

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Pós-Graduação em Ciências Biológicas

FLÁVIO SANTOS BOMFIM

DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS EM PLANTAS MEDICINAIS

RECIFE
2014

FLÁVIO SANTOS BOMFIM

DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS EM PLANTAS MEDICINAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Microbiologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dra. Leonor Costa Maia

RECIFE
2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Bomfim, Flávio Santos

**Diversidade de leveduras endofíticas em plantas medicinais. / Recife:
O Autor, 2014.**

53 folhas: tab.

Orientadora: Leonor Costa Maia

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biociências. Ciências Biológicas, 2014.**

Inclui referências

**1. Fungos 2. Plantas medicinais 3. Diversidade biológica I. Maia, Leonor
Costa (orient.) II. Título**

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 481

FLÁVIO SANTOS BOMFIM

DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS EM PLANTAS MEDICINAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Microbiologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 20/02/2014.

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Prof^a. Dra. Leonor Costa Maia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Maria Auxiliadora Cavalcanti
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. João Lúcio Azevedo
Universidade de São Paulo

MEMBROS SUPLENTE

Prof^a Dra. Rejane Pereira Neves
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dra. Vera Menezes
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela paz e tranquilidade nos momentos necessários. À minha mãe, Maria Dulceleide Bomfim, pela segurança passada na hora de incertezas, fazendo acreditar que tudo vai dar certo e sempre estando ao meu lado. Ao meu Pai de criação, José Paulo Nascimento, por estar sempre nos momentos que precisei me fazendo crer também que tudo daria certo.

Ao meu Pai, Aroaldo Santos Bomfim, por estar sempre na torcida por minha vitória. Aos meus irmãos, Waldison Santos, Gledston Santos, Adriana Santos e, à mais nova Viviane Santos, por estarem presentes na minha caminhada, sempre me apoiando.

À minha Co- Orientadora Prof^a Dra. Rejane Pereira Neves, por me receber como um filho, sempre presente nos momentos que precisei, pela competência em transmitir com sabedoria os conhecimentos que fundamentaram essa dissertação e pelo estímulo e confiança depositados em mim.

À minha Orientadora Prof^a. Dra. Leonor Costa Maia, por me aceitar e me passar um pouco dos seus conhecimentos. A Jadson Bezerra, por está sempre ao meu lado me passando seus conhecimentos, por ter contribuído principalmente com a realização desta dissertação e artigo, onde trabalhamos juntos, contribuindo com a apresentação desta dissertação, sempre estando em todos os momentos da minha caminhada e fazendo o papel de irmão.

À Prof^a. Dra. Oliane Correia Magalhães, por me dar muitos conselhos bons, estando presente em todas as minhas decisões, passando seu conhecimento e sempre estando nos momentos que mais precisei.

Ao Prof. Dr. Armando Mardens Lacerda Filho, por estar presente nesta minha caminhada e colaborando com o seu conhecimento.

Ao técnico Rubens Celso de Moraes, por ter paciência comigo, colaborando com as minhas idéias e sempre passando sabedoria.

Às secretárias, Maria de Lurdes e Adenilda Eugenia, sempre me aconselhando e presentes na minha caminhada. Aos meus amigos do Departamento de Micologia, Adriana Ferreira, Mário Negreiros, Renan Barbosa e Elvislene Silva, pelas conversas, ensinamentos e idéias trocadas.

Ao técnico João Santos, do Herbário da UFPE, companheiro de coletas, sempre com boa vontade para ajudar. À Profª. Janete Silva Teixeira, do Herbário da UFPE, passando confiança e conhecimentos para complementar esta dissertação.

Obrigado!!

RESUMO

Fungos endofíticos vivem em tecidos sadios de plantas, sem causar danos ao hospedeiro, e podem promover tolerância das espécies a diversos estresses ambientais. Muitas plantas medicinais têm sido estudadas em relação à composição de fungos endofíticos, com a maioria dos relatos citando espécies filamentosas. Para testar a hipótese de que a presença de espécies de leveduras endofíticas também é relevante, foram analisadas folhas de duas espécies de plantas medicinais ocorrentes no Brasil *Schinus terebinthifolius*, conhecida popularmente como aroeira da praia e *Tabebuia impertiginosa*, denominada ipê roxo. Inicialmente foram testadas três metodologias de isolamento a fim de, se analisar a quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), a riqueza e a diversidade de leveduras endofíticas de folhas das plantas mencionadas, em períodos chuvoso (julho/2012) e seco (janeiro/2013). Coletaram-se 450 folhas sadias (jovens, medianas e adultas) sendo 180 de 10 indivíduos de aroeira da praia e 270 folhas de 15 indivíduos de ipê roxo, no Campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil (8°03'02.30"S e 34°56'54.41"O). As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos individuais, levadas ao laboratório, lavadas sequencialmente em etanol (70%), hipoclorito de sódio (2,5-3% de cloro ativo), etanol (70%) e água destilada esterilizada. Dos métodos testados, o de fragmentação e maceração das folhas em água esterilizada, foi o mais adequado. O líquido obtido foi diluído (1:10) e semeado, em triplicata, em placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar suplementado com 50 mg/L de cloranfenicol e actidione (0,5 mg/L). Para o controle de desinfestação, 1,1 ml da última água de lavagem foi semeado nas mesmas condições. As placas de Petri foram incubadas a 28°C e observadas durante 15 dias. Um total de 3.251 UFC foi obtido sendo 2.151 nas folhas jovens, 868 nas medianas e 231 nas adultas. Mais UFC foram obtidas no período chuvoso (1.870) em relação ao período seco (1.381). Leveduras do filo Basidiomycota foram os mais frequentes nas duas plantas estudadas, com destaque para *Rhodotorula glutinis*, cujo número de UFC foi igual ao de *Candida guilliermondii* (Ascomycota). Os valores dos índices indicaram que o período chuvoso e as folhas jovens são mais propícias para o estabelecimento de diversidades de leveduras endofíticas. Maior índice de diversidade de leveduras endofíticas nas folhas jovens, sugere que esses micro-organismos atuam durante o desenvolvimento foliar. A metodologia de maceração das folhas é indicada para isolar leveduras endofíticas; a variação temporal e o estado de desenvolvimento tecido vegetal influenciam a presença de leveduras nas duas plantas

medicinais estudadas. *Schinus terebinthifolius* possui um maior número, riqueza e diversidade de leveduras endofíticas, do que nas outras plantas estudadas.

Palavras-chave: ecologia de fungos, idade foliar, micobiota endofítica, mudança temporal

ABSTRACT

Endophytic fungi live in healthy plant tissues without causing harm to the host, and can promote tolerance of species to various environmental stresses. Many medicinal plants have been studied in relation to the composition of endophytic fungi, with most reports on filamentous species. To test the hypothesis that the presence of species of endophytic yeast is also relevant, leaves of two species occurring medicinal plants were analyzed in Brazil *Schinus terebinthifolius* popularly known as mastic beach and *impertiginosa* Tabebuia called ipe purple. Three methodologies to isolate the endophytic yeasts were tested in order to analyze the number of colony forming units (CFU), the richness and diversity of endophytic yeast young, medium and mature leaves collected in the rainy (July/2012) and dried (January/2013). We collected 450 healthy leaves (young, medium and mature) and 10 180 individuals mastic beach and 270 sheets of 15 individuals purple ipe, on the campus of the Federal University of Pernambuco (UFPe), Recife, Brazil (8°03'02.30 "S and 34°56'54.41 " W). The sheets were acondicionadas em individual plastic bags, brought to the laboratory, washed sequentially with ethanol (70%), sodium hypochlorite (2.5-3 % active chlorine), ethanol (70%) and sterile distilled water. The following were fragmented and macerated in sterile water. The liquid obtained was diluted (1:10) and seeded in triplicate in Petri plates containing Sabouraud Dextrose Agar culture supplemented with 50mg / L of chloramphenicol and actidione (0.5 mg / L). For pest control, 1.1 ml of the last wash water was seeded under the same conditions. The Petri dishes were incubated at 28° C for up to 15 days and observed daily. A total of 3,251 and 2,151 CFU was obtained in the young leaves, the medians 868 and 231 in adults. More UFC were obtained in the rainy season (1,870) over the dry season (1,381). Yeasts of the phylum Basidiomycota were the most frequent in the two plants studied, especially *Rhodotorula glutinis* which the number of CFU was equal to *Candida guilliermondii* (Ascomycota). The values of diversity indices indicated the rainy season and the young leaves as the most diverse. The highest diversity of endophytic yeasts was observed in young leaves, suggesting that these micro-organisms actively participate in leaf development and may contribute to the maintenance of the plants studied. The method of maceration of the leaves is suitable for the recovery of endophytic yeast, the temporal variation and age of plant tissue influence the number of CFU in both yeast studied medicinal plants. *Schinus terebinthifolius* has number of CFU and diversity of endophytic yeasts.

Keywords : ecology of fungi , leaf age , endophytic mycoflora , temporal change

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1: DEFINIÇÕES DO TERMO ENDÓFITO EM DIVERSOS ESTUDOS CIENTÍFICOS (ADAPTADO DE HYDE E SOYTONG, 2008).....	14
TABELA 2: FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE PLANTAS MEDICINAIS.....	17
TABELA 1: UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFC) DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE <i>S. TEREBINTHIFOLIUS</i> E DE <i>T. IMPERTIGINOSA</i> EM PERÍODOS CHUVOSO E SECO.....	43
TABELA 2: FREQUÊNCIA ABSOLUTA DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE FOLHAS DE DUAS PLANTAS MEDICINAIS BRASILEIRAS CRESCENDO EM DIFERENTES ESTAÇÕES	45
TABELA 3: IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS UTILIZANDO PARTES DA REGIÃO ITS DO RDNA.....	46
TABELA 4: COMPARAÇÕES DA DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DAS PLANTAS MEDICINAIS BRASILEIRAS <i>T. IMPERTIGINOSA</i> E <i>S. TEREBINTHIFOLIUS</i> OBTIDAS DE FOLHAS JOVENS (FJ), MEDIANAS (FM) E ADULTAS (FA) NO PERÍODO SECO E CHUVOSO.....	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.2 OBJETIVOS.....	12
1.2.1 Objetivo Geral.....	12
1.2.2 Objetivo Específico.....	12
1.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	12
1.3.1 Material vegetal.....	12
1.3.2 Isolamento de leveduras endofíticas.....	12
1.3.3 Identificação das leveduras.....	13
1.3.4 Análise dos dados.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Histórico e Conceitos.....	14
2.2 Biodiversidade.....	15
2.3 Interação hóspede e hospedeiro.....	22
2.4 Importância do estudo de fungos endofíticos.....	24
2.5 Plantas medicinais.....	24
2.5.1 <i>Tabebuia impetiginosa</i>	25
2.5.2 <i>Schinus terebinthifolius</i>	26
2.6 Leveduras endofíticas em plantas medicinais.....	26
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
5. ANEXO: ARTIGO A SER SUBMETIDO: Leveduras endofíticas de folhas das plantas medicinais brasileiras <i>Schinus terebinthifolius</i> e <i>Tabebuia impetiginosa</i>.....	39

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas de diversas maneiras e com diferentes tipos de propósitos, seja com partes inteiras ou sob a forma de preparos caseiros, com usos domésticos, religiosos, espirituais de cura, podendo ainda ser submetidas a sucessivos processos de extração e purificação, para isolamento das substâncias de interesse (Albuquerque et al., 2007). Esses hábitos e costumes são tão variados entre as populações, que não se pode mais duvidar da efetiva atuação das substâncias oriundas dos vegetais (Silva, 2004).

Bactérias e fungos são comumente encontrados no interior de tecidos de plantas sem causar quaisquer danos aparentes e esses organismos endofíticos podem contribuir para incrementar a produção de certos compostos produzidos pelos vegetais, daí o interesse em investigá-los em plantas medicinais.

As leveduras possuem diversos aspectos relevantes que tornam de grande importância o seu estudo; algumas espécies podem causar doenças em animais e plantas enquanto outras são biodegradadoras de produtos naturais ou utilizadas industrialmente na produção de bebidas, papel, pão, queijo entre outros produtos (Azevedo et al., 2002). Na maioria, os trabalhos tratam de fungos endofíticos filamentosos, sendo os estudos sobre o isolamento, a localização e a diversidade de leveduras endofíticas igualmente necessários para se esclarecer a relação ecológica desses micro-organismos com os respectivos hospedeiros (Gai et al., 2010).

