maiores frequências de colonização foram de *Guignardia bidwellii* (25,94%), *Colletotrichum gloeosporioides* (9,17%), *Phyllosticta* sp. (1,88%) e *Phomopsis* spp. (1,46%). Não houve diferença significativa, isoladamente ou combinadas, relacionando o número de fragmentos colonizados e de isolados em relação às variáveis área, período de coleta e temperatura de isolamento. Dentre os fungos, *G. bidwellii* e *C. gloeosporioides* apresentaram médias significativamente maiores do que os demais isolados. Houve diferença significativa, entre o número de isolados de cada espécie, e entre estes e as variáveis período e área. Fungos endofíticos como *G. bidwellii*, *C. gloeosporioides* e a morfoespécie 1 de *S. terebinthifolius* apresentaram atividade antifúngica contra dermatófitos e leveduras de interesse médico.

**Palavras-chave:** Fungos endofíticos. *Schinus terebinthifolius*. Atividade antifúngica.



## ABSTRACT

Endophytic fungi live asymptotically in plant colonizing the internal tissues some time during their life cycle. Medicinal plants such as *Schinus terebinthifolius*, arouse interest in endophytic communities by relationship between their properties and their endophytes, however it is still little studied. The objectives of this study was to isolate endophytic fungi from *S. terebinthifolius* and characterized them for their ability to inhibit molds and yeasts pathogenic to humans through testing in solid and liquid media. There were two collections, in July/2010 and February/2011 from Campi of Federal University of Pernambuco and Rural Federal University of Pernambuco, using two insulation temperature, 28 °C and 18 °C in potato dextrose agar. Of the 960 fragments analyzed, 364 (37.92%) were colonized, 397 fungi were isolated. Higher colonization frequencies were *Guignardia bidwellii* (25.94%), *Colletotrichum gloeosporioides* (9.17%), *Phyllosticta* sp. (1.88%) and *Phomopsis* spp. (1.46%). There was no significant difference, either alone or combined, relating the number of fragments colonized and isolated in relation to variables area, collection period and insulation temperature. Among the fungi, *G. bidwellii* and *C. gloeosporioides* showed significantly higher averages than the other strains. There was significant difference between the number of isolates of each species, and between these variables and the period and area. Endophytic fungi as *G. bidwellii*, *C. gloeosporioides* and morphospecies 1 from *S. terebinthifolius* showed antifungal activity against dermatophytes and yeasts of medical interest.

**Keywords:** Fungal endophytes. *Schinus terebinthifolius*. Antifungal activity.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <b>Pág.</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Figura 1 – Aroeira-da-praia, <i>Schinus terebinthifolius</i> . Aspecto das folhas.....                                                                                                                                                                                                    | 25          |
| Figura 2 – Colônias crescidas dos fungos endofíticos a partir dos fragmentos foliolares de <i>Schinus terebinthifolius</i> em ágar batata-dextrose, após 30 dias de incubação.....                                                                                                        | 33          |
| Figura 3 – Pontos de coleta dos dez espécimes de <i>Schinus terebinthifolius</i> . À esquerda, área 1, no Campus da Universidade Federal de Pernambuco e, à direita, área 2, no Campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco, ambas situadas na Região Metropolitana do Recife..... | 36          |
| Figura 4 – Frequência dos grupos de fungos endofíticos isolados de <i>S. terebinthifolius</i> em ágar batata-dextrose.....                                                                                                                                                                | 38          |
| Figura 5 – Distribuição dos isolados fúngicos dos folíolos de <i>Schinus terebinthifolius</i> .....                                                                                                                                                                                       | 38          |
| Figura 6 – Macro e microscopia de <i>Guignardia bidwellii</i> (A e B) e <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (C e D) isolados dos folíolos de <i>Schinus terebinthifolius</i> (aumento de 400X)....                                                                                      | 42          |
| Figura 7 – Zonas de inibição da Morfoespécie 1 frente à levedura <i>Candida parapsilosis</i> .....                                                                                                                                                                                        | 47          |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                     | Pág. |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Tabela 1 – Taxas de colonização dos fungos endofíticos isolados de folíolos de <i>Schinus terebinthifolius</i> de acordo com as variáveis: área, período de coleta e temperatura de isolamento..... | 34   |
| Tabela 2 – Fungos isolados de <i>Schinus terebinthifolius</i> <sup>1</sup> .....                                                                                                                    | 39   |
| Tabela 3 – Fungos isolados de <i>Schinus terebinthifolius</i> em relação à área de coleta <sup>1</sup> .....                                                                                        | 40   |
| Tabela 4 – Fungos isolados de <i>Schinus terebinthifolius</i> em relação ao período de coleta <sup>1</sup> .....                                                                                    | 41   |
| Tabela 5 – Espectro inibitório de fungos endofíticos isolados de folíolos de <i>Schinus terebinthifolius</i> ....                                                                                   | 45   |

## SUMÁRIO

|                                                                                         | Pág.      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                | <b>11</b> |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>                                                     | <b>13</b> |
| 2.1 Fungos endofíticos.....                                                             | 13        |
| 2.2 Importância dos fungos endofíticos.....                                             | 18        |
| 2.3 Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos.....                                 | 22        |
| 2.4 <i>Schinus terebinthifolius</i> .....                                               | 24        |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                       | <b>29</b> |
| 3.1 Áreas de coleta.....                                                                | 29        |
| 3.2 Isolamento de fungos endofíticos.....                                               | 29        |
| 3.3 Identificação dos fungos endofíticos.....                                           | 30        |
| 3.4 Atividade antifúngica em meio sólido.....                                           | 31        |
| 3.5 Atividade antifúngica em meio líquido.....                                          | 31        |
| 3.6 Análise dos dados.....                                                              | 32        |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                    | <b>33</b> |
| 4.1 Taxa de colonização.....                                                            | 33        |
| 4.2 Fungos endofíticos de <i>Schinus terebinthifolius</i> .....                         | 37        |
| 4.3 Atividade inibitória de fungos endofíticos de <i>Schinus terebinthifolius</i> ..... | 45        |
| <b>5 CONCLUSÕES.....</b>                                                                | <b>50</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                 | <b>51</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

As estimativas apontam que existam cerca de 1,5 milhão de espécies de fungos no mundo, embora o número de espécies conhecidas seja de 74 mil. Esses dados baseiam-se na quantidade de espécies de plantas e insetos existentes no planeta e na grande diversidade de fungos isolados a partir destas amostras, incluindo uma grande quantidade de espécies novas e não identificadas (HAWKSWORTH, 2001).

Os fungos endofíticos figuram entre aqueles associados às plantas de maneira assintomática (PETRINI, 1991) e, embora venham sendo muito estudados nas regiões temperadas, ainda existem muitas lacunas a respeito do seu estudo em ambientes tropicais, os quais só recentemente vêm sendo melhor analisados. Contudo os dados obtidos mostram que os hospedeiros tropicais abrigam uma grande diversidade de micro-organismos endofíticos, muitos destes ainda não classificados e possivelmente pertencentes a novos gêneros e espécies (AZEVEDO *et al.*, 2000).

Nas últimas décadas pode-se observar a crescente importância desse grupo com relação à produção de metabólitos secundários, entre os quais se destacam substâncias bioativas de grande potencial biotecnológico podendo vir a prover diferentes áreas da economia como a indústria farmacêutica com subsídios para novas descobertas, com a vantagem de controlar melhor as condições de cultivo (LACAVA; SEBASTIANES; AZEVEDO, 2010).

O estudo dos fungos endofíticos é muitas vezes direcionado às plantas que naturalmente são utilizadas na medicina popular para tratamento de doenças, pois muitas vezes os metabólitos secundários produzidos por estes fungos possuem as mesmas propriedades medicinais para as quais a planta é utilizada, se tratando até do mesmo composto (STROBEL, 2003).

*Schinus terebinthofolius*, popularmente conhecida como aroeira-da-praia, é uma planta de ampla distribuição no Brasil, de Pernambuco ao Rio Grande do Sul, utilizada na medicina popular no tratamento de lesões da pele como cicatrizante e adstringente, inflamação, câncer, alergias, bacterioses e micoses (ARAÚJO *et al.*, 2007; BIAVATTI *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2011; LORENZI, 2008; PEREIRA *et al.*, 2005). O uso na medicina popular motivou a confirmação de suas propriedades farmacológicas distribuídas nas diferentes partes da planta (CAVALHER-MACHADO *et al.*, 2008; JOHANN *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2006a; MESQUITA *et al.*, 2009).

Os avanços terapêuticos no tratamento de doenças imunossupressoras e maior sobrevivência de indivíduos imunodeprimidos representam um cenário favorável para o aumento da incidência das infecções fúngicas nesses indivíduos. Estes pacientes são muitas vezes acometidos com as formas clínicas mais graves de micoses, as quais são tratadas com drogas de elevada toxicidade, tornando seu estado ainda mais delicado, o que chama a atenção para a busca de recursos alternativos que levem a descoberta de novos agentes antifúngicos mais tolerados e, porque não, mais ativos (LACAZ *et al.*, 2002).

Neste sentido torna-se importante conhecer os fungos endofíticos de *S. terebinthifolius* e avaliar o seu potencial inibitório sobre fungos de interesse médico, dermatófitos e leveduras, supondo suas correlações com as propriedades farmacológicas da planta no sentido de contribuir para a descoberta de novas alternativas terapêuticas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Fungos endofíticos

De Bary (1866, apud HYDE; SOYTONG, 2008), numa definição ampla, introduziu o termo endófito para caracterizar qualquer organismo que ocorre nos tecidos internos das plantas, diferindo do termo análogo epifítico que caracteriza organismos que são encontrados na superfície dos vegetais (CLAY; SCHARDL, 2002). Carroll (1986, apud HYDE; SOYTONG; 2008, 1988) restringiu esta colonização às partes aéreas das plantas enfatizando seu caráter assintomático, onde se exclui aqueles associados às raízes tais como os fungos micorrízicos.

Muitas são as definições para micro-organismos endofíticos, mas, dentre todas, aquela que tem se mostrado mais abrangente e mais utilizada é a relatada por Petrini (1991), o qual considera micro-organismos endofíticos aqueles que residem nos órgãos da planta colonizando seus tecidos internos durante algum momento do seu ciclo de vida sem causar danos aparentes. Esta última generaliza a presença dos endofíticos em qualquer tecido da planta.

As definições encontradas procuram separá-los sempre dos fitopatógenos, embora Azevedo *et al.* (2000) considerem que se trate de uma divisão apenas didática e haja apenas um gradiente separando-os e os limites dessa separação tornam-se muitas vezes difíceis de serem determinados. Segundo Azevedo *et al.* (2002) até então todas as espécies vegetais estudadas abrigam uma comunidade endofítica ao menos em alguma fase do seu ciclo de vida.

Bactérias e fungos são os componentes mais estudados deste grupo de organismos e que podem estar presentes simultaneamente na planta (BANDARA; SENEVIRATNE; KULASOORIYA, 2006).

Os fungos endofíticos representam um grupo heterogêneo onde se encontram Basidiomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes e fungos anamorfos, sendo estes dois últimos os mais frequentemente isolados (HYDE; SOYTONG, 2008; KHAWAR *et al.*, 2010; OSES *et al.*, 2006a; STROBEL; DAISY, 2003).

A penetração destes fungos no tecido vegetal pode ocorrer através de aberturas naturais, como os estômatos e hidatódios, de ferimentos abertos nos tecidos ou cicatrizes e através das raízes. A penetração ativa pode ocorrer com a produção de enzimas ou estruturas que facilitam a penetração do fungo no tecido (AZEVEDO, 1998). Estes constituem modos de

transmissão horizontal destes fungos, enquanto que a transmissão vertical também ocorre através das sementes a depender da espécie fúngica. (MARSHALL; TUNALI; NELSON, 1999). No interior do hospedeiro, os endófitos ocupam o interior dos tecidos vasculares ou espaços intercelulares (AZEVEDO *et al.*, 2002).

No vegetal, o genótipo e fisiologia são determinantes no tipo de relação que uma mesma espécie de fungo venha a ter com hospedeiros diferentes. Estudos indicam que exista uma plasticidade no tipo de simbiose que os fungos realizam com a planta, onde tanto patógenos quanto mutualistas e sapróbios penetram nos tecidos vegetais e permanecem latentes como uma estratégia para captar os nutrientes do hospedeiro. Em troca, o fungo pode conferir à planta resistência a doenças, tolerância à seca e promoção do crescimento ao hospedeiro (REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001; RODRÍGUEZ; REDMAN, 2008).

*Deighthoniella torulosa*, isolado tanto como endofítico quanto patógeno em *Musa acuminata*, foram capazes de causar sintomas de doença (manchas nas folhas) independente da maneira como foram inoculados com ou sem o ferimento do tecido vegetal, indicando que um estágio endofítico tenha sua importância no ciclo de vida do patógeno (PHOTITA *et al.*, 2004).

É importante destacar que muitos representantes dos gêneros *Colletotrichum*, *Guignardia* e *Fusarium* são patógenos comuns de culturas de interesse econômico, ainda que não deixem de figurar entre os principais gêneros de endofíticos frequentemente isolados (ABANG *et al.*, 2002; ALVES-SANTOS *et al.*, 2002; BAAYEN *et al.*, 2002; PHOTITA *et al.*, 2001; SIQUEIRA *et al.*, 2011).

Estudos filogenéticos confirmam que espécies de *Colletotrichum*, *Fusarium* e *Guignardia* isoladas comumente como endofíticos e saprobios guardam estreita similaridade, dentro de cada gênero, ou mesmo se tratam da mesma espécie mostrando a probabilidade de que haja uma mudança no modo de vida do fungo diante da senescência do hospedeiro, inclusive no que diz respeito ao seu modo de reprodução (PROMPUTTHA *et al.*, 2007).

Oses e colaboradores (2006a) mostram a transição dos endofíticos a sapróbios e sua disseminação neste tecido ao longo da decomposição do xilema de angiospermas e gimnospermas, o que mostra a importância da presença destes fungos no interior dos tecidos vegetais mesmo após morte deste. Assim, estes fungos são capazes de produzir enzimas que participam dos processos de decomposição vegetal (OSES *et al.*, 2006b).

No trigo, fungos endofíticos exibiram seu papel protetor contra doenças ao reduzirem as pústulas causadas pelo patógeno *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, que é o fungo agente da



ferrugem (DINGLE; MCGEE, 2003). *Pestalotiopsis jesteri*, um endofítico de *Fragaria bodenii*, produziu *in vitro* a jesterona um metabólito com atividade seletiva contra *Pythium ultimum* um Oomycete que figura entre os mais importantes patógenos de plantas (LI; STROBEL, 2001).

As plantas podem abrigar fungos endofíticos em graus diferentes de colonização (HUANG *et al.*, 2007) e altas taxas de colonização podem ser encontradas em líquens (LI *et al.*, 2007a), em plantas medicinais, plantas tropicais (RAKOTONIRIANA *et al.*, 2008), sendo essa taxa influenciada por vários fatores. Assim como pode ser observada uma maior taxa de colonização com o aumento da idade ou o tipo do tecido vegetal em estudo, com variações dentro do próprio tecido, evidenciando uma relação dinâmica. A idade do tecido foliar mostra-se mais determinante para o aumento da taxa de colonização do que a precipitação de chuvas (FISHER *et al.*, 1994, SURYANARAYANAN; THENNARASAN, 2004).

Existem indicações de que a taxa de colonização dos tecidos desempenhe um papel importante na habilidade do vegetal em suportar o calor ou a seca por existir relação entre alta frequência de colonização e o ambiente estressante no qual a planta esteja inserida (PORRAS-ALFARO *et al.*, 2008)

Com relação à diversidade obtida a partir do isolamento, o tamanho do fragmento vegetal utilizado também guarda relação inversamente proporcional com a diversidade encontrada (GAMBOA; LAUREANO; BYMAN, 2002). Existem diferentes técnicas de isolamento aplicadas para a obtenção de fungos endofíticos e estas têm influência direta sobre a detecção e enumeração dos fungos isolados (ZHANG; SONG; TAN, 2006).

Entre as mais frequentes estão aquelas que utilizam fragmentos do tecido vegetal e meios de cultura variados como ágar-água, extrato de malte ou batata-dextrose, este último o mais comum. Os períodos de isolamento variam de dez dias a dois meses e a temperatura de isolamento mais utilizada é 28°C, mas podem variar até 37°C (AZEVEDO *et al.*, 2002; JIANQIU *et al.*, 2008; LARRAN; MÓNACO; ALIPPI *et al.*, 2001; SURYANARAYANAN; TEJESVI *et al.*, 2011; THENNARASAN, 2004). Azevedo *et al.* (2002) ainda sugere isolamentos em temperaturas mais baixas como 18°C para possibilitar a obtenção de fungos menos frequentes e de crescimento mais lento, possibilitando desta forma uma maior diversidade.

