

**Fungos endofíticos associados a bromélias de restingas do Parque Nacional da Restinga
de Jurubatiba, Rio de Janeiro – Brasil**

**Endophytic fungi associated with the restinga bromeliads the National Park of
Jurubatiba Restinga, Rio de Janeiro - Brazil**

**Hongos endopíticos asociados con restinga bromélias del Restinga Parque Nacional de
Jurubatiba, Rio de Janeiro – Brasil**

Recebido: 06/05/2020 | Revisado: 04/06/2020 | Aceito: 08/06/2020 | Publicado: 20/06/2020

Gustavo de Andrade Bezerra

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6135-3737>

Universidade Federal de Goiás, Brasil

E-mail: guandrade.b@gmail.com

Vicente Mussi-Dias

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1023-1980>

Universidade Estadual do Norte Fluminense, Brasil

E-mail: vimdias@yahoo.com.br

Pedro Henrique Dias dos Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0325-7947>

Universidade Estadual do Norte Fluminense, Brasil

E-mail: pedroh_dias@hotmail.com

Beatriz Murizini Carvalho

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4662-5765>

Universidade Estadual do Norte Fluminense, Brasil

E-mail: b.murizini@yahoo.com

Tathianne Pastana de Sousa Poltronieri

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9155-7610>

Universidade Estadual do Norte Fluminense, Brasil

E-mail: tathianne_pastana@hotmail.com

Sivaldo Felipe da Silveira

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5020-5990>

Universidade Estadual do Norte Fluminense, Brasil

E-mail: slipes1967@gmail.com

Resumo

Ao longo da evolução, as plantas se adaptaram aos diferentes habitats terrestres e desenvolveram a capacidade de interagir com diferentes espécies de seres vivos, dentre os quais, destacam-se os fungos, e tem apresentado grande interesse biotecnológico ou científico e têm sido isolados e estudados a partir de plantas em diferentes biomas naturais. Com isso, objetivou-se identificar fungos endofíticos cultiváveis associados a Bromeliaceae da restinga de Jurubatiba, Estado do Rio de Janeiro. Duas coletas foram realizadas no Parque Nacional de Restingas de Jurubatiba (PNRJ), localizada na costa norte do estado. Amostras de folhas plantas sadias para o isolamento de fungos endofíticos foram coletadas das espécies de bromélias habitantes desta restinga: *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. (coleta 1) e *Bromelia antiacantha* Bertol (coleta 2). As plantas foram coletadas de forma aleatória visando-se cobrir toda a sua faixa mais representativa. Em laboratório, sob condições assépticas, efetuou-se procedimento de isolamento de fungos endofíticos mantidos sob armazenamento e posteriormente, identificação dos fungos isolados, sob microscópio óptico. Identificou-se os gêneros fúngicos: *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Monilia* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., e *Trichoderma* sp. Isolados de *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp. e *Monilia* sp. foram identificados em ambas bromélias coletadas. Dentro de cada gênero, os isolados foram agrupados e caracterizados em subtipos e, com base em levantamento bibliográfico, os fungos endofíticos encontrados poderão ser estudados para diferentes fins biotecnológicos e aplicabilidade nas diferentes vertentes do conhecimento, sendo que esse foi o primeiro relato de fungos endofíticos nessas espécies de bromélias.

Palavras-chave: Bioprospecção; Biotecnologia; Interação; Micoparasitismo.

Abstract

Throughout evolution, plants have adapted to different terrestrial habitats and developed the ability to interact with different species of living things, among which, fungi stand out, and have shown great biotechnological or scientific interest and have been isolated and studied from plants in different natural biomes. Thus, the objective was to identify cultivable endophytic fungi associated with Bromeliaceae from the Jurubatiba restinga, state of Rio de Janeiro. Two collections were made in the Restingas de Jurubatiba National Park (PNRJ), located on the north coast of the state of Rio de Janeiro. Samples of healthy plant leaves for the isolation of endophytic fungi were collected from the species of bromeliads inhabiting this restinga: *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. (collection 1) and *Bromelia antiacantha* Bertol (collection 2). Plants were collected at random in order to cover their most representative

range. In the laboratory, under conditions aseptic procedures, an isolation procedure for endophytic fungi kept under storage was carried out and, later, identification of isolated fungi, under an optical microscope. The fungal genera were identified: *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Monilia* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., And *Trichoderma* sp. Isolates of *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp. and *Monilia* sp. were identified in both collected bromeliads. Within each genus, the isolates were grouped and characterized into subtypes and, based on a bibliographic survey, the endophytic fungi found could be studied for different biotechnological purposes and applicability in different aspects of knowledge, and this was the first report of endophytic fungi. in these species of bromeliads.

Keywords: Bioprospecting; Biotechnology; Interaction; Mycoparasitism.

Resumen

A lo largo de la evolución, las plantas se han adaptado a diferentes hábitats terrestres y han desarrollado la capacidad de interactuar con diferentes especies de seres vivos, entre los cuales se destacan los hongos, y han mostrado un gran interés biotecnológico o científico y han sido aislados y estudiados. de plantas en diferentes biomas naturales. Por lo tanto, el objetivo fue identificar hongos endofíticos cultivables asociados con Bromeliaceae del banco de arena Jurubatiba, estado de Río de Janeiro. Se realizaron dos colecciones en el Parque Nacional Restingas de Jurubatiba (PNRJ), ubicado en la costa norte del estado de Río de Janeiro. Se recogieron muestras de hojas de plantas sanas para el aislamiento de hongos endofíticos de las especies de bromelias que habitan en este descanso: *Aechmea nudicaulis* (L.) Griseb. (colección 1) y *Bromelia antiacantha* Bertol (colección 2). Las plantas se recolectaron al azar para cubrir su rango más representativo. En el laboratorio, bajo condiciones procedimientos asépticos, se llevó a cabo un procedimiento de aislamiento para hongos endofíticos mantenidos bajo almacenamiento y, más tarde, identificación de hongos aislados, bajo un microscopio óptico. Se identificaron los géneros fúngicos: *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Monilia* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp. Y *Trichoderma* sp. Aislamientos de *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp. y *Monilia* sp. fueron identificados en ambas bromelias recolectadas. Dentro de cada género, los aislamientos se agruparon y caracterizaron en subtipos y, según una encuesta bibliográfica, los hongos endofíticos encontrados se pudieron estudiar para diferentes propósitos biotecnológicos y su aplicabilidad en diferentes aspectos del conocimiento, y este fue el primer informe de hongos endofíticos. en estas especies de bromelias.

Palabras clave: Bioprospección; Biotecnología; Interacción; Micoparasitismo.

1. Introdução

O Brasil possui 9.200 km de extensão de costa atlântica, sendo 5.000 km ocupados por ecossistema de restinga, ocorrendo desde o Rio Grande do Sul até o Amapá. Embora bastante extensa em comprimento, a largura da restinga varia de poucos metros a vários quilômetros, resultante de fenômenos relacionados à variação do nível do mar, às correntes marítimas, aos ventos fortes e aos processos de retenção de sedimentos (Rizzini, 1979). Esse ecossistema possui alta diversidade fitofisionômica, estando sob diversos tipos de influências bióticas e abióticas (Araújo et al., 2004; Menezes e Araújo, 2005), ora com predominância herbácea ou arbustiva, ora florestal, estabelecidas por influência no nível do lençol freático (Pereira, 2003).

Na diversidade vegetal das restinga, cujo quantitativo de famílias botânicas está em torno de 159, até o momento (Flora do Brasil, 2017), as Bromélias estão presentes nas mais diversas formações vegetais do ecossistema (Gomes e Silva, 2013). Pertencentes à família Bromeliaceae, ordem Poales, este grupo abrange cerca de um terço das monocotiledôneas, num universo de aproximadamente 20.000 espécies de plantas, representando grande variabilidade de formas, sendo em geral, plantas bem características quanto à sua floração. Essas características são conferidas às bromélias por possuírem diferentes habitats e, especialmente, porque a natureza do substrato influencia no aspecto da planta, que pode variar amplamente em tamanho e coloração das folhas, assim como na morfologia das flores (Schuttz et al., 2012).

Em função dessas variações, as bromélias desenvolveram, complexas interações com outros vegetais, animais e microrganismos que são parciais ou totalmente dependentes do microhabitat aquático formado em suas rosetas foliares. Além disso, ocorre uma gama impressionante de polinizadores, consumidores de frutos e dispersores de sementes que também dependem das bromélias (Kaehler et al., 2005), cujas interações são extremamente importantes para que os indivíduos se alimentem, se abriguem e se desenvolvam por meio das relações mutualísticas, como, por exemplo, àquelas envolvendo microrganismos endofíticos (Del-Claro, 2012).

Os fungos endofíticos, dessa forma, são aqueles que vivem no interior das plantas, habitando a parte aérea, tais como os caules, ramos e folhas, sem causar, aparentemente, qualquer dano aos seus hospedeiros (Linakoski et al., 2011) distinguindo-se dos fitopatogênicos e dos epifíticos, que causam doenças e que vivem na superfície da parte aérea da planta, respectivamente.

Esses organismos tornaram-se objeto de estudo de diversas pesquisas a fim de avaliar a ecologia, diversidade, fisiologia e adaptação da relação entre os parceiros (Rakotoniriana et al., 2007; Bayat et al., 2009). O interesse em investigar os fungos endofíticos reflete na natureza assintomática da interação com o hospedeiro, comparada ao mutualismo, porém, essa classificação é errônea devido a heterogeneidade dessas interações (Schulz et al., 2005), por ainda não serem bem compreendidas, uma vez que podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas (neste caso, estudadas pela fitopatologia) (Bae et al., 2009). Nas interações simbióticas os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta, tais como: a diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (Arnold et al., 2007; Akello et al., 2007; Redman et al., 2002; Bae et al., 2009). Dentre os metabólitos que podem ser induzidos pelos endófitos as fitoalexinas tem sido importante pois são substâncias de baixo peso molecular que apresentam atividades antimicrobianas, produzidas pelas plantas ante a ação de microrganismos ou de agentes estressantes (Bayat et al., 2009). Da parte dos fungos podem-se citar a produção de micotoxinas e metabólitos secundários que podem causar doenças em humanos e outros animais (Hong et al., 2000; Rodrigues et al., 2003).

Dentro da planta, os microrganismos endofíticos se encontram na região definida como endosfera, se estabelecendo protegidos com vantagens competitivas sobre os microrganismos presentes na rizosfera e filosfera. Além disso, na endosfera, os endófitos são favorecidos por condições ideais de nutriente, pH e umidade (Backmann et al., 2008; Linakoski et al., 2011).

Normalmente, mais de uma espécie de fungo endofítico pode ser obtida dos mesmos tecidos de um único hospedeiro. Entretanto, a preferência pelo local de sua colonização pode ser um reflexo do conteúdo daquele tecido específico, uma vez que diferentes tecidos e órgãos vegetais podem representar microhabitats distintos (Santos et al., 2003).