O conhecimento sobre a diversidade de leveduras em plantas vem crescendo, sendo reconhecido que podem desempenhar como endófitos, funções relevantes para sanidade vegetal. Os efeitos benéficos da associação planta-endófito são muitos e esses micro-organismos vêm se tornando importante ferramenta para a agricultura moderna (Peixoto Neto et al., 2002). Os relatos sobre a diversidade de leveduras endofíticas, mostram que os gêneros mais comuns *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* e *Rhodotorula* (Chapela 1989; Taylor et al. 1999; Marcarthur & McGee 2000; Cao et al. 2002; Landell et al. 2006; Unterseher et al. 2007; Tadych et al. 2012; Vieira et al. 2012; Lima et al. 2013; Bezerra et al. 2013).

Do ponto de vista ecológico, a diversidade de leveduras endofíticas é extremamente importante. A sua relação com o hospedeiro pode minimizar o perigo de extinção de algumas espécies vegetais que são utilizadas para extração de produtos medicinais, garantindo assim a preservação destas e mantendo a produção de compostos que garantam a continuidade no tratamento de pessoas afetadas por inúmeras doenças. (Peixoto Neto et al., 2004). Diversos

métodos têm sido testados para isolar leveduras endofíticas com intuito não só de conhecer a diversidade mas de buscar novas ferramentas para o estudo do potencial biotecnológico desses micro-organismos (Chen et al., 2010).

Neste trabalho, testou-se a hipótese de que as plantas medicinais *S. terebinthifolius* e *T. impetiginosa* hospedam variada e representativa população de leveduras endofíticas. O estudo teve como objetivo verificar a riqueza e diversidade de espécies endofíticas presentes em folhas com diferentes idades de desenvolvimento das duas plantas mencionadas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Conhecer e avaliar a biodiversidade de leveduras endofíticas das plantas medicinais *Schinus terebinthifolius* e *Tabebuia impetiginosa*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Isolar e identificar ao nível de espécie leveduras endofíticas de aroeira-da-praia e ipê-roxo;
- b) Determinar a densidade, riqueza e equitabilidade das espécies de leveduras endofíticas de aroeira-da-praia e ipê-roxo;
- c) Contribuir para o conhecimento da diversidade de leveduras endofíticas de plantas medicinais do Brasil.

1.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

1.3.1 Material vegetal

Folhas sadias de *S. terebinthifolius* e *H. impetiginosus* foram coletadas no Campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil (8°03'02.30" S e 34°56'54.41" O) em junho de 2012 (período úmido) e em janeiro de 2013 (período seco). No total foram coletadas aleatoriamente 810 folhas (270 jovens, 270 medianas e 270 adultas) de 10 indivíduos de *S. terebinthifolius* e coletadas 1.215 folhas (405 jovens, 405 medianas e 405 adultas) de 15 indivíduos de *H. impetiginosus*. As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos, levadas para o laboratório, mantidas a 4°C, em refrigerador, e processadas em até 24h.

1.3.2 Isolamento de leveduras endofíticas

O material coletado foi primeiramente lavado em água corrente e detergente neutro. A assepsia das folhas foi conduzida como por Arnold et al. 2000 e Araújo et al. 2002. Brevemente, amostras foram desinfestadas em etanol 70% durante 1 min, hipoclorito de sódio (2-3% de cloro ativo) por 3 min, etanol 70% durante 1 minuto, e lavadas duas vezes em água destilada esterilizada por 1 min. Para verificação da eficácia da assepsia, 1 ml da última água de lavagem foi utilizada como controle.

Após a assepsia, as folhas foram processadas para isolamento de leveduras endofíticas testando-se os métodos: para cada um foram utilizadas 270 folhas de *S. terebinthifolius* e 405 folhas de *H. impetiginosus*. Método 1- (Landell et al. 2006): as folhas foram maceradas e 0,1 mL do líquido da maceração foi espalhado em placas de Petri contendo o meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) suplementado com 400 mg/L de cloranfenicol e 1,0 mg/L de actidione para suprimir o crescimento bacteriano e de fungos filamentosos, respectivamente. Método 2- (Laranjeiras et al. 2014): fragmentos de cerca de 1 cm² foram retirados das folhas e transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de água destilada esterilizada adicionada de cloranfenicol (50 mg/L). Os tubos foram submetidos a banho de ultra-som/sonicador por 15 minutos e 1 mL da água foi transferido para outro tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada esterilizada adicionada de cloranfenicol (50 mg/L) e homogeneizada em vortex por cerca de 1 min. Após a homogeneização, 100 µL foram colocados na superfície do meio de cultura SDA contido em placa de Petri. Para a distribuição homogênea da água na superfície do meio de cultura foi utilizada alça de Drigalski. Método 3- (Araújo et al. 2002): discos de 6 mm foram retirados de cada folha e transferidos assepticamente para a superfície do meio de cultura SDA em placa de Petri. Todas as placas foram incubadas a 25±2°C por até 7 dias. Após o crescimento das colônias, as leveduras foram purificadas em meio Agar YEPG (0.5% Extrato de levedura, 2% dextrose, 1% peptona, e 2% Ágar) e armazenadas para posterior identificação.

1.3.3 Identificação das leveduras

Para identificação das leveduras, foram observadas as características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas utilizando literatura especializada (Barnett et al., 2000; de Hoog et al., 2000; Lacaz et al., 2002; Bhagat et al., 2012). Após a identificação clássica, amostras

foram selecionadas para identificação molecular utilizando parte da região ITS do rDNA (Góes-Neto et al., 2002).

Culturas representativas das leveduras identificadas estão depositadas na Micoteca URM (WCDM 604) da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

1.3.4 Análise dos dados

Os índices de diversidade de Shannon-Wiener e Fisher α e a diversidade de Simpson de cada estágio temporal e das folhas em diferentes idades de crescimento foram calculados usando o software PAST 1.7 (Hammer et al., 2001).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico e Conceitos

O estudo de endófitos teve início no século XIX sendo estes micro-organismos diferenciados dos fitopatógenos por de Bary (1866). Contudo, apenas no século XX, no final da década de 70, os endófitos foram reconhecidos como importantes componentes da microbiota, após ser verificada a capacidade de proteção dada às plantas frente ao ataque de insetos, de herbívoros e de outro micro-organismo, desde então foi demonstrado a interação simbiótica com o hospedeiro (Azevedo et al., 2002). Atualmente, os endofíticos são destacados como benéficos para os hospedeiros que colonizam, podendo representar valiosa fonte de compostos bioativos (Vieira et al., 2012).

Segundo Azevedo et al. (2000), os primeiros estudos relacionados com o isolamento de fungos endofíticos em plantas tropicais são os de Petrini e Dreyfuss (1981). No entanto, os endófitos foram primeiramente conceituados por Carroll (1986), que os descreveu como micro-organismos mutualísticos que colonizam partes dos tecidos do hospedeiro sem causar doenças. Ao longo dos anos, novos conceitos foram propostos para designar esse importante grupo de micro-organismo (Tabela 1).

Tabela 1: Definições do termo endófito em diversos estudos científicos (adaptado de Hyde e Soyong, 2008).

Definições	Referência bibliográfica
“Fungos que colonizam partes de tecidos de plantas vivas e não causam sintomas de doenças”	Carroll, 1986
“Fungos que formam inaparente infecção dentro de folhas e caules de plantas saudáveis”	Carroll, 1988
“Organismos que vivem no interior das plantas sem causar dano aparente ao seu hospedeiro”	Petrini, 1991
“Fungos colonizadores de tecidos internos vivos de suas plantas hospedeiras”	Rollinger e Langenheim, 1993
“Grupo que coloniza os tecidos internos das plantas vivas sem causar qualquer efeito negativo imediato”	Hirsch e Braun, 1992
“Qualquer fungo isolado de tecidos assintomáticos internos da planta”	Cabral et al., 1993
“Fungos e bactérias que tem todo ou uma parte do ciclo de vida dentro de tecidos de plantas vivas e causam infecções inaparentes ou assintomáticas inteiramente dentro de tecidos vegetais, mas não causam sintomas de doenças”	Wilson, 1995
“Micro-organismos que habitam o interior das plantas, sendo encontradas em folhas, ramos, raízes e sementes, sem produzir estruturas externas visíveis e sem causar doenças”	Azevedo et al., 2000
“Endófitos verdadeiros – cuja colonização nunca resulta em sintomas visíveis de doenças”	Mostert et al., 2000
“Fungos que colonizam a planta sem causar sintomas de doenças visíveis em qualquer momento específico”	Schulz e Boyle, 2005
“Micro-organismos que podem ou não crescer em meio de cultura e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar danos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais”	Azevedo e Araújo, 2007

Arnold et al. (2000) relatam que os primeiros trabalhos com fungos endofíticos foram realizados há mais de seis décadas, destacando-se nas regiões temperadas e tropicais úmidas, onde uma grande riqueza de espécies de fungos foi encontrada. Com o aumento no número de estudos, outras informações a respeito de endófitos vêm surgindo, contribuindo para melhor entendimento da associação e seus benefícios e para maior conhecimento da diversidade envolvida (Araújo et al., 2001).

2.2 Biodiversidade

A estimável biodiversidade, sobretudo em regiões tropicais, pode representar inúmeras espécies de micro-organismos ainda a serem descobertos. Tem sido sugerido que uma planta pode ser habitada por cerca de seis espécies de fungos, com a inclusão de fungos endofíticos, estima-se que aproximadamente 33 espécies de fungos podem ser encontradas em cada planta (Dreyfuss e Chapela, 1994; Hawksworth e Rossman 1997; Arnold et al. 2000).

Gai et al. (2009), afirmam que existem cerca de 300 mil espécies de plantas no mundo e poucos estudos foram realizados sobre a associação com fungos endofíticos. De acordo com o *Dictionary of Fungi* (Kirk et al., 2008), cerca 80-120 mil espécies de fungos foram descritas. Se a estimativa da diversidade de fungos estiver diretamente relacionada com o número de espécies de plantas, devem existir muito mais espécies de fungos vivendo como endófitos que até o momento não foram descritas.

Azevedo et al.(2000), relatam que as plantas tropicais possuem uma grande diversidade de micro-organismos endofíticos. No entanto, muitos não foram classificados e, possivelmente, pertencem a novos táxons. Ainda, segundo Azevedo et al. (2002), quando se considera a idade do tecido vegetal, as folhas jovens têm maior diversidade de fungos endofíticos do que as folhas velhas. Para Strobel e Daisy (2003), pelo menos uma espécie tem demonstrado ser específica para cada vegetal estudado, confirmando a possibilidade de que a diversidade de endófitos é um componente importante da diversidade fúngica global. Como destacado por Stone et al. (2004), são necessárias pesquisas para fornecer informações, mais concretas sobre a distribuição global desses micro-organismos e sua diversidade.

As espécies de fungos comumente relatadas como endófitos de várias plantas pertencem aos generos *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Podospora*, *Xylaria*, *Penicillium* e *Trichoderma* (Xing et al., 2011; Chen et al., 2011). A maioria dos estudos sobre fungos endofíticos relata o isolamento freqüente de fungos filamentosos e

raramente de leveduras a exemplo dos gêneros *Rhodotorula*, *Debaryomyces* e *Cryptococcus* (Gai et al. 2009; Flor et al. 2011; Vieira et al. 2012) alguns desses estão associados a plantas medicinais (Tabela 2).

Tabela 2: Gênero de endofíticos isolados de plantas medicinais.

Fungo endofítico	Planta medicinal	País	Referência
<i>Acremonium</i>	<i>Dendrobium</i> spp., <i>Holcus lanatus</i>	China, Espanha	Chen et al. (2011); Márquez et al.(2010); Xing et al.(2011)
<i>Alternaria</i>	<i>Adenocalymma alliaceum</i> , <i>Dendrobium</i> spp., <i>Holcus lanatus</i> , <i>Sapindus saponaria</i>	China, Brasil, Espanha, Índia,	Chen et al. (2011); Cui et al. (2011); García et al.(2012); Kharwar et al. (2011); Márquez et al.(2010)
<i>Ampelomyces</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al. (2011)
<i>Arthrinium</i>	<i>Dendrobium</i> spp., <i>Holcus lanatus</i>	China, Espanha	Chen et al. (2011); Márquez et al.(2010); Xing et al.(2011)
<i>Aspergillus</i>	<i>Adenocalymma alliaceum</i> , <i>Holcus lanatus</i>	Índia, Espanha	Kharwar et al. (2011); Márquez et al.(2010)
<i>Aureobasidium</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al., 2011.
<i>Bionectria</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al., 2011.
<i>Botryosphaeria</i>	<i>Camptotheca acuminata</i>	China	Ding et al., 2013.
<i>Candida</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al., 2011.
<i>Ceratobasidium</i>	<i>Echinacea purpurea</i>	Brasil	Rosa et al., 2012.
<i>Cercophora</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al., 2011.
<i>Chaetomella</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al., 2011.

