

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À
Morinda citrifolia Linn. (Rubiaceae)

Bolsista: Janaína da Costa Nogueira, CNPq

MANAUS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-B/0029/2010

CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À
Morinda citrifolia L.

Bolsista: Janaína da Costa Nogueira, CNPq

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristina Sayuri Maki

MANAUS

2011

RESUMO

Morinda citrifolia L. é uma Rubiaceae de pequeno a médio porte (3 a 6 metros de altura) popularmente conhecida como noni. Apesar das suas várias características nutracêuticas investigadas atualmente, são muito poucos os estudos envolvendo microrganismos endofíticos associados a este hospedeiro no Brasil. Microrganismos endofíticos, que habitam o interior de plantas sem causar-lhes prejuízos ou sintomas, representam um importante recurso genético para a biotecnologia, dada a sua aplicação na geração de produtos e processos em diversificadas áreas industriais e comerciais. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi isolar e purificar fungos endofíticos de folhas e frutos de *M. citrifolia*, os quais foram coletados no setor sul da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). O material vegetal coletado foi identificado e transportado ao Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM/UFAM), onde foi submetido ao processamento para isolamento dos endófitos. Foram obtidos 75 isolados de fungos endofíticos de 260 fragmentos de folhas e frutos de *M. citrifolia*. No isolamento a partir de folhas, foram obtidas 69 colônias de 200 fragmentos (34,5% de eficiência de isolamento). No entanto, das colônias observadas, apenas 17 isolados mostraram-se morfológicamente diferentes e foram purificados. No isolamento a partir do fruto, foram obtidas 6 colônias de 60 fragmentos (10% de eficiência de isolamento), sendo que, das colônias observadas, apenas 4 isolados mostraram-se morfológicamente diferentes e foram purificados. Todos os 75 isolados foram armazenados de acordo com o método de tubo inclinado, Castelani e em óleo mineral. A partir desses resultados, podemos verificar a diversidade pouco expressiva de fungos endofíticos cultiváveis *in vitro* nas condições apresentadas, principalmente, em se tratando do fruto de noni. E que a parte mais indicada para o isolamento de endófitos é a folha madura do noni.

ABSTRACTS

Morinda citrifolia L. is a small to medium size Rubiaceae plant (3 to 6 meters), known by noni. Despite of the current investigations about noni nutraceuticals features, there are few studies about their associated endophytes in Brazil. Endophytes, that live inside the plants without cause losses or symptoms, represents an important biotechnology genetic resource, because of their application on creating products and processes to many industrial and commercial areas. So, the aim of this work was isolate and purificate endophytes fungi from *M. citrifolia* leaves and fruits, collected at the south region of the Universidade Federal do Amazonas. The collected plant material was identified and transported to the Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM/UFAM), where it was processed to perform the isolation. Seventy five endophytic fungi were isolated from 260 leaves and fruits fragments of *M. citrifolia*. Sixty nine colonies were obtained from 200 fragments of leaves (34.5% efficiency). However, among the colonies observed, only 17 showed morphological differences and were purified. Six colonies were obtained from 60 fruit fragments (10% efficiency), and only 4 showed morphological differences and were purified. All 75 isolates were stored in accordance to Castelani, inclined tube and submerged on mineral oil methods. From these results, a low diversity was observed according to the described conditions, especially when considered noni fruits. Furthermore, mature noni leaves were the best material to obtain a substantial number of endophytes isolates.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – <i>M. citrifolia</i> L.	08
Figura 02 – Flores e inflorescências de noni	09
Figura 03 – <i>M. citrifolia</i> : (A) Planta arbórea em estágio adulto; (B) Flores; (C) frutos em diferentes estágios de maturação	11
Figura 04 – Placas de isolamentos de fungos endofíticos associados a <i>M. citrifolia</i> . Em (A) observa-se a ausência de diversidade biológica da microbiota fúngica associada a folhas maduras de noni. Em (B), observam-se as placas evidenciando o não desenvolvimento de colônias endofíticas associadas às folhas jovens de noni	17
Figura 05 – Isolados de fungos endofíticos associados a <i>M. citrifolia</i> , armazenados conforme o método do tubo inclinado e Castelani	18

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	06
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	08
2.1 Noni: origem e distribuição geográfica	08
2.1.1 Características da planta e classificação taxonômica.....	09
2.1.2 Compostos químicos de interesse.....	11
2.2 Microrganismos Endofíticos.....	12
2.2.1 Associação endófito-planta.....	12
2.2.2 Endófitos associados à noni	13
3 DESCRIÇÃO METODOLÓGICA	13
3.1 Isolamento e Purificação de Fungos Endofíticos de Folhas e Frutos de <i>Morinda citrifolia</i>	13
3.2 Armazenamento dos Fungos Isolados.....	14
3.2.1 Método do tubo inclinado	14
3.2.2 Método de Castelani.....	15
3.2.3 Método de conservação em óleo mineral.....	15
3.3 Caracterização Morfológica do Micélio Vegetativo.....	15
4 RESULTADOS FINAIS E DISCUSSÕES	16
4.1 Isolamento e Purificação de Fungos Endofíticos de Folhas e Frutos de <i>M. citrifolia</i>	16
4.2 Armazenamento dos Fungos Isolados.....	18
4.3 Caracterização Morfológica do Micélio Vegetativo.....	18
5 CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

Originária do sudeste asiático, mais especificamente na Indonésia e Austrália, *Morinda citrifolia* L., é uma planta de pequeno a médio porte (atingindo de 3 a 6 metros de altura) e conhecida no Brasil e no Havaí como noni. Além de noni, *M. citrifolia* recebe outros nomes comuns (CHAN-BLANCO et al., 2006), dependendo da localidade: *cannary wood* (Austrália), *fromager* ou *murier indien* (França), *indian mulberry* (Inglaterra), *kikiri* (Ilhas Salomão), *kura* (Fiji), *mora de la India* (Espanha), *nono* (Taiti), entre outros (NELSON, 2005).