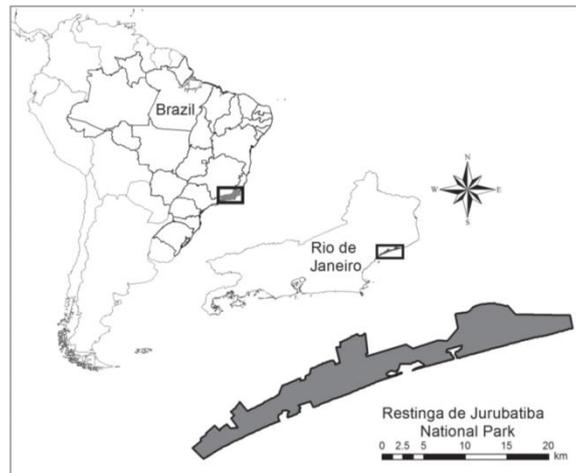
Como as informações sobre fungos endofíticos em bromélias são escassas e muito menos àquelas relacionadas às espécies presentes no ecossistema de restinga, nosso trabalho teve como objetivo isolar, identificar e realizar manutenção dos fungos endofíticos de duas espécies de bromélias comumente distribuída e encontrada em áreas da restinga do Parque Nacional de Restinga de Jurubatiba, RJ.

2. Material e Métodos

O presente trabalho trata-se de uma pesquisa experimental, quantitativa e exploratória, seguindo os preceitos fundamentais deste tipo de pesquisa, conforme recomendam Pereira et al. (2018). Parte dos dados quantitativos foram obtidos em campo e parte em laboratório.

As coletas foram realizadas no Parque Nacional de Restingas de Jurubatiba (PNRJ) (22°16'41 "S; 41°39'41"W), localizado na costa norte do estado de Rio de Janeiro, Brasil (Figura 1).

Figura 1. Localização do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, no litoral norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil, de onde foram obtidas amostras de folhas de bromélias para isolamento de fungos endofíticos.



Fonseca et al., 2015.

A área percorrida (Figura 1), apresenta, segundo a classificação de Alvarez (2013), o clima predominante na região é do tipo tropical com inverno seco (*Aw*) com uma temperatura média anual entre 22 °C e 24 °C. A média anual de pluviosidade é de 1000 a 1300 mm. A área apresenta 14.922,39 hectares, 44 Km de costa e 18 lagoas costeiras, onde os pontos de coletas foram gerados iniciando-se a partir do município de Macaé, passando por Carapebus e finalizando em Quissamã, dos quais foram obtidas as folhas de bromélias de vegetação de moitas em pleno sol, em uma faixa de vegetação após a faixa de areia que separa o mar do ecossistema aproximadamente de 2 em 2 km de distância umas das outras. Duas épocas para as coletas foram feitas, sendo a primeira em julho de 2015 e a segunda em outubro de 2015.

Coleta de material botânico

Amostras de folhas sadias das bromélias *Aechmea nudicaules* (L.) Griseb. e *Bromelia antiacantha* Bertol., onde se encontraram maduras e em fase de floração, foram obtidas para o isolamento de fungos endofíticos. As folhas foram coletadas de moitas distando de 2 em 2 km umas das outras, ao longo de toda a faixa longitudinal, paralelas à praia. Foram amostras folhas maduras e sadias no terço superior da planta. Folhas manchadas, amarelcidas ou apresentando sinais ou sintomas de senescência foram descartadas.

Obtiveram-se 3 folhas/plantas em cerca de 30 pontos diferentes de coletas (moitas) para *A. nudicaulis* e 10 pontos de coleta para *B. antiacantha* (Figura 2). Cada folha foi acondicionada em sacola de papel, devidamente identificada e mantida em caixa térmica com temperatura aproximadamente de 18 °C, até o processamento em laboratório.

Figura 2. Bromeleaceas coletadas no PNRJ para isolamento de fungos endofíticos: (A) *A. nudicaulis*; (B) *B. antiacantha*.



Fonte: autores.

Isolamento e preservação dos fungos

O isolamento foi realizado a partir das folhas que foram lavadas com detergente neutro, sob água corrente, para a retirada do excesso de impurezas e da flora epifítica residente. Posteriormente, o material foi colocado sobre papel toalha para a secagem do excesso de água.

Com auxílio de um furador de rolha (1,3 cm de diâmetro) retiraram-se seis fragmentos do terço médio das folhas, os quais foram imersos em álcool 70% (1 min.), hipoclorito de sódio 1,5% (1 min.), álcool 70% (30 s) para retirar o excesso de hipoclorito e, tríplice lavagem em água destilada estéril (Mussi-Dias et al., 2012). Todo o procedimento foi realizado sob câmara asséptica.

Os seis fragmentos, de cada folha, foram depositados em duas placas de Petri contendo meio de cultura “BDA” (batata, dextrose e ágar), acrescido de 0,2% de extrato de levedura e Chloranphenicol (0,05g/L em 10 ml de álcool) (Freire e Bezerra, 2001) modificado. As placas foram mantidas em câmaras de crescimento do tipo “BOD” a 28 °C, com fotoperíodo de 12 horas até o crescimento das colônias fúngicas. Quando necessário, de cada colônia crescida, foram feitas repicagens para outras placas contendo meio de cultivo para purificação dos isolados (Alfenas e Mafia, 2007). Após isolamento de cada isolado, os fungos foram mantidos pelos métodos de Castellani e em tubos com meio inclinado, apontados como ideais para esse tipo de armazenamento.

Identificação e caracterização dos fungos

As observações das características morfológicas e culturais de cada isolado foram realizadas através de lâminas, ao microscópio óptico, confeccionadas a partir das estruturas reprodutivas obtidas das colônias crescidas em BDA ou em microcultura

A identificação dos fungos ao nível gênero foi baseada em chaves dicotômicas distintas para cada grupo taxonômico (Hanlin, 1996; Barnett e Hunter, 1998; Seifert et al., 2011). Posteriormente, procedeu-se a fotodocumentação das lâminas em microscópio óptico (modelo Nikon i80) das estruturas dos fungos, com auxílio do software “Imaging Software Nis-Elements”.

As colônias de isolados obtidos e identificados como sendo de mesmo gênero foram cultivadas em placas de Petri e agrupadas de acordo com as semelhanças visuais de forma, crescimento, coloração e produção de corpos de frutificação ou conidiomas.

Análise dos dados

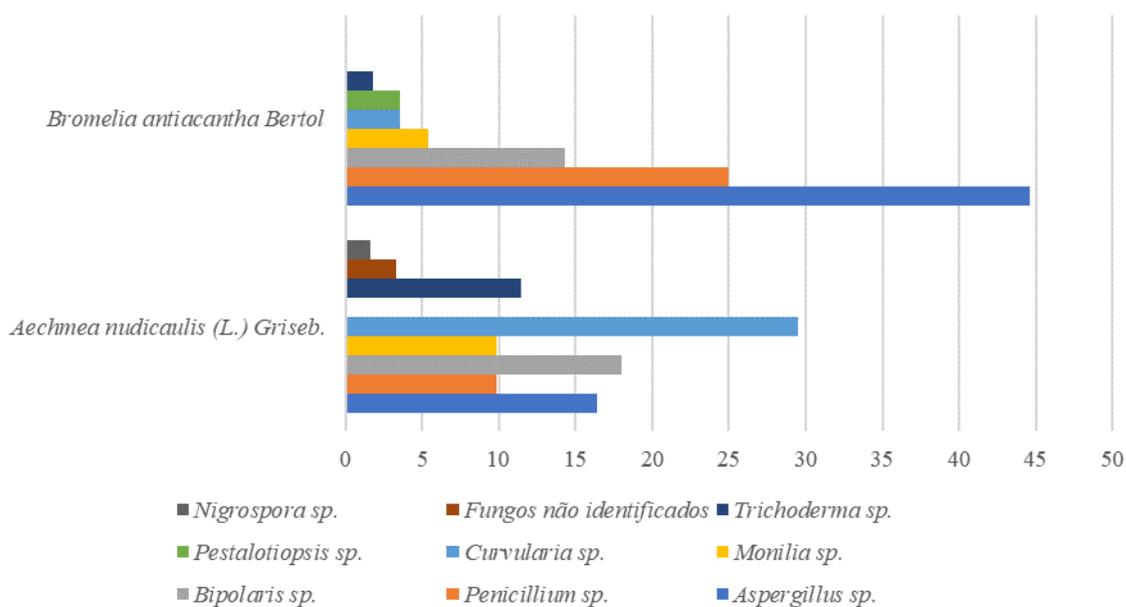
Foi realizada avaliação da frequência (percentuais) dos isolados encontrados conforme gênero provável identificado e para cada gênero, com base na identificação morfológica previamente descrita.

3. Resultados e Discussão

Das duas coletas realizadas no PNRJ, foram isolados representantes de 8 gêneros fúngicos, oriundos de 166 colônias, a partir de 206 fragmentos de folhas assintomáticas de bromeleaceae. Destas, cerca de 30 colônias oriundas de fragmentos assintomáticos foram consideradas como “fungos não-identificados” por não esporularem em meio de cultura.

Houve uma frequência diferenciada de isolados por espécie de bromeleaceae. Na espécie *Aechmea nudicaulis*, gênero mais abundante foi *Trichoderma* (29,51%) e na espécie *Bromelia antiacantha*, foi *Pestalotiopsis* sp. (44,64%) (Figura 3).

Figura 3 – Gêneros de fungos endofíticos obtidos de bromeleáceas do Parque Nacional da Restingas de Jurubatiba, RJ.



Fonte: autores.

Houve uma maior frequência de fungos na espécie 1, devido ao número de coletas relacionados com a espécie. Na coleta 1, referente a espécie 1, onde foram realizadas coletas de folhas em 30 pontos, 64% dos fungos isolados demonstraram características de cultivo, com estruturas reprodutivas aparentes, onde 36% foram de fungos que não esporularam em meio de cultivo.

Na coleta 2, referente a espécie 2, das folhas coletadas em 10 pontos, 88% dos isolamentos realizados, os fungos apresentaram estruturas reprodutivas em meio de cultivo,

entretanto, 12% desses isolamentos, foram de fungos que não esporularam em meio de cultivo. Com isso, indaga-se que alguns fungos endofíticos possuem preferência pela colonização de determinados órgãos ou parte destes, o que expressa certo grau de especificidade desses fungos a nichos restritos e bastantes característicos em seus hospedeiros. Estes microrganismos encontrados, representam uma grande diversidade, e sua frequência no hospedeiro é fortemente influenciada por fatores climáticos. Por causa desta diversidade, a maioria dos estudos tem focado mais a composição de espécies de fungos e seus padrões de distribuição do que as relações e funções exercidas pelos endófitos sobre seus hospedeiros (Arnold et al., 2003).

Arnold, et al (2003), conta que a composição de fungos associada a uma mesma espécie vegetal não se altera muito quando as amostragens são realizadas em locais de coleta distantes. Entretanto, a frequência relativa das espécies de fungos, mesmo entre plantas de mesma espécie, pode variar bastante de acordo com o regime de chuvas de cada local, o método de isolamento dos endófitos a partir do hospedeiro e a idade dos órgãos vegetais utilizados.

