

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

ISADORA CAMARGO PEDRINO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
ASSOCIADOS A *Paspalum atratum* Swallen E *Paspalum notatum* Fluggé COM
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E AGRÍCOLA PARA PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO VEGETAL E BIOCONTROLE

SÃO CARLOS

2023

ISADORA CAMARGO PEDRINO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
ASSOCIADOS A *Paspalum atratum* Swallen E *Paspalum notatum* Fluggé COM
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E AGRÍCOLA PARA PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO VEGETAL E BIOCONTROLE**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia
pela Universidade Federal de São Carlos.**

Orientador: Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

SÃO CARLOS

2023

Aos meus pais, Rosane e Benê, pelo amor, dedicação e incentivo durante toda a minha jornada de capacitação para me tornar uma profissional comprometida e íntegra.

Também ao meu irmão, Mateus, por todo o apoio e companheirismo.

Ao meu noivo, Vitor Hugo, pelo incentivo e amor.

Por fim, a todos os meus professores e orientadores, que eu tanto admiro e tenho imensa gratidão pelos ensinamentos e oportunidades.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me proporcionado essa experiência tão importante para a minha formação.

Ao meu orientador de TCC Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava, por toda a orientação, suporte e acolhimento. Obrigada pela oportunidade.

Aos meus pais, Rosane e Benê, por todo o apoio nas diversas situações ao longo da minha formação, sempre me amparando e fortalecendo.

Ao meu irmão Mateus, que sempre foi o meu melhor amigo e incentivador.

Ao meu noivo, Vitor Hugo, que sempre esteve ao meu lado me encorajando.

Ao Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha, do Departamento de Genética e Evolução, UFSCar, que me proporcionou diversos conhecimentos, sendo sempre bastante atencioso.

À Dra. Alessandra Fávero, da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, pelas valiosas sugestões para o desenvolvimento dos experimentos e por ter me recepcionado em sua linha de pesquisa.

Ao técnico de laboratório Mateus Shane, do Departamento de Genética e Evolução, UFSCar, que me acompanhou e me instruiu nos meus primeiros anos de laboratório. O seu respaldo foi fundamental.

Ao técnico de laboratório Dr. Paulo Henrique Andrade, Departamento de Morfologia e Patologia, UFSCar, que me auxiliou sempre que tive dúvidas.

À minha amiga Lia Durigan, que sempre esteve comigo em todos os momentos, me apoiando e me incentivando.

Às minhas companheiras e amigas do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB), Departamento de Morfologia e Patologia, UFSCar, Ana Carolina Vasconcelos, Laísa Garcia e Giovana Gulhote, que estiveram ao meu lado, sempre tornando os momentos mais leves e descontraídos.

Ao Prof. Dr. Iran Malavazi e ao Dr. Jonatas Campanella, Departamento de Genética e Evolução, UFSCar, por toda a atenção e auxílio no projeto.

As minhas professoras Dra. Maria Cristina Pranchevicius e Dra. Andrea Fuentes, do Departamento de Genética e Evolução, UFSCar, que eu tanto admiro e tenho gratidão!

Ao Dr. Marcos David Ferreira, da Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP, por ter me proporcionado experiências profissionais únicas.

À todos os meus professores, Bacharelado Biotecnologia, UFSCar, São Carlos, SP que sempre se demonstraram resilientes as adversidades, e compartilharam tanto seus conhecimentos.

À Embrapa Pecuária Sudeste, por fornecer o material necessário advindo do Banco de Germoplasma de *Paspalum*.

Ao Departamento de Morfologia e Patologia, UFSCar, pelo fornecimento das condições necessárias para o desenvolvimento desta pesquisa.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa Proc., nº 2020/11315-6.

RESUMO

O gênero *Paspalum* sp. participa na composição de pastagens por todo o continente americano, sendo adaptado a diversas condições ambientais. O *Paspalum atratum* é uma espécie que se adapta a solos ácidos, com baixa fertilidade e sazonalmente alagados. O *Paspalum notatum* é uma espécie adaptada a solos secos, solos alagados e com baixa fertilidade. Muitas vezes encontradas em situações desvantajosas, os fungos endofíticos podem ser responsáveis por auxiliar na manutenção de vegetais, visto que esses microrganismos residem no interior das plantas, aumentando a resistência a estresses abióticos e bióticos. A utilização de fungos com a capacidade de promover o crescimento vegetal e realizar biocontrole são abordagens estratégicas para substituir fertilizantes, inseticidas e fungicidas químicos largamente utilizados, assim como suprir as demandas das plantas de forma mais eficaz e sustentável. O presente estudo objetivou isolar e caracterizar fungos endofíticos associados a *P. atratum* e *P. notatum* e avaliar o potencial de solubilização de fosfato inorgânico (SFI) e o potencial antagonístico contra fitopatógenos. Os fungos foram isolados de raízes e folhas, e testados *in vitro* para SFI e antagonismo contra os fungos fitopatogênicos *Bipolaris* sp. e *Colletotrichum* sp. Entre os 385 isolados fúngicos obtidos, 213 solubilizaram fosfato inorgânico e os que apresentaram os melhores potenciais para SFI e antagonismo contra os fitopatógenos foram identificados. A identificação foi realizada por meio do sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal, e os gêneros identificados foram *Aspegillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Microdochium* sp., *Neosartorya* sp., *Penicillium* sp. e *Phoma* sp. como endófitos de *P. atratum*, e *Aspegillus* sp., *Ceratobasidium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Microdochium* sp., *Penicillium* sp. e *Talaromyces* sp. como endófitos de *P. notatum*.

Palavras-chave: Banco Ativo de Germoplasma (BAG); Controle biológico; Promoção de crescimento vegetal; Solubilização de fosfato inorgânico.

ABSTRACT

The genus *Paspalum* sp. participates in the composition of pastures throughout the American continent, being adapted to different environmental conditions. *Paspalum atratum* is a species that adapts to rough soils with low fertility and seasonally flooded. *Paspalum notatum* is a species adapted to dry soils, flooded soils, and soils with low fertility. Often found in disadvantageous situations, endophytic fungi may be responsible for assisting in the maintenance of vegetables, as these microorganisms reside inside plants, increasing resistance to abiotic and biotic stresses. The use of fungi with the ability to promote plant growth and carry out biocontrol are strategies to replace widely used chemical fertilizers, insecticides, and fungicides, as well as to meet the demands of plants in a more effective and sustainable way. The present study aimed to isolate and characterize endophytic fungi associated with *P. atratum* and *P. notatum* and to evaluate the inorganic phosphate solubilization potential (SFI) and the antagonistic potential against phytopathogens. Fungi were isolated from roots and leaves, and tested *in vitro* for SFI and antagonism against phytopathogenic fungi *Bipolaris* sp. and *Colletotrichum* sp. Among the 385 fungal isolates obtained, 213 solubilized inorganic phosphate and those that presented the best potential for SFI and antagonism against phytopathogens were identified. Identification was performed by sequencing the ITS region of ribosomal DNA, and the genera identified were *Aspegillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Microdochium* sp., *Neosartorya* sp., *Penicillium* sp. and *Phoma* sp. as endophytes of *P. atratum*, and *Aspegillus* sp., *Ceratobasidium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Microdochium* sp., *Penicillium* sp. and *Talaromyces* sp. as endophytes of *P. notatum*.

Keywords: Active Germplasm Bank (AGB); Biological control; Plant growth promotion; Inorganic phosphate solubilization.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- ACESSO BPG 308 DE <i>PASPALUM ATRATUM</i> NO BAG DA EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE, SÃO CARLOS, SP.....	20
FIGURA 2- ACESSO BPG 026 DE <i>PASPALUM NOTATUM</i> NO BAG DA EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE, SÃO CARLOS, SP.....	21
FIGURA 3- ILUSTRAÇÃO DA DESINFECÇÃO DOS TECIDOS VEGETAIS E OBTENÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>PASPALUM SP</i>	22
FIGURA 4- REPRESENTAÇÃO DE UMA PLACA DE PETRI COM A METODOLOGIA PARA TRIAGEM DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO IN VITRO POR FUNGOS	24
FIGURA 5- REPRESENTAÇÃO DE PLACAS DE PETRI COM A METODOLOGIA PARA TRIAGEM DE ANTAGONISMO IN VITRO	25
FIGURA 6- REPRESENTAÇÃO DE PLACAS DE PETRI COM A TÉCNICA DE PAREAMENTO DIRETO IN VITRO	26
FIGURA 7- REPRESENTAÇÃO DO CÁLCULO DA PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS	26
FIGURA 8 - REPRESENTAÇÃO DA REGIÃO DE DNA RIBOSSOMAL ITS-5,8S-ITS2.....	29
FIGURA 9- EXEMPLARES DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PURIFICADOS DE <i>PASPALUM ATRATUM</i> E <i>PASPALUM NOTATUM</i> DO BAG DA EMBRAPA PECUÁRIA SUDESTE – SÃO CARLOS (SP).....	30
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA QUANTIDADE DE ISOLADOS FÚNGICOS ENDOFÍTICOS EM RELAÇÃO AO TECIDO DE ORIGEM E A ESPÉCIE DE <i>PASPALUM SP</i>	31
FIGURA 11- AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO INSOLÚVEL POR FUNGOS ENDOFÍTICOS	32
FIGURA 12- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SELEÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS MEDIANTE O POTENCIAL DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO INORGÂNICO E SUA ORIGEM VEGETAL DE <i>PASPALUM ATRATUM</i> E <i>PASPALUM NOTATUM</i>	32
FIGURA 13- TRIAGEM DE ANTAGONISMO IN VITRO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM RELAÇÃO AO FUNGO <i>BIPOLARIS SP</i>	33
FIGURA 14- TRIAGEM DE ANTAGONISMO IN VITRO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM RELAÇÃO AO FUNGO <i>COLLETOTRICHUM SP</i>	33
FIGURA 15- ENSAIO DE ANTAGONISMO IN VITRO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM RELAÇÃO AO FITOPATÓGENO <i>BIPOLARIS SP</i>	34
FIGURA 16 - ENSAIO DE ANTAGONISMO IN VITRO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM RELAÇÃO AO FITOPATÓGENO <i>COLLETOTRICHUM SP</i>	34