<i>Chaetomium</i>	<i>Dendrobium</i> spp., <i>Aquilaria</i> spp., <i>Adenocalymma alliaceum</i> , <i>Forsítia</i> spp., <i>Rhus potanini</i> , <i>Populus tremula</i> , <i>Holcus lanatus</i>	Espanha, China, Índia, Suécia	Benedicte et al.(2010); Chen et al. (2011); Cui et al. (2011); Kharwar et al. (2011); Márquez et al.(2010); Sun et al.(2008)
<i>Chaetophoma</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al., 2011.
<i>Cladosporium</i>	<i>Dendrobium</i> spp., <i>Aquilaria</i> spp., <i>Eucommia ulmoide</i> , <i>Holcus lanatus</i> , <i>Echinacea purpúrea</i> ,	Brasil, China, Espanha	Chen et al. (2011); Cui et al. (2011); Márquez et al.(2010); Rosa et al.(2012); Sun et al.(2008); Xing et al.(2011)
<i>Cochliobolus</i>	<i>Sapindus saponaria</i>	Brasil	García et al., 2012.
<i>Colletotrichum</i>	<i>Dendrobium</i> spp., <i>Vernonia condensata</i> , <i>Cymbopogon nardus</i> , <i>Punica granatum</i> , <i>Morus nigra</i> , <i>Bauhinia forficata</i> , <i>Holcus lanatus</i> , <i>Echinacea purpúrea</i>	China, Brasil, Espanha	Chen et al. (2011); Dias et al.(2012); Márquez et al.(2010); Rosa et al.(2012)
<i>Coniothyrium</i>	<i>Aquilaria</i> spp.	China	Cui et al., 2011.
<i>Curvularia</i>	<i>Adenocalymma alliaceum</i> , <i>Berberis poiretii</i> , <i>Holcus lanatus</i> , <i>Sapindus saponaria</i>	Brasil, China, Espanha, Índia,	García et al.(2012); Kharwar et al. (2011); Márquez et al.(2010);Sun et al.(2008)
<i>Davidiella</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al., 2011.
<i>Diaporthe</i> ,	<i>Sapindus saponaria</i> , <i>Camptotheca acuminata</i>	Brasil, China	Ding et al.(2013); García et al.(2012)
<i>Discula</i>	<i>Holcus lanatus</i>	Espanha	Márquez et

			al., 2010.
<i>Epichloe</i>	<i>Holcus lanatus</i>	Espanha	Márquez et al., 2010.
<i>Epicoccum</i>	<i>Aquilaria</i> spp., <i>Forsitia</i> spp., <i>Populus tremula</i> , <i>Holcus lanatus</i> , <i>Camptotheca acuminata</i>	China, Espanha, Suécia	Benedicte et al.(2010);Cui et al. (2011); Ding et al.(2013); Márquez et al.(2010); Sun et al.(2008)
<i>Fusarium</i>	<i>Dendrobium</i> spp., <i>Cymbopogon citrates</i> , <i>Aquilaria</i> spp., <i>Adenocalymma alliaceum</i> , <i>Holcus lanatus</i> , <i>Echinacea purpurea</i> ,	Brasil, China, Espanha, India	Chen et al. (2011); Cui et al. (2011); Dias et al.(2012); Ding et al.(2013); Kharwar et al. (2011); Márquez et al.(2010); Rosa et al.(2012); Xing et al. (2011)
<i>Fusicoccum</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al., 2011.
<i>Glomerularia</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al., 2011.
<i>Glomerella</i>	<i>Morus nigra</i> , <i>Dendrobium</i> spp., <i>Echinacea purpurea</i>	Brasil, China	Dias et al.(2012); Rosa et al.(2012) Xing et al. (2011)
<i>Hyalodendron</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al., 2011.
<i>Hypocrea</i>	<i>Aquilaria</i> spp.	China	Cui et al., 2011.
<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Dendrobium</i> spp., <i>Aquilaria</i> spp.	China	Chen et al. (2011); Cui et al. (2011)
<i>Leptos</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Xing et al., 2011.
<i>Leptosphaerulina</i>	<i>Dendrobium</i> spp., <i>Aquilaria</i> spp.	China	Xing et al. (2011); Cui et

			al. (2011)
<i>Microdochium</i>	<i>Holcus lanatus</i>	Espanha	Márquez et al., 2010
<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Adenocalymma alliaceum</i>	India	Kharwar et al., 2011
<i>Mycoleptodiscus</i>	<i>Echinacea purpurea</i>	Brasil	Rosa et al., 2012
<i>Nemania</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al., 2011
<i>Nigrospora</i>	<i>Dendrobium</i> spp., <i>Cordia curassavica</i> , <i>Maytenus ilicifolia</i> , <i>Punica granatum</i> , <i>Morus nigra</i> , <i>Bauhinia forficata</i> , <i>Holcus lanatus</i>	Espanha, China, Brasil	Chen et al. (2011); Dias et al.(2012); Márquez et al.(2010)
<i>Paraconiothyrium</i>	<i>Dendrobium</i> spp., <i>Aquilaria</i> spp.	China	Chen et al. (2011); Cui et al. (2011)
<i>Penicillium</i>	<i>Adenocalymma alliaceum</i> , <i>Populus tremula</i> , <i>Holcus lanatus</i>	Espanha, India, Suécia	Benedicte et al. (2010); Kharwar et al.(2011); Márquez et al.(2010)
<i>Periconiella</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al., 2011
<i>Pestalotia</i>	<i>Dendrobium</i> spp., <i>Vernonia condensata</i>	China, Brasil	Chen et al. (2011); Dias et al. (2012)
<i>Pestlotio</i>	<i>Dendrobium</i> spp	China,	Xing et al.,2011
<i>Pestalotiopsis</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al. (2011); Xing et al. (2011)
<i>Pezicula</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al., 2011.
<i>Phaeoacremonium</i>	<i>Aquilaria</i> spp.	China	Cui et al., 2011
<i>Phaeosphaeria</i>	<i>Holcus lanatus</i>	Espanha	Márquez et al., 2010.
<i>Phialemonium</i>	<i>Holcus lanatus</i>	Espanha	Márquez et al., 2010
<i>Phoma</i>	<i>Dendrobium</i> spp., <i>Aquilaria</i> spp., <i>Holcus lanatus</i> ,	China, Espanha	Cui et al. (2011); García et

	<i>Sapindus saponaria</i>		al.(2012); Márquez et al.(2010); Xing et al. (2011)
<i>Phomopsis</i>	<i>Plectranthus barbatus</i> , <i>Vernonia condensata</i> , <i>Pfaffia</i> <i>paniculata</i> , <i>Cordia</i> <i>curassavica</i> , <i>Punica</i> <i>granatum</i> , <i>Morus nigra</i> , <i>Adenocalymma alliaceum</i> , <i>Holcus lanatus</i> , <i>Sapindus</i> <i>saponaria</i>	Brasil, Espanha, India	Dias et al. (2012); García et al.(2012); Kharwar et al.(2011); Márquez et al.(2010)
<i>Pichia</i>	<i>Aquilaria</i> spp.	China	Cui et al., 2011.
<i>Pleospora</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al., 2011.
<i>Pleurophragmium</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al., 2011.
<i>Podospora</i>	<i>Holcus lanatus</i>	Espanha	Márquez et al.,2010.
<i>Rhizoctonia</i>	<i>Adenocalymma alliaceum</i>	India	Kharwar et al.,2011.
<i>Rhizomucor</i>	<i>Aquilaria</i> spp.	China	Cui et al., 2011.
<i>Rhizopus</i>	<i>Dendrobium</i> spp., <i>Camptotheca acuminata</i>	China	Ding et al.(2013); Xing et al. (2011)
<i>Rhodotorula</i>	<i>Holcus lanatus</i>	Espanha	Márquez et al., 2010.
<i>Schizophyllum</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al., 2011
<i>Sclerotium</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al., 2011
<i>Sirodesmium</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al., 2011
<i>Sporormiella</i>	<i>Eucommia ulmoides</i> , <i>Forsítia</i> spp., <i>Rhus potanini</i>	China	Sun et al., 2008
<i>Thielavia</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al. (2011)
<i>Trichoderma</i>	<i>Dendrobium</i> spp., <i>Foeniculum vulgare</i> , <i>Adenocalymma alliaceum</i>	Brasil, China, India	Chen et al. (2011); Dias et al.(2012); Kharwar et

			al.(2011); Xing et al. (2011)
<i>Trichocladium,</i>	<i>Holcus lanatus</i>	Espanha	Márquez et al., 2010.
<i>Ulocladium</i>	<i>Holcus lanatus</i>	Espanha	Márquez et al., 2010.
<i>Verticillium</i>	<i>Dendrobium</i> spp.	China	Chen et al., 2011.
<i>Xylaria</i>	<i>Dendrobium</i> spp., <i>Aquilaria</i> spp., <i>Camptotheca</i> <i>acuminata</i>	China	Cui et al. (2011); Chen et al. (2011); Ding et al.(2013); Xing et al. (2011)

O levantamento bibliográfico efetuado, como demonstrado na Tabela 2, reflete a abundancia de fungos endofíticos filamentosos isolados de plantas medicinais em várias regiões do mundo. A associação de leveduras com plantas tem sido pouco estudada como fungo endofítico, necessitando de pesquisas sobre a sua ecologia e diversidade do grupo.

2.3 Interação hóspede e hospedeiro

Têm sido isolados de todas as espécies vegetais até agora estudadas Micro-organismos endófitos. Contudo, ainda há muitas plantas que necessitam ser avaliadas quanto à ocorrência de endófitos fúngicos (Wang e Dai et al. 2011; Strobel et al. 2003). As informações a respeito da interação endofítico-planta podem contribuir no entendimento dessa associação e de seus benefícios (Azevedo et al., 2000). Segundo Krings et al. (2007), a interação micro-organismo endofítico-planta hospedeira parece ter evoluído há mais de 400 milhões de anos, e, a capacidade das plantas habitarem o solo foi uma herança dos endofíticos.

Na interação vegetal e endofítico, a planta é induzida a produzir metabólitos de defesa em resposta à possibilidade de colonização por um micro-organismo patogênico (Agrios, 1997). A relação defesa da planta e virulência do fungo pode ser alterada, se a estabilidade for afetada tanto por aumento da virulência fúngica quanto por diminuição na defesa da planta, podendo ocorrer patogenicidade (Martiello et al., 1997).

Schulz e Boyle (2005), sugeriram que a colonização assintomática é resultante da relação antagônica entre o vegetal e os fungos, visto que os endofíticos produzem exoenzimas primordiais para infectar o hospedeiro e a maior parte é capaz também de produzir micotoxinas fitotóxicas.

A colonização endofítica ocorre a partir da penetração dos micro-organismos pelas sementes (transmissão vertical) e/ou através da zona radicular, diretamente na parede celular ou nos estômatos utilizando apressórios e haustórios (transmissão horizontal) (Saikkonem et al., 2004). Três maneiras de colonização por endófitos são conhecidas, intracelular e limitada a poucas células; intercelular e localizada; ou de forma intercelular e intracelular sistêmica atingindo tecido e órgão do vegetal, como raiz, caule, ramos, folhas, flores e frutos (Marinho et al. 2009; Johri, 2006).

A diversidade de fungos endofíticos em regiões úmidas tem auxiliado no entendimento da transmissão (Arnold et al., 2000). Entretanto, em regiões secas, a compreensão da transmissão endofítica tem sido pouco estudada, visto que o clima destas regiões parece não ser favorável à colonização e a vegetação sofre influencia das condições climáticas refletindo também na baixa densidade vegetal (Sun et al., 2012). Assim a transmissão horizontal de fungos endofíticos pode ser diminuída, devido à baixa riqueza e abundância vegetal (Losos e Leigh, 2004).

Mais recentemente, os trabalhos de identificação da comunidade de endofíticos vêm aumentando significante, devido ao potencial biotecnológico destes micro-organismos demonstrando visível importância (Sadananda et al. 2011).