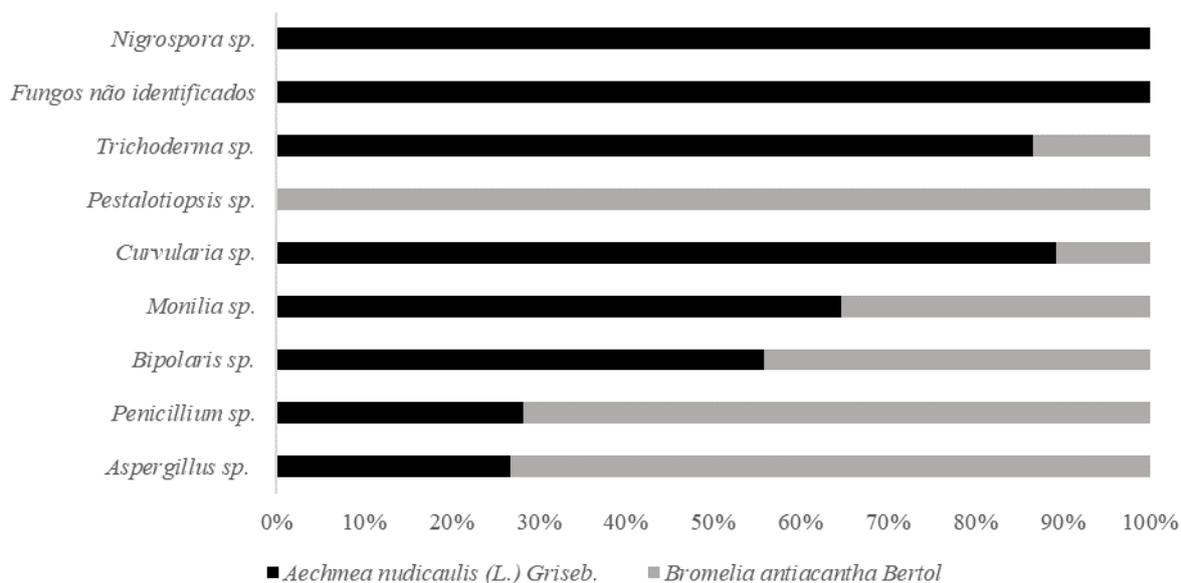
Além disso, observou-se que alguns isolados tendem a perder a viabilidade muito rapidamente, quando cultivados *in vitro*.

Não há relatos desses gêneros fúngicos em interação com essas espécies de bromélias. As bromélias abrigam uma grande diversidade de organismos e, segundo Maki (2006), a estrutura de comunidades endofíticas variam em função do ambiente ao qual as plantas se encontram, bem como, das oscilações de fatores abióticos, tais como, temperatura e regime de chuvas. Contudo, a riqueza e a composição de fungos endófitos podem também estar relacionadas às estações do ano em que se realizam as coletas (Assunção, 2010).

Proferiu-se uma análise de dados agrupados dos isolados identificados e pode-se constatar que embora alguns isolados tenham sido exclusivamente encontrados em uma das duas espécies de bromélias, não se espera que estes sejam relacionadas a uma especificidade, o que somente poderá ser confirmado com ampliação dos estudos e novas coletas. Em *Aechmea nudicaulis* foram exclusivos os gêneros *Bipolaris* sp. e *Curvularia* sp., enquanto em *Bromelia antiacantha*, o gênero *Monilia* sp. foi exclusivo na análise. Os demais gêneros identificados (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Trichoderma* sp., e *Nigrospora* sp.) foram encontrados em ambas bromélias, mas com diferentes frequências. Os demais isolados que foram caracterizados como “fungos não-identificados”, apresentaram o mesmo padrão cultural no isolamento e esses fungos apresentaram-se constantes e bastante

homogêneos (Figura 4). Na ausência de esporos, estudos de sequenciamento de genes ITS e outros deverão possibilitar a identificação destes isolados.

Figura 4 – Análise da similaridade e dominância dos gêneros fúngicos em espécies vegetais de bromeleaceae coletadas no Parque Nacional de Restingas de Jurubatiba, RJ.



Fonte: autores.

O estudo revelou que as bromélias *A. nudicaulis* e *B. antiacantha* apresentaram uma baixa diversidade de fungos endofíticos cultiváveis. Estas espécies botânicas apresentam cisternas maiores, que acumularam um maior volume de água e substratos vegetais propiciando assim, possivelmente condições favoráveis ao desenvolvimento de fungos conidiais endofíticos. Todavia, as limitações metodológicas, meios de cultura testados, bem como a forma e intensidade das amostragens efetuadas, restringiram possivelmente o isolamento de maior gama de fungos cultiváveis.

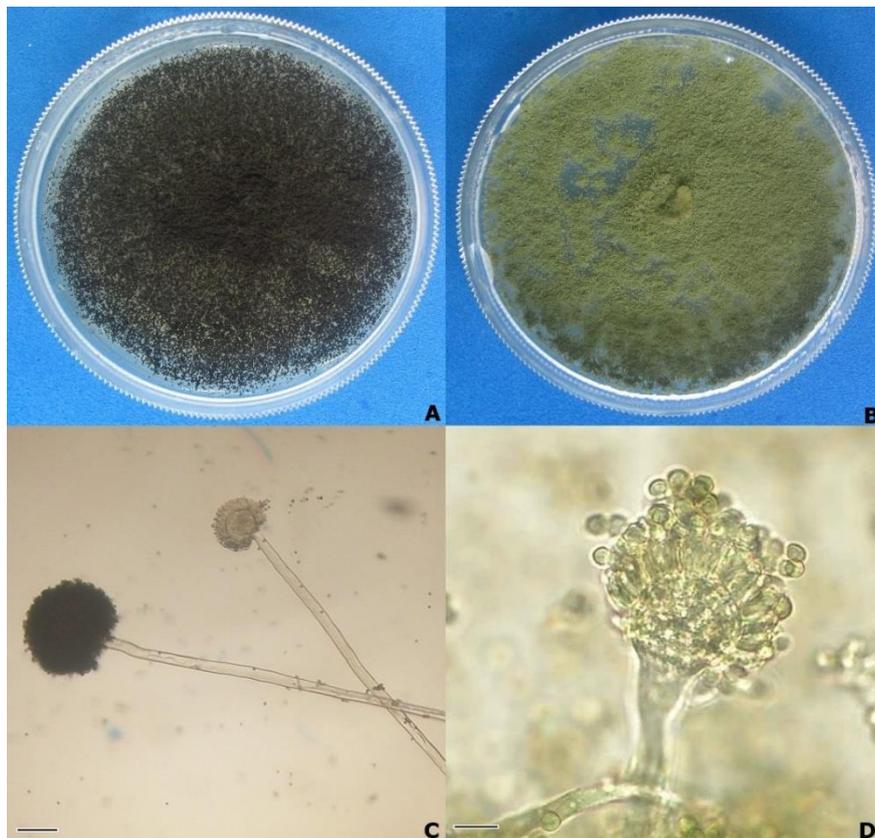
Caracterização dos grupos de isolados endofíticos obtidos das bromélias

Dos fungos endofíticos isolados das duas espécies de bromélias coletadas na restinga do PNRJ 08 gêneros ocorreram em maior frequência.

Duas espécies do fungo *Aspergillus* ocorreram como endofíticos de bromélias sendo distintos entre si. Foram observadas colônias com conídios em massa pulverulenta de

coloração negra, características da espécie do grupo *Aspergillus niger* e colônias com coloração esverdeada, típica de espécies do grupo *Aspergillus flavus* (Figura 5).

Figura 5 - *Aspergillus* endofíticos obtidos de bromélias do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ. Colônias de *Aspergillus niger* (A) e *Aspergillus flavus* (B). Conidióforos, vesícula, fiáldes e conídios característicos de cada espécie (C e D), respectivamente.



Fonte: autores.

Fungos do gênero *Aspergillus* são constituídos por inúmeras espécies, sendo a maioria, fungos hialinos que não produzem pigmento melanínico nas suas hifas e conidióforos em cultura pura (Gibbons e Rokas, 2013). A característica microscópica que define este gênero é o seu conidióforo semelhante a um “aspergillum” ou asperge, um objeto utilizado pelo clero da Igreja Católica para aspergir água benta durante uma parte da liturgia (Bennet, 2010; Gibbons e Rokas, 2013).

Este gênero compõe-se das principais espécies de microrganismos produtores de enzimas de interesse alimentício, com utilidades, tais como a clarificação de sucos de frutas (pectinases), fabricação de xaropes (amilases) e a produção do ácido cítrico. São também

descritos como produtores de micotoxinas sendo, portanto, de interesse tanto econômico quanto médico (Sousa et al., 2004).

Espécies de *Aspergillus* são comuns no solo e em matéria orgânica em decomposição, principalmente em regiões de clima quente (Ribeiro, 2009), podendo se sapróbias e cosmopolitas apresentam fácil disseminação, além de causarem deterioração em grãos e sementes (Cirio e Lima, 2003), afetando a produção agrícola. As aflatoxinas produzidas por algumas espécies desse gênero são altamente tóxicas e carcinogênicas para homens e animais (Sessegolo et al., 2011). Em algumas espécies vegetais o isolamento de *Aspergillus* sp. como fungo endofítico em folhas já foi relatado, tais como em *Ilex paraguariensis* (Pimentel et al., 2006) e em *Eremanthus erythropappus* (Magalhães et al., 2008).

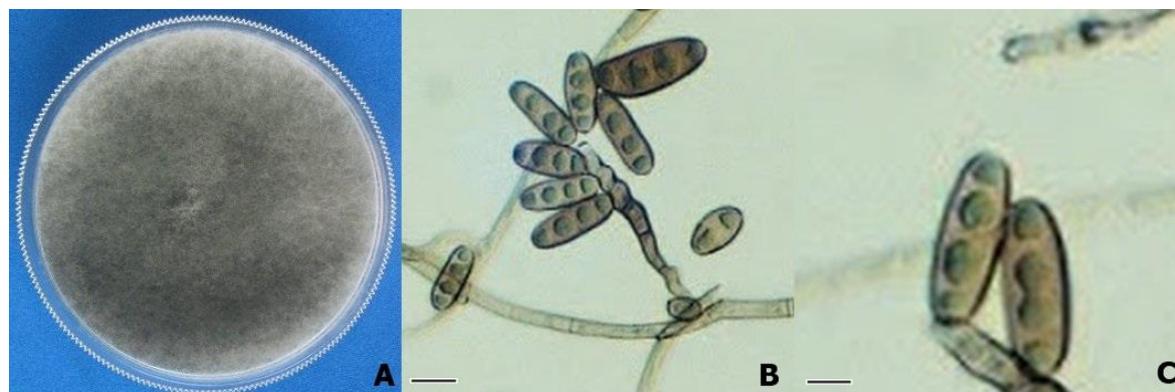
Muitas espécies de *Aspergillus*, tem sido relacionada à habilidade na solubilização de diferentes fontes de fosfato, associados à produção de ácidos orgânicos (Chuang et al., 2007) podendo constituir em alternativa para reduzir custos de produção e estabelecer a sustentabilidade do sistema agrícola (Vassilev et al., 2006).

Entre as espécies desse gênero, *A. niger* tem sido bastante estudado por sua habilidade em produzir ácidos orgânicos, principalmente o ácido cítrico (Bizukoje e Ledakowicz, 2004). Inúmeros mecanismos têm sido propostos, com relação à sua regulação e síntese, sendo a produção deste ácido influenciada pelo pH do meio, pelas fontes de carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P) e micronutrientes (Papagianni et al., 2005).

