



TATIANNE LEITE NASCIMENTO

FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Calotropis procera* (AIT.) R. BR.:
ASPECTOS ECOLÓGICOS E POTENCIAL ANTIMICROBIANO

RECIFE

2010



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

**FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Calotropis procera* (AIT.) R. BR.:
ASPECTOS ECOLÓGICOS E POTENCIAL ANTIMICROBIANO**

TATIANNE LEITE NASCIMENTO
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.
Área de Concentração: Micologia Básica.

**Orientadora: Dra. Cristina Maria de Souza Motta - UFPE
Co-orientadora: Dra. Janete Magali de Araújo - UFPE**

RECIFE

2010

Catálogo na fonte
Teresa Lucena
CRB 1419

Nascimento, Tatianne Leite

Fungos endofíticos de *Calotropis procera* (AIT.) R. BR.: aspectos ecológicos e potencial antimicrobiano/ Tatianne Leite Nascimento– Recife: O Autor, 2013.

70 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Cristina Maria de Souza Motta

Coorientador: Janete Magali de Araújo

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

Inclui bibliografia

1. Fungos endofíticos
 2. *Calotropis procera*
 3. Atividade antimicrobiana
- I. Motta, Cristina Maria de Souza (orientador) II. Araújo, Janete Magali de (coorientador) III. Título

579.17

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 310

FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Calotropis procera* (AIT.) R. BR.: ASPECTOS
ECOLÓGICOS E POTENCIAL ANTIMICROBIANO

TATIANNE LEITE NASCIMENTO

Data da defesa: 11 de fevereiro de 2010

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dra. Cristina Maria de Souza Motta (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Neiva Tinti de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Yumi Oki
Universidade Federal de Minas Gerais

Dedico a minha mãe, por tudo que ela
viveu e me ensinou, pelo amor e
dedicação.

Agradecimentos

À UFPE, Departamento de Micologia e a Pós-graduação em Biologia de Fungos;

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida durante os dois anos de estudos;

À FINEP, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho através do projeto “Coleções de Cultura de Micro-organismos Micoteca URM e UFPEDA da Universidade Federal de Pernambuco”;

Aos meus pais, Rosa Maria Leite Nascimento e José Batista do Nascimento, com todo carinho pelo apoio, amor e confiança. Em especial a minha mãe pelo aconchego, palavras de incentivo nos momentos de angústias e pelo suporte em todos os sentidos que me permitiram chegar aonde cheguei;

Ao Phelipe Manoel Oller Costa pela ajuda nas coletas;

Às minhas irmãs Daianne e Ariane pelo otimismo e carinho durante esta etapa de minha vida;

À todos os meus familiares, tios, tias, primos e primas pelo apoio e confiança;

À Patrícia Vieira Tiago e Jorge Luiz Schirmer de Mattos pela amizade e ajuda durante minha mudança para o Estado de Pernambuco;

À professora Dra. Cristina Maria Souza Motta, minha orientadora, pelos conhecimentos transmitidos e pela confiança depositada em mim;

À professora Dra. Janete Magali, co-orientadora, pelos conhecimentos transmitidos e pelo acolhimento sem restrições no Departamento de Antibióticos-UFPE;

Às professoras Débora Maria Massa Lima e Maria José dos Santos Fernandes, pela colaboração na identificação dos meus fungos endofíticos;

À professora Rejane Pereira Neves pela atenção e ajuda na identificação das leveduras isoladas;

Aos professores Jarcilene Almeida-Cortez (Depto. de Botânica-UFPE) e Geraldo Wilson Fernandes (Depto. de Biologia Geral-UFMG), pela confiança, atenção, disponibilidade e orientações fundamentais para a conclusão desse trabalho;

À Steffania Genú por compartilhar e enfrentar comigo inúmeros desafios para a conclusão de algumas etapas desse trabalho;

À Eliziane Pereira do Departamento de Antibióticos, pelo suporte técnico durante os ensaios antimicrobianos;

Aos companheiros da Micoteca pelo acolhimento e amizade;

Aos professores da Pós-Graduação em Biologia de Fungos pelos conhecimentos transmitidos;

Aos amigos do Departamento de Micologia pelos momentos de descontração e agradável convivência;

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta me ajudaram na conclusão dessa pesquisa.

RESUMO GERAL

Fungos endofíticos são micro-organismos que colonizam assintomaticamente, intra e/ou intercelularmente, tecidos sadios de plantas em algum período do seu ciclo de vida. Estes despertaram grande interesse biotecnológico em virtude da aplicabilidade de seus metabólitos secundários na medicina, indústria e agricultura. *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Apocynaceae) é uma planta medicinal muito utilizada nas regiões de origem (Ásia e África) com comprovado potencial farmacológico, sendo de ocorrência subspontânea no Nordeste do Brasil. Com o objetivo geral de analisar alguns aspectos ecológicos e o potencial antimicrobiano dos fungos endofíticos de *C. procera*, no presente estudo, foram realizadas duas coletas de material vegetal: uma no canteiro experimental do Centro de Ciências Biológicas, UFPE (Área 1), para avaliar a influência da idade foliar na comunidade de fungos endofíticos; e nas margens da BR-232, no início da Serra das Russas-PE (Área 2), para estudar a influência do tipo de tecido vegetal na comunidade de fungos endofíticos associados a folhas e pedúnculos florais. Os endofíticos foram caracterizados quanto à produção de substâncias antimicrobianas contra micro-organismos testes, patogênicos ao homem e vegetais, através de seleção em meio sólido e líquido. Na Área 1, um total de 156 isolados fúngicos distribuídos em 19 táxons, foram obtidos a partir dos 468 fragmentos foliares analisados. Verificou-se que o aumento da idade foliar exerceu uma forte influência no aumento da taxa de colonização e da riqueza de táxons dos fungos endofíticos isolados. Ocorreu pouca variação entre os índices de diversidade de Shannon calculados para as diferentes categorias etárias. A espécie dominante foi *Phaeoramularia calotropidis*, seguida por *Guignardia bidwellii*. Seis fungos endofíticos mostraram atividade contra pelo menos um micro-organismo teste. A capacidade antagônica foi verificada apenas contra bactérias Gram-positivas e os fungos patogênicos *Epidermophyton floccosum* e *Colletotrichum dematium*. Na Área 2, dos 400 fragmentos vegetais analisados foram isolados 214 fungos endofíticos distribuídos em 30 táxons, incluindo 11 morfoespécies. A taxa de colonização dos fungos endofíticos foi bem superior nos fragmentos de pedúnculos florais (61%) que nos foliares (22,5 %). Nos pedúnculos florais as leveduras predominaram, enquanto que nas folhas os fungos filamentosos foram o grupo prevalente. Dentre as espécies de fungos filamentosos isolados de pedúnculo floral, destaca-se a espécie *Monodisma fragilis* de primeira ocorrência na América Latina. Dos 51 fungos endofíticos submetidos a seleção primária em meio sólido, 47% mostraram atividade contra pelo menos um micro-organismo teste, principalmente contra bactérias Gram-positivas. Dos fungos selecionados em ensaio em meio sólido, apenas quatro apresentaram resultados positivos nas condições de cultivo aplicadas no ensaio em meio líquido, com destaque para o isolado do pedúnculo floral *Xylaria* sp., com atividade contra *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*.

Palavras-chave: Fungos endofíticos; Idade foliar; Diversidade; Atividade antimicrobiana; *Calotropis procera*.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that colonize asymptotically, intra and/or intercellular, healthy tissues of plants at some time during their life cycle. These arouse great interest in biotechnology because of the applicability of their secondary metabolites in medicine, industry and agriculture. *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. (Apocynaceae) is subspontaneous in Northeast Brasil. It is a medicinal plant widely used in the region of origin (Asia and Africa) with a proven pharmacological potential. The overall objective of this study was to analyze ecological features and antimicrobial activity of endophytic fungi of *C. procera*. Two samples were collected: the one in the area of the Center of Biological Sciences, UFPE (Area 1) was used to determine the influence of leaf age in the community of endophytic fungi, and the other, collected in the BR-232 at the beginning of Serra das Russas-PE (Area 2), was used to study the influence of plant tissue in the community of endophytic fungi associated with leaves and flower stalks. The endophytes were characterized by the ability to produce antimicrobial substances against test microorganisms, pathogenic to humans and plants, through selection on solid and liquid media. In Area 1, 156 fungal isolates distributed in 19 taxa were obtained from 468 leaf fragments analyzed. The leaf age influenced the increase of the rate of colonization and the taxa of endophytic fungi isolated. There was little variation between the indices of Shannon diversity calculated for the different age categories. The dominant species was *Phaeoramularia calotropidis*, followed by *Guignardia bidwellii*. Six endophytic fungi showed activity against at least one test microorganism. The antagonistic ability was observed only against gram-positive bacteria and the pathogenic fungi *Epidermophyton floccosum* and *Colletotrichum dematium*. In Area 2, of the 400 plant fragments analyzed 214 endophytic fungi distributed in 30 taxa were isolated including 11 morphospecies. The rate of colonization of endophytic fungi was higher in samples from the flower stalks (61%) than in leaves (22.5%). Yeasts were predominant in floral stalks, while filamentous fungi were the prevalent group in leaves. Among the species of filamentous fungi, *Monodisma fragilis*, isolated from floral stalks, is reported as the first occurrence in Latin America. Of the 51 endophytic fungi undergone on primary selection on solid medium, 47% showed activity against at least one test organism, especially against Gram-positive bacteria. Among the fungi tested and selected on solid medium, only four showed positive results in the cultivation conditions applied in the test in liquid medium, especially *Xylaria* sp. isolated from the floral stalks, with activity against *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*.

Key-words: Endophytic fungi; Age leaf; Diversity, Antimicrobial activity; *Calotropis procera*.

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Planta <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R. Br.....	24
Capítulo 1	
Figura 1. Ramo contendo folhas de <i>Calotropis procera</i> categorizadas em três faixas etárias: Folhas 1, 2, 3 – Jovens; 4, 5, 6 – Maduras e 7, 8 – Senescentes.....	31
Figura 2. Influência do aumento da idade foliar na taxa de colonização dos fungos endofíticos de <i>Calotropis procera</i> . Folhas 1, 2, 3 – Jovens; 4, 5, 6 – Maduras e 7, 8 – Senescentes.....	38
Figura 3. Média (\pm erro padrão) da densidade dos fungos endofíticos isolados em diferentes estágios de desenvolvimento foliar de <i>Calotropis procera</i> . Folhas 1, 2, 3 – Jovens; 4, 5, 6 – Maduras; 7, 8 – Senescentes. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade...	40
Capítulo 2	
Figura 1. Média da densidade dos fungos endofíticos isolados de diferentes tecidos vegetais de <i>Calotropis procera</i> , coletadas na BR 232, Pernambuco - Brasil. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste t entre duas amostras pareadas ao nível de 5% de probabilidade.....	53
Figura 2. Halo de inibição produzido pelo endofítico <i>Xylaria</i> sp. (URM 6087) isolado de <i>Calotropis procera</i> contra as bactérias <i>Streptococcus pyogenes</i> UFPEDA 07, <i>Enterococcus faecalis</i> UFPEDA 138, <i>Escherichia coli</i> UFPEDA 224, <i>Salmonella typhi</i> UFPEDA 478, em função do tempo de incubação.....	58
Figura 3. Variação do pH do meio de cultura e da massa celular (g/mL) produzida pelo endofítico <i>Xylaria</i> sp. (URM 6087) isolado de <i>Calotropis procera</i> , em função do tempo de incubação.....	58

Lista de Tabelas

	Pág.
Capítulo 1	
Tabela 1. Densidade e composição de táxons de fungos endofíticos isolados em diferentes estágios de desenvolvimento foliar de <i>Calotropis procera</i>	35
Tabela 2. Índice de diversidade de Shannon dos fungos endofíticos isolados em diferentes estágios de desenvolvimento foliar de <i>Calotropis procera</i>	37
Tabela 3. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de <i>Calotropis procera</i> isolados de folhas em diferentes estágios de desenvolvimento detectada pelo método de disco difusão.....	40
Capítulo 2	
Tabela 1. Riqueza e Frequência relativa dos fungos endofíticos isolados de diferentes tecidos vegetais de <i>Calotropis procera</i> , coletadas na BR 232, Pernambuco - Brasil.....	49
Tabela 2. Atividade antimicrobiana em meio sólido dos fungos endofíticos isolados de diferentes tecidos vegetais de <i>Calotropis procera</i> , coletadas na BR 232, Pernambuco – Brasil.....	54
Tabela 3. Atividade antimicrobiana contra micro-organismos patogênicos, dos fungos endofíticos de <i>Calotropis procera</i> cultivados em meio líquido.....	57

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
2.1. Micro-organismos Endofíticos.....	13
2.2. Dinâmica da Interação Fungo Endofítico-Planta Hospedeira.....	16
2.2.1. Transmissão e Colonização.....	16
2.2.2. Diversidade e Especificidade.....	17
2.3. Potencial Antimicrobiano de Fungos Endofíticos.....	20
2.4. <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R. Br.....	23
2.4.1. Características Morfológicas, Origem e Ocorrência.....	23
2.4.2. Aplicações de <i>Calotropis procera</i>	25
2.4.3. Fungos associados a <i>Calotropis procera</i>	27
3. INFLUÊNCIA DA IDADE FOLIAR DE <i>Calotropis procera</i> (AIT.) R. BR. NA COMUNIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..	28
Resumo.....	28
Introdução.....	29
Material e Métodos.....	30
Resultados e Discussão.....	34
4. FUNGOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS E PEDÚNCULOS FLORAIS DE <i>Calotropis procera</i> (AIT.) R. BR. E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	42
Resumo.....	42
Introdução.....	43
Material e Métodos.....	44
Resultados e Discussões.....	49
5. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

As plantas apresentam complexos mecanismos adaptativos, muitos destes somente possíveis, graças às interações com os micro-organismos. Destes destacam-se os endofíticos, micro-organismos que vivem em associação íntima no interior de tecidos de plantas vivas sem causar danos aparentes (Strobel, 2003). Acredita-se que estes desempenham funções importantes no processo de adaptação da planta com o meio, no entanto muitos aspectos são ainda desconhecidos nessa interação tão particular (Peixoto-Neto *et al.*, 2004).

Há algumas décadas, não se imaginava a grande potencialidade dos endofíticos e por isso, apesar desses micro-organismos serem encontrados no interior de praticamente todas as espécies vegetais, pouca importância foi dada a esse grupo. Desde o final do século XX o interesse aumentou e novos aspectos de relevância ecológica e farmacológica envolvendo esses micro-organismos são continuamente descobertos (Araújo *et al.*, 2002). Considerando que poucas das 300.000 espécies de plantas existentes no Planeta foram analisadas quanto a microbiota endofítica, a oportunidade de encontrar novos micro-organismos e estes serem produtores de compostos úteis para a medicina, agricultura e indústria é grande (Strobel; Daisy, 2003). Acredita-se, ainda, que muitas substâncias bioativas que ocorrem em plantas podem ser produzidas por endofíticos. Diante disto, houve um aumento no desenvolvimento de pesquisas envolvendo isolamento e caracterização biotecnológica desses micro-organismos de plantas medicinais úteis farmacologicamente, considerando que o aumento de micro-organismos patogênicos resistentes a antifúngicos e antibacterianos é uma realidade (Strobel, 2003; Strobel *et al.*, 2004).

Calotropis procera (Ait.) R. Br. (Apocynaceae), originária da África e Ásia é uma espécie vegetal de ocorrência subspontânea e comum na região Nordeste do Brasil (Melo *et al.*, 2001). É uma planta muito explorada pela medicina popular nas regiões de origem, utilizada para combater diversas doenças em humanos e outros animais (Kareem *et al.*, 2008; Hassan *et al.*, 2006). De acordo com o vasto uso popular, *C. procera* foi alvo de diferentes estudos que comprovaram algumas de suas atividades farmacológicas: antimicrobiana, analgésica, antidiarréica e antiinflamatória (Kumar; Basu, 1994; Dewan *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2001; Kareem *et al.*, 2008).

Devido ao potencial biotecnológico, *C. procera* merece atenção como uma fonte inexplorada no Brasil, quanto a composição de fungos endofíticos com atividade farmacológica e de interesse para a agricultura pressupondo-se, ainda, que estes fungos possam compartilhar algumas propriedades antimicrobianas de seu hospedeiro. Foi neste contexto que se focalizou a atenção no estudo de alguns aspectos ecológicos (diversidade, riqueza de espécies, especificidade a idade e tipo de tecido colonizado) envolvendo a interação fungo endofítico-*C. procera* e a habilidade em produzir substâncias bioativas contra alguns micro-organismos patogênicos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Micro-organismos Endofíticos

Os endofíticos constituem-se em um grupo de micro-organismos, principalmente bactérias e fungos, com habilidades singulares de interesse fora e dentro da planta hospedeira, sendo potenciais fontes de estudo que fascinam pesquisadores do mundo todo. Este grupo é conhecido a mais de um século, porém, somente nas últimas décadas houve uma intensificação dos estudos em decorrência, principalmente do seu potencial biotecnológico, isto é, enzimas e produtos farmacêuticos (Araújo *et al.*, 2002). Além dos aspectos econômicos, há um forte interesse científico por esses micro-organismos, no que diz respeito a descoberta de novas espécies microbianas. Bussaban *et al.* (2003) isolaram três novas espécies de *Pyricularia* (*P. kookicola*, *P. longispora* e *P. variabili*) como endofíticos de duas espécies de gengibre selvagem, na Tailândia; Zhang *et al.* (2007) isolaram *Trichoderma taxi* sp. nov. como endofítico de *Taxus mairei* de uma reserva natural na China; Siqueira *et al.* (2008) isolando uma nova espécie de Hyphomycete, *Corynespora subcylindrica* sp. nov. como endofítico de *Lippia sidoides*, planta medicinal do Brasil.

O termo endofítico foi introduzido por De Bary, que os definiu como “Qualquer organismo encontrado no interior de tecidos vegetais” (De Bary, 1866 *apud* Hyde; Soyong, 2008) englobando, assim, os fitopatógenos. Apesar dessa definição ser tão simplista, somente no final do século XX, novas definições para os micro-organismos endofíticos foram propostas, e estes foram definidos por Carroll (1986 *apud* Hyde; Soyong, 2008) como colonizadores assintomáticos do interior das partes aéreas das plantas, ou seja, sem causar danos aparentes, segregando-os dos fitopatógenos e excluindo os micro-organismos vivos no interior das raízes. Mas a maioria das definições subsequentes comporta a inclusão de micro-organismos isolados de raízes, no entanto os fungos micorrízicos, geralmente são desconsiderados (Hyde; Soyong, 2008). A inclusão ou não de um grupo como endofítico é variável, sendo ainda atrelada ao conceito adotado pelo autor. Azevedo em 1998, por exemplo, considerou os fungos micorrízicos e as bactérias que formam nódulos nas raízes de plantas como endofíticos (Azevedo *et al.*, 2002).

De acordo com Maheshwari (2006) a exigência mínima para que um fungo possa ser considerado um endófito é a demonstração das hifas nos tecidos vivos da planta hospedeira, o que exigiria métodos particulares para a identificação como técnicas de detecção por imunofluorescência, seqüenciamento gênico etc. Apesar de questões como a acima citada serem de considerável valor, um dos motivos para o aumento de trabalhos envolvendo os endofíticos é, além da importância ecológica e biotecnológica do grupo, a simplicidade das técnicas de isolamento, viabilizando, assim obtenção de micro-organismos crescendo em meio de cultivo nutritivo.

Embora exista uma ampla discussão sobre a definição ideal para um endofítico, a definição de Petrini (1991) é a mais amplamente aceita e citada, na qual os micro-organismos endofíticos são aqueles que residem assintomaticamente nos espaços apoplásticos e/ou dentro das células vivas das plantas em todo ou pelo menos uma parte significativa do ciclo de vida. Estes se distinguem dos epifíticos (aqueles que vivem na superfície das plantas) e dos fitopatógenos (aqueles que causam doenças nas plantas). As diferenças entre estes grupos são consideradas de significado puramente didático já que a distância de uma condição para outra pode ser muito pequena. O que há, na realidade é um gradiente com interfaces entre endofíticos, epifíticos e patógenos (Peixoto-Neto *et al.*, 2002).

