



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ITALO GUSTAVO BRAGA HABERMANN

ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDÓFITOS DE *Cordia oncocalyx*
Allemão (Boraginaceae) EM ÁREA CONSERVADA E EM ÁREA URBANA

FORTALEZA

2025

ITALO GUSTAVO BRAGA HABERMANN

ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDÓFITOS DE *Cordia oncocalyx*
Allemão (Boraginaceae) EM ÁREA CONSERVADA E EM ÁREA URBANA

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Ciências Biológicas do Centro de Ciências
da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Souza Lima

Coorientadora: Ma. Roberta da Rocha
Miranda

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

H116a Habermann, Italo Gustavo Braga.

Análise da diversidade de fungos endófitos de *Cordia oncocalyx* Allemão (Boraginaceae) em área conservada e em área urbana / Italo Gustavo Braga Habermann. – 2025.

73 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Cristiano Souza Lima.

Coorientação: Profa. Ma. Roberta da Rocha Miranda.

1. Morfotipos. 2. Shannon. 3. Simpson. 4. Pielou. 5. PCoA. I. Título.

CDD 570

ITALO GUSTAVO BRAGA HABERMANN

ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDÓFITOS DE *Cordia oncocalyx*
Allemão (Boraginaceae) EM ÁREA CONSERVADA E EM ÁREA URBANA

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 31/07/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cristiano Souza Lima (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ma. Roberta da Rocha Miranda (Coorientadora)
Secretaria de Meio Ambiente e Mudança do Clima do Ceará (SEMA)

Prof. Dra. Denise Cavalcante Hissa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Diogo Henrique Costa de Rezende
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram, direta e indiretamente, para a realização deste trabalho:

A PROGRAD e PREX, pelo apoio financeiro através das bolsas, criando melhores condições para permanência na universidade.

A minha irmã, Karol, e a minha mãe, Neta, que me dão gigantesco apoio em todas as esferas da vida, essenciais para a pessoa que sou. A meu pai, Paulo, que estimulou diversas vezes meu interesse e pensamento científico incipiente. Em memória.

Ao Prof. Cristiano Lima, pela orientação, incentivo, e contribuições na concepção e processo deste trabalho. À bióloga Roberta Rocha, pelo estímulo e exemplo de atuação profissional, além de possibilitar a parceria do Parque Estadual Botânico do Ceará para realização desta pesquisa.

A minha Tia Conceição Braga, pelo suporte no cuidado comigo mesmo e inúmeros apoios pedagógicos ao longo de minha formação.

Ao grande amigo e biólogo Bruno Guilhon, pela amizade, pelos exemplos, pelas contribuições na escrita e em diversos processos deste trabalho e de minha vida acadêmica.

Aos amigos Débora Almeida e Matheus Henrique, pelas contribuições na escrita, em especial a parte estatística. As amigas Mia Montenegro, Talita Cruz e Lua Silva, pelo apoio e conversas durante a escrita deste trabalho.

A todos os colegas de laboratório: Mariane, Gustavo, Gabrielle e Israel pelo convívio diário e conversas. Aos antigos membros do laboratório: Mirla, Egídio, Jamile, Mayumi e Diene. Sempre será um prazer ceder 1 ou 2 placas de BDA para vocês.

E ao meu gato, Lancelot.

RESUMO

Os processos de urbanização modificam fatores bióticos e abióticos de ecossistemas. As Unidades de Conservação (UCs) visam resguardar áreas ecologicamente estratégicas de vários efeitos, entre eles, a urbanização. *Cordia oncocalyx*, com nome popular pau-branco, é uma árvore nativa da Caatinga e está presente na arborização na cidade de Fortaleza, bem como no Parque Estadual Botânico do Ceará em Caucaia. Os fungos e outros microrganismos estão presentes em praticamente todos os ecossistemas. Em tecidos vegetais, quando essa comunidade não causa danos aparentes, esses microrganismos são denominados de endófitos. Este estudo teve por objetivo comparar valores de riqueza, abundância, diversidade, equitabilidade e similaridade da composição das comunidades de fungos endófitos nas folhas de *C. oncocalyx* em duas árvores de área conservada e duas árvores de área urbanizada. Para isso foram utilizados métodos baseados em cultivo em meio de cultura, onde foram obtidos 16 morfotipos em área conservada e 19 morfotipos em área urbanizada, com 20 morfotipos no total. Os morfotipos isolados foram preservados em Castellani e em tubo inclinado com BDA. A área conservada apresentou maior abundância e presença de morfotipos dominantes. Através das análises estatísticas de diversidade analisadas no software R, observou-se que somente os índices de equitabilidade de Pielou apresentaram diferença estatística significativa, cujos maiores valores foram observados na área urbanizada. Os índices de Shannon-Wiener e Gini-Simpson foram ligeiramente maiores na área urbanizada, mas sem significância estatística. A análise de coordenadas principais (PCoA) mostrou que as composições de morfotipos das comunidades de folhas da área conservada possuíam maior similaridade (Bray-Curtis) do que as da área urbanizada. Neste estudo foi possível elucidar aspectos sobre a diversidade de comunidades de fungos endófitos em *C. oncocalyx* e como elas se apresentam no ambiente conservado e urbanizado.

Palavras-chave: Morfotipos; Shannon; Simpson; Pielou; PCoA.

ABSTRACT

Urbanization processes modify biotic and abiotic factors in ecosystems. Protected areas (PAs) aim to protect ecologically strategic areas from several effects, including urbanization. *Cordia oncocalyx*, commonly known as pau-branco, is a native tree from Caatinga and is present in Fortaleza arborization, as well as in the Parque Estadual Botânico do Ceará in Caucaia. Fungi and other microorganisms are present in virtually all ecosystems. In plant tissues, when this community does not cause apparent damage, we call these microorganisms as endophytes. This study aimed to compare the richness, abundance, diversity, evenness and similarity in composition of endophytic fungi communities in *C. oncocalyx* leaves from a conserved area and an urbanized area. Using culture-based methods in culture media, we obtained 16 morphotypes in the conserved area and 19 morphotypes in the urbanized area, 20 morphotypes in total. We preserved the isolates using Castellani and PDA slants. We observed greater abundance and the presence of dominant morphotypes in the conserved area. We analyzed the diversity statistics in R. Only Pielou's evenness indices showed a statistically significant difference, with the highest values observed in the urbanized area. The Shannon-Wiener and Gini-Simpson indices were slightly higher in the urbanized area, but no statistical significance was observed. The principal coordinate analysis (PCoA) from Bray-Curtis showed that morphotype composition in communities from the conserved area were more similar than those from the urbanized area. The principal coordinates analysis (PCoA) showed that the morphotype composition of the communities in leaves from the preserved area were more similar than the ones from the urbanized area. In this study it was possible to elucidate aspects about the community's diversity in fungal endophytes in *C. oncocalyx* and how they are presented in the conserved and urbanized environment.

Keywords: Morphotypes; Shannon; Simpson; Pielou; PCoA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Equação do Índice Shannon-Wiener	19
Figura 2 - Equação do Índice Gini-Simpson	19
Figura 3 - Equação do índice de equitabilidade de Pielou	20
Figura 4 - Locais de ocorrência de <i>C. oncocalyx</i>	26
Figura 5 - Representação dos locais de coleta.....	29
Figura 6 - Locais de Coleta	30
Figura 7 - Amostra de ramo e folhas	31
Figura 8 - Disposição de materiais na câmara de fluxo contínuo	32
Figura 9 - Regiões da folha	33
Figura 10 - Distribuição dos fragmentos em placas	35
Figura 11 - Fotografia de placa de Petri com marcações na tampa	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Contagem de colônias por árvore	39
Gráfico 2 - Contagem de colônias por área	40
Gráfico 3 - Morfotipos distinguidos por árvore	41
Gráfico 4 - Morfotipos distinguidos por área	42
Gráfico 5 - Diagrama de Venn com presença de morfotipos em cada árvore	43
Gráfico 6 - Morfotipos por área, diagrama de Venn	44
Gráfico 7 - Curva de rarefação na área conservada	46
Gráfico 8 - Curva de rarefação na área urbanizada	46
Gráfico 9 - Curva de rarefação (total)	47
Gráfico 10 - Interpolação e Extrapolação	48
Gráfico 11 - Ocorrências dos morfotipos por árvore	50
Gráfico 12 - Ocorrências dos morfotipos por área	52
Gráfico 13 - Índice Shannon-Wiener em folha por árvore	54
Gráfico 14 - Índice Shannon-Wiener em folha por área	54
Gráfico 15 - Índice Shannon-Wiener em área	55
Gráfico 16 - Índice Gini-Simpson em folha por árvore	56
Gráfico 17 - Índice Gini-Simpson em folha por área	56
Gráfico 18 - Índice Gini-Simpson em área	57
Gráfico 19 - Índice Equitabilidade Pielou em folha por árvore	58
Gráfico 20 - Índice Equitabilidade Pielou em folha por área	58
Gráfico 21 - Índice Equitabilidade Pielou em área	59
Gráfico 22 - Média Índices Shannon-Wiener em folha por área	60
Gráfico 23 - Média Índices Gini-Simpson em folha por área	60
Gráfico 24 - Média Índices de em folha por área	61
Gráfico 25 - PCoA a partir de Bray-Curtis.....	62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. Urbanização e Unidades de Conservação.....	13
2.2. Caatinga.....	16
2.3. Diversidade biológica e ecologia.....	17
2.4. Fungos endófitos.....	22
2.5. Cordia oncocalyx.....	25
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivo geral.....	28
3.2. Objetivos específicos.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1. Coleta.....	29
4.2. Desinfestação e isolamento.....	32
4.3. Incubação e obtenção de Isolados.....	35
4.4. Quantificação dos morfotipos.....	36
4.5. Índices de diversidade e estatísticas.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1. Morfotipos e colônias.....	39
5.2. Curva de rarefação e extrapolação.....	45
5.3. Morfotipos por ocorrência.....	49
5.4. Índices de diversidade.....	53
5.5. Testes estatísticos dos índices.....	59
5.6. Análise de Coordenadas Principais (PCoA).....	61
6. CONCLUSÃO.....	64
7. REFERÊNCIAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

O uso da terra pelas atividades humanas causa modificações nos ambientes. A urbanização, caracterizada pela emissão de poluentes, impermeabilização do solo, redução da cobertura vegetal, defaunação, fragmentação de habitats é um desses usos. E os ecossistemas, por conseguinte suas comunidades biológicas são modificadas profundamente, estando agora influenciados e influenciando esses novos fatores.

Países buscam formas de conter esses efeitos e garantir áreas com ecossistemas protegidos, como forma de garantir os serviços ecossistêmicos, bem como manter a biodiversidade. Áreas protegidas, chamadas Unidades de Conservação no Brasil são criadas com esses e outros objetivos. A legislação e administração pública são as principais responsáveis pela sua implementação e manutenção que possui desafios diversos.

A pesquisa científica também pode ser desenvolvida em UCs e consta como um de seus objetivos. Esse amparo pode auxiliar o Brasil não só a elucidar sobre sua biodiversidade como a desenvolver pesquisas de base e aplicadas para gerar valor a esses conhecimentos. Um dos ecossistemas que tem demonstrado necessidade de maior atenção é a caatinga.

A caatinga é um bioma único, sendo a floresta sazonalmente seca mais diversa do mundo. Seu estudo é uma excelente oportunidade, com sua exploração ainda incipiente. Suas particularidades e ameaças atuais, incluindo a desertificação e o aquecimento global, urgem por maior atenção à proteção desse bioma.

As características das comunidades de microrganismos estão sendo mais bem descritas em vários ecossistemas. Alguns exemplos: trato intestinal de mamíferos, solo, corpos d'água e interior de plantas. A crescente elucidação das relações das plantas com suas respectivas comunidades endófitas vêm sendo estudada e mostrando participação desses microrganismos em muitos processos. Esse trabalho se insere nesse contexto.

Muitas vezes a principal medida de diversidade que se utiliza é a riqueza de espécies. No entanto, ela não representa tão bem as abundâncias dessas espécies bem como a proporção dos indivíduos ou biomassa. A Ecologia utiliza-se de índices com forte base estatística aplicados à análise de diversidade para comparar comunidades distintas.

Os fungos participam de diversos processos ecológicos, sendo importantes decompositores e patógenos. Apesar de causarem diversas doenças em plantas, também possuem relações benéficas com estas, como os fungos endófitos. Esses fungos podem estar distribuídos em diferentes tecidos vegetais e também produzem metabólitos que podem estar associados a benefícios para a planta hospedeira.

Cordia oncocalyx vem sendo mais utilizada na arborização urbana em Fortaleza, Capital do Ceará. É uma planta nativa da caatinga e possui usos medicinais com estudos sobre suas propriedades. A sua distribuição em área urbana e em UCs facilita sua coleta para estudos comparativos das duas comunidades de fungos endófitos.

Esse trabalho parte das seguintes perguntas de partida: as comunidades de fungos endófitos em folhas de *Cordia oncocalyx* possuem valores de riqueza, abundância e diversidade diferentes em área conservada e em área urbanizada? E essas comunidades possuem maior semelhança entre folhas da mesma árvore? E entre folhas da mesma área?

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Urbanização e Unidades de Conservação

A urbanização modifica o ambiente natural e essas modificações são percebidas no solo, no ar e nos corpos d'água, especialmente devido à eliminação da vegetação, impermeabilização do solo e emissão de resíduos poluentes (QI; CHE; WANG, 2023). O uso da terra pode modificar o ambiente por mais de décadas, mesmo após o fim do uso (FOSTER et al., 2009).

Essas modificações podem ser fatores físicos: carbono, nitrogênio no solo e erosão do solo, e fatores biológicos, como fauna e flora (FOSTER, 2009). O impacto da urbanização nas comunidades de microrganismos também é estudado, principalmente nos microrganismos do solo (LI et al., 2024; ZHANG et al., 2019) e da água (SELVAKUMAR & BORST, 2006).

Os efeitos da urbanização na comunidade de plantas acontecem de acordo com o gradiente de urbanização. A urbanização também afeta a composição vegetal conforme o tipo de porte: arbóreas, arbustivas ou herbáceas, sendo as árvores e arbustos mais afetadas na riqueza de plantas, especialmente por influência de plantas exóticas (HOU et al., 2023).

O processo de urbanização, juntamente com as mudanças climáticas e fragmentação de habitats também influenciam sobre a sanidade e sobrevivência das espécies botânicas. Estresses bióticos e abióticos prejudicam o equilíbrio nos processos fisiológicos das plantas, bem como dos microrganismos associados. Esses desequilíbrios aumentam a taxa de mortalidade arbórea, sobretudo em situações de eventos extremos como incêndios, atividade humana e patologias (PAUTASSO et al., 2010).

Os patógenos de plantas fazem parte de um complexo sistema que envolve patógeno-hospedeiro-ambiente, outros microrganismos também estão envolvidos. Consequentemente, alterações na planta e seu equilíbrio podem

aumentar a exposição e vulnerabilidade a patógenos, sendo esse fato agravado em populações com baixa diversidade genética (PAUTASSO et al., 2010).

A legislação Brasileira define um conjunto de regras na lei nº 9.985/2000 (BRASIL, 2000), conhecida como lei do SNUC, para preservar áreas importantes para os ecossistemas. A lei instituiu o Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC), estabelecendo diretrizes fundamentais e regras de uso da terra em diversas categorias de Unidades de Conservação (UC's).

As Unidades de Conservação (UCs) são áreas protegidas, nas quais certas atividades são proibidas ou controladas a depender da categoria. Alguns exemplos dessas restrições: não construir, limitações nas regras para visitas, limitações na extração de recursos. (BRASIL, 2000).

Essas áreas criadas por lei buscam manter esses ambientes com seus ecossistemas funcionando naturalmente, ou com manejo, pequenas intervenções controladas. Essas áreas naturais, ou trazidas de volta a condições próximas aos ecossistemas naturais, com menor impacto de ações humanas e de degradação também buscam colaborar com a pesquisa científica (BRASIL, 2000).

Assim como outras categorias, Parques Nacionais e Estaduais permitem a realização de pesquisa científica (BRASIL, 2000). A pesquisa científica em áreas conservadas abrange inúmeros aspectos, entre eles a riqueza de espécies, o que pode facilitar a compreensão acerca das dinâmicas dos ecossistemas (HASSLER, 2005).

O Parque Estadual Botânico do Ceará no município de Caucaia está incluído no domínio fitogeográfico da Caatinga, com predominância de mata de tabuleiro e carnaubais (SEMA, 2021). O Parque está classificado como Parque Estadual, que segue as mesmas diretrizes dos Parques Nacionais, porém, gerido pelo Governo do Estado do Ceará, através da Secretaria de Meio Ambiente e Mudança do Clima (CEARÁ, 2012).

A Lei nº 9.985/2000, também apresenta o termo diversidade biológica de forma abrangente. Há inclusão à variabilidade dentro das espécies (variabilidade genética), origem dos organismos e aos próprios ecossistemas. A lei também faz

menção ao termo “elementos da biosfera”, que, junto com fauna e flora, pode-se incluir os microrganismos associados aos ambientes (BRASIL, 2000).