A obtenção de isolados oriundos de novas fontes, ainda pouco exploradas, como é o caso de bromélias adaptadas às restingas pode contribuir na bioprospecção de espécies novas, ainda não descritas, bem como isolados promissores para serem utilizados em benefício do homem.

Dos isolamentos realizados a partir de folhas de bromélias só houve a ocorrência de um tipo de *Bipolaris* sp. (Figura 6), não há relatos na literatura, até o momento, de detecção deste gênero como um endófito em bromeliáceas.

Figura 6 - *Bipolaris* sp. endofítico obtido de bromélias do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ. Aspecto da colônia do fungo cultivado em meio de cultura (A). Conidióforo e conídios (B e C).



Fonte: autores.

Por se apresentar bastante diverso entre espécies vegetais, o gênero *Bipolaris* (figura 6), apresenta diversificação entre espécies dentro do seu gênero, com diferenciações no conidióforo e conídio, podendo transitar entre outros gêneros.

O isolado de *Bipolaris* obtido apresentou colônias com aparência aveludada e conídios levemente curvos, fusiformes e elipsoidais, arredondados no ápice, e com conidióforos não ramificados. Há, no entanto, possibilidade de o fungo ser reclassificado, uma vez que inúmeras isoformas de *Bipolaris* são hoje consideradas *Curvularia*, com base em análise filogenética de sequências de DNA e, a distinção de *Bipolaris* e *Curvularia* como formas não parasíticas é imprecisa com base apenas na morfologia de conidióforos e conídios (Manangoda et al, 2012).

Espécies de *Bipolaris* são taxonomicamente relacionadas a espécies de *Drechslera*, *Exserohilum* e *Curvularia*, grupo que abriga importantes patógenos de plantas e saprófitos (Pratt, 2006). Em sua fase sexual, tanto *Bipolaris* spp. quanto *Curvularia* spp. são hoje tratados como teleomórfos de *Cochliobollus* (Manamgoda et al., 2012).

Este fungo é capaz de produzir pigmentos amarelo-alaranjados, em meio de cultura, que apresentam dois tipos de estruturas, a antraquinônica e os derivados de xantona. Espécies de *Bipolaris* sp. têm sido utilizadas na biorremediação da poluição por óleo cru no Kuwaiti, devido à sua capacidade de crescer e degradar o hidrocarboneto em meios com altas concentrações de NaCl (+10%) e em altas temperaturas (Obuekwe et al., 2005). Algumas espécies também têm sido estudadas e apresentando bons resultados como micoherbicida para o controle ervas daninhas (Evidente et al., 2005).

Estudos com extratos produzidos por *Bipolaris* tem sido realizado no controle do crescimento celular. De 186 extratos de fungos endofíticos, de diversos gêneros, isolados da planta *Smallanthus sonchifolius*, cerca de 12% apresentaram moderada ou alta atividade citotóxica contra células tumorais e foram considerados promissoras fontes de compostos anticancerígenos. Dentre estes fungos, *Bipolaris* chamou a atenção, pois seu extrato foi capaz de inibir o crescimento celular (Gallo et al., 2009).

Espécies do complexo *Bipolaris* normalmente podem causar lesões foliares necróticas, provocando a morte dos tecidos em várias gramíneas, como por exemplo, a mancha de *Bipolaris*, importante doença foliar da cultura do milho (Trigiano et al., 2010). Portanto, estudos de patogenicidade com isolados endofíticos são recomendados para a confirmação dessa relação.

Um único isolado *Curvularia* foi obtido a partir de folhas de *A. nudicaulis*. Este gênero é caracterizado como um fungo filamentosso dematiaceo (Figura 7).

Figura 7 - Colônia de *Curvularia* sp., endofítica de bromélias do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ. a) aspecto lanoso do micélio quando cultivado em placa de Petri contendo meio BDA; b e c) conídios e conidióforos.



Fonte: autores.

A colônia do fungo *Curvularia* apresenta aspecto lanoso, comumente encontrado em diferentes espécies vegetais, apresentando diferentes tipos de reações patogênicas ou endofíticas. Na figura 7, os conídios são de forma oblonga e apresentando septos entre suas ramificações. Considerado como saprófita do solo, as características da colônia se apresentam como sendo de crescimento rápido, preenchendo toda a placa em menos de uma semana, coloração inicialmente verde escura, tornando-se preto-acinzentada com reverso da placa preto e, textura lanosa.

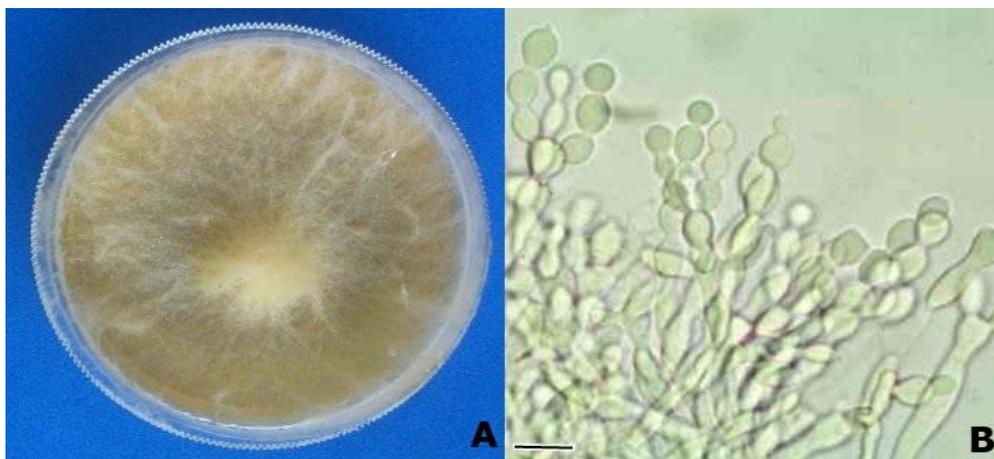
Fungos do gênero *Curvularia* são frequentemente encontrados como sapróbios, fitopatogenos ou endófitos em diferentes substratos vegetais, (Ferreira, 2010; Lima e Furtado, 2007). Como fitopatógenos causam manchas em culturas de grande importância como trigo, milho, arroz, sorgo, cevada, aveia e centeio (FERREIRA, 2010). Tem sido encontrado associado a manchas foliares e endofiticamente em diversas espécies de *Heliconia* (Lins e Coelho, 2004; Costa, 2007; Sobrinho, 2008; Santos et al., 2009), como *C. lunata* isolada de *H. chartacea* cv. Sex Pink, bem como de folhas de *Musa* (Assunção, 2010) e de *Vitis lambrusca* (Lima, 2010).

As variações presentes neste gênero estão distribuídas entre mais de 40 espécies (Watanabe, 2010) e ainda não se conhece o papel biotecnológico para este gênero, embora *C. geniculata* tenha demonstrado atividade positiva na supressão de organismos patogênicos e *C. lunata* na produção de enzimas do sistema lignolítico e biossurfactante (Chomcheon et al., 2010).

O gênero *Monilia* apresenta informações escassas nas literaturas. Em meio de cultura, o fungo cresce rápido produzindo conídios hialinos que variam conforme a temperatura e o hospedeiro. A coloração da colônia vai de branca a alaranjada com margem inteira, micélio aéreo inicialmente escasso e posteriormente zonado concêntrico.

Das bromélias do PNRJ foram obtidos somente dois isolados distintos entre si, de *Monilia*, a partir da espécie *B. antiacantha* (Figura 8).

Figura 8 - Colônias de *Monilia* sp. endofíticas de bromélias do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ. (a) aspecto do crescimento em placa de Petri contendo meio BDA; b) conídios e conidióforo.

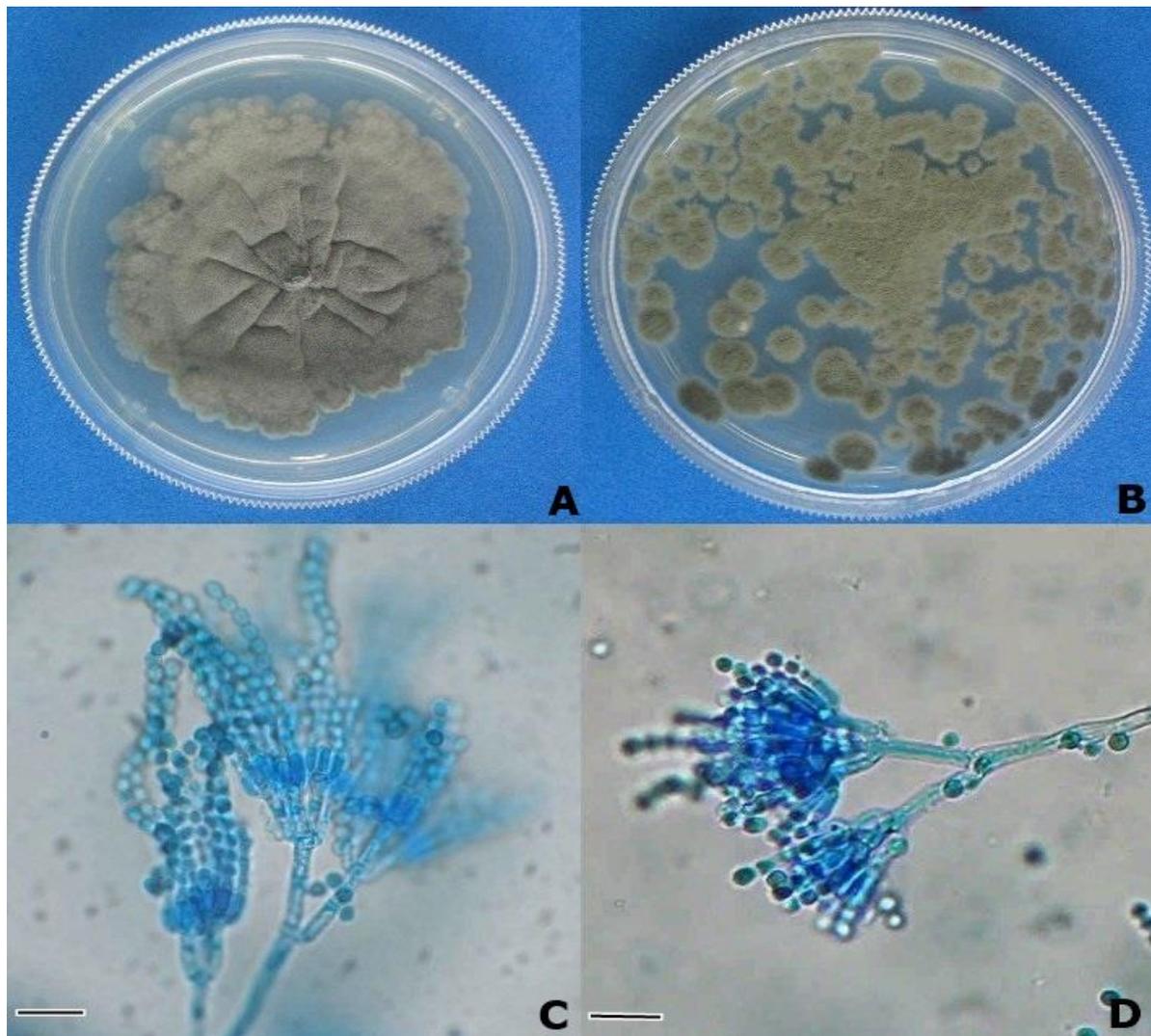


Fonte: autores.