Técnicas para a eliminação dos micro-organismos epifíticos se utilizam de compostos clorados como o hipoclorito de sódio ou de cálcio como principal agente desinfetante que, de acordo com a textura do vegetal, podem ser em concentrações que variam de 0,5% a 4% e

tempos que variam de 2 a 4 minutos. A verificação da eficiência do processo de eliminação dos epifíticos é realizada geralmente pela semaedura de alíquotas da última água de lavagem, mas também pode ser realizado pelo “imprint” do material vegetal tratado no meio de isolamento e posterior incubação apenas do meio de cultura, ambos se mostrando eficientes para essa verificação (AZEVEDO *et al.*, 2002; RAKOTONIRIANA *et al.*, 2008; SÁNCHEZ-MÁRQUEZ; BILLS; ZABALGOGEAZCOA, 2007).

Técnicas de biologia molecular são importantes na detecção de fungos não cultiváveis em meios de cultura ou para aqueles cujo crescimento lento é superado por fungos que crescem mais rapidamente, proporcionando um conhecimento mais abrangente da comunidade endofítica presente naquele tecido, encontrando-se altos índices de diversidade (PORRAS-ALFARO *et al.*, 2008). Estas técnicas são também uma boa ferramenta na identificação daqueles isolados que, mesmo diante da aplicação de estratégias para a indução de esporulação (GUO; HYDE; LIEW, 1998), não produzem estruturas reprodutivas necessárias a sua identificação pelos métodos taxonômicos clássicos (STROBEL; DAISY, 2003).

Tecidos diferentes da planta tendem a apresentar uma diferença nas suas comunidades de endófitos (FISHER *et al.*, 1994). Folhas apresentam em geral altas taxas de colonização e diversidade, enquanto em outros tecidos como o xilema esses índices apresentam-se menores (OSES *et al.*, 2006a). Plantas de uma mesma família podem guardar um maior grau de similaridade entre as suas comunidades de endófitos em comparação com plantas pertencentes a famílias diferentes, indicando certa preferência a este nível (JIANQIU *et al.*, 2008).

Em duas ou mais localidades, a despeito das diferenças do ambiente, plantas de uma mesma espécie podem ter um núcleo frequente de endófitos, isto é gêneros ou espécies que são comumente isolados (KHARWAR *et al.*, 2008) e espécies específicas de uma referida localidade, inclusive em se tratando de área nativa ou não (FISHER *et al.*, 1994). Ao passo que mesmo entre as espécies mais frequentes, sua proporção pode variar de acordo com a localização do vegetal ou a estação do ano (TEJESVI *et al.*, 2005). Hashizume, Sahashi e Fukuda (2008) encontraram variações nas frequências de isolamento dos principais fungos endofíticos isolados das folhas de *Quercus acuta*, os quais compreenderam *Phomopsis* sp., *Discula* sp. e um isolado não identificado, onde as frequências dos dois primeiros aumentou com o aumento da altitude, enquanto que a do terceiro teve sua frequência diminuída na mesma situação.

De acordo com a sua localização geográfica as plantas podem oferecer um ambiente diferente para o estabelecimento da relação de simbiose. Comparando-se zonas árticas e tropicais, encontramos, com a diminuição da latitude, um ganho em diversidade e nas taxas de colonização dos tecidos com variações tão extremas quanto de 1 a 99%. O número de espécies de incidência pontual, aquelas que ocorrem apenas uma vez durante o isolamento é alto, tendo participação importante no incremento da diversidade (ARNOLD; LUTZONI, 2007).

A associação endófito-planta traz ao hospedeiro vantagens evidentes quanto ao crescimento. Os benefícios trazidos ao crescimento do hospedeiro, não provêm apenas da simples associação, mas relacionam-se diretamente também com a disponibilidade de nutrientes e água acessíveis à planta naquele ambiente, havendo diferentes respostas a estas condições. Plantas colonizadas por endofíticos sujeitas à fertilização e estresse hídrico tiveram um incremento da rede fotossintética em relação a plantas livres de endófitos. Enquanto que diante de um maior aporte de água e diminuição da fertilização plantas não-colonizadas alocaram mais nutrientes para os processos fotossintéticos, e aquelas colonizadas destinaram-se a incrementar os mecanismos de defesa (FAETH; FAGAN, 2002; REN *et al.*, 2011).

As vantagens trazidas pela simbiose fungo-planta tais como termotolerância ou proteção a patógenos vão estar diretamente relacionadas ao estresse ambiental que a planta possa sofrer, onde a associação funciona como um “gatilho” para ativar mais rapidamente os sistemas de resposta ao estresse, determinando o êxito do vegetal em colonizar o ambiente (REDMAN *et al.*, 1999, REDMAN *et al.*, 2002). Outras pressões do ambiente podem agir diretamente na comunidade de endofíticos da planta como é o caso da herbivoria, a qual favorece a presença de endófitos produtores de alcalóides em gramíneas (FAETH; FAGAN, 2002).

Na interação do endófito com o hospedeiro podemos ter tanto aqueles que são simples simbioses, não trazendo benefícios evidentes para o vegetal, como também aqueles que podem trazer benefícios à planta pela produção de substâncias tipicamente produzidas pela mesma, como os hormônios, a exemplo das auxinas, reguladoras do crescimento das plantas, e seus precursores, como o ácido 3-indol-acético e o ácido 3-indol-pirúvico produzido pela levedura *Williopsis saturnus* introduzida em plântulas de milho (NASSAR; EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM., 2005). *Penicillium* sp. isolado das raízes de *Chrysanthemum coronarium* foi capaz de produzir as giberelinas fisiologicamente ativas GA3, GA4 e GA7 em

quantidades maiores do que *Fusarium fujikuroi*, único organismo até então capaz de excretar giberelinas em quantidades industrialmente viáveis (HAMAYUN *et al.*, 2010).

Não apenas a relação com o vegetal e o ambiente, mas também a interação do endófito com outros grupos de organismos irão exercer influência no benefício ou não que possa resultar da simbiose. Fungos endofíticos podem exercer interações antagônicas espécie-específicas com outras comunidades de fungos presentes na planta como provocar redução da colonização por fungos micorrízicos. Estas interações chegam a afetar, inclusive, os níveis de metabólitos bioativos produzidos pelos endófitos tais como substâncias alcalóides (LIU *et al.*, 2011).

Interações destes fungos com outros grupos de organismos também tem influência positiva na eficiência do fungo em promover determinado benefício como é o caso da termotolerância promovida por *Curvularia protuberata* em *Dichanthelium lanuginosum* (gramínea) e em *Solanum lycopersicon* (tomate) a qual só acontece se o fungo estiver sendo parasitado pelo vírus CThTV (*Curvularia thermal tolerance vírus*) (MÁRQUEZ *et al.*, 2007).

Vantagens maiores podem ser obtidas a partir de estudos destas relações entre os diferentes grupos habitantes dos tecidos vegetais. *In vitro* fungos e bactérias endofíticas formando biofilmes produziram quantidades maiores de substâncias semelhantes ao ácido indolacético do que culturas isoladas ou mistas dos mesmos, o que pode ser útil para a produção de um inóculo com intuito de aumentar a produção em agrossistemas visto que estas substâncias redutoras do pH podem proporcionar uma maior proteção à planta (BANDARA; SENEVIRATNE; KULASOORIYA, 2006).

Paralelamente às vantagens e complexos efeitos que os fungos endofíticos exercem nas plantas, estudos mais aprofundados tem encontrado aplicabilidades neste grupo que não se restringe às vantagens apenas dentro da relação fungo-hospedeiro cuja importância tem contribuído para o conhecimento e desenvolvimento biotecnológico.

## 2.2 Importância dos fungos endofíticos

Os fungos endofíticos são microrganismos cujas potencialidades ainda são pouco exploradas, porém estes vêm se mostrando uma fonte de compostos químicos que encontram aplicabilidade em áreas como a agricultura, a indústria e a medicina (KHAWAR *et al.*, 2010; OSES *et al.*, 2006b; STROBEL; DAISY, 2003).

Diante da escassez de recursos e restrições ao uso de substâncias como pesticidas e dependência dos fertilizantes artificiais em contrapartida com a forte demanda para o aumento da produção, vantagens da associação acrescentadas à cultura como promoção do crescimento, supressão de doenças e ataque de insetos, tolerância ao calor, seca e salinidade podem ser o ponto de equilíbrio para atender a essas exigências a partir do momento em que for melhor compreendida a dinâmica da relação endófito-planta-ambiente (DIENE; NARISAWA, 2009).

As aplicações dos endófitos na agricultura são amplas no que se refere ao controle biológico, agindo contra insetos-praga, quando atuam como entomopatogênicos, contra fitopatógenos, a partir da competição pelo fato de ambos ocuparem um nicho ecológico semelhante, e contra nematóides com a produção de substâncias nematicidas (LACAVA; SEBASTIANES; AZEVEDO, 2010).

Em *Theobroma cacao* (cacau) morfoespécies endofíticas além de *Colletotrichum gloeosporioides* e um isolado de *Trichoderma* foram eficientes *in vitro* e em testes de campo contra os fitopatógenos *Moniliophthora roreri*, *Phytophthora palmivora* e *Moniliophthora perniciosa*, agentes da podridão parda e negra e da “vassoura-de-bruxa”, respectivamente, doenças que prejudicam a produção do cacau na América do Sul. Os mecanismos de inibição apresentados por estes endofíticos envolveram competição, antibiose e micoparasitismo, observado pelo isolado de *Trichoderma* em *M. roreri* (LACAVA; SEBASTIANES; AZEVEDO, 2010; MEJÍA *et al.*, 2008).

Vega *et al.* (2008) isolaram de folhas, hastes, raízes e frutos de *Coffea arabica* (café) fungos endofíticos pertencentes a gêneros entomopatogênicos como *Acremonium*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Clonostachys* e *Paecilomyces*, dos quais *B. bassiana* e *C. rosea* mostraram-se patogênicos à broca do café, *Hypothenemus hampei*, que está entre as pragas que mais causam prejuízos às culturas de café no mundo todo, com um tempo médio de sobrevivência dos insetos de 5 e 15 dias para os respectivos tratamentos.

Estudos mostram o uso de fungos endofíticos como agentes no controle biológico de nematóides, que trazem danos à agricultura, constitui uma alternativa natural eficaz no combate ao problema. Segundo Schwarz *et al.* (2004) o ácido 3-hidroxipropiônico produzido pelos endófitos *Phomopsis phaseoli* e *Melanconium betulinum* desempenhou atividade nematicida em baixas concentrações, com LD<sub>50</sub> de 12.5–15 µg.ml<sup>-1</sup>, contra *Meloidogyne incógnita*. Outros fungos como, *Geotrichum* sp. isolado de *Azadirachta indica* produziu compostos epiméricos derivados do 1,3-oxazinano com atividade nematicida contra o parasita

*Bursaphelenchus xylophilus* e o sapróbio *Panagrellus redivivus* superiores a 50% em 48 horas (LI *et al.*, 2007b) e isolados não-patogênicos de *Fusarium oxysporum* e espécies de *Trichoderma* são os mais estudados neste sentido principalmente em culturas de arroz, tomate e banana (SIKORA *et al.*, 2008).

Uma gama de enzimas podem ser produzidas por este grupo de fungos dentre estas as lipases, amilases, proteases (MARIA; SRIDHAR; RAVIRAJA, 2005), lignocelulolíticas (OSES *et al.*, 2006b), tanases (MAHAPATRA; BANERJEE, 2009) e as queratinases (MORSY; EL-GENDY, 2009), todas de grande aplicação em âmbito industrial.

As substâncias larvicidas esterigmatocistina e a secosterigmatocistina do fungo *Podospira* sp. isolado de *Laggera alata* (Asteraceae) foram capazes de eliminar 95% das larvas do mosquito *Anopheles gambiae* em 24 horas nas concentrações de 100 e 294,5ppm, resultados comparáveis ao de inseticidas comerciais. Estes dados mostram a possibilidade de se encontrar nos endofíticos compostos larvicidas naturais mais seletivos, biodegradáveis e, portanto, menos agressivos ao meio ambiente (MATASYOH *et al.*, 2011).

Compostos orgânicos voláteis produzidos pelo fungo *Ascocoryne sarcoides*, isolado de *Eucryphia cordifolia*, incluíram acetatos de alquila, álcoois, e ácidos alcenos, cetonas, ésteres de cadeias curtas e médias, alguns constituintes do diesel, os quais podem ter aplicações como biocombustíveis e aditivos de biocombustíveis, o que sinaliza uma alternativa às fontes não renováveis a partir de uma maior compreensão e otimização dos processos da sua produção (GRIFFIN *et al.*, 2010; STROBEL *et al.*, 2008; STROBEL *et al.*, 2010).

Em ambientes impactados os fungos endofíticos também podem constituir uma ferramenta de biorremediação como, por exemplo, no caso de contaminação por metais pesados. Xiao *et al.* (2010) mostraram que o endofítico *Microsphaeropsis* sp. isolado de *Solanum nigrum* foi capaz de adsorver o cádmio disperso em solução aquosa em uma quantidade duas vezes maior do que aquela de outros adsorventes como o carbono ativado.

De interesse no âmbito da medicina e indústria farmacêutica estão os fungos endofíticos isolados por Wiyakrutta e colaboradores (2004) apresentaram atividade antimalárica contra *Plasmodium falciparum*, antiviral contra *Herpes simplex* tipo 1 e citotóxica contra células do carcinoma epidermóide oral e células de câncer de mama.

Os extratos de endófitos isolados das folhas e raízes de *Viguiera arenaria* e de folhas de *Tithonia diversifolia* expressaram inibição da atividade enzimática da gGAPDH em *Trypanosoma cruzi* e da adenina fosforribosiltransferase de *Leishmania tarentolae* e sua atividade citotóxica contra células T leucêmicas e de melanoma foram atribuídas à

nestriapirona obtida do fracionamento dos extratos ativos de *Glomerella cingulata* (GUIMARÃES *et al.*, 2008).

Wu e colaboradores (2009) testando a atividade antitrombótica de fungos endofíticos obteve do isolado de *Fusarium* sp. uma enzima fibrinolítica de 28-kDa com atividade enzimática comparativamente superior a plasmina e cuja análise das sequências internas não mostrou homologia com nenhum outro agente fibrinolítico conhecido indicando tratar-se de nova molécula.

Estudos são direcionados para o isolamento e conhecimento do potencial biotecnológico de fungos endofíticos de plantas medicinais pelo fato de que esses organismos muitas vezes podem compartilhar dos mesmos componentes bioativos do seu hospedeiro e, portanto das mesmas propriedades ou produzir derivados desses componentes que se apresentem ainda mais ativos do que aqueles produzidos pelo hospedeiro. Um exemplo é o taxol produzido primariamente por *Taxus brevifolia*, mas que também foi produzido pelo seu endofítico *Taxomyces andreanae*. Em *Taxus baccata* o isolado de *Gliocladium* sp. foi capaz de produzir taxol e seu precursor 10-deacetil bacatina III em concentrações de 10µg/l e 65µg/l, respectivamente, com atividade citotóxica contra células tumorais de leucemia, carcinoma epidérmico e câncer de mama (SREEKANTH *et al.*, 2009).

*Aspergillus niger* var *taxi* foi relatado por Zhao e colaboradores (2009) como um novo produtor de taxol isolado de *Taxus cuspidata*. A vantagem é a produção do referido composto a partir de uma fonte microbiana, tornando mais viável e eficiente a sua produção diante da escassez das fontes vegetais e dificuldades em seu cultivo (STROBEL, 2003, ZHOU *et al.*, 2010). Entretanto, a produção de taxol não é uma característica exclusiva dos fungos endofíticos de hospedeiros do gênero *Taxus*, pois segundo Vennila e Muthumary (2011) o fungo *Pestalotiopsis pauciseta* proveniente de *Tabebuia pentaphylla* foi capaz de produzir taxol em concentração estimada de 208 µg.L<sup>-1</sup>.

A atividade antioxidante de certos endófitos, tais como *Aspergillus nidulans* e *A. oryzae* obtidos de *Ginkgo biloba*, encontra-se diretamente relacionada com o conteúdo de compostos fenólicos e seus derivados, os flavonóides, produzidos pelo fungo, o que sugere que estas substâncias tenham importante contribuição nesta atividade e podem ser utilizadas para a produção de medicamentos naturais e precursores de drogas a partir destes fungos (HUANG *et al.*, 2007; QIU *et al.*, 2010).

Dentro do vasto leque de aplicabilidade dos fungos endofíticos pode-se observar a enorme quantidade daqueles que apresentam alguma atividade antimicrobiana, principalmente contra microrganismos de interesse médico (SIQUEIRA *et al.*, 2011).

### 2.3 Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos

Diante da necessidade urgente de elaboração de novos medicamentos eficientes principalmente contra infecções por micro-organismos, a exploração da natureza tem servido para a descoberta de novos compostos naturais ativos que podem dar suporte para a produção de novas drogas naturais ou semissintéticas, a partir das ferramentas da química combinatória (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003), neste sentido são grandes as potencialidades dos endofíticos e muitos estudos tem sido dedicados a este conhecimento.