M. citrifolia L. é uma Rubiaceae tolerante a solos salinos e condições de seca, desenvolvendo-se tanto em florestas, como em terrenos rochosos ou arenosos (NELSON, 2005). Apresenta folhas largas, simples e de coloração verde escura. As flores são pequenas, brancas e perfumadas, enquanto os frutos são ovais, com superfície irregular, medindo cerca de 3 a 10 cm de comprimento e 3 a 6 cm de largura, os quais produzem grande quantidade de sementes e sua coloração, de acordo com o grau de maturação, varia do verde ao branco. O aroma do fruto, quando colhido, é forte e considerado desagradável. Porém, dada a disseminação de informações a respeito de suas características benéficas à saúde humana, as pessoas têm incluído o fruto (cozido ou cru), como parte de sua dieta alimentar, além do seu uso em sucos e chás. Flores e frutos estão presentes na planta o ano todo.

Atualmente, *M. citrifolia* está distribuída nas regiões tropicais, sendo encontrada principalmente na Índia, Polinésia, Austrália, China, Malásia e Sudeste Asiático. No Brasil, a espécie desenvolve-se bem, embora muito recentemente as atenções tenham-se voltado para suas atividades benéficas que incluem, dentre outras: anti-câncer (HIRAZUMI et al., 1996; ANEKPANKUL et al., 2007), antimicrobiana (ATKINSON, 1956; JAYARAMAN et al., 2008), anti-fúngica e antitumoral (JAYARAMAN et al., 2008), vasodilatadora (GILANI et al.,

2010), antioxidante (MOHD et al., 2001; WANG et al., 2009), hepatoprotetora e controladora do diabetes (SABITHA et al., 2009).

Os frutos e as folhas de *M. citrifolia* são consumidos como alimento nas ilhas do Pacífico, além de serem utilizados largamente na medicina popular. As folhas são utilizadas no tratamento de vários tipos de inflamações e queimaduras, infecções viróticas (SELVAM et al., 2009), enquanto as raízes são utilizadas como corante (CHAN-BLANCO et al., 2006), embora sejam contenedoras de grande parte dos princípios ativos benéficos registrados na literatura.

Apesar da grande diversidade biológica amazônica, são ainda poucos os estudos envolvendo fungos endofíticos em fruteiras no Brasil. Acredita-se que a totalidade ou grande maioria das plantas são hospedeiras de endófitos.

Desde as primeiras evidências dos endófitos, vários pesquisadores têm definido esses microrganismos de maneiras diferentes, que normalmente dependente da perspectiva da qual esses organismos são isolados e posteriormente analisados (STROBEL et al., 2003).

Segundo Azevedo (1998), microrganismos endofíticos são aqueles cultiváveis ou não, que penetram a planta e vivem em seu interior, interagindo com outras espécies de microrganismos, sem causar algum dano ou prejuízo ao seu hospedeiro, ou mesmo, estruturas externas visíveis. Segundo Petrini (1991), fungos endofíticos colonizam os tecidos saudáveis da planta, em algum tempo do seu ciclo de vida, sem lhes causar danos aparentes. Daí, o despertar do interesse de pesquisadores há algumas décadas.

Vários estudos apontam o grande potencial dos endófitos na agricultura e na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados como vetores para a introdução de genes de interesse nas plantas, como agentes inibidores de pragas e patógenos e como fontes de metabólitos primários e secundários de interesse. Assim, fungos endofíticos representam um importante recurso genético para a biotecnologia.

Atualmente as comunidades científicas têm demonstrado interesse na bioprospecção

destes microrganismos, devido ao seu potencial na produção de metabólitos secundários, utilizando métodos genéticos de alta sensibilidade para a sua identificação.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Noni: origem e distribuição geográfica

Originária do sudeste da Ásia, Oceania e Austrália, o noni (Figura 01) estende-se da Polinésia à Índia, apresentando, atualmente, uma distribuição pantropical. Sua ampla distribuição é devida à sua reduzida necessidade de cuidados, desenvolvendo-se adequadamente sob várias condições ambientais, incluindo condições adversas, tais como a exposição ao vento, ao fogo, às enchentes e a condições de salinidade, sendo também capaz de colonizar áreas de resíduos agressivos ou fluxos de lava.



Figura 01 – *M. citrifolia* L.

O gênero *Morinda* é constituído por cerca de 80 espécies com diversas utilidades, sendo algumas utilizadas como plantas ornamentais, outras para a obtenção de corantes e/ou medicamentos. O nome do gênero, *Morinda*, é derivado do latim e, de certa forma,

representa a característica peculiar da planta (*morus* = amora), referente à semelhança entre os frutos de noni e os da amoreira. A espécie *citrifolia* refere-se à semelhança entre as folhas de noni e de citros (Figura 02).



Figura 02 – Folhas e inflorescência de noni.

As Rubiaceae (exemplos: café, noni, entre outros) apresentam ampla distribuição e diversidade, ocorrendo em diversos ambientes e apresentando hábitos bem variados: de árvores a lianas, perenes ou anuais e raramente como epífitas (ex. gênero *Hillia*). Apesar da ampla distribuição, ocorrem principalmente em regiões tropicais e subtropicais.

No Brasil, estão presentes em áreas úmidas, como nas Florestas Amazônica e Atlântica. Porém, em nosso país, o noni ainda é pouco conhecido e suas benesses pouco divulgadas, contrastando com o consumo usual em países como os Estados Unidos, o Japão, a China, a Índia, a Austrália e em grande parte da Europa.

2.1.1 Características da planta e classificação taxonômica

M. citrifolia é uma Rubiaceae arbórea (subfamília Rubioideae), a qual representa a quarta maior família das angiospermas, descrita em 1789 por Antoine Laurent Jussieu, a qual apresenta ainda, cerca de 9 a 13 mil espécies, distribuída em 550 a 650 gêneros

(OLIVEIRA, 2009; SILVA, 2010). As Rubiaceae reúnem um considerável número de espécies de importância econômica, principalmente ornamental, medicinal ou alimentícia (DI STASI E HIRUMA-LIMA, 2002; OLIVEIRA, 2009). O termo Rubiaceae deve-se a um pigmento vermelho característico, encontrado nas raízes das plantas que compõem a família.