O SNUC é o maior sistema de políticas integradas para conservação do meio ambiente do mundo (BERNARD; PENNA; ARAÚJO, 2014). Apesar disso, ele não dispõe de um aporte financeiro satisfatório para que as políticas ambientais sejam adequadamente executadas. O financiamento é utilizado para contratação de pessoal, construção e manutenção de infraestrutura, realização e implementação dos planos de manejo, todas ações necessárias para que o objetivo das UC's seja cumprido (SILVA et al., 2021).

Somado a isso, outro problema é a localização e o tipo de categoria dessas UCs. Apesar dos avanços em tamanho das áreas, quando se analisa onde essas áreas foram definidas, observam-se vieses. As áreas tendem a ficar em terrenos acidentados ou áreas de baixa produtividade, a fim de evitar conflitos de interesses (VIEIRA; PRESSEY; LOYOLA, 2019).

O SNUC também se situa no contexto da Constituição Federal de 1988. O artigo 225 traz:

Art. 225. Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações (BRASIL, 1988).

Apesar da Lei brasileira não trazer explicitamente, interpretações do direito fundamental mencionam o princípio constitucional da proibição do retrocesso (SARLET; FENSTERSEIFER, 2012). Esse princípio trata as conquistas de direitos fundamentais humanos como marcos consolidados, não devendo a justiça retroceder na garantia desses direitos.

Ainda que as decisões jurídicas considerem o princípio da proibição do retrocesso, são relatados casos de redução de categoria, remoção de proteção de área ou redução da área protegida (BERNARD; PENNA; ARAÚJO, 2014).

2.2. Caatinga

A Caatinga é um domínio morfoclimático exclusivamente brasileiro e ocupa aproximadamente 10,1% do território nacional. Sua vegetação dominante é savana estépica em 63,3% da área (IBGE, 2019). O clima da Caatinga possui duas estações: estação seca e estação chuvosa. As chuvas costumam acontecer entre janeiro e maio, com pouca chuva no restante do ano. O período seco e a forte incidência solar são as principais pressões sobre as adaptações dos seres vivos desse domínio (SAMPAIO, 1995).

Entre as adaptações das plantas da caatinga estão: substituição de folhas por espinhos, caules fotossintetizantes e suculentos, perda das folhas em período seco e alterações no metabolismo (SANTOS et al., 2014). Essas adaptações e seus processos, são profundamente relacionadas à sazonalidade. A presença ou ausência de chuvas define os períodos de floração e a perda das folhas, ou deciduidade, acontece no período seco.

No entanto, a Caatinga, com 862.818 km² (IBGE, 2019), ainda é pouco conservada, tendo somente 284 UCs, que ocupam aproximadamente 81,9 mil km², correspondendo à 9,49% de seu território. Em comparação, a Amazônia possui 394 UCs para mais de 1,2 milhão de km², correspondendo à quase 29% de sua extensão (MMA, 2025). Isso reforça que as UCs não estão proporcionalmente distribuídas nos biomas brasileiros (VIEIRA; PRESSEY; LOYOLA, 2019).

Essa diferença pode decorrer do longo período de uso e ocupação da caatinga sem preocupação ambiental. Isso também se reflete nos insuficientes investimentos na proteção ambiental desse ambiente (OLIVEIRA; BERNAD, 2017). Somado a fatores socioeconômicos como baixa renda, que faz com que os governos direcionem maior parte de seus esforços nessas áreas (LEAL et al., 2005).

Atividades econômicas de subsistência são ameaças presentes na caatinga. Plantações, criação de gado, extração de madeira e ocupação humana estão entre essas atividades (TEIXEIRA et al., 2021). No entanto, essas pessoas e suas práticas precisam ser integradas às políticas de conservação, para fazerem um

uso mais sustentável dos ecossistemas, mantendo o ecossistema e extraindo o que lhe é necessário .

Baixo investimento também reflete em pouco estudo nessas áreas, de forma que a degradação de áreas da caatinga coloca em risco de extinção espécies que ainda não foram descritas (TEIXEIRA et al., 2021). Estudos na microbiota do solo auxiliam a compreender a degradação e a preservação dessas áreas. É necessário um longo período para microbiota de um solo degradado se assemelhe a de um conservado (SILVA et al., 2024; PEREIRA et al., 2021).

Dessa forma, o conhecimento das comunidades microbianas, em diversos ecossistemas e habitats, abrange relações e processos ecológicos importantes. Entre eles: ciclagem de nutrientes e estoques de carbono (BALDRIAN, 2016) e relevante no atual contexto de mudanças climáticas e perda de hábitat (ARAÚJO et al., 2021; BALDRIAN; LÓPEZ-MONDÉJAR; KOHOUT, 2023).

2.3. Diversidade biológica e ecologia

A compreensão dos processos dentro do funcionamento de um ecossistema é complexa. Uma das formas de avaliar o funcionamento dos ecossistemas é pela produtividade e eficiência na captura de recursos. Essas variáveis são associadas a riqueza de espécies e outros fatores em estudos (BROSE; HILLEBRAND, 2016).

Esse funcionamento envolve os diferentes níveis tróficos, biodiversidade e sofre influência de fatores abióticos e suas mudanças. A interação entre as espécies e o ambiente, compõe um conjunto de processos no ambiente. Fatores como disponibilidade de nutrientes, água, bem como eventos inundações, ondas de calor e secas alteram esses processos e sua estabilidade (BROSE; HILLEBRAND, 2016).

Apesar das muitas variáveis, pesquisas indicam que é a riqueza que permanece sendo o principal fator que influencia nos processos do ambiente. A quantidade de espécies favorece a estabilidade, o acúmulo de nutrientes como nitrogênio no solo, além de menor ocorrência de fungos fitopatógenos e menor

abundância de insetos herbívoros, devido a predação desses insetos (BROSE; HILLEBRAND, 2016; TILMAN; ISBELL; COWLES, 2014)

Na avaliação de riqueza, a quantidade de espécies (ou outra categoria) registrada é proporcional ao esforço amostral da pesquisa. Para avaliar a representatividade amostral em relação às espécies totais do ambiente, utilizam-se curvas de rarefação e curvas de extrapolação. Nesses cálculos, conta-se com auxílio de programação, em especial o R e seus pacotes (CHAO; CHIU, 2016).

A diversidade de um ambiente é medida então através de amostras e contagens para se obter números de espécies, riqueza e abundância. Somado a esses números, avalia-se também a distribuição e equitabilidade (ou equidade) dessas espécies nesse ambiente, com índices derivados da estatística (THUKRAL, 2017).

Esse apoio da estatística é fundamental, uma vez que a simples medição por contagem pode omitir aspectos importantes, como a raridade ou desequilíbrios em espécies dominantes nesse ecossistema. A compreensão da estatística por vezes se perde entre ecologistas e outros pesquisadores, uma vez que geralmente não são matemáticos ou estatísticos por formação (DALY; BAETENS; DE BAETS, 2018).

Os índices mais consolidados e tradicionais na ecologia são os índices de Shannon e de Simpson. O índice Shannon também é chamado de Shannon-Wiener em aplicações ecológicas, e o índice Simpson possui a variação Gini-Simpson (ou Simpson inverso) que torna a relação “maior índice, maior diversidade” mais precisa e intuitiva, facilitando as inferências, uma vez que o índice original traz essa relação invertida (DALY; BAETENS; DE BAETS, 2018).

O índice Shannon, de acordo com Dušek e Popelková (2017, p.6, tradução nossa): “expressa a incerteza em prever a qual categoria um ponto selecionado aleatoriamente em uma área analisada pertencerá”. Em outras palavras, quanto menor esse índice, mais provável é acertar essa previsão, mais “previsível e homogênea” é a distribuição nesse agrupamento de amostra.

O índice Shannon é derivado de aplicações na entropia, ou desordem em um sistema, é feito um paralelo para representar essa heterogeneidade em sistemas ecológicos (DALY; BAETENS; DE BAETS, 2018). É importante relacionar o índice à quantidade de espécies observadas, bem como a base logarítmica utilizada. Visualizando a fórmula, tem-se uma melhor compreensão.

Figura 1 - Equação do Índice Shannon-Wiener

$$H_{Sh}(\mathbf{p}) = - \sum_{i=1}^S p_i \ln(p_i)$$

H_{Sh} = Índice de diversidade de Shannon-Wiener; p : abundância relativa; p_i : abundância relativa de uma espécie i ; i : i -ésima espécie; S : total de espécies; \ln : logaritmo natural.

Fonte: DALY; BAETENS; DE BAETS (2018, p. 9).

O índice Simpson, por outro lado, é mais sensível à dominância de espécies ou categorias). Ele “representa a probabilidade de dois indivíduos retirados aleatoriamente serem da mesma espécie” (DALY; BAETENS; DE BAETS, 2018, p. 9, tradução nossa). A versão inversa (Gini-Simpson) traz essa relação invertida: de serem de espécies diferentes, portanto, maiores valores indicam comunidades mais diversas e distribuídas.

Figura 2 - Equação do Índice Gini-Simpson

$$H_{GS}(\mathbf{p}) = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2$$

H_{GS} = Índice de diversidade de Gini-Simpson; p : abundância relativa; p_i : abundância relativa de uma espécie i ; i : i -ésima espécie; S : total de espécies.

Fonte: adaptado de DALY; BAETENS; DE BAETS (2018, p. 10).

Esses dois índices, quando juntos com a riqueza de espécies e considerações tornam-se viáveis para comparar comunidades. O índice Shannon, um pouco menos sensível a espécies dominantes e o índice Gini-Simpson que decresce mais acentuadamente quando há espécies dominantes no ambiente (THUKRAL, 2017). Ainda que válido, convém cautela em interpretar pequenas variações, já que se baseiam em escalas quadráticas e logarítmicas (DALY; BAETENS; DE BAETS, 2018).

Outro índice muito utilizado é o de Equitabilidade de Pielou, derivado do índice Shannon (THUKRAL, 2017). Esse índice pode ser calculado pela razão do índice Shannon obtido pelo índice Shannon caso as espécies tivessem abundâncias iguais, ou equidade máxima, resultando em um percentual. Mesmo muito dependente da riqueza é amplamente utilizado na literatura (DALY; BAETENS; DE BAETS, 2018).

Figura 3 - Equação do índice de equitabilidade de Pielou

$$Pielou's J' = \frac{H'}{H'_{\max}} = \frac{H'}{\ln S}$$

J' : Índice de equitabilidade de Pielou; H': Índice Shannon-Wiener; H'_{\max} : Índice Shannon-Wiener caso proporções iguais; S: total de espécies; ln: logaritmo natural;
Fonte: THUKRAL, 2017.

Recentemente, há uma série de novos índices, propostos na tentativa de explicar, resumir e analisar as diferentes nuances que cada área requer (DALY; BAETENS; DE BAETS, 2018). No entanto, considerando limitações, pode-se ser mais robusto utilizar métodos já estabelecidos, compreendendo sua melhor aplicação e apresentando os índices de forma não isoladas, de forma que sua significância seja mantida (DALY; BAETENS; DE BAETS, 2018; THUKRAL, 2017).

Os avanços na forma de medir a diversidade, como esperado, se expandem para outros ecossistemas. Entre eles podemos definir os microbiomas, o

conjunto dos microrganismos presentes no ecossistema (KIM et al., 2017). Mesmo com a grande diversidade, por longa data estimativas de riqueza e aplicação de índices de diversidade são aplicados em comunidades microbianas (HUGHES et al., 2001).

Avanços da biologia molecular permitiram métodos de amostragem de microrganismos que não dependem de meio de cultura. Bancos de dados baseados no rRNA 16S (Ácido Ribonucleico da Subunidade Ribossomal 16S) para bactérias e ITS (Espaçador Interno Transcrito) para fungos desempenham um importante papel e são constantemente alimentados por novos estudos (KIM et al., 2017).

Somados aos métodos moleculares, os estudos com métodos dependentes de meio de cultura ainda são feitos, para microbiomas humanos e também ambientais. Estudos que avaliam ambos os métodos, citam as duas metodologias como complementares para caracterizar a diversidade microbiana (KIM et al., 2017; LEE et al., 2016; PANDYA et al., 2017).

O rRNA 16S (para bactérias), 18S (em fungos) e o ITS nesses estudos são tratados como OTUs (Unidades de Taxonômicas Operacionais) e, apesar de não serem espécies por definição, são tratadas como espécies nos registros de riqueza e de índices de diversidade, que já preveem outras categorias além de espécies. Outra categoria presente em estudos baseados em morfologia, são os morfotipos, considerados em muitos estudos de fungos endófitos (ALBRECHTSEN et al., 2018; SANTOS et al., 2020).

Estudos que utilizam morfotipo como "categoria" citam essa ressalva. Posteriores análises rotineiramente classificam mais de um morfotipo para um único gênero (SANTOS et al., 2020). A identificação por via molecular ou morfológica consome tempo e recursos, portanto, considerar morfotipos pode permitir que estudos e conclusões sejam viáveis (SUN; GUO, 2012).

2.4. Fungos endófitos

Os fungos podem ser definidos como um grupo heterotrófico, monofilético, pertencente ao domínio Eukarya e com parede celular de quitina (NISKANEN et al., 2023). Eles desempenham importantes papéis nos processos ecossistêmicos. Como: decompositores, micorrízicos simbiotes, nos líquens e como parasitas (DIGHTON, 2016).

Os fungos são um grupo diverso, com mais de 155.000 espécies descritas (BÁNKI et al., 2025). Estimativas recentes propõem entre 2,2 e 3,8, (HAWKSWORTH; LÜCKING, 2017; NISKANEN et al., 2023). A biologia molecular, tanto para analisar novas espécies como para definir novas espécies em microrganismos já conhecidos, impulsiona o crescimento desses números (NISKANEN et al., 2023).

O avanço das tecnologias de biologia molecular, especialmente o *metabarcoding*, mudou drasticamente como identificar a presença de espécies em todos os campos da microbiologia. A biologia molecular também descreve novas espécies contidas em espécies estabelecidas, os chamados complexos de espécies (NISKANEN et al., 2023; SANTOS et al., 2019)

Em NISKANEN et al. (2023) e em TRUONG et al. (2017) são citados vieses na descoberta dessas novas espécies ocultas. Como a maior quantidade de estudos em fungos do solo, comparado a outros habitats. Bem como a menor cobertura de estudos em ecossistemas de áreas tropicais, mesmo que sejam ecossistemas com maior diversidade de espécies esperada.

Um dos grupos de fungos que vem ganhando destaque são os fungos endófitos (ZHENG et al., 2015). Os fungos endófitos podem ser definidos como fungos que habitam o interior das plantas, porém sem causar danos aos hospedeiros (HYDE, SOYTONG, 2008). Em geral, a definição incluiria os fungos micorrízicos, porém esses são tratados como uma área distinta dentro da Micologia.

Esse grupo de fungos vêm sendo estudados e sua presença já foi relacionada com menor ataque de pragas da planta, promotores de crescimento,

tolerância à seca e até controle de doenças de plantas (BAMISILE et al., 2018; BUSBY et al., 2015). Além do crescente número de estudos de diversidade possibilitar novos compostos químicos para outros usos humanos (HYDE, SOYTONG, 2008; ZHENG et al., 2015).

Outro fator que influencia na importância do estudo dos fungos endófitos é a crescente quantidade de dados indicando fungos endófitos como patógenos de plantas latentes ou habitando espécies não suscetíveis (SALVATORE; ANDOLFI; NICOLETTI, 2020). Reforçando a tese de que patógenos podem ter se espalhado por outras plantas na forma de endófitos (SALVATORE; ANDOLFI; NICOLETTI, 2020).

O número de espécies de fungos descritas que conseguem viver de forma endofítica ainda permanece desconhecido (BHUNJUN et al., 2023). Os principais gêneros encontrados nos fungos endófitos são: *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Glomerella*, *Guignardia*, *Leptosphaerulina*, *Nigrospora*, *Phoma*, *Phomopsis* e *Xylaria* (ZHENG et al., 2015).

O principal método para isolamento de fungos endófitos consiste em coletar tecidos vegetais saudáveis, esterilizar suas superfícies, padronizar fragmentos e dispor os fragmentos em meios de culturas. Esse método de análise possui alguns vieses, devido a seletividade do meio e predomínio dos fungos de crescimento rápido, mas facilita futura extração de metabólitos (HYDE, SOYTONG, 2008).

Dentro da planta, as comunidades de fungos endófitos, diferem de acordo com o tecido vegetal. Os fungos observados nas folhas, diferem dos fungos observados nas raízes, bem como dos observados em caule. A localização geográfica da planta também pode interferir. A mesma espécie pode apresentar comunidades distintas, mudando o país ou zona climática (tropical, temperada etc.) (ZHENG et al., 2015).

Outro fator que modifica a abundância e distribuição desses fungos são as condições da planta e do ambiente. Plantas mais velhas tendem a ter mais fungos colonizando-as. A cobertura vegetal próxima a essa planta, a presença de

dossel, bem como fatores ambientais (umidade, precipitação, mudanças de estação, presença de poluentes), podem modificar essa comunidade (ZHENG et al., 2015).

As comunidades de fungos endófitos também podem diferir de acordo com a localização interna da folha. Proximidade da face adaxial ou abaxial e nervuras, podem interferir e estudos avaliando somente folhas podem não acessar essa distribuição (HARRISON; GRIFFIN, 2020). O padrão de colonização dos tecidos foliares ainda não foi claramente descrito, ocorrendo em mosaicos de colonização (YAN et al., 2015).