As colônias do gênero *Monilia* (figura 8) apresentam aspectos laranjados cotonoso, com os conídios aéreos em desenvolvimento em cadeia, ovalados.

O gênero *Penicillium*, isolado de folhas de bromélias, apresentou dois padrões quanto à morfologia das colônias, porém em análises microscópicas, não foram diferentes entre si. Em bromeleaceae, não há relatos de interações endofíticas envolvendo o fungo *Penicillium*, a não ser como fitopatígeno de frutos de abacaxi (Verzignassi et al, 2009). Todos os isolados obtidos apresentaram coloração esverdeada, característica da cultura em meio BDA (figura 9).

Figura 9 - Colônia de *Penicillium* endofíticas de bromélias do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ. (A, B) organização da colônia do fungo em placa de Petri contendo meio BDA; deposição do gênero *Penicillium* em microscópio óptico, com detalhe da organização dos conídios e conidióforo (C e D).



Fonte: autores.

Os fungos do gênero *Penicillium* comporta inúmeras espécies e são filamentosos com hifas septadas e hialinas. As diferentes espécies apresentam um crescimento rápido em meio de cultura devendo ser incubadas à temperatura adequada ao local de origem ou da infecção. Em microscópico a estrutura geral do conidióforo é específica e identifica o gênero (Figura 9).

O fungo *Penicillium* sp., é conhecido como o fungo dos bolores cuja coloração verde ou azul é uma característica específica deste gênero.

Este fungo possui grande importância, sendo utilizado como organismo modelo em diversos estudos de pesquisa básica e pesquisa aplicada, por exemplo, controle biológico, secreção de metabólitos secundários, fonte de novos fármacos para indústria farmacêutica, fonte de enzimas de interesse industrial, entre outros (Wang et al., 2008). Tem sido frequentemente isolado como endofítico em tecidos de diversas plantas, sendo que o seu papel nesta condição está associado intrinsecamente ao hospedeiro e as condições ambientais envolvidas (Cao et al., 2002).

Espécies de *Penicillium* vem sendo citadas como endófitos produtores de metabólitos secundários bioativos e com potencial de aplicação na indústria farmacêutica e química, tais como esteroides produzidos por *Penicillium* sp., endófito de *Melia azedarach* (Marinho et al., 2009). Wang et al. (2008) descreveram a atividade de metabólitos secundários de *Penicillium* sp. isolado das folhas de *Hopea hainanensis*, relatando a ação destes contra *Candida albicans*, *C. krusei* e *A. niger*.

Estudos relatam a grande frequência desse gênero habitando internamente tecidos de cana-de-açúcar, assim como a rizosfera (Stuart, 2006; Mendes, 2008; Fávoro, 2009; Romão, 2010), folhas e raízes de *Musa acuminata* (Cao et al., 2002), de folhas, raízes e frutos de *Melia azedarach* (Santos et al., 2003) e em café (*Coffea arabica*, *C. congensis*, *C. dewevrei* e *C. liberica*), os quais foram caracterizados como *P. brevicompactum*, *P. brocae*, *P. cecidicola*, *P. citrinum*, *P. coffeae*, *P. crustosum*, *P. janthinellum*, *P. olsonii*, *P. oxalicum*, *P. sclerotiorum* e *P. steckii* (Vega et al., 2008)

Narloch et al. (2002) estudaram o efeito dos fungos solubilizadores de fosfato *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. associados em diferentes doses de fosfato na produção da matéria seca e na absorção de fósforo pela cultura do rabanete.

De acordo com os autores os isolados diferiram quanto capacidade de promover a produção de matéria seca, dependendo da dose de fósforo aplicada. Plantas submetidas à inoculação de *Penicillium* sp. com 17,5 mg kg⁻¹ de P apresentaram produção de matéria seca equivalente às obtidas por plantas com até 70,0 mg de P por kg de solo, sem inoculação.

O gênero *Pestalotiopsis* foi o mais abundante isolado de *B. antiacantha*, mostrando frequência de 44,64% dos isolados identificados. Apresentou cerca de 6 (seis) grupos morfológicos, com disposições regulares e irregulares de conidiomas (Figura 10).

Apesar do reconhecimento da importância crescente do gênero *Pestalotiopsis*, a identificação de isolados em nível de espécie ainda é muito complexa.

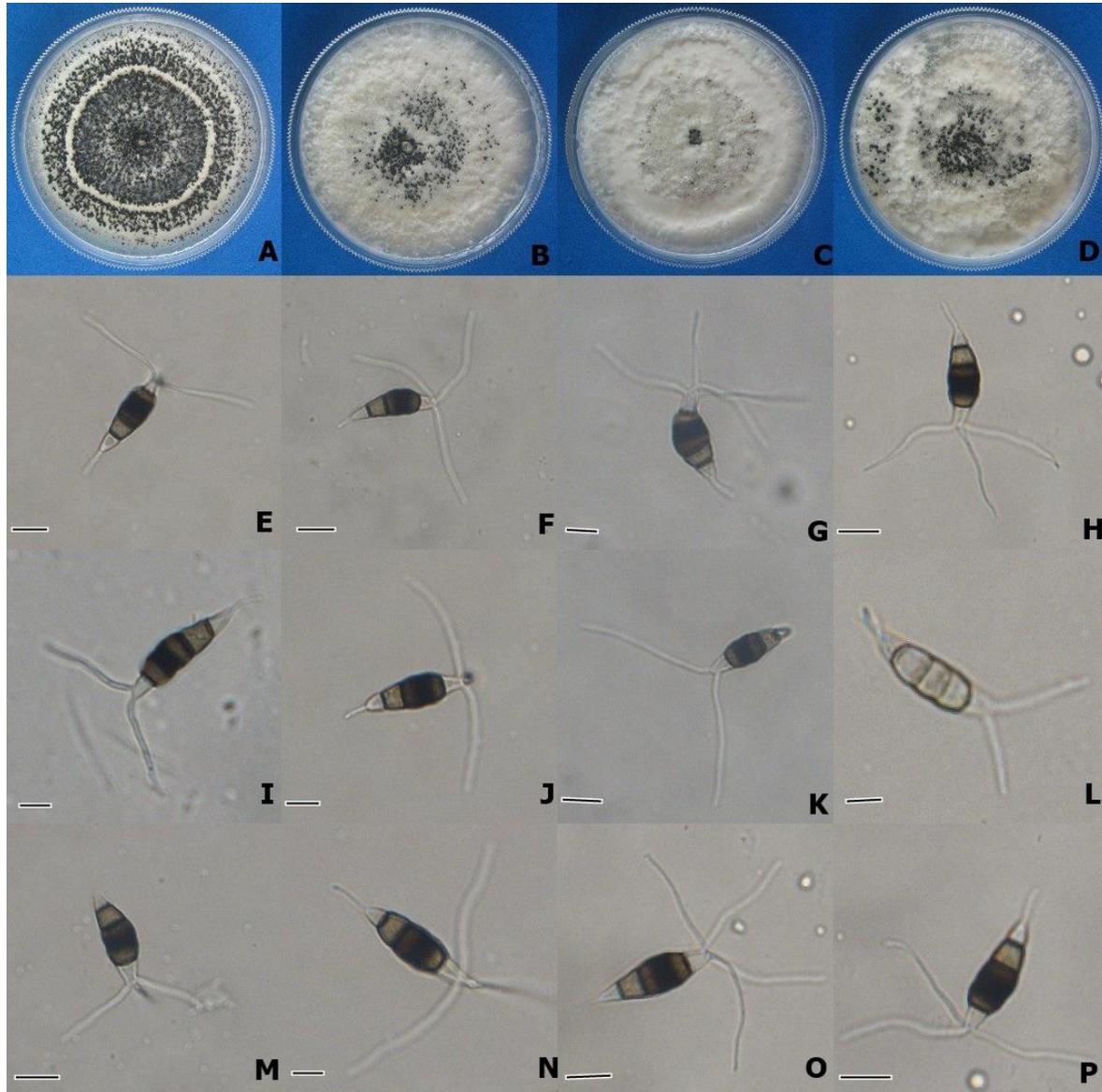
Características consideradas relevantes em chaves baseadas exclusivamente na morfologia nem sempre combinam com a posição taxonômica de isolados obtida por meio de dados de sequenciamento de DNA.

Liu et al. (2010) conseguiram associar a característica morfológica, pigmentação das células medianas do conídio com relações filogenéticas inferidas por sequências de DNA de regiões ITS e do gene da β - tubulina.

Espécies do gênero *Pestalotiopsis* podem ser encontradas como endofíticas, sapróbias e fitopatógenos (Kruschewsky, 2010). São de ocorrência comum em *Anacardium occidentale* (Kimati et al., 1997), *Eucalyptus* spp., *Ananas lucidus* (Barguil et al, 2008), *Caryota mitis* (Pessoa et al., 2008), *Licuala grandis*, *Rhaphis excelsa*, *Heliconia rostrata*, *H. psittacorum*, *H. psittacorum* cv. *Golden Torch*, *Etilingera elatior*, *H. psittacorum*, *H. rostrata*, *Heliconia* sp., *H. bihai* cv. *Chocolate*, *H. latispatha*, *H. orthotricha* cv. *She*, *H. orthotricha* cv. *Total Eclipse*, *Vigna unguiculata* (Rodrigues; Menezes, 2002; Sologuren; Juliatti, 2007; Castro, 2007; Kruschewsky, 2010). *Pestalotiopsis microspora*, *P. maculans* e *Pestalotiopsis* sp. são endofíticas em raízes de *Vellozia compacta* (Rodrigues, 2010), folhas de *Musa* spp. (Assunção, 2010), *Vitis labrusca* (Lima, 2010) e *Pinus taeda* (Pimentel et al., 2010).

Espécies de *Pestalotiopsis* já foram descritas como endófitos em várias plantas, mas para poucas gimnospermas. Wei & Xu (2007) descreveram a ocorrência de cancro provocado por *P. funerea* em gimnospermas adultas de *Cupressocyparis leylandii* na Itália; Yang et al. (2011) isolaram *P. photiniae* da gimnosperma chinesa *Podocarpus macrophyllus*. Entretanto, alguns estudos demonstraram a presença de espécies de *Pestalotiopsis* como fitopatógenos. Gangadevi & Muthumary (2009) caracterizaram isolados de *Pestalotiopsis* capazes de causar apodrecimento das folhas e caules de *Camellia sinensis* no sul da Índia.

Figura 10 – *Pestalotiopsis* sp. endofíticas de bromélias do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ. (A, B, C, D) Variações morfológicas de colônias de *Pestalotiopsis* sp. em meio BDA, em colônias com 7 dias de crescimento; (E – P) conídios apresentando 2 apêndices basais, 3 apêndices basais, 4 apêndices basais e um apical.



Fonte: autores.