M. citrifolia L. é um arbusto de pequeno a médio porte, medindo cerca de 3 a 10 metros de altura quando adulta. As folhas são grandes, elípticas, opostas, com margens onduladas, coloração verde brilhante na face superior (adaxial) e opaca na inferior (abaxial) (Figura 03a). As flores são pequenas, perfumadas e com corola branca (Figura 03b), as quais originam os frutos de formato ovóide com superfície irregular, cobertos de secções poligonais (McCLATHEY, 2002; WANG et al., 2002) (Figura 03c).

Cerca de 6 meses após a germinação da semente, a planta tem um florescimento contínuo, sendo que os frutos carnosos com grande quantidade de sementes podem ser colhidos durante todo o ano. A coloração do fruto varia de verde a branco, segundo o grau de maturação (Figura 03c). O aroma do fruto colhido é forte e considerado desagradável.

Diferentes partes da planta de noni apresentam utilidade tradicional e/ou moderna por conter em sua composição, vários componentes ativos com diversos efeitos terapêuticos. A raiz, o caule, a casca, a folha e os frutos são utilizados na Polinésia, China, Índia e outros países há mais de 2 mil anos.

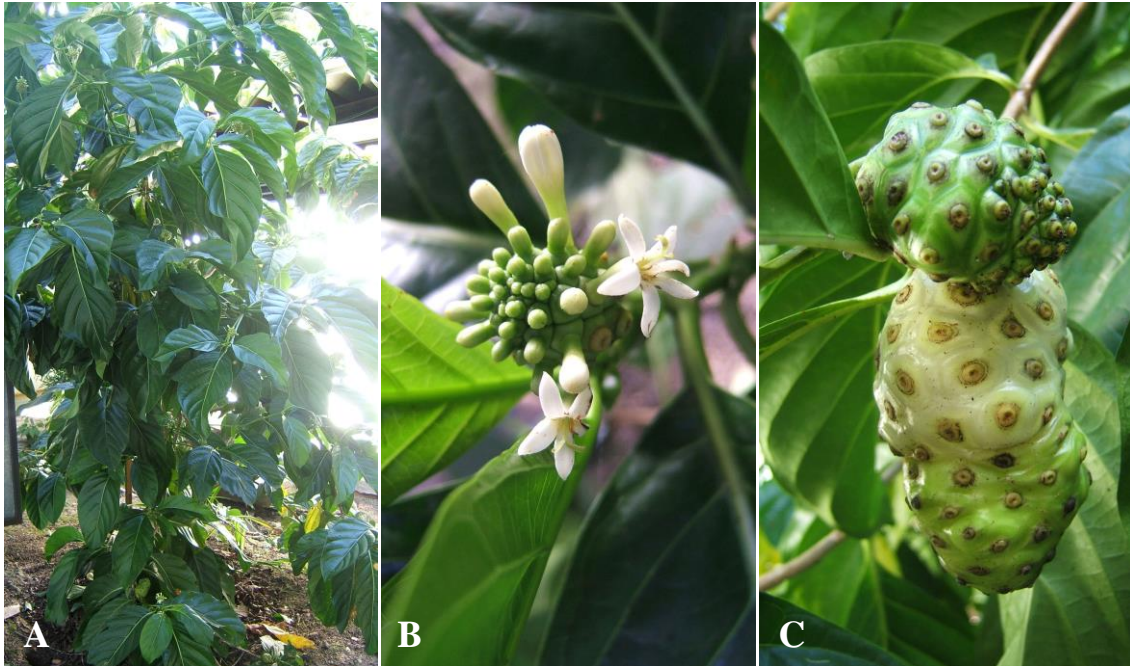


Figura 03 – *M. citrifolia*: (A) Planta arbórea em estágio adulto; (B) flores; (C) frutos em diferentes estágios de maturação.

2.1.2 Compostos químicos de interesse

Cerca de 160 compostos fitoquímicos foram identificados na planta de noni, sendo os micronutrientes mais importantes, os compostos fenólicos, os ácidos orgânicos e os alcalóides (WANG e SU, 2001). Muitos dos efeitos benéficos do noni são resultantes da presença destes compostos, porém, a composição química é diferente para cada parte da planta a ser considerada.

Os compostos fenólicos são descritos como os mais abundantes no suco do noni, sendo as antraquinonas (damnacanthal, morindona, morindina, alizarina, rubiadina, nordamnacanthal, rubiadina-1-metil-éter, etc.), e também a asperulosida, a aucubina e a escopoletina (WANG e SU, 2001), as mais importantes.

Os alcalóides do noni, principalmente a xeronina e a proxeronina, permitem à célula operar eficientemente, auxiliando nos mecanismos de reparo celular. O fruto do noni oferece ao organismo proxeronina em grande quantidade, a qual é convertida nas células em xeronina, um composto que intervém em uma série de reações fisiológicas do corpo

humano (SOLOMON, 1999). O fruto do noni é rico em ácido ascórbico (vitamina C) (SILVA et al., 2009) e provitamina A (DIXON et al., 1999).

Com o crescente interesse em desvendar os benefícios proporcionados pelo uso do noni, seja na forma de chá, suco, desidratado, etc., a *World Noni Research Foundation* opera com dois periódicos: a *Noni International Journal of Research* e a *Clinical Research Journal Noni* para postar as atividades científicas relacionadas à planta.

2.2 Microrganismos Endofíticos

Os microrganismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que se alojam no interior das plantas, onde desenvolvem, muitas vezes, uma relação mutualística com o hospedeiro, sem causar-lhe danos ou sintomas aparentes (AZEVEDO, 1998; PEIXOTO-NETO et al., 2004).