FIGURA 17- GEL DE 1% DE AGAROSE PARA CONFIRMAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DA REGIÃO DE DNA RIBOSSOMAL ITS-5,8S-ITS2 DOS ENDÓFITOS DE <i>PASPALUM ATRATUM</i> ...	37
FIGURA 18- GEL DE 1% DE AGAROSE PARA CONFIRMAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DA REGIÃO DE DNA RIBOSSOMAL ITS-5,8S-ITS2 DOS ENDÓFITOS DE <i>PASPALUM NOTATUM</i> ...	38
FIGURA 19- DIAGRAMA DE VENN AGRUPANDO OS GÊNEROS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM COMUM AO <i>P. ATRATUM</i> E AO <i>P. NOTATUM</i>	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- PREPARAÇÃO DO TAMPÃO DE EXTRAÇÃO DE DNA.	27
TABELA 2- RESULTADOS DOS ENSAIOS DE ANTAGONISMO IN VITRO ENTRE OS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS E OS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PASPALUM ATRATUM.....	35
TABELA 3- RESULTADOS DOS ENSAIOS DE ANTAGONISMO IN VITRO ENTRE OS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS E OS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PASPALUM NOTATUM	36
TABELA 4- IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS DE PASPALUM ATRATUM. *NI = NÃO IDENTIFICADO.....	38
TABELA 5- IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS DE PASPALUM NOTATUM.*NI = NÃO IDENTIFICADO	39
TABELA 6- PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS ENDOFÍTICOS DE P. ATRATUM REFERENTE AOS FITOPATÓGENOS COLLETOTRICHUM SP. E BIPOLARIS SP.*NI = NÃO IDENTIFICADO.....	41
TABELA 7- PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS ENDOFÍTICOS DE P. NOTATUM REFERENTE AOS FITOPATÓGENOS COLLETOTRICHUM SP. E BIPOLARIS SP.*NI = NÃO IDENTIFICADO.....	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	GÊNERO <i>PASPALUM</i>	13
2.2	MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS	14
2.3	SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO INORGÂNICO POR FUNGOS ENDOFÍTICOS	15
2.4	CONTROLE BIOLÓGICO POR FUNGOS ENDOFÍTICOS	17
3	OBJETIVOS	19
3.1	OBJETIVO GERAL	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1	COLETA DO MATERIAL	20
4.2	DESINFECÇÃO SUPERFICIAL DE FOLHA E RAÍZ E ISOLAMENTO POR FRAGMENTAÇÃO	21
4.3	PURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS E ARMAZENAMENTO DOS ISOLADOS	22
4.4	EXPERIMENTOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL E CONTROLE BIOLÓGICO <i>IN VITRO</i>	23
4.4.1	Solubilização de Fosfato inorgânico (SFI).....	23
4.4.2	Atividade Antagonista a <i>Bipolaris</i> sp. e <i>Colletotrichum</i> sp. e pareamento direto <i>in vitro</i>	24
4.5	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	26
4.5.1	Extração de DNA fúngico	26
4.5.2	Amplificação da região ITS do rDNA.....	28
4.5.3	Purificação do DNA amplificado e sequenciamento, edição e análise de comparação de sequências no NCBI.	29
5	RESULTADOS	30
5.1	ISOLAMENTOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>PASPALUM ATRATUM</i> E <i>PASPALUM NOTATUM</i>	30
5.2	EXPERIMENTOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL E CONTROLE BIOLÓGICO <i>IN VITRO</i>	31
5.2.1	Solubilização de Fosfato Inorgânico (SFI).....	31
5.2.2	Atividade Antagonista aos gêneros <i>Bipolaris</i> sp. e <i>Colletotrichum</i> sp	32
5.3	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS FÚNGICOS	37

5.4	GÊNEROS FÚNGICOS COM AS MELHORES ATIVIDADES ANTAGONISTAS FRENTE AO <i>BIPOLARIS</i> SP E AO <i>COLLETOTRICHUM</i> SP	40
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÃO	52
8	PERSPECTIVAS FUTURAS	53
9	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

Com o crescimento de cerca de 1,1 % ao ano da população mundial, de acordo com as projeções a população mundial atingirá 9,7 bilhões em 2050 (Molotoks *et al.*, 2021). Desde os primórdios, a prática agrícola tem sido fundamental para suprir as demandas alimentícias da população. Entretanto, os avanços agrícolas visando aumentar a produtividade, recorreram ao uso recorrente de fertilizantes, inseticidas e fungicidas químicos, os quais se tornaram partes fundamentais desse sistema (Shivastav, 2020). O uso elevado desses agroquímicos tem ocasionado a contaminação de solos e lençóis freáticos, se tornando responsáveis por diversos danos à saúde humana (Lopes; Albuquerque, 2018). Com isso, a implementação de métodos alternativos para garantir a qualidade e a produtividade na agricultura é essencial para a manutenção da saúde dos seres vivos (Shivastav, 2020).

Os fungos endofíticos, que habitam o interior das plantas, podem se tornar uma estratégia para as questões atuais em detrimento aos agroquímicos, dado que esses microrganismos auxiliam no crescimento vegetal por intermédio da solubilização de fosfato, produção de fitormônios, produção de moléculas bioativas e ação antagonista a fitopatógenos (Azevedo *et al.*, 2014 Rawat *et al.*, 2020). O uso destes endófitos já tem sido descrito, como, por exemplo, a utilização do fungo endofítico *Rodhotorula glutinosis* para supressão de podridão azul em macieiras, ocasionado um aumento da biomassa e o crescimento vegetal, ou ainda, a combinação dos gêneros de endófitos de *Aspergillus terreus* e *Acremonium strictum* como antagonista aos fitopatógenos causadores de doenças na cultura de tomate (Symasia *et al.*, 2021).

O gênero *Paspalum* sp. é constituinte das pastagens do Brasil, sendo encontrado nos variados biomas do país. Suas espécies são dotadas de qualidades forrageiras, propriedades nutricionais e adaptabilidade aos diversos contextos ambientais (Novo *et al.*, 2016). Sendo a principal fonte de alimentação animal, as pastagens brasileiras são constituídas majoritariamente pelo gênero *Brachiaria* sp, e a baixa variabilidade genética pode ocasionar vulnerabilidade desse gênero, sendo suscetíveis a desequilíbrios ecológicos (De Paula, 2022). Tendo em vista as características do *Paspalum atratum*, o qual possui crescimento acelerado e alto potencial de rendimento, o mesmo poderia se tornar uma alternativa para reduzir a baixa variabilidade genética presente nos pastos. Assim com o *P. atratum*, o *P. notatum* também possui características promissoras, como adaptação a diversos tipos de solos, podendo ser uma

alternativa para ocupar áreas não ocupadas por essas gramíneas (Marcon *et al.*, 2018; Beck, 2012; De Paula, 2022). A necessidade de alternativas para a nutrição animal, assim como a busca por alternativas para substituição de agroquímicos, pode direcionar para o estudo dos gêneros de *Paspalum* sp.

Os acessos de *Paspalum* sp. do banco ativo de germoplasma da Embrapa Pecuária Sudeste, dotado de mais de 450 acessos têm sido explorados em diversos estudos, desde caracterização quanto à estresses (Pezzopane *et al.*, 2017), até desenvolvimento de novos híbridos (Dinato *et al.*, 2018). A diversidade da microbiota endofítica e rizosférica também têm sido um alvo de estudos, mas as pesquisas ainda são escassas. Assim sendo, o estudo do potencial desses microrganismos pode ser um caminho para lidar com as demandas atuais de nutrição animal e substituição de agroquímicos, assim como possibilitar novas descobertas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GÊNERO *Paspalum*

Dotado de mais de 400 espécies, o gênero *Paspalum* é amplamente distribuído pelo continente americano e é considerado o segundo maior gênero da família Poaceae (Novo *et al.*, 2016; Secco & Fachinetto, 2019). No Brasil, encontram-se mais de 200 espécies nativas do gênero *Paspalum* sp. distribuídas por todo o território, como nos biomas Amazônia, Cerrado e Pampa (Scheffer-Basso *et al.*, 2002). A presença desse gênero em locais com diferentes condições ambientais é um indicativo do seu grande potencial de adaptabilidade a fatores como frio, acidez, alagamento e fogo (Secco & Fachinetto, 2019).

Além da qualidade de adaptação, o gênero *Paspalum* sp. é conhecido por ter espécies com qualidade de forragem e propriedades nutricionais (Novo *et al.*, 2016). Levando em consideração que o Brasil possui aproximadamente 160 milhões de terras utilizadas para atividades de pecuária, e cerca de 80 milhões desses hectares são plantados espécies do gênero *Brachiaria* sp., esse fato sugere que ocorre uma vulnerabilidade genética dos pastos, podendo ser suscetíveis às pragas e doenças (Valle *et al.*, 2001; Batista & Regitano Neto, 1999). Com isso, nos últimos anos ocorreu um aumento no interesse pela utilização desse gênero como alternativa para utilização como forrageiras na produção agropecuária dado as características de interesse observados nas espécies de *Paspalum* sp. (Novo *et al.* 2016).

Das espécies de *Paspalum* sp., o *Paspalum atratum* Swallen, também conhecido como Capim Pojuca, é uma gramínea perene típica de regiões quentes caracterizada como de crescimento rápido, solos com baixa fertilidade, ácidos e sazonalmente alagados, e, também dotada de alto potencial de rendimento de forragem e de sementes (Marcon *et al.*, 2018). Com folhas tenras (facilmente cortadas), *P. atratum* apresenta crescimento cespitoso (ereto, perpendicular ao nível do solo), e alcançam alturas superiores a 1,5 metros (Cunha *et al.*, 2001). Ademais, essa espécie possui uma alta demanda por fósforo, característica esta, que limita a produção dessa forragem (Filgueiras *et al.*, 2016).

Outra espécie do gênero *Paspalum* sp. é o *Paspalum notatum* Fluggé, conhecido popularmente como Grama-forquilha ou Grama-batatais. Essa espécie consiste em uma gramínea perene, com rizomas horizontais, e adaptação a solos secos, alagados e com baixa

fertilidade, com sua altura variando de 10 a 20 cm (Beck, 2012). Por possuir resistência ao pisoteio, essa espécie é amplamente utilizada em gramados (Boldrini, 2016). O nome Grama-forquilha é referente ao fato que, no ápice das hastes florais, ocorre o desenvolvimento de dois racemos (tipo de inflorescência) com aparência de uma bifurcação (Beck, 2012).

Localizada na cidade de São Carlos, região central do Estado de São Paulo, a 21° 56' de longitude Oeste, a Embrapa Pecuária Sudeste detém o Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* (BAG *Paspalum*) com a segunda maior coleção mundial de *Paspalum*. O objetivo do BAG é preservar, caracterizar e avaliar os recursos genéticos coletados de *Paspalum* sp., assim como estimular novas coletas e intercâmbio de germoplasma (Batista & Neto, 1999). Nesse Banco, estão presentes cerca de 450 acessos com aproximadamente 60 espécies diferentes, sendo que umas das espécies de *P. atratum* é encontrado no acesso BGP 308 (BRA 0300078/VRcMnSv 14525), e uma das espécies de *P. notatum* é encontrado no acesso BGP 026 (BRA 0063001/VGzLeBo 9684).

2.2 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Os microrganismos endofíticos são definidos como todos os microrganismos que podem ou não ser cultivados, e que residem o interior das plantas de forma sistêmica ou localizada, sem manifestar patogenicidade visível nas plantas (Rajamanikyam et al., 2017; Souza & Santos, 2017; Toghueo & Boyom, 2019). Majoritariamente, esses microrganismos penetram através das raízes, mas também ocorre por intermédio dos estômatos ou hidatódios através da produção de enzimas líticas que degradam as paredes vegetais, assim como por intermédio de ferimentos ocasionados por outros microrganismos (Majewska-Sawka A., Nakashima, 2004; Jordaan et al., 2006; Rudgers & Clay, 2007; Azevedo, 2014). Outra forma que os microrganismos endofíticos internalizam as plantas é por meio das sementes, visto que esses microrganismos podem ser difundidos aos descendentes da planta através das sementes, se instalando ao longo de toda a vida do vegetal (Petrini, 1991; Azevedo, 2014, Azevedo & Quecine, 2019; Bogas et al. 2024).

Os endófitos são localizados em todo o planeta vivendo dentro de plantas vasculares, musgos e algas, desde os polos, desertos e oceanos, até florestas tropicais, mangues e cerrados (Azevedo et al. 2000; Azevedo, 2014; Sebastianes, Azevedo, Lacava, 2017; Lacava, Bogas,

Moreira, 2021). Esse cenário corrobora que as comunidades endofíticas estão relacionadas com o desenvolvimento e sobrevivência das plantas nesses locais, uma vez que as mesmas se encontram, muitas vezes, em condições adversas. Tem-se o conhecimento de que as associações mutualísticas entre as plantas e os microrganismos possibilitam que as plantas adquiram estímulos para seu crescimento e aumento da resistência a estresses abióticos e bióticos, e que os microrganismos endofíticos obtenham nutrientes e proteção das plantas (Khare *et al.*, 2018; Lacava, Machado, Andrade, 2021).

O aumento de resistência a estresses abióticos, como seca, salinidade e temperaturas extremas, está relacionado com mecanismos moleculares adotados pelos microrganismos endofíticos. Esses mecanismos moleculares envolvem a indução da expressão de genes de resposta ao estresse, gerando moléculas como espécies reativas de oxigênio, e a síntese de metabólitos que combatem esses estresses, como é o caso do ABA (Wang *et al.*, 2003; Khare and Arora, 2015; Lata *et al.*, 2018). Pela presença de endófitos, a biossíntese e as vias de sinalização do ABA são moduladas, de forma que ocorre uma contribuição para o crescimento da planta quando em condição de estresse salino (Wani *et al.*, 2016; Waqas *et al.*, 2012).