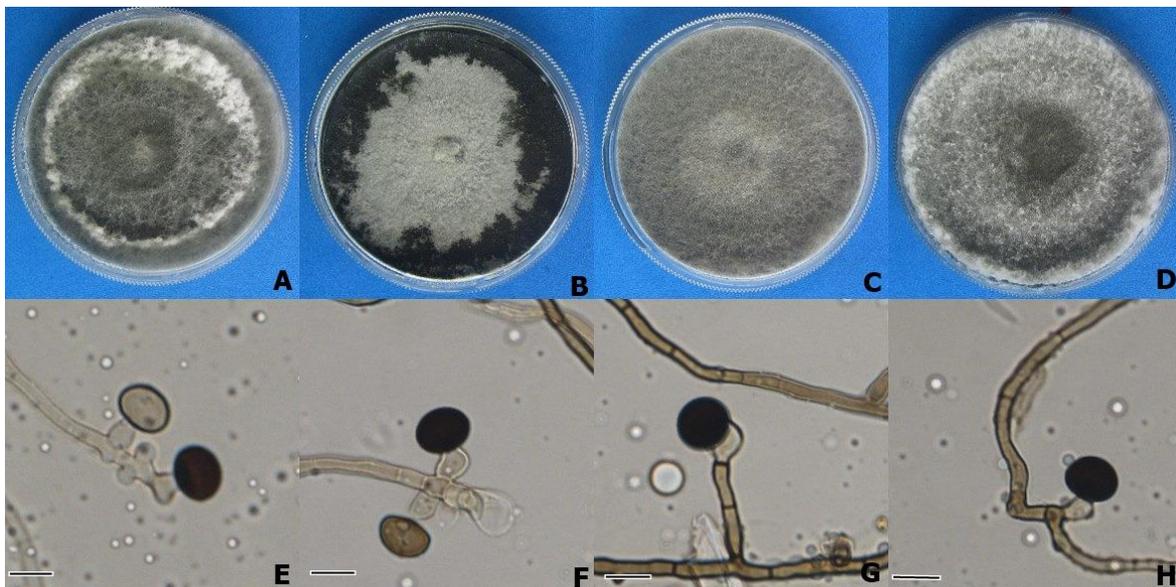
Na figura 10, apresentam variações morfológicas de colônias de *Pestalotiopsis* sp. em meio BDA, em colônias após 7 dias de crescimento e diversidade entre o gênero, com conídios apresentando o número de flagelos na base do conídio.

Pestalotiopsis spp, podem ser um grupo de fungos com um grande potencial biotecnológico devido à produção de alguns metabólitos secundários, entre eles o taxol. Hao et al. (2007) avaliaram a produção de lacase por *Pestalotiopsis* alterando a composição do

meio de cultivo, variando as fontes e concentrações de carbono e nitrogênio. A influência de diferentes indutores e inibidores da produção de lacase também foram examinados. Segundo os autores, *Pestalotiopsis* sp. é um produtor da enzima lacase, com grande potencial de uso industrial. O potencial sintético dos fungos é bastante conhecido, pois produzem enzimas que possuem larga aplicação industrial. Devido à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, e por apresentarem baixa especificidade por substratos, as lacases têm sido utilizadas em diversos processos, como remoção de lignina de polpas kraft em indústrias de papel e celulose, remoção de xenobióticos de cursos d'água, análise de drogas, remoção de compostos fenólicos de vinho, clarificação de corantes e efluentes, entre muitos outros (Baldrian & Gabriel, 2002).

O gênero *Nigrospora*, identificado neste trabalho, apresentou poucas variações morfoculturas, apresentando 4 diferenciações na disposição micelial em meio BDA (Figura 11).

Figura 11 – *Nigrospora* sp. endofíticas de bromélias do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ. (A - D) Variações nas colônias de *Nigrospora* sp. isolados de bromélias e organização da colônia do fungo em placa de Petri contendo meio BDA; (E - H) deposição do gênero *Nigrospora* em microscópio óptico, com detalhe da organização dos conídios e conidióforo.



Fonte: autores.

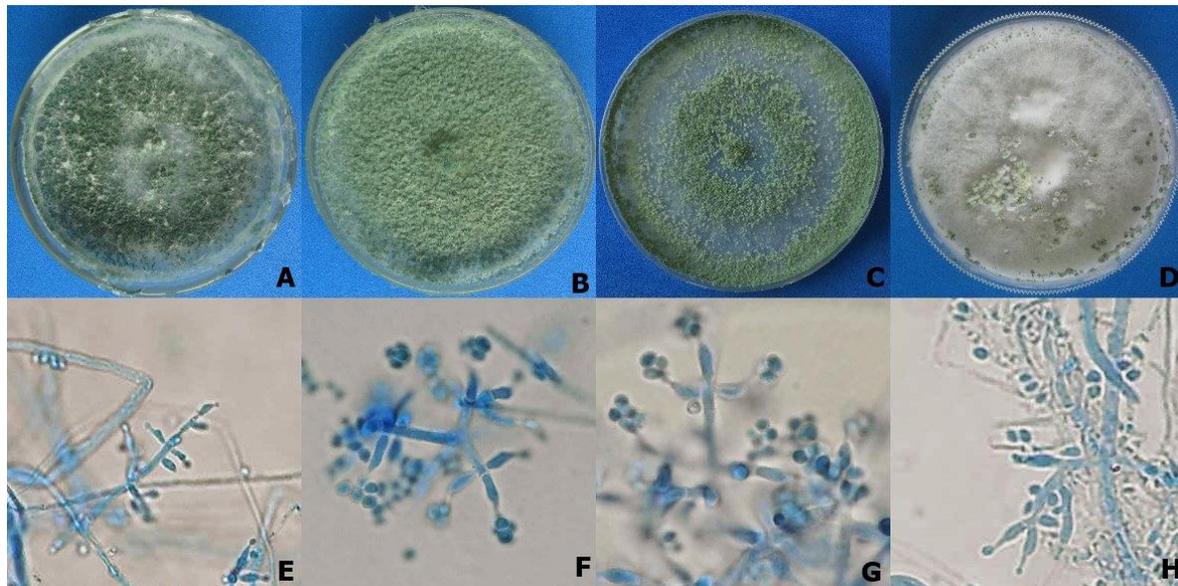
Com base nisso, o gênero *Nigrospora* encontrado nesse trabalho, não se pode subestimar a capacidade dos mesmos como patógenos em algum momento ou fase de

desenvolvimento da cultura, uma vez que ainda não há dados suficientes que comprove a sua estrita relação endofítica.

A maioria das espécies de *Nigrospora* possui hábito sapróbio, no entanto, associam este fungo com a podridão das maçãs do algodoeiro (*Gossypium* spp.), a podridão no colmo do milho (*Zea mays*) e do arroz (*Oryza sativa*). *Nigrospora oryzae* foi isolada de folhas de *H. bihai* no DF (Costa, 2007), de *Rosa hybrida* (Salazar; Garcia, 2005), *Annona squamosa* (Silva, 2006), *Leucaena leucocephala* (Mendes et. al., 2009), *Musa* spp. (Assunção, 2010) e *Vitis labrusca* (Lima, 2010).

Os caracteres biológicos do gênero *Trichoderma* sp. são saprófitas, muitas vezes no solo ou em madeira, algumas espécies relatadas como parasitas de outros fungos. Usado na produção de antibióticos, enzimas e agentes de controle biológico (Figura 12).

Figura 12– *Trichoderma* sp. endofíticas de bromélias do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ. (A – D) Colônia de *Trichoderma* isolados de bromélias e organização da colônia do fungo em placa de Petri contendo meio BDA; (E – H) deposição do gênero *Trichoderma* em microscópio óptico, com detalhe da organização dos conídios e conidióforo.



Fonte: autores.

Os isolados de *Trichoderma* sp. apresentou poucas diferenciações culturais, mostrando 3 parâmetros morfoculturais, onde pode mostrar distinções nas espécies, que podem ser identificadas por meio de desenvolvimento em meio de cultura.

Stolf (2006) avaliou o efeito de fungos endofíticos correspondente a um isolado de *Trichoderma atroviride* e uma cepa não patogênica de *Fusarium oxysporum* sobre o

biocontrole de *Radopholus similis* e seu efeito sobre a promoção de crescimento em mudas de bananeira micropropagadas do cultivar “Williams”. O experimento foi avaliado seis semanas depois da inoculação com nematóides. Verificou-se que *Trichoderma* apresentou melhor biocontrole que *Fusarium*. Porém, tanto para *Fusarium* como para *Trichoderma*, o melhor efeito de biocontrole foi obtido com três re-inoculações, correspondendo a 69% e 80% de biocontrole respectivamente. Em relação às variáveis de crescimento observou-se que nenhum fungo afetou o crescimento das plantas.

Fungos do gênero *Trichoderma* tem sido isolado de solos e também como endofítico, porém com menor frequência. Relações antagônicas entre endófitos e fitopatógenos, já foram verificadas em outros trabalhos. O antagonismo entre o fungo endofítico *Trichoderma harzianum* e o fungo fitopatogênico *Alternaria alternata* foi avaliado sob diferentes condições ambientais de temperatura e atividade de água por Sempere e Santamarina (2007). Na análise microscópica os autores verificaram que *T. harzianum* compete por espaço e nutrientes, realizando antagonismo com *A. alternata* e diminuindo seu crescimento, sendo um grande candidato ao biocontrole deste patógeno. Martins-Corder e Melo (1998), analisando a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. em controlar o fitopatógeno da berinjela *Verticillium dahliae*, verificaram que dentre os 47 isolados de *Trichoderma* spp. testados pelo antagonismo em placa, pelo menos 10 obtiveram alto índice de antagonismo, sendo que a maioria colonizou e produziu esporos em abundância sobre as colônias de *V. dahliae*, indicando grande capacidade de antagonismo.

Algumas linhagens de trichoderma são utilizadas no controle de fitopatógenos e na promoção de crescimento vegetal devido a sua versatilidade de ação, como parasitismo, antibiose e competição, além de atuarem como indutores de resistência das plantas contra doenças. Essas características tornam trichoderma um dos fungos mais pesquisados em condições de laboratório, casa de vegetação, no Brasil, estufa em Portugal, e campo (Louzada *et al.*, 2009; Hoyos-Carvajal, Orduz, e Bissett, 2009).

Contudo, o sucesso do controle de fitopatógenos e da promoção de crescimento por bioagentes dependerá das propriedades e mecanismos de ação do organismo. As espécies do gênero *Trichoderma* são as mais utilizadas no controle de fitopatógenos por serem encontradas em uma vasta diversidade de ambientes, devido à facilidade de serem cultivadas e observadas, ao rápido crescimento em um grande número de substratos e ao fato de não serem patogênicas para plantas superiores. Apresentam-se capazes de inibir fitopatógenos através de competição, parasitismo direto, produção de metabólitos secundários e micoparasitismo de estruturas de resistência de patógenos, como escleródios, esporos e

clamidósporos, que em geral são difíceis de serem destruídos. Pesquisas mostram que isolados de trichoderma reduzem a viabilidade de escleródios de *Rhizoctonia solani*. Dentre os antagonistas de fungos fitopatogênicos usados no biocontrole, cerca de 90% têm sido realizados com diferentes isolados pertencentes a este gênero (Benítez *et al.*, 2004; Kunieda-Alonso, Alfenas e Maffia, 2005).