Na competição dos fungos por esses espaços e recursos foliares, relações de antagonismos são comuns. Os compostos produzidos nessas relações de antagonismo e competição, se espalham pelo sistema vascular das plantas. Sugerindo uma explicação aos benefícios observados em plantas colonizadas por endófitos, por exemplo: menos infecções por patógenos e herbívora por insetos, que também podem ser sensíveis a esses compostos (YAN et al., 2015).

A compreensão dessas comunidades e como ela se modifica com diferentes gradientes ainda possui lacunas. Preencher essas lacunas, favorece não só indicadores de onde estão as espécies ainda a serem descobertas, bem como colabora para o entendimento dos processos ecossistêmicos existentes (OONO et al., 2020; ZHENG et al., 2015).

O uso de índices de diversidade pode ser usado nesses estudos comparativos em regiões da planta. Em folhas e raízes da soja (*Glycine max*), as comunidades de folhas e raízes (FERNANDES et al., 2015) mostraram-se diferentes, com mais riqueza, abundância, diversidade e equitabilidade nas folhas. Foi observado também uma alta dominância de espécies de *Fusarium* nas raízes, preocupante devido a doenças causadas por muitas espécies do gênero.

Comparar regiões pode ser uma forma de compreender a dinâmica e diferenças entre comunidades de fungos endófitos. O estudo de MATSUMURA e FUKUDA (2013), compara diferentes composições do ambiente: próximo a plantação, floresta nativa e área suburbana. Foram avaliados índices de diversidade em comunidades de fungos endófitos obtidos através de isolamento em meio de cultura e posteriormente identificados via molecular.

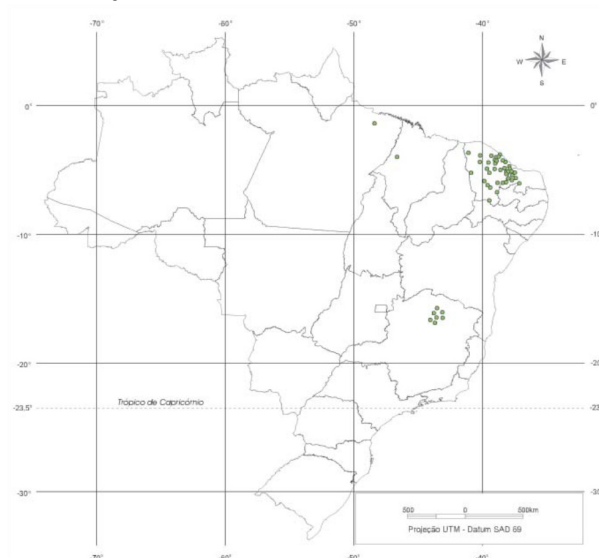
2.5. *Cordia oncocalyx*

Cordia oncocalyx Allemão é uma planta arbórea nativa da Caatinga. *Cordia oncocalyx* é uma árvore decídua que atinge até 12 metros de altura e até 45 centímetros de diâmetro à altura do peito. Com ramificação dicotômica e copa bastante ramificada. Possui folhas simples alternas e elípticas, de 12 a 25 centímetros de comprimento (CARVALHO, 2008). É conhecida popularmente como pau-branco ou pau-branco-do-sertão.

C. oncocalyx teve seu gênero recentemente reposicionado de *Auxemma* para *Cordia*. Em revisão taxonômica, o acúmulo de dados moleculares e morfológicos resultaram no agrupamento das espécies de 3 antigos gêneros, *Auxemma*, *Patagonula* e *Saccellium*, no gênero *Cordia* (GOTTSCHLING & MILLER, 2006). Alguns trabalhos ainda trazem *Auxemma oncocalyx* como sinônimo.

Suas principais áreas de ocorrências são no Ceará, Minas Gerais e Rio Grande do Norte. A árvore vem sendo utilizada para a arborização urbana como planta ornamental, devido às suas flores brancas. Também foi muito usada no passado para extrativismo vegetal, sendo sua madeira usada para móveis e na construção civil (CARVALHO, 2008).

Figura 4 - Locais de Ocorrência de *C. oncocalyx*



Fonte: CARVALHO, 2008

O Pau branco também é usado na medicina popular por extratos cicatrizantes, devido à alantoína. Além dela, encontra-se também a oncocalixona A, relacionada com ação antitumoral em ratos (FERREIRA et al., 2004). A oncocalixona A ainda é relatada como potencial agente antitumoral, antiglicante, anti-inflamatório, e até analgésico, sendo necessário mais estudos para esclarecer esses mecanismos de ação (SILVA et al., 2021b).

A oncocalixona A também é a responsável pela coloração escura no interior do caule. Várias outras moléculas homólogas foram identificadas, junto com oncalixona C e alantoína. Ao analisar-se o conjunto de moléculas de *C. oncocalyx* e as encontradas em outras plantas do gênero, nota-se a semelhança estrutural, reforçando o reposicionamento taxonômico (FERREIRA et al., 2023).

Relacionando *Cordia oncocalyx* e fungos endófitos são relatados alguns trabalhos: micorrizas arbusculares como em PAGANO et al. (2013), a espécie de fungo micorrízico arbuscular *Septoglomus furcatum*, em *C. oncocalyx* (BLASZKOWSKI et al., 2013). Isso sugere que *Cordia oncocalyx* ainda não possui trabalhos com fungos endófitos de folhas publicados.

Outros trabalhos de comunidades endófitas no gênero *Cordia* relatam fungos endófitos e correlação com redução de atividade de formigas cortadeiras em *Cordia alliodora* (BITTLESTON et al., 2010). Também micorrizas em *Cordia elaeagnoides* e de outras árvores (ALVAREZ-MANJARREZ et al., 2021). Bem como bactérias endófitas em *Cordia dicothoma* e uso de seus metabólitos (SHARMA et al., 2022, 2023).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar comunidades de fungos endófitos em folhas de *Cordia oncocalyx* através de métodos dependentes de meio de cultura.

3.2. Objetivos específicos

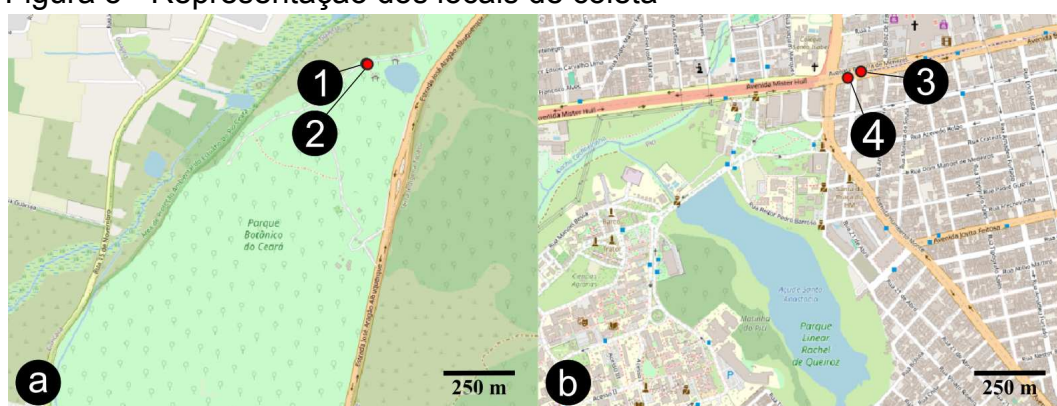
1. Analisar valores de riqueza, abundância e diversidade em comunidades de fungos endófitos em folhas de *Cordia oncocalyx* observadas em área conservada e em área urbanizada;
2. Identificar, se houver, quais são os morfotipos dominantes;
3. Analisar similaridades e particularidades entre as comunidades de fungos endófitos em folhas entre as duas áreas e entre as quatro árvores;
4. Obter isolados de fungos endófitos de folhas de *C. oncocalyx*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta

As áreas selecionadas para as coletas (Figura 5) são: 1) área urbana, localizada ao fim da Avenida Bezerra de Menezes, e 2) área conservada, localizada no interior da Unidade de Conservação Parque Estadual Botânico do Ceará. Selecionou-se 2 árvores em cada área. As coordenadas das 4 árvores estão no apêndice. A localização das árvores também estão representadas em mapa na figura 5.

Figura 5 - Representação dos locais de coleta



Legenda: a) Local das árvores da área conservada. b) Local das árvores da área urbanizada.

Fonte: OpenStreetMap.

Figura 6 – Locais de Coleta



Legenda: a) Coleta das árvores em área conservada. b) Arredores do local de coleta na área urbanizada. c) Ramo da árvore 4 sendo coletado com tesoura de poda aérea.

Fonte: Autor.

O critério para escolhas das árvores foram árvores com altura acima de 2,5 metros e com folhas com pouco ou nenhum sinal de doenças de plantas ou deficiência hídrica. Registrou-se em um caderno as coordenadas de cada árvore a partir de localização do GPS embutido no smartphone. As coordenadas se encontram em apêndice do presente trabalho.

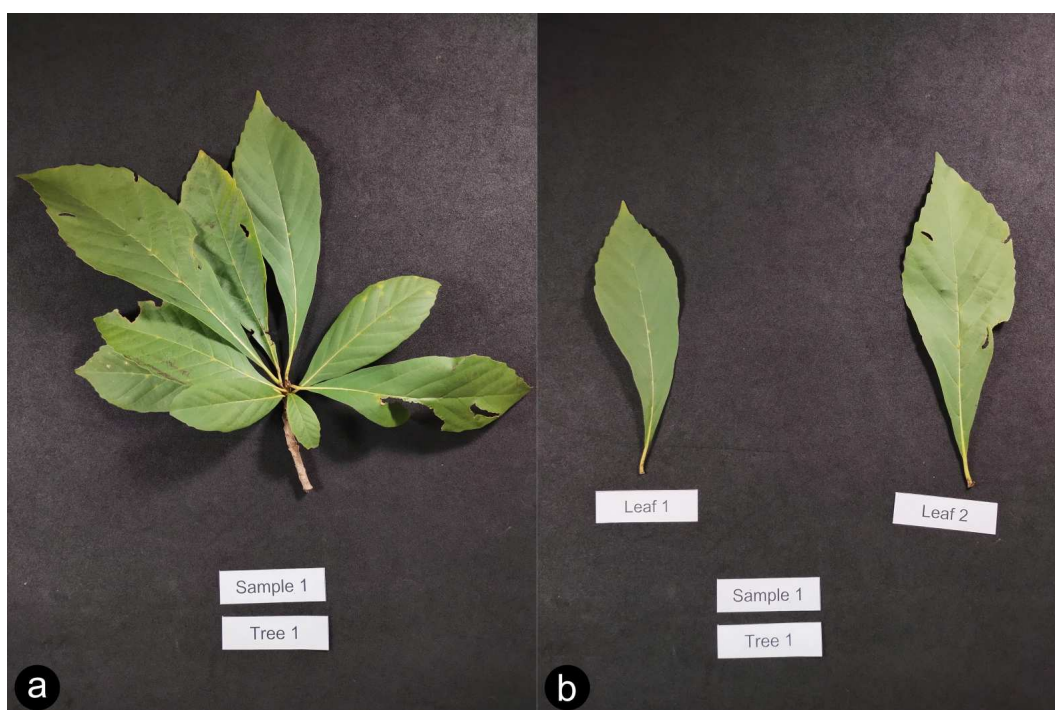
Realizou-se coletas de ramos apicais de *Cordia oncocalyx*, entre 20 e 10 cm de extensão, junto com a gema apical e as folhas desse trecho do caule. Utilizou-se tesoura de poda de mão e tesoura de poda aérea para cortar a secção desejada. Foram coletados 5 a 6 ramos de cada árvore.

Os respectivos ramos foram colocados em sacos plásticos translúcidos novos, sem fechá-los completamente, e escreveu-se na parte externa a qual árvore pertence o ramo. Os sacos foram colocados dentro de caixas de poliestireno expandido com gelo, em bolsas térmicas no fundo, isolado de contato direto com as amostras por jornal.

Dentro de 24 horas após a coleta, em laboratório, os ramos passaram por mais uma seleção. Escolheram-se os 4 ramos mais íntegros (com as folhas mais verdes e com menos sinais de herbivoria de insetos) de cada árvore. A partir de então, o ramo passou-se a se denominar amostra 1, 2, 3 e 4, da árvore 1, 2, 3 ou 4.

Escolheu-se da amostra as folhas que seriam desinfestadas e isoladas. Registrou-se cada amostra e folhas selecionadas com fotografia de acordo com o exemplo na Figura 7, as demais fotos estarão na seção de anexos. Então as folhas foram lavadas com água corrente da torneira antes de seguir para os procedimentos microbiológicos.

Figura 7 – Amostra de ramo e folhas



Legenda: a) Fotografia da amostra 1 da árvore 1. b) Fotografia das folhas 1 e 2 da árvore 1

Fonte: Autor.

4.2. Desinfestação e isolamento

Em câmara de fluxo laminar, com condições e técnicas assépticas, a desinfestação seguiu o método de KHALIL et al. (2021). Utilizou-se álcool etílico 70%, hipoclorito de sódio 2,5% e água destilada e esterilizada. Esses líquidos foram dispostos em placas de Petri, com aproximadamente 150 mL em cada.

Devido à limitação de tamanho das placas de Petri, que possuem 15 cm de diâmetro, algumas folhas foram cortadas ao meio perpendicularmente à nervura central para que pudessem ser acomodadas dentro das placas. Reiterando que as folhas foram enxaguadas antes de ir para a câmara, a sequência utilizada na desinfestação foi:

1. Imersão em álcool etílico (70%) por 1 minuto;
2. Imersão em hipoclorito de sódio (2,5%) por 4 minutos;
3. Imersão em álcool etílico (70%) por 30 segundos;
4. Imersão e retirada em ADE (água destilada e esterilizada) 3 vezes, em recipientes distintos.

Figura 8 - Disposição de materiais na câmara de fluxo contínuo



Fonte: Autor.

Para manipulação das folhas e fragmentos utilizou-se pinças de aço inoxidável. Entre o manuseio de uma folha e outra, as pinças eram flambadas, sem deixar que tocasse superfícies não estéreis. Após a desinfestação das folhas, retiram-se fragmentos circulares de 3mm de diâmetro. Para a retirada, apoiou-se a folha em papel filtro esterilizado e utilizou-se furador de rolha que foi flambado entre as retiradas.

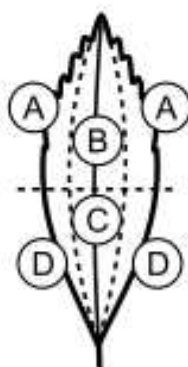
Os fragmentos foram de regiões específicas da folha, em relação à distância do pecíolo e da nervura central. A tabela 1 define as regiões da folha enquanto a figura 9 ilustra essas regiões da folha.

Tabela 1. Regiões da folha

Região	Em relação ao pecíolo	Em relação à nervura central
A	Distante	Distante
B	Distante	Próximo
C	Próximo	Próximo
D	Próximo	Distante

Fonte: Autor.

Figura 9 - Regiões da folha



Fonte: Autor.

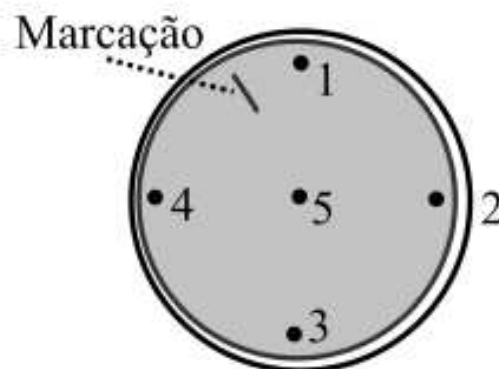
Utilizando-se de placas de Petri previamente vertida em condições assépticas, retirou-se 5 fragmentos de cada região da folha, que foram dispostos em uma mesma placa. Cada placa com 15mL (+/- 2mL) de meio de cultura e foram vedadas após o posicionamento dos fragmentos. Dessa forma, cada folha resultou em 4 placas de Petri com 20 fragmentos no total.

Essas placas se denominaram “placas do isolamento”, abreviadas para Co “nnn”. Nas quais “Co” indica *C. oncocalyx* e “nnn” a numeração da placa. A tabela nos apêndices demonstra cada região, árvore, amostra, folha e região da folha de cada placa. Duas placas também foram inoculadas com 500µL da última água destilada do processo de desinfestação, para testar a eficiência do processo de desinfestação.

O meio de cultura das placas de Petri foi BDA 1/2, com estreptomicina [500mg/L] e cloranfenicol [500mg/L]. A concentração dos nutrientes do meio foi reduzida (em relação ao BDA convencional) para diminuir as taxas de crescimento dos fungos, facilitando a etapa de obtenção de isolados. Essa mudança se baseou em testes de isolamento anteriores. Enquanto a adição de antibióticos visa inibir crescimento bacteriano indesejado.

Cada placa de Petri foi marcada na superfície inferior, próximo à borda, com um pequeno traço, utilizando pincel permanente. Para servir de referência para cada fragmento: da visão superior, sentido horário, após a marcação, 1, 2, 3 e 4, sendo o do meio o fragmento 5 (figura 10). O fragmento pode ser referenciado como Co “nnn.y”, seguindo o início da notação de acordo com a placa e a letra “y” sendo o fragmento (1 a 5).