2.2.1 Associação endófito-planta

Microrganismos endofíticos já foram isolados de todas as espécies de plantas até agora analisadas. Devido à íntima associação entre os endófitos e as espécies vegetais, tem sido sugerido que estes microrganismos co-evoluíram com os seus hospedeiros (MISAGHI e DONDELINGER, 1990), apresentando uma íntima interação mutualística, onde os endófitos recebem nutrientes e proteção da planta hospedeira e a planta apresenta também vantagens decorrentes dessa interação. Dentre elas, destacam-se a maior resistência a estresses bióticos e/ou abióticos (SAIKKONEN et al., 1998), a resistência contra patógenos (HALLMANN et al., 1997), a promoção de crescimento da planta (HALLMANN et al., 1997), entre outros benefícios.

2.2.2 Endófitos associados à noni

Fungos, leveduras e bactérias associados a uma planta hospedeira podem auxiliar no seu metabolismo e conseqüentemente, na produção de metabólitos secundários com forte potencial medicinal. Porém, ainda são poucos os trabalhos sobre a microbiota endofítica associada à noni.

Kumala e Siswanto (2007) isolaram microrganismos endofíticos dos ramos de *M. citrifolia*. Neste estudo, foram obtidos 11 fungos endofíticos e 5 bactérias endofíticas na forma de bastão, sendo 3 Gram-positivas e 2 Gram-negativas. Tanto as bactérias como os fungos endofíticos isolados (à exceção de um isolado fúngico) produziram substâncias antimicrobianas com ampla atuação na inibição de bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras.

Segundo Radu e Kqueen (2002), os extratos das culturas de fungos endofíticos isolados do noni apresentam ação antitumoral positiva no ensaio contra células de levedura.

3 DESCRIÇÃO METODOLÓGICA

3.1 Isolamento e Purificação de Fungos Endofíticos de Folhas e Frutos de *M. citrifolia*

As folhas e frutos de noni foram coletados em Manaus (Campus Universitário Senador Arthur Virgílio Filho). Transportado ao laboratório, o material vegetal foi lavado em água corrente e submetido ao protocolo de desinfecção do tecido descrito por Azevedo et al. (2010), utilizando o método do hipoclorito de sódio.

Após a desinfecção superficial, as folhas foram fragmentadas com bisturi estéril, em quadrados pequenos (aproximadamente 2 x 2mm), os quais foram transferidos para placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose – BDA (Himedia) suplementados com 0,1% de tetraciclina – Tc (50 µg/mL), para a inibição do crescimento de bactérias.

Após a desinfecção superficial, os frutos foram partidos, para que fragmentos da polpa fossem coletados com pinça autoclavada e transferidos para placas de Petri contendo meio BDA + Tc, conforme o protocolo para folhas.

As placas contendo fragmentos de folhas e aquelas contendo fragmentos de fruto foram incubadas em estufa tipo BOD a 28°C. Diariamente, as placas contendo fragmentos de folhas e frutos foram analisadas quanto ao crescimento dos fungos. As colônias desenvolvidas foram re-isoladas individualmente para placas contendo BDA + Tc, as quais foram novamente submetidas à incubação, por aproximadamente 4 dias.

Após o crescimento, a superfície de cada colônia fúngica foi raspada com o auxílio de uma alça de platina e o material coletado foi depositado em microtubos (tipo Eppendorf) individualizados contendo 1,5mL de solução salina (NaCl 0,8%) autoclavada. Os microtubos foram submetidos à homogeneizador do tipo Vortex por aproximadamente 10 segundos.

Após a homogeneização, uma alíquota de 20µL da suspensão de esporos foi distribuída com alça de Drigalski sobre a superfície do meio BDA + Tc em placa de Petri, a qual foi incubada em estufa tipo BOD a 28°C. Colônias monospóricas foram purificadas para placas de Petri contendo BDA, as quais foram novamente incubadas em estufa BOD a 28°C para o desenvolvimento das colônias. As colônias monospóricas obtidas foram armazenadas conforme descrito a seguir.

3.2 Armazenamento dos Fungos Isolados

Os fungos foram armazenados, utilizando três metodologias diferentes: método do meio inclinado e Castelani em diferentes temperaturas e método de conservação em óleo mineral à temperatura ambiente.

3.2.1 Método do tubo inclinado

Neste método, um pequeno fragmento de BDA contendo micélio foi depositado sobre a superfície do meio BDA disposto em tubo de ensaio inclinado (aumento da superfície de crescimento do fungo). Submeteu-se os tubos contendo os isolados à estufa BOD (28°C) e

após o crescimento dos isolados, dois tubos foram mantidos à temperatura ambiente, enquanto duas réplicas foram mantidas refrigeradas (4°C).

3.2.2 Método de Castelani

Neste método, 10 a 15 pequenos discos de BDA (5mm de diâmetro) contendo micélio são submersos em frascos de penicilina contendo 20mL de água destilada autoclavada. Os frascos foram lacrados e mantidos à temperatura ambiente e em geladeira (duplicata).

3.2.3 Método de conservação em óleo mineral

Neste método, aproximadamente 10mL de meio BDA foram vertidos em frascos de penicilina. Um fragmento de BDA com micélio foi inoculado sobre a superfície do meio de cultura e em seguida, os frascos contendo micélio foram submetidos à incubação em estufa BOD até a colonização micelial da superfície do meio de cultura. Após a colonização, depositou-se sobre a colônia, 5mL de óleo mineral (Nujol®) autoclavado. O frasco foi vedado e mantido à temperatura ambiente.

3.3 Caracterização Morfológica do Micélio Vegetativo

A macromorfologia dos isolados foi determinada, analisando-se características como a velocidade de crescimento, a cor do micélio, a presença de pigmentação, a coloração reversa, a textura da colônia, o relevo e a borda da colônia.