Tratando da resistência a estresses bióticos, os microrganismos endofíticos são capazes de induzir a resistência sistêmica na planta, regular a expressão de genes relacionados com as vias de defesa da planta, e suprimir o desenvolvimento dos fitopatógenos por intermédio do antagonismo (Khare *et al.*, 2018). Exemplificando, foi elucidada a capacidade do fungo *Fusarium solani* de induzir a resistência sistêmica da planta contra o patógeno de folhas de tomate, *Septoria lycopersici*, por meio da ativação de genes de combate a patogênese (Kavroulakis *et al.*, 2007).

2.3 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO INORGÂNICO POR FUNGOS ENDOFÍTICOS

Assim como o nitrogênio e o potássio, o elemento fósforo é um nutriente indispensável para o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Mehta *et al.*, 2013). Entretanto, a disponibilidade de fósforo para ser absorvido pelas plantas é relativamente baixa, por conta da complexação desse elemento com íons metálicos presentes no solo. Do total de fósforo do solo, pequenas porcentagens estão disponíveis as plantas, sendo derivados de biomassa vegetal e substâncias microbianas. Já do fósforo inorgânico, tem-se cerca a maior porcentagem, sendo

de fosfatos e minerais como fosfato de cálcio, fosfato de alumínio e fosfato de ferro (Etesami *et al.*, 2021). Esses complexos insolúveis são resultantes da reação da carga negativa do íon fosfato com as cargas positivas dos íons alumínio, cálcio e ferro presentes no solo, de forma que são impossibilitados de serem absorvidos diretamente pelos vegetais; as formas de fósforo que são passíveis de serem absorvidas pelas plantas são H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} (Perumalsamy & Thangavelu, 2017).

Contudo, existem microrganismos responsáveis por disponibilizar fósforo inorgânico do solo para as plantas, denominados microrganismos solubilizadores de fósforo (MSPs). Além de inúmeros gêneros bacterianos que realizam esse processo, existem gêneros fúngicos descritos como capazes de solubilização de fosfato, sendo eles do gênero *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp., *Acremonium* sp., *Hymenella* sp., *Curvularia* sp., dentre outros (Rawat *et al.*, 2020). Para a solubilização de fosfato inorgânico, esses microrganismos adotam alguns mecanismos, como: produção de ácidos orgânicos, produção de ácidos inorgânicos, liberação de prótons do NH_4^+ , produção de sideróforos, etc (Tomer *et al.*, 2016).

Tratando-se da produção de ácidos orgânicos, os mesmos são resultantes das vias metabólicas dos MSPs, como as vias de fermentação, respiração e oxidação. Esses ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido glucônico, ácido oxálico e ácido tartático) são excretados por esses microrganismos, de forma que resulta na acidificação das proximidades microbianas, e a consequente liberação dos fosfatos dos complexos insolúveis (Kishore *et al.*, 2015). Além da produção de ácidos orgânicos, os MSPs possuem um processo de menor eficiência com relação a este primeiro, que é a produção de ácidos inorgânicos; como forma de solubilizar fosfato, esses microrganismos produzem ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico e ácido carbônico para liberar os complexos insolúveis (Shrivastava *et al.*, 2018).

Outro mecanismo de solubilização de fosfato inorgânico inclui a liberação de prótons do NH_4^+ . No solo, encontra-se naturalmente o amônio, que é assimilado por esses microrganismos para síntese dos aminoácidos. Na célula dos MSPs, o amônio é convertido em amônia (NH_3), e o excedente de prótons H^+ é liberado no citoplasma da célula. Essa liberação do excedente de prótons ocasiona a acidificação do meio ao redor da célula, e auxilia na dissolução dos complexos de fosfatos insolúveis (Gaiind, 2016).

A excreção de sideróforos também é um mecanismo de solubilização de fosfato inorgânico. Os sideróforos são compostos orgânicos que formam ligações de alta afinidade com o ferro do solo, solubilizando-o, e o tornando passível de ser captado por esses microrganismos (Birch; Bachofen, 1990; Collavino, *et al.*, 2010). Com isso, a liberação desses

compostos no solo queela o ferro que estava formando complexos insolúveis com o fósforo, tornando-o disponível para sua solubilização (Collavino *et al.*, 2010).

Levando em consideração que o fornecimento de fosfato para as plantas é essencial ao longo de toda a vida do vegetal, os fertilizantes fosfatados são aplicados constantemente. Entretanto, da mesma forma que ocorre a complexação dos fosfatos do solo em complexos insolúveis, o fósforo desses fertilizantes também é complexado, e as plantas acabam por absorver pouca quantidade (Ahemad & Kibret, 2014; Solanki *et al.*, 2018).

Isto posto, tendo em mente o potencial de solubilização de fosfato inorgânico pelos MSPs, os fungos endofíticos capazes de solubilizar fosfato e disponibilizar para as plantas, podem se tornar uma alternativa para fornecimento de fósforo no meio agrônômico, como uma alternativa para suprir as demandas de forma eficaz e constante. (Matos *et al.*, 2017; Walia *et al.*, 2017; Awais *et al.*, 2017).

2.4 CONTROLE BIOLÓGICO POR FUNGOS ENDOFÍTICOS

Em escala global, os patógenos de plantas são responsáveis por cerca de 16% das perdas, e as doenças causadas são controladas majoritariamente pelo uso de agroquímicos (Fontana *et al.*, 2021). Entretanto, tem-se o conhecimento que a abordagem química ocasiona inúmeros malefícios, como a perda da estrutura física das plantas, contaminação de lençóis freáticos e rios, prejuízos a saúde dos seres vivos, e seleção de populações de patógenos resistentes (Lopes & Albuquerque., 2018). Por conta desse cenário, a busca por alternativas que combatam o desenvolvimento dos patógenos ao mesmo tempo que conciliam a conservação ambiental está cada vez maior. Resultante disso, o controle biológico vem ganhando cada vez mais espaço no setor (Köhl *et al.*, 2019; O'Brien, 2017).

O controle biológico, ou biocontrole, consiste em uma técnica que utiliza agentes biológicos, como fungos, bactérias e vírus, para controlar o crescimento e desenvolvimento de outros organismos que causam impactos ecológicos ou econômicos (Bale *et al.*, 2008). Esses microrganismos são geralmente isolados da rizosfera ou do interior dos tecidos vegetais (endófitos), e possuem uma grande vantagem que é especificidade para um determinado patógeno, de forma a serem inofensivos para demais espécies não-alvo (O'Brien, 2017).

Nos últimos anos, inúmeros microrganismos foram determinados como agentes de biocontrole para doenças causadas por fungos e bactérias em culturas vegetais, e passaram a ser produzidos em escala comercial; essa definição foi feita levando em consideração que o controle realizado por eles foi próximo ou equivalente ao controle realizado por fungicidas (O'Brien, 2017). Dentre os fungos que são agentes de biocontrole, as espécies do gênero *Trichoderma* sp são bem avaliadas, como é o caso do fungo *Trichoderma koningii*, que apresentou 93% de grau de controle em relação ao fungo *Phytophthora cactorum*, e o fungo *T. harzianum*, que apresentou 89% de grau de controle para o mesmo fungo (Alexander & Stewart, 2001).

O fungo do gênero *Bipolaris* sp. foi descrito como fitopatógeno de culturas da família Poaceae, causando manchas foliares e podridões nas raízes. A patogenicidade causada por esse gênero fúngico foi descrito para capim-elefante, arroz, trigo, milho, sorgo e *Paspalum* sp., ocasionando perdas significantes (Manamgoda *et al.*, 2014; Al-sadi, 2021). Em 2002, Anjos e colaboradores, observaram severas manchas foliares em 100% das plantas da *Paspalum atratum* no Campo Experimental da Embrapa, localizado no Distrito Federal. O agente etiológico foi identificado como *Bipolaris maydis* (Anjos *et al.*, 2004).

A doença antracnose causada pelo fungo do gênero *Colletotrichum* sp. é responsável por inúmeras perdas na família Poaceae. Esse fungo já foi descrito como fitopatógeno de milho, soja, dentre outros cultivos (Trojan *et al.*, 2018; Barbieri *et al.*, 2017). Na Embrapa Pecuária Sudeste, localizada em São Carlos, SP, foi observado sintomas, em condições de campo, em *Paspalum* sp. O agente etiológico foi identificado como do gênero *Colletotrichum* sp..

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização de fungos endofíticos de raízes e folhas de *Paspalum atratum* Swallen e *P. notatum* Fluggé quanto à capacidade de promoção de crescimento vegetal e biocontrole.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e purificar a comunidade fúngica endofítica de raízes e folhas de *Paspalum atratum* (BGP 308) e *Paspalum notatum* (BGP 026) provenientes do BAG de *Paspalum* da EMBRAPA.
- Criar um banco de culturas fúngicas isoladas de *P. atratum* e *P. notatum* provenientes do BAG;
- Selecionar os fungos endofíticos de *P. atratum* e *P. notatum* com potencial de solubilização de fosfato inorgânico por meio de experimentos *in vitro*.
- Selecionar os fungos endofíticos de *P. atratum* e *P. notatum* com potencial de controle biológico por meio de experimentos *in vitro* de antagonismo aos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum* sp. e *Bipolaris* sp.
- Identificar taxonomicamente por meio do sequenciamento da região ITS os fungos endofíticos que possuíram melhores performances para promoção de crescimento vegetal e biocontrole *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL

Neste estudo, as duas espécies de *Paspalum* sp. (*Paspalum atratum* e *Paspalum notatum*) foram coletadas no Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* (BAG) da Embrapa Pecuária Sudeste (21°57'42'' S, 47°50'28'' W, 860m), localizada na São Carlos, SP. Para a coleta do material e o isolamento dos fungos endofíticos, a metodologia de Araújo *et al.* (2014) com modificações foi utilizada.

No dia 29 de agosto de 2022, foram coletados 10 indivíduos de *Paspalum atratum* Swallen do acesso BGP 308 (BRA 030078/VRcMmSv 14525) (Figura 1) e no dia 04 de outubro de 2022, foram coletados 10 indivíduos de *Paspalum notatum* Flûggé do acesso BGP 026 (BRA 006301/VGzLeBo 9684) (Figura 2).

Após a coleta, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos para transporte ao Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB), Departamento de Morfologia e Patologia, UFSCar, São Carlos, SP.

Figura 1- Acesso BPG 308 de *Paspalum atratum* no BAG da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. Fonte: Registrado pelo autor.



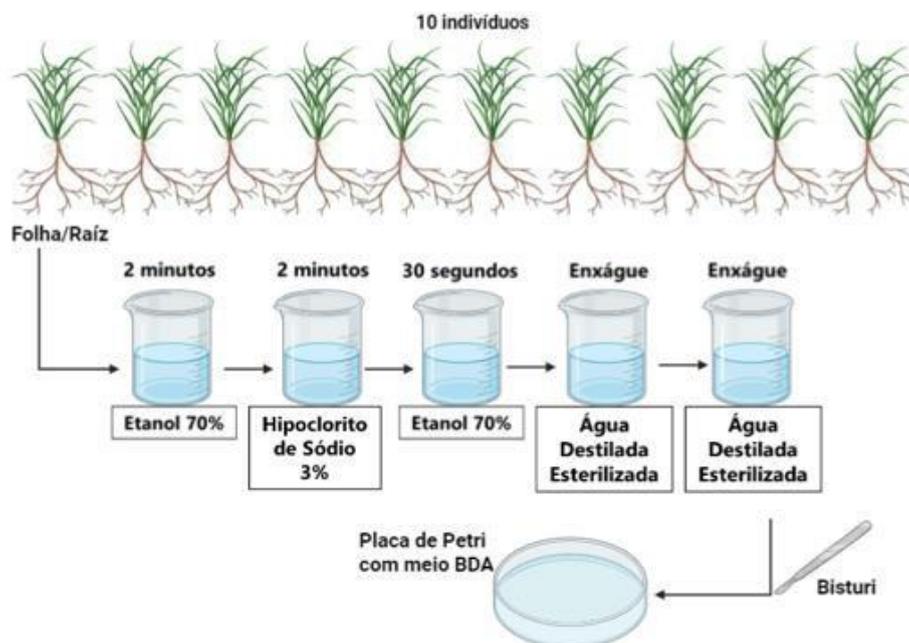
Figura 2- Acesso BPG 026 de *Paspalum notatum* no BAG da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. Fonte: Registrado pelo autor.