Figura 10 - Esquema de distribuição e denominação dos fragmentos em placa de Petri



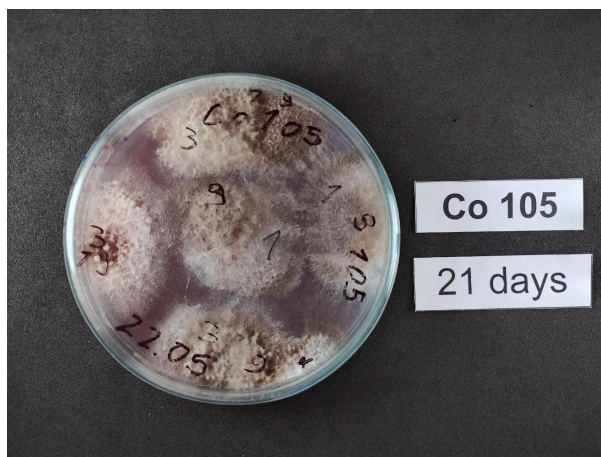
Fonte: Autor.

4.3. Incubação e obtenção de Isolados

Após a desinfestação e retirada dos fragmentos em câmara de fluxo laminar, as placas seguiram para incubação. Na sala de incubação, o ar-condicionado foi programado para 25° C e as luzes programadas em fotoperíodo de 12 horas, durante o período de 21 dias.

As placas foram conferidas a cada 3 dias para marcação dos morfotipos observados (figura 11). A marcação dos morfotipos foi feita temporariamente na respectiva tampa da placa de Petri, atualizada a cada vez que era conferida. Os morfotipos quantificados também foram sendo transcritos em planilha digital. As placas foram armazenadas na sala de incubação para possíveis novos repiques de isolados.

Figura 11 - Placa de Petri com marcações



Legenda: Placa contendo marcação da placa: Co 105, data: 22.05 e marcações de morfotipos observados: 1, 3, 4 e 9. Fonte: Autor.

Cada morfotipo foi isolado em pelo menos um exemplar (chamado aqui de Isolado). Esse Isolado do morfotipo foi feito através de ponta de hifa para uma nova placa de Petri com BDA em concentrações normais. O isolamento da cultura pura foi feito em sala de repicagem, bem como os outros procedimentos desse ponto em diante.

Na sala de repicagem a manipulação foi feita próximo à chama como zona de esterilidade e os instrumentos sempre esterilizados por flambagem ou calor úmido. A abertura parcial das placas foi feita próximo à essa zona de esterilidade, e a cultura manipulada com agulha, ou alça de platina.

4.4. Quantificação dos morfotipos

Ao fim do período de incubação, as placas foram fotografadas em visão superior e inferior. Optou-se por manter uma fotografia da tampa marcada com os morfotipos para possíveis consultas, antes de limpá-la e fotografá-la sem marcações, exceto a referencial (ver figura 10 do final da seção 4.3).

A quantificação considerou até o fim do período de incubação e foi feita registrando quais morfotipos eram observados em cada fragmento de cada placa. Contabilizou-se quantos morfotipos, no total, foram registrados em cada árvore e por área geográfica.

Após o fungo ser isolado das placas de Isolamento (Placas Co), passou-se a denominar esse fungo como “Isolado”. Cada Isolado foi condizente com um único morfotipo. Registrou-se cada Isolado com um código IH “nn”. “IH” refere-se às iniciais do autor do trabalho, prática do laboratório e a numeração “nn”, à sequência cronológica em que o fungo foi isolado.

Após obtenção de colônia pura, os Isolados foram preservados em tubo inclinado e em água destilada e esterilizada (Castellani). Cada Isolado também foi fotografado em crescimento. Um disco de 5 mm da borda da colônia foi posicionado no centro de outra placa de Petri com BDA para ser fotografado ao longo do crescimento, nos dias 4, 8 e 12.

Calculou-se, a partir dos registros de incidência dos morfotipos, o percentual de ocorrência dos fungos nos fragmentos de folha. Os resultados estão fracionados em partes, de acordo com os morfotipos, seguindo a sequência numérica.

4.5. Índices de diversidade e estatísticas

Calculou-se os índices de diversidade de Shannon-Wiener, Gini-Simpson e o índice de Equitabilidade de Pielou através de software R versão 4.5. Agrupou-se as amostras por árvore e por área durante o processo, bem como foi calculado o índice tratando as áreas como uma única comunidade.

Os índices possibilitam comparar a diversidade biológica de amostras das áreas conservada e urbanizada. A utilização de folhas como agrupamento permite

que testes estatísticos sejam feitos com mais robustez, sem perder significância biológica com um ou poucos fragmentos de folha.

Após apresentados os resultados dos índices, foi realizado o teste de normalidade. O teste escolhido foi o de Shapiro-Wilk devido ao tamanho do grupo amostral (folhas por área). Os agrupamentos escolhidos ocorreram como as outras etapas de análise: área conservada, com 16 folhas, área urbanizada, com 15 folhas (uma mostrou-se imprópria para aplicação de índices e total, com 31 folhas. Para os valores dos 3 índices utilizados: Shannon-Wiener, Gini-Simpson e Pielou.

O teste é necessário para saber qual teste estatístico mais adequado ou se é possível fazer alguma transformação nos dados. Após o teste, seguiu-se para o teste t de Student para medir se houve ou não diferença estatisticamente significativa entre os índices das folhas nas duas áreas.

Para analisar a semelhança das comunidades em semelhança de morfotipos foi feita uma Análise de Coordenadas Principais (PCoA). Os dados na forma coletada apresentam a incidência de morfotipos nos fragmentos, então somados em abundância de morfotipos nas folhas.

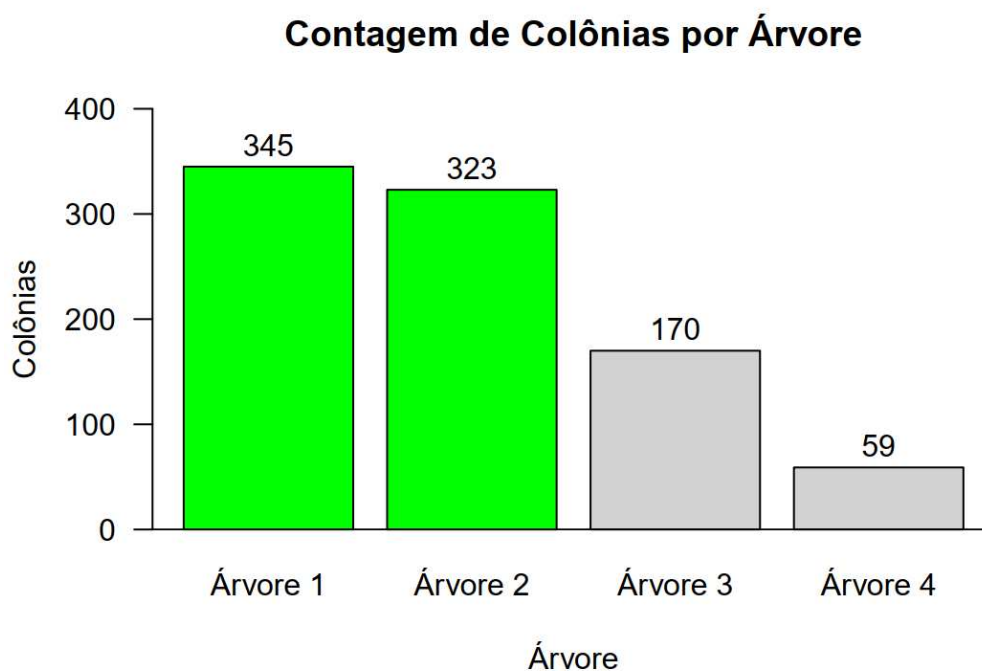
A partir dos agrupamentos das folhas, a matriz de dados: “folhas x quantidade morfotipos” foram transformadas por Hellinger . Em seguida, foi feito o cálculo de dissimilaridade entre as amostras com Bray-Curtis. A matriz triangular resultante foi processada com função PCoA do pacote ape para se obter o gráfico (LEGENDRE; GALLAGHER, 2001).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Morfotipos e colônias

Foram realizados os isolamentos de 640 fragmentos de folha. Os fragmentos foram distribuídos em 128 placas, 64 provenientes da área conservada e 64 da área urbanizada. Somadas todas as placas, observou-se o crescimento de 897 colônias de fungos. A quantidade de colônias específica de cada árvore (1 a 4) e de cada área (conservada, urbanizada e total) estão representadas nos gráficos 1 e 2.

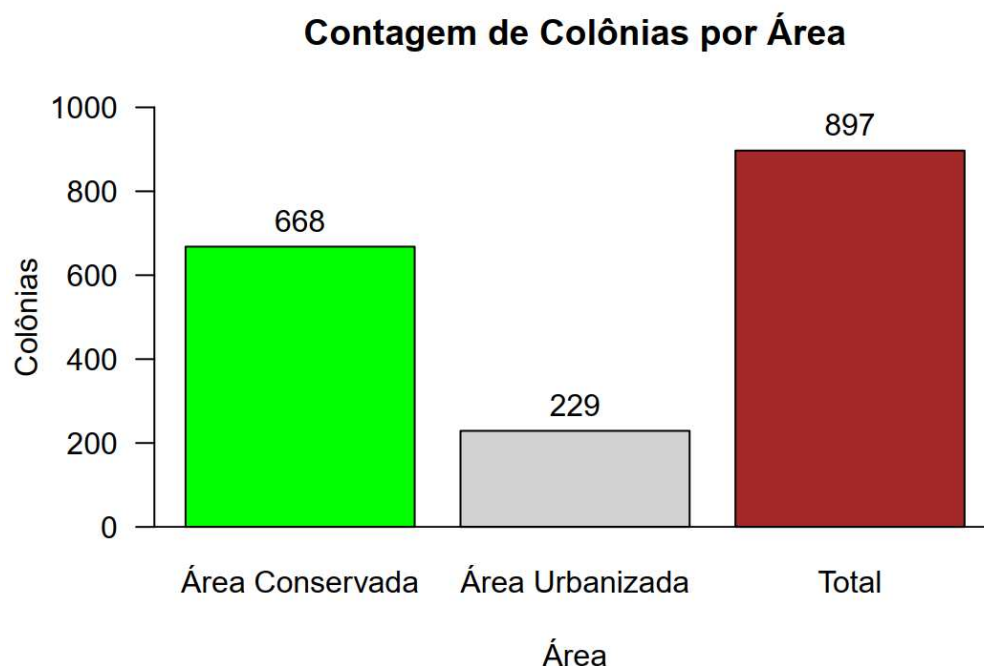
Gráfico 1 - Contagem de colônias por árvore



Legenda: cor verde: árvores da área conservada, cor cinza: árvores da área urbanizada.

Fonte: Autor.

Gráfico 2 - Contagem de colônias por área



Legenda: cor verde: área conservada, cor cinza: área urbanizada, cor marrom: representação do total. Fonte: Autor.

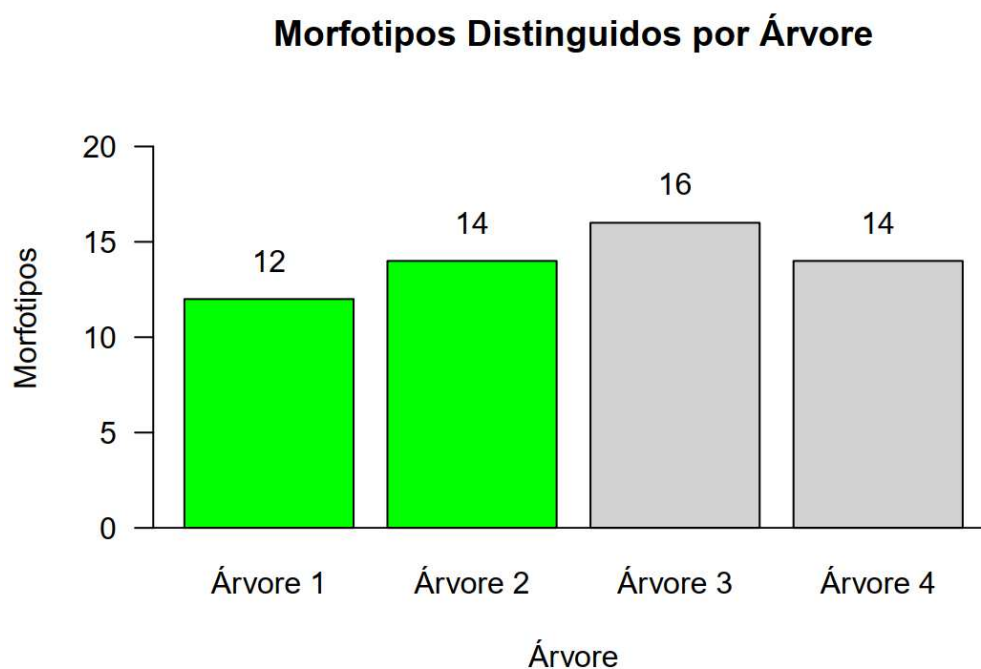
Esses valores também resultam na média de colônias por placa: aproximadamente 10,44 colônias/placa na área conservada e 3,58 colônias/placa na área urbanizada.

Na área urbanizada também foi observado mais placas sem crescimento nenhum, totalizando 10 placas. Uma das folhas da área urbanizada apresentou crescimento de somente 1 colônia. Essa folha em específico foi removida nos cálculos de índices de diversidade (seção 5.4) por impossibilitar numericamente o cálculo. Nenhuma das placas inoculadas com água destilada apresentou crescimento de colônias.

Foram distinguidos 20 morfotipos ao todo. Os gráficos 3 e 4 representam esse resultado de acordo com cada uma das árvores e cada área, incluindo o total. Os isolamentos desses morfotipos de fungos para colônia pura, resultaram em 27

Isolados: IH 72 a IH 99. Alguns morfotipos foram isolados mais de uma vez para maior representatividade dos dominantes.

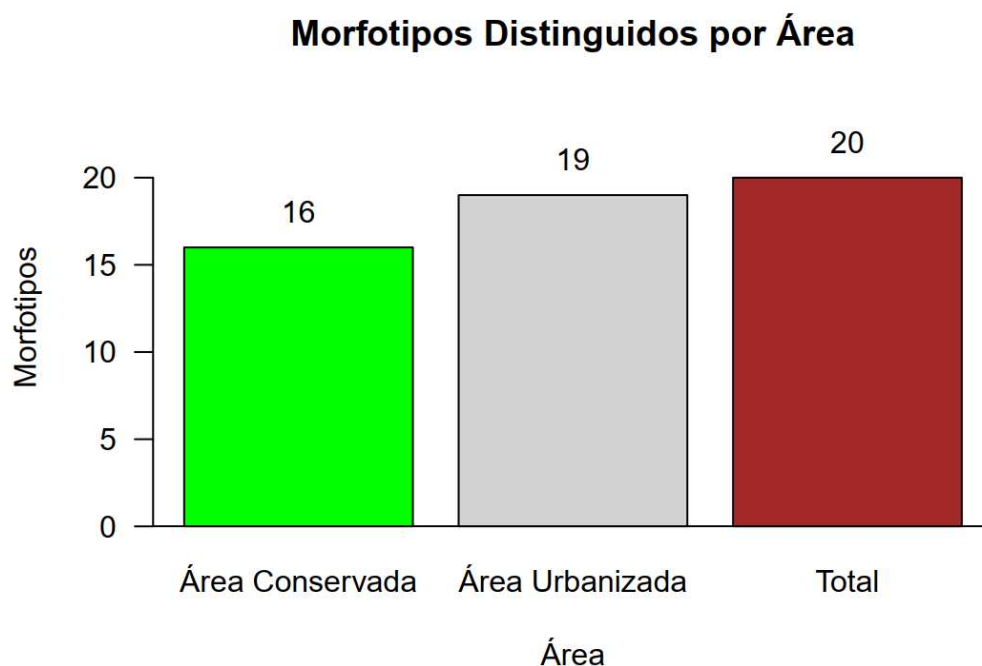
Gráfico 3 - Morfotipos distinguidos por árvore



Legenda: cor verde: árvores da área conservada, cor cinza: árvores da área urbanizada.

Fonte: Autor.

Gráfico 4 - Morfotipos distinguidos por área



Legenda: cor verde: área conservada, cor cinza: área urbanizada, cor marrom: representação do total. Fonte: Autor.

A área conservada teve mais colônias do que a área urbanizada (aproximadamente 2,62 vezes). No entanto, a Área Urbanizada teve 19 morfotipos enquanto a área Conservada, 16. Outro resultado a se observar foi que as placas provenientes das árvores da área conservada (árvores 1 e 2) apresentaram quantidades semelhantes de colônias. Por outro lado, as árvores da área urbanizada divergiram muito na abundância, apresentando 170 e 59 colônias, cada.

A quantidade de morfotipos deve ser interpretada com cautela. É relatado que o cultivo em placa pode apresentar vieses para fungos de rápido crescimento. No entanto é possível que a área urbanizada, apesar de ter menor ocorrência de fungos endófitos, apresente uma maior diversidade desses. Essa possibilidade será discutida na sessão

Ou 2) o método escolhido pode ter omitido a ocorrência de morfotipos nas etapas de diferenciação e contabilização dos morfotipos.