A aplicação de *Trichoderma* tem proporcionado aumentos significativos na percentagem e na precocidade de germinação, no peso seco e na altura de plantas, além de estimular o desenvolvimento das raízes laterais (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). Eles são capazes de atuar como bioestimulantes do crescimento radicular, promovendo o desenvolvimento de raízes através de fitohormônios e assim, melhorar a assimilação de nutrientes, aumentando a resistência diante de fatores bióticos não favoráveis, além de degradar fontes de nutrientes que serão importantes para o desenvolvimento do vegetal (Harman *et al.*, 2004).

Filho *et al.* (2008), observaram produção de ácido indolacético (AIA) em isolados de *Trichoderma* spp.. De acordo com os resultados obtidos, nos isolados CEN 209 e CEN 500, a produção desse hormônio foi detectada em baixos níveis. No entanto, o isolado CEN 262 revelou níveis consideravelmente superiores em relação aos demais isolados estudados.

A concentração elevada de AIA verificada nas análises do isolado CEN 262 foram compatíveis com os valores obtidos nos experimentos relativos ao desenvolvimento de miniestacas de eucalipto clonal, que atingiu aumento de 137%, 145% e 43% da parte aérea, raiz e altura das plantas, respectivamente, comparados à testemunha. Segundo os autores, outros fatores também podem estar envolvidos na promoção de crescimento como solubilização de nutrientes e controle de microrganismos deletérios de raízes.

Hoyos-Carvajal *et al.* (2009), avaliaram a produção de metabólitos de 101 isolados de *Trichoderma* spp. na Colômbia. Vinte por cento das cepas foram capazes de produzir formas solúveis de fosfato de rocha fosfática, 8% das amostras avaliadas mostraram capacidade de produzir sideróforos consistentes para converter ferro a formas solúveis, 60% produziram ácido indol-3-acético (IAA) ou análogos a auxina.

A produção destes metabólitos é uma característica de cepas específicas, assim, variou muito entre as espécies. Além disso, nem todas as substâncias produzidas se correlacionaram com o aumento do crescimento de mudas de feijão, sendo que, sete isolados aumentaram significativamente o crescimento das mudas. Portanto, o potencial biotecnológico dos isolados obtidos no presente estudo deverá ser investigado com a continuidade da pesquisa.

Neste contexto, o estudo com fungos endófitos são promissores para o controle biológico de fitopatógenos (Nalini et al., 2014), pois são considerados benéficos às plantas. Quando presentes em determinadas fases do ciclo de vida da planta contribuem para o aumento da tolerância a estresses abióticos e na promoção do crescimento, uma vez que microrganismos endófitos podem atuar inibindo os patógenos por competição por nutrientes, parasitismo direto e pela produção de metabólitos (Grigoletti Jr et al., 2000), estimulando a planta a produzir fitormônios, toxinas e substâncias promotoras de crescimento que estão relacionadas ao controle de fitopatógenos (Rosenblueth & Martínez-Romero, 2006; Azevedo & Araújo, 2007).

Estudos como o aqui descrito precisam ser incentivados, sobretudo em ecossistemas ainda pobremente explorados, como a Restinga, a fim de contribuir para o descobrimento e aprofundamento do conhecimento acerca das ações desses microrganismos, bem como decifrar suas estratégias de sobrevivência, defesa, reprodução e adaptação, além de contribuir para potenciais aplicações biotecnológicas.

Considerações Finais

Como foi proposto, realizou-se o isolamento, identificação e manutenção de isolados fúngicos de restingas em bromélias, assumindo o compromisso com o destinado no presente trabalho.

Foram possíveis o isolamento e a identificação de 164 isolados, pertencentes os gêneros: *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Curvularia* sp., *Monilia* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *Pestalotiopsis* sp., e *Trichoderma* sp.

Houve diferenças nas frequências das colônias e isolados obtidos para os gêneros fúngicos dentre espécies e coletas. Na espécie *A. nudicaulis* foram exclusivos os gêneros *Bipolaris* sp. e *Curvularia* sp., enquanto que na espécie *B. antiacantha*, o gênero *Monilia* sp.

Os demais gêneros foram encontrados em ambas hospedeiras estudadas, mas com diferentes frequências. 21% isolados que não produziram esporos em cultura pura, foram caracterizados, mas não-identificados em nível de gênero, o que requererá estudos adicionais, com marcadores moleculares.

Em associações com bromélias de restinga, este é primeiro relato publicado sobre a interação desses fungos identificados em espécies de bromélias. Propõe-se mais estudos exploratórios para avaliar a aplicabilidade desses fungos nas mais diferentes áreas do

conhecimento que podem atuar desde o controle de doenças até outras aplicações biotecnológicas.

Referências

Araujo DSD, Pereira MCA & Pimentel MCP (2002). Flora e estrutura de comunidades na restinga de jurubatiba - síntese dos conhecimentos com enfoque especial para a formação aberta de clusia. In: Rocha CFD, Araújo WL, Lima AOS, Azevedo JL, Marcon J, Sobral JK & Lacava PT. *Manual de isolamento de microrganismos endofíticos*. Piracicaba.

Akello J, Dubois T, Gold CS, Coyne D, Nakavuma J, Paparu P (2007) *Beauveria bassiana* (balsamo) vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*musa spp.*). *Journal of invertebrate pathology*, 96: 34–42. DOI: 10.1016/j.jip.2007.02.004.

Arnold AE, Mejía LC, Kyllö D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. Washington, 100: 15649-15654. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2533483100>.

Alfenas AC, Mafia RG (2007). *Métodos em fitopatologia*. Viçosa: UFV, 382p

Assunção MMC (2010). Fungos endófitos isolados de folhas de bananeira (*musa spp.*) e seleção de antagonistas a fitopatógenos dessa cultura. 2010. 172f. *Tese* (Doutorado em biologia de fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife,

Azevedo JL, Araújo WL (2007). Endophytic fungi of tropical plants: diversity and biotechnological aspects. In: Ganguli, B.n.; Deshmukh, S. K. *Fungi multifaceted microbes*. New delhi, *Anamaya Publishers* .189-207.

Bachmann J, Zierold R, Phil YTC, Hauert R, Phys-Dipl CS, Grund-schmidt R, Rheinlander B, Grundmann M, Gosele U, Nielsch, K (2008). Selbstkatalytische atomlagenabscheidung von siliciumdioxid. *Angewandte chemie*. 120(33): 6272–6274. DOI: <https://doi.org/10.1002/ange.200800245>

Bae H, Sicher RC, Kim MS, Kim SH, Strem MD, Melnick RL, Bailey BA (2009). The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate dis 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of experimental botany*, 60 (11): 3279–3295. DOI: 10.1093/jxb/erp165

Bayat F, Mirlohi A, Khodambashi M (2009). Effects of endophytic fungi on some drought tolerance mechanisms of tall fescue in a hydroponics culture. *Russian journal of plant physiology*, 56(4): 510-516. DOI: 10.1134/S1021443709040104

Baldrian P, Gabriel J (2002). Copper and cadmium increase laccase activity in pleurotus ostreatus, *Fems Microbiology Letters*, 20(1): 69-74. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb10988.x

Barnett HL, Hunter BB (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed. Saint Paul, MS: Aps, Press,

Bizukoje M, Ledakowicz S (2004). The kinetics of simultaneous glucose and fructose uptake and product formation by *Aspergillus niger* in citric acid fermentation. *Process biochemistry*, 39: 2261-2268. DOI: 10.1016/j.procbio.2003.11.017

Benítez T, Rincón AM, Limón MC & Condón AC (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*, 7(4): 249-260. ISSN 1139-6709

Bennet JW (2010). An overview of the genus aspergillus. Disponível em: < <http://open-access-biology.com/aspergillus/aspergillusch1.pdf>> acesso em: 22 fev. 2017

Cao R, Liu X, Gao K, Mendgen K, Kang Z, Gao J, Dai Y, Wang X (2009). Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes *in vitro*. *Current microbiology*, 59: 584–592. DOI: 10.1007/s00284-009-9477-9

Chuang CC, Kuo YL, Chao CC & Chao WL (2007). Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by *Aspergillus niger*. *Biology and fertility of soils*, 43: 575-584. DOI 10.1007/s00374-006-0140-3

Chomcheon P, Wiyakrutta S, Aree T, Sriubolmas N, Ngamrojanavanich N, Mahidol C, Ruchirawat S, Kittakoop P (2010). Curvularides a-e: antifungal hybrid peptide-polyketides from the endophytic fungus *Curvularia geniculata*. *Chem. Eur. J*, 16:11178–11185. DOI: 10.1002/chem.201000652.

Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Cortés-Penagos CE, López-Bicio J (2009) *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 149(3): 1579–1592. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.108.130369>.

Costa CR (2007). Fungos associados às plantas ornamentais tropicais no distrito federal. 2007. 98f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília.

Del-Claro K. (2012). Origens e importância das relações plantas-animais para a ecologia e conservação. In: _____. Torezan-Silingardi HM. (orgs). Ecologia das interações plantas-animais: uma abordagem ecológico-evolutiva. Rio de Janeiro: *Technical Books*, p. 336.

Evidente A, Andolfi A, Cimmino A, Vurro M, Fracchiolla M, Charudattan R, Mot A. (2005). Drazepinone, a trisubstituted tetrahydronaphthofuroazepinone with herbicidal activity produced by *Drechslera siccans*. *Phytochemistry*, 66(6): 715 – 721. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.02.008>

Esteves FA, Scarano FR (orgs.). (2004). Pesquisas de longa duração na restinga de jurabatiba: ecologia, história natural e conservação. São carlos: RIMA, 59-76.

Fonseca LCN, Vizentin-Bugoni J, Rech A, Alves MA (2015). Plant-hummingbird interactions and temporal nectar availability in a *Restinga* from Brazil. *Anais da academia brasileira de ciências*, 87(4): 2163-2175. DOI: 10.1590/0001-3765201520140349

Flora do brasil 2020 em construção. Jardim botânico do rio de janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 07 mai. 2017

Ferreira LS (2010). Caracterização de isolados de *curvularia* spp. Endofíticos de milho (*zea mays* l.) por parâmetros morfológicos e moleculares. 118 f. *Dissertação* (mestre em ciências biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Filho MRC, Mello SCM, Santos RPE, Menêzes JE (2008). Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*, 226. Brasília, Embrapa recursos genéticos e biotecnologia.

Freire FCO, Bezerra JL (2001). Foliar endophytic fungi of Ceará state (Brazil): A preliminary study. *Summa Phytopathologica*, 27(3): 304-08.

Gomes JML, Silva NNF (2013). Bromeliaceae das Restingas do estado do Espírito Santo, Brasil. *Natureza online*, 11(2): 79-89.

Gallo MBC, Chagas FO, Almeida MO, Macedo CC, Cavalcanti BC, Barros FWA, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Pessoa C, Bastos JK, Pupo MT (2009). Endophytic fungi found in association with *smallanthus sonchifolius* (asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. *Journal of basic microbiology*, 48: 1-10. DOI: 10.1002/jobm.200800093

Gibbons JG, Rokas A. (2013). The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends in microbiol.*, 21: 14-22. DOI: 10.1016/j.tim.2012.09.005

Grigoletti JRA, Figueredo A, García C. (2000). Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. *Revista floresta* (Brasil) 30:155-165

Hong L, Zou WX, Meng JC, Hu J, Tan RX (2000). New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant science*, 151: 67–73. DOI: [doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00199-5](http://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00199-5)

Hyde KD, Soyong K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal diversity*, 33: 163-173. DOI: 10.1371/journal.pone.0084539

Hanlin RT (1996). Illustrated genera of ascomycetes. Aps press, 274p.