Rodriguez e Redman (2008), em seu artigo de revisão, discutem sobre a categorização dos fungos endofíticos como patógenos, sapróbios, ou mutualistas, apoiando a questão que isolados fúngicos de uma mesma espécie ou gênero podem apresentar uma plasticidade ecológica significativa. No caso, análises de espécies de *Colletotrichum*, gênero frequentemente isolado como endofíticos de plantas tropicais, indicam que a expressão do comportamento parasita ou mutualista dependem do genótipo da planta hospedeira. Tal hipótese foi exemplificada por estudos que demonstraram que espécies de *Colletotrichum* classificadas como virulentas em algumas plantas (*C. magna* do Melão; *C. acutatum* e *C. gloesporioides* do Morango), em outras hospedeiras (*C. magna* do Tomate; *C. acutatum* e *C. gloesporioides* do Melão), além de não causarem doenças, estabeleceram uma relação mutualística tais como: resistência a doenças, aumento de crescimento e/ou tolerância a seca.

Peixoto-Neto *et al.* (2002) afirmam ainda que, um micro-organismo considerado endofítico pode se comportar como um patógeno devido a redução dos mecanismos de defesa da planta hospedeira. Essa informação nos remete a considerar a questão referente aos endofíticos como patógenos latentes ou isolados hipovirulentos. Há trabalhos que

apóiam a possibilidade de que isolados resgatados de tecidos sadios, possam ser, na realidade, formas latentes do patógeno, como verificado por Lana (2004) uma vez que, a partir de análises moleculares de variabilidade genética, não encontrou diferenças entre isolados considerados endofíticos e patogênicos de cacauzeiro. Em contrapartida, Azevedo *et al.* (2000) divulgam em uma revisão, a diferenciação genética e morfológica entre isolados de *Guignardia citricarpa*, espécie do agente causal da “mancha preta de cítrico”, obtidos de lesões (fitopatógenos) e de isolados dessa mesma espécie procedentes de tecidos saudáveis (endofíticos). Análises de RAPD desses dois grupos geram 343 bandas, e uma delas foi exclusiva do DNA dos isolados patogênicos, o que permitiu a criação de *primers* específicos para este grupo. Testes morfológicos também separaram os dois grupos em relação a esporulação.

O comportamento ecológico das diferentes espécies de fungos endofíticos em associação com a planta hospedeira ainda não é totalmente claro, podendo até variar de mutualista ou simbiótico para antagônico ou ligeiramente patogênico (Saikkonen *et al.*, 1998; Schulz; Boyle, 2005; Arnold, 2007), ou ainda ser neutro, como inicialmente foi considerado na década de 70 (Azevedo *et al.*, 2000). Diante do exposto, a categorização de um endofítico em um grupo ecológico fixo é uma tarefa muito difícil.

No entanto, estudos têm demonstrado que em muitos casos, existe uma importante interação simbiótica com o hospedeiro, contribuindo de maneira significativa no processo de adaptação da planta com o meio. Esta interação envolve a produção de compostos que diminuem a herbivoria sobre os tecidos vegetais ou conferem resistência a fitopatógenos, além da produção de fitoreguladores que podem aumentar o desenvolvimento vegetal, entre outros (Azevedo *et al.*, 2000; Peixoto-Neto *et al.*, 2004). Entre diversos estudos que verificam os benefícios da relação endofítico-hospedeiro, pode-se citar o trabalho de Arnold *et al.* (2003). Os autores ao estudarem a resposta de plantas de cacauzeiro axênicas (isentas de micro-organismos) inoculadas com endofíticos do próprio hospedeiro e com o patógeno *Phytophthora* sp., observaram que as plantas inoculadas com os endófitos apresentaram menos necrose e mortalidade das folhas, se comparadas ao controle, inoculados apenas com o patógeno.

Apesar da complexidade e variabilidade das interações fungos endofíticos-planta hospedeira, características como modo de transmissão e os padrões de infecção e fatores ecológicos (concorrência com outros micro-organismos, estrutura espacial de populações, fatores abióticos e predições da associação de endofítico-planta) são susceptíveis de mudanças ao longo dessa interação (Saikkonen *et al.*, 1998).

2.2. Dinâmica da Interação Fungo Endofítico-Planta Hospedeira

Muitos aspectos são ainda desconhecidos nas interações entre plantas/micro-organismos que vivem associados e só mais recentemente com ajuda de especialistas das áreas de bioquímica, genética clássica e molecular, ecologia e outras áreas afins começam a se desvendar detalhes desta interação. Contudo ainda levará muito tempo para este grande vazio seja preenchido satisfatoriamente (Azevedo *et al.*, 2002).

2.2.1. Transmissão e Colonização

Os endofíticos podem infectar as plantas hospedeiras de forma vertical e/ou horizontal. Na transmissão vertical o fungo difundido sistemicamente é passado para os descendentes via sementes da planta hospedeira. Já a transmissão do fungo realizada por meio de esporos de origem assexual e sexual é dita horizontal. A transmissão horizontal, originando colonizações localizadas em alguns tecidos e órgãos vegetais, é sem dúvida a forma mais comum de transmissão e pode ser encontrada em todos os tipos de plantas. Provavelmente, o tamanho, a complexa arquitetura morfológica e a idade de maturidade mais longa das plantas arbóreas, limitam o crescimento sistêmico e o sucesso da transmissão vertical dos fungos endofíticos. Em contrapartida, o pequeno tamanho, morfologia e posição dos meristemas das gramíneas fornecem mais oportunidades para o crescimento sistêmico e subsequente transmissão vertical para fungos (Saikkonen *et al.*, 2004).

Os endofitos, com exceção dos transmitidos pelas sementes podem penetrar através da zona radicular, enquanto que os micro-organismos presentes no ar utilizam aberturas naturais como estômatos presentes nas partes aéreas da planta como folhas, caule, cotilédones, flores e frutos (Saikkonen *et al.*, 2004; Maheshwari, 2006). Podendo, ainda, utilizar outras portas de entradas, como aberturas causadas por insetos e outros animais, e até mesmo pelas estruturas de fungos patogênicos, como os apressórios. Também pode ocorrer entrada ativa de endofíticos pela produção de enzimas ou estruturas que facilitem sua penetração (Schulz; Boyle, 2005).

As comunidades endofíticas cuja composição, forma de colonização e transmissão varia em função do hospedeiro e das condições ambientais, se inter-relacionam dentro da planta, em um balanço harmônico (Peixoto-Neto *et al.*, 2002). Na literatura, considerando

as três variáveis, composição, forma de colonização e transmissão, os fungos endofíticos são divididos em dois grupos principais: *balansiaceus* e não-*balansiaceus*. Onde, endofíticos *balansiaceus* são fungos ascomicetos pertencentes aos gêneros *Epichloë* e *Balansia* (anamorfos *Neotyphodium* e *Ephelis*), que se desenvolvem sistêmica e intercelularmente e são transmitidos verticalmente através de sementes. Quanto a interação endofítico-hospedeiro, são os mais bem estudados sendo encontrados nos órgãos de gramíneas das regiões temperadas (Schulz; Boyle, 2005). Endófitos não-*balansiaceus* são diversos, tanto filogeneticamente quanto em relação à estratégia de vida. São transmitidos horizontalmente (Arnold *et al.*, 2003; Schulz; Boyle, 2005) e a maioria dos fungos deste grupo pertence ao grupo dos ascomicetos, tendo sido isolados de praticamente todas as plantas. A colonização pode ser inter ou intracelular, localizada ou sistêmica (Schulz; Boyle, 2005).

Fatores bióticos e abióticos modificam a frequência e composição dos fungos endofíticos transmitidos horizontalmente a planta hospedeira. Entre os fatores bióticos, além da disponibilidade dos esporos, há a interferência do genótipo e fenótipo da planta e interações com outros microorganismos na planta (Ahlholm *et al.*, 2002). Os fatores abióticos incluem temperatura e umidade do ambiente; o regime de chuvas pode influenciar fortemente a dispersão e a germinação dos esporos dos fungos endofíticos (Carroll, 1988). Os resultados obtidos por Arnold *et al.* (2003) indicam que a chuva, orvalho ou névoa favoreceram a entrada do fungo endofítico no interior das folhas ou plântulas de cacau. Estes pesquisadores ainda verificaram que a maior densidade de endofíticos encontrada em folhas maduras pode estar associada ao tempo de exposição ao ambiente. A maior abundância e riqueza de fungos endofíticos nas folhas maduras quando comparadas as folhas jovens de plantas tropicais foram observadas nos trabalhos de Arnold e Herre (2003), Pimentel *et al.* (2006) e Esteves *et al.* (2007). Este padrão também pode estar relacionado com a maior concentração de substâncias antifúngicas em folhas jovens (Coley; Barone, 1996), o que poderia influenciar a colonização de endofíticos nessas folhas.

2.2.2. Diversidade e Especificidade

Os fungos são uma das formas de vida mais diversas neste Planeta. Estima-se que existam 1,5 milhões de espécies fúngicas, destas apenas 74 mil são correntemente

conhecidas. No entanto essa escala de diversidade de espécies está em aberta discussão; dados recentes gerados por micologistas que trabalham nos trópicos, ou ao nível molecular, sugerem que essa estimativa é muito baixa (Hawksworth, 2001), principalmente ao considerar os fungos microscópicos, cujos papéis ecológicos são pouco conhecidos e a presença negligenciada por ocuparem, de forma oculta, habitats particulares. Como é o caso dos fungos endofíticos, um grupo polifilético altamente diverso, que são definidos funcionalmente pela ocorrência dos mesmos no interior de tecidos assintomáticos de plantas, sendo encontrados em todo vegetal estudado - musgos, samambaias, sementes de plantas do ártico a plantas tropicais, e de campos agrícolas para ambientes naturais biologicamente diversos (Arnold, 2007).

Estudos em florestas tropicais sugerem que a diversidade de fungos endofíticos é maior nos trópicos que nas regiões temperadas (Cannon; Simmons, 2002). Arnold *et al.* (2001), ao estudarem nove espécies arbóreas neotropicais representando nove famílias vegetais no Panamá, isolaram 418 morfoespécies de fungos endofíticos, destas apenas 140 foram encontradas em mais de uma folha, demonstrando alta especificidade. Concluíram, com base neste e em outros estudos, que os fungos endofíticos são hiperdiversos nos trópicos e que a figura de 1,5 milhões pode subestimar a diversidade de fungos e que um importante fator é a especificidade ao hospedeiro. No entanto, estudos posteriores sugerem cautela antes de se considerar os fungos endofíticos hiperdiversos em espécies vegetais de ambientes tropicais. Suryanarayanan *et al.* (2003) ao investigarem a micobiota endofítica de 24 árvores de duas florestas tropicais secas (espinhosa e decídua) no sul da Índia, obtiveram uma curva de acumulação de espécies diferente da curva progressiva obtida para uma floresta tropical úmida (Arnold *et al.*, 2001), já que o número de espécies de endofíticos só aumentou de forma significativa com o número de isolados inicialmente. Esse estudo e o de Cannon e Simmons (2002) com 12 espécies arbóreas da Guiana sugerem que para algumas espécies de ecossistemas tropicais a diversidade de endofítico não é alta.

As espécies de fungos endofíticos mais freqüentemente isoladas nos trópicos pertencem ao filo Ascomycota, incluindo os anamorfos (te e Coelomycetes). Espécies de Basidiomycota e Zygomycota também são isoladas como endofíticos, mas representam um menor número (Schulz; Boyle, 2005). Em plantas brasileiras, espécies de *Ascochyta*, *Cladosporium*, *Colletotrichum/Glomerella*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Mucor*, *Nodulisporium*, *Pestalotia*, *Phomopsis*, *Phyllosticta*, *Rhizopus* e *Xylaria* são as mais freqüentes (Peixoto-Neto *et al.*, 2002). Ainda há o grupo de fungos não esporulantes ou *Mycelia Sterilia*,

comumente relatados em trabalhos envolvendo fungos endofíticos (Suryanarayanan *et al.*, 2000; Strobel *et al.* 2004).

Em um levantamento rápido de trabalhos envolvendo fungos endofíticos de plantas tropicais, pode se verificar que essa comunidade tende a ser composta por uma ou poucas espécies dominantes, e geralmente estas são generalistas, ou seja, são encontradas em diferentes plantas hospedeiras taxonomicamente não relacionadas. Estes táxons generalistas e recorrentes podem refletir o sucesso destes em ocupar o interior de tecidos vegetais, interferindo também, na diversidade encontrada (Suryanarayanan *et al.*, 2003). Entre os fungos generalistas e recorrentes destacam-se o gênero *Colletotrichum* (Larran *et al.*, 2001; Cannon; Simmons, 2002; Arnold *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2008), *Phylosticta* (Suryanarayanan *et al.*, 2003), *Phomopsis* (Suryanarayanan *et al.*, 2000; Cannon; Simmons, 2002; Huang *et al.*, 2008), *Pestalotiopsis* (Cannon; Simmons, 2002; Tejesvi *et al.*, 2005), Xylariales (Frohlich *et al.*, 2000; Cannon; Simmons, 2002; Huang *et al.*, 2008), *Fusarium* (Gond *et al.*, 2007; Kharwar *et al.*, 2008), *Alternaria* (Larran *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2008; Kharwar *et al.*, 2008), *Cladosporium* (Kharwar *et al.*, 2008) e *Mycelia Sterilia* (Suryanarayanan; Vijaykrishna, 2001; Cannon; Simmons, 2002; Huang *et al.*, 2008).

Comumente, de dezenas a centenas de isolados podem ser obtidos de um único vegetal (Strobel; Dayse, 2003) e, inúmeros fatores abióticos e bióticos, podem exercer pressões seletivas que interferem na composição, frequência e especificidade das espécies endofíticas.

A variabilidade de fungos endofíticos ocorre de hospedeiro para hospedeiro. Um exemplo claro foi relatado por Arnold *et al.* (2003), que isolaram *Colletotrichum* spp. em 88,9% das folhas de *Theobroma cacao*, 33,3% das folhas de *Ouratea lucens* e não isolaram esse gênero de *Heisteria concinna*. E dentre todos os gêneros isolados desses três hospedeiros, 65,5% foram restritos a apenas um hospedeiro. Huang *et al.* (2008), verificaram diferenças entre as espécies dominantes de acordo com o hospedeiro, *Colletotrichum* foi o mais abundante em *Artemisia lactiflora* (74,1%), *Phomopsis* em *Artemisia capillaris* (64,3%) e Xylariales em *Strophanthus divaricatus* e *Hoya carnosa* (34,3% e 31%, respectivamente), todas são plantas medicinais chinesas. Os autores ainda encontraram variação na comunidade de fungos endofíticos de acordo com o tipo de tecido. *Chaetomium*, *Drechslera*-Like, *Ellisembia*, *Ephelis*, *Helminthosporium*, *Pyrenochaeta* e *Rhizosphaera* foram detectados apenas nos caules e *Phyllosticta*, *Physalospora* e *Spiropes* foram isoladas apenas das folhas. Outros autores também encontraram modificações na abundância e composição dos endofíticos em dependência do

tipo de tecido avaliado (Suryanarayanan; Vijaykrishna, 2001; Tejesvi *et al.*, 2005; Gond *et al.*, 2007;) e idade foliar (Arnold; Herre, 2003).

Na dinâmica da interação micro-organismo endofítico-planta hospedeira, inúmeros fatores abióticos e bióticos, podem exercer pressões seletivas que interferem na composição, frequência e especificidade das espécies endofíticas. Assim, um hospedeiro pode albergar diferentes comunidades endofíticas de micro-organismos, dependendo de diferentes fatores como características do vegetal, do micro-organismo e do ambiente (Arnold; Herre, 2003).

A condição climática, também, é uma variável a se considerar no isolamento de endofíticos. Tejesvi *et al.* (2005) estudaram os tecidos, raiz e caule, da planta medicinal da Índia *Terminalia arjuna* em duas estações monção (designação dada a ventos sazonais, em geral associado com chuvas intensas) e inverno. A maior diversidade foi encontrada na monção e Coelomycetes foram mais numerosos no inverno que Hyphomycetes e Ascomycota. Diferenças nas espécies de endofíticos isolados em períodos diferentes de coleta foram verificadas por Larran *et al.* (2001) em tomate, na qual a espécie dominante foi *Colletotrichum gloesporioides* em 1998, enquanto em 1999, a dominância foi exercida por *Alternaria alternata* e a espécie dominante no ano anterior de coleta não foi isolada. O local onde se encontra o vegetal hospedeiro pode influenciar a comunidade de fungos endofíticos, como descrito por Gamboa e Bayman (2001), em que a comunidade de fungos da população de *Guarea guidonia* em uma floresta conservada foi mais diversa que a de uma área perturbada em Porto Rico. Em contraste, Kharwar *et al.* (2008) encontraram diferenças pouco relevantes na riqueza de espécies de fungos endofíticos isolados da planta medicinal indiana *Catharanthus roseus* coletadas em dois locais ecologicamente distintos.

2.3. Potencial Antimicrobiano de Fungos Endofíticos

Por crescerem em um nicho ecológico tão específico, onde organismo e seu biótipo estão sujeitos a constantes e singulares interações, alguns endofíticos podem ser produtores de compostos naturais bioativos envolvidos nessa relação endofítico-hospedeiro (Strobel, 2003). Esses produtos naturais são considerados potencialmente úteis e economicamente interessantes na medicina, agricultura e indústria, incluindo os relacionados às plantas hospedeiras tendo por isso, despertado o interesse da comunidade científica (Strobel; Daisy, 2003; Strobel *et al.*, 2004).

Produtos naturais são metabólitos derivados de micro-organismos, plantas ou animais que há séculos vêm sendo explorados pelo homem. O aumento de micro-organismos patogênicos resistentes a antifúngicos e antibacterianos é uma realidade que vem limitando a eficácia dessas substâncias no controle de doenças infecciosas. Assim, há uma tendência geral para a busca de novos antibióticos que sejam altamente eficazes, de baixa toxicidade e de menor impacto ambiental. Nesse contexto, os endofíticos se mostram como uma moderna e relativamente inexplorada fonte de diversidade microbiana produtora de metabólitos biologicamente ativos e assim, terapeuticamente úteis e com aplicações na agricultura e indústria (Strobel; Daisy, 2003; Strobel *et al.*, 2004).

Segundo Schulz e Boyle (2005), aproximadamente 80% dos fungos endofíticos produzem compostos biologicamente ativos como: antibacterianos, fungicidas e herbicidas. Entre os exemplos mais citados que ilustra o interesse pelo potencial dos micro-organismos endofíticos é o da síntese do taxol, substância extraída da árvore *Taxus brevifolia*, utilizada contra câncer de mama e de útero. O fungo *Taxomyces andreanea*, isolado de *T. brevifolia*, assim como sua hospedeira, é capaz de sintetizar o taxol como forma de proteção do vegetal (Stierle *et al.*, 1993). Estudos recentes verificaram que diferentes gêneros de fungos endofíticos isolados de *Taxus* spp. são produtores de taxol, destacando ainda que processos de fermentação usando estes fungos podem ser um modo alternativo ao uso do extrato de *Taxus* spp. para a produção dessa substância. Entre estes, *Cladosporium cladosporioides* endofítico de *Taxus media* (Zhang *et al.*, 2009a), *Aspergillus niger* var. *taxi* isolado de *Taxus cuspidata* (Zhao *et al.*, 2009) e *A. candidus* de *Taxus media* (Zhang *et al.*, 2009b).