A primeira hipótese abre espaço para outras discussões, como acerca do motivo da diferença no número de morfotipos observados. A segunda hipótese diz respeito ao método de dispor os fragmentos de folhas em placas de Petri.

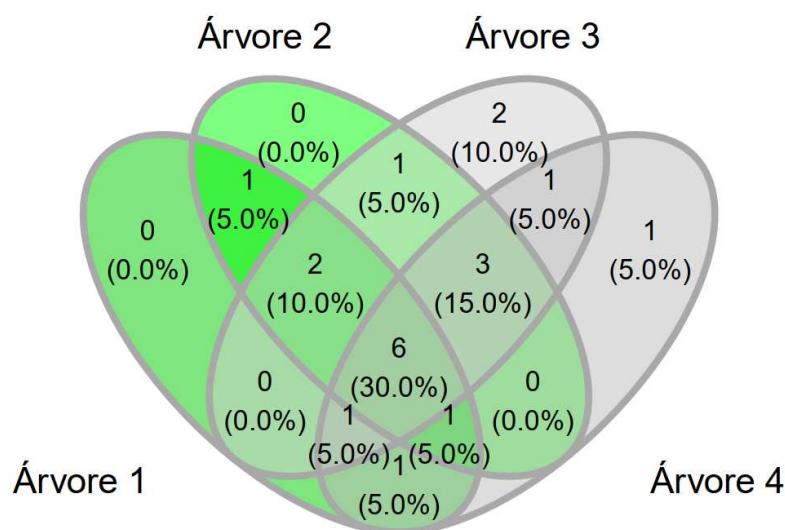
É provável que o maior número de colônias de fungos, especialmente as de crescimento rápido, tenha inibido ou ocultado a ocorrência de morfotipos de fungos de crescimento lento e/ou raras.

Mais implicações desse resultado serão discutidas após os índices de diversidade e equitabilidade na seção 5.4.

O gráfico 5 ilustra o diagrama de Venn com a quantidade de morfotipos presentes nas placas de cada área em relação ao total. E o gráfico 6 ilustra a presença dos morfotipos nas placas correspondentes às áreas e em comum.

Gráfico 5 – Morfotipos por árvore, diagrama de Venn

Morfotipos por Árvore – Diagrama de Venn



Legenda: elipses na cor verde: árvores da área conservada, elipses na cor cinza: árvores da área urbanizada. Fonte: Autor.

A análise do diagrama pode partir de muitos pontos: o morfotipo exclusivo da área conservada (morfotipo 6) ocorre nas duas árvores dessa área.

Analisando individualmente cada área, as árvores da área conservada têm dois morfotipos exclusivos a menos. São 2 morfotipos exclusivos para a árvore 1 e 4 morfotipos exclusivos para a árvore 2. Em comparação à área urbanizada: 5 [morfotipos] para a árvore 3 e 3 [morfotipos] para a árvore 4.

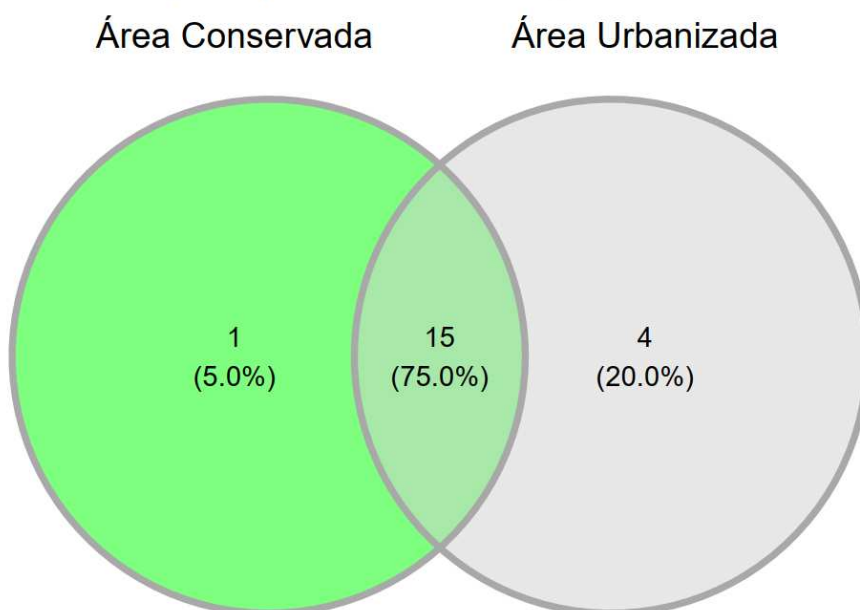
2 morfotipos foram observados apenas na árvore 3 (morfotipos 17 e 18), 1 apenas na árvore 4 (morfotipo 20) e 1 exclusivo da área urbanizada ocorrendo nas duas árvores (morfotipo 14).

Por fim, a quantidade de morfotipos em comum às duas árvores em cada área foi quase igual: 10 para área conservada e 11 para área urbanizada. 6 morfotipos foram comuns a todas as árvores (morfotipos 1, 2, 3, 4, 7 e 8).

A distribuição entre as árvores se deu de maneira semelhante, com um ou dois morfotipos a mais nos subconjuntos. Faz-se a observação de mais morfotipos exclusivos por árvore nas árvores da área urbanizada.

Gráfico 6 – Morfotipos por área, diagrama de Venn

Morfotipos por Área – Diagrama de Venn



Legenda: cor verde: área conservada, cor cinza: área urbanizada. Fonte: Autor.

O último diagrama de Venn (gráfico 6) resume a riqueza de morfotipos nas duas áreas, indicando os 15 morfotipos em comum e os morfotipos exclusivos em cada área.

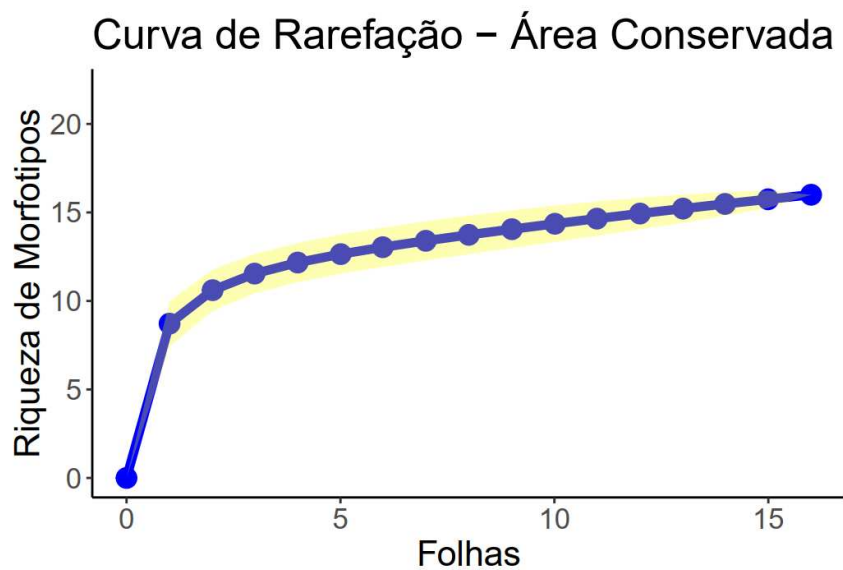
5.2. Curva de rarefação e extrapolação

As curvas de rarefação observam a quantidade de novos morfotipos em relação à quantidade de unidades amostrais observadas. A unidade amostral selecionada foi “folha”, das quais foram retirados 20 fragmentos de cada folha.

Foram retiradas 8 folhas de cada árvore, fornecendo assim uma unidade bem definida, com quantidades constantes (20 fragmentos cada folha), e igualmente coletadas (16 folhas cada área). Essas quantidades são limitadas pela capacidade do laboratório e torna cada árvore ou área um espaço amostral com uma aceitável robustez estatística.

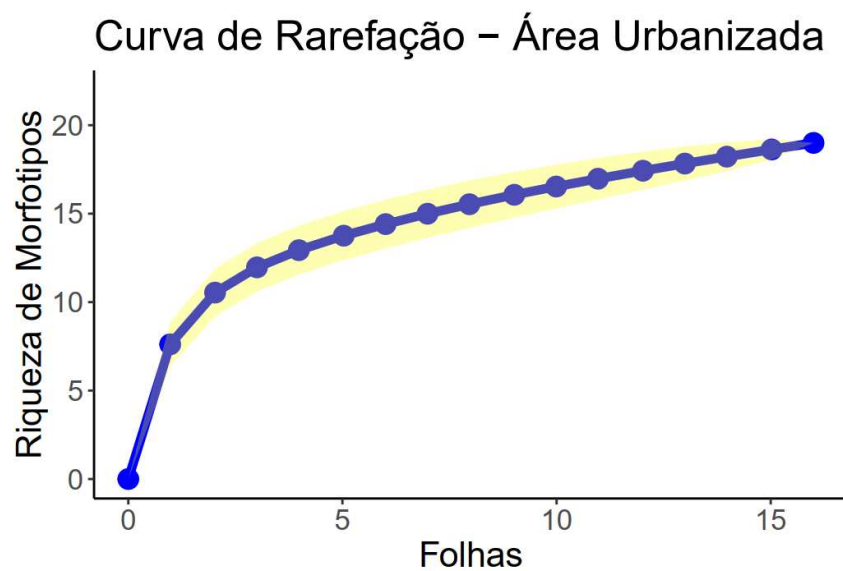
As curvas de rarefação que foram produzidas pela função *specaccum* do pacote *vegan* do R estão representadas nos gráficos 7 a 9. Os agrupamentos escolhidos foram os mesmos: área conservada (Gráfico 7), área urbanizada (Gráfico 8) e total (Gráfico 9). A unidade amostral que o *software* utiliza são folhas.

Gráfico 7 - Curva de rarefação na área conservada



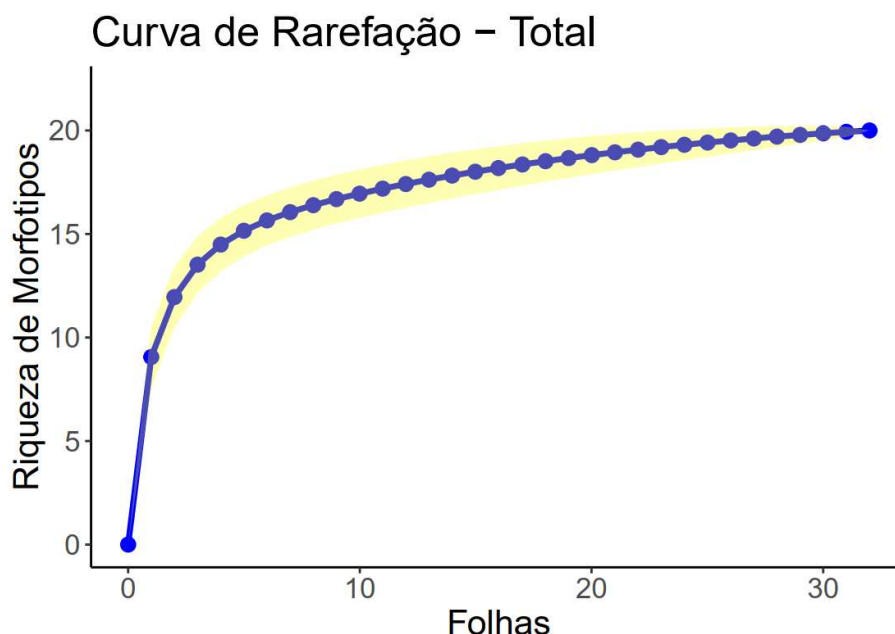
Legenda: linha e ponto azul: média de morfotipos inéditos a cada nova folha, região amarelada: desvio padrão. Fonte: Autor.

Gráfico 8 - Curva de rarefação na área urbanizada



Legenda: linha e ponto azul: média de morfotipos inéditos a cada nova folha, região amarelada: desvio padrão. Fonte: Autor.

Gráfico 9 - Curva de rarefação (total)



Legenda: linha e ponto azul: média de morfotipos inéditos a cada nova folha, região amarelada: desvio padrão. Fonte: Autor.

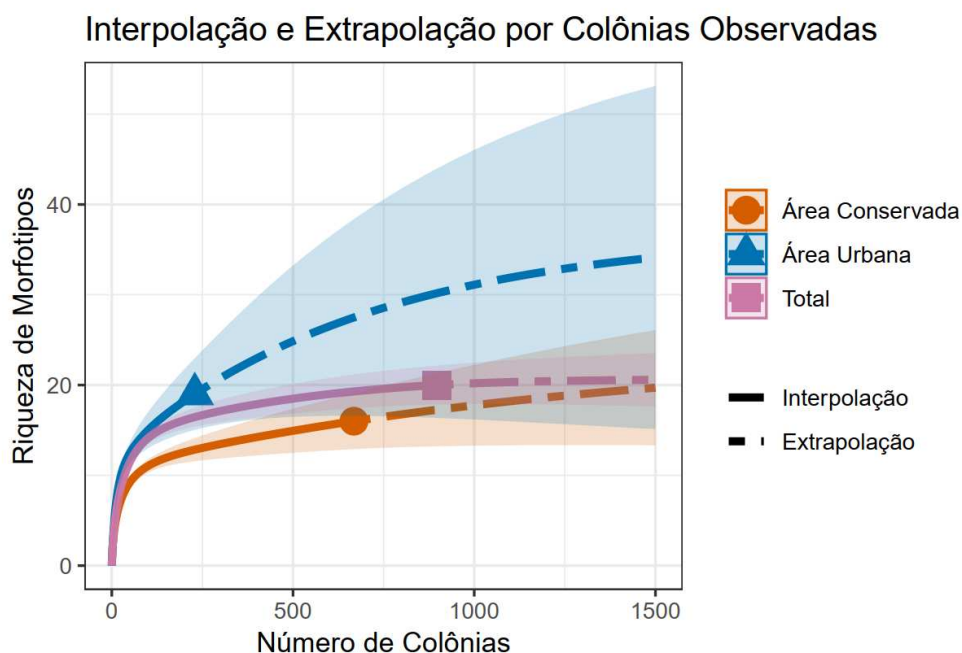
As curvas de rarefação, sugerem que o platô de morfotipos está mais próximo na área conservada do que na área urbanizada. As escalas dos gráficos foram padronizadas para facilitar a comparação numérica. A curva de rarefação difere da curva do coletor por fazer uma média de novos morfotipos por amostra. Dessa forma, não há diferença na sequência que as amostras foram analisadas, como ocorre nas curvas de coletor.

A primeira “média” de novos morfotipos na área conservada é maior, fazendo com que as primeiras amostras já acumulem mais morfotipos. Já na área urbana, os acúmulos são mais dispersos. Os acúmulos também sugerem maior probabilidade de que novos morfotipos sejam encontrados com aumentos no esforço amostral.

Utilizando o pacote *iNext* do R, também foi feita uma curva de interpolação e extrapolação (Gráfico 10). A curva de interpolação é equivalente à de rarefação, que utiliza amostra, por uma curva de rarefação que se baseia em

indivíduos amostrados. A interpolação e extrapolação juntas informam sobre a confiabilidade do esforço amostral.

Gráfico 10 - Interpolação e Extrapolação



Legenda: regiões azulada, rosada e avermelhada: desvio padrão da estimativa. Fonte: Autor.

As coletas utilizaram-se de um esforço simétrico nas duas áreas (conservada e urbanizada), com iguais quantidades de folhas coletadas. A discrepância na quantidade de colônias obtidas em cada área faz com que a interpolação e extrapolação do *iNext* seja bastante influenciada.

O agrupamento de amostras total (agrupando todas as folhas) sugere que o platô de morfotipos foi atingido com a curva de extrapolação.

Foi estimado pela curva que, com mais 500 colônias de fungos, aproximadamente a mesma quantidade de morfotipos seria amostrada. Esse aumento representaria um acréscimo de aproximadamente 56% novas colônias em relação à quantidade de colônias já amostrada.

Já analisando a diferença nas duas áreas, o quanto do platô calculado foi atingido (ou interpolado), sugere que a área urbanizada precisaria de maior amostragem para que seu platô de morfotipos fosse atingido. Isso ocorre devido ao baixo número de colônias e alto número de morfotipos, como citado anteriormente.