Pode-se observar a atividade inibitória de fungos endofíticos não apenas em micro-organismos de interesse médico, mas também agrícola. A tricotecina é um éster não-volátil produzido pelo endofítico *Trichotecium roseum* isolado de *Maytenus hookeri* cuja atividade antagônica apresentada contra fungos fitopatógenos foi comprovada pelos ensaios em meio líquido utilizando o extrato do fungo obtido por fermentação (ZHANG *et al.*, 2010).

Botelho *et al.* (2007) mostram que compostos produzidos por endofíticos podem constituir-se em novas opções para resolver o problema da emergência de bactérias patógenas ao homem resistentes a antimicrobianos. Do mesmo modo, Tayung *et al.* (2011) também obtiveram atividade do metabólito bruto de *Fusarium solani* obtido de *Taxus baccata* contra *Candida albicans* e *C. tropicalis*, ambas as cepas resistentes ao fluconazol, agente antifúngico de referência.

Foi realizado um amplo estudo com 81 plantas medicinais oriundas da Tailândia pertencentes a 40 famílias das quais foram isolados fungos endofíticos com atividade antibacteriana contra *Micobacterium tuberculosis* (WIYAKRUTTA *et al.*, 2004).

De fungos endofíticos do café, *Coffea arabica* e *C. robusta*, foram isolados *Fusarium oxysporum*, *Glomerella* sp., *Aspergillus versicolor* e *Cladosporium* spp., os quais exibiram amplo espectro de atividade antibacteriana contra *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e contra quatro sorotipos diferentes de *Escherichia coli* (SETTE *et al.*, 2006).

Extratos de culturas submersas de diferentes fungos endofíticos exibiram atividade contra *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *Microsporum canis*, *A. flavus*, *A.*



*fumigatus*, *Trichophyton rubrum*, entre outros fungos, comparável a da anfotericina B não apenas em espectro, mas também em concentração e entre os compostos ativos isolados estão a arundifungina, cerulenina, esferopsidina A e o ascosteroside A e B (WEBER *et al.*, 2007).

Extratos etilacéticos dos fungos endofíticos isolados de *Vigueira arenaria* e *Tithonia diversifolia* exibiram atividade inibitória contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*, entre os quais isolados de *Glomerella cingulata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Guignardia mangiferae*, *Phomopsis longicolla*, *Penicillium ochrochloron*, *Cryptosporiopsis rhizophila*, *Fusarium* sp., *Phoma sorghina*, entre outros (GUIMARÃES *et al.*, 2008).

*Xylaria* sp. isolado de *Ginkgo biloba* produziu 7-amino-4-metilcumarina um composto com amplo espectro antimicrobiano que inibiu *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *Shigella* sp., *Yersinia* sp., *C. albicans*, *Penicillium expansum* e *Aspergillus niger* em concentrações inibitórias tão baixas quanto 4 e 6,3µg/ml mostrando também a potente atividade deste composto frente a estes patógenos (LIU *et al.*, 2008).

O endofítico *Phomopsis* sp. isolado de *Cistus monspeliensis* produziu derivados da ciclopentenona, a phomotenona, e duas novas cromonas, as phomocromonas A e B com propriedades contra o fungo *Microbotryum violaceum*, as bactérias *E. coli* e *Bacillus megaterium*, e contra a alga *Chlorella fusca* (AHMED *et al.*, 2011).

A partir de hastes de *Paeonia delavayi* isolou-se o endófito do gênero *Trichoderma* de onde foram extraídos sesquiterpenóides como o ácido tricodérico, o 2β-hidroxitricloacorenol, o ciclonerodiol, o óxido de ciclonerodiol e a sorbicilina todos com atividade inibitória frente a *E. coli* e *Staphylococcus albus* e graus variáveis de atividade contra *Shigella sonnei* e fungos fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Fusarium avenaceum*, *F. moniliforme* e *Pyricularia oryzae*, e patógeno ao homem *Hormodendrum dermatitidis* (WU *et al.*, 2011).

Siqueira e colaboradores (2011), a partir *Lippia sidoides* isolaram fungos endofíticos com atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e contra fungos filamentosos e leveduras, isto também foi observado como as propriedades do óleo essencial desta planta (BOTELHO *et al.*, 2007) e mostra que compostos produzidos por endofíticos podem constituir-se em novas opções para resolver o problema da emergência de bactérias patógenas ao homem resistentes a antimicrobianos.

Neste contexto, onde um amplo potencial biotecnológico pode ser constatado por estes habitantes internos das plantas, em especial daquelas com propriedades medicinais, faz-se necessário conhecer e explorar as comunidades endofíticas deste grupo de plantas cada vez

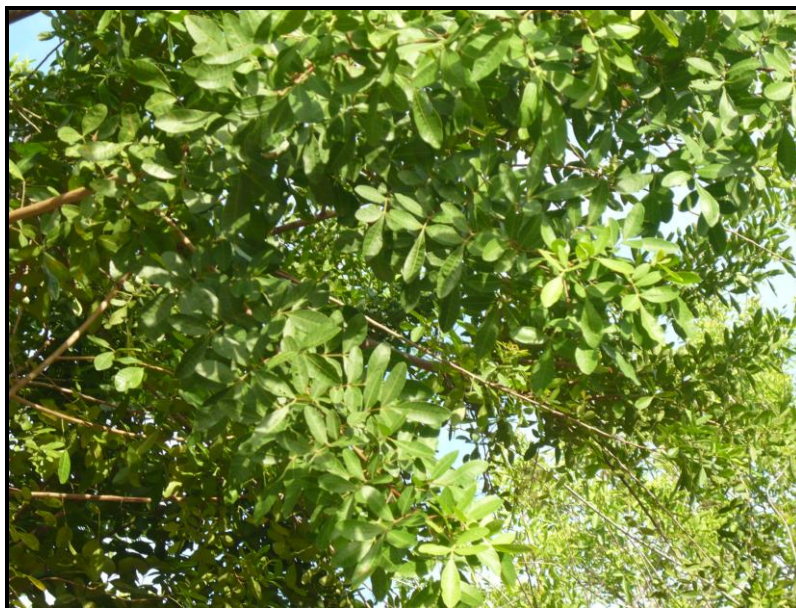
mais e é daí que surge a planta *Schinus terebinthifolius*, a aroeira, como objeto do presente estudo.

## 2.4 *Schinus terebinthifolius*

*Schinus terebinthifolius* é uma planta angiosperma da família das Anacardiaceae, perenifolia e pioneira, de ocorrência em floresta semidecidual de altitude, florestas pluviais e restinga, pode atingir uma altura de 5 a 10m. Também ocorre comumente na beira de rios, córregos e em várzeas úmidas, podendo também se desenvolver em terrenos pobres e secos. A distribuição é ampla no Brasil e abrange os estados de Pernambuco até Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul em várias formações vegetais. Dentre os seus nomes populares encontram-se: aroeira, aroeira-da-praia, aroeira-branca, aroeira mansa, aroeira-do-campo, aroeira-pimenteira, Cambuí, cabuí, bálsamo, etc. A dispersão de suas sementes é feita por pássaros, sendo, portanto, ampla (LORENZI, 2008).

O período de floração de *S. terebinthifolius* vai de setembro a janeiro e a frutificação estende-se de janeiro a julho, onde os frutos, drupas globosas, quando maduros, apresentam uma cor vermelho-brilhante, muito procurados pela avifauna e para usos na culinária como condimento. Apresenta uso ornamental na arborização urbana e paisagismo, e sua madeira é utilizada na produção de carvão e lenha. A casca é espessa e utilizada para o curtimento de couro e fortalecimento de redes de pesca. A madeira é moderadamente pesada, mole e resistente com grande durabilidade natural. A flor é pequena, branca e melífera e suas folhas são compostas formadas por 3 a 7 folíolos verdes e possuem forte aroma (Figura 1) (LORENZI, 2008).

Figura 1 - Aroeira-da-praia, *Schinus terebinthifolius*. Aspecto das folhas.



Fonte: a autora, 2012.

Embora considerada um problema no sul dos Estados Unidos, devido a ser uma planta invasiva (SPECTOR; PUTZ, 2004), levantamentos etnofarmacognósicos apontam propriedades medicinais como adstringente e cicatrizante inclusive em preparações cosméticas (BIAVATTI *et al.*, 2007).

Estudos etnobotânicos realizados no município de João Pessoa apontam sua utilização, dentre outras plantas medicinais, para o tratamento de afecções bucais através da ingestão da sua infusão por pacientes de unidades odontológicas do serviço público e privado devido às suas propriedades cicatrizante e antiinflamatória mostrando que é difundido o conhecimento das suas propriedades pela população (SANTOS *et al.*, 2009).

Produtos farmacêuticos são comercializados explorando suas propriedades medicinais, como o gel de aroeira, útil no tratamento de vaginoses bacterianas e com propriedades protetoras sobre a microbiota vaginal (AMORIM; SANTOS, 2003).

Um medicamento fitoterápico composto por extratos de *S. terebinthifolius*, *Piptadenia colubrina*, *Physalis angulata* e *Cereus peruvianus* possui comprovada atividade cicatrizante e baixa toxicidade (LIMA *et al.*, 2006b).

Estudos investigam e comprovam a atividade biológica de extratos de diferentes partes desta planta: casca do caule (MELO JÚNIOR *et al.*, 2002), caule (JOHANN *et al.*, 2007) e folhas (JOHANN *et al.*, 2008).

Seus extratos apresentam atividade comprovada contra fungos e bactérias, incluindo cepas resistentes a antibióticos convencionais (LIMA *et al.*, 2006a; JOHANN *et al.*, 2010).

Extratos etanólicos das folhas exibiram atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (MARTÍNEZ *et al.*, 1996).

O extrato da casca do caule foi efetivo na inibição de *Enterococcus* do grupo D, *Bacillus corineforme*, *Streptococcus*  $\beta$ -hemolítico, *S. viridans* e *Staphylococcus aureus* comparativamente semelhante à gentamicina (MELO JÚNIOR *et al.*, 2002).

Trabalhos relatam a atividade antifúngica do extrato etanólico das folhas deste vegetal contra os agentes fúngicos *Candida glabrata* e *Sporothrix schenkii* e do caule contra *Cryptococcus neoformans* (JOHANN *et al.*, 2007). O extrato aquoso das suas partes aéreas foram ativos contra *Candida albicans* (SCHMOURLO *et al.*, 2005).

Também foi demonstrada atividade inibitória de extratos etil-acéticos de *Schinus terebinthifolius* contra não apenas o crescimento, mas também a capacidade de adesão a células do epitélio bucal por *C. albicans* não apresentando citotoxicidade a macrófagos murinos, revelando o potencial desta planta na busca de novos compostos antifúngicos (JOHANN *et al.*, 2008).

O schinol, um composto bifênol, isolado da casca e folhas da planta, mostrou atividade contra cepas de *Paracoccidioides brasiliensis* incluindo efeito sinérgico em associação ao itraconazol, o que pode ser útil na busca pela otimização no tempo de tratamento (JOHANN *et al.*, 2010).

Extratos etilacéticos das folhas da aroeira-vermelha apresentaram alta atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais de glioblastoma, melanoma e carcinoma de cólon humano, assim como de outras plantas da mesma família como *Myracrodruon urundeuva* e *Tapirira guianensis* (MAHMOUD *et al.*, 2011).

Os extratos etanólicos apresentaram entre os principais compostos fenólicos identificados o ácido cafeico, o ácido cumárico e o ácido sirínico. A atividade antioxidante do extrato etanólico foi superior ao do óleo essencial e o extrato obtido com o diclorometano foi o que apresentou melhor desempenho antimicrobiano. Estes dados indicam a diversidade de compostos químicos presentes nas folhas destes vegetais e suas diferentes aplicabilidades (EL-MASSRY *et al.*, 2009).

Extratos foliares da aroeira-da-praia foram testados com relação à ação sobre lesões ulceradas induzidas na cavidade bucal de ratos e constatou-se sua atuação na reparação do tecido conjuntivo, aceleração da recuperação do tecido epitelial, diminuição do processo inflamatório crônico e aceleração da maturação do colágeno mostrando sua contribuição ao

processo de cicatrização (RIBAS *et al.*, 2006). Na alveolite induzida em ratos os extratos da casca do caule *Schinus terebinthifolius* demonstrou um bom desempenho no reparo da lesão com neoformação do tecido ósseo após 6 dias do tratamento (MELO JÚNIOR *et al.*, 2002).

O óleo essencial das folhas da aroeira da praia compreende em maior proporção sesquiterpenos com 56,96%, seguidos por monoterpenos oxigenados com 34,37%, monoterpenos com 4,97% e sesquiterpenos oxigenados com 3,32%, dentre estes a principal substância obtida foi o cis- $\beta$ -terpineol, mas também foram identificados o (E)-cariophileno, o  $\beta$ -cedreno e o citronelal (EL-MASSRY *et al.*, 2009).

O óleo essencial dos frutos contém o  $\alpha$ -pineno efetivo na indução da apoptose em células de melanoma metastático experimental com significativa redução do número dos nódulos, mostrando o potencial antitumoral de plantas medicinais da família *Anacardiaceae* (MATSUO *et al.*, 2011).

No óleo essencial das suas sementes foram detectados os compostos  $\delta$ -3-careno em proporção maior que 50%, seguido pelo  $\alpha$ -pineno, silvestreno, germacreno D,  $\beta$ -mircene e o isoterpinoleno. Larvas do mosquito transmissor da dengue e febre amarela *Stegomyia aegypti* foram susceptíveis ao óleo essencial das sementes da aroeira-da-praia com uma LD<sub>50</sub> chegando a 172,44 $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (SILVA *et al.*, 2010).

Das suas folhas foram obtidos compostos aromáticos tais como o ácido gálico (composto fenólico), o galato de metila (composto fenólico) e o 1,2,3,4,6-pentagaloilglucose (composto fenólico), possuindo estes dois últimos atividade anti-alérgica comprovada *in vivo* por meio da diminuição da desgranulação dos mastócitos, da formação do edema e do influxo de eosinófilos pelo decréscimo da produção de fatores de quimiotáticos dos eosinófilos (CAVALHER-MACHADO *et al.*, 2008).

A pentagaloilglucose é um composto de ampla ação produzido por *Schinus terebinthifolius*, entre estas anti-câncer. Estudos mostram seus efeitos *in vitro* contra o crescimento ou invasão do câncer de mama e do fígado, leucemia e melanoma, e *in vivo* contra o cancer de próstata, de pulmão, sarcoma e câncer de mama, com envolvimento da sua atividade anti-angiogênica neste processo, inibição da replicação do DNA e indução da apoptose. Propriedades anti-diabética, inibição da formação de gordura, efeitos anti-mutagênicos, anti-oxidantes direto e indireto, como antiviral e antibacteriano e atividade anti-convulsivante são só alguns dos efeitos farmacológicos e biológicos desta substância relatados na literatura (HAYASHI *et al.*, 1989, ZHANG *et al.*, 2009).

Soares e colaboradores (2007), avaliando a atividade antibacteriana da tintura da aroeira, constataram seu efeito inibitório sobre *Streptococcus mutans*, bactéria envolvida nos processos de formação da cárie, e reduziu significativamente a contaminação de escovas dentárias por este micro-organismo. Diferentes extratos da casca do caule da aroeira-da-praia foram eficazes em inibir o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antimicrobianos (LIMA *et al.*, 2006a).

O estudo das comunidades endofíticas em *Schinus terebinthifolius* são escassos e entre os endófitos isolados figuram fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Phomopsis*, *Colletotrichum* e *Trichaptum*, além do actinomiceto do gênero *Streptomyces* (GOMES, 2008; TONIAL, 2010). Entre estes isolados pode-se observar atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* comparáveis às do cloranfenicol e nistatina. A análise dos extratos ativos obtidos destes endófitos encontrou substâncias alcalóides entre os principais constituintes, indicando importante contribuição destas na atividade inibitória apresentada. Em menor proporção também estiveram presentes nesses extratos antraquinonas e terpenóides.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Área de coleta

A coleta das amostras de folíolos saudáveis de cinco plantas de *Schinus terebinthifolius* foi realizada em cada área nos *Campi* da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, área 1, e da Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, área 2, totalizando 10 plantas, onde o material vegetal de cada área e planta foi tratado separadamente. Foram realizadas duas coletas, uma no mês de julho de 2010 e outra no mês de fevereiro de 2011.

#### 3.2 Isolamento de fungos endofíticos

Os folíolos coletados foram transportados em sacos plásticos, devidamente identificados, acondicionados sob refrigeração e encaminhados para o Laboratório da Coleção de Culturas Micoteca- URM da UFPE, onde foram processados em 24 horas.