A micromorfologia foi analisada por meio de microcultivo em placas de Petri. Para este método, retiraram-se dois pequenos fragmentos de micélio (sem ágar), os quais foram dispostos em posições equidistantes na superfície do meio de cultura, em placa de Petri. A seguir, uma lamínula autoclavada foi depositada e pressionada sobre cada um dos pequenos inóculos. As placas foram submetidas à incubação durante 2-7 dias a 28°C. Após observação do crescimento micelial sobre a lamínula, a mesma foi retirada cuidadosamente com auxílio de um pinça e posicionada sobre uma lâmina de microscopia contendo uma

gota de corante lactofenol-azul-algodão. Observou-se a presença de estruturas vegetativas e reprodutivas utilizando microscópio óptico (Aumento de 400X).

4 RESULTADOS FINAIS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e Purificação de Fungos Endofíticos de Folhas e Frutos de *M. citrifolia*

As plantas de noni das quais foram isolados os endófitos apresentaram aspecto saudável, sem manchas foliares ou qualquer outra característica que pudesse ser atribuída a sintomas fitopatológicos. Desta forma, os isolados obtidos foram considerados endófitos. Foram obtidos 75 isolados de fungos endofíticos de *M. citrifolia* em uma coleta realizada no mês de Março de 2011. Fungos morfológicamente semelhantes dentro de um mesmo tratamento (folha/planta ou fruto/planta) foram desconsiderados, tendo por fim, sido obtidos 21 fungos distintos morfológicamente. De acordo com Carroll (1988), a composição microbiana endofítica pode variar em função da espécie vegetal, distribuição geográfica, idade da planta, precipitação anual, entre outros fatores.

Nos isolamentos a partir de folhas (maduras e jovens), a eficiência geral de isolamento foi de 28,84%. No entanto, quando considerados separadamente, observa-se que a eficiência de isolamento a partir de folhas maduras foi muito maior (100%), se comparada à de folhas jovens (26%). Assim, observa-se que, nos materiais vegetais utilizados neste estudo, folhas maduras forneceram grande disponibilidade de endófitos, contrastando com a reduzida quantidade de endófitos associadas a folhas jovens (Figura 04). A diferença, talvez, seja devida ao fato de que as folhas maduras, tendo um tempo de desenvolvimento maior, também fornecem um tempo maior para a colonização de fungos endofíticos. Além disso, folhas jovens apresentam mecanismos de defesa por vezes mais acentuados, para que ocorra a efetiva proteção no início do desenvolvimento. Outra observação é a intensa oxidação do material vegetal jovem, indicando, talvez, mais um motivo pelo qual o isolamento tenha sido insatisfatório. Acredita-se que, com a oxidação do

material vegetal, os fungos associados ao tecido (se existentes), não conseguiram se desenvolver.

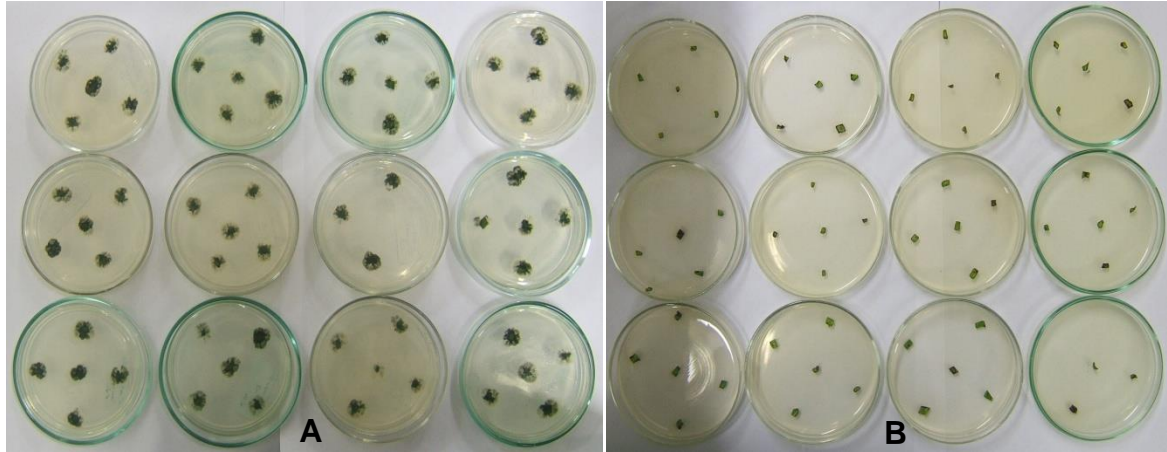


Figura 04 – Placas de isolamento de fungos endofíticos associados a *M. citrifolia*. Em **(A)** observa-se a ausência de diversidade biológica da microbiota fúngica associada a folhas maduras de noni. Em **(B)**, observam-se as placas evidenciando o não desenvolvimento de colônias endofíticas associadas às folhas jovens de noni.

Outra consideração importante foi a obtenção de colônias morfologicamente semelhantes. Assim, considera-se que, embora a eficiência de isolamento em folhas maduras tenha sido elevada, o mesmo não se aplica à diversidade, que foi considerada baixa. Porém, vale ressaltar que métodos como o empregado, apenas permitem o crescimento dos chamados microrganismos endofíticos cultiváveis. Acredita-se que muitos dos microrganismos associados a plantas não são passíveis de cultivo *in vitro*, sendo necessárias técnicas outras que permitam a detecção dos mesmos.

O isolamento de endófitos a partir de frutos indicou uma eficiência baixíssima de isolamento (10%), quando comparado com as folhas. Foram obtidas 6 colônias a partir de 60 fragmentos de fruto. Das 6 colônias obtidas, 4 foram consideradas morfologicamente divergentes entre si.

4.2 Armazenamento dos Fungos Isolados

Os 75 isolados obtidos no isolamento foram armazenados conforme descrito no item 3.2. Na Figura 05, é possível observar o armazenamento dos fungos pelo método do tubo inclinado e o método de Castelani descritos nos itens 3.2.1 e 3.2.2, respectivamente.