2.4 Importância do estudo de fungos endofíticos

Desde a descoberta dos endofíticos, os estudos têm mostrado a importância destes micro-organismos em diferentes segmentos, sobretudo no desenvolvimento econômico, com a aplicação biotecnológica proporcionando expressivo crescimento com um mercado circulante de dezenas de bilhões de novos produtos biotecnológicos (Azevedo e Araujo, 2005). Os endófitos são importantes para a proteção vegetal e a interação ecológica, bem como na síntese de metabólitos primários e secundários possibilitando o uso em diversos processos biotecnológicos como produção de vacinas, enzimas, antibióticos, antifúngicos e anticancerígenos. Além disso, desenvolvem mecanismos contra insetos, animais herbívoros e

até micro-organismos que possam causar danos a planta hospedeira e também aceleram o desenvolvimento de sementes (Azevedo et al. 2000; Clay e Schardl, 2002; Gai et al. 2009).

Os metabólitos produzidos como fitohormônios, enzimas e outros compostos químicos além de não causar danos ao vegetal podem contribuir para, a defesa e o crescimento da planta (Clay e Schardl 2002). Neste contexto, a utilização dos endofíticos representa uma perspectiva de suma importância, garantindo cada vez mais o desenvolvimento e aplicação biotecnológica. No entanto, a relação harmônica naturalmente espontânea entre endofítico-planta pode ser rompida por alguns fatores a exemplos de estresses ambientais que podem favorecer mudança da condição endofítica para patogênica (Azevedo et al., 2009).

Na indústria farmacêutica, os fungos endofíticos representam potenciais fontes de produtos naturais pela capacidade de produzir metabólitos secundários com várias atividades biológicas de utilização em tratamento de câncer, infecções de etiologia fúngica e bacteriana (Gallo et al. 2008; Strobel et al. 2003; Sun et al. 2011; Suryanarayanan et al. 2009; Jalgaonwala et al. 2011). Na agricultura, os produtos bioativos oriundos dos endofíticos têm contribuído para o controle de doenças fitossanitárias (Garcia et al., 2012).

2.5 Plantas medicinais

O estudo da relação das plantas medicinais com a população, a etnobotânica, trouxe o aumento na utilização destas plantas que há centenas de milhões de anos teria iniciado descoberta biotecnológicas e econômicas (Brasileiro et al. 2008; Rates et al. 2001; Oliveira et al. 2010).

As plantas medicinais possuem uma grande variedade de atividades biológicas, cujos compostos apresentam princípios bioativos para tratamentos de doenças causadas por fungos, bactérias e essas mesmas propriedades parecem ser transmitidas por alguns fungos endofíticos (Azevedo et al. 2002).

O Brasil tem uma rica diversidade de plantas medicinais com uma longa tradição na fitoterapia, sendo a região Nordeste a grande referência na utilização dessas plantas, (Rosa et al. 2010; Dias et al. 2012; Oliveira et al. 2010).

O alto custo dos medicamentos industrializados conduz a população carente de assistência médica e financeira a utilizar as plantas medicinais nas formas de chás, extratos obtidos de folhas macerados, óleos de caules, entre outras formas para tratamento de infecções (Landell et al. 2006).

Com o passar do tempo, a industrialização desses produtos comprometem a transmissão do conhecimento popular para as futuras gerações, fato observado em várias comunidades brasileiras, principalmente na região Nordeste (Dias et al. 2012; Strobel et al. 2003). As plantas medicinais, *Tabebuia impetiginosa* e *Schinus terebinthifolius* também conhecido como aroeira da praia são indicadas pela Farmacopéia Brasileira (2010), com princípios ativos frente a micro-organismos.

2.5.1 *Tabebuia impetiginosa*

Tabebuia impetiginosa Mart. ex. DC. Standl., cujo nome atual é *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex. DC.) Mattos, é denominada popularmente ipê roxo e pau d'arco roxo pertence à família Bignoniaceae, que apresenta 36 gêneros utilizados na medicina popular (Longhi et al.1995; Maia, 2004). A espécie é caracterizada como de grande porte que pode chegar a 30 metros, com troncos de até 90 cm de diâmetro, estrutura cilíndrica, casca pouco espessa de cor pardo-cinza, folhas inteiras ou serrilhadas e flores com cálice cupular, dispostas em inflorescências paniculadas terminais, com tamanho máximo de 6-12 cm comprimento. As sementes são aladas com aproximadamente 1-3 cm, cordiformes, de coloração marrom clara (Lorenzi,1998; Pereira et al. 2003). Por possuir flores muito vistosas, é utilizada para arborização de avenidas, rodovias, parques, praças e jardins (Lorenzi, 1998).

Espécies de *Tabebuia* têm madeira forte e larga, sendo usada em marcenarias. Além disso, é utilizada no tratamento de infecções por *Candida*, úlceras sifilíticas e outras inflamações, como anti-reumática e anti-anêmica (Carvalho, 1994).

2.5.2 *Schinus terebinthifolius*

Schinus terebinthifolius Raddi recebe várias denominações popularmente como aroeira, aroeira pimenteira, aroeira precoce, aroeira do campo, aroeira da praia, aroeira negra, aroeira branca, aroeira vermelha, aroeira mansa, aroeira do brejo, aroeira do sertão, fruto de raposa, aroeira de sabiá, fruto de sabi, coração de bugre, cambuí, bálsamo, aguaraiaba e careiba. Pertence à família Anacardiaceae, a árvore de pequeno e médio porte atinge de 5-12m de altura com tronco de 30-60 cm de diâmetro (Lorenzi,2002; Biavatti et al. 2007). As cascas do caule são ricas em taninos, que conferem uma ação adstringente e desinfetante e auxiliando ainda na medicina popular no tratamento de gastrite (Santos et al., 2006). Originária da

América do Sul, a espécie é encontrada principalmente no Brasil, no Paraguai e na Argentina (Diniz et al., 1999). Lima et al. (2006) registraram ação no tratamento de vaginites crônicas e cervicites. No entanto, estudos relatam que esta planta pode produzir resinas que em contato com a pele podem causar dermatite alérgica (Moraes et al., 2004).

Segundo Medeiros et al. (2007) *S. terebinthifolius* vem demonstrando propriedade medicinais constatadas como anti-sépticas e anti-inflamatórias eficazes nos quadros febris em infecções do trato urinário, diarreias, tosse, bronquite e outras alterações do sistema respiratório (Agra et al. 2008; Biavatti et al. 2007), além de ação antitumoral (Queires et al., 2006), antioxidante (Santos 2006), cicatrizante e antimicrobiana (Lima et al. 2004; Fernner et al. 2006). As plantas medicinais possuem uma grande diversidade de leveduras endofíticas que tem representado fonte de sub-produtos de ação também medicinal (Landell et al. 2006).

2.6 Leveduras endofíticas em plantas medicinais

Os fungos endofíticos têm sido estudados a partir do isolamento em meio de cultura específico ou diretamente a partir do vegetal (fungos não cultiváveis). Além disso, podem ser observados diretamente no tecido vegetal utilizando técnicas de microscopia ou ser detectados por técnicas de amplificação do DNA (Schulz e Boyle, 2005; Sebastianes et al. 2008).

As pesquisas vêm demonstrando que os fungos endofíticos que colonizam as plantas medicinais exercem uma grande variedade de atividades biológicas. O predomínio de pesquisas com fungos filamentosos, os quais são de fácil isolamento com os métodos rotineiramente utilizados (Landell et al. 2006; Rosa et al. 2010; Vieira et al. 2012).

Poucos estudos têm relatado o isolamento de leveduras endofíticas e o relacionamento delas com as plantas hospedeiras. Por exemplo, estudos de endófitos verificaram “leveduras negras” associadas com *Fagus grandifolia* e *Populus tremuloides* (Chapela 1989), com palmeira de região temperada (*Trachycarpus fortunei*) (Taylor et al. 1999), com planta nativa da Austrália (*Banksia integrifolia*) (Marcarthur & McGee 2000), com banana (*Musa acuminata*) (Cao et al., 2002), com espécies de Bromeliaceae (Landell et al., 2006) e com folhas de árvores de regiões (Unterseher et al., 2007). Mais recentemente, outros estudos verificaram leveduras endofíticas em ovários de *Vaccinium macrocarpon* (Tadych et al., 2012), em folhas de planta medicinal brasileira *Solanum cernuum* (Vieira et al., 2012), em

folhas de café e uva (*Coffe arabica* e *Vitis labrusca*) (Lima et al., 2013) e a partir do cacto *Cereus jamacaru* (Bezerra et al., 2013). A literatura confirma a necessidade de verificação da associação de leveduras endofíticas com diferentes tecidos vegetais, principalmente quando se refere a associação delas com plantas medicinais.

REFERÊNCIAS

- Abreu, M. F. et al. Influence of edaphic variables on the floristic composition and structure of the tree-shrub vegetation in typical and rocky outcrop cerrado areas in Serra Negra, Goiás State, Brazil. *Brazilian Journal of Botany*, 2010; v. 35, n. 3, p. 259-272.
- Agra M.F., Silva K.N., Basílio I.J.L.D., França P.F., Barbosa-Filho J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 2008; 18: 472-508.
- Agrios, G.H..*Plant Pathology*. Academy Press, London, 1997.
- Albuquerque, A.P. et al. Medicinal and magic plants from a public market in Northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 2007;v.110, n.1, p.76-91.
- Amorozo, M. C. M. A abordagem etnobotânica na pesquisa de plantas medicinais. In: Di Stasi, L. C. *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista 1996; p.230.
- Araújo, W.L., Maccheroni, JR.W., Aguilar-Vildoso, C.I., Barroso, P.A.V., Saridakis, H.O., Azevedo, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology* 2002; 47: 229-236
- Arnold, A.E., Maynard, Z., Gilbert, G.S., Coley, P.D., Kursar, T.A. Are tropical endophytes fungi hyperdiverse? *Ecology Letters* 2000;3:267-274.
- Arnold, A.E., Herre, E.A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* 2003;95: 388–398.
- Azevedo, J.L., Araújo, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Ganguli BN, Deshmukh SK (eds.) *Fungi: multifaceted microbes*. CRC Press, Boca Raton 2007; pp. 189-207.
- Azevedo, J.L.; Maccheroni Júnior, W.; Araújo, W.L. Importância dos microorganismos endofíticos na agricultura. In: Luz, W.C. et al. (Eds). *RAPP: revisão anual de patologia de plantas*. v.11. Passo Fundo: Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família 2003; p.333-71.
- Azevedo, J.L., Maccheroni, Jr.W., Pereira, J.O., Araújo, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 2000; 3(1): 40-65.
- Benedicte R., Albrechtsen L. B., Akkamahadevi V., Åsa H., Mats W., Karlsson J., Jansson S. Endophytic fungi in European aspen (*Populus tremula*) leaves—diversity, detection, and a suggested correlation with herbivory resistance *Fungal Diversity* 2010; 41:17–28 Doi 10.1007/s13225-009-0011.

Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D. *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 2000.

Bezerra, J.D.P., Lopes, D.H.G., Santos, M.G.S., Svedese, V.M., Paiva, L.M., Almeida-Cortez, J.S., Souza-Motta, C.M..Riqueza de micro-organismos endofíticos em espécies da família Cactaceae. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas* 2012; 9(2): 19-23.

Bezerra, J. D. P.; Santos, M. G. S.; Barbosa, R. N.; Svedese, V. M.; Lima, D. M. M.; Fernandes, M. J. S.; Gomes, B. S.; Paiva, L. M.; Almeida-Cortez, J. S. A.; Souza-Motta, C. M. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. *Symbiosis* 2013; 60: 53-63.

Bhagat J, Kaur A, Sharma M, Saxena AK, Chadha BS. Molecular and functional characterization of endophytic fungi from traditional medicinal plants. *World J Microbiol Biotechnol.* 2012; 28: 963–71.

Biavatti M, Marensi V, Leite SN, Reis A Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. *Rev Bras Farmacogn*, 2007; 17: 640-653.

Biswas, C., Dey, P., Satpathy, S., Satya, P. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as a season long endophyte in jute (*Corchorus olitorius*) and its rapid detection using SCAR marker. *BioControl*, 2012; 57: 565–571.

Brasileiro B.G., Pizziolo V.R., Matos D.S., Germano A.M., Jamal C.M. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008; vol. 44: n. 4.

Cabral, D., Stone, J., Carrol, G.C. The internal mycoflora of *Juncus* spp.: microscopic and cultural observation of infection patterns. *Mycological Research* 1993; 97: 367-376.

Camatti-Sartori, V., Silva-Ribeiro, R.T., Valdebento-Sanhueza, R.M., Pagnocca, F.C., Echeverrigaray, S. and Azevedo, J.L., 2005. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. *J. Basic Microbiol* 2008; 45: 397–402.

Cao L.X., J.L. You and S.N. Zhou. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 2002; 18: 169–171.