Nos artigos de revisão sobre endofíticos como fontes de produtos bioativos, Strobel (2003) e Strobel *et al.* (2004) apresentam outros exemplos de substâncias de interesse produzidas por endofíticos: **Criptocandina A**, um antifúngico lipopeptídico obtido do fungo endofítico *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* isolado da planta medicinal *Tripterigeum wilfordii* nativa da Eurásia. Este composto é ativo contra *Candida albicans* e *Trichophyton* sp. patógenos ao homem e contra fungos fitopatógenos como *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinérea*; **Criptocina**, um ácido tetrâmico, com atividade antifúngica também foi obtido a partir de *C. cf. quercin*; **Pestaloside** e **Jesterona** ambos com propriedades antifúngicas e produzidos por fungos do gênero *Pestalotiopsis*, endofítico generalista comumente encontrado habitando plantas tropicais; **Ácido Coletótrico** com forte atividade contra algumas bactérias Gram-positivas e o fitopatógeno *Helminthosporium sativum*, obtidos a partir de outro fungo considerado generalista nos trópicos, *Colletotrichum*

gloeosporioides isolado como endofítico de *Artemisia mongolia* planta chinesa com grande resistência contra herbívoros, fungos e bactérias fitopatógenas (Zou *et al.*, 2000).

Resultados promissores como a produção do taxol e de outros metabólitos como os citados acima por endofíticos, levam vários pesquisadores a lançarem a hipótese de que alguns fungos possam compartilhar e/ou serem os responsáveis pelas propriedades antimicrobianas encontradas em seu hospedeiro (Strobel *et al.*, 2004; Kharwar *et al.*, 2008). Nesse sentido plantas medicinais se destacam como fortes candidatas a investigação do potencial biológico dos seus fungos endofíticos. Diante da imensa diversidade vegetal existente em todo mundo Strobel (2003), lança várias hipóteses que devem ser consideradas como estratégia de seleção da planta hospedeira para o encontro de endofíticos produtores de substâncias ativas, sendo: plantas que têm uma história etnobotânica de interesse (uso empírico por povos tradicionais) não só as medicinais; plantas de ambientes únicos, especialmente, aqueles com uma biologia incomum e que apresentam novas estratégias para sobrevivência sob estresse; plantas que são endêmicas; e que crescem em áreas de grande biodiversidade.

Vários trabalhos investigando o potencial antimicrobiano de endofíticos de plantas medicinais do mundo todo têm mostrado resultados satisfatórios. Huang *et al.* (2007), investigaram entre outras propriedades, a atividade antimicrobiana da planta medicinal *Nerium oleander* L. (Apocynaceae) e de representantes dos fungos endofíticos. O líquido fermentado, filtrado e diluído em PBS (pH 7.0–7.2), da cultura de sete fungos endofíticos produziram substâncias que apresentaram bons resultados contra bactérias e fungos patogênicos, sendo que a maioria mostrou eficácia maior que os extratos da planta hospedeira. Entre os isolados destaca-se a amostra NoS16 que exibiu atividade contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* com as concentrações mínimas inibitórias (CMI) de 0,08 e 2,50 mg/mL, respectivamente, enquanto que para essas mesmas bactérias teste as CMI obtidas do extrato da planta foram de 25,00 e 6,25 mg/mL, respectivamente.

Liu *et al.* (2001) estudaram a atividade antifúngica de fungos endofíticos isolados da planta medicinal chinesa *Artemisia annua* sobre os fitopatógenos *Gaeumannomyces graminis*, *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia cerealis*, *Phytophthora capsici*, *Helminthosporium sativum* e *Gerlachia nivalis*, encontrando isolados com ação inibidora para todos os patógenos avaliados. O uso de endofíticos no controle biológico de doenças em plantas é relatado por Azevedo *et al.* (2002), que destaca o uso de isolados considerados avirulentos ou hipoviulentos do patógeno, como no caso da murcha do

tomate causada por *Fusarium oxysporum* controlada por isolados endofíticos dessa mesma espécie. Os autores relatam ainda que os micro-organismos endofíticos por habitarem um nicho ecológico semelhante àqueles ocupados por fitopatógenos, podem, assim, controlá-los por competição nutricional, produção de substâncias antibióticas, parasitando o patógenos ou mesmo induzindo a planta a desenvolver resistência a doenças.

As pesquisas envolvendo plantas medicinais de países asiáticos e a produção de metabólitos pela comunidade de fungos endofíticos são exploradas por vários outros autores. Radu e Kqueen (2002) isolaram e testaram fungos endofíticos de 62 plantas medicinais da Malásia e destacam pelo menos seis isolados endofíticos com impressionante atividade antifúngica. Li *et al.* (2005) verificaram a capacidade antagônica de fungos endofíticos de 12 plantas chinesas a fungos fitopatogênicos (*A. niger*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium* sp., *Phytophthora nicotianae*, *Scopulariopsis* sp., *Trichoderma viride* e *Verticillium* sp), enquanto que Lin *et al.* (2007) estudaram os endofíticos de *Camptotheca acuminata* coletada no sul da China, contra bactérias (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) e fungos (*Candida albicans* e *Aspergillus niger*) patogênicos ao homem. Em ambas as pesquisas os resultado dos testes de bioatividade mostraram que cerca de 30% dos endofíticos apresentam atividade antimicrobiana contra pelo menos um organismo teste. Já Phongpaichit *et al.* (2006) destacam que 18.6% dos fungos endofíticos de cinco plantas do gênero *Garcinia* do sul da Tailândia exibirem atividade inibitória contra *S. aureus* resistente a meticilina, *S. aureus*, *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans*.

Estes resultados confirmam que os fungos endofíticos constituem-se em um rico bio-recurso para a exploração e descoberta de novos produtos naturais. Além das propriedades antimicrobianas, antitumorais e imunossupressoras (Strobel; Daisy, 2003; Strobel *et al.*, 2004;), certos endofíticos melhoram a adaptabilidade de seus hospedeiros aumentando sua tolerância à ambientes com estresse e resistência contra herbívoros e/ou insetos e afetam de forma positiva o crescimento do vegetal (Azevedo *et al.*, 2002).

2.4. *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.

2.4.1. Características Morfológicas, Origem e Ocorrência

Calotropis procera (Ait.) R. Br. (Apocynaceae), é uma planta arbustiva ou subarbórea ereta, perene, com pouca ramificação (geralmente partindo da base), com 2,5-3,0 metros de altura, podendo alcançar até 6,0 metros (Figura 1). Como característica da sua família botânica é produtora de látex em abundância. Suas folhas são simples, sésseis e grandes com comprimento que varia de 7,0-18,0 cm e largura de 5,0-13,0 cm, subcoriáceas organizadas de forma oposta ao longo do caule tendo uma fina camada de pêlos macios (Francis, s.d.). A inflorescência é constituída de pedúnculos carnosos e cilíndricos, terminais e axilares, onde encontram-se umbelas de flores pediceladas dispostas em cachos, com uma coloração que varia de branco a cor-de-rosa ou com aparência púrpura. Seus frutos são cápsulas infladas, globosas, grandes, com sementes cobertas por painas brancas sedosas. Além disso, seus ramos, folhas, pedúnculos e frutos são recobertos geralmente por cerosidade branco-acinzentada, principalmente nas plantas mais jovens. A sua multiplicação se dá através da disseminação das sementes pelo vento (Kissmann; Groth, 1999; Lorenzi; Matos, 2002).



Figura 1. Planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.

Calotropis procera é nativa do sudoeste da Ásia (Índia, Paquistão, Afeganistão, Irã, Arábia Saudita e Jordânia) e África (Somália, Egito, Líbia, Argélia, Marrocos, Mauritânia e Senegal) (Abbassi *et al.*, 2003), onde é muito utilizada para combater diversas doenças

em humanos e outros animais pela medicina popular (Hassan *et al.*, 2006; Kareem *et al.*, 2008). No entanto, essa espécie pode ser encontrada em quase todas as regiões tropicais semi-áridas da América. Na América do Sul, *C. procera* foi introduzido provavelmente na cidade de Recife – PE como planta ornamental, no final do século XIX. Mas, há indícios de que suas sementes, dotadas de filamentos sedosos, tenham chegado ao Brasil com escravos africanos como enchimento de colchões e travesseiros. No Brasil, a sua distribuição vai do Nordeste até o norte de Minas Gerais e, também, ocorre em outras regiões, principalmente em áreas do cerrado (Kissmann; Groth, 1999; Ulhôa *et al.*, 2007).

Dependendo da região onde é encontrada, pode ser conhecida popularmente como: algodão-de-seda (PE), flor-de-seda, ciúme e hortência (CE), paininha-de-seda (SP), leiteiro (SP, MG), queimadeira e jacaúna (NE). Na região Nordeste sua ocorrência é subespontânea e muito comum, adaptando-se a várias condições abióticas, tolerando solos pobres, arenosos, ácidos e com elevado teor de alumínio e são muito resistentes a períodos de seca (Ferreira, 1973). Portanto, *C. procera* apresenta características que favoreceram seu estabelecimento em ambientes estressados e antropofizados, comportando-se como importante invasora de ecossistemas naturais em recuperação como a Caatinga, Cerrado e regiões litorâneas, além de áreas agrícolas e de pastagens degradadas, formando populações numerosas na beira de algumas estradas e terrenos baldios, a partir da qual vem aumentando cada vez mais sua distribuição no Brasil (Ulhôa *et al.*, 2007).

2.4.2. Aplicações de *Calotropis procera*

Estudos etnobotânicos evidenciam uma antiga relação entre a flor-de-seda e culturas africanas, indianas e do Oriente Médio. Por exemplo, praticamente todas as partes da planta incluindo seu látex, são utilizadas como expectorante, anti-helmíntico, laxativo, purgativo, antiinflamatório e diurético (Iqbal *et al.*, 2005). Na medicina tradicional indiana a decocção da planta é usada para o tratamento de espasmos musculares, disenteria, febre, reumatismo, asma entre outros (Mossa *et al.*, 1991). No Paquistão o uso etnoveterinário inclui a aplicação do látex sobre picada de cobra, o uso das folhas e flores amassadas e misturadas a açúcar para melhorar o apetite e digestão do gado (Ch *et al.*, 2006). Mas o teor cáustico do látex pode desencadear processos inflamatórios em mucosas; em contato com os olhos, pode lesar a córnea. Em algumas regiões ao sul da Índia, o látex é usado também como abortivo (Ulhôa *et al.*, 2007). No Brasil, um estudo etnobotânico de plantas

medicinais no cerrado em Goiás, revelou o uso das raízes *C. procera* para o tratamento de infecções gastrointestinais, renais, ovários e infecções genitais, no entanto não é comumente usada na medicina popular no país (Costa *et al.*, 2005).

Devido ao grande potencial farmacológico indicado pelo vasto uso popular, *C. procera* foi alvo de diferentes estudos que comprovaram algumas de suas atividades farmacológicas. Dentre as propriedades biológicas de *C. procera*, principalmente provenientes do seu látex e folhas, pode-se destacar as atividades: antiinflamatória (Kumar; Basu, 1994); analgésica com princípios ativos que podem ter eficácia equivalente à da aspirina (Dewan *et al.*, 2000); antiinflamatória e analgésica (Barros *et al.*, 2004); antidiarréica (Kumar *et al.*, 2001); antifertilidade em ratos (Kamath; Rana, 2002); inseticida (Ahmed *et al.*, 2006); ação contra ovos e larvas de *Aedes aegypti* (Ramos *et al.*, 2006); antibacteriana e antifúngica (Kareem *et al.*, 2008); além de potencialidade para terapia contra o câncer (Choedon *et al.*, 2006), entre outras.

Kareem *et al.* (2008), verificaram o efeito de extratos obtidos por diferentes solventes (etanol, água e clorofórmio) de folhas e látex de *C. procera* contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. albus*, *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae* e antifúngica contra *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Candida albicans* e *Microsporium boudardii*. Os extratos etanólicos geraram os melhores resultados de inibição contra *E. coli* e *S. aureus*, e os fungos *A. niger* e *C. albicans*. Resultados semelhantes foram encontrados por Asres *et al.* (1992), com significativa atividade do látex e extratos etanólicos das folhas contra *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Extratos metanólicos das folhas, também mostraram atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Yesmin *et al.*, 2008). Os extratos *n*-butanólico das flores de *C. procera*, também demonstraram ação contra oito bactérias patogênicas usando o método de disco difusão em meio sólido (Larhsini *et al.*, 2001). A atividade antifúngica de *C. procera* foi verificada contra *M. gypseum*, *Trichophyton rubrum* (extrato aquoso e solventes orgânicos de folha, casca e raiz - Hassan *et al.*, 2006), *Epidermophyton floccosum* e *Trichophyton gypseum* (extrato aquoso - Kuta, 2008), *Fusarium oxysporum* (extrato aquoso de folhas - Sharma; Trivedi, 2002), *F. moniliforme* e *Rhizoctonia solani* (Ahmad; Sultana, 2003).

Algumas atividades farmacológicas comprovadas nesta espécie podem ser atribuídas à presença de flavonóides glicosilados que apresentam atividades antiinflamatória, analgésica e antimicrobiana (Gallegos-Olea *et al.*, 2008). Nas partes áreas

de *C. procera* também foram encontradas várias outras substâncias ativas medicinalmente incluindo alcalóides, taninos, saponinas e/ou triterpenos (Mossa *et al.*, 1991).

2.4.3. Fungos associados a *Calotropis procera*

Há poucos estudos a cerca da comunidade de fungos associados a *C. procera*. Bokhary *et al.* (2000) isolaram da superfície das folhas de *C. procera* coletadas na Arábia Saudita, 46 espécies fúngicas pertencentes a 21 gêneros. O gênero *Alternaria* apresentou o maior número de espécies, sete, seguido por *Aspergillus* e *Drechslera* com cinco espécies cada. As espécies encontradas durante todos os meses da pesquisa foram: *Alternaria alternata*, *A. chlamydospora*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Drechslera australiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum* e *Rhizopus stolonifer*. No Brasil, Freire e Braun (2009) isolaram, associado a folhas de *C. procera* e *C. gigantea* coletadas no Ceará, o fungo hifomiceto *Passalora calotropidis*. Os fungos fitopatógenos de *C. procera* foram estudados por Barreto *et al.* (1999), entre os quais destacam-se *Phaeoramularia calotropidis* e *Puccinia obliqua*, citados como primeira ocorrência em associação com esta hospedeira no Brasil.

Com relação a microbiota endofítica associada a *C. procera*, pode se citar o trabalho de Khan *et al.* (2007) que estudou a comunidade de fungos endofíticos de folha e caule de nove plantas localizadas no campus de Karachi University, Paquistão. Um total de oito espécies de fungos foi isolado, sendo: *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Aspergillus* sp., *Penicillium sublateritium*, *Phoma chrysanthemicola*, *P. hedericola*, *Phoma* sp., e *Candida albicans*. A taxa de colonização foi baixa, sendo de 8,86% e curiosamente não houve isolamento de nenhum fungo associado às folhas de *C. procera*. No Brasil não foi encontrado até o momento, nenhum estudo relacionado a micota endofítica da espécie vegetal em questão, assim, considerando a influência ambiental na interação planta/endofítico, devendo esta ser considerada única para cada sistema de planta/comunidade endofítica no tempo e no espaço em que ocupam, compreende-se a necessidade de estudos mais detalhados sobre ecologia e potencial antimicrobiano da comunidade endofítica relacionada com *C. procera* no país.

3. INFLUÊNCIA DA IDADE FOLIAR DE *Calotropis procera* (AIT.) R. BR. NA COMUNIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA¹.

RESUMO

Fungos endofíticos representam um interessante grupo de micro-organismos associados ao tecido saudável de plantas. *Calotropis procera* é uma planta exótica comum na região Nordeste do Brasil, sendo explorada pela medicina popular nas regiões de origem (África e Ásia). No presente trabalho foram isolados fungos endofíticos de folhas, de *C. procera*, em diferentes estágios de maturação. Um total de 156 isolados fúngicos distribuídos em 19 táxons, foram obtidos a partir dos 468 fragmentos foliares analisados. Verificou-se que o aumento da idade foliar exerceu influência no aumento da taxa de colonização e da riqueza de táxons dos fungos endofíticos isolados. Dos fragmentos das folhas categorizadas como jovens, praticamente não houve crescimento fúngico. Entre as folhas maduras e senescentes não foi verificada diferença significativa quanto a densidade dos isolados. Ocorreu pouca variação entre os índices de diversidade de Shannon calculados para as diferentes categorias etárias. A espécie dominante foi *Phaeoramularia calotropidis*, correspondendo a 63,5% do total das colônias obtidas, seguida por *Guignardia bidwellii* (21,1%). Dos fungos endofíticos selecionados, seis apresentaram alguma atividade antimicrobiana com a produção de halos de inibição apenas contra bactérias Gram-positivas, sendo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis* as mais sensíveis e os fungos patogênicos ao homem, *Epidermophyton floccosum* e, aos vegetais, *Colletotrichum dematium*.

Palavras-chave: Fungos endofíticos; Idade foliar; Diversidade; Atividade antimicrobiana; *Calotropis procera*.

¹Trabalho a ser submetido para publicação como Tatianne Leite Nascimento; Geraldo Wilson Fernandes; Jarcilene S. Almeida-Cortez; Débora Maria Massa Lima; Janete Magali de Araújo; Cristina Maria de Souza-Motta. 2010. Influência da idade foliar de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. na comunidade de fungos endofíticos e atividade antimicrobiana. Journal of Plant Interactions.

INTRODUÇÃO

Os micro-organismos constituem-se em um grupo de, principalmente bactérias e fungos, com habilidades únicas de interesse, fora e dentro da planta hospedeira. Estes micro-organismos residem assintomaticamente nos espaços apoplásticos e/ou dentro das células vivas das plantas em todo ou pelo menos uma parte significativa do ciclo de vida (Petrini 1991). Por crescerem neste nicho ecológico tão específico, onde organismo e seu biótipo estão sujeitos a constantes e singulares interações, alguns destes endofíticos podem ser produtores de compostos naturais bioativos e potencialmente úteis na medicina, agricultura e indústria (Strobel, 2003; Strobel; Daisy, 2003).

A dinâmica da interação micro-organismo endofítico-planta hospedeira ainda não está totalmente esclarecida. Além dos fatores ambientais, como temperatura e umidade, variações na química, maturidade e anatomia do tecido hospedeiro colonizado podem exercer pressões seletivas que interferem na abundância e composição da comunidade dos fungos endofíticos. Arnold e Herre (2003) verificaram que folhas mais velhas de *Theobroma cacao* suportam mais fungos endofíticos que folhas jovens. Outros autores também encontraram modificações na comunidade endofítica em um mesmo hospedeiro em dependência da idade foliar (Suryanarayana; Thennarasan, 2004) e tipo de tecido vegetal estudado (Suryanarayanan; Vijaykrishna, 2001; Tejesvi *et al.*, 2005; Gond *et al.*, 2007).

Os fungos endofíticos podem ser encontrados em praticamente todas as plantas investigadas (Arnold, 2007). Diante da imensa diversidade vegetal existente Strobel (2003), lança várias hipóteses para o encontro de endofíticos produtores de substâncias ativas que foram consideradas como estratégia de seleção da planta hospedeira aqui estudada, sendo elas: plantas de ambientes únicos, e que apresentam novas estratégias para sobrevivência sob estresse; plantas que têm uma história etnobotânica de interesse (uso empírico por povos tradicionais).

Calotropis procera (Apocynaceae) é uma planta arbustiva ou subarbórea ereta, perene, com pouca ramificação, é nativa do sudoeste da Ásia e África (Abbassi *et al.*, 2003). Na região Nordeste do Brasil sua ocorrência é subespontânea e muito comum, adaptando-se a várias condições abióticas, tolerando solos pobres, arenosos, ácidos e com elevado teor de alumínio e são muito resistentes a períodos de seca (Ferreira, 1973). Esta planta apresenta um grande potencial farmacológico indicado pelo seu vasto uso popular

por culturas africanas, indianas e do Oriente Médio (Iqbal *et al.*, 2005), e diferentes estudos científicos comprovaram algumas de suas atividades farmacológicas. Dentre as suas propriedades biológicas pode-se destacar as atividades: antiinflamatória (Kumar; Basu, 1994); analgésica com princípios ativos que podem ter eficácia equivalente à da aspirina (Dewan *et al.*, 2000); antidiarréica (Kumar *et al.*, 2001); inseticida (Ahmed *et al.*, 2006); antibacteriana e antifúngica (Asres *et al.*, 1992, Kareem *et al.*, 2008; Yesmin *et al.*, 2008) entre outras.