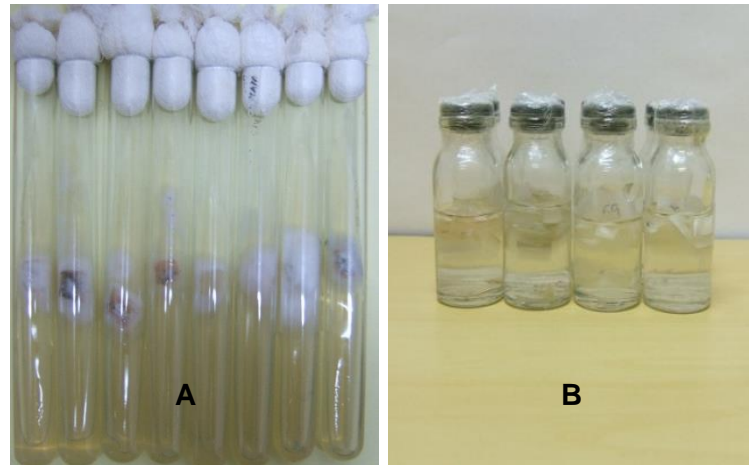


Figura 05 – Isolados de fungos endofíticos associados a *M. citrifolia* armazenados, conforme o método do tubo inclinado (A) e Castelani (B).

4.3 Caracterização Morfológica do Micélio Vegetativo

A caracterização dos 75 isolados foi realizada após 6 dias de crescimento em meio BDA. As características macromorfológicas dos isolados, encontram-se descritas na Tabela 01.

Tabela 01. Características macromorfológicas dos 75 isolados de fungos endofíticos associados a *M. citrifolia* L.

ISOLADO	CARACTERÍSTICAS MACROMORFOLÓGICAS
1	Crescimento micelial lento, colônia verde escura, sem pigmentos, coloração micelial reversa verde escura a negra, textura da colônia é do tipo membranosa, com bordas levemente irregulares, e de aspecto arenoso.
2	Crescimento micelial rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa rosa, textura cotonosa, com bordas regulares.
3	Crescimento micelial lento, colônia rosa, sem pigmentação, coloração micelial reversa rosa, textura cotonosa, bordas regulares.
4	Crescimento micelial muito lento, colônia negra, sem produção de pigmentos, textura do tipo membranosa, coloração micelial reversa negra, com bordas irregulares.

Tabela 01. Características macromorfológicas dos 75 isolados de fungos endofíticos associados a *M. citrifolia* L. (Continuação 1)

ISOLADO	CARACTERÍSTICAS MACROMORFOLÓGICAS
5	Crescimento micelial intermediário, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura da colônia do tipo veludosa, borda regular.
6	Crescimento micelial muito lento, colônia verde, sem pigmento, coloração micelial reversa amarela, textura veludosa, com bordas irregulares.
7	Crescimento micelial lento, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura veludosa, com bordas regulares.
8	Crescimento micelial intermediário, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura da colônia do tipo cotonosa, borda regular.
9	Crescimento micelial intermediário, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura da colônia cotonosa, borda regular.
10	Crescimento micelial rápido, colônia marrom claro, sem pigmentação, coloração reversa marrom, textura veludosa, com bordas regulares.
11	Crescimento micelial rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branco, textura cotonosa, com bordas regulares.
12	Crescimento micelial lento, colônia rosa, sem pigmentação, coloração micelial reversa rosa, textura veludosa, com bordas regulares.
13	Crescimento micelial lento, colônia verde escuro, sem pigmentação, coloração micelial reversa verde escura a negro, textura membranosa, com bordas irregulares.
15	Crescimento micelial rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branco, textura cotonosa, com bordas regulares.
17	Crescimento micelial intermediário, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa rosa, textura da colônia cotonosa, borda regular.
18	Crescimento micelial lento, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura cotonosa, com bordas regulares.
19	Crescimento micelial lento, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura veludosa, com bordas regulares.
20	Crescimento micelial rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa laranja, micélio do tipo aéreo, com bordas regulares.
21	Crescimento micelial rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração reversa micelial branco, textura cotonosa, com bordas regulares.
22	Crescimento micelial rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa rosa, textura cotonosa, com bordas regulares.
23	Crescimento micelial rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa amarelo, textura veludosa, com bordas irregulares.
24 A	Crescimento micelial lento, colônia branca, sem pigmentos, coloração reversa micelial branco, textura cotonosa, com bordas regulares
24 B	Crescimento micelial lento, colônia branca, sem pigmentos, coloração micelial reversa branca a verde, micélio do tipo aéreo, borda regular
25	Crescimento micelial lento, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa amarelo, textura cotonosa, com bordas irregulares.
26	Crescimento micelial intermediário, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura da colônia cotonosa, borda regular.
27	Crescimento micelial muito lento, colônia verde escura a cinza, sem pigmentação, coloração micelial reversa verde escura, micélio plano, com bordas irregulares.

Tabela 01. Características macromorfológicas dos 75 isolados de fungos endofíticos associados a *M. citrifolia* L. (Continuação 2)