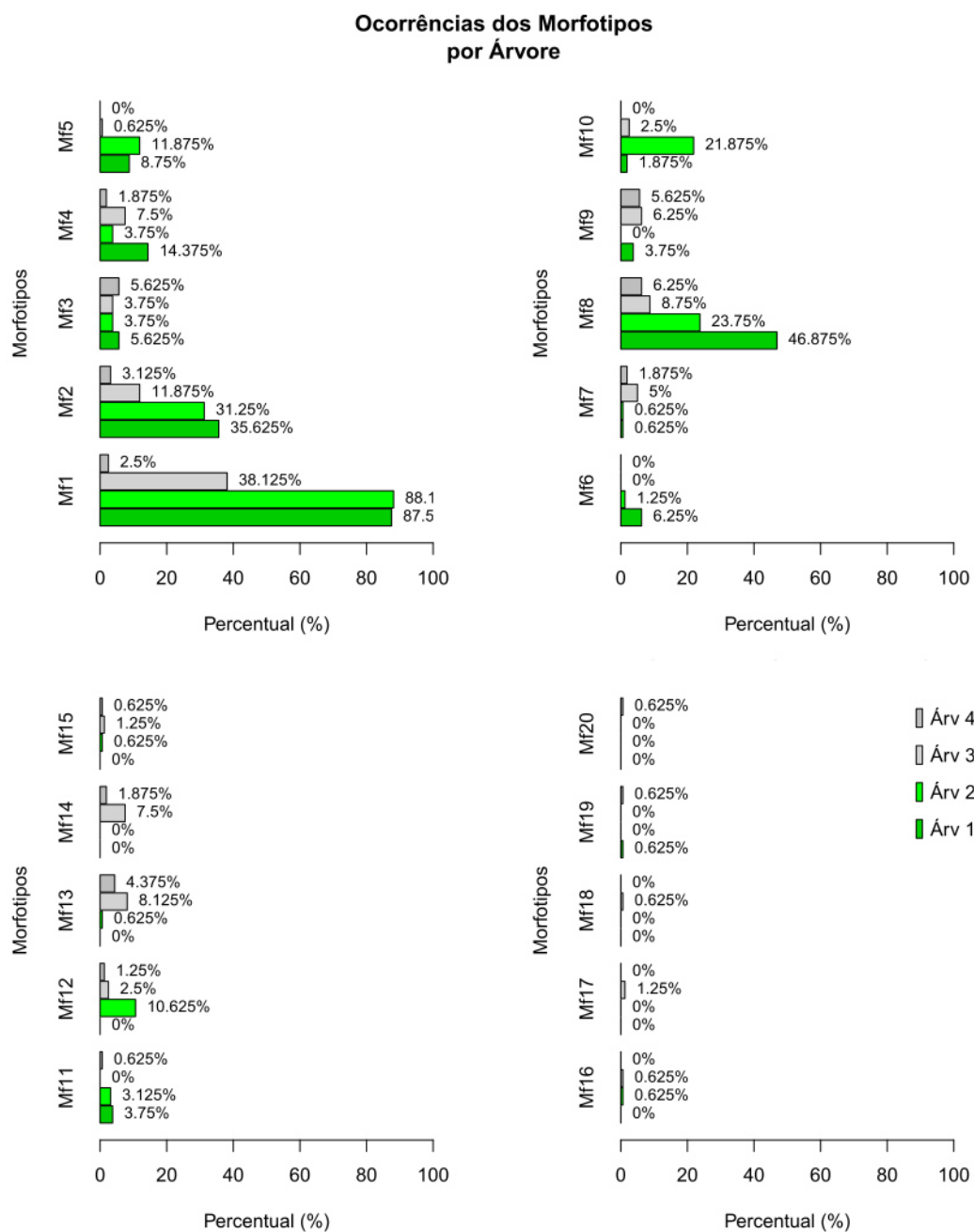
Isso indica que há espaço para novos morfotipos na área urbanizada com mais coletas. Futuros estudos podem requerer maior esforço amostral nessa área. Com aproximadamente mais 270 colônias, podem-se chegar à 25 morfotipos.

No entanto, um aumento de 250 colônias (da área urbanizada) representa aproximadamente mais 118% de esforço amostral nessa área, seguindo a proporção encontrada na área urbanizada de acordo com a seção x.1 (Morfotipos e Colônias) - média de 3,58 colônias por placa.

5.3. Morfotipos por ocorrência

Na análise de ocorrências dos morfotipos, seguiu-se o padrão por árvore e depois por área e total. A sequência busca inferências e deduções a partir dos dados apresentados. O gráfico 11 traz o percentual de ocorrência de cada morfotipo por árvore.

Gráfico 11 - Ocorrências dos morfotipos por árvore



Legenda: cores verde: árvores da área conservada, cores cinza: árvores da área urbanizada.

Fonte: Autor.

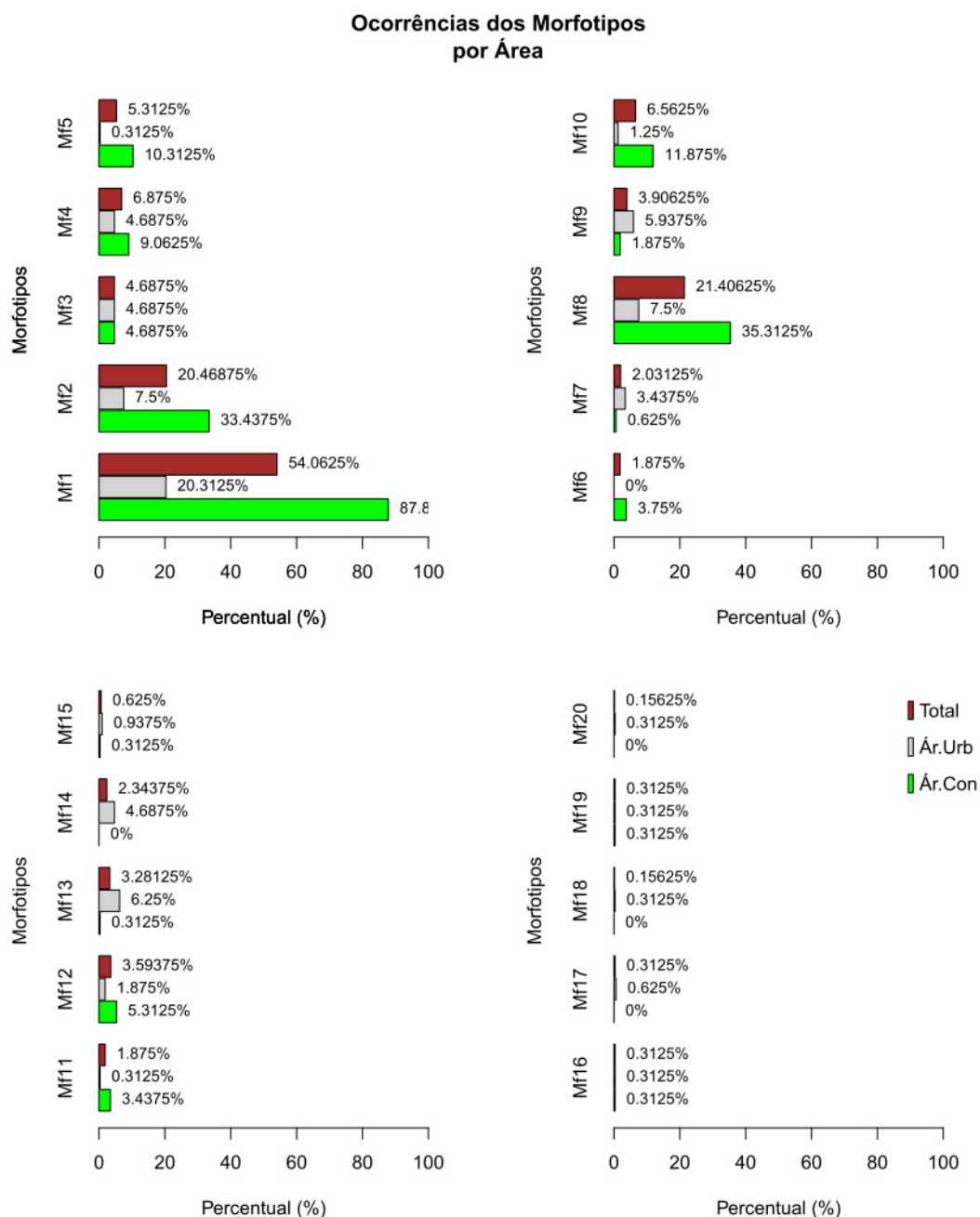
Alguns morfotipos se destacam em grande percentual de ocorrência nos fragmentos. Exemplos desses são: morfotipos 1, 2 e 8, ambos com ocorrência em mais do que 20% das duas árvores da área conservada. O morfotipo 1, também varia muito na ocorrência nas árvores da área urbanizada, sendo de 38,13% na árvore 3 e de apenas 2,5% na árvore 4.

A dominância na ocorrência desses morfotipos influencia diretamente nos índices de diversidade das áreas. Como será discutido na próxima seção x.5.

Outros com uma ocorrência que se destaca em relação às outras árvores. Os morfotipos 10 e 12 com percentual de ocorrência na árvore 2 quatro vezes maior que o das outras árvores. O Morfotipo 4 também se destacou em ocorrência na árvore 1 (14,38%), mas metade da ocorrência (7,5%) foi registrada também na árvore 3, o que faz com que não difiram tanto nesses valores.

Do morfotipo 15 em diante (até o 20), todas as ocorrências foram “residuais”, ficando as ocorrências menores que 2% em qualquer árvore. O gráfico 12 apresenta de resultados das ocorrências de morfotipos por área.

Gráfico 12 - Ocorrências dos morfotipos por área



Legenda: cor verde: área conservada, cor cinza: área urbanizada, cor marrom: representação do total. Fonte: Autor.

Com exceção dos morfotipos dominantes na área conservada, morfotipos 1, 2 e 8, as ocorrências dos morfotipos mantiveram uma diferença de no máximo 11%. Outros destaques na área conservada, apesar de menores, foram os

morfotipos 4, 5 e 10 que tiveram ocorrência de 9,06%, 10,31% e 11,88% respectivamente.

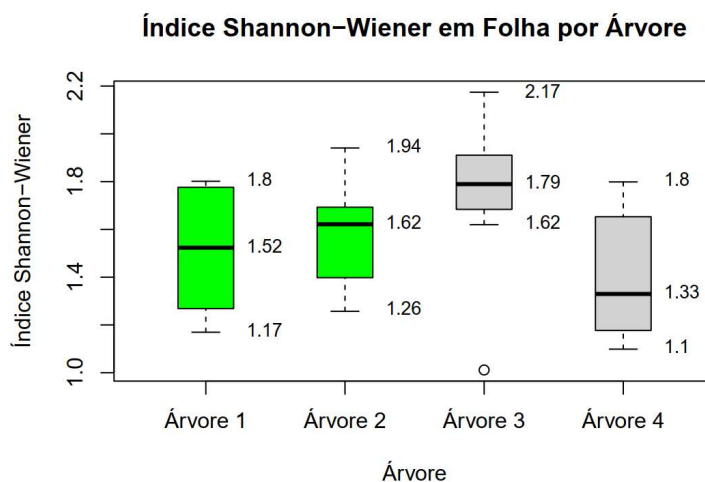
Uma vez que os esforços amostrais de cada área foram iguais, a ocorrência total sempre é a média das ocorrências nas áreas. Portanto, a ocorrência total está disposta de maneira quase ilustrativa. Outro ponto é que, com exceção dos morfotipos dominantes, nenhuma ocorrência ultrapassou os 7% no agrupamento total de fragmentos.

5.4. Índices de diversidade

Após processamento de dados no R, obteve-se os índices de diversidade que são apresentados primeiro através de *barplots*, para em seguida, aplicar na área inteira e apresentar média. Retirou-se a folha com somente 1 ocorrência de fungo pois impedia, com valores impróprios, a adequada aplicação dos índices.

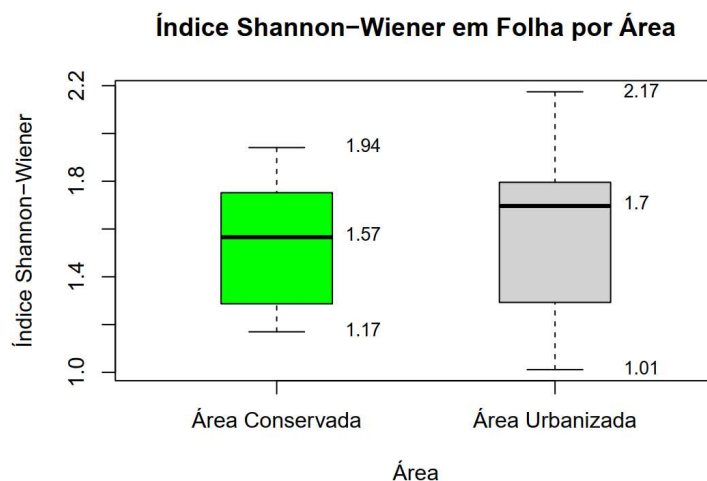
Os gráficos 13 e 14 apresentam os valores obtidos por Shannon-Wiener. Nota-se novamente maior semelhança entre as folhas de cada uma das árvores da área conservada do que dos valores da área urbanizada. Foi observado uma folha da árvore 3 que ficou como *outlier* com valor 1.01, mas o valor foi incluído quando analisou-se a área urbanizada.

Gráfico 13 - Índice Shannon-Wiener em folha por árvore



Legenda: cor verde: árvores da área conservada, cor cinza: árvores da área urbanizada. Fonte: Autor.

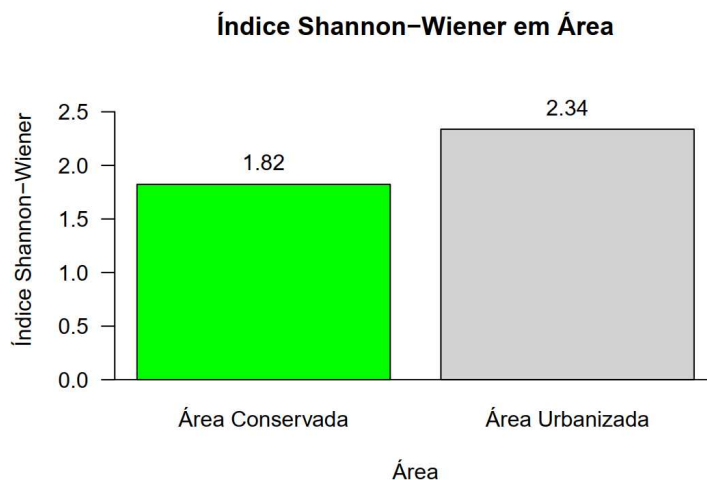
Gráfico 14 - Índice Shannon-Wiener em folha por área



Fonte: Autor.

Ao agrupar todas as comunidades das folhas de cada área como uma única comunidade, a diferença é notável (Gráfico 15). Válido reiterar que esses valores (1,82 e 2,34) deve ser visto no contexto com a de riqueza de morfotipos (16 e 19 respectivamente) em cada árvore. Porém sugere que a composição das comunidades de área conservada são mais “previsíveis”, uma vez que o índice é derivado da entropia do sistema.

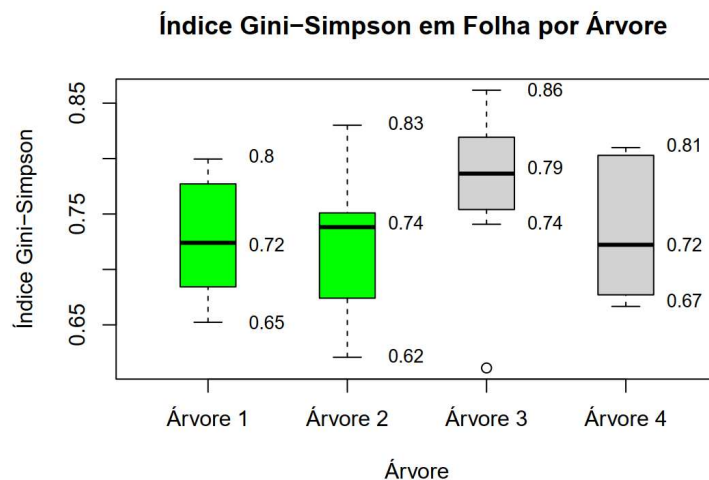
Gráfico 15 - Índice Shannon-Wiener em área



Fonte: Autor.

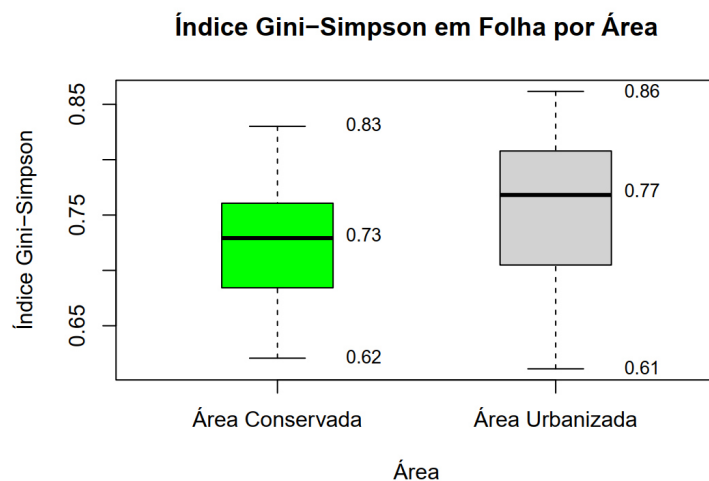
Os valores do índice Gini-Simpson (Gráficos 16 e 17) se comportaram de maneira muito semelhante aos do Shannon-Wiener. Com um aumento muito sutil na mediana e nas cercas dos valores da árvore 4. Esse índice é mais sensível a espécies, ou morfotipos dominantes. Uma vez que essa árvore apresentou os mais baixos valores de abundância, seu decréscimo, da escala do índice Shannon para este é mais sutil, como se a composição fosse mais diluída.

Gráfico 16 - Índice Gini-Simpson em folha por árvore



Legenda: cor verde: árvores da área conservada, cor cinza: árvores da área urbanizada. Fonte: Autor.