O material vegetal conduzido ao laboratório foi lavado em água corrente para a remoção de poeira e outros resíduos e, ao abrigo de capela de fluxo laminar, submetido a processo de desinfestação superficial para a eliminação dos micro-organismos epifíticos como se segue: imersão em etanol a 70% por 1 minuto, em hipoclorito de sódio (2-2,5% de cloro ativo) por 3 minutos, em etanol 70% por 30 segundos e lavados três vezes em água destilada esterelizada (ARAÚJO *et al.*, 2002).

Após o processo de desinfestação superficial, foram cortados de cada folíolo 16 fragmentos de aproximadamente 3X3 mm tendo sido utilizados três folíolos de cada planta, representando 240 fragmentos de cada coleta, 480 fragmentos de cada área, totalizando assim 960 fragmentos, os quais foram transferidos em condições assépticas para placas de Petri contendo o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) (g/L: batata 200, dextrose 20 e ágar 17) (LACAZ *et al.*, 2002) suplementado com 100mg/L de cloranfenicol incubadas a 28°C e a 18°C por até 30 dias, sendo observadas diariamente e as colônias fúngicas desenvolvidas foram purificadas e isoladas para posterior identificação. Em cada placa de Petri foram dispostos de maneira equidistante oito fragmentos de cada folíolo. Paralelamente, foi realizado o controle da eliminação dos epifíticos pela inoculação de 1ml da última água de lavagem em placas de Petri que foram acondicionadas nas mesmas condições do isolamento.

### 3.3 Identificação dos fungos endofíticos

Os fungos endofíticos foram identificados de acordo com as características morfológicas macroscópicas, tais como aspecto, coloração e diâmetro das colônias, e microscópicas, a partir das estruturas somáticas e reprodutivas, utilizando-se de literatura específica (BARNETT; HUNTER, 1987; DE HOOG *et al.*, 2000; DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 2007; ELLIS, 1971; HANLIN, 1990; PITT, 1988; SAMSON; FRISVAD, 2004; SIVANESAN, 1984; SUTTON, 1980).

De acordo com o fungo em estudo, fragmentos da cultura foram inoculados em ágar extrato de malte (g/L: extrato de malte 20, peptona 1, dextrose 20, ágar 20) (RAPER; FENNEL, 1977), ou BDA contidos em placas incubadas a 30°C por 15 dias e após este período, realizadas as diferentes análises fenotípicas como diâmetro, bordos, textura e coloração do verso e reverso das colônias, produção de pigmentos e tempo de crescimento.

A verificação das microestruturas somáticas e reprodutivas foi realizada através de microcultivos (cultivo sob lamínula) através da técnica de Dalmau (1929), onde fragmentos das colônias foram semeados em três pontos equidistantes da placa contendo o meio de cultura específico para cada grupo de fungos, e sobre estes colocadas lamínulas previamente esterilizadas. A preparação permaneceu a temperatura de 30°C por aproximadamente sete a 15 dias conforme espécie em estudo. Em seguida, a lamínula do cultivo, invertida, foi utilizada para a preparação da lâmina corada com Azul de Amann e observada ao microscópio óptico.

As culturas nas quais se verificou a ausência de produção de estruturas reprodutivas como esporóforos e esporos, foram observadas as estruturas somáticas à microscopia e a macromorfologia para sua separação em morfoespécies. Como métodos para estimular a esporulação foram utilizados: exposição à luz ultravioleta (UV) por um a dois minutos da cultura imediatamente após o semeio nos meios anteriormente utilizados, bem como após crescimento da colônia com cinco dias nas mesmas condições anteriores, incubação no escuro, meios de cultura diferentes como Ágar-água (g/L: ágar 15), Ágar-tomate (suco de tomate 50ml, água destilada 50mL, ágar 1,6 g), e Ágar-água adicionado de fragmentos autoclavados dos folíolos de *S. terebinthifolius* adicionados previamente às placas de Petri em quantidade de 1g por placa adaptado de Guo, Hyde e Liew (1998).

Realizada a identificação o material de interesse biotecnológico e/ou ecológico, pelo menos um exemplar de cada espécie endofítica é incorporado ao acervo da Coleção de



Culturas- Micoteca URM do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco.

Após identificação dos fungos, para a etapa seguinte, pelo menos um representante de cada táxon isolado de folíolos diferentes foi selecionado para o teste de atividade inibitória frente a fungos patogênicos ao homem.

### 3.4 Atividade antifúngica em meio sólido

A atividade antifúngica dos fungos endofíticos foi avaliada utilizando-se o teste do Bloco de Gelose com base na metodologia modificada por Ichikawa *et al.* (1971) que permite uma seleção qualitativa, de forma rápida, de possíveis produtores de substâncias antimicrobianas. Os fungos endofíticos foram cultivados em BDA contido em placas de Petri, por 10 dias a 30°C. Após crescimento das colônias, discos de micélio-ágar com 6 mm de diâmetro foram cortados com o auxílio de um furador esterilizado e dispostos na superfície de meio Ágar Sabouraud (g/L: dextrose 40, peptona 10 e ágar 17) (LACAZ *et al.*, 2002) semeado previamente com o fungo a ser testado, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *M. gypseum* URM 4964, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans* URM5544, *Candida albicans* URM6381, *C. glabrata* URM6392 e *C. parapsilosis* URM6379. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas no caso das leveduras e 5-7 dias no caso dos fungos filamentosos. Após este período, seguiu-se a medição dos halos de inibição em milímetros. Os testes foram realizados em triplicata.

### 3.5 Atividade antifúngica em meio líquido

O teste de Difusão em Disco, modificado de Bauer e colaboradores (1966), foi realizado para seleção do melhor meio líquido de cultivo para a produção do metabólito bioativo. A seleção dos fungos para o teste em meio líquido baseou-se no diâmetro das zonas de inibição e na variedade do espectro de ação contra os fungos-teste. Após o crescimento dos endofíticos selecionados por um período de sete dias em BDA e ágar extrato de malte, três discos de 6 mm das colônias fúngicas foram transferidos para frascos do tipo Erlenmeyer contendo 100 mL de meio de cultura Caldo Extrato de Malte e Caldo Batata Dextrose, pH 6,0 e 7,0, respectivamente, e incubados a 30°C em mesa rotatória a 180rpm e em estado estático por 10 dias. Ao final deste período a amostra do líquido metabólico foi retirada, filtrada e

centrifugada para separação entre a massa e o líquido metabólico, do qual foi aferido o pH final e armazenado a -20°C até o teste de atividade e da massa fúngica foi determinado o peso seco. O teste de atividade do líquido metabólico procedeu-se nas mesmas condições do teste anteriormente descrito com a seguinte modificação: substituição do disco de micélio ágar por disco de papel de filtro embebido com 10 µl do líquido metabólico concentrado a 25% do volume. O teste foi realizado em triplicata.

### 3.6 Análise dos dados

Na análise dos dados foram avaliadas as taxas de colonização (TC) através da razão entre o número de fragmentos com crescimento fúngico (Nf) e o número total de fragmentos (Nt) isolados do tecido vegetal ( $TC = Nf/Nt \times 100$ ) (ARAÚJO *et al.*, 2002) e a Frequência Relativa (FR) de isolamento foi calculada com o número de isolados de uma espécie dividido pelo total de número de isolados expressas em percentagens (PHOTITA *et al.*, 2001).

Para avaliar a interação dos fatores área, período e temperatura na taxa de colonização e números isolados foi realizado o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial. Cada fator teve dois tratamentos, totalizando seis, com cinco repetições (3 x 2 x 5). Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Para o cálculo foi utilizado o software Assistat - Assistência Estatística (SILVA, 2007). Para avaliar a interação dos fatores espécies de fungos, área e período foi realizado o mesmo delineamento e análise descrito acima.

A similaridade da micobiota endofítica de aroeira em relação às áreas de coleta foi calculada utilizando o coeficiente DICE (Sorensen) e construído o dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA utilizando o programa NTSYSpc 2.10.

Para determinação da zona de atividade antifúngica foi calculada a média aritmética.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Taxa de colonização

Dos 960 fragmentos dos folíolos de *Schinus terebinthifolius*, em 364 foram isolados fungos endofíticos (Figura 2), representando uma taxa de colonização total de 37,92%. No presente estudo a taxa de colonização em relação à área de coleta variou de 17,5% a 20,42%. Foram isolados apenas fungos filamentosos, o que se assemelha aos resultados obtidos por Tonial (2010), a qual também obteve fungos filamentosos e um actinomiceto a partir dos folíolos e não isolou leveduras.

Figura 2 - Colônias crescidas dos fungos endofíticos a partir de fragmentos foliolares de *Schinus terebinthifolius*, em ágar batata-dextrose, após 30 dias de incubação.



Fonte: a autora, 2012.

Para a primeira coleta, no mês de julho de 2010, as temperaturas médias, máxima e mínima, foram de 27 e 21°C e a precipitação acumulada mensal foi de aproximadamente 270mm e para a segunda coleta, no mês de fevereiro de 2011, estas variáveis foram de 30°C, 22°C e aproximadamente 230mm.

Com relação às variáveis: área, período de coleta e temperatura de isolamento, as condições onde se constatou maiores taxas de colonização foram o Campus da UFRPE (20,31%), o mês de julho (20,52%) e a temperatura de 18°C (19,58%) (Tabela 1).

Nessas condições, no mês de julho, 198 fragmentos foram colonizados por fungos, com taxa de colonização de 20,63% e em fevereiro, 166 com taxa de colonização de 17,29% (Tabela 1). Quanto à temperatura de isolamento, a taxa de colonização a 18°C foi de 19,58% e a 28°C, de 18,34%. Na UFPE a taxa de colonização foi de 17,5% e na UFRPE, de 20,42%. No entanto, diante destes valores, a análise estatística relacionando o número de fragmentos colonizados em relação a estas variáveis, isoladamente ou combinadas, mostrou que não houve diferença significativa. Vale mencionar que no isolamento realizado no mês de fevereiro, na área 1, a 28°C, não se obteve crescimento fúngico nos fragmentos dos folíolos de duas plantas estudadas.

Tabela 1 - Taxas de colonização dos fungos endofíticos isolados de folíolos de *Schinus terebinthifolius* de acordo com as variáveis: área, período de coleta e temperatura de isolamento.

| TAXA DE COLONIZAÇÃO DOS FUNGOS (%) |       |      |           |      |       |
|------------------------------------|-------|------|-----------|------|-------|
| ÁREA                               | JULHO |      | FEVEREIRO |      | TOTAL |
|                                    | 18°C  | 28°C | 18°C      | 28°C |       |
| UFPE                               | 5,83  | 5,21 | 3,54      | 2,92 | 17,5  |
| UFRPE                              | 4,9   | 4,69 | 5,31      | 5,52 | 20,42 |
| TOTAL                              | 10,73 | 9,90 | 8,85      | 8,44 | 37,92 |

Fonte: a autora, 2012.

Por outro lado, são muito variáveis as taxas de colonização de fungos endofíticos em material foliar de diferentes espécies vegetal com valores de 11 a 78%. A taxa de colonização dos folíolos de *S. terebinthifolius* (Anacardiaceae) de 37,92% constatada nesse trabalho é superior a encontrada nas folhas de *Rhus potanini* (Anacardiaceae) que foi de 2% (JIANQIU *et al.*, 2008), em *Acer truncatum* (Aceraceae) de 11% (SUN; GUO; HYDE, 2011), em *Dendrobium loddigesii* (Orquidaceae) de 18% (CHEN *et al.*, 2010). Entretanto taxas de colonização foliar superiores são relatadas por Siqueira *et al.* (2011) em *Lippia sidoides* (Verbenaceae) a taxa de colonização nas folhas foi de 50,4%; por Rakotoniriana *et al.* (2008) de 78% em folhas de *Centella asiatica* (Apiaceae); e por Arnold, Maynard e Gilbert (2001) em plantas tropicais panamenhas, incluindo um representante da família das Anacardiaceae, *Anacardium excelsum*, encontrou taxas de colonização próximas a 100%.

Tonial (2010) realizou isolamentos de fungos endofíticos de *S. terebinthifolius* nos meses de setembro e março de anos consecutivos e obteve taxas de colonização diversas não apenas entre si (76% e 50%, respectivamente), mas também daquelas encontradas no presente trabalho. Embora seja importante destacar que no trabalho citado as condições de coleta

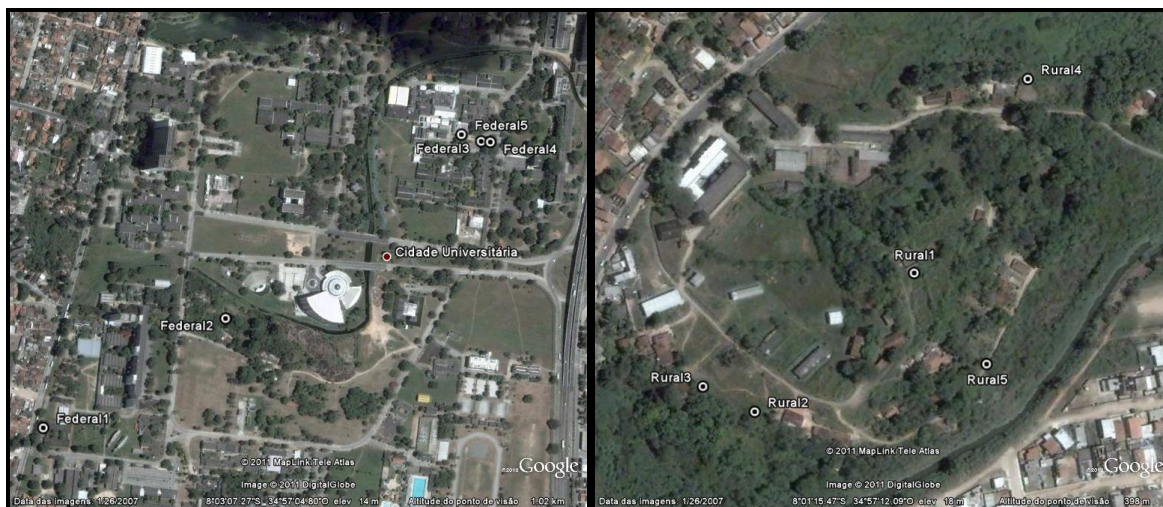
foram também diferentes, desde a área de coleta, no estado do Paraná, altitude da área (940m) e amostragem da planta envolvendo apenas um exemplar.

Segundo Taylor, Hyde e Jones (1999) a taxa de colonização das folhas de *Trachycarpus fortunei* (Palmae) por fungos endofíticos variou entre 23 e 57% em quatro sítios de amostragem. Os resultados destes estudos mostram que em diferentes áreas de coleta as taxas de colonização são passíveis de variações, como constatado no presente trabalho.

Em relação às áreas de coleta, as plantas da área 2 (Campus da UFRPE) tiveram uma maior taxa de colonização total, 20,42%, do que aquelas amostradas na área 1 (Campus da UFPE), 17,50%. A partir da imagem de satélite pode-se observar que, ao contrário da área 1 caracterizada por ambiente urbano cujas ações antrópicas incidem até sobre a vegetação do entorno, na área 2 as plantas encontram-se inseridas em um ambiente onde permanecem resquícios da vegetação nativa de mata Atlântica, a reserva de Dois Irmãos que oferece um habitat propício para abrigo de espécies animais e vegetais dentro do grande centro urbano que se caracteriza a Região Metropolitana do Recife, o que pode ter influenciado na maior colonização observada neste local, visto que há influência deste fator na diversidade e proporção da mesma em outros estudos segundo Fisher *et al.*, 1994.

A área de mata é de 380 hectares, onde a população ocupa e se utiliza dos recursos ao longo de todo o seu perímetro (LIMA; CORRÊA, 2005) (Figura 3). Taylor, Hyde e Jones (1999) trabalhando com a palmeira *Trachycarpus fortunei* observaram diferenças nas taxas de colonização dos espécimes analisadas dentro e fora de sua distribuição geográfica natural, onde estas últimas tiveram uma taxa de colonização inferior às primeiras, além disso também destaca a importância da vegetação adjacente no ambiente nativo, incluindo outras espécies de palmeira, como fator influente no incremento deste índice.

Figura 3 - Pontos de coleta dos dez espécimes de *Schinus terebinthifolius*. À esquerda, área 1 no Campus da Universidade Federal de Pernambuco e, à direita, área 2 no Campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco, ambas situadas na região Metropolitana do Recife.



Fonte: a autora, 2012.

Vários fatores influenciam os níveis de colonização incluindo as variáveis referentes ao isolamento que possuem influência direta sobre os fungos obtidos tanto em relação à quantidade quanto à diversidade. O meio de cultura utilizado, o ágar batata-dextrose está entre os mais frequentes utilizados em isolamentos de fungos endofíticos. Cao, You e Zhou (2002) mostram, em *Musa acuminata*, que dependendo do meio de cultura utilizado pode ser obtido um número maior ou menor de isolados endofíticos desta planta. Seguindo o que foi mostrado por Gamboa, Laureano e Byman (2002) o tamanho do fragmento utilizado no presente isolamento, 3X3mm, foi o mais próximo possível daquele recomendado no estudo citado, 2,5X2,5mm. O número de fragmentos em estudo, 960, encontra-se dentro da média dos fragmentos analisados em recentes estudos que variam entre 100 (XING *et al.*, 2011) e 2400 (TEJESVI *et al.*, 2005), sendo que a maioria dos estudos encontram-se dentro deste intervalo.