ISOLADO	CARACTERÍSTICAS MACROMORFOLÓGICAS
28	Crescimento micelial lento, colônia marrom, sem pigmentação, coloração micelial reversa branco, textura furfurácea, com bordas regulares.
29 A	Crescimento micelial lento, colônia branca a marrom claro, sem pigmentação, coloração micelial reversa marrom, textura cotonosa, com bordas regulares.
29 B	Crescimento micelial lento, colônia branca a verde, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura veludosa, com bordas irregulares
30	Crescimento micelial lento, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa rosa, textura veludosa, com bordas regulares.
31	Crescimento micelial rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa rosa, textura cotonosa, com bordas irregulares.
32	Crescimento micelial muito lento, colônia verde escura a negro, sem pigmentação, coloração micelial reversa verde escura, micélio membranoso, com bordas irregulares.
33	Crescimento micelial rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração reversa branca, textura furfurácea, com bordas regulares.
34	Crescimento micelial lento, colônia negra a cinza, sem pigmento, coloração micelial reversa negra, textura da colônia membranosa, revelo da colônia apiculada, e bordas irregulares
35	Crescimento micelial intermediário, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura da colônia cotonosa, borda regular.
37	Crescimento micelial lento, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa laranja, textura da colônia cotonosa, borda regular.
38	Crescimento micelial lento, colônia branca, sem pigmentação, coloração reversa laranja, textura da colônia cotonosa, borda regular.
39	Crescimento micelial lento, colônia negra, sem pigmento, coloração micelial reversa negra, textura da colônia membranosa, revelo da colônia apiculada, e bordas irregulares
40	Crescimento micelial rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura da colônia cotonosa, borda regular.
41	Crescimento micelial intermediário, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura da colônia cotonosa, borda regular.
42	Crescimento micelial muito lento, colônia negra, sem pigmentação, coloração micelial reversa negra, micélio plano, revelo da colônia cerebriforme, com bordas irregulares.
43	Crescimento micelial rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa amarela, textura da colônia furfurácea, borda regular.
44	Crescimento micelial lento, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura da colônia veludosa, borda regular.
45	Crescimento micelial lento, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa amarelo, textura da colônia cotonosa, borda irregular.
46	Crescimento micelial rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa amarela, textura da colônia furfurácea, borda regular.
47	Crescimento micelial lento, coloração laranja, sem pigmentação, coloração micelial reversa laranja, textura da colônia veludosa, borda regular.
48	Crescimento micelial lento, colônia negra, sem pigmento, coloração micelial reversa negra, textura furfurácea e bordas irregulares
49	Crescimento micelial intermediário, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura da colônia cotonosa, borda regular.

Tabela 01. Características macromorfológicas dos 75 isolados de fungos endofíticos associados a *M. citrifolia* L. (Continuação 3)

ISOLADO	CARACTERÍSTICAS MACROMORFOLÓGICAS
50	Crescimento micelial rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa rosa, textura da colônia furfurácea, borda regular.
51	Crescimento micelial muito lento, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura da colônia cotonosa, borda regular.
52	Crescimento micelial lento, colônia branca e verde, sem pigmentação, coloração micelial reversa verde, textura da colônia furfurácea, borda regular.
53	Crescimento micelial rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura da colônia furfurácea, borda regular.
55	Crescimento micelial rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração reversa branca, textura da colônia veludosa, borda regular.
56	Crescimento micelial intermediário, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa amarelo, textura da colônia cotonosa, borda regular.
57	Crescimento micelial lento, colônia verde escura, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura da colônia arenosa, borda irregular
58	Crescimento micelial lento, colônia verde escura, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca a verde claro, textura da colônia arenosa, borda irregular
59	Crescimento micelial lento, colônia verde, sem pigmentação, coloração micelial reversa verde escura, textura da colônia membranosa, borda irregular.
60	Crescimento micelial lento, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa amarelo, textura da colônia cotonosa, borda regular.
61	Crescimento micelial lento, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura da colônia veludosa, borda regular.
62	Crescimento micelial lento, colônia rosa, sem pigmentação, coloração micelial reversa rosa, textura da colônia veludosa, borda irregular.
63	Crescimento micelial lento, colônia verde escuro, sem pigmentação, coloração micelial reversa negra, textura da colônia arenosa, revelo da colônia rugoso, borda irregular.
64	Crescimento micelial muito rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura da colônia cotonosa, borda regular.
65	Crescimento micelial intermediário, colônia branca a cinza, sem pigmentação, coloração micelial reversa verde escura, textura da colônia furfurácea, revelo da colônia apiculada, borda regular.
66	Crescimento micelial lento, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa amarelo, textura da colônia cotonosa, borda regular.
67	Crescimento micelial rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa amarelo, textura da colônia cotonosa, borda regular.
68	Crescimento micelial rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa laranja, micélio do tipo aéreo, borda irregular.
69	Crescimento micelial intermediário, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca a rosa, textura da colônia cotonosa, borda regular.
70 A	Crescimento micelial rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura da colônia cotonosa, borda regular.

Tabela 01. Características macromorfológicas dos 75 isolados de fungos endofíticos associados a *M. citrifolia* L. (Continuação 4 - FINAL)

ISOLADO	CARACTERÍSTICAS MACROMORFOLÓGICAS
70 B	Crescimento micelial intermediário, colônia verde escuro, com pigmentação, coloração micelial reversa verde escura, textura da colônia arenosa, revelo da colônia rugosa, borda irregular.
71	Crescimento micelial rápido, colônia creme, com pigmentação, coloração micelial reversa creme, textura da colônia veludosa, borda regular.
72 A	Crescimento micelial lento, colônia rosa, sem pigmentação, coloração micelial reversa rosa, textura da colônia veludosa, borda regular.
72 B	Crescimento micelial lento, colônia branca, sem pigmentação, coloração reversa branco, textura da colônia furfurácea, borda irregular
73	Crescimento micelial rápido, colônia branca a laranja, sem pigmentação, coloração micelial reversa laranja, textura da colônia cotonosa, borda irregular.
74	Crescimento micelial lento, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branco a laranja, textura da colônia cotonosa, borda irregular.
75	Crescimento micelial muito rápido, colônia branca, sem pigmentação, coloração micelial reversa branca, textura da colônia furfurácea, borda regular

As análises micromorfológicas não foram concluídas, dada a necessidade da troca de bolsista, que ocasionou no atraso do cronograma inicial do projeto. No entanto, mesmo com a finalização do PIBIC, o trabalho será continuado para o segundo semestre de 2011.

5 CONCLUSÃO

Esses resultados indicam que existe diferença na densidade de endófitos em cada material vegetal analisado. Há baixa diversidade de fungos endofíticos em *Morinda citrifolia*, principalmente nos frutos, e que a parte mais indicada para o isolamento de endófitos é a folha madura do noni. O tamanho dos fragmentos pode ter influenciado na alta eficiência do isolamento, pois de acordo com Cannon e Simmons (2002) o tamanho do fragmento pode interferir na comunidade endofítica, portanto os fragmentos menores propiciam a obtenção de um maior número de isolados.