Assim, considerando que a comunidade de fungos endofíticos de *C. procera* foi pouco explorada, tanto ecológica como biotecnologicamente, e diante dos resultados satisfatórios de estudos sobre o potencial antimicrobiano de endofíticos de outras plantas medicinais do mundo (Huang *et al.*, 2007; Phongpaichit *et al.*, 2006; Radu; Kqueen, 2002; Liu *et al.*, 2001), este trabalhou visou avaliar a influência da idade foliar na comunidade de fungos endofíticos de *C. procera* e caracterizar os isolados obtidos quanto à produção de substâncias antimicrobianas contra micro-organismos testes, patogênicos ao homem e aos vegetais, através de seleção em meio sólido.

MATERIAL E MÉTODOS

Área experimental

O material vegetal foi coletado de dez indivíduos de *C. procera* cultivados em parcelas de 1m x 1m, num canteiro de 10m x 1m na área experimental do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em Recife, Pernambuco, Brasil. As mudas utilizadas na montagem do experimento são provenientes de um sítio com grande quantidade de indivíduos jovens de *C. procera*, na praia de Maria Farinha, município de Paulista, Pernambuco. As mudas foram mantidas por três dias em casa de vegetação e posteriormente transplantadas para o canteiro, onde receberam uma camada de esterco caprino e regas diárias até seu completo estabelecimento. O clima da região de estudo é tropical úmido com o período chuvoso de fevereiro a setembro e temperatura média de 25°C. A precipitação no mês de coleta (agosto/2008) foi de aproximadamente 280mm (INMET, 2008).

Amostragem

Para avaliar a composição da comunidade de fungos endofíticos, dez indivíduos de *C. procera* com porte arbustivo e com aproximadamente seis meses de cultivo em canteiro foram amostrados em agosto de 2008. De cada planta foi selecionado um ramo do qual foram coletadas até oito folhas saudáveis, cada uma representando um estágio de desenvolvimento foliar, iniciando a coleta a partir da primeira folha mais jovem até a senescente. Essas folhas foram categorizadas em três faixas etárias: Folhas 1, 2, 3 – Jovens (folhas não expandidas completamente e cobertas por uma camada pilosa); 4, 5, 6 – Maduras (folhas completamente expandidas); 7, 8 – Senescentes (folhas com sinais de senescência como amarelecimento e desidratação de partes da mesma), Figura 1. No total foram amostradas 78 folhas, já que duas plantas não apresentaram a folha 8 no ramo, categorizada como senescente nas demais plantas estudadas.

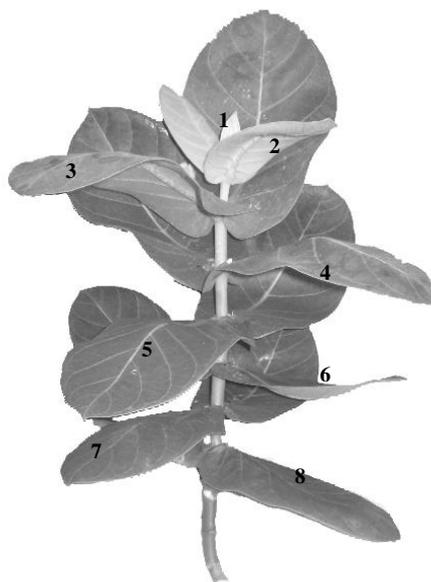


Figura 1. Ramo contendo folhas de *Calotropis procera* categorizadas em três faixas etárias: Folhas 1, 2, 3 – Jovens; 4, 5, 6 – Maduras e 7, 8 – Senescentes.

Isolamento dos Fungos Endofíticos de Calotropis procera

As folhas foram levadas ao laboratório, lavadas em água corrente para a remoção da poeira e outros resíduos e mantidas sob refrigeração por cerca de 12 horas. A técnica utilizada para eliminação dos micro-organismos epifíticos foi a de desinfestação superficial

com hipoclorito de sódio de acordo com Araújo *et al.* (2002). Assim, as folhas foram imersas em etanol 70% por 1 minuto, em hipoclorito de sódio (2-2,5 % de cloro ativo) por 4 minutos, em etanol 70% por 30 segundos e lavadas três vezes em água destilada e esterilizada. De cada folha foram retirados seis fragmentos (aproximadamente 5x5mm): dois da base, dois do centro e dois do ápice. Os fragmentos foram transferidos assepticamente para placas de Petri contendo o meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA (g/L): batata 200, dextrose 20 e ágar 15; Lacaz *et al.*, 2002) suplementado com cloranfenicol (100µg/mL) para inibir o crescimento de bactérias. O controle de eficiência de desinfestação superficial foi confirmado pela inoculação de 1 mL da última água de lavagem em placas de Petri com o mesmo meio de cultura do isolamento. As placas de Petri foram incubadas a temperatura ambiente ($28 \pm 2^{\circ}\text{C}$) por até 30 dias, sendo observadas diariamente e qualquer colônia fúngica presente foi isolada, purificada e identificada.

Identificação dos Fungos Endofíticos

Para a identificação dos fungos endofíticos, foram observadas características macroscópicas (coloração, aspecto e diâmetro das colônias), microscópicas (microestruturas somáticas e reprodutivas) e quando necessárias, fisiológicas (assimilação e fermentação de fontes de carbono e etc.), sendo utilizada literatura específica (Ellis, 1971, 1976; Carmichael *et al.*, 1980; Sutton, 1980; Domsch *et al.*, 1993; Barnett *et al.*, 2000, dentre outros). Os fungos isolados neste estudo que não produziram esporos foram separados em morfoespécies de acordo com características morfológicas macroscópicas e microscópicas. Na tentativa de estimular a esporulação fúngica, algumas técnicas foram utilizadas, entre elas: banho de luz UV (exposição de 1min. e 2min. do inóculo e da colônia com cinco de dias de crescimento); incubação no escuro; uso de diferentes meios de cultura: Ágar Extrato de Malte (g/L: extrato de malte 20, peptona 1, dextrose 20, ágar 16) Lacaz *et al.* (2002); Meio Folha (g/L: glicose 5, ágar 16; 500 mL do extrato aquoso das folhas de *C. procera*, completar o volume para 1 litro) adaptado de Araújo *et al.* (2002); Ágar água (g/L: ágar 15) Araújo *et al.* (2002); Ágar tomate (suco de tomate 50ml, água destilada 50mL, ágar 1,6 g). Ainda, utilizou-se métodos alternativos adaptados de Guo *et al.* (1998) em que, pedaços de folhas e pedaços de caule esterilizados em autoclave (121°C por 20 min.) foram depositados na superfície do meio de cultura Ágar água em placas de Petri e frascos, respectivamente, na intenção de estimular a produção de estruturas

reprodutivas na superfície do material vegetal. Após identificação, um exemplar de cada espécie dos fungos endofíticos de interesse biotecnológico e/ou ecológico foi incorporado ao acervo da coleção de culturas-Micoteca URM do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em Recife, Pernambuco, Brasil.

Análise dos dados

A taxa de colonização (TC) foi calculada pela razão entre o número de fragmentos com crescimento fúngico (N_f) e o número total de fragmentos (N_t) por idade foliar ($TC = N_f/N_t \times 100$) (Araújo *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2008). O índice de diversidade de Shannon-Wiener foi calculado através do software DivEs – Diversidade de espécies (Rodrigues 2005). A densidade absoluta dos fungos endofíticos obtidos foram submetidos a análise de variância, e comparados pelo teste de Tukey por meio do software Assistat – Assistência Estatística (Silva, 2007). Cada planta foi considerada uma unidade experimental (10 repetições). Uma análise de regressão linear simples foi realizada entre a idade foliar e a taxa de colonização, e entre a idade foliar e a riqueza de táxons através do software BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007).

Caracterização dos Fungos Endofíticos quanto a Atividade Antimicrobiana

Micro-organismos Teste

A atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos foi avaliada contra as bactérias: Gram-positivas - *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Bacillus subtilis* UFPEDA 86, *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138 e *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 07; Gram-negativas - *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Enterobacter aerogenes* UFPEDA 739, *Salmonella typhi* UFPEDA 478, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 735 e *Proteus vulgaris* UFPEDA 740; Alcool-ácido resistente - *Mycobacterium smegmatis* UFPEDA 71. E contra fungos: Patogênicos ao homem - *Candida albicans* URM 5889, *Malassezia furfur* URM 4849, *Epidermophyton floccosum* URM 5110, *Trichosporum cutaneum* URM 5743 e *Fusarium solani* URM 5776; Fitopatogênicos - *Colletotrichum dematium* URM 3315 e

Fusarium oxysporum URM 5283. As bactérias são procedentes da Coleção de Microorganismos do Departamento de Antibióticos UFPEDA e os fungos da Micoteca URM, UFPE.

Seleção dos Fungos Endofíticos quanto à Atividade Antimicrobiana em Meio Sólido

Pelo menos um representante de cada táxon dos fungos endofítico isolados foi testado quanto a produção de substâncias com ação antimicrobiana contra bactérias e fungos patogênicos. Os fungos endofíticos foram submetidos ao teste de Bloco de Gelose baseado na metodologia modificada de Ichikawa *et al.* (1971) por permitir uma seleção rápida e qualitativa de micro-organismos produtores de substâncias bioativas. Cada fungo foi cultivado na superfície de BDA em placas de Petri a 30°C por sete dias, de forma que o crescimento microbiano fosse em “tapete”. Após este período, discos foram cortados da colônia com um furador esterilizado (8mm de diâmetro) e transferidos para a superfície de meios específicos previamente semeados com os micro-organismos teste: meio Ágar Nutriente (AN – Difco) e *Brain Heart Infusion* (BHI - Difco) semeados com as bactérias; meio Ágar Sabouraud (SAB (g/L): peptona 10, dextrose 40, ágar 16; Lacaz *et al.*, 2002), semeado com os fungos, exceto *Malassezia furfur* que foi semeado em SAB suplementado com 0,5% de azeite de oliva. Em seguida, as placas de Petri foram incubadas a 37°C por 24 ou 48 horas (*Mycobacterium smegmatis*) quando os micro-organismos teste eram bactérias e a 30°C por até 62 horas quando os micro-organismos teste eram fungos. Os halos de inibição foram medidos após estes períodos. Sendo o teste considerado negativo (-) na ausência de halo de inibição e na presença de halo de inibição seguiu-se a seguinte categorização: +, os que apresentaram halos menores do que 15mm; e ++, os que apresentaram halos de inibição iguais ou maiores do que 15mm. O teste foi realizado em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Taxa de Colonização, Diversidade e Riqueza

Um total de 156 isolados fúngicos foram obtidos a partir dos 468 fragmentos foliares de *C. procera* analisados (Tabela 1). A maioria dos fungos endofíticos isolados foi identificada ao nível de espécie. Entretanto, alguns não apresentaram estruturas reprodutivas (esporos e esporóforos) sendo considerados pertencentes ao grupo *Mycelia Sterilia* (Morfoespécies 1, 2 e 3). Outros, apesar de apresentarem esporos, não puderam ser identificados com a literatura disponível (Hyphomycete 1, Hyphomycete 2 e *Xylaria* sp.).

Dos 19 táxons obtidos, 13 foram identificados ao nível de espécie, um ao nível de gênero, dois em Hyphomycetes e três em morfoespécies (*Mycelia Sterilia*), Tabela 1. O isolamento de fungos endofíticos agrupados como *Micelia Sterilia* é comum, em alguns estudos este grupo é dominante na comunidade endofítica estudada (Suryanarayanan; Vijaykrishna 2001; Cannon; Simmons, 2002; Huang *et al.*, 2008). Nenhum dos métodos utilizados para estimular a produção de esporos foi efetivo para as Morfoespécies 1, 2 e 3.

Tabela 1. Densidade e composição de táxons dos fungos endofíticos isolados em diferentes estágios de desenvolvimento foliar de *Calotropis procera*.

Fungos endofíticos	Idade Foliar								Total
	Jovem			Madura			Senescente		
	1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>Acremonium kiliense</i> Grutz	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Acremonium strictum</i> W. Gams	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Cercospora pulcherrima</i> Tharp.	-	-	-	-	-	-	-	1	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>Cladosporium oxysporum</i> (Berk. & Curt.)	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Colletotrichum gloesporioides</i> (Penz.) Sacc.	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>Curvularia pallescens</i> Boedijn	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>Diplodina microsperma</i> (Johnston) B. Sutton	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk	-	-	-	-	1	-	2	-	3
<i>Guignardia bidwellii</i> (Ellis) Viala & Ravaz	-	-	-	2	2	10	8	9	31
Hyphomycete 1	-	-	-	-	-	-	1	-	1
Hyphomycete 2	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>Microascus desmosporus</i> (Lechmere) Curzi	-	-	-	1	-	-	-	-	1
Morfoespécie 1	-	-	-	-	-	-	1	-	1
Morfoespécie 2	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Morfoespécie 3	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>Phaeoramularia calotropidis</i> (Ell. & Everh.)	-	-	1	14	18	19	23	23	98
<i>Rhodotorula glutinis</i> (Fresen.) F.C. Harrison	1	1	1	1	2	-	1	1	8
<i>Xylaria</i> sp.	2	-	-	-	-	-	-	-	2
Densidade total	4	3	2	18	25	30	39	35	156

A taxa total de colonização foi de 32,1%. Em plantas medicinais chinesas, incluindo espécies da mesma família de *C. procera* (Apocynaceae), Huang *et al.* (2008) verificaram que a colonização por fungos endofíticos variou de 36,7% a 100% dos fragmentos vegetais amostrados. No estudo realizado na Índia com, a planta medicinal *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), a incidência de fungos endofíticos em fragmentos foliares foi de aproximadamente 34% (Kharwar *et al.*, 2008), tal taxa se assemelha com o resultado encontrado no presente estudo.

Há poucas investigações a cerca da comunidade de fungos endofíticos associados ao gênero *Calotropis*. No Paquistão, Khan *et al.* (2007) obtiveram uma taxa de colonização de 8,86% com uma riqueza de oito espécies de fungos endofíticos isolados de nove plantas de *C. procera*. Eles Assim, a taxa de colonização e a riqueza de táxons relatada neste artigo (32,1% e 19, respectivamente) foram altas para *C. procera*, principalmente considerando que no estudo acima citado não houve isolamento de nenhum fungo endofítico associado às folhas. Contudo comparações entre estudos é problemática devido a diferenças nas metodologias empregadas, incluindo o esforço amostral (Cannon; Simmons, 2002; Arnold *et al.*, 2001).

Houve pouca variação entre os índices de diversidade de Shannon calculados para as diferentes categorias etárias (Tabela 2), sendo que as folhas em início de senescência (Folha 7) apresentaram o maior valor (0,63). Os baixos índices de diversidade encontrados estão relacionados principalmente às espécies de fungos recorrentes ou dominantes que frequentemente são relatadas em isolamento de fungos endofíticos (Suryanarayanan *et al.*, 2003; Kharwar *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008). A espécie dominante entre as folhas de *C. procera* foi *Phaeoramularia calotropidis*, correspondendo a 63,5% do total das colônias obtidas. A segunda espécie em abundância foi *Guignardia bidwellii* (21,1%). Essas espécies não foram encontradas nas folhas jovens (1 e 2) que apresentaram espécies particulares demonstrando que alguns táxons podem ser idade-específicos. As demais espécies encontradas apresentaram um ou poucos isolados (Tabela 1).

Phaeoramularia calotropidis é relatado como um fitopatógeno de *C. procera* no Brasil (Barreto *et al.* 1999) e não há relatos dessa espécie isolada como endofítica. Tal fato levanta a discussão se os fungos endofíticos são patógenos latentes ou isolados hipovirulentos como relatado por Peixoto-Neto *et al.* (2002). O isolamento de fungos tradicionalmente fitopatogênicos como endofíticos de plantas tropicais é comum. Espécies de *Colletotrichum* (Arnold *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2008, Larran *et al.*, 2001; Cannon;

Simmons, 2002) e *Fusarium* (Gond *et al.*, 2007; Kharwar *et al.*, 2008) são frequentemente encontrados como dominantes na comunidade endofítica em diferentes vegetais.

Tabela 2. Índice de diversidade de Shannon dos fungos endofíticos isolados em diferentes estágios de desenvolvimento foliar de *Calotropis procera*.

Folhas	Diversidade de Shannon
Jovens	
1	0,45
2	0,48
3	0,30
Maduras	
4	0,33
5	0,45
6	0,34
Senescentes	
7	0,63
8	0,41

A categorização dos fungos endofíticos como patógenos, sapróbios, ou mutualistas é alvo de inúmeras discussões. Peixoto-Neto *et al.* (2002), consideram que a diferenciação entre estas categorias ecológicas é de significado puramente didático já que a distância de uma condição para outra pode ser muito pequena. Estes afirmam ainda, que o endofítico pode se comportar como um patógeno devido a redução dos mecanismos de defesa da planta hospedeira, comportando-se como patógenos latentes ou isolados hipovirulentos. Rodriguez e Redman (2008), apoiando a questão que isolados fúngicos de uma mesma espécie ou gênero podem apresentar uma plasticidade ecológica significativa, acreditam que a expressão do comportamento parasita ou mutualista depende do genótipo da planta hospedeira. No entanto, Azevedo *et al.* (2000) divulgam em uma revisão, a diferenciação genética e morfológica que existe entre isolados de *Guignardia citricarpa*, espécie do agente causal da “mancha preta de cítrico”, obtidos de lesões (fitopatógenos) e de tecidos saudáveis (endofíticos). Portanto colocar um endofítico em um grupo ecológico fixo é uma tarefa muito difícil.

Influência de Idade Foliar na Comunidade de Fungos Endofíticos

Verificou-se que a taxa de colonização acresce significativamente à medida que aumenta a idade foliar ($y = 0,4381x^2 + 6,2167x - 6,2214$, $R^2 = 93,3\%$, figura 2). Dos fragmentos das folhas categorizadas como jovens (Folhas 1, 2, 3), obteve-se o menor crescimento fúngico.

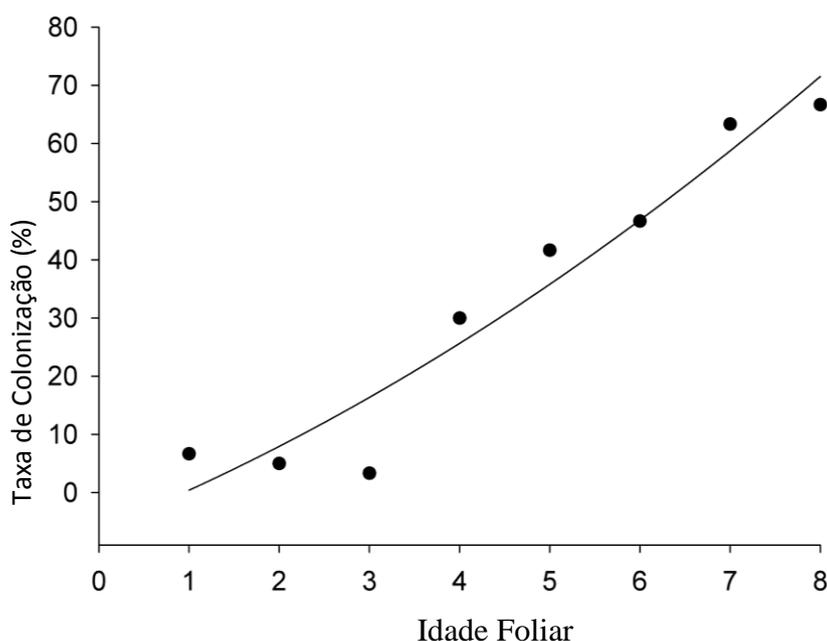


Figura 2. Influência do aumento da idade foliar na taxa de colonização dos fungos endofíticos de *Calotropis procera*. Folhas 1, 2, 3 – Jovens; 4, 5, 6 – Maduras e 7, 8 – Senescentes.