4.2 DESINFECÇÃO SUPERFICIAL DE FOLHA E RAÍZ E ISOLAMENTO POR FRAGMENTAÇÃO

Seguindo a metodologia de Araújo *et al.* (2014), as raízes e folhas coletadas foram submetidas à desinfecção superficial por meio da passagem em série por frascos de vidro esterilizados na câmara de fluxo laminar (Figura 3). Durante o processo, as folhas e raízes foram colocadas por 2 minutos em etanol 70 %, 2 minutos em hipoclorito de sódio 3 %, 30 segundos em etanol 70 %, e dois enxagues em água destilada esterilizada, sucessivamente. Em seguida, os tecidos foram cortados em fragmentos de 0,7 cm com o auxílio do bisturi esterilizado, e foram encubados 10 fragmentos de folhas e 10 fragmentos de raízes de cada indivíduo em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) contendo antibiótico tetraciclina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) a 28°C . O experimento foi realizado em triplicata.

Figura 3- Ilustração da desinfecção dos tecidos vegetais e obtenção dos fungos endofíticos de *Paspalum* sp.. Fonte: Elaborado pelo autor.



Para as placas de Petri controle, uma alíquota de 10 μL da água destilada esterilizada do fim do processo de desinfecção superficial foi encubada em meio de cultura BDA a 28°C para verificar se o processo de desinfecção foi eficiente. As placas de Petri contendo os tecidos vegetais e a alíquota controle foram observadas diariamente para acompanhar o crescimento fúngico.

4.3 PURIFICAÇÃO DOS ISOLADOS E ARMAZENAMENTO DOS ISOLADOS

As placas contendo os fragmentos de folha e raiz que apresentaram crescimento fúngico foram selecionadas, e as colônias fúngicas foram purificadas através do repique por estrias de esgotamento em placas de Petri contendo meio BDA a 28°C. As placas com as colônias purificadas foram armazenadas na geladeira para utilização nos próximos experimentos, e em frascos do tipo ampicilina utilizando a técnica de *Castellani* (Araújo *et al.*, 2014) com a identificação das colônias.

Para a identificação das colônias:

- Foi anotada a espécie de *Paspalum* sp. de onde ocorreu o isolamento: PN para *P. notatum* e PA para *P. atratum*;

- Seguido pelo tecido vegetal de origem: Raíz ou Folha;
- Seguido do indivíduo de onde ocorreu o isolamento: Variando de 1 até 10 (pois foram coletados 10 indivíduos);
- Seguido de qual fungo purificado é aquele: Se foram purificados cinco fungos daquele indivíduo, serão nomeados de 1 até 5.

Exemplos da nomenclatura:

PN Raíz 7-10: Esse fungo é endófito de *P. notatum*, foi isolado da raíz do indivíduo 7, e foi o décimo fungo purificado do indivíduo 7;

PA Folha 4-4: Esse fungo é endófito de *P. atratum*, foi isolado de folha do indivíduo 4, e foi o quarto fungo purificado do indivíduo 4.

4.4 EXPERIMENTOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL E CONTROLE BIOLÓGICO *IN VITRO*

Foram realizados testes *in vitro* de solubilização de fosfato inorgânico (SFI) e antagonismo aos fungos do gênero *Bipolaris* sp. e *Coletotrichum* sp., cujas cepas foram cedidas pela Dra. Sonia Nogueira da Embrapa Pecuária Sudeste, para analisar o potencial dos isolados fúngicos em promover a solubilização de fosfato e realizar controle biológico.

4.4.1 Solubilização de Fosfato inorgânico (SFI)

O potencial de solubilização de fosfato inorgânico dos isolados endofíticos foi analisado por meio da utilização de um meio de cultura contendo fosfato insolúvel (10 g.L⁻¹ de glicose; 5g.L⁻¹ de NH₄Cl; 1g.L⁻¹ de NaCl; 1g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0,8 g.L⁻¹ de CaHP0₄; 15 g.L⁻¹ de ágar; pH 7,2). Discos de 0,5 cm de diâmetro do micélio aéreo dos fungos foram inoculados no meio de cultura e incubados a 28°C; o experimento foi realizado em triplicata. O surgimento de um halo incolor ao redor das colônias é um indicativo de capacidade de solubilização de fosfato inorgânico, sendo que, quanto maior o halo incolor em relação ao

tamanho do micélio, maior o potencial de solubilização de fosfato inorgânico do fungo (Figura 4) (Verma et al., 2001).

As placas de Petri foram analisadas em dois pontos distintos (48 h e 72 h) em relação ao surgimento e ao tamanho do halo incolor. Como havia uma grande quantidade de isolados, a relação do tamanho do halo incolor em função do tamanho do micélio foi o parâmetro escolhido para selecionar os isolados com melhores potenciais de solubilização de fosfato inorgânico.

Determinamos como aferição:

- Ausência de halo;
- Surgimento de halo pequeno em relação ao micélio;
- Surgimento de halo médio em relação ao micélio;
- Surgimento de halo grande em relação ao micélio.

Figura 4- Representação de uma Placa de petri com a metodologia para triagem de solubilização de fosfato *in vitro* por fungos. Fonte: Elaborado pelo autor.



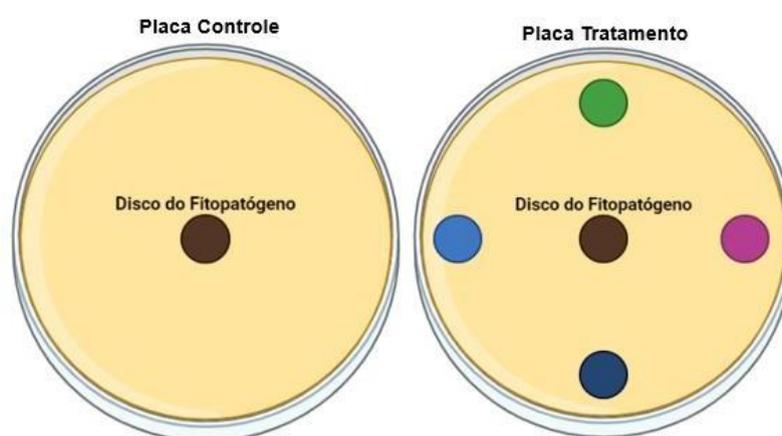
Os fungos que apresentaram e mantiveram halo médio em relação ao micélio e halo grande em relação ao micélio em até 72 horas, foram selecionados para o teste de pareamento direto *in vitro*.

4.4.2 Atividade Antagonista a *Bipolaris* sp. e *Colletotrichum* sp. e pareamento direto *in vitro*

Preliminarmente, realizou-se uma triagem com todos os isolados do *P. atratum* e *P. notatum* para analisar qualitativamente a influência sobre o desenvolvimento dos fitopatógenos dos gêneros *Bipolaris* sp. e *Colletotrichum* sp..

O experimento foi realizado em triplicata com 4 discos (0,5 cm de diâmetro) de fungos distintos colocados em pontos equidistantes na placa de Petri contendo meio BDA, juntamente com o fungo fitopatogênico ao centro, e incubados a 28°C. Para controle, foi inoculado um disco (0,5 cm de diâmetro) do fungo fitopatogênico ao centro da placa com meio BDA (Figura 5). As placas foram observadas até o momento em que o fungo fitopatogênico atingisse a totalidade da placa controle.

Figura 5- Representação de placas de Petri com a metodologia para triagem de antagonismo *in vitro*. Fonte: Elaborado pelo autor.

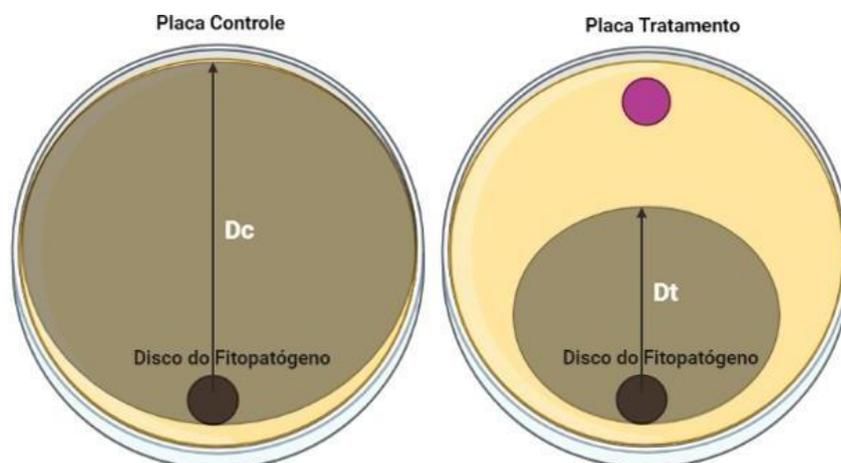


Com essa triagem, os fungos endofíticos que apresentaram capacidade de inibir o crescimento dos fungos fitopatogênicos foram selecionados. O indicativo da atividade antagonista foi a presença de um halo de inibição do fungo fitopatogênico.

Em seguida, os fungos endofíticos que apresentaram os melhores potenciais de solubilização de fosfato na etapa anterior e que também apresentaram atividade antagonista frente aos fungos fitopatogênicos na triagem, foram selecionados para realizar o método de pareamento direto *in vitro* (Mariano, 1993) o experimento foi realizado em duplicata. Nessa metodologia, para analisar quais isolados possuem capacidade de inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos, discos de 0,5 cm de diâmetro dos fitopatógenos foram inoculados na extremidade oposta de discos de 0,5 cm de diâmetro dos endófitos em placas de Petri contendo BDA; para a placa controle, apenas o disco fúngico do fitopatógeno foi posicionado em uma

das extremidades (Figura 6). As placas de Petri foram incubadas a 28°C, e foram observadas até o momento em que o fitopatógeno atingisse a totalidade da placa controle.

Figura 6- Representação de placas de Petri com a técnica de pareamento direto *in vitro*. Fonte: Elaborado pelo autor.



Com o crescimento total do fitopatógeno na placa controle, o diâmetro micelial do controle e o diâmetro micelial do tratamento foram medidos para o cálculo na porcentagem de inibição dos fungos fitopatogênicos seguindo a metodologia adaptada de (Quiroga; Sampietro; Vattuone, 2001) (Figura 7).

Figura 7- Representação do cálculo da porcentagem de inibição dos fungos fitopatogênicos.

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{Diâmetro Micelial do Controle (Dc)} - \text{Diâmetro Micelial do Tratamento (Dt)}}{\text{Diâmetro Micelial do Controle (Dc)}} \times 100$$

4.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

4.5.1 Extração de DNA fúngico

Os isolados que apresentaram os melhores potenciais nos testes de solubilização de fosfato *in vitro* e antagonismo aos fitopatógenos foram cultivados em placas de petri contendo meio sólido BDA, e depois foram transferidos com o auxílio da alça de platina para tubos de

volume de 50 mL contendo 15 mL meio BDB líquido, e mantidos a meia rosca em incubadora do tipo shaker por 3 dias, sob agitação de 180 rpm e 28°C.

Os tubos foram retirados do *shaker* e colocados na centrífuga a 4800 rpm, com Ac=9 e Dec=6, T° ambiente, por 15 minutos, para sedimentação do micélio. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e os micélios foram coletados e secados em papel. Os micélios secos foram fechados em papel alumínio com a identificação da colônia fúngica, e colocados em nitrogênio líquido. Após realizar esse processo para todos os fungos selecionados, os micélios que estavam fechados em papel alumínio no nitrogênio líquido, foram passados um a um, para um cadinho contendo nitrogênio líquido, e macerados até virar pó.