Hao J, Song F, Huang F, Yang C, Zhang Z, Zheng Y, Tian X. (2007). Production of laccase by a newly isolated deuteromycete fungus *Pestalotiopsis* sp. and its decolorization of azo dye. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 34(3): 233-240. DOI: 10.1007/s10295-006-0191-3

Hoyos-Carvajal L, Orduz SE, Bissett J. (2009). Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological control*, 51: 409–416. DOI: doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.07.018

Kruschewsky M.C. (2010). Taxonomia e ecologia do gênero *Pestalotiopsis* no Brasil, com ênfase para a Mata Atlântica do Sul da Bahia. 59 f. *Dissertação* (mestre em produção vegetal) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus.

Kunieda-Alonso S, Alfenas AC & Maffia LA (2005). Sobrevivência de micélio e escleródios de *Rhizoctonia solani* tratados com *Trichoderma* spp., em restos de cultura de *Eucalyptus* sp. *Fitopatologia brasileira*, 30(2): 164-168. DOI: doi.org/10.1590/S0100-41582005000200010

Linnakoski R, Puhakka H, Pappinen A. (2011). Endophytic fungi isolated from *khaya anthotheca* in ghana. *Fungal ecology*. 12(3): 444-453. DOI: doi.org/10.1016/j.funeco.2011.08.006

Lima TEF (2010). Micobiota endofítica de *Vitis labrusca* L. cv. Isabel em regiões do vale do Siriji, Pernambuco, Brasil. 58f. *Dissertação* (mestrado) -Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

Lins SRO, Coelho RSB (2004). Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no estado de Pernambuco. *Fitopatologia brasileira*, 29(3): 332-335. DOI: doi.org/10.1590/S0100-41582004000300019

Liu AR, Chen SC, Wu SY, Xu T, Guo LD, Jeewon R, Wei JG. (2010). Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and ITS implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy. *Molecular phylogenetics evolution*, 57: 528-35. DOI: 10.1016/j.ympev.2010.07.017

Louzada GAS, Carvalho DDC, Mello SCM, Lobo Júnior M, Martins I, Braúna LM. (2009). Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes ecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. *Biota neotropica*, 9(3): 145–149. DOI: doi.org/10.1590/S1676-06032009000300014

Magalhães WCS, Missagia RV, Costa FAF, Costa MCM. (2008). Diversidade de fungos endofíticos em candeia *Eremanthus erythropappus* (dc).macleish. *Cerne*, lavras, 14(3): 267-273.

Manamgoda DS, Cai L, Mckenzie EHC, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E, Shivas RG, Tan YP, Hyde KD (2012). A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* – *Cochliobolus* – *Curvularia* complex. *Fungal diversity*, 56: 131-144. DOI: doi.org/10.1007/s13225-012-0189-2

Marinho AMR, Marinho PSB, Rodrigues Filho E. (2007). Constituintes químicos de *Penicillium* sp, um fungo endofítico isolado de *Murraya paniculata* (rutaceae). *Revista ciências exatas e naturais*, 9(2): 189-199.

Martins-Corder MP, Melo IS (1998). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. a *Verticillium dahliae* kleb. *Science agriculture*, 55(1). DOI: doi.org/10.1590/S0103-90161998000100002

Menezes LFT, Araujo DSD. (2005). Formações vegetacionais da restinga da marambaia, Rio de Janeiro. In: MENEZES, L. F. T.; PEIXOTO, A. L.; ARAÚJO, D. S. D. (orgs.). História natural da marambaia. Rio de janeiro: edur, 67-120.

Mussi-Dias V, Araújo ACO, Silveira SF, Rocabado JMA, Araújo KL. (2012). Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. *Revista brasileira de plantas medicinais*, 14(2): 261-266. DOI: doi.org/10.1590/S1516-05722012000200002.

Narloch C, Oliveira VL, Anjos JT, Silva Filho GN. (2002). Respostas da cultura do rabanete à inoculação de fungos solubilizadores de fosfatos. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 37(6): 841-845. DOI: doi.org/10.1590/S0100-204X2002000600013

Obuekwe CO, Badrudeen AM, Al-Saleh E, Mulder JL. (2005). Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under conditions of simultaneous temperature and salt stress. *International biodeterioration & biodegradation*, 56(4): 197-205. DOI: doi.org/10.1016/j.ibiod.2005.05.005

Oses R, Valenzuela S, Freer J, Sanfuentes E, Rodriguez J. (2008). Fungal endophytes in xylem of healthy chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal diversity*, 33: 77- 86. DOI: [10.3389/fmicb.2017.01286](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01286)

Pereira OJ (2003). Restinga: origem, estrutura e diversidade. In: Jardim, M. A. G.; Bastos, M. N. C.; Santos, J. U. M. (orgs.). Desafios da botânica brasileira no novo milênio: inventário, sistematização e conservação da biodiversidade vegetal. Belem: Sociedade Brasileira De Botânica, 177-179.

Papagianni M, Frank W, Matthey M. (2005). Fate and role of ammonium ions during fermentation of citric acid by *Aspergillus niger*. *Applied and environmental microbiology*, 71: 7178-7186. DOI: [10.1128/AEM.71.11.7178-7186.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7178-7186.2005)

Pereira AS, Shitsuka DM, Parreira FJ & Shitsuka R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. [e-book]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_Metodologia-Pesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1.

Pessoa WRLS, Barguil BM, Oliveira SMA, Coelho RSB. (2008). Ocorrência de *Pestalotiopsis palmarum* em *Caryota mitis*. *Summa phytopathologica*, 34(1): 95, 2008. DOI: doi.org/10.1590/S0100-54052008000100023

Pimentel IC, Figura G, Auer CG. (2010). Fungos endofíticos associados a acículas de *Pinus taeda*. *Summa phytopathologica*, 36(1): 85-88. DOI: doi.org/10.1590/S0100-54052010000100016.

Pratt RG (2006). Enhancement of sporulation in species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, and *Exserohilum* by growth on cellulose-containing substrates. *Mycopathologia*, 162: 133 – 140. DOI: [10.1007/s11046-006-0043-8](https://doi.org/10.1007/s11046-006-0043-8)

Ribeiro TPS. (2009). Fungos queratinofílicos em areia de parques escolares de Boa Vista, Roraima. 47f. Monografia (Pós - graduação em recursos naturais) - Universidade Federal de Roraima. Boa Vista.

Rodrigues AAC, Menezes M. (2002). Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de Serra Talhada e de Caruaru, estado de Pernambuco. *Fitopatologia brasileira*, 27: 532-537. DOI: doi.org/10.1590/S0100-41582002000500016.

Rodrigues RL. (2010). Fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* mart. ex schult. F. (velloziaceae) presente em afloramentos rochosos nos estados de Minas Gerais e Tocantins. 70 f. Dissertação (mestrado em ecologia de biomas tropicais) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.

Rosenblueth M, Martínez-Romero E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions* 19:827-837. DOI: doi.org/10.1094/MPMI-19-0827

Rodrigues KF, Hesse M, Werner C. (2003). Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from spondias mombin. *Journal basic microbial*, 40(4): 261-267. DOI: [10.1002/1521-4028\(200008\)40:4<261::AID-JOBM261>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200008)40:4<261::AID-JOBM261>3.0.CO;2-D)

Rizzini CT (1979) tratado de fitogeografia do brasil: aspectos sociológicos e florísticos. 2 ed. São paulo, huncitc, 2 v.

Rakotoniriana EF, Munaut F, Decock C, Randriamampionona D, Andriambololoniaina M, Rakotomalala T, Rakotonirina EJ, Rabemanantsoa C, Cheuk K, Ratsimamanga SU, Mahillon

J, El-Jaziri M, Quetin-Leclercq J, Corbisier AM. (2007). Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves. *Antonie van Leeuwenhoek*. 93, 27–36. DOI: doi.org/10.1007/s10482-007-9176-0

Redman RS, Sheehan KB, Stout TG, Rodriguez RJ, Henson JM. (2002). Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*, 298. DOI: [10.1126/science.1072191](https://doi.org/10.1126/science.1072191)

Santos AS, Santana CVS, Almeida AC, Nascimento ARP, França FS. (2009). Fungos associados a manchas foliares em *Heliconia psittacorum* cv. Golden torch, no submédio São Francisco. *Revista verde*, 4(4): 01 – 04.

Sessegolo T, Tochetto C, Zanette RA, Silva AS, Alves SH, Monteiro SG, Santurio JM. (2011). Microbiota fúngica em amostras de água potável e esgoto doméstico. *Semina: ciências agrárias*, 32(1): 301-306.

Seifert K, Morgan-Jones G, Gams W, Kendrick B. (2011) The Genera of Hyphomycetes. *Cbs biodiversity series*, v. 9, 997p.

Souza AQL, Souza ADL, Filho AS, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira JO. (2004). Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth. *Acta amazonica*, 34(2), 185 - 195. DOI: doi.org/10.1590/S0044-59672004000200006

Schultz R, Araújo LC Sá FS. (2012). Bromélias: abrigos terrestres de vida de água doce na floresta tropical. *Natureza online*, 10(2): 89-92.

Sologuren FJ, Juliatti FC. (2007). Doenças fúngicas em plantas ornamentais em Uberlândia-MG. *Bioscience journal*, 23(2): 42-52

Sempere F, Santamarina MP (2007). *In vitro* biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (fr.) Keissler under different environmental conditions. *Mycopathologia*, 163: 183- 190. DOI: [10.1007/s11046-007-0101-x](https://doi.org/10.1007/s11046-007-0101-x)

Vassilev N, Medina A, Azcón R & Vassileva M. (2006). Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and p uptake. *Plant and soil*, 287: 77-84. DOI: doi.org/10.1007/s11104-006-9054-y

Verzignassi JR, Matos AP, Santos MF, Poltronieri LS, Benchimol RL, Sanches NF (2009). Mancha negra do abacaxi no Pará. *Summa phytopathol.*, 35(1): 76.

Wang FW, Jiao RH, Cheng AB, Tan SH, Song YC (2006) Antimicrobial potential of endophytic fungi residing in *Guercus variabilis* and brefeldin a obtained from *Cladosporium* sp. *World journal of microbiology and biotechnology*, 23: 79- 83. DOI: doi.org/10.1007/s11274-006-9195-4

Watanabe T. (2010). Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. *Crc press*.

Wei JG, Xu T. (2007). *Pestalotiopsis kunmingensis*, sp. Nov., an endophyte from *Podocarpus macrophyllus*. *Fungal diversity*, 15: 247-254.

Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu RS, Hess WM. (2011). Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*, 142: 435-440. DOI: [10.1099/13500872-142-2-435](https://doi.org/10.1099/13500872-142-2-435)

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Gustavo de Andrade Bezerra – 60%

Vicente Mussi-Dias – 15%

Pedro Henrique Dias dos Santos – 10%

Beatriz Murizini Carvalho – 5%

Tathianne Pastana de Sousa Poltronieri – 5%

Silvaldo Felipe da Silveira – 5%