A densidade média destas foi abaixo de 0,5 isolados, diferindo estatisticamente das demais idades foliares, exceto em comparação com a folha de número 4 categorizada como madura, que ocupa uma posição de transição entre as categorias etárias estabelecidas. Não foram observadas diferenças estatísticas entre a densidade dos fungos endofíticos procedentes dos fragmentos das folhas consideradas maduras (Folhas 5, 6) e senescentes (Folhas 7, 8) (Figura 3).

A maior densidade de isolados e riqueza de espécies encontradas nas folhas mais velhas (Figura 2 e Tabela 1) sugere que as mesmas, após a maturação, são mais favoráveis ao estabelecimento dos fungos endofíticos. Estes resultados corroboram com estudos anteriores que demonstraram que folhas mais velhas apresentam mais fungos endofíticos que aquelas relativamente mais jovens, como verificado em folhas de *Theobroma cacao*

(Arnold; Herre, 2003), *Plumeria rubra* (Suryanarayanan; Thennarasan, 2004) e *Baccharis dracunculifolia* (Oki *et al.*, 2009).

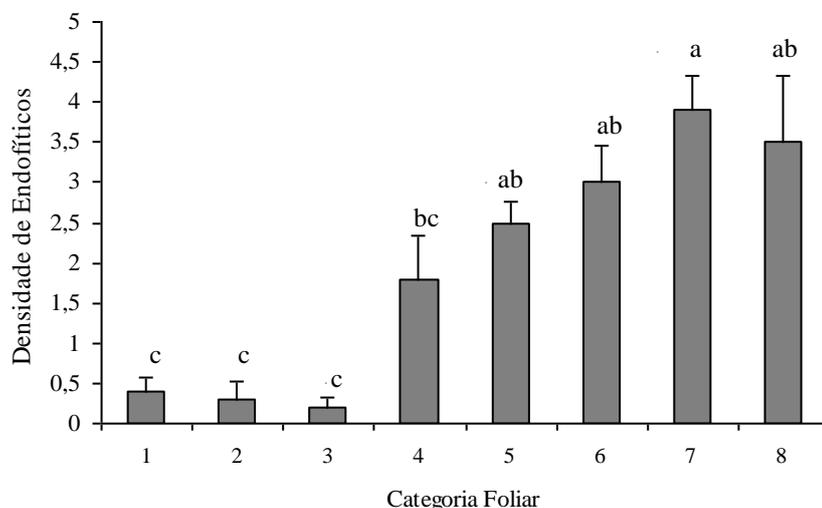


Figura 3. Média (\pm erro padrão) da densidade dos fungos endofíticos isolados em diferentes estágios de desenvolvimento foliar de *Calotropis procera*. Folhas 1, 2, 3 – Jovens; 4, 5, 6 – Maduras; 7, 8 – Senescentes. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Inúmeros fatores bióticos e abióticos estão envolvidos na infecção e colonização endofítica, entre eles a química e anatomia do tecido hospedeiro e as condições ambientais em que o vegetal está exposto. Geralmente, as folhas mais jovens são quimicamente diferentes das folhas maduras apresentando uma maior concentração de substâncias antifúngicas (Coley; Barone, 1996) e contra o ataque de herbívoros (Coley, 1988). O padrão de isolamento obtido e a variação na densidade fúngica conforme a faixa etária amostrada demonstra que, provavelmente, a comunidade de fungos endofíticos de *C. procera* é transmitida horizontalmente a planta hospedeira, sendo, portanto realizada por meio de esporos sexuais e assexuais dispersos no ambiente (Saikkonen *et al.*, 2004). Assim, entre outros fatores, o tempo de exposição, o tamanho da superfície de contato e o número de aberturas naturais do tecido vegetal pode influenciar na proporção da colonização endofítica. Arnold e Herre (2003) verificaram que o tempo de exposição do tecido estudado ao ambiente está associado ao incremento na densidade dos endofíticos. Além disso, as folhas jovens de *C. procera* apresentam uma barreira física à entrada fúngica composta por uma densa camada pilosa e uma cerosidade branco-acinzentada em toda a sua superfície (Lorenzi; Matos, 2002).

Atividade Antimicrobiana dos Fungos Endofíticos

Dos 35 isolados endofíticos testados seis apresentaram ação antimicrobiana com halos de inibição variando de 12 a 20mm (Tabela 3). A capacidade antagônica foi verificada apenas contra bactérias Gram-positivas, com destaque para o isolado *Curvularia pallescens* (URM 6048) com halos de inibição maiores que 15mm para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Apenas os isolados *Cladosporium cladosporioides* (URM 6084) e *Xylaria* sp. (URM 6085) foram capazes de inibir o crescimento da bactéria Alcool-ácido resistente - *Mycobacterium smegmatis*. *Cladosporium cladosporioides* (URM 6084) também foi capaz de inibir o crescimento de *Epidermophyton floccosum* (URM 5110), único dos cinco fungos patogênicos ao homem que foi inibido no testes. O maior halo de inibição contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum dematium* (URM 3315) foi produzido pelo isolado Hyphomycete 2 (P1-5) (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de *Calotropis procera* isolados de folhas em diferentes estágios de desenvolvimento detectada pelo método de disco difusão.

Isolados Endofíticos	Folha	Bactérias-Teste					Fungos-Teste	
		UFPEDA ¹					URM ²	
		02	07	71	86	138	5110	3315
Jovem								
Morfoespécie 3 (P9-127)	2	+	-	-	-	+	-	-
<i>Xylaria</i> sp. (URM 6085)	1	-	-	-	+	-	-	-
Madura								
Morfoespécie 2 (P6-81)	6	-	-	+	-	-	-	-
Senescente								
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (URM 6084)	7	-	-	+	-	-	+	-
<i>Curvularia pallescens</i> (URM 6048)	7	++	++	-	-	-	-	+
Hyphomycete 2 (P1-5)	7	-	-	-	-	++	-	++

¹ Bactérias teste que apresentaram zonas de inibição: UFPEDA 02 - *Staphylococcus aureus*, UFPEDA 07 - *Streptococcus pyogenes*, UFPEDA 71 - *Mycobacterium smegmatis*, UFPEDA 86 - *Bacillus subtilis* e UFPEDA 138 - *Enterococcus faecalis*.

² Fungos teste que apresentaram zonas de inibição: Patogênico ao homem URM 5110 - *Epidermophyton floccosum*, e a vegetais URM 3315 - *Colletotrichum dematium*.

–: sem atividade; +: halo de inibição menor que 15 mm; ++: halo de inibição igual ou maior que 15 mm.

Alguns autores levantam a hipótese de que muitas substâncias bioativas que ocorrem em plantas podem ser produzidas e/ou compartilhada por seus endofíticos (Strobel, 2003; Strobel *et al.*, 2004). Extratos aquosos de folhas de *C. procera* demonstraram significativa atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* em estudos realizados por Yesmin *et al.* (2008) e contra o fungo *E. floccosum* em resultados obtidos por Kuta (2008). Estes mesmos micro-

organismos também tiveram inibição do crescimento por alguns dos fungos endofíticos testados neste estudo.

Entre os fungos detectados como produtores de substâncias antimicrobianas, os isolados procedentes das folhas mais velhas foram os que apresentaram maiores halos de inibição do crescimento dos micro-organismos teste. Foi verificado que a atividade antibacteriana foi mais intensa do que a atividade antifúngica. O gênero *Xylaria* e o grupo *Micelia Sterilia* são relatados em outros trabalhos como potenciais fontes de substâncias bioativas (Cafêu *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007). Apóia-se assim, estudos futuros envolvendo fungos endofíticos de *C. procera*, incluindo novos isolamentos e métodos de detecção e classificação das substâncias antimicrobianas.

Por fim, com os resultados obtidos nesta pesquisa pretende-se contribuir para a compreensão da interação entre a comunidade de fungos endofíticos e a idade do tecido foliar, além de abrir novas perspectivas sobre o potencial biotecnológico dos micro-organismos endofíticos de *Calotropis procera*.

Agradecimentos

À PROCAD/CAPES e ao projeto “Coleções de Cultura de Micro-organismos Micoteca URM e UFPEDA da Universidade Federal de Pernambuco” financiado pela FINEP.

4. FUNGOS ENDOFÍTICOS DE FOLHAS E PEDÚNCULOS FLORAIS DE *Calotropis procera* (AIT.) R. BR. E POTENCIAL ANTIMICROBIANO².

RESUMO

Os fungos endofíticos vivem no interior de tecidos de plantas vivas em uma complexa associação. *Calotropis procera* é uma planta medicinal explorada nas regiões de origem (África e Ásia), sendo de ocorrência comum no Nordeste do Brasil. No presente trabalho foram isolados fungos endofíticos de folhas e pedúnculos florais de *C. procera*, sendo estes caracterizados quanto a atividade antimicrobiana contra bactéria e fungos patogênicos, através de seleção em meio sólido e líquido. Dos 400 fragmentos vegetais analisados foi obtido um total de 214 fungos endofíticos distribuídos em 30 táxons, incluindo 11 morfoespécies. A taxa de colonização dos fungos endofíticos foi bem superior nos fragmentos de pedúnculos florais (61%) que nos foliares (22,5 %), sendo verificada diferença significativa entre os tipos de tecido vegetal, considerando a densidade média dos isolados de *C. procera*. Os índices de diversidade de Shannon calculados para os fungos endofíticos de pedúnculos florais e folhas foram muito próximos, sendo de 0,91 e 1,02, respectivamente. Nos pedúnculos florais as leveduras foram a forma predominante enquanto que nas folhas os fungos filamentosos foram o grupo dominante, com maior frequência relativa de isolamento da espécie *Rhodotorula glutinis* (33,54%) e *Guignardia bidwelli* (43%), respectivamente. Dentre as espécies de fungos filamentosos isolados de pedúnculo floral, destaca-se a espécie *Monodisma fragilis* de primeira ocorrência na América Latina. Dos 51 fungos endofíticos submetidos a seleção primária em meio sólido, 47% mostraram atividade contra pelo menos um micro-organismo teste, principalmente contra bactérias Gram-positivas. Dos fungos selecionados do ensaio em meio sólido, apenas quatro apresentaram resultados positivos nas condições de cultivo aplicadas na fermentação líquida, com destaque para o isolado do pedúnculo floral *Xylaria* sp., com atividade contra *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*.

Palavras-chave: Fungos endofíticos; Diversidade; Atividade antimicrobiana, *Calotropis procera*.

² Trabalho a ser submetido para publicação como Tatianne Leite Nascimento; Débora Maria Massa Lima; Maria José dos Santos Fernandes; Janete Magali de Araújo; Cristina Maria de Souza-Motta. 2010. Fungos endofíticos de folhas e pedúnculos florais de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. e potencial antimicrobiano. Brazilian Journal of Microbiology.

INTRODUÇÃO

As plantas apresentam complexos mecanismos adaptativos, muitos destes somente possíveis, graças às interações com os micro-organismos. Destes destacam-se os endofíticos, micro-organismos que colonizam intra e/ou intercelular mente tecidos sadios de plantas em algum período do seu ciclo de vida, sem causar danos aparentes aos mesmos (Petrini, 1991; Azevedo *et al.*, 2000). O papel ecológico das diferentes espécies de fungos endofíticos ainda não é totalmente claro, podendo até variar de simbiótico para antagônico ou ligeiramente patogênico (Schulz; Boyle, 2005; Arnold, 2007). Estabelecer limites rígidos para a categorização de um endofítico em um grupo ecológico fixo é uma tarefa muito difícil, alguns autores apóiam a questão que isolados fúngicos de uma mesma espécie ou gênero podem apresentar uma plasticidade de funções ecológicas significante no interior da planta (Rodriguez; Redman, 2008). No entanto, acredita-se que estes desempenham funções importantes no processo de adaptação da planta com o meio, entre estas a resistência a fitopatógenos, como verificado por Arnold *et al.* (2003).

Comumente, de dezenas a centenas de isolados podem ser obtidos de um único vegetal (Strobel; Dayse, 2003). Modificações ambientais, na maturidade e anatomia do tecido hospedeiro, podem exercer pressões seletivas que interferem na composição, frequência e especificidade das espécies endofíticas. Huang *et al.* (2008), encontraram variação na comunidade de fungos endofíticos de acordo com o tipo de tecido analisado. *Chaetomium*, *Drechslera*-Like, *Ellisembia*, *Ephelis*, *Helminthosporium*, *Pyrenochaeta* e *Rhizosphaera* foram detectados apenas nos caules e *Phyllosticta*, *Physalospora* e *Spiropes* só foram isoladas das folhas. A especificidade de espécies endofíticas em dependência do tipo de tecido avaliado também foi verificada por Tejesvi *et al.* (2005), Gond *et al.* (2007).

Uma das propriedades mais importantes dos fungos endofíticos está associada à sua capacidade metabólica de produzir uma grande diversidade de moléculas bioativas (Strobel *et al.*, 2004). Os produtos naturais de micro-organismos endofíticos têm mostrado capacidade de inibir ou matar uma ampla variedade de agentes patogênicos, tornando-os potenciais produtores de metabólitos de interesse econômico na medicina, na agricultura e indústria, tendo por isso, despertado o interesse da comunidade científica (Strobel; Daisy, 2003). Resultados promissores como a produção do taxol, levam vários pesquisadores a lançarem a hipótese de que alguns fungos possam compartilhar, mimetizar e/ou serem os responsáveis pelas propriedades antimicrobianas encontradas em seu hospedeiro (Kharwar *et al.*, 2008; Strobel *et al.*, 2004).

Calotropis procera (Apocynaceae) é uma planta com uma importante história etnobotânica associada ao seu vasto uso medicinal por culturas africanas, indianas e do Oriente Médio (Iqbal *et al.*, 2005). Essa espécie é nativa do sudoeste da Ásia e África (Abbassi *et al.*, 2003), mas pode ser encontrada em quase todas as regiões tropicais semi-áridas da América. Na região Nordeste do Brasil sua ocorrência é subespontânea e muito comum, formando populações numerosas na beira de estradas e ambientes degradados (Ferreira, 1973). Dentre as suas propriedades biológicas pode-se destacar as atividades: antiinflamatória (Kumar; Basu, 1994); analgésica com princípios ativos que podem ter eficácia equivalente à da aspirina (Dewan *et al.*, 2000); antidiarréica (Kumar *et al.*, 2001); inseticida (Ahmed *et al.*, 2006); antibacteriana e antifúngica (Kareem *et al.*, 2008; Yesmin *et al.*, 2008; Asres *et al.*, 1992) entre outras.

Assim, considerando os muitos aspectos ainda desconhecidos na complexa interação entre planta/fungo endofítico e o potencial antimicrobiano dos endofíticos de plantas medicinais (Huang *et al.*, 2007; Phongpaichit *et al.*, 2006; Radu; Kqueen, 2002; Liu *et al.*, 2001), este trabalhou visou investigar a comunidade de fungos endofíticos associados a folhas e pedúnculos florais de *C. procera* e caracterizar os isolados obtidos quanto à habilidade de produzir substâncias antimicrobianas contra micro-organismos testes, patogênicos ao homem e vegetais.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do Material Vegetal

Foram selecionados cinco indivíduos de *Calotropis procera*, distantes entre si por aproximadamente 3 metros, localizados as margens da BR-232 no início da Serra das Russas entre os municípios de Pombos e Gravatá, Pernambuco – Brasil (S08° 09' 206" W35° 25' 075"). De cada planta foram coletadas, aleatoriamente, folhas e pedúnculos florais saudáveis (sem manchas ou qualquer tipo de lesão causada por patógenos, insetos ou danos mecânicos vistos a olho nú). As amostras vegetais (cinco de cada tecido e planta), foram armazenadas em sacos plásticos, identificadas e conduzidas ao Laboratório da Coleção de Culturas – Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) para isolamento dos fungos endofíticos. O clima da região é tropical úmido com o período

chuvoso de fevereiro a setembro e temperatura média de 25°C. A região da área de coleta apresentou precipitação acumulada no mês de coleta (julho/2008) de aproximadamente 370mm (INMET, 2008).

Isolamento dos Fungos Endofíticos de *Calotropis procera*

O material vegetal foi levado ao laboratório, lavado em água corrente para a remoção da poeira e outros resíduos e mantidos sob refrigeração por até 24 horas. A técnica utilizada para eliminação dos micro-organismos epifíticos foi a de desinfestação superficial com hipoclorito de sódio de acordo com Araújo *et al.* (2002). Assim, ao abrigo de uma capela de fluxo laminar, as folhas e pedúnculos florais foram imersas em etanol 70% por 1 minuto, em hipoclorito de sódio (2-2,5 % de cloro ativo) por 4 minutos, em etanol 70% por 30 segundos e lavados três vezes em água destilada e esterilizada. Após o processo de desinfestação superficial, as folhas e os pedúnculos florais foram cortados em fragmentos de 0,5cm² e 0,5cm respectivamente e transferidos assepticamente para placas de Petri contendo o meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA (g/L): batata 200, dextrose 20 e ágar 15; Lacaz *et al.*, 2002) suplementado com cloranfenicol (100µg/mL) para inibir o crescimento de bactérias. O controle de eficiência da desinfestação foi confirmado pela inoculação de 1mL da última água de lavagem em placas de Petri com o mesmo meio de cultura do isolamento. As placas de Petri foram incubadas a temperatura ambiente (28 ± 2°C) por até 30 dias, sendo observadas diariamente e qualquer colônia fúngica presente foi isolada, purificada e identificada.

Identificação dos Fungos Endofíticos

Para a identificação dos fungos endofíticos, foram observadas características macroscópicas (coloração, aspecto e diâmetro das colônias), microscópicas (microestruturas somáticas e reprodutivas) e quando necessárias, fisiológicas (assimilação e fermentação de fontes de carbono e etc.), sendo utilizada literatura específica (Raper; Thom, 1949; Ellis, 1971, 1976; Carmichael *et al.*, 1980; Sutton, 1980; Domsch *et al.*, 1993; Barnett *et al.*, 2000, dentre outros). Os fungos isolados neste estudo que não produziram esporos foram separados em morfoespécies de acordo com características

morfológicas macroscópicas e microscópicas (micélio). Na tentativa de estimular a esporulação fúngica, algumas técnicas foram utilizadas, entre elas: banho de luz UV (exposição de 1min. e 2min. do inóculo e da colônia com cinco de dias de crescimento); incubação no escuro; uso de diferentes meios de cultura: Ágar Extrato de Malte (g/L: extrato de malte 20, peptona 1, dextrose 20, ágar 16) Lacaz *et al.* (2002); Meio Folha (g/L: glicose 5, ágar 16; 500 mL do extrato aquoso das folhas de *C. procera*, completar o volume para 1 litro) adaptado de Araújo *et al.* (2002); Ágar água (g/L: Agar 15) Araújo *et al.* (2002); Ágar tomate (suco de tomate 50ml, água destilada 50mL, ágar 1,6 g). Ainda, utilizou-se métodos alternativos adaptados de Guo *et al.* (1998) em que, pedaços de folhas e pedaços de caule esterilizadas em autoclave (121°C por 20 mim.) foram depositados na superfície do meio de cultura Ágar água em placas de Petri e frascos, respectivamente, na intenção de estimular a produção de estruturas reprodutivas na superfície do material vegetal. Após identificação, um exemplar de cada espécie dos fungos endofíticos de interesse biotecnológico e/ou ecológico é incorporado ao acervo da coleção de culturas-Micoteca URM do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em Recife, Pernambuco, Brasil.