A idade do tecido vegetal, diferenças anatômicas no tecido, o tempo e a concentração de hipoclorito de sódio utilizados no protocolo de isolamento podem estar relacionados a variações nas taxas de colonização obtidas de fungos endofíticos em determinada planta. JianQiu *et al.* (2008) obtiveram taxa de colonização, bem como um número de isolados obtidos dos fragmentos (taxa de isolamento), diretamente proporcional à idade do tecido em galhos de *Rhus potanini*, Anacardiaceae, assim como também em indivíduos das famílias Eucommiaceae e Oleaceae. Cannon e Simmons (2002) obtiveram maior colonização nas nervuras do que no tecido laminar de folhas de 12 espécies diferentes de plantas, mostrando que diferenças anatômicas no tecido influenciam na colonização. Pereira, Lima e Azevedo

(1999) e Photita *et al.* (2001), em *M. acuminata*, obtiveram diferentes taxas de colonização de fungos endofíticos, 30,7% e 41,7-56,5%, utilizando hipoclorito de sódio em concentrações e tempos de 3% e 4 minutos e 1% e 3 minutos, respectivamente.

A amostragem dos indivíduos da espécie, dez plantas, mostrou-se de acordo com aquelas adotadas em trabalhos recentes como os de Hanada *et al.* (2010) que também utilizou dez indivíduos de *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu), e até superior aos de Fröhlich *et al.* (2000) com palmeiras das espécies *Licuala ramsayi* e *Licuala* sp., que utilizaram três indivíduos de cada espécie. Também foram encontrados na literatura trabalhos envolvendo apenas um indivíduo da espécie estudada como o de Souza *et al.* (2004) com *Strychnos cogens* e *Palicourea longiflora*.

Araújo *et al.* (2002) sugerem que uma amostragem suficiente é aquela que utiliza entre cinco e dez indivíduos para refletir o mais uniforme possível a comunidade endofítica presente no vegetal. Visto que foram obtidas espécies que predominaram entre os endofíticos das folhas da aroeira, pode-se constatar que a amostragem foi suficiente para refletir a comunidade endofítica das folhas desta planta na região analisada.

A altitude também é um fator que mostra influência sobre as frequências e diversidade dos fungos endofíticos isolados em determinado hospedeiro, onde algumas espécies não são isoladas, e quanto a este fator as áreas do presente estudo, situadas em média a 23m acima do nível do mar, em muito diferem daquela onde se processou a coleta realizada por Tonial (2010), de *Schinus terebinthifolius*, o que pode ter influenciado as diferenças observadas.

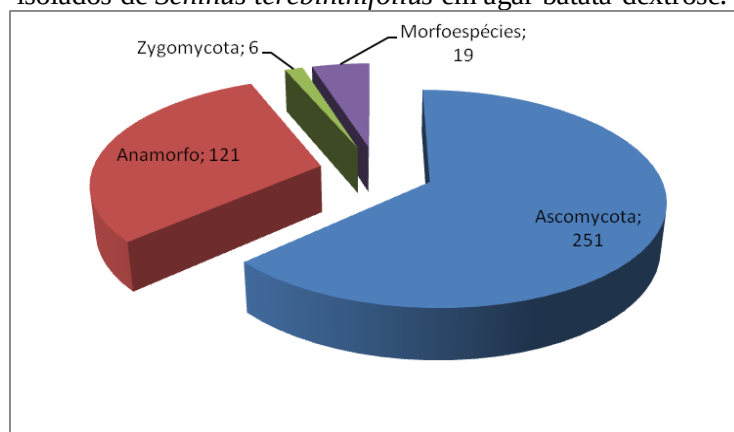
#### 4.2 Fungos endofíticos de *Schinus terebinthifolius*

Nas condições de cultivo, tamanho e número de fragmentos, meio de BDA para isolamento e temperatura de incubação de 18°C e 28°C, foram isolados um total de 397 fungos endofíticos dos 960 fragmentos dos folíolos de *S. terebinthifolius*, havendo fragmentos dos quais se obtiveram mais de um isolado, bem como de outros nenhum crescimento de fungo endofítico foi observado durante os 30 dias do experimento.

Dos 397 isolados endofíticos, 251 (63,22%) pertencem aos filos Ascomycota, 121 (30,48%) a fungos anamorfos, ou mitosporicos como usado por alguns autores, 19 (4,79%) foram considerados morfoespécies e seis isolados (1,51%) de Zygomycota (Figura 4), distribuídos em oito gêneros e treze táxons. Assunção (2010), em *Musa* spp., isolou uma proporção maior de fungos anamorfos, 80%, do que Ascomycota, 17,5% e Nalini *et al.* (2005)

obtiveram de *Crataeva magna* 85% dos isolados constituídos por fungos mitospóricos, 10% de Zygomycota e 5% de Ascomycota, o que difere do encontrado em *S. terebinthifolius*.

Figura 4 - Frequência dos grupos de fungos endofíticos isolados de *Schinus terebinthifolius* em ágar batata-dextrose.

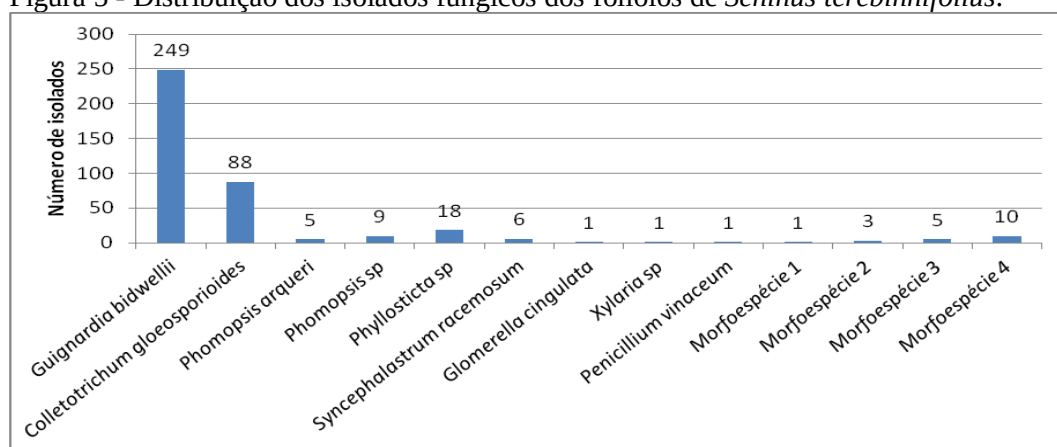


Fonte: a autora, 2012.

Destes isolados, um maior número foi obtido na coleta 1 (213) do que na coleta 2 (184), bem como na área 2 (205) em relação à área 1 (192) e em relação a temperatura de isolamento de 18°C (207) maior do que de 28°C (190). Porém, o número de isolados em relação às variáveis período, temperatura de isolamento e área de coleta, não mostrou diferenças significativas.

Na figura 5 encontra-se a distribuição dos fungos identificados segundo a literatura especializada.

Figura 5 - Distribuição dos isolados fúngicos dos folíolos de *Schinus terebinthifolius*.



Fonte: a autora, 2012.



Como observado na figura 5, *Guignardia bidwellii*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Phyllosticta* sp. e *Phomopsis* spp. foram os taxons isolados em maior número, onde as frequências de colonização corresponderam, respectivamente, de 25,94%, 9,17%, 1,88% e 1,46%. Fungos que não apresentaram estruturas reprodutivas (morfoespécies) tiveram uma frequência total de 1,98%. Outros taxons como *Syncephalastrum racemosum*, *Penicillium vinaceum*, *Glomerella cingulata* e *Xylaria* sp. também estiveram entre os endofíticos obtidos da aroeira-da-praia, porém em número de isolados com frequências menores que 1%.

A partir da interação dos fatores analisados, fungos que foram isolados (Tabelas 2), e estes em relação à área (Tabelas 3) e ao período (Tabelas 4), houve diferença significativa entre o número de isolados de cada espécie, bem como entre estes isolados e as variáveis período e área, sem diferenças em relação à temperatura.

Os isolados de *Guignardia bidwellii* e *Colletotrichum gloeosporioides* apresentaram médias significativamente maiores do que as médias dos demais isolados, mostrando que houve predominância significativa destes fungos nos folíolos de *Schinus terebinthifolius*. *Phyllosticta* foi significativamente menor em relação a *G. bidwellii* e *C. gloeosporioides* e não o foi em relação aos demais isolados (Tabela 2).

Tabela 2 - Fungos isolados de *Schinus terebinthifolius* <sup>1</sup>

| Médias dos fungos isolados            |        |
|---------------------------------------|--------|
| <i>Guignardia bidwellii</i>           | 12.45a |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | 4.40b  |
| <i>Phomopsis</i> sp.                  | 0.45c  |
| <i>Phomopsis archeri</i>              | 0.25c  |
| <i>Phyllosticta</i> sp.               | 0.90c  |
| <i>Syncephalastrum racemosum</i>      | 0.30c  |
| <i>Glomerella cingulata</i>           | 0.05c  |
| <i>Xylaria</i> sp.                    | 0.05c  |
| <i>Penicillium vinaceum</i>           | 0.05c  |
| Morfoespécie 1                        | 0.05c  |
| Morfoespécie 2                        | 0.15c  |
| Morfoespécie 3                        | 0.25c  |
| Morfoespécie 4                        | 0.50c  |

Fonte: a autora, 2012.

<sup>1</sup> As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Relacionando-se fungos isolados em diferentes áreas foram constatadas diferenças significativas apenas em relação a duas espécies *Guignardia bidwellii* e *Colletotrichum gloeosporioides* (Tabela 3). Na área 1 o número de isolados de *G. bidwellii* diferiu significativamente daqueles da área 2, cuja média foi superior, e também dos demais isolados da mesma área. *C. gloeosporioides* também diferiu significativamente dos demais isolados na

área 1, embora na área 2 tenha sido diferente apenas da *G. bidwelli*, sem diferença diante dos demais isolados. Comparando-se a área 1 e 2 *C. gloeosporioides* teve número de isolados significativamente maior na área 1 em relação à área 2, observado pela diminuição das médias. Em relação à similaridade, nestas duas áreas este índice teve um coeficiente superior a 0,75 indicando uma homogeneidade da comunidade endofítica.

Tabela 3 - Fungos isolados de *Schinus terebinthifolius* em relação à área de coleta<sup>1</sup>

| Fungos                                | Área <sup>2</sup> |          |
|---------------------------------------|-------------------|----------|
|                                       | Área 1            | Área 2   |
| <i>Guignardia bidwellii</i>           | 10.80 aB          | 14.10 aA |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | 6.00 bA           | 2.80 bB  |
| <i>Phomopsis</i> sp.                  | 0.10 cA           | 0.80 bA  |
| <i>Phomopsis archeri</i>              | 0.10 cA           | 0.40 bA  |
| <i>Phyllosticta</i> sp                | 0.40 cA           | 1.40 bA  |
| <i>Syncephalastrum racemosum</i>      | 0.60 cA           | 0.00 bA  |
| <i>Glomerella cingulata</i>           | 0.10 cA           | 0.00 bA  |
| <i>Xylaria</i> sp.                    | 0.00 cA           | 0.10 bA  |
| <i>Penicillium vinaceum</i>           | 0.00 cA           | 0.10 bA  |
| Morfoespécie 1                        | 0.00 cA           | 0.10 bA  |
| Morfoespécie 2                        | 0.10 cA           | 0.20 bA  |
| Morfoespécie 3                        | 0.20 cA           | 0.30 bA  |
| Morfoespécie 4                        | 0.80 cA           | 0.20 bA  |

Fonte: a autora, 2012.

<sup>1</sup> As médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas nas linhas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>2</sup>Área 1= UFPE, área 2= UFRPE

Em relação ao período de isolamento, podem ser observadas diferenças significativas em relação à espécie *C. gloeosporioides* (Tabela 4). *C. gloeosporioides* teve média significativamente superior às médias dos demais isolados no período 1, exceto à *G. bidwellii*, e também em relação à média do período 2. No período 1 (julho/2010), *G. bidwellii* teve sua média significativamente superior às médias dos demais isolados, e inferior em relação à média, no período 2 (fevereiro/2011), da mesma espécie, embora esta diferença não tenha sido significativa, comparando-se os dois períodos.

Tabela 4 - Fungos isolados de *Schinus terebinthifolius* em relação ao período de coleta <sup>1</sup>

| Isolado                               | Período <sup>2</sup> |           |
|---------------------------------------|----------------------|-----------|
|                                       | Período 1            | Período 2 |
| <i>Guignardia bidwellii</i>           | 11.10 aA             | 13.80 aA  |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | 6.30 bA              | 2.50 bB   |
| <i>Phomopsis</i> sp.                  | 0.80 cA              | 0.10 bA   |
| <i>Phomopsis archeri</i>              | 0.40 cA              | 0.10 bA   |
| <i>Phyllosticta</i> sp                | 1.10 cA              | 0.70 bA   |
| <i>Syncephalastrum racemosum</i>      | 0.60 cA              | 0.00 bA   |
| <i>Glomerella cingulata</i>           | 0.00 cA              | 0.10 bA   |
| <i>Xylaria</i> sp.                    | 0.10 cA              | 0.00 bA   |
| <i>Penicillium vinaceum</i>           | 0.10 cA              | 0.00 bA   |
| Morfoespécie 1                        | 0.10 cA              | 0.00 bA   |
| Morfoespécie 2                        | 0.20 cA              | 0.10 bA   |
| Morfoespécie 3                        | 0.50 cA              | 0.00 bA   |
| Morfoespécie 4                        | 0.00 cA              | 1.00 bA   |

Fonte: a autora, 2012.

<sup>1</sup> As médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas nas linhas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>2</sup>Período 1= julho/2010, período 2= fevereiro 2011.

Pode-se observar que houve predominância em relação à frequência de um pequeno número de espécies, enquanto que as demais representaram um número baixo de isolados. Tonial (2010) também obteve como endofíticos de *Schinus terebinthifolius* os fungos *Colletotrichum* sp., *Penicillium* sp., *Penicillium roseopurpureum*, *Phomopsis* sp., gêneros comuns àqueles encontrados em nosso estudo. No entanto, também foram isolados *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp. e *Trichaptum* sp., os quais não estiveram presentes neste estudo, onde foram isolados *Guignardia* spp., *Phyllosticta* spp. ou *Xylaria* spp de *S. terebinthifolius*.

Situação semelhante ocorreu em palmeiras, onde Fröhlich, Hyde e Petrini (2000) evidenciaram que 10% das espécies isoladas tiveram frequências de colonização de 1 a 20%, enquanto que as demais espécies tiveram uma frequência menor do que 1% e sinaliza que este é um padrão frequente nos estudos de diversidade não só de fungos endofíticos, mas também de outros organismos como plantas e animais.

*Guignardia bidwellii* (Figura 6A e 6B), no estudo de Siqueira *et al.* (2011) também figurou como endofítico nas folhas de *Lippia sidoides*, com frequência relativa de 6,87%, contudo, muito inferior a constatada no presente trabalho de 25,94%. Da mesma forma, em *Spondias mombin* (Anacardiaceae) espécies de *Guignardia* foram predominantes nos fragmentos foliares analisados provenientes de dois sítios de coleta diferentes (RODRIGUES; SAMUELS, 1999).

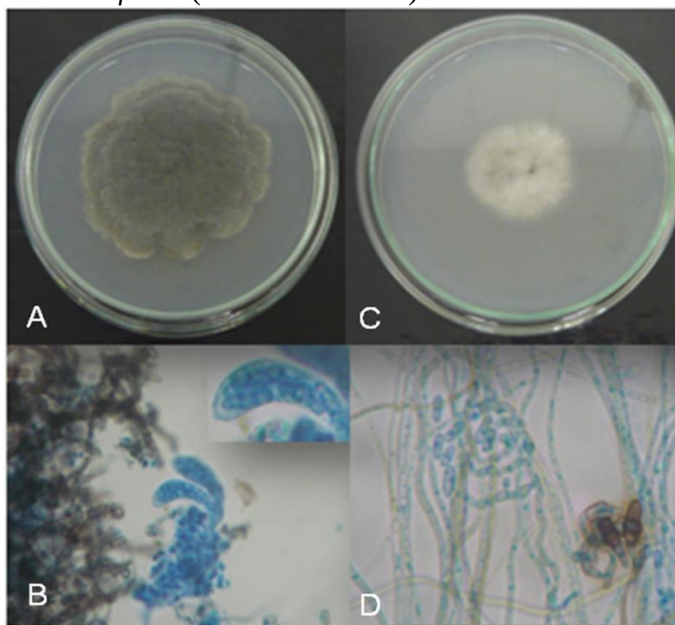
O gênero *Guignardia* é composto por espécies que figuram tanto como endofíticos quanto como fitopatógenos. Em *Musa acuminata*, *G. cocoicola*, um patógeno típico desta

cultura, foi isolado como endofítico e não causou nenhum sintoma de doença quando reinoculado para análise do seu potencial patogênico (PHOTITA *et al.*, 2004).