Carmo-Souza, L.D.O. Distribution of yeast in nature. In: Rose, A.H.; Harrison, J.S. (eds). *The Yeasts, biology of yeasts*. London: Academic Press London. 1969; v.1, p. 79-106.

Carvalho, P. E. R. Espécies florestais brasileiras recomendações Silvio culturais, potencialidades e uso da madeira 1994; Brasília: Embrapa/CNPQ, p.640.

Carvalho MC, Barca FN, Agnez-Lima LF, Medeiros SR Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem barks (*Shinus terebinthifolius* Raddi). *Environ Mol Mutagen* 2003; 42: 185-191.

Chandra, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012; 95:47–59.

Chapela IH. Fungi in healthy stems and branches of American beech and aspen: a comparative study. *New Phytologist* 1989; 113: 65–75.

Chen, Y.C., Eisner, J.D., Kattar, M.M., Rassouljian-Barrett, S.L., Lafe, K., Yarfitz, S.L., Limaye, A.P. and Cookson, B.T., 2000. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphism in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J. Clin Microbiology* 2010;38: 2302–2310.

Chen J., Hu K. X., Hou X. Q., Guo S. X. *World J Microbiol Biotechnol* .Endophytic fungi assemblages from 10 *Dendrobium* medicinal plants (Orchidaceae) 2011; 27:1009–1016 DOI 10.1007/s11274-010-0544-y.

Clay, K.; Holah, J. Fungal Endophyte Symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science* , 1999; 285: 1742-1744.

Clay, K. Fungal endophytes of grasses. Their potential as biocontrol agents. *Mycological Research* 1988; 92: 1-12.

Clay, K., Schardl, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist* 2002; 160: 99–127.

Ding X. • Liu K. • Deng B. • Chen W. • Li W. • Liu F. Isolation and characterization of Endophytic fungi from *Camptothec aacuminata*. *World J Microbiol Biotechnol* 2013; DOI 10.1007/s11274-013-1345-x.

Flor N. Rivera-Orduña, Roberto A. Suarez-Sanchez,, Zoila R. Flores-Bustamente, Jorge N. Gracida-Rodriguez, Luiz B. Flores-Cotera Diversity of endophytic fungi of *Taxus globosa* (Mexican yew). *Fungal Diversity* 2011;47: 65-74.

Ettori, L.C.; Siqueira, A.C.M.F.; Sato, A.S.; Campos, O.R. Variabilidade genética em populações de ipê-roxo – *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Tol. – para conservação ex situ. *Revista do Instituto Florestal* 1996; v.8: n.1, p.61-70,

Fenner, R. *et al.* Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Rev. Brás. Cienc. Farm* 2006; v. 42: nº3, pág. 369-394.

Gai C.S., Lacava P.T, Jr.W.M., Glienke C., Araújo W.L., Miller T.A. and Azevedo J.L. Diversity of endophytic yeasts from sweet Orange and their localization by scanning electron microscopy. *Journal of Basic Microbiology* 2009;49: 441–451.

García A., Rhoden S. A. , Filho C.J. R. , Nakamura C. V. , Pamphile J. A. Diversity of Foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindussaponaria* L. and their Localization by scanning electron microscopy *Biol Res* 2012;45: 139-148.

Gallo, M. B. C.; Guimarães, D. O.; Momesso, L. S.; Puro, M. T. Natural products from endophytic fungi. In: Saika, R.; Bezbaruah, R. L.; Bora, T. C. Microbial Biotechnology, India: New India Publishing Agency 2008; p.139-168.

Góes-Neto, A., Loguercio-Leite, C., Guerrero, R. T. Molecular phylogeny of tropical, 2002.

Guo, Q.; Zhao, B.; Packer, L. Electron spin resonance study of free radicals formed from a procyanidin-rich pine (*Pinus maritima*) bark extract, pycnogenol. *Free Rad. Biol. Med.* 2000; v. 27, p. 1308 – 1312.

Hallmann, J.A., Quadt-Hallmann, W., Mahaffee, F., Kloepper, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 1997;43: 895-914.

Hawksworth, D.L., Rossman, A.Y.. Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology* 1997;87: 888-891.

Hammer, O.; Harper, D. A. T.; Ryan, P. D. Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaentologia Electronica*, v. 4, 2001. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em: 13 ago. 2013.

Hirsch, G.U., Braun, U. Communities of parasitic microfungi. In: Winterhoff, W. (ed.). *Handbook of vegetation science: Fungi in vegetation science*. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands 1992; pp.225-250.

Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., Figueras, M.J. *Atlas of Clinical Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands. 2000.

Hyde, K.D., Soyong, K. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 2008; 33: 163-173.

Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Hyde, K.D., Corke, H. and Sun, M. Biodiversity of endophytic Fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal diversity* 2008;33: 61-75.

Jin, P.; Wang, S. Y.; Wang, C. Y.; Zheng, Y. Effect of cultural system and storage temperature on antioxidant capacity and phenolic compounds in strawberries. *Food Chemistry*, 2013; v. 124, p.262-270.

Johri, B.N. Endophytes to the rescue of plants! *Current Science* 2006;90(10):1315-1316.

Kirk P, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. 10 th edn. CAB International, Wallingford, UK, 2008.

Lacaz, C. S.; Porto, E.; Martins, J. E. C.; Heins-Vaccari, E. M.; Melo, N. T. *Tratado de Micologia Médica*, São Paulo: Editora Sarvier, 9ª ed., p. 1120, 2002.

Landell M.F., Mautone J.N., Valente P. Biodiversity of yeasts associated to Bromeliads in Itapuã Park, Viamão/RS. *Biociências*, Porto Alegre, dez, 2006; v.14: n.2, p.144-149.

Lima, E.O.; Pereira, F.O.; Lima, I.O.; Trajano, V.N.; Souza, E.L. *Schinus terebinthifolius* Raddi: avaliação do espectro de ação antimicrobiana de seu extrato aquoso. *Infarma* 2004; v.16: n.7, pág. 83-85.

Lima MR, Luna JS, Santos AF, Andrade MC, Sant'ana AE, Genet JP, Marquez B, Neuville L, Moreau N Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2006; 105: 137-147.

Lima TEF, Oliveira RJV, Neves RP, Bezerra JL, Cavalcanti MAQ. Endophytic yeast of *Coffea arabica* and *Vitis labrusca* cv. Isabel from Pernambuco, Brazil. *Nova Hedwigia* 2013; 96.

Lorenzi, H. Árvores brasileiras (Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil). Editora Plantarum, 1992; Nova Odessa: Volume 1.

Lorenzi, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum 1998; p.368.

Lorenzi, H. Árvores Brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4ªed. Ed. Instituto Plantarum 2002; v.1: pág. 24.

Longhi, R.A. Livro das árvores; árvores e arvoretas do Sul. 2.ed., Porto Alegre: L&PM 1995; 176p.

Losos, E.C., Leigh, E.G. Jr. *Tropical forest diversity and dynamism: findings from a large-scale plot network* 2004; University of Chicago Press, Chicago.

Maia, G.N.. Catinga: árvore e arbustos e suas utilidades, São Paulo, D & Z Computação gráfica e editora, 2004.

Macarthur, D., McGee, P. A comparison of the endophytic fungi from leaves of *Banksia integrifolia* at three sites on the east coast of Australia. *Australasian Mycologist*, 2000; 19(3), 80-83.

Marinho, A.M.R., Marinho, P.S.B., Rodrigues Filho, E.. Constituintes químicos de *Penicillium* sp, um fungo endofítico isolado de *Murrayapaniculata* (Rutaceae). *Revista Ciências Exatas e Naturais* 2007; 9(2): 189-199.

Marinho A.M.R., Marinho P.S.B. , Filho E.R. Esteroides produzidos por *Penicillium herquei*, Um Fungo Endofítico Isolado Dos Frutos De *Melia azedarach* (Meliaceae). *Quim. Nova* 2009; v.32: n. 7, 1710-1712,.

Márquez S. S. & Bills G. F. & Acuña L. D. & Zabalgoeazcoa I. Endophytic Mycobiota of leaves and roots of the Grass *Holcus lanatus* Fungal Diversity 2010; 41:115–123 DOI 10.1007/s13225-009-0015-7.

Medeiros K.C.P, Monteiro J.C., Diniz M.F.F.M., Medeiros I.A., Silva B.A., Piuvezam M.R. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Radd in inflammatory models. *Ver Bras Farmacogn* 2007; 17: 23-28.

Mendes, R., Azevedo, J.L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: Anais do 5º Congresso Brasileiro de Micologia 2007; p. 129-140.

Middelhoven, W.J. Identity and biodegradative abilities of yeasts isolated from plants growing in an arid climate. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1997; 72, p.81-89.

Moraes M.O., Bezerra F.A.F., Lotufo L.C., Pessoa C, Moraes M.E.A. Avaliação clínica da eficácia e segurança de fitoterápicos no Brasil. *Arq Bras Fitomed Cient* 2004; 30-39.

Mostert, L., Crous, P.W., Petrini, O. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia* 2000;52: 46-58.

Müller, C.B., Krauss, J. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current Opinion in Plant Biology* 2005;8: 450–456.

Mussi-Dias V., Araújo A.C.O., Silveira S.F., Rocabado J.M.A., Araújo K.L. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais 3 Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu 2012; v.14: n.2, p.261-266.

Oliveira G.L., Oliveira A.F.M., Andrade L.H.C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. *Acta bot. bras* 2010; 24(2): 571-577.

Owen, N.L., Hundley, N. Endophytes – the chemical synthesizers inside plants. *Science Progress* 2004; 87(2):79-99.

Pereira, S.C.; Gamarra- Rojas, C.F.L.; Gamarra- Rojas, G.; Lima M.; Gallindo, F.A.T. Plantas úteis do nordeste do Brasil, Recife, 2003; Associação plantas do Nordeste.

Peters, S., Aust, H.J., Draeger, S., Schulz, B. Interactions in dual cultures of endophytic fungi with host and nonhost plant calli. *Mycologia* 1998; 90:360-367.

Petrini, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews, J.H., Hirano, S.S. (eds.). *Microbial ecology of leaves*. Springer, New York, 1991.

Phaff, H.J., Starmer, W.T. Specificity of natural habitats for yeast and yeasts-like organisms. In: Skinner, F.A., Passmore, S.M., Davenport, R.R. (eds). *Biology and activity yeasts*. London: Academic Press. 1980; p. 79-102.

Queires, L.C. *et al.* Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. *Anticancer Research* 2006; v.26: nº1, pág.379-387.

Raman A.; Wheatley W. and Popay A. Endophytic Fungus—Vascular Plant Insect Interactions Source: Environmental Entomology Published By: Entomological Society of America 2012; 41(3): 433-447.

Rates, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino da farmacognosia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.11, n.2, p.57-69, 2001. Disponível em: <<http://www.farmacognosia.ufpr.br>>. Acesso em: 27 julho, 2006.

RavindraN. ,Satish K. ,AshishM.,Surendra K. G. ,Vijay K. S. ,Talat A. , Anuj K. Assessment of diversity, distribution and antibacterial lactivityof endophyticfungi Isolated from a medicinal plant *Adenocalymm aalliaceum* Miers *Symbiosis* 2011; 55:39–46 DOI 10.1007/s13199-011-0142-2.

Ribas, M.O. *et al.* Efeito da *Schinus terebenthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. *Rev. Odonto Cienc. – Fac. Odonto/PUCRS* 2006; v.21: nº 53, pág. 245-252.

Rodrigo R. M. R.R., Barbieri R.L., Carvalho F.I.F. Resistência das Plantas a Moléstias Fúngicas. *Ciência Rural*, Santa Maria 1997; v.27: n.1, p.161-168.

Rodrigues, K. F., Samuels, G. J. Fungal endophytes of *Spondias mombin*leaves in Brazil. *Journal of Basic Microbiology* 1994; 39:131-135.

Rodriguez RJ, White JF Jr, Arnold AE, Redman RS. Fungal endophytes: and functional roles. *New Phytol* 2009; 182:314–33.

Rollinger, J.L., Langenheim, J.H. Geographic survey of fungal endophytic community, compositon in leaves of coastal redwood.*Mycologia* 1993;85: 149–156.

Rosa C.S., Martins A.A.,Santin r., Faria R.O., Nobre M.O.,Meireles M.C.A., Madrid I.M. & Nascentep.S. *Malassezia pachydermatis* no tegumento cutâneo e meato acústico externo de felinos hígidos, otopatas e dermatopatas, no município de Pelotas, RS, Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2006; 34:143-147.