Análise dos dados

Foram avaliadas a taxa de colonização (TC) expressa pela razão entre o número de fragmentos com crescimento fúngico e o número total de fragmentos por tipo de tecido vegetal (Araújo *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2008) e a Frequência Relativa (FR) de isolamento calculada como o número de isolados de uma espécie dividido pelo total do número de isolados, ambas são expressas em percentagem (Photita *et al.*, 2001). O índice de diversidade de Shannon-Wiener foi calculado através do software DivEs – Diversidade de espécies (Rodrigues, 2005). A densidade dos fungos endofíticos obtidos entre as folhas e os pedúnculos florais foi comparada pelo Teste t pareado ao nível de 5% de probabilidade através do software BioEstat 5.0 (Ayes *et al.*, 2007).

Caracterização dos Fungos Endofíticos quanto a Atividade Antimicrobiana

Micro-organismos Teste

A atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos foi avaliada contra as bactérias:: Gram-positivas - *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Bacillus subtilis* UFPEDA 86, *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138 e *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 07; Gram-negativas - *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Enterobacter aerogenes* UFPEDA 739, *Salmonella typhi* UFPEDA 478, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 735 e *Proteus vulgaris* UFPEDA 740; Alcool-ácido resistente - *Mycobacterium smegmatis* UFPEDA 71; e contra os fungos: Patogênicos ao homem - *Candida albicans* URM 5889, *Malassezia furfur* URM 4849, *Epidermophyton floccosum* URM 5110, *Trichosporum cutaneum* URM 5743 e *Fusarium solani* URM 5776; Fitopatogênicos - *Colletotrichum dematium* URM3315 e *Fusarium oxysporum* URM5283. As bactérias foram procedentes da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos UFPEDA e os fungos da Micoteca URM, UFPE.

Seleção dos Fungos Endofíticos quanto à Atividade Antimicrobiana em Meio Sólido

Pelo menos um representante de cada táxon dos fungos endofítico isolados foi testado quanto a produção de substâncias com ação antimicrobiana contra bactérias e fungos patogênicos. Os fungos endofíticos selecionados foram submetidos a uma seleção primária quanto à atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos teste. Foi utilizado o teste de Bloco de Gelose baseado na metodologia modificada de Ichikawa *et al.* (1971) por permitir uma seleção rápida e qualitativa de micro-organismos que produzam substâncias bioativas. Cada fungo foi cultivado na superfície de BDA em placas de Petri a 30°C por sete dias, de forma que o crescimento microbiano fosse em “tapete”. Após este período, discos foram cortados da colônia com um furador esterilizado (8mm de diâmetro) e transferidos para a superfície de meios específicos previamente semeados com os micro-organismos teste: meio Ágar Nutriente (AN – Difco) e *Brain Heart Infusion* (BHI - Difco) semeado com as bactérias; meio Ágar Sabouraud (SAB (g/L): peptona 10, dextrose 40, ágar 16; Lacaz *et al.*, 2002), semeado com os fungos, exceto *Malassezia furfur* que foi semeado em SAB suplementado com 0,5% de azeite de oliva. Em seguida, as placas de Petri foram incubadas a 37°C por 24 ou 48 horas (*Mycobacterium smegmatis*) quando os micro-organismos teste eram bactérias e a 30°C por aproximadamente 62 horas quando os

micro-organismos teste eram fungos. Os halos de inibição foram medidos após estes períodos. O teste foi realizado em triplicata. Sendo considerados negativos (-) quando não foi observado halo de inibição; +, os que apresentaram halos menores do que 15mm; ++, os que apresentaram halo de inibição iguais ou maiores do que 15mm; +++ halos de inibição maiores que 20 mm; ++++ halos de inibição maiores que 30 mm.

Seleção dos Fungos Endofíticos Produtores de Substâncias Antimicrobianas em Meio Líquido

Os isolados com os melhores resultados no ensaio de atividade antimicrobiana em meio sólido foram submetidos ao teste de Difusão em Disco modificado de Bauer *et al.* (1966), com a finalidade de selecionar o melhor meio e tempo de cultivo para a produção do metabólito bioativo em meio líquido. Os pré-inóculos foram preparados a partir da transferência de três discos (8mm de diâmetro) da colônia fúngica endofítica para frascos Erlenmeyers de 250mL contendo 50mL dos diferentes meios de cultura. As culturas foram incubadas a 30°C em mesa rotatória a 180rpm por 48h. Alíquotas (10mL) de cada pré-inóculo foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 500mL contendo 90mL dos seguintes meios de cultura: Caldo Extrato de Malte (CEM (g/L): extrato de malte 20, peptona 1, dextrose 20), Meio para a produção de Eurimicina (MPE (g/L): farinha de soja 20, glicose 20, CaCO₃ 2 e NaCl 5) e M1 (g/L: farinha de soja 10, glicose 10, CaCO₃ 1 e NaCl 5), todos com pH ajustado para 7,0, e submetido as mesmas condições de cultivo do pré-inóculo e em estado estático por até 10 dias. A cada 48h, 3mL do conteúdo da fermentação foram transferidos para tubos Falcon (2mL) e Eppendorf (1mL), sendo submetidos a centrifugação até a completa separação entre líquido metabólico bruto e massa celular. Discos de papel de filtro (8mm) esterilizados foram umedecidos com 60 μ L do líquido metabólico bruto e transferidos para a superfície de meios específicos previamente semeados com os micro-organismos teste, conforme descrito no item anterior. Variações dos parâmetros como pH e peso seco foram verificados em todos os testes. Os testes foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Taxa de Colonização, Diversidade e Riqueza

Dos 400 fragmentos vegetais analisados (200 de cada tecido vegetal: folha e pedúnculo floral), foi obtido um total de 214 fungos endofíticos de *Calotropis procera* (Tabela 1). A maioria dos fungos endofíticos que apresentaram estruturas reprodutivas (esporos e esporóforos) foi identificada ao nível de espécie. Entretanto, alguns endofíticos não apresentaram estruturas reprodutivas, sendo considerados pertencentes ao grupo *Mycelia Sterilia* (Morfoespécies 1-8) e outros, apesar de apresentarem esporos, não foi possível a identificação com a literatura disponível (Levedura 1, Levedura 2, Levedura 3, *Alternaria* sp., *Penicillium* sp. e *Xylaria* sp.).

Tabela 1. Diversidade, Riqueza e Freqüência relativa¹ dos fungos endofíticos isolados de diferentes tecidos vegetais de *Calotropis procera*, coletadas na BR 232, Pernambuco - Brasil.

Espécie endofítica	Folha		Pedúnculo Floral		Total	
	Densidade	FR%	Densidade	FR%	Densidade	FR%
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	-	-	1	0,61	1	0,47
<i>Alternaria citri</i> Ellis & N. Pierce	-	-	1	0,61	1	0,47
<i>Alternaria</i> sp.	-	-	1	0,61	1	0,47
<i>Botrytis ricini</i> Godfrey	2	4,00	-	-	2	0,93
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries	-	-	1	0,61	1	0,47
<i>Cladosporium oxysporum</i> (Berk. & Curt.)	-	-	1	0,61	1	0,47
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Sacc.	-	-	2	1,22	2	0,93
<i>Cryptococcus laurentii</i> (Kuff.) C.E. Skinner	2	4,00	19	11,59	21	9,81
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht	-	-	8	4,88	8	3,74
<i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk	-	-	1	0,61	1	0,47
<i>Guignardia bidwelli</i> (Ellis) Viala & Ravaz	23	46,00	1	0,61	24	11,21
<i>Libertella betulina</i> Desm.	1	2,00	4	2,44	5	2,34
<i>Monodisma fragilis</i> Alcorn	-	-	1	0,61	1	0,47
Morfoespécie 1	1	2,00	-	-	1	0,47
Morfoespécie 2	1	2,00	-	-	1	0,47
Morfoespécie 3	-	-	1	0,61	1	0,47
Morfoespécie 4	-	-	1	0,61	1	0,47
Morfoespécie 5	-	-	1	0,61	1	0,47
Morfoespécie 6	-	-	1	0,61	1	0,47
Morfoespécie 7	-	-	1	0,61	1	0,47
Morfoespécie 8	-	-	1	0,61	1	0,47
Levedura 1	4	8,00	32	19,51	36	16,82
Levedura 2	4	8,00	23	14,02	27	12,62
Levedura 3	-	-	5	3,05	5	2,34
<i>Penicillium</i> sp.	2	4,00	-	-	2	0,93
<i>Phaeoramularia calotropidis</i> (Ell. & Everh.)	2	4,00	-	-	2	0,93
<i>Phoma medicaginis</i> Malbr. & Roum.	1	2,00	-	-	1	0,47

Tabela 1. Continuação...

Espécie endofítica	Folha		Pedúnculo Floral		Total	
	Densidade	FR%	Densidade	FR%	Densidade	FR%
<i>Pithomyces maydicus</i> (Sacc.) M.B. Ellis	1	2,00	-	-	1	0,47
<i>Rhodotorula glutinis</i> (Fresen.) F.C. Harrison	6	12,00	55	33,54	61	28,50
<i>Xylaria</i> sp.	-	-	2	1,22	2	0,93
Densidade Total	50		164		214	
Riqueza	13		23			
Diversidade de Shannon	1,02		0,91			

¹Frequência relativa, dada pela razão entre o número de colônias obtidas daquela espécie e o número total de colônias isoladas.

²Levedura não identificada

Dos 27 táxons de fungos filamentosos obtidos dos tecidos de *C. procera*, 16 foram identificados ao nível de espécie, três ao nível de gênero e oito foram categorizados em morfoespécies (*Mycelia Sterilia*), Tabela 1. O uso do conceito de morfoespécie é um valioso indicador para avaliar a diversidade das comunidades endofíticas, já que o isolamento de fungos, cujas estruturas reprodutivas não são produzidas nos meios de cultura convencionalmente utilizados é muito comum (Arnold *al et.*, 2001). Problemas na identificação de fungos endofíticos já foram observados por outros autores (Gamboa; Bayman, 2001). Nenhum dos métodos utilizados para estimular a produção de esporos foi efetivo para as Morfoespécies 1-8.

A taxa de colonização dos fungos endofíticos foi bem superior nos fragmentos de pedúnculos florais (61%) que nos foliares (22,5%), para o cálculo dessas taxas foram considerados tanto os fungos filamentosos quanto as leveduras. Nos pedúnculos florais as leveduras foram predominantes, enquanto que nas folhas foram os fungos filamentosos. Apesar da grande diferença entre as taxas de colonização dos tipos de tecido vegetal de *C. procera* esta não é expressiva se calculada considerando apenas a colonização por fungos filamentosos, sendo de 15% para o pedúnculo floral e 16,5% para folha. As leveduras contribuíram para o aumento da taxa de colonização para os pedúnculos florais.

A extensiva colonização de um tecido por leveduras endofíticas não é comumente verificada na literatura, geralmente estas apresentam uma incidência muito abaixo da encontrada para fungos filamentosos (Larran *et al.*, 2001; Larran *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2002; Camatti-Sartori *et al.*, 2005; Landell *et al.*, 2006). No entanto, tal padrão não foi verificado para o pedúnculo floral de *C. procera*, que apresentou uma taxa de 50% de colonização dos fragmentos por leveduras. Muitos táxons de leveduras tem sido

encontrados como endofíticos em plantas (Khaled *et al.*, 2006), no entanto ecologicamente, pouco se conhece sobre tal associação. As leveduras são um componente comumente estudado e encontrado na superfície dos vegetais, ocupando como microhabitats folhas, flores, néctares, frutas, cascas de árvores e outros substratos ricos em açúcares (Khaled *et al.*, 2006; Landell *et al.*, 2006), cuja ocupação pode ser altamente relacionada aos insetos como vetores (Azeredo *et al.*, 1998). Provavelmente a preferência das leveduras pelo pedúnculo floral verificada neste estudo, pode relacionar-se ao tecido, rico em vasos de condução de substâncias nutritivas (Taiz; Zeiger, 2009) e a acessibilidade do inóculo fúngico através das flores (Saikkonen *et al.*, 2004), no entanto, não há estudos suficientes para conclusões sólidas.

Em um estudo a cerca da comunidade de fungos endofíticos associados a *C. procera* coletada na Índia, Khan *et al.* (2007) verificaram uma colonização de 8,86% dos fragmentos vegetais amostrados com uma riqueza de 8 espécies fúngicas e, curiosamente, não houve isolamento de nenhum fungo endofítico das folhas desse vegetal. Tais dados são muito inferiores se comparados com a taxa de colonização e a riqueza de táxons relatada neste artigo (53,5% e 30 táxons, respectivamente), demonstrando alta variabilidade da comunidade endofítica mesmo em hospedeiros de uma mesma espécie. De acordo Arnold e Herre (2003), na dinâmica da interação micro-organismo endofítico-planta hospedeira, inúmeros fatores abióticos e bióticos, podem exercer pressões seletivas que interferem na composição, frequência e especificidade das espécies endofíticas. Além da interferência das variáveis que naturalmente influenciam a comunidade de fungos endofíticos, diferenças nas metodologias empregadas no isolamento de endofíticos, incluindo o esforço amostral, tornam comparações entre estudos ainda mais problemáticas (Cannon; Simmons, 2002; Arnold *et al.*, 2001).

Houve diferença estatística entre os tipos de tecido vegetal considerando a densidade dos fungos endofíticos isolados de *C. procera* ($p= 0,001$, Figura 1). As folhas apresentaram um total de 50 isolados e dos pedúnculos florais foi obtido um total de 164 fungos endofíticos, sugerindo que os fatores químicos e anatômicos do tecido hospedeiro podem influenciar na infecção e colonização endofítica (Arnold; Herre, 2003).

A composição taxonômica dos fungos endofíticos variou de acordo com o tecido estudado. O pedúnculo floral apresentou uma riqueza de táxons maior (23) do que as folhas (13). No entanto, os índices de diversidade de Shannon calculados para folhas e pedúnculos florais foram muito próximos, sendo de 0,91 e 1,02, respectivamente (Tabela 1). Os resultados referentes à diversidade estão relacionados principalmente as espécies de

fungos recorrentes ou dominantes aqui verificadas e que freqüentemente são relatadas em isolamento de fungos endofíticos de outros vegetais (Suryanarayanan *et al.*, 2003; Kharwar *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008).

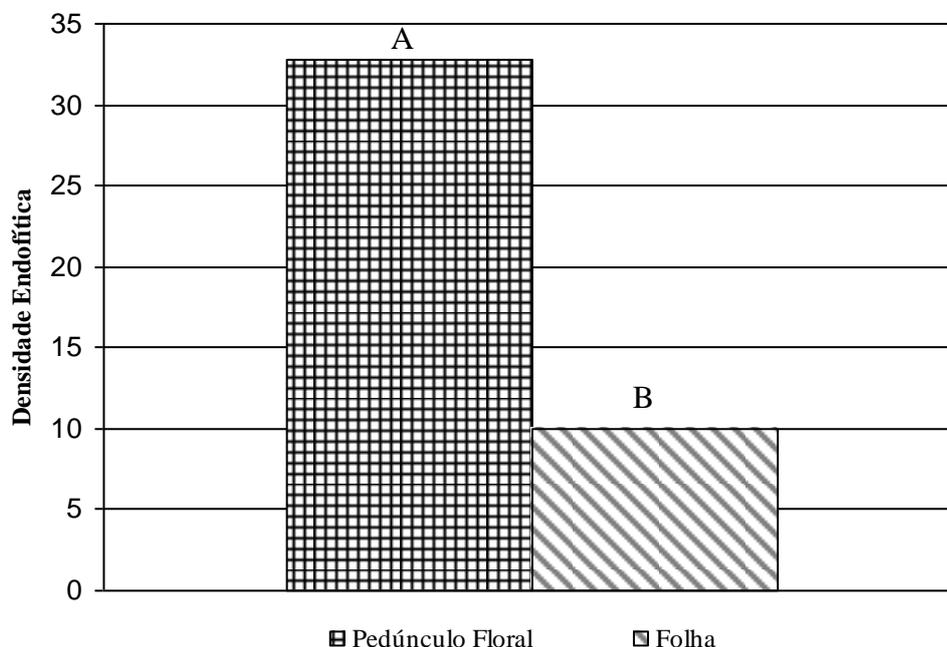


Figura 1. Média da densidade dos fungos endofíticos isolados de diferentes tecidos vegetais de *Calotropis procera*, coletadas na BR 232, Pernambuco - Brasil. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste t entre as duas amostras pareadas ao nível de 5% de probabilidade.

A espécie dominante entre as folhas de *C. procera* foi *Guignardia bidwelli*, com 43% da freqüência relativa de isolamento, seguida pela levedura *Rhodotorula glutinis* com 12% (Tabela 1). Os demais táxons apresentaram um ou poucos isolados, sendo os filamentosos: *Botrytis ricini*, *Phoma medicaginis*, *Libertela betulina*, *Penicillium* sp., *Phaeoramularia calotropidis*, *Pithomyces maydicus* e Morfoespécie 1 e 2; e as leveduras: *Cryptococcus laurentii* e Levedura 1 e Levedura 2. De acordo com Peixoto-Neto *et al.* (2002), *G. bidwelli* está entre as espécies mais freqüentes entre os endofíticos isolados no Brasil.

No pedúnculo floral, as leveduras foram predominantes, sendo *Rhodotorula glutinis*, a espécie com maior freqüência relativa de isolamento (33,54%) entre as colônias obtidas deste tecido e a com maior freqüência relativa geral com 28,50% do total de isolados obtidos na soma dos dois tecidos. A segunda espécie dominante foi a Levedura 1 (19,51%), seguida pela Levedura 2 (14,02%) e por *Cryptococcus laurentii* (11,59%) (Tabela 1), sendo a última pertencente a um gênero de importante caráter patológico

humano, relacionado a Criptococose, infecção subaguda ou crônica, de comprometimento pulmonar, sistêmico e do sistema nervoso central (Sidrim; Moreira, 1999). Estudos envolvendo diferentes espécies de plantas, também relataram o isolamento de leveduras, sendo que *Rhodotorula* sp. e *Cryptococcus* sp. estão entre os gêneros mais citados (Larran *et al.*, 2001; Larran *et al.*, 2002; Pirttilä *et al.*, 2003; Camatti-Sartori *et al.*, 2005; Landell *et al.*, 2006), confirmando que estes são comuns como fungos endofíticos; além de isolados de leveduras não identificados (Cao *et al.*, 2002).

Dentre os fungos filamentosos isolados do pedúnculo floral, *Fusarium oxysporum* foi a espécie com a maior frequência relativa de isolamento (4,88%). O gênero *Fusarium* é frequentemente citado como dominante na comunidade endofítica em diferentes vegetais (Gond *et al.*, 2007; Kharwar *et al.*, 2008). Das espécies de fungos filamentosos isolados de pedúnculo floral, *Monodisma fragilis* é aqui relatada pela primeira vez ocorrendo na América Latina, não havendo, também, relato anterior dessa espécie como endofítica.

Alguns táxons apresentaram especificidade ou preferência ao tecido vegetal estudado. Do total de isolados de pedúnculo floral (23), 17 ocorreram apenas neste tecido, como os gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Monodisma* e *Xylaria*, além das Morfoespécies 3-8 e a Levedura 3. Enquanto que as espécies particulares ao tecido foliar foram *Botrytis ricini*, *Pithomyces maydicus*, *Phoma medicaginis*, *Phaeoramularia calotropidis* e o gênero *Penicillium* (Tabela 1). As diferenças verificadas na composição taxonômica, variando de acordo com tecido vegetal indicam que alguns fungos endofíticos apresentam afinidade por diferentes tipos de tecido, o que pode ser reflexo da sua capacidade para utilizar ou sobreviver no interior de um substrato específico (Huang *et al.*, 2008). Muitos estudos anteriores relatam a tecido-especificidade de fungos endofíticos (Tejesvi *et al.*, 2005; Gond *et al.*, 2007; Suryanarayanan; Vijaykrishna, 2001). Além disso, fatores como o habitat associado ao hospedeiro e a interação com outros endofíticos ou micro-organismos patógenos podem modificar a dinâmica da comunidade endofítica (Araújo *et al.*, 2002).