Um amplo estudo em angiospermas, gimnospermas e pteridófitas, envolvendo um total de 94 plantas, mostraram à ampla gama de hospedeiros do endófito *G. endophyllicola* isolado destes três grupos de plantas (OKANE *et al.*, 2003). *G. mangifera* é outra espécie deste gênero que foi dominante em folhas de *Dendrobium nobile* (YUAN; CHEN; YANG, 2009).

*Colletotrichum gloeosporioides* (Figura 6C e 6D), a segunda espécie mais freqüente, foi isolada como endofítico neste trabalho, com 88 isolados representando uma freqüência de 9,17%. Embora esta espécie não tenha sido isolada de aroeira por Tonial (2010), a presença desta espécie como endofítico é corriqueira. Siqueira *et al.* (2011) obteve *C. gloeosporioides* como principal endofítico isolado a partir de folhas de *L. sidoides*, o que também ocorreu em *Lycopersicon esculentum* (tomate) (LARRAN; MÓNACO; ALIPPI, 2001). O gênero *Colletotrichum* também esteve entre os mais frequentes obtidos a partir de folhas de *Musa acuminata* (banana) (PEREIRA; VIEIRA; AZEVEDO, 1999), *Plumeria rubra* (SURYANARAYANAN; THENNARASAN, 2004), em *Tripterygium wilfordii* (KUMAR; HYDE, 2004) e em *Calotropis gigantea* (DEVARAJAN; SURYANARAYANAN, 2006).

Figura 6 - Macroscopia e microscopia de *Guignardia bidwellii* (A e B) e *Colletotrichum gloeosporioides* (C e D) isolados dos folíolos sadios de *Schinus terebinthifolius* (aumento de 400X).



Fonte: a autora, 2012.

Apesar de freqüente como endófito, *Colletotrichum gloeosporioides* é um fitopatógeno agente da antracnose em diferentes culturas como as de manga, *Mangifera* spp. (ESTRADA; DODD; JEFFRIES, 2000), amoras, *Morus alba* (YOSHIDA et al., 2000), inhame, *Dioscorea* spp. (ABANG et al., 2002), morango, *Fragaria* spp (XIAO et al., 2004), uva, *Vitis vinifera* (SOYTONG et al., 2005), azeitonas, *Olea europaea* subsp. *europaea* (TALHINHAS et al., 2005), entre outras, o que traz sérios prejuízos à agricultura.

Variações com relação às freqüências de isolamento dos endófitos ocorreram em *Schinus terebinthifolius* nos diferentes períodos das duas coletas. Em julho de 2010 foram obtidos 63 isolados (6,56%) de *C. gloeosporioides*, enquanto que em fevereiro de 2011 este número reduziu para 25 (2,6%). Situação inversa ocorreu com *G. bidwelli* cujo número de isolados aumentou de 111 (11,56%) para 138 (14,38%), comparando-se os referidos meses julho e fevereiro, nesta ordem. Esses dados mostram que a freqüência de fungos endofíticos na aroeira-da-praia é um índice dinâmico.

Estas alterações na freqüência de algumas espécies de fungos endofíticos com relação ao período de coleta estão de acordo com os de Larran, Mónaco e Alippi (2001) e Suryanarayanan e Thennarasan (2004) os quais trabalharam com *L. esculentum* e *P. rubra*, respectivamente. *Colletotrichum* spp. foram dominantes no período úmido, tornando-se escasso ou ausente nos meses mais secos em *P. rubra* (SURYANARAYANAN; THENNARASAN, 2004).

Espécies de *Colletotrichum* são comumente isoladas como endofíticos predominantes no material foliar, embora sofram modificações em suas freqüências e presença ao longo das variações ambientais e fisiológicas do hospedeiro. Kumar e Hyde (2004) encontraram diferenças na composição e freqüência dos endofíticos em *Tripterygium wilfordii* dependentes do tecido vegetal analisado. Tais influências foram relatadas por Larran, Mónaco e Alippi (2001) onde, em duas coletas realizadas em anos seguidos no mesmo mês, *C. coccoides* passou de espécie mais freqüente a ausente, possivelmente devido às diferentes condições climáticas. Em *S. terebinthifolius* os períodos de coleta, fevereiro e julho, coincidem com o início e fim do período de frutificação da planta o que pode indicar que a comunidade endofítica acompanhe as mudanças fisiológicas ocorridas neste hospedeiro em relação a esta variável, embora maiores investigações sejam necessárias para a confirmação desse comportamento.

*Phyllosticta* sp., embora em menor grau, com 18 isolados e freqüência de 1,88%, também foi isolado como endofítico neste trabalho e é descrito também como endófito em

*Licuala* sp. e *L. ramsayi* com frequências variando de 1,1 a 3,5% (FRÖHLICH; HYDE; PETRINI, 2000), semelhantes à encontrada nesse trabalho em *S. terebinthifolius*. Trata-se de um gênero que compreende espécies que se comportam como endófitos, a exemplo de *P. citribraziliensis* e *P. capitalensis* e como patógenos, *P. citricarpa* e *P. citriasiana*, com uma ampla gama de hospedeiros (GLIENKE *et al.*, 2011). Vale salientar que esta se trata do anamorfo de *Guignardia* sp. (SIVANESAN, 1984).

*Phomopsis* spp. e *Xylaria* sp. obtidos da aroeira estão também no grupo dos endófitos típicos, sendo frequentemente isolados em muitos estudos anteriores envolvendo outras plantas medicinais (JIANQIU *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2011) e árvores frutíferas exibindo inclusive potencial biotecnológico (BUATONG *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2008). *Penicillium vinaceum*, com um isolado, fez parte das espécies escassas no presente isolamento e embora tenha sido citado como endofítico também é raro em outros estudos. Em aroeira, foram relatadas espécies de *Penicillium* como endofíticos, assim como este gênero também esteve entre os principais isolados de *Melia azedarach*, juntamente com isolados de *Aspergillus*, os quais já isolados em aroeira, não foram observados no presente estudo (SANTOS *et al.*, 2003; TONIAL, 2010). Em *Crocus sativus*, *P. vinaceum* foi isolado e deste foram obtidos alcalóides com aplicabilidades medicinais (ZHENG *et al.*, 2011). *Syncephalastrum racemosum* com seis isolados em aroeira disposta como um endófito ainda raro que, no entanto, foi obtido de *Osbeckia stellata* em número de 37 e em *Camellia caduca*, 19, ambas plantas medicinais (BHAGOBATY; JOSHI, 2011).

Um número de 19 isolados (1,98%) foi constituído de espécimes que não esporularam, não sendo possível, pelos métodos clássicos, baseados na macro e microscopia, a identificação ao nível de espécie e, por isso, divididas em morfoespécies, de acordo com suas características macroscópicas em meio BDA: Morfoespécie 1. algodonoso, micélio claro, levemente amarelado, reverso escuro em tons negro e alaranjado, pigmenta o meio de marrom a amarelado, crescimento moderado, hifas hialinas; Morfoespécie 2. aveludado, micélio negro, reverso negro, não libera pigmentos no meio, crescimento lento, hifas demáceas; Morfoespécie 3. algodonoso, micélio cinza escuro, reverso negro, não produz pigmentos no meio, crescimento moderado, hifas demáceas; Morfoespécie 4. micélio algodonoso escasso, esbranquiçado, pontos negros e amarelados na superfície, reverso claro, não libera pigmentos no meio, crescimento moderado, hifas hialinas.

Guo, Hyde e Liew (2000) a partir de *Livistona chinensis* obteve o mesmo número de morfoespécies (19). Estes fungos já foram identificados por outros autores, ao menos em parte,

ao nível de classe, através de técnicas envolvendo biologia molecular e a análise comparativa das sequências do DNA ribossômico, através dos genes 5.8S e das regiões ITS. Frölich, Hyde e Petrini (2000) a partir de folhas de palmeiras isolou 75 espécies esporulantes e 60 que não apresentaram estruturas reprodutivas, uma proporção relativamente alta, visto que estes fungos são isolados em geral em frequências baixas em folhas e também são denominados *Mycelia sterilia* por outros autores (JIANQIU *et al.*, 2008; OSES *et al.*, 2006b; SURYANARAYANAN; THENNARASAN, 2004).

É importante destacar que a maioria das espécies incidentais (frequência menor que 1%) como *Xylaria* sp., *Penicillium vinaceum*, *Syncephalastrum racemosum*, Morfoespécie 1 e Morfoespécie 3 foram isoladas somente no período mais úmido, julho, não aparecendo na segunda coleta, realizada no mês de fevereiro, indicando que no período a comunidade endofítica sofre maiores variações em *Schinus terebinthifolius*, podendo ser encontrada uma maior variedade de espécies.

#### 4.3 Atividade inibitória de fungos endofíticos de *Schinus terebinthifolius*

Um total de 80 culturas de fungos endofíticos foram testados quanto a capacidade de inibir dermatófitos e leveduras no teste do bloco de micélio-água em meio sólido, destes 11 apresentaram zona de inibição (Tabela 5).

Tabela 5. Espectro inibitório de fungos endofíticos isolados de folíolos de *Schinus terebinthifolius* em meio sólido.

| Espécie Endofítica/Número de isolamento  | Diâmetro (mm) da zona de inibição contra fungos patógenos |    |    |    |    |    |    |    |                 |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|-----------------|
|                                          | Ca                                                        | Cp | Cg | Tm | Tr | Tt | Mc | Mg | Ef <sup>1</sup> |
| <i>Guignardia bidwellii</i> 32           | -                                                         | -  | 8  | -  | 14 | -  | -  | -  | -               |
| <i>G. bidwellii</i> 34                   | -                                                         | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 18              |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> 36 | -                                                         | -  | -  | 19 | 15 | 12 | -  | -  | -               |
| Morfoespécie 1 49                        | 10                                                        | 12 | 9  | 15 | 15 | -  | -  | -  | -               |
| <i>G. bidwellii</i> 54                   | -                                                         | -  | -  | -  | 11 | -  | -  | -  | -               |
| <i>G. bidwellii</i> 56                   | -                                                         | -  | -  | -  | 10 | -  | -  | -  | -               |
| <i>G. bidwellii</i> 94                   | -                                                         | -  | -  | -  | 14 | -  | -  | -  | -               |
| <i>G. bidwellii</i> 105                  | -                                                         | -  | -  | -  | -  | 14 | -  | -  | 18              |
| <i>G. bidwellii</i> 107                  | -                                                         | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 14              |
| <i>G. bidwellii</i> 118                  | -                                                         | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 16              |
| <i>G. bidwellii</i> 147                  | -                                                         | -  | -  | -  | 12 | -  | -  | -  | -               |

Fonte: a autora, 2012.

<sup>1</sup>Ca, *Candida albicans*; Cp, *C. parapsilosis*; Cg, *C. glabrata*; Tm, *Trichophyton mentagrophytes*; Tr, *T. rubrum*; Tt, *T. tonsurans*; Mc, *Microsporum canis*; Mg, *M. gypseum*; Ef, *Epidermophyton floccosum*; -, ausência de atividade.

Dentre os fungos testados, a Morfoespécie 1 esteve entre os isolados que inibiram o maior número de fungos-teste incluindo dermatófitos e leveduras (Figura 7).

De acordo com a Tabela 5, podemos observar que os fungos endofíticos de *S. terebinthifolius* foram capazes de apresentar atividade inibitória frente a dermatófitos e leveduras de interesse médico no teste realizado em meio sólido. A maioria dos endofíticos que apresentaram inibição fúngica foram espécimes de *Guignardia bidwelli* frente a *T. rubrum*, *T. tonsurans* e *Epidermophyton floccosum* e uma fraca atividade de um espécime contra *C. glabrata*. Um isolado de *Colletotrichum gloeosporioides* foi capaz de inibir os fungos filamentosos do gênero *Trichophyton*. Siqueira *et al.* (2011) testou com blocos de micélio-ágar a atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de *Lippia sidoides* e obteve 16 isolados com capacidade de inibir bactérias e fungos entre estes *Malassezia furfur* e *T. rubrum*.

Wang *et al.* (2007), testando o extrato bruto, obtiveram endófitos cujos metabólitos foram ativos contra fungos de interesse médico, incluindo *Candida albicans* e *Epidermophyton floccosum* com zonas de inibição variando amplamente de 10mm a maiores que 30mm, entre estes estiveram *Cladosporium* sp., *Aspergillus fumigatus* e *Gliocladium* spp. Por outro lado Maria, Sridhar e Raviraja (2005), embora tenham realizado extrações com acetato de etila e testado o extrato bruto e purificado, obtiveram de *Acanthus ilicifolius* e *Acrostichum aureum* os endofíticos *Aspergillus* sp., *Pestalotipsis* sp. e um isolado não-esporulante que apresentaram atividade com zonas de inibição frente a *Candida albicans* e *Cryptococcus albidus* que variaram de 7 a 13mm, o que se assemelhou ao obtido no presente estudo cujos halos foram de 8 a 19mm.

Xing *et al.* (2011) testaram os extratos etanólicos de fungos endofíticos de *Dendrobium devonianum* e *D. thyrsiflorum* contra os fungos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* e obtiveram inibições que variaram de 7 a 15mm, sendo que nenhuma inibição foi observada em *C. neoformans*, mostrando que mesmo a partir de extratos as zonas de inibição apresentadas são relativamente pequenas.



Figura 7 - Zonas de inibição da Morfoespécie 1 frente à levedura *Candida parapsilosis*.



Fonte: a autora, 2012.

Buatong *et al.* (2011) trabalhando com espécies endofíticas de doze plantas típicas de mangue incluindo os gêneros *Avicennia*, *Bruguiera*, *Lumnitzera*, *Rhizophora*, *Sonneratia*, *Scyphiphora* e *Xylocarpus* analisaram a atividade antimicrobiana contra *Microsporum gypseum*, *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*, incluindo *Xylaria cubensis* e *Pestalotiopsis* sp., e espécies que não esporularam (*Mycelia sterilia*) esta última também tendo sido observada pela morfoespécie 2, embora nenhum endófito tenha mostrado inibição de *Microsporum gypseum*. Neste mesmo trabalho, embora tenha sido testada uma única espécie de dermatófito, foi decrescente a quantidade de endófitos ativos contra o fungo filamentoso e as leveduras *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*, nesta ordem, estando estes dados de acordo com os nossos resultados.

De acordo com os critérios estabelecidos, em relação ao espectro e diâmetro das zonas de inibição, quatro culturas de endofíticos foram selecionadas para o teste em meio líquido: Morfoespécie 1, dois isolados de *Guignardia bidwellii* e um de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Os resultados mostraram que o líquido metabólico não apresentou atividade inibitória frente aos fungos testados. Resultado semelhante ao obtido no presente trabalho ocorreu em *Lippia sidoides* onde os fungos endofíticos apresentaram capacidade de inibir *Malassezia furfur* e *Trichophyton rubrum* nos testes com blocos de micélio-ágar, porém não expressaram esta atividade nos testes realizados com o líquido metabólico (SIQUEIRA *et al.*, 2011). Nascimento (2009) testando a atividade de 51 fungos endofíticos de *Calotropis procera*

contra os fungos patógenos ao homem *Epidermophyton floccosum*, *Malassezia furfur*, *Trichosporum cutaneum*, e fitopatógenos *Colletotrichum dematium* e *Fusarium oxysporum*, obteve apenas um isolado, *Alternaria* sp., cujo líquido metabólico, em caldo extrato de malte e incubados por dois dias a 180rpm, apresentou atividade contra *E. floccosum*, com halo de inibição inferior a 15mm, apesar do teste em meio sólido ter mostrado que 11 isolados exibiram atividade antifúngica contra pelo menos um dos fungos-teste.

Outros trabalhos com percentuais baixos de atividade antifúngica de endofíticos são encontrados na literatura tais como o de Wang *et al.* (2007) que avaliaram o potencial antimicrobiano de fungos endofíticos de *Quercus variabilis* através do teste fermentativo e obtiveram 7,5% de atividade contra fungos os patogênicos ao homem *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Microsporum canis*, onde os fungos previamente crescidos em ágar batata-dextrose foram inoculados em meio líquido à base de extrato de levedura por duas semanas a 28°C a 140rpm.

Li *et al.* (2005) obtiveram de 12 plantas medicinais chinesas uma proporção maior de endofíticos cujos líquidos metabólicos (caldo fermentativo) apresentaram atividade antifúngica, 30%, onde foi usado como meio de fermentação o caldo batata-dextrose incubados a 25°C a 160rpm por nove dias e o líquido obtido das culturas foi concentrado a 20%, semelhante ao realizado no presente estudo.