Gráfico 17 - Índice Gini-Simpson em folha por área

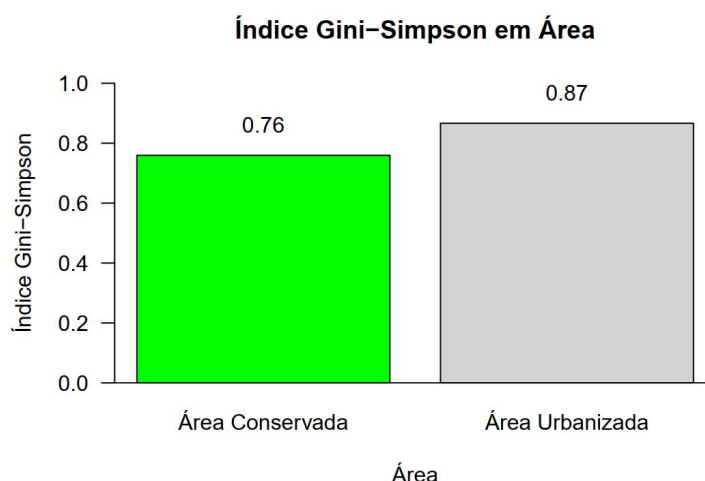


Fonte: Autor.

O valor de Gini-Simpson (Gráfico 18) para as duas áreas repete o mesmo raciocínio do Shannon-Wiener. Apontando a comunidade da área urbanizada mais diversa e com menos dominância de morfotipos. Ressalta-se que, quando analisados de forma agrupada, ambos os índices apresentaram maiores valores na área urbanizada como um todo do que os maiores valores em folhas individuais.

Esse aumento pode ser compreendido como uma maior diversidade quando se agrupa a comunidade da área urbanizada como “inteira”. Como se as ocorrências de morfotipos fossem se aproximando e formando uma comunidade mais equilibrada. Na área conservada, o agrupamento ressalta os morfotipos dominantes, ficando os outros em categorias mais raras.

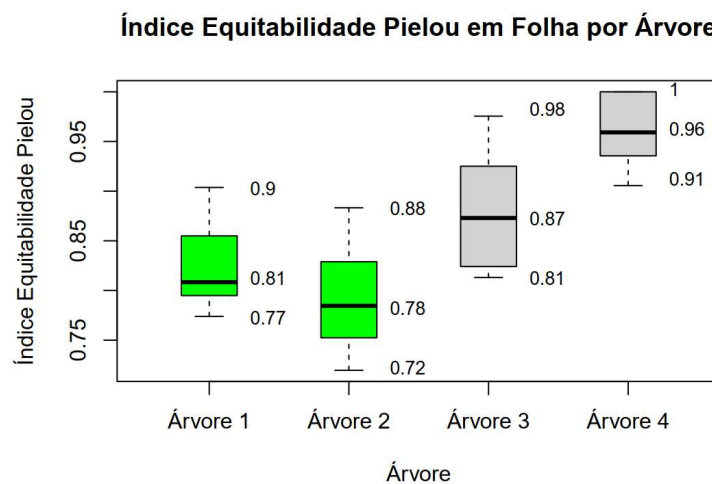
Gráfico 18 - Índice Gini-Simpson em área



Fonte: Autor.

Nos Gráficos 19 e 20, tem-se os índices de equitabilidade de Pielou nas folhas. Nota-se que a árvore 4 agora assume o grupo com maiores valores de equitabilidade e pouca dispersão, e a árvore 3 com valores mais dispersos. As árvores da área conservada estão relativamente similares. Agora a árvore 2 apresenta os menores valores, observa-se a mediana um pouco acima do limite inferior da árvore 1.

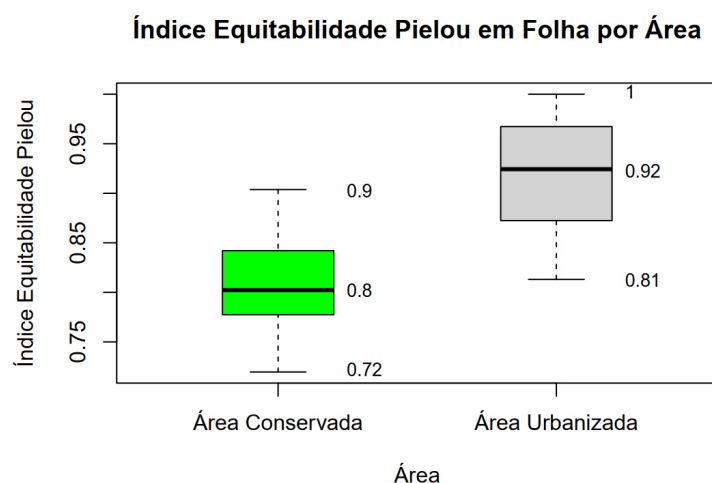
Gráfico 19 - Índice Equitabilidade Pielou em folha por árvore



Legenda: cor verde: árvores da área conservada, cor cinza: árvores da área urbanizada. Fonte: Autor.

Quando analisado por área, a metade com valores de equitabilidade mais baixos da área urbanizada é semelhante à metade com os valores mais altos da conservada.

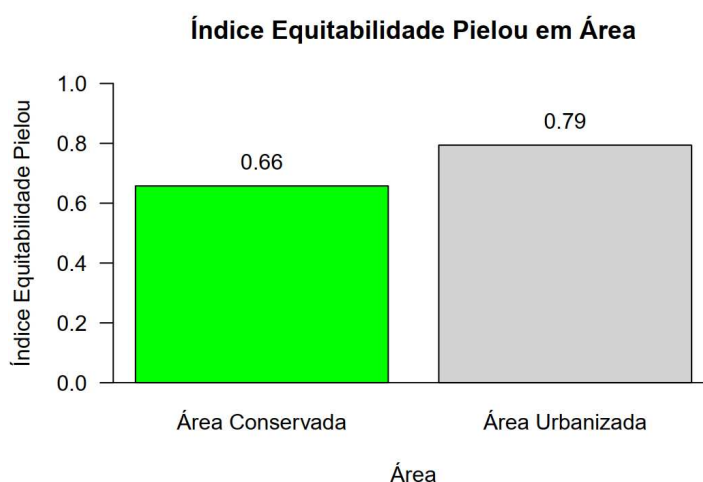
Gráfico 20 - Índice Equitabilidade Pielou em folha por área



Fonte: Autor.

O padrão dos índices anteriores não se repetiu com a equitabilidade de Pielou (Gráfico 21). A área urbanizada também apresentou um valor um pouco menor quando comparada com o menor valor das comunidades individuais em folha. Mas ainda apresenta um maior valor na área urbanizada.

Gráfico 21 - Índice Equitabilidade Pielou em área



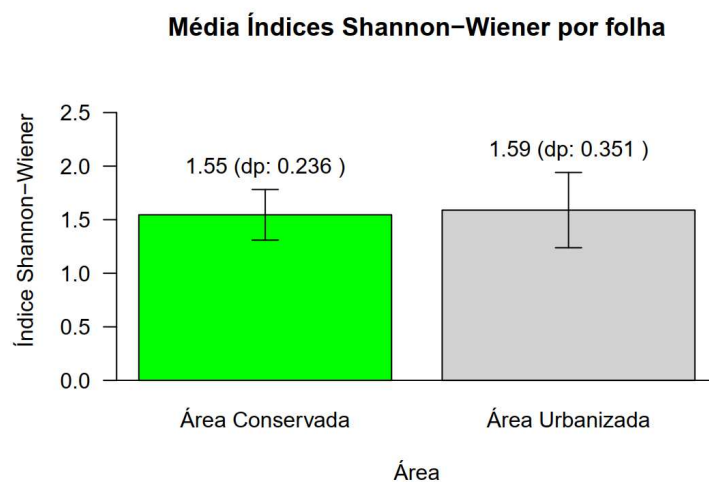
Fonte: Autor.

5.5. Testes estatísticos dos índices

Com o tamanho das amostras, o teste de normalidade escolhido foi o de Shapiro-Wilk. O valor de p maior do que 0.05 nos indica hipótese nula corroborada, ou seja, os valores observados seguem uma distribuição normal. A tabela no apêndice apresenta os resultados dos testes utilizando o R.

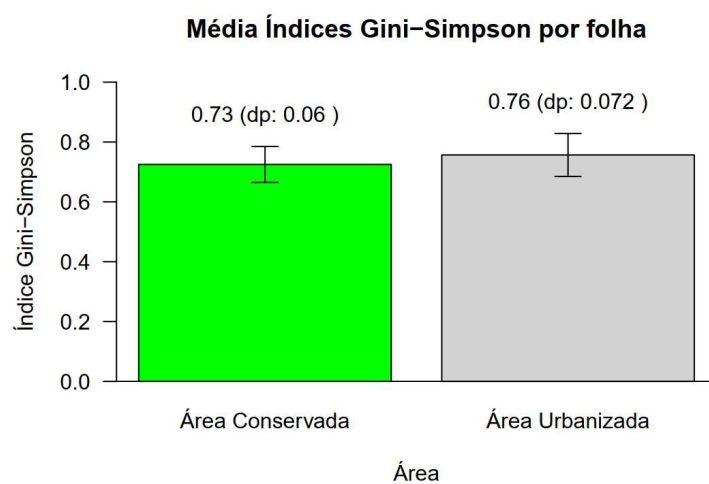
A partir desses resultados, todos os agrupamentos apresentaram distribuição normal, sem necessidade de transformações. Sabendo-se que se tratam de dados paramétricos torna-se viável apresentar esses valores observados em folhas em médias e desvio-padrão (Gráficos 22, 23 e 24).

Gráfico 22 - Média Índices Shannon-Wiener em folha por área



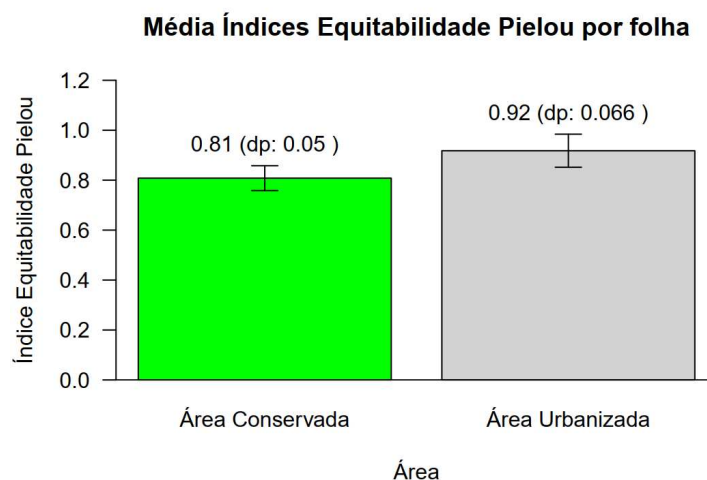
Fonte: Autor.

Gráfico 23 - Média Índices Gini-Simpson em folha por área



Fonte: Autor.

Gráfico 24 - Média Índices de em folha por área



Fonte: Autor.

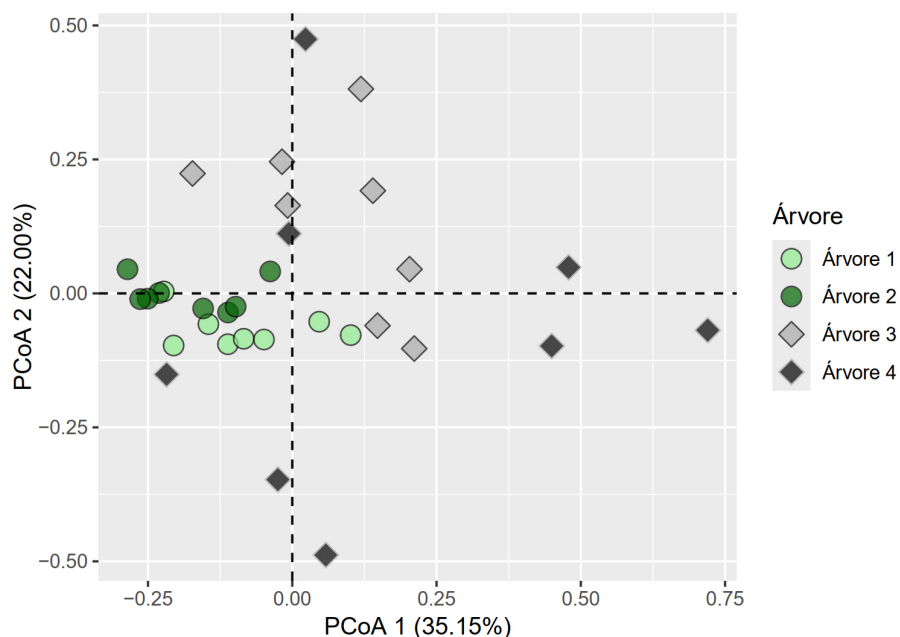
Por conseguinte, realizaram-se testes t de Student (tabela nos apêndices). Os índices Shannon-Wiener e Gini-Simpson não apresentaram diferença significativa: $t = -0,41$, $p = 0,69$ e $t = -1,33$, $p = 0,19$, respectivamente. Porém, o Índice de equitabilidade de Pielou apresentou diferença significativa entre as duas áreas utilizando teste t de Student, $t = -5,19$ e $p < 0,01$.

Isso mostra que os índices de diversidade, Shannon-Wiener e Gini-Simpson, foram semelhantes. E é realmente observada uma maior equitabilidade em comunidades de fungos endófitos em folhas da área urbanizada.

5.6. Análise de Coordenadas Principais (PCoA)

As árvores da área conservada enfatizaram sua grande similaridade com a Análise de Coordenadas Principais (PCoA) (Gráfico 25). As folhas das árvores 1 e 2 ficaram agrupadas em regiões próximas no gráfico. As folhas da árvore 2 ficam um pouco mais agrupadas do que as folhas da árvore 1, mas ambas regiões ainda ficam bem próximas. Isso indica comunidades mais semelhantes e homogêneas entre essas folhas.

Gráfico 25 - PCoA a partir de Bray-Curtis



Fonte: Autor.

Já as folhas das árvores 3 e 4 apresentaram maiores dissimilaridades entre si. As folhas da árvore 3 estão dispostas em um agrupamento mais disperso que o das árvores 1 e 2. Enquanto que as folhas da árvore 4 estão bastante dispersas no gráfico. O que indica que há baixa similaridade entre essas duas árvores, se analisadas como comunidades independentes. Sendo assim, comunidades bastante distintas.

A dispersão das folhas da árvore 4 ainda permite concluir que a baixa abundância de fungos endófitos em suas folhas tornam a composição das comunidades menos robustas. A menor abundância de fungos da árvore faz com que pequenas mudanças na proporção dos morfotipos façam as comunidades se diferenciarem significativamente.

Dado a diferença entre abundância de fungos endófitos das árvores 3 e 4 na seção 5.1, a menor dominância também colabora para que a diferença na composição das comunidades se torne mais acentuada. Em outros termos, os morfotipos dominantes nas árvores 1 e 2 também colaboram para que as folhas

dessas duas árvores tenham comunidades mais semelhantes, ficando assim, na mesma região do gráfico.

6. CONCLUSÃO

O valor da abundância de fungos endófitos em folhas da área conservada foi bem maior que o da área urbanizada. Com maior incidência de fungos endófitos nessas folhas, é possível que isso indique um habitat mais propício para os fungos endófitos. Essa incidência e abundância não resultaram em maior riqueza, obteve-se mais morfotipos na área urbanizada. No total, o trabalho obteve 27 isolados distribuídos em 20 morfotipos.

Os índices de diversidade não diferiram significativamente nas folhas das áreas analisadas, porém a equitabilidade diferiu. Em contrapartida, os valores de equitabilidade mostraram que os morfotipos de fungos endófitos da área urbanizada são mais igualmente abundantes do que na área conservada. Resultado influenciado pela dominância de 3 morfotipos na área conservada.

A composição das comunidades de fungos endófitos entre as folhas de mesma árvore na área conservada mostrou-se mais similar do que entre as folhas de mesma árvore na área urbanizada. Quanto maior a abundância de fungos endófitos nas folhas da árvore, foi observada maior similaridade entre as comunidades.

É preciso reiterar sobre limitações de avaliações quantitativas usando métodos dependentes de cultivo. Além do crescimento de somente fungos cultiváveis, é notório que o modo de crescimento de fungos filamentosos pode acabar valorizando fungos de crescimento rápido. Apesar disso, o trabalho possibilitou o isolamento e preservação dos morfotipos.

Com a preservação dos isolados, os fungos estão disponíveis para futuros estudos, em especial o de caracterização e identificação, que foge do escopo do presente trabalho. Os estudos de metabólitos, testes experimentais ou comparação de dados certamente também se apresentam como objetivos tangíveis para futuras pesquisas.