Rosa L. H., Nurhayat T. ,Natascha T. , David E. W. , ZhiqiangP. ,Ulrich R. B. , James J. B. , Natasha M. A. , Larry A. W. , Rita M. M. Diversity and Biological Activities of Endophytic Fungi Associated with Micropropagat ed Medicinal Plant *Echinacea purpurea* (L.)Moench. *American Journal of Plant Sciences* 2012; 3: 1105-1114 doi:10.4236/ajps.2012.38133.

Ruby Erach Jalgaonwala;.Bhavna V.M. ; Raghunath T. M. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 2011; 1(2): 21-32.

Saikkonem, K., Wäli, P., Helander, M., Faeth, S.H. Evolution of endophyte-plant symbioses.*Trends in Plant Science* 2004;9(6): 275-280.

Sadananda, T. S.; Nilrupama, R.; Chaithra, K.; Govindappa, M.; Chandrappa, C. P.; Raghavendra, B. Antimicrobial and antioxidant activities of endophytes from *Tabebuia argêntea* and identification of anticancer agent (lapachol). *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011; Vol. 5(16): p. 3643 -3652.

Santos, O.J.;Nicolau, G.C. M.; Jurandir, M.R. ; Samuel D. Avaliação do extrato de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de gastrorrafias em ratos. *Acta Cir. Bras.* 2006; v.21: nº2, pág.39-45.

Schulz, B., Boyle, C. The endophytic continuum. *Mycological Research* 2005; 109(06):661-686.

Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Aust, H.J., Römmert, A.K., Krohn, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 2002;106(9): 996-1004.

Sebastianes, F.L.S., Romão, A.S., Lacava, P.T., Pizzirani-Kleiner, A.A. Endophytic fungi isolated from two mangrove ecosystems in São Paulo State, Brazil. In: *XII International Congress of Mycology*, pp. 69-69, 2008.

Siqueira, V. M., Braun, U., Souza-Motta, C.M. *Corynespora subcylindrica* sp. nov., a new hyphomycete species from Brazil and a discussion on the taxonomy of corynespora-like genera. *Sydowia* 2008;60(1): 113–122.

Siqueira, V.M., Conti, R., Araújo, J.M., Souza-Motta, C.M. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippiasidoides* Cham. and their antimicrobial activity. *Symbiosis* 2011;53: 89–95.

Silva, A.G. Plantas na terapêutica moderna: tendências, riscos e estratégias de conservação. *Natureza on line* 2004;v.2, n.2, p.34-6.

Stierle A, Strobel GA, Stierle D. Taxol and taxen production by *Taxomyces andreanae* an endophytic fungus of pacific yew. *Science* 1993; 260: 214–216

Strobel, G.A. Endophytes as sources of bioactives products. *Microbes and Infection*, 2003.

Strobel, G.A., Daisy, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2003; 67(4):491-502.

Strobel, G.A., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 2004;67: 257–268.

Strobel, G.A., Kluck, K., Hess, W.M., Sears, J., Ezra, D., Vargas, P.N. *Muscodoralbus* E-6, an endophyte of *Guazuma ulmifolia* making volatile antibiotics: Isolation, characterization and experimental establishment in the host plant. *Microbiology* 2007;153: 2613-2620.

Strobel, G.A., Spang, S., Kluck, K., Hess, W.M., Sears, J., Livinghouse, T. Synergism among volatile organic compounds resulting in increased antibiosis in *Oidium* sp. *FEMS Microbiology Letters* 2008;283:140-145.

Sun J. Q., GUO L., Z. W. , Ping W. & Chi D. F. Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants *Sci China Ser C-Life Sci* 2008; 51(8):751-759.

Sun, Y., Wang, Q., Lu, X., Okane, I., Kakishima, M. Endophytic fungal community in stems and leaves of plants from desert areas in China. *Mycological Progress* 2012;11(3):781-790.

Suryanarayanan, T.S., Murali, T.S., Venkatesan, G. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forest across a rainfall gradient. *Canadian Journal of Botany* 2002; 80: 818-826.

Suryanarayanan, T.S., Wittlinger, S.K., Faeth, S.H. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. *Mycological Research* 2005;109:635–639.

Tadych, M., Bergen, M.S., Johnson-Cicalese, J., Polashock, J.J., Vorsa, N., White Jr., J.F. Endophytic and pathogenic fungi of developing cranberry ovaries from flower to mature fruit: diversity and succession. *Fungal Diversity* 2012; 54: 101–116.

Tan, R.X., Zou, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* 2001; 18:448-459.

Taylor, T.N., Taylor, E.L. The rhynie chert ecosystem: a model for understanding fungal interactions. In: Bacon, C.W., White, J.F. (eds.) *Microbial endophytes*. Marcel Decker, New York 2000.

Trindade, R.C., Resende, M.A., Silva, C.M., Rosa, C.A. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. *Systematic and Applied Microbiology* 2002; 25(2): 294-300.

Vieira, M.L.A., Hughes, A.F.S., Gil, V.B., Vaz, A.B.M., Alves, T.M.A., Zani, C.L., Rosa, C.A., Rosa, L.H. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). *Canadian Journal of Microbiology* 2012;58: 54-66.

Wilberforce, E.M., Boddy, L., Griffiths, R., Griffith, G.W. Agricultural management affects communities of culturable root-endophytic fungi in temperate grasslands. *Soil Biology & Biochemistry* 2003;35: 1143–1154.

Wilson, D. Endophyte – the evolution of the term, a clarification of its use and definition. *Oikos* 1995;73: 274-276.

White Jr., J.F., Bacon, C.W. Editorial - The secret world of endophytes in perspective. *Fungal Ecology* 2012; 5: 287-288.

Yates, I.E., Bacon, C.W., Hinton, D.M. Effects of endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on corn growth and cellular morphology. *Plant Diseases* 1997;81:723-72.

Unterseher M, Reiher A, Finstermeier K, Otto P, Morawetz W. Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. *Mycological Progress* 2007; 6: 201–212.

Xing Y.M., Chen J., Cui J.L., Chen X. M., Guo S. X. Antimicrobial Activity and Biodiversity of Endophytic Fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum* from Vietnam. *Curr Microbiol* 2011; 62:1218–1224.

Zhang T. , Zhang Y. Q. , Liu H. Y. , Wei Y.Z. , Li H. L., Sun J. , ZhaoL.X. &YuL.Y.Diversity and cold adaptation of culturable endophytic fungi from bryophytes in the Fildes Region, King George Island, maritime Antarctica. *Research Letter*, 2013.

ANEXO

ARTIGO SUBMETIDO

Título: Leveduras endofíticas de folhas das plantas medicinais brasileiras *Schinus terebinthifolius* e *Tabebuia impertiginosa*

Revista científica: Fungal Diversity

Leveduras endofíticas em folhas das plantas medicinais brasileiras *Schinus terebinthifolius* e *Handroanthus impetiginosus*

Resumo

Fungos endofíticos vivem em tecidos sadios de plantas, sem causar danos ao hospedeiro, e podem promover tolerância das espécies a diversos estresses ambientais. Muitas plantas medicinais têm sido estudadas em relação à composição de fungos endofíticos, com a maioria dos relatos citando espécies filamentosas. O objetivo deste estudo foi testar métodos para isolamento, estimar a quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), a riqueza e a diversidade de leveduras endofíticas em folhas em diferentes estádios de desenvolvimento das plantas medicinais brasileiras *Schinus terebinthifolius* e *Handroanthus impetiginosus*. O método de maceração de tecidos foi o mais apropriado para detecção das leveduras. Um total de 3.251 UFC foi obtido sendo 2.151 das folhas jovens, 868 das medianas e 231 das adultas. Na estação chuvosa foram isolados 1.870 leveduras enquanto na estação seca apenas 1.381 foram obtidas. e chuvosa (UFC = 1870) quando utilizando a metodologia de maceração do tecido vegetal. As leveduras do filo Basidiomycota foram as mais frequentes nas duas plantas estudadas, com destaque para *Rhodotorula glutinis* cujo o número de UFC foi igual para *Candida guilliermondii* (Ascomycota). Os valores dos índices de diversidade indicaram a estação chuvosa e as folhas jovens como as mais diversas em termo de leveduras endofíticas. O maior índice de diversidade de leveduras endofíticas foi observado nas folhas jovens, o que sugere que esses micro-organismos participam ativamente do desenvolvimento foliar e podem contribuir para a manutenção das plantas estudadas. A metodologia de maceração das folhas é indicada para o isolamento de leveduras endofíticas, a variação temporal e a idade do tecido vegetal influenciam o número de UFC de leveduras nas duas plantas medicinais estudadas. *Schinus terebinthifolius* possui um maior número de UFC, riqueza e diversidade de leveduras endofíticas.

Palavras chave: ecologia de fungos, idade foliar, microbiota endofítica, mudança temporal

Introdução

Fungos endofíticos são taxonomicamente diversos e habitam a maioria ou todas as plantas (Wilberforce et al. 2003; Azevedo et al. 2007; Hyde & Soyong 2008; Suryanarayanan

et al. 2005; White Jr. & Bacon 2012). Apresentando, na maioria das vezes, vantagens desconhecidas para os hospedeiros, sendo fontes potenciais de metabólitos secundários que podem servir como novos medicamentos e agroquímicos (Tan & Zou 2001; Chandra 2012; Bezerra et al. 2012a; White Jr. & Bacon 2012). Segundo a hipótese de mutualismo defensivo, os endófitos protegem as plantas hospedeiras de insetos herbívoros, mamíferos, organismos causadores de doenças e estresses ambientais (Clay 1988; Azevedo et al. 2000; Tadych et al. 2012; Biswas et al. 2012; White Jr. & Bacon 2012).

Embora muita atenção tenha sido dada à diversidade de endófitos nos últimos anos, estudos sobre o isolamento e o relacionamento de leveduras com as plantas hospedeiras são escassos. Leveduras foram citadas como endófitos em *Fagus grandifolia* e *Populus tremiiloides* (Chapela 1989), em palmeira de região temperada (*Trachycarpus fortunei*) (Taylor et al. 1999), em planta nativa da Austrália (*Banksia integrifolia*) (Marcarthur & McGee 2000), em banana (*Musa acuminata*) (Cao et al. 2002), em espécies de Bromeliaceae (Landell et al. 2006) e em folhas de árvores temperadas (Unterseher et al. 2007). Mais recentemente, outros estudos registraram leveduras endofíticas em ovários de *Vaccinium macrocarpon* (Tadych et al. 2012), em folhas da planta medicinal *Solanum cernuum* (Vieira et al. 2012), em folhas de café e uva (*Coffes arabica* e *Vitis labrusca*) (Lima et al. 2013) e em exemplares do cacto *Cereus jamacaru* (Bezerra et al. 2013).

As plantas medicinais são utilizadas desde a antiguidade na medicina popular em várias comunidades tradicionais em todo o mundo (Strobel et al, 2003). No Brasil relatos demonstram que a utilização de plantas medicinais acontece desde antes da colonização portuguesa, com os povos indígenas utilizando-as no tratamento das enfermidades (Dias et al. 2012). Apesar da sua grande importância como fonte de moléculas biologicamente ativas, só mais recentemente as plantas medicinais começaram a ter ênfase particular no estudo da comunidade de micro-organismos endofíticos. A partir da descoberta de que um fungo endofítico poderia produzir *in vitro* o anticancerígeno conhecido como “Taxol” (Stierle et al. 1993), outros estudos exploraram a comunidade de endófitos de plantas medicinais com o intuito de encontrar fungos que possuíssem a mesma capacidade farmacêutica do hospedeiro e/ou pudessem ser fonte de novos compostos biologicamente ativos (Vieira et al. 2012).

Handroanthus impetiginosus (Mart. ex DC.) Mattos e *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) são utilizadas popularmente na medicina tradicional no Brasil, possuem variação na distribuição geográfica, podendo ser encontradas em toda a América do Sul ou em regiões específicas no Brasil, Paraguai e Argentina (Longhi et al. 1995; Diniz et al. 1999).

Essas plantas medicinais tem sido utilizadas no tratamento de algumas infecções causadas por espécies de *Candida* (Carvalho, 1994) e também podem apresentar atividade antiinflamatória, antitumoral, antioxidante e cicatrizante (Santos et al. 2006; Medeiros et al. 2007; Agra et al. 2008). Além disso, devido às suas características fitossociológicas, têm sido utilizadas em projetos paisagísticos (Ettori et al. 1996).