Atividade Antimicrobiana dos Fungos Endofíticos

Dos 51 fungos endofíticos submetidos a seleção primária em meio sólido (27 de pedúnculo floral e 24 de folhas), 47% mostraram atividade contra pelo menos um micro-organismo teste com halos de inibição variando de 11 a 41,5mm (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade antimicrobiana em meio sólido dos fungos endofíticos isolados de diferentes tecidos vegetais de *Calotropis procera*, coletadas na BR 232, Pernambuco – Brasil.

Fungos Endofíticos	Bactérias-Teste UFPEDA ¹										Fungos-Teste URM ²				
	2	7	71	86	138	224	478	735	740	740	3315	4849	5110	5283	5743
Pedúnculo Floral															
<i>Alternaria citri</i> (CP25)	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria</i> sp.(CP04)	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	-	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (URM 5869)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>C. oxysporum</i> (URM 5868)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> (CP15)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. oxysporum</i> (CP19)	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>F. oxysporum</i> (CP27)	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. oxysporum</i> (URM 6049)	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	++	+	++
<i>F. oxysporum</i> (CP51)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Morfoespécie 3(URM 6086)	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Morfoespécie 5(URM 6087)	++	++	++	++	-	-	+++	-	+++	-	-	-	-	-	-
Morfoespécie 7(URM6088)	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Morfoespécie 8(CP34)	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Xylaria</i> sp.(URM 6051)	+	++++	-	-	+++	++	++++	-	++++	-	-	-	-	-	-
Folha															
<i>Guignardia bidwelli</i> (CF35)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
<i>G. bidwelli</i> (CF39)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
<i>G. bidwelli</i> (CF40)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-
<i>G. bidwelli</i> (CF41)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>G. bidwelli</i> (CF43)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Morfoespécie 1(CF20)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Morfoespécie 2(CF49)	+	+	++	-	-	+	++++	-	+++	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp. (CF31)	-	-	-	-	-	-	+++	-	+++	-	+	-	+	-	-
<i>Phoma medicaginis</i> (CF33)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Pithomyces maydicus</i> (CF23)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Bactérias teste que apresentaram zonas de inibição: *Staphylococcus aureus* UFPEDA02, *Streptococcus pyogenes* UFPEDA07, *Mycobacterium smegmatis* UFPEDA71, *Bacillus subtilis* UFPEDA86, *Enterococcus faecalis* UFPEDA138, *Escherichia coli* UFPEDA224, *Salmonella typhi* UFPEDA478, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA735, *Proteus vulgaris* UFPEDA740.

²Fungos teste que apresentaram zonas de inibição: Patogênico ao homem *Malassezia furfur* URM4849, *Epidermophyton floccosum* URM5110 e *Trichosporum cutaneum* URM5743 e a vegetais *Colletotrichum dematium* URM3315 e *Fusarium oxysporum* URM5283.

-: sem atividade; +: halo de inibição menor que 15 mm; ++: halo de inibição igual ou maior que 15 mm; +++: halo de inibição maior que 20 mm; ++++: halo de inibição maior que 30 mm.

Os fungos isolados de ambos os tecidos vegetais demonstraram alguma capacidade antimicrobiana, no entanto os endofíticos de pedúnculo floral demonstraram ser mais promissores, principalmente no controle de bactérias patogênicas, que os isolados do tecido foliar.

A maioria dos fungos de pedúnculo floral apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Os que mais se destacaram foram: o isolado *Xylaria* sp. (URM 6051) com halo de inibição maior que 20mm (*Enterococcus faecalis*) e 30mm (*S. pyogenes* e *Salmonella typhi*); Morfoespécie 5 (URM 6087) com largo espectro de ação, atuando contra seis das dez bactérias testadas, incluindo a Álcool-Ácido Resistente. Dos endofíticos de folhas, o isolado *Penicillium* sp. (CF31), apresentou halo de inibição superior a 20mm (*S. typhi*), e Morfoespécie 2 (CF49) com atividade contra a maioria das bactérias testadas, mas com destaque apenas contra *S. typhi*, com halo de 41,5mm.

De acordo com Schulz e Boyle (2005), a porcentagem de fungos endofíticos produtores de compostos biologicamente ativos é alta, chegando a aproximadamente 80% dos isolados. Inúmeros estudos têm demonstrado o grande potencial farmacológico dos endofíticos isolados de plantas medicinais (Liu *et al.*, 2001; Radu; Kqueen, 2002; Li *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2007), entre o exemplo mais citado, está o da síntese do taxol, substância anticancerígena extraída da árvore *Taxus brevifolia* e também sintetizada pelo seu fungo endofítico *Taxomyces andreanea* (Stierle *et al.*, 1993). Mais recentemente, verificou-se que outras espécies de fungos endofíticos isolados de *Taxus* spp. são capazes de produzir taxol, destacando ainda que processos de fermentação usando estes fungos podem ser um modo alternativo ao uso do extrato do vegetal, para a produção dessa substância, entre estes, *Cladosporium cladosporioides* endofítico de *Taxus media* (Zhang *et al.*, 2009a) e *Aspergillus niger* var. *taxi* isolado de *Taxus cuspidata* (Zhao *et al.*, 2009).

Estudos etnobotânicos evidenciam inúmeros usos medicinais de *C. procera*, principalmente, pelas culturas africanas, indianas e do Oriente Médio. Por exemplo, praticamente todas as partes da planta incluindo seu látex, são utilizadas como expectorante, anti-helmíntico, antidiarréico, purgativo, antiinflamatório e diurético (Iqbal *et al.*, 2005). A atividade antimicrobiana *C. procera* foi verificada por diferentes autores. Extratos aquosos de folhas de *C. procera* demonstraram significativa atividade contra bactérias Gram-positivas dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* (Yesmin *et al.*, 2008), como verificado para grande parte dos endofíticos testados neste estudo. No

entanto, diferentes extratos de *C. procera* mostram um largo espectro de ação, também com bons resultados para bactérias Gram-negativas, sendo *Proteus* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae* (Asres *et al.*, 1992; Larhsini *et al.*, 2001, Kareem *et al.*, 2008) e vários gêneros de fungos, tais como *Microsporum gypseum*, *Trichophyton* sp., *Epidermophyton floccosum*, *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme* e *Rhizoctonia solani* (Sharma; Trivedi, 2002; Ahmad; Sultana, 2003; Hassan *et al.*, 2006; Kuta, 2008), com bons resultados na inibição de *Candida albicans* (Sehgal *et al.*, 2005).

Os fungos endofíticos de *C. procera* aqui analisados apresentaram atividade antimicrobiana para vários gêneros de micro-organismos suscetíveis aos extratos do vegetal citados acima, o que sugere a hipótese que os endofíticos podem produzir substâncias com a mesma propriedade antimicrobiana de suas plantas hospedeiras (Strobel, 2003; Strobel *et al.*, 2004). Entretanto, nenhum dos fungos endofíticos testados foram capazes de inibir o crescimento de *C. albicans*.

Os endofíticos que produziram halos de inibição superiores a 15mm contra os micro-organismos teste em meio sólido, foram submetidos ao ensaio fermentativo em meio líquido. Destes, apenas quatro isolados apresentaram resultados positivos nas condições de cultivo ensaiadas, sendo: sob agitação, *F. oxysporum* (URM 6049), *Alternaria* sp. (CP04), *Xylaria* sp. (URM 6051) e na condição estática, o isolado *Penicillium* sp. (CF31). *Penicillium* sp. (CF31), apresentou atividade somente com dez dias de fermentação em meio de cultura MPE, alterando o pH para 7,6 e halo de inibição de 17mm contra *S. typhi* (Tabela 3)

Os melhores resultados do ensaio fermentativo ocorreram na condição de agitação e utilizando o meio de cultura Extrato de Malte, os valores de pH e tempo de incubação variaram de acordo com o isolado endofítico analisado e/ou micro-organismo patogênico (Tabela 3). *Alternaria* sp. (CP04), apresentou atividade antimicrobiana apenas com 48h de incubação e com acidificação do meio de cultura modificando o pH para 5,2, contra a bactéria *S. aureus* e o fungo *E. floccosum*, os halo de inibição foram menores que 15mm. Este isolado foi o único a apresentar atividade antifúngica durante a fermentação. *Fusarium oxysporum* (URM 6049) foi capaz de inibir somente a bactéria *S. aureus* produzindo o maior halo de inibição (25,7mm) no meio de cultura M1, no quarto dia de incubação, com aumento do pH para 8,0.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana contra micro-organismos patogênicos, dos fungos endofíticos de *Calotropis procera* cultivados em meio líquido.

Micro-organismo Teste	Condições de cultivo/ Fungo endofítico			pH final	Halo de inibição ²
	Tempo (dias)	Meio de cultura ¹	Agitação (rpm)		
<i>Alternaria</i> sp. (CP04)					
UFPEDA02 <i>Staphylococcus aureus</i>	2	EM	180	5,2	+
URM5110 <i>Epidermophyton floccosum</i>	2	EM	180	5,2	+
<i>Fusarium oxysporum</i> (URM 6049)					
UFPEDA02 <i>Staphylococcus aureus</i>	4	M1	180	8,0	+++
<i>Xylaria</i> sp. (URM 6051)					
UFPEDA07 <i>Streptococcus pyogenes</i>	8	EM	180	5,1	++++
UFPEDA138 <i>Enterococcus faecalis</i>	4	EM	180	4,8	+++
UFPEDA224 <i>Escherichia coli</i>	6	EM	180	4,9	+
UFPEDA478 <i>Salmonella typhi</i>	8	EM	180	5,1	+++
<i>Penicillium</i> sp. (CF31)					
UFPEDA478 <i>Salmonella typhi</i>	10	MPE	0	7,6	++

¹EM – Extrato de Malte; MPE - Meio para a produção de Eurimicina.

² + halo de inibição menor que 15mm; ++ halo de inibição igual ou maior que 15mm; +++ halo de inibição maior que 20mm; ++++ halo de inibição maior que 30 mm.

O endofítico *Xylaria* sp. (URM 6051) cultivado no meio de cultura Extrato de Malte sob agitação, foi o mais promissor no ensaio fermentativo, apresentando atividade antibacteriana do quarto ao décimo dia de incubação, com atuação contra quatro bactérias patogênicas: *S. pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *S. typhi* (Figura 2). O pH da cultura apresentou inicialmente considerável modificação, passando do pH inicial 7,0 para 4,7 com 48h de fermentação, após esse período ocorreu um leve incremento do pH do meio com o aumento do tempo de incubação. A produção de massa celular foi contabilizada a partir do segundo dia de fermentação e apresentou aumento gradual até o sexto dia (0,41 g/mL), com decréscimo considerável após esse período, no décimo dia foi verificada a menor produção de massa celular, sendo esta de 0,25 g/mL (Figura 3).

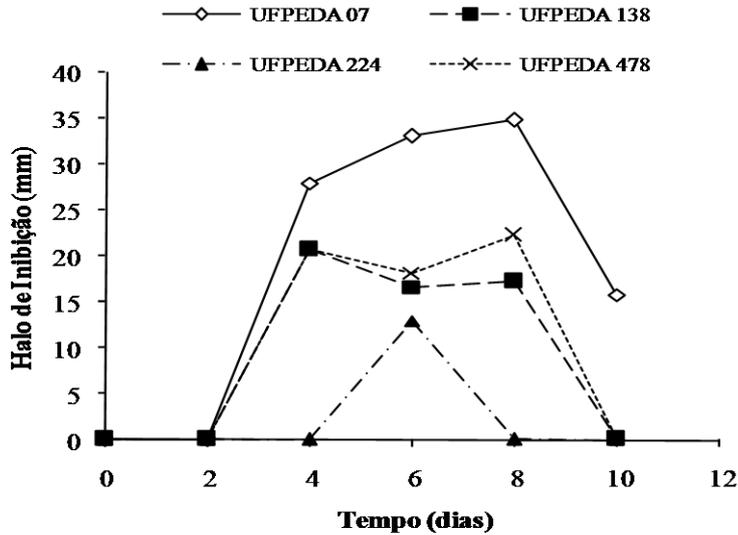


Figura 2. Halo de inibição produzido pelo endofítico *Xylaria* sp. (URM 6087) isolado de *Calotropis procera* contra as bactérias *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 07, *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138, *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Salmonella typhi* UFPEDA 478, em função do tempo de incubação.

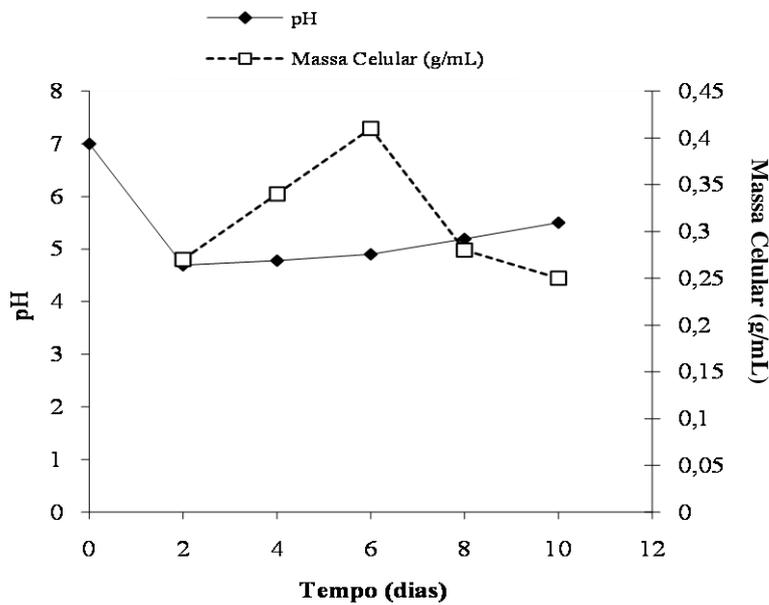


Figura 3. Variação do pH do meio de cultura e da massa celular (g/mL) produzida pelo endofítico *Xylaria* sp. (URM 6087) isolado de *Calotropis procera*, em função do tempo de incubação.

No quarto dia de incubação do endofítico *Xylaria* sp. (URM 6051), foi detectado o melhor halo de inibição contra *E. faecalis*. A atividade antibacteriana contra *E. coli*, ocorreu somente no sexto dia de incubação, período em que foi verificado o pico de produção micelial. Os melhores resultados de inibição de *S. pyogenes* e *S. typhi* ocorreram

no oitavo dia de fermentação, com halos de 34,83mm e 22,3mm, respectivamente. No décimo dia de incubação os líquidos fermentados do isolado *Xylaria* sp. (URM 6051) exibiram atividade somente contra *S. pyogenes*, a diminuição da capacidade antibacteriana pode estar relacionada a fase de morte celular verificada nesse período com a diminuição da produção de massa celular (Figura 2 e 3).

Com exceção do isolado *Xylaria* sp. (URM 6051), praticamente nenhum fungo endofítico repetiu o desempenho verificado na seleção em meio sólido. De acordo com Strobel *et al.* (2004), a quantidade e os tipos de compostos produzidos por fungos endofíticos são afetados pela temperatura, composição do meio e o grau de aeração em que os mesmos são cultivados. Portanto, o uso de outros meios de cultura com variação na temperatura, aeração e tempo de incubação seria necessário para avaliar a atividade dos isolados que não produziram compostos bioativos durante a fermentação. Owen e Hundley (2004) ressaltam que *in vitro* um endofítico pode continuar a produzir o composto ou, em certas circunstâncias, após certo período de tempo, pode parar o processo químico, já que a produção de compostos bioativos sem dúvida é estimulada pela planta ou pelos efeitos causados pelo ambiente.

Considerações semelhantes foram realizadas por Schulz *et al.* (1995) ao estudarem a produção de metabólitos secundários de diferentes isolados endofíticos do gênero do fungo *Pezizula*, já que a síntese das diferentes substâncias estudadas foram dependentes da condição de cultivo. Por exemplo, um isolado de *Pezizula* quando cultivado em um pH constante e com manutenção de um alto nível de saturação de oxigênio, produziu substâncias diferentes que em cultivo em que esses parâmetros variaram. Os autores especulam ainda que a síntese dos metabólitos desse fungo é estimulada pela associação com o hospedeiro na competição com outros fungos para a sua manutenção naquele ambiente.

Radu e Kqueen (2002) ao estudarem o potencial antimicrobiano e antitumoral dos extratos brutos obtidos da fermentação líquida de fungos endofíticos isolados de várias plantas medicinais na Malásia, chegaram a conclusões aplicáveis a este estudo, tais como: os extratos brutos dos isolados endofíticos com positiva atividade biológica podem conter alta concentração de algum princípio ativo, apoiando-se a necessidade de pesquisas envolvendo o isolamento, purificação e caracterização dessa possível substância ativa; os endofíticos com baixa atividade antimicrobiana no bioensaio podem ter compostos ativos em pouca quantidade e/ou estes são mascarados pelas demais substâncias contidas no extrato bruto, mas que podem ser eficazes após purificadas; os extratos que não

apresentaram nenhuma atividade antimicrobiana podem ser ativos contra outros micro-organismos que não foram testados nesta pesquisa.

A partir deste trabalho verificou-se que a composição da comunidade de fungos endofíticos de *Calotropis procera* varia quantitativa e qualitativamente de acordo com tecido vegetal estudado, com preferência das leveduras pelo pedúnculo floral, tecido do qual, também isolou-se uma espécie de fungo filamentosos rara, *Monodisma fragilis*. A espécie dominante nas folhas de *C. procera* é *Guignardia bidwelli*, seguida pela levedura *Rhodotorula glutinis*. No pedúnculo floral, as leveduras são predominantes, sendo *Rhodotorula glutinis*, a espécie com maior frequência relativa de isolamento e a com maior frequência relativa do total de isolados obtidos na soma dos dois tecidos. A segunda espécie dominante foi a Levedura 1 seguida pela Levedura 2 e por *Cryptococcus laurentii*. Os fungos endofíticos de *C. procera* são bons produtores de substâncias antimicrobianas, principalmente atuando contra bactérias patogênicas, lançando novas perspectivas sobre o potencial biotecnológico dos mesmos e apoiando a necessidade de estudos posteriores visando a elucidação dos prováveis compostos bioativos produzidos por estes micro-organismos.

Agradecimentos

À CAPES e ao projeto “Coleções de Cultura de Micro-organismos Micoteca URM e UFPEDA da Universidade Federal de Pernambuco” financiado pela FINEP.

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A comunidade de fungos endofíticos associada a *Calotropis procera*, apresentou baixa taxa de colonização foliar em ambos os locais de coleta. No pedúnculo floral, a taxa de colonização, foi maior devido a contribuição das leveduras endofíticas isoladas.

O método de desinfestação superficial foi eficaz, permitindo o isolamento de diversos gêneros de fungos filamentosos e leveduras endofíticas, incluindo a espécie rara *Monodisma fragilis*.

Constatou-se a presença de espécies dominantes nos diferentes tecidos vegetais estudados, sendo as espécies de fungos filamentosos *Phaeoramularia calotropidis* e *Guignardia bidwellii* predominantes em folhas e a levedura *Rhodotorula glutinis* no pedúnculo floral de *C. procera*. As leveduras demonstraram preferência ao pedúnculo floral e; nos tecidos foliares predominou o isolamento de fungos filamentosos, sendo que cada área de coleta apresentou uma espécie dominante particular e apesar das diferenças metodológicas utilizadas em cada coleta, pode se inferir que a área em que a planta hospedeira se encontra pode modificar a comunidade endofítica.

A composição da comunidade de fungos endofíticos varia quantitativa e qualitativamente de acordo com tecido vegetal estudado (folha e pedúnculo floral) e a idade foliar. As folhas categorizadas como senescentes comportam uma maior densidade endofítica, verificando-se que o aumento da idade foliar influenciou no aumento da taxa de colonização e riqueza de táxons.