Esse pó de micélio foi coletado com o auxílio de uma espátula e transferidos para tubos tipo *ependorf* de 2 mL identificados com o nome da amostra que estavam no gelo contendo 400 uL de tampão de extração, que foi preparado nas condições descritas na Tabela 1.

Tabela 1- Preparação do tampão de extração de DNA.

Componente	Para 500 mL de tampão	Concentração
Tris base (PM 121 g/mol)	12,1 g	200 mM
NaCl (PM 58,44)	7,3 g	250 mM
EDTA (estoque 0,5 M)	25 mL	25 mM
SDS (estoque 10 %)	25 mL	0,5%

Em um béquer contendo cerca de 300 mL de água MiliQ foi adicionado o Tris base, e o pH foi ajustado para 8,5 com HCl concentrado, gota a gota. Em seguida, os outros componentes foram adicionados até dissolver, e o menisco na proveta foi ajustado para 500 mL.

Os *ependorfs* contendo o tampão de extração e o micélio foram colocados em agitador de tubos do tipo *vortex* por 30 segundos. Em seguida, foram acrescentados 500 uL de uma mistura de fenol-clorofórmio (1:1) aos *ependorfs*, e foram colocados novamente no vortex por 10 minutos para extrair os ácidos nucleicos. Após os 10 minutos, os *ependorfs* foram centrifugados por 5 minutos a 20800 g e 4°C. A fase aquosa (sobrenadante) foi removida e transferida para outro *ependorf* devidamente identificado com o nome da amostra. Nos novos *ependorfs* contendo a fase aquosa, foram acrescentados 500 uL de clorofórmio para remover

o resíduo de fenol que pode ter restado na preparação, e colocados novamente no vórtex por 30 segundos, e centrifugados a 20800 g por 5 minutos a 4°C.

Em seguida, a fase aquosa foi removida novamente e transferida para outros *eppendorfs* devidamente identificados com o nome da amostra. Foram adicionados 900 uL de isopropanol e homogeneizado, de forma que foi possível observar o DNA precipitando. Os *eppendorfs* foram deixados no ultrafreezer (-80°C) por 30 minutos, e em seguida, foram centrifugados por 5 minutos a 20800 g, sendo possível a observação de um pellet no fundo do *eppendorf*. O sobrenadante (isopropanol) foi descartado, e foram adicionados 500 uL de álcool 70 nos *eppendorfs* contendo os pellets, e foram centrifugados por 2 minutos a 20800 g. O sobrenadante (etanol 70%) foi descartado, e os pellets foram deixados para secar por 30 minutos.

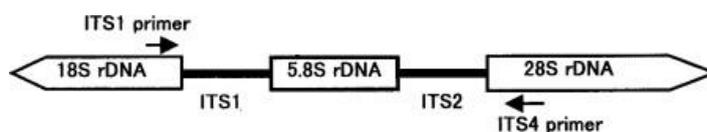
Com os *pellets* secos, foram adicionados 30 uL de água ultrapura deionizada e esterilizada em autoclave, ressuspensando o *pellet* com a ajuda da micropipeta de 50 uL. Para a obtenção do DNA livre de RNA, as amostras foram tratadas com 2 uL de RNase A, que ficou agindo por 30 minutos.

Por fim, os DNAs foram quantificados utilizando o NanoVue, e sua integridade foi analisada utilizando eletroforese em gel de agarose 1 %. Para analisar o tamanho da banda de DNA obtida, foi utilizado o marcador de peso molecular Low Range DNA Ladder (Cellco), e o fotodocumentador (Bio-Rad).

4.5.2 Amplificação da região ITS do rDNA

A amplificação da região de DNA ribossomal ITS-5,8S-ITS2 foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (primers) ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et. al*, 1990) (Figura 8). Os primers utilizados para a reação de PCR são complementares as regiões terminais dos genes 18S e 28S, e próximas aos espaçadores gênicos ITS1 e ITS2, resultando em fragmentos amplificados por PCR que incluíram uma pequena região dos genes 18S e 28S nas extremidades, o espaçador ITS 1, o gene 5,8S completo, e o espaçador ITS2.

Figura 8 - Representação da região de DNA ribossomal ITS-5,8S-ITS2. Fonte: modificado FUJITA *et al* (2001).



A amplificação foi realizada usando a técnica da *Polymerase Chain Reaction* (PCR) no termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler) programado para realizar uma desnaturação inicial a 98°C por 30 segundos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 98°C por 10 segundos, anelamento a 60°C por 15 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto, e extensão final de 72°C por 5 minutos. A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 50 uL contendo 1uL do primer ITS1, 1 uL do primer ITS4, 0,5 uL de dNTPs, 10 uL de 5X Phusion HF Buffer (Thermo Scientific), 0,5 uL de enzima phusion, 36,5 uL de água Mili-Q autoclavada, e 0,5 uL de DNAg.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram analisados utilizando eletroforese em gel de agarose 1%, e o marcador de peso molecular Low Range DNA Ladder (Cellco), com o auxílio do fotodocumentador (Bio-Rad).

4.5.3 Purificação do DNA amplificado e sequenciamento, edição e análise de comparação de sequências no NCBI.

Os fragmentos amplificados na PCR (600-750 pb) foram purificados utilizando o Kit de purificação Agarose Gel Extraction Kit (Cellco), conforme as especificações do fabricante. Em seguida, as amostras foram quantificadas no NanoVue, e analisadas por meio da eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a resolução do produto purificado. Por fim, as amostras foram encaminhadas para sequenciamento no Laboratório Multiusuário de Sequenciamento em Larga Escala e Expressão Gênica da UNESP de Jaboticabal, SP.

As sequências obtidas pelo sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 foram comparadas com as sequências depositadas com a utilização da ferramenta BLASTn no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

5 RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Paspalum atratum* E *Paspalum notatum*

A partir do isolamento dos fungos endofíticos por fragmentação de folhas e raízes de *Paspalum atratum* foram obtidos 225 isolados, sendo eles 161 isolados de raíz e 64 isolados de folha.

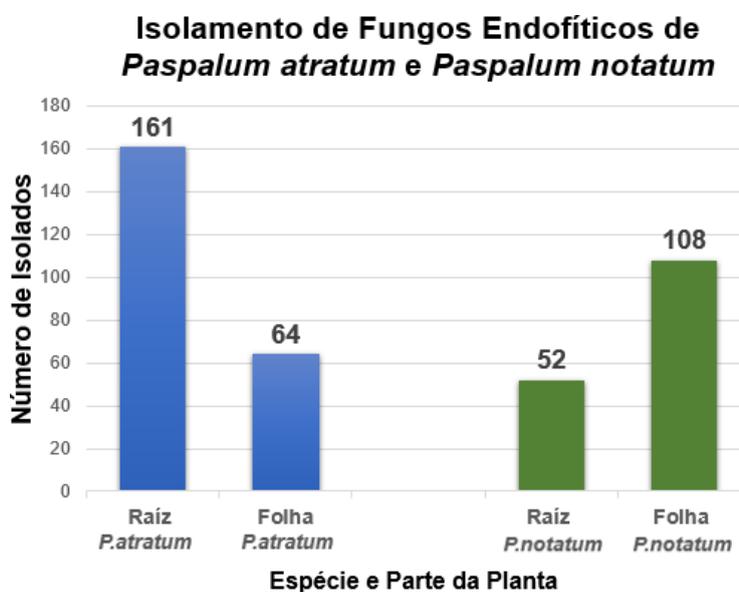
Já do isolamento dos fungos endofíticos de folhas e raízes de *P. notatum* foram obtidos 160 isolados, sendo 52 fungos isolados de raíz e 108 isolados de folha. Na Figura 9 é apresentado o fenótipo de alguns dos isolados fúngicos purificados.

Figura 9- Exemplares de fungos endofíticos purificados de *Paspalum atratum* e *Paspalum notatum* do BAG da Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos (SP). Fonte: Registrado pelo autor.



As raízes de *P. atratum* apresentaram maior abundância de fungos endofíticos quando em comparação com suas folhas. Por outro lado, as folhas de *P. notatum* apresentaram maior abundância de fungos endofíticos quando em comparação as suas raízes (Figura 10).

Figura 10 - Representação gráfica da quantidade de isolados fúngicos endofíticos em relação ao tecido de origem e a espécie de *Paspalum* sp.. Fonte: Elaborado pelo autor.



5.2 EXPERIMENTOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL E CONTROLE BIOLÓGICO *IN VITRO*

5.2.1 Solubilização de Fosfato Inorgânico (SFI)

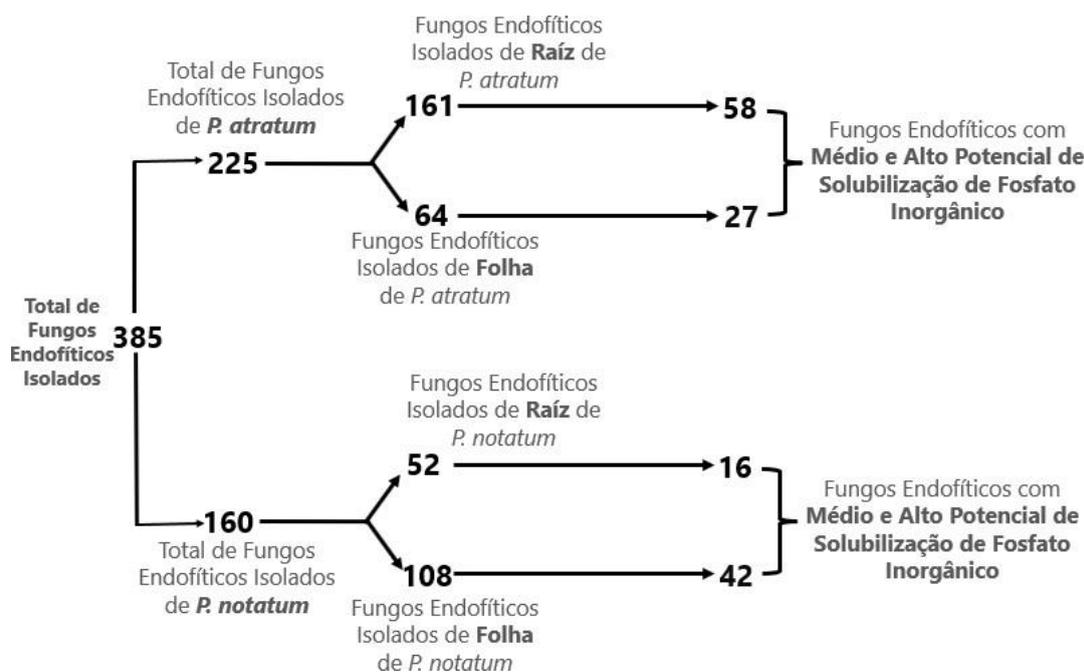
Do total de 385 isolados fúngicos que foram avaliados em relação à capacidade de solubilização de fosfato inorgânico, 213 apresentaram resultados positivos indicados pela presença de halo em volta da colônia fúngica. Destes 213 isolados que apresentaram resultados positivos para solubilização de fosfato, 143 apresentaram médio ou alto potencial de solubilização de fosfato, levando em consideração os parâmetros de seleção adotados: Fungos que apresentaram e mantiveram halo médio em relação ao micélio e fungos que apresentaram halo grande em relação ao micélio em até 72h. Na Figura 11, podemos observar o surgimento dos halos em alguns dos isolados fúngicos. (Em verde: halo de solubilização grande em relação ao micélio. Em amarelo: halo de solubilização médio em relação ao micélio. Em vermelho: halo de solubilização pequeno em relação ao micélio).

Figura 11- Avaliação *in vitro* da atividade de solubilização de fosfato insolúvel por fungos endofíticos. Fonte: Registrado pelo autor.



O esquema abaixo representa a quantidade de fungos com médio ou alto potencial de solubilização de fosfato de acordo com seu local de isolamento referente à espécie e ao tecido vegetal de origem (Figura 12).