Resultados obtidos por Buatong *et al.* (2011) mostram que variando o fungo-teste podem ser variadas a quantidade de fungos endofíticos com atividade inibitória, onde os extratos brutos fermentativos dos endofíticos de espécies de plantas oriundas do mangue se mostraram ativos contra os fungos testados, que incluíam *M. gypseum*, *Criptococcus neoformans*, e *Candida albicans*, em 25,5%, 11,7%, 7,5%, respectivamente.

No trabalho de Xing *et al.* (2011), citado anteriormente, onde foi obtida atividade antifúngica dos endófitos de *Dendrobium devonianum* e *D. thyrsiflorum*, o cultivo foi realizado em caldo batata-dextrose 120rpm, a 25°C por um período de uma semana em ambiente escuro.

Utilizando-se condições estáticas de fermentação, Maria, Sridhar e Raviraja (2005) obtiveram atividade dos extratos etilacéticos parcialmente purificados dos fungos endofíticos *Pestalotiopsis* sp, *Aspergillus* sp. e do isolado estéril MSI 1 contra *C. albicans* e *Cryptococcus albidus*. Vale salientar que, testando o extrato etilacético não purificado, estes autores não haviam obtido atividade inibitória contra *C. albidus* expressa pelo isolado MSI 1.

Com os exemplos acima citados podemos observar que as condições de cultivo utilizadas para a realização do teste de atividade antifúngica em meio líquido são variadas em diferentes trabalhos. Variações no meio de cultivo, rotação, período de incubação, temperatura, luminosidade e até mesmo o fungo testado podem resultar em variações na expressão da inibição. Schulz *et al.* (1995) testando a atividade fungicida de isolados endofíticos de *Pezicula* spp. obtiveram substâncias com esta atividade de acordo com as condições de cultura. Radu e Kqueen (2002) assinalam que extratos de fungos endofíticos que mostram uma baixa atividade antimicrobiana em bioensaios podem possuir compostos ativos, mas provavelmente em quantidades pequenas ou possuir extratos ativos que necessitam de purificação. Do mesmo modo que extratos que não mostram atividade podem ser ativos contra outros micro-organismos-teste, o que pode ter ocorrido no presente trabalho.

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir:

- *Schinus terebinthifolius* é colonizada por fungos endofíticos filamentosos.
- A área, o período de coleta e a temperatura de incubação não são determinantes na taxa de colonização e no número de isolados de fungos endofíticos de *Schinus terebinthifolius*.
- Ascomycota predomina como fungos endofíticos de *Schinus terebinthifolius*, seguidos dos anamorfos.
- *Guignardia bidwellii* e *Colletotrichum gloeosporioides* são as espécies prevalentes dentre os fungos endofíticos de *Schinus terebinthifolius*.
- Variações na frequência das espécies podem ocorrer em fungos endofíticos de *Schinus terebinthifolius* em relação a diferentes períodos de coleta.
- Variações na frequência das espécies podem ocorrer em fungos endofíticos de *Schinus terebinthifolius* em relação a diferentes áreas de coleta.
- Fungos endofíticos da *Schinus terebinthifolius* apresentam atividade antifúngica contra dermatófitos e leveduras de interesse médico.

## REFERÊNCIAS

- Abang, M. M., Winter, S., Green, K. R., Hoffman, P., Mignouna, H. D., Wolf, G. A. 2002. Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. *Plant Pathology* 51: 63–71.
- Ahmed, I., Hussain, H., Schulz, B., Draeger, S., Padula, D., Pescitelli, G., Ree, T. V., Krohn, K. 2011. Three New Antimicrobial Metabolites from the Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. *European Journal of Organic Chemistry* 2011: 2867-2873.
- Alves-Santos, F. M., Cordeiro-Rodrigues, L., Sayagués, J. M., Martín-Domínguez, R., García-Benavides, P., Crespo, M. C., Díaz-Mínguez, J. M., Eslava, A. P. 2002. Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli* isolates from Spain and Greece. *Plant Pathology* 51: 605–611.
- Amorim, M. M. R., Santos, L. C. 2003. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 25(2): 95-102.
- Araújo, W.L., Lima, A.O.S., Azevedo, J.L., Marcon, J., Sobral, J. K., Lacava, P.T. 2002. *Manual de isolamento de microorganismos endofíticos*. Piracicaba, ESALQ.
- Araújo, E. C., Oliveira, R. A. G., Coriolano, A. T., Araújo, E.C. 2007. Uso de plantas medicinais pelos pacientes com câncer de hospitais da rede pública de saúde em João Pessoa (PB). *Revista Espaço para a Saúde* 8(2): 44-52.
- Arnold, A. E., Maynard, Z., Gilbert, G. S. 2001. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycological Research* 105(12): 1502-1507.
- Arnold, A. E., Lutzoni, F. 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88(3): 541-549.
- Assunção, M. M. C. Fungos endofíticos isolados de folhas de bananeira (*Musa* spp.) e seleção de antagonistas a fitopatógenos dessa cultura. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 2010. 171p.
- Azevedo, J. L. 1998. Microorganismos endofíticos. In: Melo, I. S., Azevedo, J. L. *Ecologia Microbiana*. Jaguaríuna, EMBRAPA-CNPMA.
- Azevedo, J. L., Maccheroni Jr, W., Pereira, J. O., Araújo, W. L. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 3(1): 40-65.
- Azevedo, J. L., Maccheroni Jr, W., Araújo, W. L., Pereira, J. O. 2002. Microorganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: Serafini, L. A., Barros, N. M., Azevedo, J. L. *Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. Caxias do Sul, Educ.
- Baayen, R. P., Bonants, P.J. M., Verkley, G., Carroll, G. C., Aa, H. A., Weerdt, M., Brouwershaven, I. R., Schutte, G. C., Maccheroni Jr, W., Glienke-Blanco, C., Azevedo, J. L. 2002. Nonpathogenic Isolates of the *Citrus* black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). *Ecology and Population Biology* 92(5): 464-477.
- Bandara, W. M. M. S., Seneviratne, G., Kulasoorya, S. A. 2006. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. *Journal of Biosciences* 31: 645-650.
- Barnett, H. L., Hunter, B. B. *Illustrated genera of imperfecti fungi*. 1987. 4 ed. New York, Macmillan Publishing Company.
- Bauer, A. M., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal Clinical Pathology* 43: 493-496.

- Bhagobaty, R. K., Joshi, S. R. 2011. Multi-loci molecular characterisation of endophytic fungi isolated from five medicinal plants of Meghalaya, India. *Mycobiology* 39(2): 71-78.
- Biavatti, M. W., Marensi, V., Leite, S. N., Reis, A. 2007. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17(4): 640-653.
- Botelho, M. A., Nogueira, N. A. P., Bastos, G. M., Fonseca, S. G. C., Lemos, T. L. G., Matos, F. J. A., Montenegro, D., Heukelbach, J., Rao, V. S., Brito, G. A. C. 2007. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 40: 349-356.
- Buatong, J., Phongpaichit, S., Rukachaisirikul, V., Sakayaroj, J. 2011. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(12): 3005-3008.
- Cannon, P. F., Simmons, C. M. 2002. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia* 94(2): 210-220.
- Cao, L. X., You, J. L., Zhou, S. N. 2002. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 169-171.
- Carroll, G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69(1):2-9.
- Castro, J. A., Brasileiro, B. P., Lyra, D. H., Pereira, D. A., Chaves, J. L., Amaral, C. L. F. 2011. Ethnobotanical study of traditional uses of medicinal plants: The flora of caatinga in the community of Cravolândia-BA, Brazil. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(10): 1905-1917.
- Cavalher-Machado, S. C., Rosas, E. C., Brito, F. A., Heringe, A. P., Oliveira, R. R., Kaplan, M. A. C., Figueiredo, M. R., Henriques, M. G. M. O. 2008. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *International Immunopharmacology* 8: 1552-1560.
- Chen, X. M., Dong, H. L., Hu, K. X., Sun, Z. R., Chen, J., Guo, S. X. 2010. Diversity and antimicrobial and plant-growth-promoting activities of endophytic fungi in *Dendrobium loddigesii* Rolfe. *Journal Plant Growth Regulation* 29: 328-337.
- Clay, K., Schardl, C. 2002. Evolutionary Origins and Ecological Consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist* 160(S4): S99-S127.
- Dalmat, L.M. 1929. Remarques sur la technique mycologique. Caractères macroscopiques des cultures de champignons. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 7: 536-541.
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Gene, J., Figueras, M.J. 2000. *Atlas of Clinical Fungi*. 2<sup>nd</sup> edition. The Netherlands. Central bureau voor Schimmelcultuur.
- Devarajan, P. T., Suryanarayanan, T. S. 2006. Evidence for the role of phytophagous insects in dispersal of non-grass fungal endophytes. *Fungal Diversity* 23: 111-119.
- Diene, O., Narisawa, K. 2009. The use of symbiotic fungal associations with crops in sustainable agriculture. *Journal of Developments in Sustainable Agriculture* 4: 50-56.
- Dingle, J., Mcgee, P. A. 2003. Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in wheat. *Mycological Research* 107(3): 310-316.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T. 2007. *Compendium of soil fungi*. 2<sup>nd</sup> ed. San Francisco, IHW Verlag Eching.
- Ellis, M.B. *Dematiaceous Hyphomycetes*. 1971. Kew: Commonwealth Mycological Institute.
- El-Massry, K. F., El-Ghorab, A. H., Shaaban, H. A., Shibamoto, T. 2009. Chemical Compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. *Journal of agricultural and food chemistry* 57: 5265-5270.

- Estrada, A. B., Dodd, J. C., Jeffries, P. 2000. Effect of humidity and temperature on conidial germination and appressorium development of two Philippine isolates of the mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Pathology* 49: 608-618.
- Faeth, S. H., Fagan, W. F. 2002. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integrative and Comparative Biology* 42: 360-368.
- Fisher, P. J., Petrini, O., Petrini, L. E., Sutton, B. C. 1994. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca and Switzerland. *New Phytologist* 127: 133-137.
- Fröhlich, J., Hyde, K. D., Petrini, O. 2000. Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research* 104 (10): 1202-1212.
- Gamboa, M. A., Laureano, S., Byman, P. 2002. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: does size matter? *Mycophatologia* 156: 41-45.
- Glienke, C., Pereira, O. L., Stringari, D., Fabris, J., Kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L., Cunnington, J., Shivas, R. G., Groenewald, J. Z., Crous, P. W. 2011. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. *Persoonia* 26: 47– 56.
- Gomes, R. R. *Phomopsis* spp. endófitos de plantas medicinais: diversidade genética e antagonismo ao fungo *Guignardia citricarpa*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 2008. 166p.
- Griffin, M. A., Spakowicz, D. J., Gianoulis, T. A., Strobel, S. A. 2010. Volatile organic compound production by organisms in the genus *Ascocoryne* and a re-evaluation of myco-diesel production by NRRL 50072. *Microbiology* 156: 3814–3829.
- Guimarães, D. O., Borgs, W. S., Kawano, C. Y., Ribeiro, P. H., Goldman, G. H., Nomizo, A., Thiemann, O. H., Oliva, G., Lopes, N. P., Pupo, M. T. 2008. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. *Immunology & Medical Microbiology* 52 (2008) 134–144.
- Guo, L., Hyde, K. D., Liew, E. C. Y. 1998. A method to promote sporulation in palm endophytic fungi. *Fungal Diversity* 1: 109-113.
- Guo, L. D., Hyde, K. D., Liew, E. C. Y. 2000. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytologist* 147: 617-630.
- Hamayun, M., Khan, S. A., Iqbal, I., Ahmad, B., Lee, I. 2010. Isolation of a Gibberellin-producing fungus (*Penicillium* sp. MH7) and Growth Promotion of Crown Daisy (*Chrysanthemum coronarium*). *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(1): 202-207.
- Hanada, R. E., Pomella, A.W. V., Costa, H. S., Bezerra, J. L., Loguercio, L. L., Pereira, J. O. 2010. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal Biology* 114: 901-910.
- Hanlin, R. T. 1990. *Illustrated genera of ascomycetes*. St Paul, Minnesota, APS Press.
- Hashizume, Y., Sahashi, N., Fukuda, K. 2008. The influence of altitude on endophytic mycobiota in *Quercus acuta* leaves collected in two areas 1000 km apart. *Forest Pathology* 38: 218–226.
- Hawksworth, D. L., 2001. The magnitude of fungal diversity : the 1±5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105(12): 1422-1432.
- Hayashi, T., Nagayama, K., Arisawa, M., Shimizu, M., Suzuki, S., Yoshizaki, M., Morita, N. 1989. Pentagalloylglucose, a xanthine-oxydase inhibitor from a Paraguayan crude drug, “Molle-I” (*Schinus terebinthifolius*). *Journal of Natural Products* 52(1): 210-211.
- Huang, W., Cai, Y., Xing, J., Corke, H., Sun, M. 2007. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. *Economic Botany* 61(1): 14-30.

- Hyde, K. D., Soyong, K. 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 33: 163-173.
- Ichikawa, T., Date, M., Ishikura, T., Ozaki, A. 1971. Improvement of Kasugamycin – producing strain by the agar piece method and the prototroph method. *Folia Microbiologica* 16: 218-224.
- JianQiu, S., LiangDong, G., Wei, Z., WenXiang, P., DeFu, C. 2008. Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants. *Science in China Series C: Life Sciences* 51(8): 751-759.
- Johann, S., Pizzolatti, M. G., Donnici, C. L., Resende, M. A. 2007. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 632-637.
- Johann, S., Silva, D. L., Martins, C. V. B., Zani, C. L., Pizzolatti, M. G., Resende, M. A. 2008. Inhibitory effect of extracts from Brazilian medicinal plants on the adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 2459-2464.
- Johann, S., Sá, N. P., Lima, L. A. R. S., Cisalpino, P. S., Cota, B. B., Alves, T. M. A., Siqueira, E. P., Zani, C. L. 2010. Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 9:30
- Kharwar, R. N., Verma, V. C., Strobel, G., Ezra, D. 2008. The endophytic fungal complex of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Current Science* 95(2): 228-233.
- Kumar, D. S. S., Hyde, K. D. 2004. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity* 17: 69-90.
- Lacava, P. T., Sebastianes, F. L. S., Azevedo, J. L. 2010. Fungos endofíticos: biodiversidade e aplicações biotecnológicas. In: Esposito, E., Azevedo, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2ª edição revista e ampliada. Caxias do Sul, Educs.
- Lacaz, C. S., Porto, E., Martins, J. E. C., Heins-Vaccari, E. M., Melo, N. T. 2002. *Tratado de Micologia Médica*. 9º edição. São Paulo, Sarvier.
- Larran, S., Mónaco, C., Alippi, H. E. 2001. Endophytic fungi in leaves of *Lycopersicon esculentum* Mill. *World Journal of Microbiology and biotechnology* 17: 181-184.
- Li, J. Y., Strobel, G. A. 2001. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochemistry* 57: 261–265.
- Li, H., Qing, C., Zhang, Y., Zhao, Z. 2005. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 1515-1519.
- Li, W., Zhou, J., Guo, S., Guo, L. 2007a. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. *Fungal Diversity* 25: 69-80.
- Li, G., Yu, Z., Li, X., Wang, X., Zheng, L., Zhang, K. 2007b. Nematicidal Metabolites Produced by the Endophytic Fungus *Geotrichum* sp. AL4. *Chemistry & Biodiversity* 4: 1520-1524.
- Lima, M. G. C., Corrêa, A. C. B. 2005. Apropriação de uma unidade de conservação de Mata Atlântica no espaço urbano de Recife – PE: o caso da reserva de Dois Irmãos. *Revista de Geografia* 22(1): 67-77.
- Lima, M. R. F., Luna, J. S., Santos, A. F., Andrade, M. C. C., Sant’Ana, A. E. G., Genet, J., Marquez, B., Neuville, L., Moreau, N. 2006a. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 105: 137–147.
- Lima, C. R., Costa-Silva, J. H., Lyra, M. M. A., Araújo, A. V., Arruda, V. M., Dimech, G.S., Evêncio, L. B., Fraga, M. C. C. A., Lafayette, S. S. L., Wanderley, A. G. 2006b. Atividade cicatrizante e estudo toxicológico pré-clínico do fitoterápico Sanativo®. *Acta Farmacêutica Bonaerense* 25 (4): 544-549.



- Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., Lv, X., Zhou, J. 2008. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78: 241-247.
- Liu, Q., Parsons, A.J., Xue, H., Fraser, K., Ryan, G. D., Newman, J. A., Rasmussen, S. 2011. Competition between foliar *Neotyphodium lolii* endophytes and mycorrhizal *Glomus* spp. fungi in *Lolium perenne* depends on resource supply and host carbohydrate content. *Functional Ecology* 25: 910-920.
- Lorenzi, H. 2008. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Vol. 1, 5ª edição. Nova Odessa, Instituto Plantarum.
- Mahapatra, S., Banerjee, D. 2009. Extracellular tannase production by endophytic *Hyalopus* sp. *The Journal of General and Applied Microbiology* 55: 255-259.
- Mahmoud, T. S., Marques, M. R., Pessoa, C. O., Lotufo, L.V. C., Magalhães, H.I.F., Moraes, M. O., Lima, D. P., Tininis, A. G., Oliveira, J. E. 2011. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21(3): 456-464.
- Maria, G. L., Sridhar, K. R., Raviraja, N. S. 2005. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technology* 1: 67-80.
- Márquez, L. M., Redman, R. S., Rodriguez, R. J., Roossinck, M. J. 2007. A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* 315: 513-515.
- Marshall, D., Tunali, B., Nelson, L. R. 1999. Occurrence of fungal endophytes of Wild *Triticum*. *Crop Science* 39: 1507-1512.
- Martínez, M. J., Betancourt, J., Alonso-González, N., Jauregui, A. 1996. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 52: 171-174.
- Matasyoh, J. C., Dittrich, B., Schueffler, A., Laatsch, H. 2011. Larvicidal activity of metabolites from the endophytic *Podospira* sp. against the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Parasitology Research* 108:561-566.
- Matsuo, A. L., Figueiredo, C. R., Arruda, D. C., Pereira, F. V., Scutti, J. A. B., Massaoka, M. H., Travassos, L. R., Sartorelli, P., Lago, J. H. G. 2011.  $\alpha$ -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 411: 449-454.
- Mejía, L. C., Rojas, E. I., Maynard, Z., Bael, S. V., Arnold, A. E., Hebbar, P., Samuels, G. J., Robbins, N., Herre, E. A. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control* 46: 4-14.
- Melo Jr, E. J. M., Raposo, M. J., Lisboa Neto, J. A., Diniz, M. F.A., Marcelino Júnior, C. A. C., Sant'Ana, A. E. G. 2002. Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: microbiological and microscopic analysis. *Phytomedicine* 9: 109-116.
- Mesquita, M. L., Paula, J. E., Pessoa, C., Moraes, M. O., Costa-Lotufo, L. V., Grougnet, R., Michel, S., Tillequin, F., Espindola, L. S. 2009. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology* 123: 439-445.
- Morsy, M., El-Gendy, A. 2009. Keratinase production by endophytic *Penicillium* spp. Morsy1 under solid-state fermentation using rice straw. *Applied Biochemistry Biotechnology* 162(3): 780-794.
- Nalini, M. S., Mahesh, B., Tejesvi, M. V., Prakash, H. S., Subbaiah, V., Kini, K. R., Shetty, H. S. 2005. Fungal endophytes from the three-leaved caper, *Crataeva magna* (Lour.) DC. (Capparidaceae). *Mycopathologia* 159: 245-249.

- Nascimento, T. L. Fungos endofíticos de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.: aspectos ecológicos e potencial antimicrobiano. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 2009. 74p.
- Nassar, A. H., El-Tarabily, K. A., Sivasithamparan, K. 2005. Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of Soils* 42: 97-108.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M. 2003. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *Journal of Natural Products* 66:1022-1037.
- Okane, I., Lumyong, S., Nakagiri, A., Ito, T. 2003. Extensive host range of an endophytic fungus, *Guignardia endophyllicola* (anamorph: *Phyllosticta capitalensis*). *Mycoscience* 44: 353-363.
- Oses, R., Valenzuela, S., Freer, J., Sanfuentes, E., Rodríguez, J. 2006a. Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Diversity* 33: 77-86
- Oses, R., Valenzuela, S., Freer, J., Baeza, J., Rodríguez, J. 2006b. Evaluation of fungal endophytes for lignocellulolytic enzyme production and wood biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57: 129-135.
- Pereira, J. O., Vieira, M. L. C., Azevedo, J. L. 1999. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 15: 37-40.
- Pereira, C. O., Lima, E. O., Oliveira, R. A. G., Toledo, M. S., Azevedo, A. K. A., Guerra, M. F., Pereira, R. C. 2005. Abordagem etnobotânica de plantas medicinais utilizadas em dermatologia na cidade de João Pessoa-Paraíba, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 7(3): 9-17.
- Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: J.H. Andrews & S.S. Hirano (Eds.) *Microbial Ecology of Leaves*. New York, Springer-Verlag, pp. 179-197.
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P., Hyde, K. D. 2001. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycological Research* 105(12): 1508-1513.
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E. H. C., Hyde, K. D. 2004. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? *Fungal Diversity* 16: 131-140.
- Pitt, J. I. 1988. *A laboratory guide to common Penicillium species*. North Ryde, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing.
- Porrás-Alfaro, A., Herrera, J., Sinsabaugh, R. L., Odenbach, K. J., Lowrey, T., Natvig, D. O. 2008. Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. *Applied and Environmental Microbiology* 74(9): 2805-2813
- Prompttha, I., Lumyong, S., Dhanasekaran, V., McKenzie, E. H. C., Hyde, K. D., Jeewon, R. 2007. Phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology* 53: 579-590.
- Qiu, M., Xie, R., Shi, Y., Zhang, H., Chen, H. 2010. Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L. *Annals of Microbiology* 60:143-150.
- Radu, S., Kqueen, C. Y. 2002. Preliminary screening of endophytic fungi from medicinal plants in Malaysia for antimicrobial and antitumor activity. *Malaysian Journal of Medical Sciences* 9(2): 23-33.
- Rakotoniriana, E. F., Munaut, F., Decock, C., Ramdriamanpionona, D., Andriambololoniaina, M., Rakotomalala, T., Rakotonirina, E. J., Rabemanantsoa, C., Cheuk, K., Ratsimamanga, S. U., Mahillon, J., El-Jaziri, M., Quetin-Leclercq, J., Corbisier, A. M. 2008. Endophytic

- fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interections within leaves. *Antonie van Leeuwenhoek* 93: 27–36.
- Raper, K.B., Fennell, D.I. 1977. *The genus Aspergillus*. Baltimore, Willians and Wilkins.
- Redman, R. S., Freeman, S., Clifton, D. R., Morrel, J., Brown, G., Rodriguez, R. J. 1999. Biochemical Analysis of Plant Protection Afforded by a Nonpathogenic Endophytic Mutant of *Colletotrichum magna*. *Plant Physiology* 119: 795-804.
- Redman, R. S., Dunigan, D. D., Rodriguez, R. J. 2001. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist* 151: 705–716.
- Redman, R. S., Sheehan K. B., Stout, R. G., Rodriguez, R. J., Henson, J. M. 2002. Thermotolerance Generated by Plant/Fungal Symbiosis. *Science* 298: 1581.
- Ren, A. Z., Li, X., Han, R., Yin, L. J., Wei, M. Y., Gao, Y. B. 2011. Benefits of a symbiotic association with endophytic fungi are subject to water and nutrient availability in *Achnatherum sibiricum*. *Plant Soil*
- Ribas, M. O., Sousa, M. H., Sartoretto, J., Lanzoni, T. A., Noronha, L., Acra, L. A. 2006. efeito da *Schinus terebinthifolius* raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. *Revista Odonto Ciência* 21(53): 245-252.
- Rodrigues, K. F., Samuels, G. J. 1999. Fungal endophytes of *Spondias mombin* leaves in Brazil. *Journal of Basic Microbiology* 39(2): 131–135.
- Rodríguez, R., Redman, R. 2008. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 59(5): 1109–1114.
- Samson, R.A., Frisvad, J.C. 2004. *Penicillium* Subgenus *Penicillium*: new Taxonomics Schemes, Mycotoxins and Other Extrolites. *Studies in Mycology* 49: 1-260.
- Sánchez-Márquez, S., Bills, G. F., Zabalgoceazcoa, I. 2007. The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Diversity* 27: 171-195.
- Santos, R. M. G., Rodrigues-Fo, E., Rocha, W. C., Teixeira, M. F. S. 2003. Endophytic fungi of *Melia azedarach*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 767-770.
- Santos, E. B., Dantas, G. S., Santos, H. B., Diniz, M. F. F. M., Sampaio, F. C. 2009. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19(1B): 321-324.
- Schmourlo, G., Mendonça-Filho, R. R., Alviano, C. S., Costa, S. S. 2005. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology* 96: 563–568.
- Schulz, B., Sucker, J., Aust, H. J., Krohn, K., Ludewig, K., Jones, P. G., Döring, D. 1995. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezicula* species. *Mycological Research* 99(8): 1007-1015.
- Schwarz, M., Köpcke, B., Weber, R. W. S., Sterner, O., Anke, H. 2004. 3-Hydroxypropionic acid as a nematicidal principle in endophytic fungi. *Phytochemistry* 65: 2239–2245.
- Sette, L. D., Passarini, M. R. Z., Delarmelina, C., Salati, F., Duarte, M. C. T. 2006. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal of Microbiology Biotechnology* 22:1185–1195.
- Sikora, R. A., Pocasangre, L., Felde, A., Niere, B., Vu, T. T., Dababat, A. A. 2008. Mutualistic endophytic fungi and *in-planta* suppressiveness to plant parasitic nematodes. *Biological Control* 46: 15–23.
- Silva, F. de A.S. *Assistat - Assistência estatística*. 2007. Versão 7.4 beta. UAEA-CTRN-UFCG Campina Grande-PB. Disponível em: <<http://assistat.sites.uol.com.br>>. Acesso em: 22 janeiro 2012.
- Silva, A.G., Almeida, D. L., Ronchi, S. N., Bento, A. C., Scherer, R., Ramos, A.C., Cruz, Z. M. A. 2010. The essential oil of Brazilian pepper, *Schinus terebinthifolia* Raddi in larval control of *Stegomyia aegypti* (Linnaeus, 1762). *Parasites & Vectors* 3:79.

- Siqueira, V. M., Conti, R., Araújo, J. M., Souza-Motta, C. M. 2011. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. *Symbiosis* 53: 89–95.
- Sivanesan, A. 1984. *The bitunicate ascomycetes and their anamorphs*. Germany. J. Cramer.
- Soares, D. G. S., Oliveira, C. B., Leal, C., Drumond, M. R. S., Padilha, W. W. N. 2007. Atividade antibacteriana *in vitro* da tintura de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na descontaminação de escovas dentais contaminadas pelo *S. mutans*. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada* 7(3): 253-257.
- Souza, A. Q. L., Souza, A. D. L., Astolfi Filho, S., Belém-Pinheiro, M. L., Sarquis, M. I. M., Pereira, J. O. 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazonica* 34(2): 185-195.
- Soytong, K., Srinon, W., Rattanacherdchai, K., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K. 2005. Application of antagonistic fungi to control anthracnose disease of grape. *Journal of Agricultural Biotechnology* 1: 33-41.
- Spector, T., Putz, F. E. 2004. Biomechanical plasticity facilitates invasion of maritime forests in the southern USA by Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius*). *Biological Invasions* 8: 255–260.
- Sreekanth, D., Syed, A., Sarkar, S., Santhakumari, B., Ahmad, A., Khan, M. I. 2009. Production, purification, and characterization of taxol and 10-DABIII from a new endophytic fungus *Gliocladium* sp. isolated from the Indian Yew tree, *Taxus baccata*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(11), 1342–1347.
- Strobel, G. A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection* 5: 535–544.
- Strobel, G., Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67:491-502.
- Strobel, G. A., Knighton, B., Kluck, K., Ren, Y., Livinghouse, T., Griffin, M., Spakowicz, D., Sears, J. 2008. The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072). *Microbiology* 154: 3319–3328.
- Strobel, G. A., Knighton, B., Kluck, K., Ren, Y., Livinghouse, T., Griffin, M., Spakowicz, D., Sears, J. 2010. The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072). *Microbiology* 156, 3830–3833. *Corrigendum*.
- Sun, X., Guo, L., Hyde, K. D. 2011. Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fungal Diversity* 47:85–95.
- Suryanarayanan, T. S., Thennarasan, S. 2004. Temporal variations in endophyte assemblages of *Plumeria rubra* leaves. *Fungal Diversity* 15:197-204.
- Sutton, B.C. *The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. 1980. Kew: Commonwealth Mycological Institute.
- Talhinhas, P., Sreenivasaprasad, S., Neves-Martins, J., Oliveira, H. 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Applied and Environmental Microbiology* 71(6): 2987-2998.
- Taylor, J. E., Hyde, K. D., Jones, E. B. G. 1999. Endophytic fungi associated with temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. *New Phytologist* 142: 335-346.
- Tayung, K., Barik, B. P., Jha, D. K., Deka, D. C. 2011. Identification and characterization of antimicrobial metabolite from an endophytic fungus, *Fusarium solani* isolated from bark of Himalayan yew. *Mycosphere* 2(3), 203–213.

- Tejesvi, M. V., Mahesh, B., Nalini, M. S., Prakash, S. H., Kini, K. R., Subbiah, V., Shetty, H. S. 2005. Endophytic fungal assemblages from inner bark and twig of *Terminalia arjuna* W & A. (Combretaceae). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21:1535-1540.
- Tejesvi, M. V., Kajula, M., Mattila, S., Pirttilä, A. M. 2011. Bioactivity and genetic diversity of endophytic fungi in *Rhododendron tomentosum* Harmaja. *Fungal Diversity* 47:97-107.
- Tonial, F. 2010. Atividade antimicrobiana de endófitos e de extratos foliares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 138p.
- Vega, F. E., Posada, F., Aime, M. C., Pava-Ripoll, M., Infante, F., Rehner, S. A. 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control* 46: 72-82.
- Vennila, R., Muthumary J. 2011. Taxol from *Pestalotiopsis pauciseta* VM1, an endophytic fungus of *Tabebuia pentaphylla*. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 1: 103-108.
- Wang, F. W., Jiao, R. H., Cheng, A. B., Tan, S. H., Song, Y. C. 2007. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and Brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 79-83.
- Weber, R. W. S., Kappe, R., Paululat, T., Mösker, E., Anke, H. 2007. Anti-*Candida* metabolites from endophytic fungi. *Phytochemistry* 68: 886-892.
- Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Panphut, W., Thongon, N., Danwiset-kanjana, K., Ruangrunsi, N., Meevootisom, V. 2004. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 265-272.
- Wu, B., Wu, L., Ruan, L., Ge, M., Chen, D. 2009. Screening of endophytic fungi with antithrombotic activity and identification of a bioactive metabolite from the endophytic fungal strain CPC 480097. *Current Microbiology* 58:522-527.
- Wu, S., Zhao, L., Chen, Y., Huang, R., Miao, C., Wang, J. 2011. Sesquiterpenoids from the Endophytic Fungus *Trichoderma* sp. PR-35 of *Paeonia delavayi*. *Chemistry and Biodiversity* 8: 1717-1723.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Fujii, Y., Shirata, A. 2000. *Colletotrichum dematium* produces phytotoxins in anthracnose lesions of mulberry leaves. *Biochemistry and Cell Biology* 90(3): 285-291.
- Xiao, C. L., MacKenzie, S. J., Legard, D. E. 2004. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated hosts. *Population Biology* 94: 446-453.
- Xiao, X., Luo, S., Zeng, G., Wei, W., Wan, Y., Chen, L., Guo, H., Cao, Z., Yang, L., Chen, J., Xi, Q. 2010. Biosorption of cadmium by endophytic fungus (EF) *Microsphaeropsis* sp. LSE10 isolated from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Bioresource Technology* 101: 1668-1674.
- Xing, Y., Chen, J., Cui, J., Chen, X., Guo, S. 2011. Antimicrobial activity and biodiversity of endophytic fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum* from Vietman. *Current Microbiology* 62: 1218-1224.
- Yuan, Z., Chen, Y., Yang, Y. 2009. Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 295-303.
- Zhang, H. W., Song, Y. C., Tan, R. X. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Products Reports* 23:753-771.
- Zhang, J., Li, L., Kim, S., Hagerman, A. E., Lü, J. 2009. Anti-Cancer, Anti-Diabetic and Other Pharmacologic and Biological Activities of Penta-Galloyl-Glucose. *Pharmaceutical Research* 26(9): 2066-2080.

- Zhang, X., Li, G., Ma, J., Zeng, Y., Ma, W., Zhao, P. 2010. Endophytic fungus *Trichotecium roseum* LZ93 antagonizing pathogenic fungi *in vitro* and its secondary metabolites. *The Journal of Microbiology* 48(6): 784-790.
- Zhao, K., Ping, W., Li, Q., Hao, S., Zhao, L., Gao, T., Zhou, D. 2009. *Aspergillus niger* var. *taxi*, a new species variant of taxol-producing fungus isolated from *Taxus cuspidata* in China. *Journal of Applied Microbiology* 107(4): 1202-1207.
- Zheng, C., Li, L., Zou, J., Han, T., Qin, L. 2011. Identification of a quinazoline alkaloid produced by *Penicillium vinaceum*, an endophytic fungus from *Crocus sativus*. *Pharmaceutical Biology* 50(2): 129-133.
- Zhou, X., Zhu, H., Liu, L., Lin, J., Tang, K. 2010. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86: 1707-1717.