Calotropis procera apresentou vários fungos endofíticos capazes de inibir o crescimento das bactérias e fungos patogênicos em meio sólido, com a maioria dos isolados apresentando ação contra bactérias Gram-positivas *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*. Entre os fungos detectados como produtores de substâncias antimicrobianas, os isolados procedentes das folhas mais velhas foram os que apresentaram maiores halos de inibição do crescimento dos micro-organismos teste. Sendo verificado que a atividade antibacteriana foi mais intensa do que a atividade antifúngica neste estudo.

A metodologia aplicada no ensaio fermentativo, não foi totalmente eficaz já que poucos fungos endofíticos repetiram o desempenho da seleção em meio sólido. Parâmetros como meio de cultura, agitação e tempo de fermentação interferiram na produção do metabólito bioativo. O endofítico *Xylaria* sp. (URM 6051) apresentou os melhores resultados no ensaio fermentativo, atuando contra as bactérias: *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*. Estudos complementares

devem ser realizados submetendo os fungos endofíticos a outros métodos de cultivo, com meios de culturas compostos por diferentes fontes de carbono e nitrogênio na tentativa de estimular a produção de substâncias bioativas eficazes contra micro-organismos patogênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbassi, K., Atay-Kadiri, Z., Ghaout, S. 2003. Biological effects of alkaloids extracted from three plants of Moroccan arid areas on the desert locust. *Physiological Entomology* 28(3): 232-236.
- Ahlholm, J., Helander, M.L., Elamo, P., Saloniemi, I., Neuvonen, S., Hanhimäki, S., Saikkonen, K. 2002. Micro-fungi and invertebrate herbivores on birch trees: fungal mediated plant–herbivore interactions or responses to host quality? *Ecology Letters* 5: 648–655.
- Ahmad, K.F., Sultana, N. 2003. Studies on bioassay directed antifungal activity of medicinal plants *Calotropis procera*, *Skimmia laureola*, *Peltophorum pterocarpum* and two pure natural compounds ulopterol and 4-methoxy-1-methyl-3-(2' S-hydroxy-3'-ene butyl)-2-quinolone. *Journal of the Chemical Society of Pakistan* 25(4): 328-330.
- Ahmed, U.A.M., Zuhua, S., Bashier, N.H.H., Muafi, K., Zhongping, H., Yuling, G. 2006. Evaluation of insecticidal potentialities of aqueous extracts from *Calotropis procera* Ait. against *Henosepilachna elaterii* Rossi. *Journal of Applied Sciences* 6(11): 2466-2470.
- 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.
- Arnold, A.E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* 21: 51-66.
- Arnold, A.E., Herre, E.A. 2003. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* 95: 388-398.
- Arnold, A.E., Maynard, Z., Gilbert, G.S. 2001. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycological Research* 105: 1502-1507.
- Arnold, A.E., Mejia, L.C., Kylo, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N., Herre, E.A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:15649-15654.
- Asres, K., Murthy, P.N., Djote, M. 1992. Antimicrobial Screening of *Calotropis Procera*, *Calpurnia aures* and *Melia azedarach* growing in Ethiopia. *Ethiopian Pharmaceutical Journal* 10(1): 43-49.
- Ayres, M., Ayres Jr., M., Ayres, D.L., Santos, A.A. *BioEstat – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas*. 2007. Versão 5.0. Disponível em: <http://www.mamiraua.org.br/download/index.php?dirpath=./BioEstat%205%20Portugues&order=0>. Acesso em: 20 julho 2009.
- Azevedo, J.L., Maccheroni Jr., W., Pereira, J.O, Araújo, W.L. de. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 3(1), 40-65. Disponível em: <<http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/4>>. Acesso em: 29 abril 2008.
- Azevedo, J.L., Serafine, L.A., Barros, N.M. 2002. Micro-organismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: Serafine, L.A., Barros N.M., Azevedo, J.L. (eds.)

- Biotecnologia: avanços na agricultura e na indústria*. Caxias do Sul, Editora da Universidade de Caxias do Sul, pp. 233-265.
- Barnett, J.A.; Payne, R.W.; Yarrow, D. 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Barreto, R.W., Evans, H.C., Pomella, A.W.V. 1999. Fungal pathogens of *Calotropis procera* (rubber bush), with two new records from Brazil. *Australasian Plant Pathology* 28(2): 126-130.
- Barros, F.E.V., Sousa, M.G.T., Costa, J.L., Olea, R.S.G., Freire, S.M.F., Borges, A.C.R., Borges, M.O.R. 2004. Avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico de *Calotropis procera* R. Br. (ciúme). *Infarma* 16(9-10): 60-64.
- 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.
- Bokhary, H.A., Al-Sohaibany, S., Al-Sadoon, Q.H., Parvez, S. 2000. Fungi associated with *Calotropis procera* and *Capparis spinosa* leaves. *Journal of King Saud University* 12: 11-23.
- Bussaban, B., Lumyong, S., Lumyong, P., Hyde, K.D., McKenzie, E.H.C. 2003. Three new species of *Pyricularia* are isolated as zingiberaceous endophytes from Thailand. *Mycologia* 95(3): 519-524.
- Cafêu, M.C., Silva, G.H., Teles, H.L., Bolzani, V. da S., Araújo, Â.R. 2005. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Química Nova*, 28(6): 991-995.
- Camatti-Sartori, V., Silva-Ribeiro, R.T., Valdebenito-Sanhueza, R.M., Pagnocca, F.C., Echeverrigaray, S., Azevedo, J.L. 2005. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. *Journal of Basic Microbiology* 45: 397-402.
- Cannon, P.F., Simmons, C.M. 2002. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia* 94: 210-220.
- Carmichael, J.W., Kendrick, W.B., Connors, I.L., Singler, L. 1980. *Genera of Hyphomycetes*. Canada: University of Alberta Press.
- Carroll, G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69(1): 2-9.
- 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.
- Ch, M.I., Khan, M.A., Hanif, W. 2006. Ethno veterinary medicinal uses of plants from Samahni Valley Dist. Bhimber, (Azad Kashmir) Pakistan. *Asian Journal of Plant Sciences* 5(2): 390-396.
- Choedon, T., Mathan, G., Arya, S., Kumar, V. L., Kumar, V. 2006. Anticancer and cytotoxic properties of the latex of *Calotropis procera* in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 12(16): 2517-2522.
- Coley, P.D., Barone J.A. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Reviews Ecology Systematic* 27: 305-335.

- Coley, P.D. 1988. Effects of plant growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore defense. *Oecologia* 74: 531-536.
- Costa, L.L., Fernandes, F.H., Silva, R. P. da, Zucchi, M.R. 2005. Estudos etnobotânicos de plantas medicinais em campos cerrados de Ipameri (GO). Disponível em:< http://www.prp.ueg.br/06v1/conteudo/pesquisa/inicci/en/eventos/sic2005/arquivos/biologicas/estudo_etnobotanicos.pdf >. Acesso em: 24 jun. 2009.
- Dewan, S., San Graula, H., Kumar, V.L. 2000. Preliminary studies on the analgesic activity of latex *Calotropis procera*. *Journal Ethnopharmacology* 73(1-2): 307-311.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T. 1993. *Compendium of soil fungi*. San Francisco: IHW – Verlag.
- Ellis, M.B. *Dematiaceous Hyphomycetes*. 1971. Kew: Commonwealth Mycological Institute.
- Ellis, M.B. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. 1976. Kew: Commonwealth Mycological Institute.
- Esteves, D., Soares, N.R., Santos, M.P. dos, Oki, Y., Fernandes, G.W. 2007. Fungos endofíticos como mediadores na relação entre *Baccharis dracunculifolia* e herbívoros no Parque Nacional da Serra do Cipó, MG. In: *Congresso de Ecologia do Brasil, 8. Anais...* Caxambu-MG: Sociedade de Ecologia do Brasil, 2007.
- Ferreira, M.B. Distrito Federal e Goiás sob ameaça de invasora *Calotropis procera* (Ait.). 1973. *Revista Brasileira do Cerrado* [S.I.] 21(1): 20-22.
- Francis, J.K. Wildland shrubs of the United States and its territories: thamnisc descriptions. International Institute of Tropical Florest. U.S. Department of Agriculture. *Florest service*. Disponível em: <[www.fs.fed.us/global/iitf/wildland shrubs.htm](http://www.fs.fed.us/global/iitf/wildland_shrubs.htm)>. Acesso em: 24 junho 2009.
- Freire, F.C.O., Braun, U. 2009. Hifomicetos cercosporoides associados a plantas do Estado do Ceará. *Revista Ciência Agrônômica* 40(1): 150-156.
- Frohlich, J., Hyde, K.D., Petrini, O. 2000. Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research* 104 (10): 1202-1212.
- Gallegos-Olea, R.S., Borges, M.O.R., Borges, A.C.R., Freire, S.M.F., Silveira, L.M.S., Vilegas, W., Rodrigues, C.M., Oliveira, A.V., Costa, J.L. 2008. Flavonóides de *Calotropis procera* R. Br. (Asclepiadaceae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 10(1): 29-33.
- Gamboa, M.A., Bayman, P. 2001. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). *Biotropica* 33(2): 352-360.
- Gond, S.K.; Verma, V.C.; Kumar, A. 2007. Study of endophytic fungal community from different parts of *Argle marmelos* Corraeae (Rutaceae) from Varanasi (India). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1371-1375.
- Guo, L.D., Hyde, K.D. and Liew, E.C.Y. 1998. A method to promote sporulation in palm endophytic fungi. *Fungal Diversity* 1: 109-113.
- Hassan, S.W., Bilbis, F.L., Ladan, M.J., Umar, R., Dangoggo, S.M., Saidu, Y., Abubakar, M.K., Faruk, U.Z. 2006. Evaluation of antifungal activity and phytochemical analysis of leaves, roots and stem barks extracts of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(14): 2624-2629.

- Hawksworth, D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105(12): 1422-1432.
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Hyde, K.D., Corke, H., Sun, M. 2007. Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1253–1263.
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Hyde, K.D., Corke, H., Sun, M. 2008. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity* 33: 61-75.
- 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 Microbiol*, 16: 218-224.
- Iqbal, Z., Lateef, M., Jabbar, A., Muhammad, G., Khan, M.N. 2005. Anthelmintic activity of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. flowers in sheep. *Journal of Ethnopharmacology* 102(2): 256-261.
- INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. Estação Meteorológica do Recife. Disponível em:<<http://www.inmet.gov.br>>. Acesso em: 15 outubro 2009.
- Kamath, J.V., Rana, A.C. 2002. Preliminary study on antifertility activity of *Calotropis procera* roots in female rats. *Fitoterapia* 73: 111-115.
- Kareem, S.O., Akpan, I., Ojo, O.P. 2008. Antimicrobial activities of *Calotropis procera* on selected pathogenic microorganisms. *African Journal of Biomedical Research* 11: 105-110.
- Khaled, A., El-Tarabily, K.A., Sivasithamparam, K. 2006. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience* 47: 25–35.
- Khan, R., Shahzad, S., Choudhary, M.I., Khan, S.A., Ahmad, A. 2007. Biodiversity of the endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. *Pakistan Journal of Botany* 39(6): 2233-2239.
- 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.
- Kissmann, K.G., Groth, D. 1999. *Plantas infestantes e nocivas*. Vol. 2. 2ª edição. São Paulo, Editora BASF.
- Kumar, H.S., Dewan, S., Sangraula, H., Kumar, V.L. 2001. Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. *Journal Ethnopharmacology* 76: 115-118.
- Kumar, V.L., Basu, N. 1994. Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera*. *Journal Ethnopharmacology* 44(2): 123-125.
- Kuta, F.A. 2008. Antifungal effect of *Calotropis procera* stem bark on *Epidermophyton flocosum* and *Trichophyton gypseum*. *African Journal of Biotechnology* 7(13): 2116-2118.
- Lacaz, C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Heins-Vaccari, E.M., Melo, N.T. 2002. *Tratado de Micologia Médica*. 9ª edição. São Paulo, Sarvier.

- Lana, T.G. 2004. Caracterização genética e fisiológica de *Crinipellis pernicioso*. Tese (Doutorado: Microbiologia Agrícola), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 91p.
- Landell, M.F., Mautone, J.N., Valente, P. 2006. Biodiversity of yeasts associated to bromeliads in Itapuã park, Viamão/RS. *Biociências* 14(2): 144-149.
- Larhsini, M., Oumouid, L., Lazrek, H.B., Wataleb, S., Bousaid, M., Bekkouche, K., Jana, M. 2001. Antibacterial activity of some Moroccan medicinal plants. *Phytotherapy Research* 3: 250-252.
- Larran, S., Mônaco, C., Alippi, H.E. 2001. Endophytic fungi in leaves of *Lycopersicon esculentum* Mill. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 17: 181-184.
- Larran, S., Perello, A., Simon, M.R., Moreno, V. 2002. Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 683-686.
- 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.
- Lin, X., Lu, C., Huang, Y., Zheng, Z., Su, W., Shen, Y. 2007. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1037-1040.
- Liu, C. H.; Zou, W. X.; Lu, H.; Tan, R. X. 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology* 88: 277-282.
- Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. 2002. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo, Instituto Plantarum.
- Maheshwari, R. 2006. What is an endophytic fungus? *Current Science* 90(10): 1309.
- Melo, M. M.; Vaz, F. A.; Gonçalves, L. C.; Saturnino, H. M. 2001. Estudo fitoquímico da *Calotropis procera* Ait., sua utilização na alimentação de caprinos: efeitos clínicos e bioquímicos séricos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 2(1): 15-20.
- Mossa, J.S., Tariq, M., Mohsin, A., Ageel, A.M., Al-Yahya, M.A., Al-Said, M.S., Rafatullah, S. 1991. Pharmacological studies on aerial parts of *Calotropis procera*. *American Journal of Chinese Medicine* 19(3-4): 223-231.
- Owen, N.L., Hundley, N. 2004. Endophytes – the chemical synthesizers inside plants. *Science Progress* 87(2): 79-99.
- Peixoto-Neto, P.A.S., Azevedo, J.L. de, Caetano, L.C. 2004. Micro-organismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. *Boletim Latinoamericano y del Caribe Del Plantas Medicinales y Aromáticas - BLACPMA* 3 (4): 69-72.
- Peixoto-Neto, P.A.S.; Azevedo, J.L.; Araújo, W.L. 2002. Micro-organismos endofíticos. *Biociência e Desenvolvimento* 29, ver pagina. Disponível em: <<http://www.biociencia.com.br/revista/bio29/micro.asp>>. Acesso em: 14 nov. 2008.
- Petrini O. 1991. Fungal endophyte of tree leaves. In: Andrews J., Hirano S.S. (eds.). *Microbial ecology of leaves*, New York, Springer Verlag, pp. 179-197.

- Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., Rukachaisirikul, V., Sakayaroj, J. 2006. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *FEMS Immunology ; Medical Microbiology* 48: 367–372.
- Pimentel, I.C., Kuczkowski, F.R., Chime, M.A., Auer, C.G., Grigoletti Junior, A. 2006. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). *Floresta* 36(1): 123-128.
- Pirttilä, A. M., Pospiech, H., Laukkanen, H., Myllylä, R., Hohtola, A. 2003. Two endophytic fungi in different tissues of scots pine buds (*Pinus sylvestris* L.). *Microbial Ecology* 45(1): 53-62.
- 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: 1508-1513.
- 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.
- Ramos, M.V., Bandeira, G.P., Freitas, D.T., Nogueira, N.A.P., Alencar, N.M.N., Sousa, P.A.S., Carvalho, A.F.U. 2006. Latex constituents from *Calotropis procera* (R. Br.) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn.). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101(5): 503-510.
- Raper, K.B., Thom, C. *A manual of the Penicillia*. 1949. Baltimore: The Williams & Wilkins Company.
- Rodrigues, W.C. *DivEs - Diversidade de espécies*. 2005. Versão 2.0. Software e Guia do Usuário. Disponível em: <<http://www.ebras.bio.br>>. Acesso em: 10 maio 2007.
- Rodriguez, 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.
- SAF - Secretaria da agricultura familiar, Ministério do Desenvolvimento Agrário. Doenças agrícolas. Disponível em: <<http://www.mda.gov.br/saf/arquivos/0806509627.pdf>>. Acesso em: 20 junho 2008.
- Saikkonen, K., Faeth, S.H., Helander, M., Sullivan, T.J. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Reviews Ecology ; Systematic* 29: 319–343.
- Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M., Faeth, S.H. 2004. Evolution of endophyte–plant symbioses. *TRENDS in Plant Science* 9(6): 275-280.
- Schulz, B., Boyle, C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research* 109(06): 661-686.
- Schulz B., Sucker, J., Aust, H. J., Krohn, K., Ludewig, K., Jones, P. G., Doring, D. 1995. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezicula* species. *Mycological Research* 99(8): 1007-1015.
- Sehgal, R., Arya, S., Kumar V.L. 2005. Inhibitory effect of extracts of latex of *Calotropis procera* against *Candida albicans*: a preliminary study. *Indian Journal Pharmacology* 37(5): 334-335.

- Sharma, N., Trivedi, P.C. 2002. Screening of leaf extracts of some plants for their nematocidal and fungicidal properties against *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum*. *Asian Journal of Experimental Sciences* 16(1-2): 21-28.
- Sidrim, J.J.C.; Moreira, J.L.B. 1999. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Silva, F. de A.S. *Assistat - Assistência estatística*. 2007. Versão 7.4 beta. UAEA-CTRN-UFMG Campina Grande-PB. Disponível em: <<http://assistat.sites.uol.com.br>>. Acesso em: 20 abril 2007.
- Siqueira, M. V., Braun, U., Souza-Motta, C. M. 2008. *Corynespora subcylindrica* sp. nov. - a new hyphomycete species from Brazil and a discussion on the taxonomy of corynespora-like genera. *Sydowia* 60(1): 113-122.
- Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreans* an endophytic fungus of pacific yew. *Science* 260:214-216.
- Strobel, G., Daisy, B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(04): 491-502.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. 2004. Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products* 67(2): 257-268.
- Strobel, G.A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection* 5: 535-544.
- Suryanarayanan, T.S., Senthilarasu, G., Muruganandam, V. 2000. Endophytic fungi from *Cuscuta rejlexa* and its host plants. *Fungal Diversity* 4: 117-123.
- Suryanarayanan, T.S., Thennarasan, S. 2004. Temporal variation in endophyte assemblages of *Plumeria rubra* leaves. *Fungal Diversity* 15: 197-204.
- Suryanarayanan, T.S., Venkatesan G., Murali, T.S. 2003. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. *Current Science* 85(4): 489-493.
- Suryanarayanan, T.S., Vijaykrishna, D. 2001. Fungal endophytes of aerial roots of *Ficus benghalensis*. *Fungal Diversity* 8: 155-161.
- Sutton, B.C. *The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. 1980. Kew: Commonwealth Mycological Institute.
- Taiz, L., Zeiger, E. *Fisiologia vegetal*. 2009. 2.ed. Porto Alegre, Artmed.
- Tejesvi, V.M., Mahesh, B., Nalini, M.S., Prakash, H.S., 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.
- Ulhôa, N., Fernandes, G.W., Almeida-Cortez, J. 2007. Uma Estranha na Paisagem. *Ciência Hoje* 41(241): 70-72.
- Yesmin, M.N., Uddin, S.N., Mubassara, S., Akond, M.A. 2008. Antioxidant and antibacterial activities of *Calotropis procera* Linn. *American-Eurasian Journal of Agricultural ; Environmental Sciences* 4(5): 550-553.
- Zhang, C., Liu, S., Lin, F., Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S. 2007. *Trichoderma taxi* sp.nov., an endophytic fungus from Chinese yew *Taxus mairei*. *FEMS Microbiology Letters* 270: 90-96.

- Zhang, P., Zhou, P., Yu, L. 2009a. An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Current Microbiology* 59: 227–232.
- Zhang, P., Zhou, P., Yu, L. 2009b. An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Aspergillus candidus* MD3. *FEMS Microbiology Letters* 293: 155-159.
- 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.
- Zou, W.X., Meng, J.C., Lu, H., Chen, G.X., Shi, G.X., Zhang, T.Y., Tan, R.X. 2000. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *Journal of Natural Products* 63: 1529-1530.