Figura 12- Representação esquemática da seleção dos fungos endofíticos mediante o potencial de solubilização de fosfato inorgânico e sua origem vegetal de *Paspalum atratum* e *Paspalum notatum*. Fonte: Elaborado pelo autor.



5.2.2 Atividade Antagonista aos gêneros *Bipolaris* sp. e *Colletotrichum* sp.

Para a verificação da atividade antagonista aos fungos fitopatogênicos dos gêneros *Bipolaris* sp. e *Colletotrichum* sp., foram realizados dois testes. Preliminarmente o teste contendo 4 discos de fungos distintos com os discos dos fitopatógenos *Bipolaris* sp e

Colletotrichum sp ao centro (Figura 13)(Figura 14) e, e em seguida, o teste de contato direto, com o disco do fitopatógeno em uma extremidade e o disco do endófito na outra extremidade (Figura 15)(Figura 16). Os discos de fungos são resultantes do cultivo prévio em meio sólido BDA a 28°C.

O teste preliminar em triplicata com os 365 fungos endofíticos mostrou que os isolados apresentaram atividade antagonista, mas não foi possível chegar a conclusões quantitativas.

Figura 13- Triagem de antagonismo *in vitro* de fungos endofíticos em relação ao fungo *Bipolaris* sp.. A seta em vermelho indica a inibição do crescimento do fitopatógeno. Fonte: Registrado pelo autor.



Figura 14- Triagem de antagonismo *in vitro* de fungos endofíticos em relação ao fungo *Colletotrichum* sp.. A seta em vermelho indica a inibição do crescimento do fitopatógeno. Fonte: Registrado pelo autor.

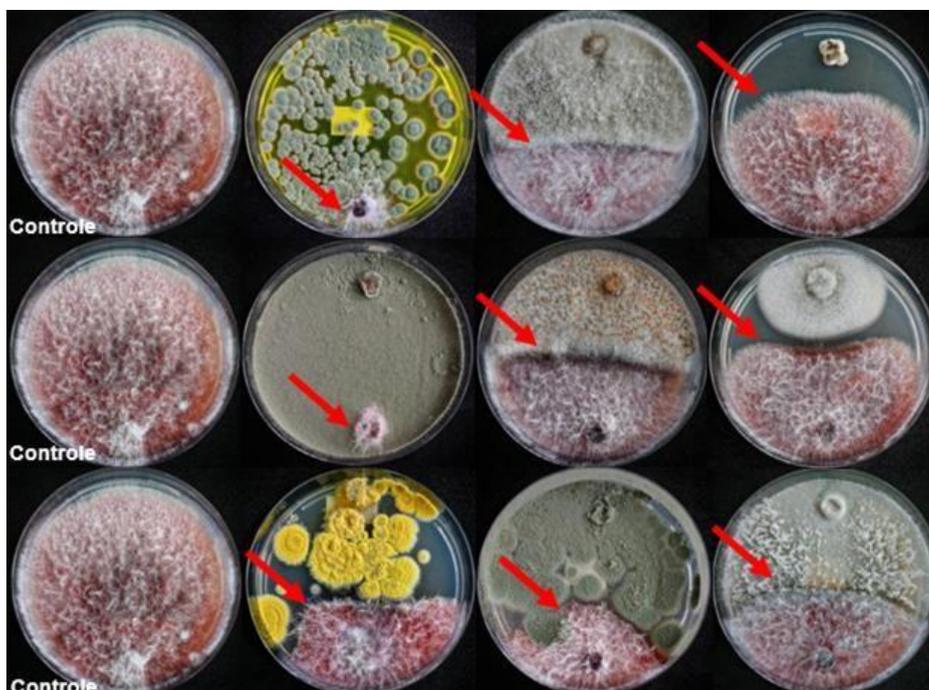


Com isso, foram realizados testes de antagonismo com os 143 fungos endofíticos selecionados pelo critério de médio e alto potencial de solubilização de fosfato inorgânico. A metodologia de pareamento direto *in vitro* foi utilizada em duplicata para verificação da atividade antagonista ao fungo do gênero *Bipolaris* sp., e, também em duplicata para verificação da atividade antagonista ao fungo do gênero *Colletotrichum* sp. Na Figura 15, as setas em amarelo mostram a inibição do fungo fitopatogênico *Bipolaris* sp., e na Figura 16, as setas em vermelho apontam a inibição do fungo fitopatogênico *Colletotrichum* sp.

Figura 15- Ensaio de antagonismo *in vitro* de fungos endofíticos em relação ao fitopatógeno *Bipolaris* sp.. As setas em amarelo indicam a inibição do crescimento do fitopatógeno. Fonte: Registrado pelo autor.



Figura 16 - Ensaio de antagonismo *in vitro* de fungos endofíticos em relação ao fitopatógeno *Colletotrichum* sp.. As setas em vermelho indicam a inibição do crescimento do fitopatógeno. Fonte: Registrado pelo autor.



Com o ensaio de pareamento direto *in vitro* foi possível determinar as porcentagens de inibição seguindo a metodologia de Quiroga e colaboradores (2001). Dos endófitos de *P.*

atratum, as maiores porcentagens de inibição para o gênero *Colletotrichum* sp. e *Bipolaris* sp., respectivamente, foram de 58,82 % e 70,59 %. Dos endófitos de *P. notatum*, as maiores porcentagens de inibição para o gênero *Colletotrichum* sp. e *Bipolaris* sp., respectivamente, foram de 85,88 % e 88,23 %.

Para os isolados fúngicos de *P. atratum*, a Tabela 2 demonstra as melhores porcentagens de inibição obtidas para os gêneros de fitopatógenos selecionados para o atual estudo.

Tabela 2- Resultados dos ensaios de antagonismo *in vitro* entre os fungos fitopatogênicos e os fungos endofíticos de *Paspalum atratum*.

Identificação do Isolado	Tecido Vegetal do Isolamento	% Inibição do gênero <i>Colletotrichum</i> sp.	% Inibição do gênero <i>Bipolaris</i> sp.
PA folha 10-6	Folha	47,05%	70,59%
PA raíz 4-18	Raíz	56,47%	62,35%
PA raíz 4 - 2	Raíz	51,76%	60,00%
PA raíz 6-20	Raíz	56,47%	60,00%
PA raíz 5-1	Raíz	58,82%	58,82%
PA raíz 8-13	Raíz	58,82%	54,11%
PA raíz 7-2	Raíz	54,11%	58,82%
PA folha 4-4	Folha	54,11%	58,82%
PA raíz 4-17	Raíz	51,76%	58,82%
PA raíz 4-5	Raíz	55,29%	58,82%
PA raíz 8-1	Raíz	44,70%	58,82%
PA raíz 6-2	Raíz	57,64%	55,29%
PA raíz 3-8	Raíz	54,11%	57,64%
PA raíz 3-7	Raíz	57,64%	52,94%
PA raíz 6-15	Raíz	57,64%	52,94%
PA folha 2-7	Raíz	52,95%	57,64%
PA raíz 4-7	Raíz	57,64%	52,94%
PA raíz 4-11	Raíz	50,58%	57,64%
PA raíz 1-12	Raíz	55,29%	52,95%

Para os isolados fúngicos de *Paspalum notatum*, a Tabela 3 demonstra as melhores porcentagens de inibição obtidas para os gêneros de fitopatógenos selecionados para o atual estudo.

Tabela 3- Resultados dos ensaios de antagonismo *in vitro* entre os fungos fitopatogênicos e os fungos endofíticos de *Paspalum notatum*.

Identificação do Isolado	Tecido Vegetal do Isolamento	% de Inibição do gênero <i>Colletotrichum</i> sp.	% de Inibição do gênero <i>Bipolaris</i> sp.
PN folha 9-7	Folha	64,70%	88,23%
PN folha 4-21	Folha	85,88%	80,00%
PN folha 4-18	Folha	61,17%	83,52%
PN raíz 6-6	Raíz	82,35%	56,47%
PN raíz 3-1	Raíz	76,47%	58,82%
PN folha 4-2	Folha	55,29%	65,88%
PN folha 4-6	Folha	56,47%	64,70%
PN folha 4-17	Folha	54,11%	64,70%
PN raíz 6-2	Raíz	52,94%	61,17%
PN raíz 4-7	Raíz	51,76%	61,17%
PN folha 6-3	Folha	52,94%	61,17%
PN raíz 6-11	Raíz	50,58%	61,17%
PN raíz 9-1	Raíz	55,29%	60,00%
PN raíz 6-5	Raíz	58,82%	57,64%
PN folha 4-5	Folha	57,64%	58,82%
PN raíz 6-3	Raíz	51,76%	58,82%
PN folha 7-9	Folha	55,29%	51,76%
PN folha 4-13	Folha	55,29%	42,35%
PN folha 4-10	Folha	47,05%	54,11%

Após a seleção dos fungos com as melhores atividades antagonistas aos fungos fitopatogênicos e levando em consideração que os mesmos também apresentam os melhores potenciais de solubilização de fosfato inorgânico por terem apresentado halo médio e halo grande em relação ao micélio em até 72h, esses endófitos foram selecionados para identificação taxonômica.

5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Foram selecionados 38 fungos endofíticos de acordo com os resultados de solubilização de fosfato inorgânico e os testes de antagonismo. Os DNAs dos fungos com os melhores potenciais foram extraídos e a PCR da região ITS-5,8-ITS do rDNA foi realizada para posterior sequenciamento, como é possível observar nos géis de agarose 1% com as bandas amplificadas e purificadas, em que a identificação dos isolados está em branco e os padrões de peso molecular estão indicados em vermelho (Figura 17)(Figura 18).

Figura 17- Gel de 1% de agarose para confirmação da amplificação dos fragmentos da região de DNA ribossomal ITS-5,8S-ITS2 dos endófitos de *Paspalum atratum*. Fonte: Registrado pelo autor.

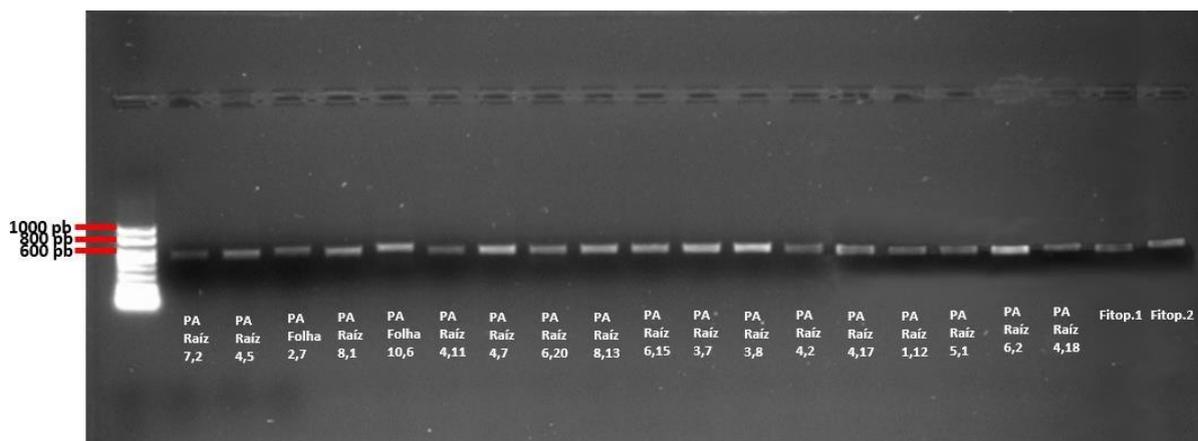
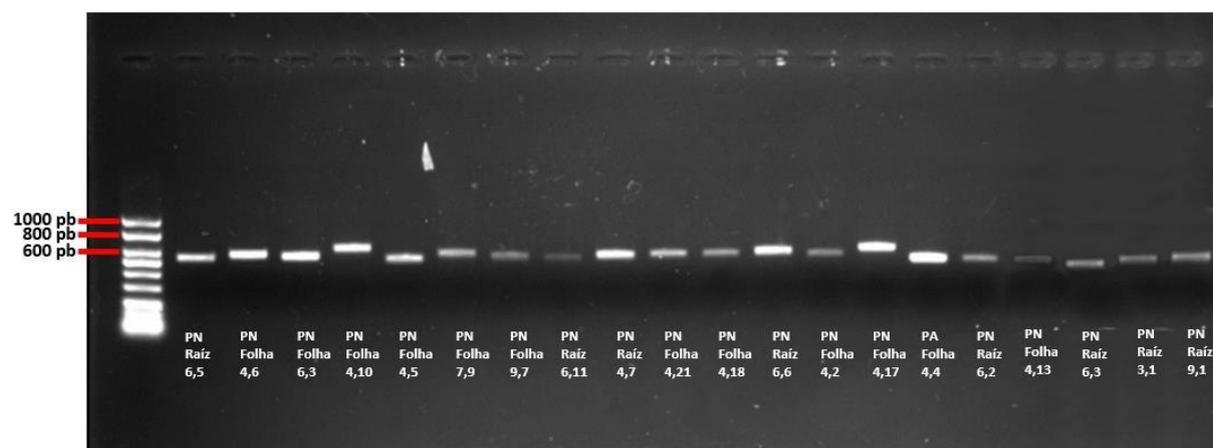


Figura 18- Gel de 1% de agarose para confirmação da amplificação dos fragmentos da região de DNA ribossomal ITS-5,8S-ITS2 dos endófitos de *Paspalum notatum*. Fonte: Registrado pelo autor.