Os objetivos do presente estudo foram testar três métodos para isolamento de leveduras endofíticas (Landell et al. 2006; Laranjeiras, não publicado; Araújo et al. 2002); estimar o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC); identificar e determinar a riqueza e diversidade de leveduras endofíticas em folhas em diferentes fases de desenvolvimento, determinando ainda se a presença das leveduras difere entre período seco e chuvoso. Para o nosso conhecimento este é o primeiro relato da associação de leveduras endofíticas com folhas das plantas medicinais brasileiras *S. terebinthifolius* e *H. impetiginosus*.

Material e Métodos

Material vegetal

Folhas sadias de *S. terebinthifolius* e *H. impetiginosus* foram coletadas no Campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil (8°03'02.30" S e 34°56'54.41" O) em junho de 2012 (período úmido) e em janeiro de 2013 (período seco). No total foram coletadas aleatoriamente 810 folhas (270 jovens, 270 medianas e 270 adultas) de 10 indivíduos de *S. terebinthifolius* e coletadas 1.215 folhas (405 jovens, 405 medianas e 405 adultas) de 15 indivíduos de *H. impetiginosus*. As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos, levadas para o laboratório, mantidas a 4°C, em refrigerador, e processadas em até 24h.

Isolamento de leveduras endofíticas

O material coletado foi primeiramente lavado em água corrente e detergente neutro. A assepsia das folhas foi conduzida como por Arnold et al. 2000 e Araújo et al. 2002. Brevemente, amostras foram desinfestadas em etanol 70% durante 1 min, hipoclorito de sódio (2-3% de cloro ativo) por 3 min, etanol 70% durante 1 minuto, e lavadas duas vezes em água destilada esterilizada por 1 min. Para verificação da eficácia da assepsia, 1 ml da última água de lavagem foi utilizada como controle.

Após a assepsia, as folhas foram processadas para isolamento de leveduras endofíticas testando-se os métodos: para cada um foram utilizadas 270 folhas de *S. terebinthifolius* e 405 folhas de *H. impetiginosus*. Método 1- (Landell et al. 2006): as folhas foram maceradas e 0,1 mL do líquido da maceração foi espalhado em placas de Petri contendo o meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) suplementado com 400 mg/L de cloranfenicol e 1,0 mg/L de actidione para suprimir o crescimento bacteriano e de fungos filamentosos, respectivamente. Método 2- (Laranjeiras et al. 2014): fragmentos de cerca de 1 cm² foram retirados das folhas e transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de água destilada esterilizada adicionada de cloranfenicol (50 mg/L). Os tubos foram submetidos a banho de ultra-som/sonicador por 15 minutos e 1 mL da água foi transferido para outro tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada esterilizada adicionada de cloranfenicol (50 mg/L) e homogeneizada em vortex por cerca de 1 min. Após a homogeneização, 100 µL foram colocados na superfície do meio de cultura SDA contido em placa de Petri. Para a distribuição homogênea da água na superfície do meio de cultura foi utilizada alça de Drigalski. Método 3- (Araújo et al. 2002): discos de 6 mm foram retirados de cada folha e transferidos assepticamente para a superfície do meio de cultura SDA em placa de Petri. Todas as placas foram incubadas a 25±2°C por até 7 dias. Após o crescimento das colônias, as leveduras foram purificadas em meio Agar YEPG (0.5% Extrato de levedura, 2% dextrose, 1% peptona, e 2% Ágar) e armazenadas para posterior identificação.

Identificação das leveduras

Para identificação das leveduras, foram observadas as características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas utilizando literatura especializada (Barnett *et al.*, 2000; de Hoog *et al.*, 2000; Lacaz *et al.*, 2002; Bhagat *et al.*, 2012). Após a identificação clássica, amostras foram selecionadas para identificação molecular utilizando parte da região ITS do rDNA (Góes-Neto *et al.*, 2002).

Culturas representativas das leveduras identificadas estão depositadas na Micoteca URM (WCDM 604) da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

Análise dos dados

Os índices de diversidade de Shannon-Wiener e Fisher α e a diversidade de Simpson de cada estágio temporal e das folhas em diferentes idades de crescimento foram calculados usando o software PAST 1.7 (Hammer et al., 2001).

Resultados

Entre os três métodos utilizados o de Landell et al. (2006) foi o mais propício para isolamento de leveduras. Por esse método foram obtidas, de folhas sadias de *S. terebinthifolius*, 2.180 UFC e 1.071 UFC de folhas de *T. impetiginosa*. Com os dois foram obtidas, de folhas de *S. terebinthifolius*, um total de 649 e 68 UFC e de folhas de *H. impetiginosus* 342 e 31 UFC de leveduras endofíticas utilizando os métodos preconizados por Laranjeiras et al. (2014) e Araújo et al. (2002), respectivamente.

O período úmido favoreceu a detecção do maior número de leveduras (1.870 UFC) em comparação com o período seco (1.381 UFC). No período úmido obteve-se 1.196 UFC folhas de *S. terebinthifolius* e 674 UFC da planta *H. impetiginosus* (Tabela 1).

Tabela 1: Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de leveduras endofíticas isoladas de folhas de *S. terebinthifolius* e de *H. impetiginosus* nos períodos chuvoso e seco.

Planta medicinal	Estação e tecido vegetal ^a						Total
	Chuvoso			Seco			
	FJ	F	FA	FJ	F	F	
		M			M	A	
<i>Schinus terebinthifolius</i>	786	31	10	73	23	19	2.180
<i>H. impetiginosus</i>	406	19	71	22	12	41	1.071
		7		7	9		
Total	1,19	50	17	96	36	60	
	2	7	1	0	1		

^a Tecido vegetal: FJ – folhas jovens, FM – folhas medianas, FA – folhas adultas

As folhas identificadas como jovens (FJ) apresentaram maior número de leveduras tanto nos dois período chuvoso quanto no período seco, seguidas pelas folhas medianas (FM) e pelas folhas adultas (Tabela 1).

Um total de 105 leveduras foram isoladas, sendo 59 de folhas de *T. impetiginosa* e 46 de folhas de *S. terebinthifolius*. Dessas leveduras, quatro espécies são Ascomycota, todas do gênero *Candida*, e cinco pertenceu a *Cryptococcus* e *Rhodotorula*, pertencentes ao filo

Basidiomycota (Tabela 2). *Candida guilliermondii* foi a espécie mais frequentemente encontrada em folhas de *H. impetiginosus*, seguida de *Cryptococcus laurentii* e *Rhodotorula glutinis*. Nas folhas de *H. impetiginosus*, *R. glutinis* foi a levedura mais frequente.

Em folhas de *H. impetiginosus* foram identificadas oito espécies de leveduras no período chuvoso e seis no período seco. Em folhas de *S. terebinthifolius* foram isoladas oito espécies de leveduras endofíticas no período chuvoso e sete no período seco. O gênero *Rhodotorula* e a espécie *R. glutinis* foram os táxons mais frequentemente encontrados. Espécies de leveduras do filo Basidiomycota foram mais frequentes no período seco nas folhas das duas plantas, sendo *Cryptococcus* mais comumente encontrado em *H. impetiginosus* e *Rhodotorula* em *S. terebinthifolius*. Isolados representativos das espécies identificadas pela metodologia clássica foram selecionados para estudo de partes da região ITS do rDNA (Tabela 3).

Nas folhas jovens de *H. impetiginosus* foram identificadas sete espécies, seguida das folhas medianas (6 espécies) e adultas (2 espécies). Nas folhas jovens as espécies mais frequentes foram *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus laurentii* e *Rhodotorula glutinis*. Nas folhas medianas e adultas o endófito *C. guilliermondii* também foi mais frequente. Nas folhas de *S. terebinthifolius* foram identificadas oito espécies, sendo *C. heveanensis* a mais frequente nas folhas jovens, enquanto nas folhas medianas *Rhodotorula minuta* e *R. glutinis* foram mais frequentes. Nas folhas adultas obtido apenas um isolado de cada levedura.

A riqueza (*S*) e diversidade (*H*) de leveduras endofíticas nas duas plantas estudadas foi maior no período chuvoso (Tabela 4). As folhas jovens e medianas apresentaram maior riqueza e diversidade de leveduras que as folhas adultas. A diversidade avaliada pelo índice de Shannon (*H*) foi maior nas folhas jovens e menor nas folhas adultas. O filo Basidiomycota apresentou maior riqueza e diversidade. A comunidade de leveduras endofíticas nas duas espécies vegetais foi mais diversa no período chuvoso e nas folhas em estágio inicial de desenvolvimento.

Tabela 2: Frequência absoluta de leveduras endofíticas isoladas de folhas de duas plantas medicinais brasileiras crescendo em diferentes estações

Leveduras endofíticas	Planta medicinal, período temporal e tecido vegetal ^a											
	<i>H. impetiginosus</i>						<i>Schinus terebinthifolius</i>					
	Chuvoso			Seco			Chuvoso			Seco		
	F J	F M	F A	F J	F M	F A	FJ	FM	FA	FJ	FM	FA
Ascomycota												
<i>Candida albicans</i> (C.P. Robin)	1						1					1
Berkhout												
<i>C. famata</i> E.K. Novák & Zsolt	3	1		2			1			1		2
<i>C. guilliermondii</i> (Castell.)	4	4	3	4	2	1	2	1	1	1		5
Langeron & Guerra												
<i>C. sake</i> (Joule) James Prescott	1											1
Basidiomycota												
<i>Cryptococcus heveanensis</i> (Groen.)				2			4			5		9
Baptist & Kurtzman												
<i>Cryptococcus laurentii</i> (Kuff.) C.E.	2	2		6	2	1			1	2		3
Skinner												
<i>Rhodotorula minuta</i> (Saito) F.C.		1					2	2		3	2	9
Harrison												
<i>R. mucilaginoso</i> (A. Jörg.) F.C.	2	2		1			1	1		3	1	6
Harrison												
<i>R. glutinis</i> (Fresen.) F.C. Harrison	5	2		3	1	1	3	1		3	3	11
Total	18	12	3	18	5	3	14	5	2	18	6	1

^a Tecido vegetal: FJ – folhas jovens, FM – folhas medianas, FA – folhas adultas

Tabela 3: Identificação molecular de leveduras endofíticas utilizando partes da região ITS do rDNA

Isolados	Identificação clássica	Identificação molecular	Número de acesso	Identidade (%)	Observação
1F, 6F 21F, R189, 8F, 26F, 33F e 39F	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	EU149812.1	99	-
2F, 4F, 10F, 11F, 14F, 20F, 23F, R188 e R190	<i>C. laurentii</i>	<i>Bullera arundinariae</i>	NR_077092	96	Possível nova espécie, ou essa espécie não está no GenBank
3F, 12F, 13F, 21F e 42F	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	HQ876043.1	100	-
5F, 9F, 16F, 17F, 22F, 24F e 40F	<i>C. guilliermondii</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	JN183444.1	99	-
7F, 15F, 19F e R192	<i>R. glutinis</i>	<i>Rhodotorula</i> sp.	FJ238090.1	91	Possível nova espécie

Tabela 4: Comparações da diversidade de leveduras endofíticas isoladas das plantas medicinais brasileiras *H. impetiginosus* e *S. terebinthifolius* obtidas de folhas jovens (FJ), medianas (FM) e adultas (FA) no período seco e chuvoso

Comparações	UFC	Número de isolados	Número de espécies	Shannon (H')	Fisher α	Diversidade de Simpson
<i>H. impetiginosus</i>						
FJ vs. FM	633 vs. 326	32 vs. 17	8 vs. 6	1,83 vs. 1,59	3,42 vs. 3,30	0,81 vs. 0,76
FJ vs. FA	633 vs. 112	32 vs. 6	8 vs. 3	1,83 vs. 0,86	3,42 vs. 2,38	0,81 vs. 0,5
FM vs. FA	326 vs. 112	17 vs. 6	6 vs. 3	1,59 vs. 0,86	3,30 vs. 2,38	0,76 vs. 0,5
Chuvoso vs. Seco	674 vs. 397	33 vs. 26	8 vs. 6	1,78 vs. 1,55	3,35 vs. 2,44	0,79 vs. 0,75
Asco vs. Basidio	-	26 vs. 33	4 vs. 5	0,84 vs. 1,29	1,32 vs. 1,63	0,46 vs. 0,68
<i>S. terebinthifolius</i>						
FJ vs. FM	1.519 vs. 542	32 vs. 11	8 vs. 4	1,89 vs. 1,26	3,42 vs. 2,26	0,82 vs. 0,69
FJ vs. FA	1.519 vs. 119	32 vs. 3	8 vs. 3	1,89 vs. 1,09	3,42 vs. 0	0,82 vs. 0,66
FM vs. FA	542 vs. 119	11 vs. 3	4 vs. 3	1,26 vs. 1,09	2,26 vs. 0	0,69 vs. 0,66
Chuvoso vs. Seco	1.196 vs. 984	21 vs. 25	8 vs. 7	1,92 vs. 1,75	4,71 vs. 3,22	0,83 vs. 0,80
Asco vs. Basidio	-	8 vs. 38	3 vs. 5	0,90 vs. 1,53	1,74 vs. 1,54	0,53 vs. 0,77
Total						
FJ vs. FM	2.152 vs. 868	64 vs. 28	9 vs. 6	2,03 vs. 1,67	2,85 vs. 2,34	0,85 vs. 0,80
FJ vs. FA	1.152 vs. 231	64 vs. 9	9 vs. 3	2,03 vs. 0,99	2,85 vs. 1,57	0,85 vs. 0,59
FM vs. FA	868 vs. 231	28 vs. 9	6 vs. 3	1,67 vs. 0,99	2,34 vs. 1,57	0,80 vs. 0,59
Chuvoso vs. Seco	1.870 vs. 1.381	54 vs. 50	9 vs. 7	1,97 vs. 1,86	3,08 vs. 2,21	0,83 vs. 0,83
Asco vs. Basidio	-	34 vs. 71	4 vs. 5	0,87 vs. 1,55	1,17 vs. 1,22	0,48 vs. 0,77