REFERÊNCIAS

ANEKPANKUL, T.; GOTO, M.; SASAKI, M.; PAVASANT, P.; SHOTIPRUK, A. Extraction of anti-cancer damnacanthal from roots of *Morinda citrifolia* by subcritical water. **Separation and Purification Technology**. 55:343–349, 2007.

ATKINSON, N. Antibacterial substances from flowering plants. 3. Antibacterial activity of dried Australian plants by rapid direct plate test. **Australian Journal of Experimental Biology**. 34:17-26. 1956.

AZEVEDO, J. L. 1998. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Ecologia Microbiana**. v.1. 1ª ed. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.; LACAVAL, P. T.; MARCON, J.; LIMA, A. O. S.; SOBRAL, J. K.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Isolamento de microrganismos endofíticos. In: ARAÚJO, W. L.; LACAVAL, P. T.; MARCON, J.; LIMA, A. O. S.; SOBRAL, J. K.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: Calq, pp. 83-92. 2010.

CARROLL, G.C. Fungal endophytes in stem and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology** 69: 2-9. 1988.

CHAN-BLANCO, Y.; VAILLANT, F.; PEREZ, A. M.; REYNES, M.; BRILLOUET, J. M.; BRAT, P. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal of Food Composition and Analysis**. 19: 645-654. 2006.

CANNON, P.F.; SIMMONS, C.M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, v.94, n 2, p.210-20. 2002.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: UNESP, 2ª ed. 604 pp. 2002.

DIXON, A. R.; MCMILLEN, H.; ETKIN, N. L. Ferment this: the transformation of Noni, a traditional Polynesian medicine (*Morinda citrifolia*, Rubiaceae). **Ecological Botany**. 53:51–68. 1999.

GILANI, A. H.; MANDUKHAIL, S.; IQBAL, J.; YASINZAI, M.; AZIZ, N.; KHAN, A.; REHMAN, N. Antispasmodic and vasodilator activities of *Morinda citrifolia* root extract are mediated through blockade of voltage dependent calcium channels. **Complementary and Alternative Medicine**. 10:1-9. 2010.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**. 43:895-914. 1997.

HIRAZUMI, A.; FURUSAWA, E.; CHOU, S. C.; HOKAMA, Y. Immunomodulation contributes to the anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) fruit juice. **Proceedings of the Western Pharmacological Society**. 39:7-9. 1996.

JAYARAMAN, S. K.; MANOHARAN, M. S.; ILLANCHEZIAN, S. Antibacterial, antifungal and tumor cell suppression potential of *Morinda citrifolia* fruit extracts. **International Journal of Integrative Biology**. 3:44-49. 2008.

KUMALA, S.; SISWANTO, E. B. 2007. Isolation and screening of endophytic microbes from *Morinda citrifolia* and their ability to produce anti-microbial substances. **Microbiology Indonesia**. 1:145-148.

MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**. 80:808-811. 1990.

MOHD, Z.; ABDUL-HAMID, A.; OSMAN, A. Antioxidative activity extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. **Food Chemistry**. 78:227-231. 2001.

NELSON, S. C. ***Morinda citrifolia* (noni)**. Species Profile for Pacific Island Agroforestry. 2005. Disponível em www.traditionaltree.org (12/09/2010).

OLIVEIRA, J. D. S. **Estudo morfo-anatômico de *Morinda citrifolia* L. (noni) cultivado no Maranhão**. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão. 58 pp. 2009.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; CAETANO, L. C.; AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**. 3:69-72. 2004.

- PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S. S. (eds.) **Microbial Ecology of Leaves**. Springer-Verlag. New York. pp. 179-197. 1991.
- PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, K. D. Fungi on *Musa acuminata* in Hong Kong. **Fungal Diversity**. 6:99-106. 2001.
- RADU, S.; KQUEEN, C. Y. Preliminary screening of endophytic fungi from Medicinal plants in Malaysia for antimicrobial and antitumor activity. **Malaysian Journal of Medical Sciences**. 9:23-33. 2002.
- SABITHA, P.; ADHIKARI, P. M. R.; SHETTY, R. M. S.; HEGDE, A.; KAMATH, A. The beneficial effects of noni fruit juice in diabetic patients. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. 3:1822-1826. 2009.
- SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M. SULLIVAN, T. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**. 29:319-343. 1998.
- SELVAM, P.; MURUGESH, N.; WITVROUW, M.; KEYAERTS, E.; NEYTS, J. Studies of antiviral activity and cytotoxicity of *Wrightia tinctoria* and *Morinda citrifolia*. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 71:670-672. 2009.
- SILVA, J. J. M. **Adubação orgânica e mineral de noni: desempenho agrônômico, nutrição da planta, qualidade de fruto e de suco**. Tese de Doutorado, Centro de Ciências Agrárias/Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba. 120 pp. 2010.
- SILVA, L. R.; MEDEIROS, P. V. Q.; LEITE, G. A.; SILVA, K. J. P.; MENDONÇA, V.; SOUSA, J. A. Caracterização do fruto de noni (*Morinda citrifolia* L.). **Horticultura Brasileira**. 27:S267-S271. 2009.
- SOLOMON, N. **The noni phenomenon**. Direct Source Publishing, Utah. 1999.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology Molecular Biology Reviews**. 67:491-502. 2003.
- WANG, M. Y.; SU, C. Cancer Preventive Effect of *Morinda citrifolia* (Noni). **Annals of the New York Academy of Sciences**. 952:161-168. 2001.

WANG, M. Y.; LUTFIYYA, M. N.; WEIDENBACHER-HOPER, V.; ANDERSON, G.; SU, C.; WEST, B. Antioxidant activity of noni juice in heavy smokers. **Chemistry Central Journal**, 3:13. 2009.

WAGNER, W. L.; HERBST, D. H.; SOHMER, S. H. Manual of the Flowering Plants of Hawaii, rev. ed. University of Hawaii Press, Honolulu, 1999.

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Informação e se caracteriza como sub projeto do projeto de pesquisa Bibliotecas Digitais.