As sequências obtidas pelo sequenciamento da região ITS1-5,8S-IT2 foram comparadas com as sequências depositadas com a utilização da ferramenta BLASTn no banco de dados do NCBI. Os gêneros e a porcentagem de identidade das sequências estão descritas na Tabela 4 para *P. atratum* e na Tabela 5 para *P. notatum*.

Tabela 4- Identificação taxonômica dos isolados de *Paspalum atratum*. *NI = Não identificado.

Código no Gel	Identificação	Similaridade com as sequências depositadas no NCBI
PA folha 10-6	NI*	-
PA raíz 4-18	<i>Microdochium</i> sp.	99,05%
PA raíz 4 - 2	NI*	-
PA raíz 6-20	<i>Colletotrichum</i> sp.	99,61%
PA raíz 5-1	NI*	-
PA raíz 8-13	<i>Aspergillus</i> sp.	97,52%
PA raíz 7-2	<i>Penicillium</i> sp.	99,15%
PA folha 4-4	<i>Aspergillus</i> sp.	99,64%
PA raíz 4-17	<i>Fusarium</i> sp.	99,21%
PA raíz 4-5	NI*	-
PA raíz 8-1	<i>Phoma</i> sp.	99,79%
PA raíz 6-2	<i>Fusarium</i> sp.	99,21%
PA raíz 3-8	<i>Fusarium</i> sp.	97,79%
PA raíz 3-7	NI*	-

PA raíz 6-15	<i>Fusarium</i> sp.	97,74%
PA folha 2-7	<i>Neosartorya</i> sp.	97,25%
PA raíz 4-7	<i>Fusarium</i> sp.	100,00%
PA raíz 4-11	NI*	-
PA raíz 1-12	<i>Fusarium</i> sp.	98,58%

Tabela 5- Identificação taxonômica dos isolados de *Paspalum notatum*. *NI = Não identificado.

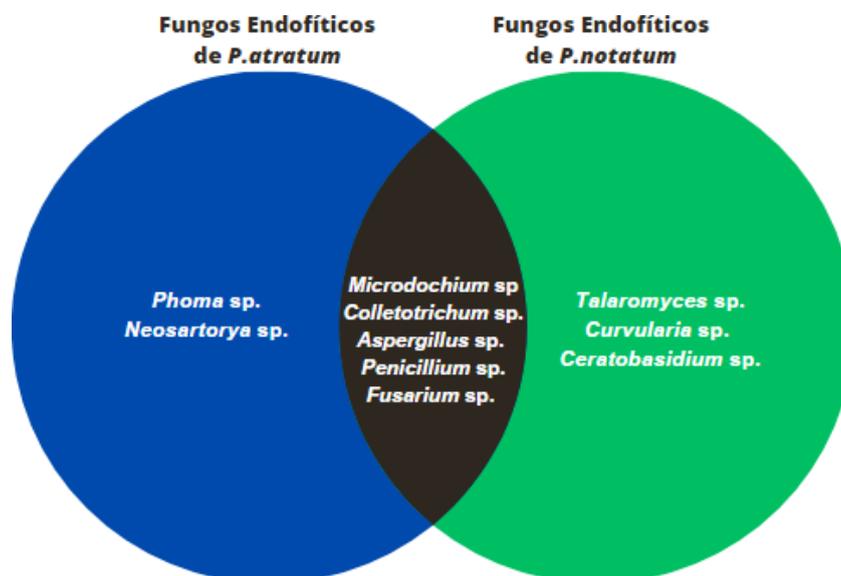
Código no Gel	Identificação	Similaridade com as sequências depositadas no NCBI
PN folha 9-7	<i>Penicillium</i> sp.	98,71%
PN folha 4-21	<i>Talaromyces</i> sp.	97,85%
PN folha 4-18	NI*	-
PN raíz 6-6	<i>Aspergillus</i> sp.	100%
PN raíz 3-1	NI*	-
PN folha 4-2	<i>Colletotrichum</i> sp.	90,71%
PN folha 4-6	<i>Colletotrichum</i> sp.	99,63%
PN folha 4-17	<i>Ceratobasidium</i> sp.	97,04%
PN raíz 6-2	<i>Ceratobasidium</i> sp.	97,18%
PN raíz 4-7	<i>Curvularia</i> sp.	100%
PN folha 6-3	<i>Microdochium</i> sp.	99,41%
PN raíz 6-11	<i>Fusarium</i> sp.	99,80%
PN raíz 9-1	NI*	-
PN raíz 6-5	<i>Fusarium</i> sp.	99,81%
PN folha 4-5	NI*	-
PN raíz 6-3	<i>Curvularia</i> sp.	99,63%
PN folha 7-9	<i>Ceratobasidium</i> sp.	96,13%
PN folha 4-13	<i>Ceratobasidium</i> sp.	95,81%
PN folha 4-10	<i>Ceratobasidium</i> sp.	97,18%

Por meio do sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal, foi possível identificar os gêneros dos isolados fúngicos de *P. atratum* (7 gêneros) e *P. notatum* (8 gêneros). Do *P. atratum*, foram encontrados os gêneros *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium*

sp., *Microdochium* sp., *Neosartorya* sp., *Penicillium* sp. e *Phoma* sp. Do *P. notatum* foram encontrados os gêneros *Aspergillus* sp., *Ceratobasidium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Microdochium* sp., *Penicillium* sp. e *Talaromyces* sp.

Os fungos endofíticos encontrados no presente trabalho que são comuns as duas espécies de *Paspalum* são dos gêneros: *Microdochium* sp., *Colletotrichum* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp (Figura 19).

Figura 19- Diagrama de Venn agrupando os gêneros de fungos endofíticos em comum ao *P. atratum* e ao *P. notatum*. Fonte: Elaborado pelo autor.



5.4 GÊNEROS FÚNGICOS COM AS MELHORES ATIVIDADES ANTAGONISTAS FRENTE AO *BIPOLARIS* SP E AO *COLLETOTRICHUM* SP.

Os fungos selecionados com as melhores atividades antagonistas frente aos fitopatógenos *Bipolaris* sp. e *Colletotrichum* sp. foram identificados por meio do sequenciamento da região ITS, e os gêneros encontrados estão descritos na tabela Tabela 6 para os isolados de *P. atratum*, e na tabela Tabela 7 para os isolados de *P. notatum*.

Tabela 6- Porcentagem de inibição dos isolados fúngicos endofíticos de *P. atratum* referente aos fitopatógenos *Colletotrichum* sp. e *Bipolaris* sp.*NI = Não identificado.

Identificação do Isolado	Gênero Fúngico	% de Inibição do gênero <i>Colletotrichum</i> sp.	% de Inibição do gênero <i>Bipolaris</i> sp.
PA folha 10-6	NI	47,05%	70,59%
PA raíz 4-18	<i>Microdochium</i> sp.	56,47%	62,35%
PA raíz 4 - 2	NI	51,76%	60,00%
PA raíz 6-20	<i>Colletotrichum</i> sp.	56,47%	60,00%
PA raíz 5-1	NI	58,82%	58,82%
PA raíz 8-13	<i>Aspergillus</i> sp.	58,82%	54,11%
PA raíz 7-2	<i>Penicillium</i> sp.	54,11%	58,82%
PA folha 4-4	<i>Aspergillus</i> sp.	54,11%	58,82%
PA raíz 4-17	<i>Fusarium</i> sp.	51,76%	58,82%
PA raíz 4-5	NI	55,29%	58,82%
PA raíz 8-1	<i>Phoma</i> sp.	44,70%	58,82%
PA raíz 6-2	<i>Fusarium</i> sp.	57,64%	55,29%
PA raíz 3-8	<i>Fusarium</i> sp.	54,11%	57,64%
PA raíz 3-7	NI	57,64%	52,94%
PA raíz 6-15	<i>Fusarium</i> sp.	57,64%	52,94%
PA folha 2-7	<i>Neosartorya</i> sp.	52,95%	57,64%
PA raíz 4-7	<i>Fusarium</i> sp.	57,64%	52,94%
PA raíz 4-11	NI	50,58%	57,64%
PA raíz 1-12	<i>Fusarium</i> sp.	55,29%	52,95%

Tabela 7- Porcentagem de inibição dos isolados fúngicos endofíticos de *P. notatum* referente aos fitopatógenos *Colletotrichum* sp. e *Bipolaris* sp.*NI = Não identificado.

Identificação do Isolado	Gênero Fúngico	% de Inibição do gênero <i>Colletotrichum</i> sp.	% de Inibição do gênero <i>Bipolaris</i> sp.
PN folha 9-7	<i>Penicillium</i> sp.	64,70%	88,23%
PN folha 4-21	<i>Talaromyces</i> sp.	85,88%	80,00%
PN folha 4-18	NI	61,17%	83,52%
PN raíz 6-6	<i>Aspergillus</i> sp.	82,35%	56,47%

PN raíz 3-1	NI	76,47%	58,82%
PN folha 4-2	<i>Colletotrichum sp.</i>	55,29%	65,88%
PN folha 4-6	<i>Colletotrichum sp.</i>	56,47%	64,70%
PN folha 4-17	<i>Ceratobasidium sp.</i>	54,11%	64,70%
PN raíz 6-2	<i>Ceratobasidium sp.</i>	52,94%	61,17%
PN raíz 4-7	<i>Curvularia sp.</i>	51,76%	61,17%
PN folha 6-3	<i>Microdochium sp.</i>	52,94%	61,17%
PN raíz 6-11	<i>Fusarium sp.</i>	50,58%	61,17%
PN raíz 9-1	NI	55,29%	60,00%
PN raíz 6-5	<i>Fusarium sp.</i>	58,82%	57,64%
PN folha 4-5	NI	57,64%	58,82%
PN raíz 6-3	<i>Curvularia sp.</i>	51,76%	58,82%
PN folha 7-9	<i>Ceratobasidium sp.</i>	55,29%	51,76%
PN folha 4-13	<i>Ceratobasidium sp.</i>	55,29%	42,35%
PN folha 4-10	<i>Ceratobasidium sp.</i>	47,05%	54,11%

6 DISCUSSÃO

No trabalho desenvolvido na Argentina por Depetris e colaboradores (2020), amostras foram coletadas de duas pastagens expostas ao pastoreio intensivo representando sistemas típicos de produção de bovinos de corte da América do Sul, em que foram coletadas 60 amostras de *Paspalum dilatatum* e 60 amostras de *P. notatum*, de ramos e folhas, para isolamento e caracterização de fungos endofíticos. Foram encontrados 6 gêneros em *P. dilatatum* (*Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Cladosporium* sp. e *Fusarium* sp.) e 2 gêneros em *P. notatum* (*Aspergillus* sp. e *Bipolaris* sp.). Depetris *et al.* (2022) realizaram uma nova coleta em pastagens expostas ao pastoreio de 84 amostras de *P. notatum*, em que foram isolados 44 endófitos de 7 gêneros distintos (*Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Bipolaris* sp., *Cercospora* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., e *Curvularia* sp.). Assim como encontrado por Depetris *et al.* (2020), o atual projeto isolou os gêneros *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp., e na nova coleta de Depetris *et al.* (2022) houve o isolamento dos gêneros *Penicillium* sp., e *Curvularia* sp., assim como encontrados no presente trabalho.