7. REFERÊNCIAS

- ALBRECHTSEN, B. R. et al. Both plant genotype and herbivory shape aspen endophyte communities. *Oecologia*, v. 187, n. 2, p. 535–545, 1 mar. 2018.
- ÁLVAREZ-MANJARREZ, J. et al. Micorrizas del bosque tropical caducifolio y otras simbiosis fúngicas. *Acta Botanica Mexicana*, n. 128, 6 dez. 2021.
- ARAUJO, A. S. F. et al. Distinct taxonomic composition of soil bacterial community across a native gradient of Cerrado-Ecotone-Caatinga. *Applied Soil Ecology*, v. 161, p. 103874, maio 2021.
- ARNOLD, A. E. et al. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters*, v. 3, n. 4, p. 267–274, jul. 2000.
- BALDRIAN, P. Forest microbiome: diversity, complexity and dynamics. *FEMS Microbiology Reviews*, p. fuw040, 16 nov. 2016.
- BALDRIAN, P.; LÓPEZ-MONDÉJAR, R.; KOHOUT, P. Forest microbiome and global change. *Nature Reviews Microbiology*, v. 21, n. 8, p. 487–501, 1 ago. 2023.
- BAMISILE, B. S. et al. Fungal Endophytes: Beyond Herbivore Management. *Frontiers in Microbiology*, 23 mar. 2018.
- BÁNKI, O., et al. (2025). Catalogue of Life (Version 2025-07-10). Catalogue of Life Foundation, Amsterdam, Netherlands. <https://doi.org/10.48580/dgrrq>. Acesso em: 8 ago. 2025.
- BERNARD, E.; PENNA, L. A. O.; ARAÚJO, E. Downgrading, Downsizing, Degazettement, and Reclassification of Protected Areas in Brazil. *Conservation Biology*, v. 28, n. 4, p. 939–950, 11 abr. 2014.
- BHUNJUN, C. S. et al. Do all fungi have ancestors with endophytic lifestyles? *Fungal Diversity*, v. 125, n. 1, p. 73–98, 16 mar. 2023.
- BITTLESTON, L. S. et al. Endophytic fungi reduce leaf-cutting ant damage to seedlings. *Biology Letters*, v. 7, n. 1, p. 30–32, 7 jul. 2010.
- BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American journal of botany*, v. 98, n. 3, p. 426–38, 2011.
- BLASZKOWSKI, J. et al. *Septoglomus fuscum* and *S. furcatum*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycologia*, v. 105, n. 3, p. 670–680, 1 maio 2013.
- BRASIL. Lei Nº 9.985, de 18 de julho de 2000. Regulamenta o art. 225, § 1o, incisos

I, II, III e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 2000. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L9985.htm. Acesso em: 15 set. 2023.

BROSE, U.; HILLEBRAND, H. Biodiversity and ecosystem functioning in dynamic landscapes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 371, n. 1694, p. 20150267, 19 maio 2016.

BUSBY, P. E.; RIDOUT, M.; NEWCOMBE, G. Fungal endophytes: modifiers of plant disease. *Plant Molecular Biology*, v. 90, n. 6, p. 645–655, 8 dez. 2015.

CEARÁ. DECRETO Nº30.868, de 10 de abril de 2012. Fortaleza, CE: Diário Oficial do Estado do Ceará. Série 3, Ano IV, Caderno 1/2. Disponível em: <http://imagens.seplag.ce.gov.br/PDF/20120412/do20120412p01.pdf#page=1>. Acesso em: 15/09/2023.

CHAO, A.; CHIU, C.-H. Species Richness: Estimation and Comparison. Wiley StatsRef: Statistics Reference Online, p. 1–26, 5 ago. 2016.

DALY, A.; BAETENS, J.; DE BAETS, B. Ecological Diversity: Measuring the Unmeasurable. *Mathematics*, v. 6, n. 7, p. 119, 10 jul. 2018.

DIGHTON, J. Fungi in ecosystem processes. [s.l.] Boca Raton, Fla. Crc Press, 2016.

DUŠEK, R.; POPELKOVÁ, R. Theoretical view of the Shannon index in the evaluation of landscape diversity. *AUC Geographica*, v. 47, n. 2, p. 5–13, 26 set. 2017.

FERNANDES, E. G. et al. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. *Microbiological Research*, v. 181, p. 84–92, 1 dez. 2015.

FERREIRA, M. et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in oncocalyxone A isolated from *Auxemma oncocalyx*. *Phytomedicine*, v. 11, n. 4, p. 315–322, 1 jan. 2004.

FERREIRA, P. M. P. et al. *Cordia oncocalyx* and oncocalyxones: From the phytochemistry to the anticancer action and therapeutic benefits against chronic diseases. *Fitoterapia*, v. 169, p. 105624–105624, 1 set. 2023.

FOSTER, D. et al. The Importance of Land-Use Legacies to Ecology and Conservation. *BioScience*, v. 53, n. 1, p. 77, 2003.

GOTTSCHLING, M.; MILLER, J. H. Clarification of the Taxonomic Position of *Auxemma*, *Patagonula*, and *Saccellium* (Cordiaceae, Boraginales). *Systematic Botany*, v. 31, 1 abr. 2006.

HARRISON, J. G.; GRIFFIN, E. A. The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny and host tissues: how far have we come and where

do we go from here? *Environmental Microbiology*, v. 22, n. 6, p. 2107–2123, 31 mar. 2020.

HASSLER, Márcio Luís. A importância das Unidades de Conservação no Brasil. *Sociedade & Natureza*, v. 17, n. 33, 2005.

HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *The Fungal Kingdom*, v. 5, n. 4, p. 79–95, 28 jul. 2017.

HOU, Y. et al. Negative effects of urbanization on plants: A global meta-analysis. *Ecology and Evolution*, v. 13, n. 4, 31 mar. 2023.

HUGHES, J. B. et al. Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 10, p. 4399–4406, out. 2001.

HYDE, K.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity*, v. 33, p. 163–173, 30 nov. 2008.

IBGE. Biomas e sistema costeiro-marinho do Brasil: compatível com a escala 1:250 000. Rio De Janeiro, IBGE, 2019. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101676.pdf>. Acesso em: 15 set. 2023.

INGO WOLFGANG SARLET; TIAGO FENSTERSEIFER. Direito constitucional ambiental : constituição, direitos fundamentais e proteção do ambiente. 2. ed. rev. e atual ed. São Paulo : Revista Dos Tribunais, 2012.

KHALIL, A. M. A. et al. Isolation and Characterization of Fungal Endophytes Isolated from Medicinal Plant *Ephedra pachyclada* as Plant Growth-Promoting. *Biomolecules*, v. 11, n. 2, p. 140, 22 jan. 2021.

KIM, B.-R. et al. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, n. 12, p. 2089–2093, 28 dez. 2017.

LEAL, I. R. et al. Changing the Course of Biodiversity Conservation in the Caatinga of Northeastern Brazil. *Conservation Biology*, v. 19, n. 3, p. 701–706, jun. 2005.

LEE, S. A. et al. Comparative analysis of bacterial diversity in the rhizosphere of tomato by culture-dependent and -independent approaches. *Journal of Microbiology*, v. 54, n. 12, p. 823–831, 26 nov. 2016.

LEGENDRE, P.; GALLAGHER, E. D. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, v. 129, n. 2, p. 271–280, out. 2001.

LI, J. et al. Urbanization-driven forest soil greenhouse gas emissions: Insights from the role of soil bacteria in carbon and nitrogen cycling using a metagenomic approach. *The Science of The Total Environment*, v. 923, n. 171364, p.

171364–171364, 2 mar. 2024.

MATSUMURA, E.; FUKUDA, K. A comparison of fungal endophytic community diversity in tree leaves of rural and urban temperate forests of Kanto district, eastern Japan. *Fungal Biology*, v. 117, n. 3, p. 191–201, mar. 2013.

MMA, CNUC. Painel Unidades de Conservação Brasileiras. 2023. Disponível em: <https://cnuc.mma.gov.br/powerbi>. Acesso em: 15 set. 2023.

NISKANEN, T. et al. Pushing the Frontiers of Biodiversity Research: Unveiling the Global Diversity, Distribution, and Conservation of Fungi. *Annual Review of Environment and Resources*, v. 48, n. 1, 18 set. 2023.

OLIVEIRA, A. P. C. DE; BERNARD, E. The financial needs vs. the realities of in situ conservation: an analysis of federal funding for protected areas in Brazil's Caatinga. *Biotropica*, v. 49, n. 5, p. 745–752, 12 jun. 2017.

OONO, R. et al. Species diversity of fungal endophytes across a stress gradient for plants. *New Phytologist*, v. 228, n. 1, p. 210–225, 8 jul. 2020.

PAGANO, M. C.; ZANDEVALLI, R. B.; ARAÚJO, F. S. Biodiversity of arbuscular mycorrhizas in three vegetational types from the semiarid of Ceará State, Brazil. *Applied Soil Ecology*, v. 67, p. 37–46, 2013.

PANDYA, S. et al. Comparison of culture-dependent and culture-independent molecular methods for characterization of vaginal microflora. *Journal of Medical Microbiology*, v. 66, n. 2, p. 149–153, 1 fev. 2017.

PAUTASSO, M. et al. Plant health and global change - some implications for landscape management. *Biological Reviews*, p. no-no, 25 jan. 2010.

PEREIRA, A. P. DE A. et al. Grazing exclusion regulates bacterial community in highly degraded semiarid soils from the Brazilian Caatinga biome. *Land Degradation & Development*, v. 32, n. 6, p. 2210–2225, 17 fev. 2021.

QI, G.; CHE, J.; WANG, Z. Differential effects of urbanization on air pollution: Evidences from six air pollutants in mainland China. *Ecological Indicators*, v. 146, n. 109924, p. 109924, fev. 2023.

SALVATORE, M. M.; ANDOLFI, A.; NICOLETTI, R. The Thin Line between Pathogenicity and Endophytism: The Case of *Lasiodiplodia theobromae*. *Agriculture*, v. 10, n. 10, p. 488, 21 out. 2020.

SAMPAIO, E. V. S. B. Overview of the Brazilian caatinga. *Seasonally Dry Tropical Forests*, p. 35–63, 1 nov. 1995.

SANTOS, A. C. DA S. et al. Morphology, phylogeny, and sexual stage of *Fusarium caatingaense* and *Fusarium pernambucanum*, new species of the *Fusarium incarnatum-equisetis* species complex associated with insects in Brazil. *Mycologia*,

v.111, n. 2, p. 244–259, 4 mar. 2019.

SANTOS, C. et al. Fungal Endophytic Community Associated with Guarana (*Paullinia cupana* Var. *Sorbilis*): Diversity Driver by Genotypes in the Centre of Origin. *Journal of Fungi*, v. 6, n. 3, p. 123, 31 jul. 2020.

SANTOS, M. et al. Caatinga, the Brazilian dry tropical forest: can it tolerate climate changes? *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, v. 26, n. 1, p. 83–99, 8 fev. 2014.

SELVAKUMAR, A.; BORST, M. Variation of microorganism concentrations in urban stormwater runoff with land use and seasons. *Journal of Water and Health*, v. 4, n. 1, p. 109–124, 1 mar. 2006.

SEMA. Plano de Manejo do Parque Estadual Botânico do Ceará, encarte 03. 2021. Disponível em: <https://www.sema.ce.gov.br/wpcontent/uploads/sites/36/2021/04/Encarte-3-Botanico-Socioambiental.pdf>. Acesso em: 15 set 2023.

SHARMA, M. et al. Diversity, Antimicrobial, Antioxidant, and Anticancer Activity of Culturable Fungal Endophyte Communities in *Cordia dichotoma*. *Molecules*, v. 28, n. 19, p. 6926–6926, 4 out. 2023.

SHARMA, M.; MALLUBHOTLA, S. Diversity, Antimicrobial Activity, and Antibiotic Susceptibility Pattern of Endophytic Bacteria Sourced From *Cordia dichotoma* L. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 13 may 2022.

SILVA et al. Short-term restoration practices change the bacterial community in degraded soil from the Brazilian semiarid. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, 21 mar. 2024.

SILVA, J. M. C. DA et al. Funding deficits of protected areas in Brazil. *Land Use Policy*, v. 100, p. 104926, jan. 2021a.

SILVA, R. E. DA et al. Biological properties of *Oncocalyxone A*: a review. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 4, p. e57810414343, 22 abr. 2021b.

SUN, X.; GUO, L. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. *Mycology*, v. 3, n. 1, p. 65–76, 8 mar. 2012.

TEIXEIRA, M. G. et al. The Brazilian Caatinga protected areas: an extremely unbalanced conservation system. *Environmental Conservation*, v. 48, n. 4, p. 287–294, 19 out. 2021.

THUKRAL, A. K. A review on measurement of Alpha diversity in biology. *Agricultural Research Journal*, v. 54, n. 1, p. 1, 2017.

TILMAN, D.; ISBELL, F.; COWLES, J. M. Biodiversity and Ecosystem Functioning. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 45, n. 1, p. 471–493, 23

nov. 2014.

TRUONG, C. et al. How to know the fungi: combining field inventories and DNA-barcoding to document fungal diversity. *New Phytologist*, v. 214, n. 3, p. 913–919, 8mar. 2017.

YAN, J. F. et al. Do endophytic fungi grow through their hosts systemically? *Fungal Ecology*, v. 13, p. 53–59, fev. 2015.

ZHANG, Y. et al. Urbanization significantly impacts the connectivity of soil microbes involved in nitrogen dynamics at a watershed scale. *Environmental Pollution*, v. 258, mar. 2020.

ZHENG, Y.-K. et al. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. *Annals of Microbiology*, v. 66, n. 2, p. 529–542, 25 set. 2015.

APÊNDICE A

Tabela. Coordenadas das árvores coletadas.

Árvore	Latitude	Longitude
Árvore 1	- 3,708241	- 38,641180
Árvore 2	- 3,708260	- 38,641136
Árvore 3	- 3,736395	- 38,568111
Árvore 4	- 3,736597	- 38, 568538

APÊNDICE B

Tabela. Árvore, Amostra, Folha, Região da folha e Placa de Isolamento respectiva. Autor

Árvore	Amostra	Folha	Região da folha	Placa de Isolamento
1	1	1	A	Co 101
			B	Co 102
			C	Co 103
			D	Co 104
		2	A	Co 105
			B	Co 106
			C	Co 107
			D	Co 108
	2	3	A	Co 109
			B	Co 110
			C	Co 111
			D	Co 112
		4	A	Co 113
			B	Co 114
			C	Co 115
			D	Co 116
1	3	5	A	Co 117
			B	Co 118
			C	Co 119
			D	Co 120
		6	A	Co 121
			B	Co 122
			C	Co 123
			D	Co 124

4	7	A	Co 125	
		B	Co 126	
		C	Co 127	
		D	Co 128	
		A	Co 129	
		B	Co 130	
		C	Co 131	
		D	Co 132	
2	1	A	Co 133	
		B	Co 134	
		C	Co 135	
		D	Co 136	
	2	A	Co 137	
		B	Co 138	
		C	Co 139	
		D	Co 140	
	2	A	Co 141	
		B	Co 142	
		C	Co 143	
		D	Co 144	
	2	A	Co 145	
		B	Co 146	
		C	Co 147	
		D	Co 148	
3	A	Co 149		
	B	Co 150		
	C	Co 151		
	D	Co 152		
2	6	A	Co 153	
		B	Co 154	
		C	Co 155	
		D	Co 156	
4	7	A	Co 157	
		B	Co 158	
		C	Co 159	
		D	Co 160	
8	A	Co 161		
	B	Co 162		
	C	Co 163		
	D	Co 164		
3	1	1	A	Co 165

			C	Co 207
			D	Co 208
			A	Co 209
			B	Co 210
4			C	Co 211
			D	Co 212
			A	Co 213
			B	Co 214
3		5	C	Co 215
			D	Co 216
			A	Co 217
			B	Co 218
4		6	C	Co 219
			D	Co 220
			A	Co 221
			B	Co 222
4		7	C	Co 223
			D	Co 224
			A	Co 225
			B	Co 226
		8	C	Co 227
			D	Co 228

APÊNDICE C

Tabela. Teste de normalidade Shapiro-Wilk dos índices em folhas.

Área	Índice	W	Valor de p	Conclusão
Conservada	Shannon	0,93864	0,3327	Dist.normal
	Simpson	0,96644	0,7782	Dist.normal
	Pielou	0,9803	0,966	Dist.normal
Urbanizada	Shannon	0,92582	0,2361	Dist.normal
	Simpson	0,93048	0,2775	Dist.normal
	Pielou	0,90421	0,1104	Dist.normal
Total	Shannon	0,95544	0,2201	Dist.normal
	Simpson	0,96661	0,431	Dist.normal
	Pielou	0,95233	0,1809	Dist.normal

Legenda: Shannon: Índice de Shannon-Wiener; Simpson: Índice de Gini-Simpson; Pielou: Índice de Equitabilidade de Pielou.
W: Resultado do teste de Shapiro-Wilk; Valor de p: Valor de p correspondente ao resultado do teste. Autor.

APÊNDICE D

Tabela. Teste de t de Student comparando os índices em folhas por área.

Índice	Média CON	Média URB	Teste t	gl	Valor de p	Conclusão
Shannon	1,55	1,59	-0,40525	24,3	0,6888	Não-significativo
Simpson	0,73	0,76	-1,3297	27,4	0,1946	Não-significativo
Pielou	0,81	0,92	-5,1914	26,0	2,04e-5	Significativo

Legenda: Shannon: Índice de Shannon-Wiener; Simpson: Índice de Gini-Simpson; Pielou: Índice de Equitabilidade de Pielou; Média CON: média da área conservada; Média URB: média da área urbanizada; Teste t: Resultado do teste t de Student; gl: grau de liberdade; Valor de p: Valor de p correspondente ao resultado do teste. Autor.