^a Tecido vegetal: FJ – folhas jovens, FM – folhas medianas, FA – folhas adultas

Discussão

Os resultados do presente estudo se assemelham com outros trabalhos que também utilizaram a fragmentação do tecido vegetal como método para obtenção de fungos endofíticos. Por exemplo, Taylor et al. (1999) que estudaram folhas de *T. fortunei* e recuperaram apenas quatro leveduras; Guo et al. (2000) que isolaram apenas *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E. C. Hansen de tecidos de *Litchi chinensis*; Marcarthur e McGee (2000) que verificaram a presença de 26 fungos endofíticos identificados como Blastomycete, e Vieira et al. (2012) que estudaram a planta medicinal brasileira *Vaccinium macrocarpon* e conseguiram isolar 21 leveduras endofíticas.

A maceração do material vegetal propiciou a detecção de um maior número de leveduras, o que demonstra ser este método o mais apropriado do que os dois outros testados. Da mesma forma, Landell et al. (2006), utilizando a técnica de assepsia e maceração de folhas de Bromeliaceae da Floresta Atlântica no Brasil, isolaram 138 fungos sendo 40 espécies de leveduras endofíticas, das quais 16 ainda não eram conhecidas para a ciência. Os resultados obtidos na presente pesquisa contribuirão para o entendimento da relação das leveduras endofíticas com o seu hospedeiro, já que elas são pouco isoladas ou estudadas.

Este estudo parece ser o primeiro a descrever a diversidade de leveduras endofíticas em folhas nas duas plantas medicinais brasileiras estudadas. No Brasil, além de Landell et al. (2006) que estudaram leveduras em folhas de bromélias na Floresta Atlântica, Gai et al. (2009) estudaram leveduras endofíticas em folhas de *Citrus* coletadas em diferentes áreas de cultivo. Alguns autores têm demonstrado que a presença de fungos endofíticos pode variar com a idade e a química do tecido vegetal do hospedeiro (Arnold & Herre 2003; Jin et al. 2013), localização do tecido (Gai et al. 2009; Bezerra et al. 2013) e com a mudança temporal (Vieira et al. 2012), como foi verificado neste estudo. Estudando a planta medicinal brasileira *Solanum cernuum* Vieira et al. (2012) isolaram 18 leveduras endofíticas no período úmido e apenas três no período seco. Em relação à colonização, Gai et al. (2009) demonstraram por microscopia eletrônica de varredura a presença de leveduras em estômatos e xilema, reforçando, segundo os autores, a sua natureza endofítica. Também no Brasil, Bezerra et

al. (2013), em estudos com cactos relataram que leveduras endofíticas parecem preferir os tecidos mais internos do hospedeiro. Como os estudos sobre leveduras endofíticas ainda são insipientes, conclusões precisas acerca da sua participação no desenvolvimento vegetal são prematuras, sendo necessários mais estudos para definir a participação efetiva desses endófitos na sobrevivência das plantas nos diversos ambientes. Os resultados obtidos sugerem que leveduras endofíticas participam ativamente no desenvolvimento foliar das duas plantas medicinais estudadas e que possuem importância ecológica para o vegetal nas distintas estações climáticas.

A maioria das leveduras endofíticas isoladas nas folhas das duas plantas estudadas são Basidiomycota. Segundo Middelhoven (1997), a maioria das espécies de leveduras isoladas da superfície de folhas de plantas de ambientes tropicais pertencem ao filo Basidiomycota. No mesmo estudo, o autor registrou maior abundância de leveduras do filo Ascomycota quando utilizou plantas de região úmida, concluindo que a umidade pode influenciar a comunidade de leveduras em plantas de regiões tropicais.

Resultado similar ao presente estudo foi obtido por Landell et al. (2006), os quais registraram, em folhas de bromélias, maior riqueza de leveduras endofíticas do filo Basidiomycota (cerca de 30 espécies), com mais frequência de espécies de *Sporobolomyces*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula* mais frequentemente isoladas. Entre as áreas estudadas, os autores também verificaram que o índice de diversidade de Shannon variou entre 2,820 e 3,102 e a riqueza de leveduras endofíticas nas bromélias estudadas foi distintamente superior variando entre 26 e 34 (Landell et al. 2006). Espécies de *Cryptococcus* e *Rhodotorula* também foram mais isoladas em folhas de *Citrus* (Gai et al. 2009) cultivadas no estado de São Paulo, Brasil. As leveduras endofíticas pode ter a mesma ou superior importância que as leveduras da superfície vegetal, que, segundo Middelhoven (1997), podem proteger as plantas quando competem por nutrientes com os fungos fitopatogênicos. Isso confirmam a importância do estudo de leveduras endofíticas em plantas medicinais e outras plantas de interesse econômico com o intuito de se conhecer a diversidade destes micro-organismos, seus benefícios para o hospedeiro e importância biotecnológica.

Ambientes tropicais possuem uma grande diversidade de plantas e muitas têm sido utilizadas pelas populações tradicionais em diversas formulações para o tratamento de enfermidades. Esses ambientes apresentam uma variação climática que

predominantemente destaca um período úmido e outro seco. Alguns estudos de fungos endofíticos têm demonstrado que a variação temporal pode influenciar a comunidade de endófitos, como verificado nesta pesquisa. Estudando a associação de fungos endofíticos com *Phoradendron perrottettii* e *Tapirira guianensis*, em áreas de Cerrado no Brasil, de Abreu et al. (2010) registraram maior número de isolados (1.266) e de morfoespécies (92) nos tecidos vegetais coletados no período úmido. Os autores observaram aumento significativo no número de endófitos nos caules de *P. perrottettii* e nas folhas de *T. guianensis* na estação chuvosa. Contudo, folhas de *P. perrottettii* apresentaram o mesmo número de fungos endofíticos em ambas as estações. Variação da riqueza de espécies de fungos endofíticos durante as estações do ano também foi observada por Clay & Holah (1999) que estudaram a gramínea *Festuca arundinaceae* nos EUA. Em *Baccharis dracunculifolia*, Vieira et al. (2012) também verificaram maior riqueza de endófitos no período chuvoso. A umidade e a proximidade vegetacional em ambientes tropicais são fatores ambientais importantes para a infecção e dispersão fúngica (Rodrigues 1994; Suryanarayanan et al. 2002) e podem influenciar a micro diversidade endofítica fúngica (Taylor et al. 1999). Detecção de mais leveduras nas plantas estudadas no período úmido indica que a mudança temporal pode influenciar a colonização endofítica por leveduras e que estes endófitos acompanham o desenvolvimento das plantas.

A comunidade de leveduras endofíticas também foi influenciada pelo estágio de desenvolvimento das folhas de *H. impetiginosus* e *S. terebinthifolius* estudadas. Folhas jovens apresentaram o maior número de UFC, maior riqueza e diversidade de leveduras endofíticas nas duas plantas medicinais. Diferentemente dos nossos resultados, Arnold et al. (2003) observaram maior riqueza de fungos endofíticos em folhas de *Theobroma cacao* com mais idade. Da mesma forma, Vieira et al. (2012) observaram maior número de fungos endofíticos em folhas adultas e não conseguiram isolar endófitos nas folhas novas de *Baccharis dracunculifolia*. Resultados diferentes dos encontrados no presente estudo também foram obtidos por Jin et al. (2013) que estudaram folhas, caule e raiz de *Stellera chamaejasme* e observaram maior densidade e diversidade de endófitos em folhas e caules maduros.

As leveduras podem interagir ecologicamente e envolver-se com outros organismos e substratos (Rosa et al. 2006), além disso, o rompimento da cutícula das

células vegetais pode liberar substâncias que favorecem a distribuição e manutenção da comunidade de leveduras (Middelhoven 1997). Como o desenvolvimento foliar modifica a química da folha e esta pode influenciar a comunidade endofítica (Arnold & Herre 2003) e como já foi demonstrado que há uma maior abundância de fungos filamentosos em tecidos vegetais mais maduros (Arnold et al. 2003; Vieira et al. 2012; Jin et al. 2013) e estes podem produzir compostos antimicrobianos (Siqueira et al. 2011; Vieira et al. 2012), estes e outros fatores, tais como os ambientais, podem estar contribuindo com a menor abundância e riqueza de leveduras endofíticas em folhas adultas das duas plantas medicinais estudadas.

Semelhantemente, Bezerra et al. (2013) relataram que as leveduras endofíticas preferiram colonizar os tecidos mais internos do cacto estudado. O comportamento das leveduras deve diferir do comportamento dos fungos filamentosos, pois parece que estes micro-organismos preferem colonizar substratos com alto teor de açúcar (Carmo-Souza 1969) e o seu estabelecimento e manutenção em comunidades naturais podem ser influenciado pela produção de enzimas extracelulares (Trindade et al. 2002). Entretanto, tem-se considerado que a distribuição de leveduras não ocorre aleatoriamente em substratos açucarados, mas está intimamente relacionada com interações que ocorrem entre os micro-organismos, insetos e substratos (Phaff & Starmer 1980).

Somente este estudo descreveu a comunidade de leveduras endofíticas em folhas com distinto estágio de desenvolvimento de *S. terebinthifolius* e *H. impetiginosus* e demonstrou que as folhas jovens e período chuvoso possuem maior frequência de endófitos e que esta comunidade endofítica parece ter importância ecológica direta no desenvolvimento foliar das plantas estudadas durante a variação temporal. Além de fornecer informações sobre a diversidade de leveduras associadas com nichos específicos, esta pesquisa sugere que a presença de leveduras endofíticas em plantas medicinais é uma fonte de micro-organismos com potencialidades biotecnológicas, podendo contribuir para o entendimento das relações endofíticas de leveduras e fungos filamentosos nos estágios de desenvolvimento vegetal. Estudos associando técnicas (tradicionais, moleculares e proteômicas) que identifiquem leveduras e fungos filamentosos em distintos tecidos vegetais contribuem para o melhor entendimento da ecologia endofítica das plantas tropicais, com ênfase nas medicinais, economicamente importantes para o desenvolvimento sustentável.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE pelo apoio financeiro e bolsa de mestrado do primeiro autor. Ainda estendemos nossos agradecimentos a Universidade Federal de Pernambuco e aos colegas do Laboratório, pela ajuda técnica.

Referências

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.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A comunidade de leveduras endofíticas associada as plantas medicinais brasileira *S. terebinthifolius* e *H. impetiginosus* representa uma importante diversidade de fungos até então não estudada.

O número de UFC, riqueza e diversidade de leveduras endofíticas no período chuvoso difere significativamente do período seco.

As folhas jovens apresentam a maior comunidade de leveduras endofíticas associadas com as duas plantas medicinais estudadas.

As leveduras do filo Basidiomycota e a espécie *Rhodotorula glutinis* são os táxons mais frequentes nas plantas estudadas.

Leveduras endofíticas parecem contribuir com o desenvolvimento foliar das plantas medicinais estudadas e com a permanência delas em períodos de variação temporal.

Esta pesquisa da comunidade de leveduras endofíticas associadas a plantas *S. terebinthifolius* e *H. impetiginosus* é o primeiro estudo e nenhum outro verificou essa diversidade associada com folhas em distinto estágio de desenvolvimento e em mudança temporal das duas plantas medicinais brasileiras.