Sikes *et al.* (2017) também realizaram um isolamento de fungos endofíticos de raízes de *P. Notatum* coletados na Estação Biológica de Archbold, nos EUA, identificando 4 gêneros distintos: *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Curvularia* sp. e *Helotiales* sp., de forma que isolaram os gêneros *Curvularia* sp e *Fusarium* sp., como o atual projeto. Não existem relatos na literatura sobre isolados fúngicos endofíticos de *P. atratum*.

Embora o atual projeto tenha identificado isolados fúngicos endofíticos dos mesmos gêneros que encontrados em outros trabalhos, foi possível identificar outros gêneros não antes descritos para *Paspalum*, sendo *Ceratobasidium* sp., *Colletotrichum* sp., *Microdochium* sp., *Neosartorya* sp., *Phoma* sp. e *Talaromyces* sp. O local de isolamento realizado no atual projeto foi do BAG de *Paspalum*, e os locais dos demais projetos foram de pastagens expostas e de áreas de preservação e estudo, de forma que pode haver uma correlação com as espécies diferentemente encontradas.

Neste sentido, foi realizado uma revisão bibliográfica para verificar se já houve a descrição destes gêneros de endófitos, não descritos anteriormente para o gênero *Paspalum* sp., mas descritos para outras plantas hospedeiras.

O fungo do gênero *Microdochium* sp. foi descrito como endófito de raiz de cevada (*Hordeum vulgare*) no trabalho de Shadmani *et al.* (2021), e, também como endófito de raiz de trigo por Rothen *et al.* (2018), ambos da mesma família que o *Paspalum* sp. (Poaceae).

O fungo do gênero *Phoma* sp. foi descrito por Garcia *et al.* (2012) como endófito de folha de *Sapindus saponaria*, uma planta conhecida pelas suas atividades medicinais, e, também por Da Costa Silveira *et al.* (2020) como endófito de *Bambusa oldhammi*, uma espécie de bambu.

O gênero *Neosartorya* sp. foi isolado por Sikes *et al.* (2017) de *Aristida gyrans*, uma gramínea natural dos Estados Unidos da América pertencente família Poaceae, e, também no trabalho de Yodsing *et al.* (2018) como endófito de *Casearia growiifolia*, uma planta utilizada para fins medicinais. Assim como estes autores, Bang *et al.* (2019) encontraram o gênero *Neosartorya* sp. como endófito de raiz de *Glehnia littoralis*, uma erva perene.

O fungo do gênero *Colletotrichum* sp. foi identificado por Azuddin *et al.* (2023) como endófito de raiz de *Azopopus compressus*, uma espécie de gramínea da família Poaceae, e, também por Ferreira *et al.* (2020) como endófito de raiz, caule e folha de *Carapichea ipecacuanha*, conhecida como raiz-do-Brasil.

Radisatuti *et al.* (2019) realizaram o isolamento de fungos endofíticos de raiz e caule de *Centella asiatica*, uma planta medicinal, obtendo 20 isolados do gênero *Ceratobasidium* sp. de ambos os tecidos vegetais. Du *et al.* (2020) isolaram fungos endofíticos de raiz, caule e folha de *Securinega suffruticosa*, um arbusto de folhas caducas também utilizado como planta medicinal, obtendo 420 isolados, sendo que 38 pertenciam ao gênero *Ceratobasidium* sp..

Park *et al.* (2021), realizaram um estudo a respeito dos fungos endofíticos da vegetação nativa de dunas, que são compostas majoritariamente por gramíneas e plantas rasteiras. Nesse estudo, o isolamento foi realizado de raízes, e foram encontrados 361 endófitos. Com a identificação molecular, o gênero dominante foi *Penicillium* sp. (43,21%) seguido por *Talaromyces* sp. (16,90%) e *Aspergillus* sp. (11,91%).

Neste cenário, o atual estudo pode ser considerado o primeiro a descrever fungos endofíticos de *P. atratum*, assim como ser o primeiro projeto a relatar os gêneros *Ceratobasidium* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Microdochium* sp., *Neosartorya* sp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp. e *Talaromyces* sp. como endófitos do gênero *Paspalum*.

Relembrando que os 38 isolados fúngicos de *P. atratum* e *P. notatum* foram selecionados de acordo com sua performance de solubilização de fosfato *in vitro* e antagonismo aos fitopatógenos *Colletotrichum* sp. e *Bipolaris* sp., a discussão será relacionada à esses parâmetros.

A importância de se obter isolados com potencial de solubilização de fosfato está relacionada com a contribuição desses microrganismos para a manutenção das espécies vegetais e, também na agricultura. No atual estudo, os gêneros identificados, tanto em *P. atratum* quanto em *P. notatum* apresentaram halo médio em relação ao micélio e halo grande em relação ao micélio no teste de solubilização de fosfato *in vitro*, os quais foram considerados com os melhores potenciais.

Não foi possível encontrar trabalhos que abordavam a solubilização de fosfato por fungos endofíticos isolados das espécies de *P. atratum* e *P. notatum*, mas outros pesquisadores estudaram endófitos desses mesmos gêneros fúngicos oriundos de outras espécies vegetais quanto à capacidade de solubilização de fosfato.

Rothen *et al.* (2018) em seu estudo a respeito de fungos endofíticos de raiz de trigo, isolaram o gênero *Microdochium* sp. e realizaram análises a respeito de seu potencial de solubilização de fosfato. Os resultados mostraram que os isolados endofíticos não possuíam capacidade de solubilização de fosfato pelo não aparecimento do halo translúcido. Entretanto, no presente estudo, foi possível verificar que o isolado fúngico do mesmo gênero isolados de *P. atratum* e *P. notatum* apresentaram atividades contrárias à atividade encontrada por Rothen *et al.* (2018).

Da Costa Silveira *et al.* (2020) estudaram o potencial dos endófitos do gênero *Phoma* sp. de *Bambusa oldhammi* para solubilização de fosfato *in vitro*. Neste estudo, dois isolados de *Phoma* sp. foram testados em relação a solubilização de fosfato, sendo que um apresentou resultado positivo e outro apresentou resultado negativo, indicando que o mesmo gênero pode possuir características distintas quanto a solubilização de fosfato. No atual trabalho, o gênero *Phoma* sp., isolado de *P. atratum*, apresentou um alto potencial de solubilização de fosfato inorgânico, resultado que se assemelha a um dos isolados fúngicos descritos por Da Costa Silveira *et al.* (2020).

O potencial de solubilização de fosfato pelo fungo endofítico do gênero *Colletotrichum* sp. foi estudado por Oliveira *et al.* (2020). Neste estudo, foram analisados o potencial de solubilização de fosfato de 17 isolados de *Justicia brandegeana* (popularmente conhecida como flor-camarão), um arbusto perene, e *Serjania laruotteana*, uma trepadeira. Os resultados determinaram que 9 desses isolados possuíam grande potencial de solubilização de fosfato *in vitro*, sendo 8 isolados de *S. Laruotteana* e 1 isolado de *J. brandegeana*. O presente estudo determinou que os isolados do gênero *Colletotrichum* sp., encontrado em *P. atratum* e *P. notatum*, possuem potencial de solubilização de fosfato inorgânico, de acordo com 52,94 % do resultado obtido por Oliveira *et al.* (2020).

Não foi possível encontrar na literatura disponível nada a respeito do potencial de solubilização de fosfato pelo endófito do gênero *Neosartorya* sp., mas os resultados obtidos no atual estudo demonstraram potencial de solubilização de fosfato inorgânico *in vitro*. Também não foi possível localizar na literatura a atividade de solubilização de fosfato pelo fungo endofítico do gênero *Ceratobasidium* sp., mas no presente estudo foi possível determinar que os isolados fúngicos do gênero *Ceratobasidium* sp. apresentaram potencial positivo para a solubilização de fosfato também.

Priyadharsini *et al.* (2017) descreveram a capacidade do fungo endofítico de *Parthenium hysterophorus* (coentro do mato) do gênero *Curvularia* sp. de solubilizar fosfato *in vitro* e *in vivo* em *Cajanus cajan* (feijão guandu). Os resultados mostraram que o isolado possui capacidade de solubilizar diferentes fontes de fósforo, assim como proporcionaram um maior crescimento do feijão guandu em relação ao controle sem inoculação desse fungo. Os resultados encontrados no atual projeto descrevem o gênero *Curvularia* sp. isolado de *P. notatum* como bom solubilizador de fosfato inorgânico, o que corrobora com os resultados obtidos por Priyadharsini *et al.* (2017).

Adhikari *et al.* (2018) estudaram o potencial de solubilização de fosfato por fungos endofíticos de raízes de *Taxux wallichiana* (teixo do Himalaia); com o isolamento foram obtidos os gêneros *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. e os resultados de solubilização de fosfato demonstraram que dois dos isolados de um total de 5, sendo um de *Penicillium* sp. e um de *Aspergillus* sp., possuíam grande potencial solubilização de fosfato. Noorjahan *et al.* (2019) analisaram o potencial de solubilização de 18 isolados fúngicos de 3 classes de algas marinhas; os resultados mostraram que 7 dos 18 isolados fúngicos apresentavam grande potencial de solubilização de fosfato, sendo fungos endofíticos dos gêneros *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp. O presente estudo determinou que, assim como nos resultados encontrados por Adhikari *et al.* (2018) e Noorjahan *et al.* (2019), os endófitos dos gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. possuem um alto potencial de solubilização de fosfato.

Nath *et al.* (2015) isolaram fungos endofíticos de *Camellia sinensis*, popularmente conhecida como chá-da-índia, e estudaram o potencial de promoção de crescimento vegetal. Os endófitos foram isolados de raíz, caule e folhas, e dos 8 isolados obtidos, 5 eram do gênero *Penicillium* sp., 2 do gênero *Aspegillus* sp., 1 do gênero *Fusarium* sp.. A maior atividade de solubilização de fosfato foi do gênero *Penicillium* sp., seguido do gênero *Aspegillus* sp., de forma que o resultado para o gênero *Fusarium* sp. foi de baixa atividade em comparação aos demais. Shi *et al.* (2016) estudaram o potencial de solubilização de fosfato pelos fungos endofíticos. isolados de raíz de *Brassica napus*, conhecida popularmente como colza. Os

isolados foram caracterizados como do gênero *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Mucor* sp. e *Penicillium* sp.. Os resultados mostraram que o isolado do gênero *Penicillium* sp. possui 3 vezes mais capacidade de solubilização de fosfato do que o gênero *Fusarium* sp.. Portanto, os dois trabalhos concluíram que o *Fusarium* sp. possui menor potencial de solubilização de fosfato *in vitro* do que o *Aspegillus* sp. e o *Penicillium* sp..

No presente projeto, os isolados do gênero *Fusarium* sp. foram comparados em relação ao tamanho do halo dos fungos do gênero *Aspegillus* sp. e *Penicillium* sp.. Como esses isolados apresentaram similaridade no teste qualitativo de solubilização de fosfato *in vitro*, não se pode afirmar qual deles possui o maior potencial de solubilização de fosfato sem a adição de ensaios quantitativos.

Sahu *et al.* (2018) estudaram os endófitos de *Withania somnifera*, uma planta medicinal, quanto as capacidades de promoção de crescimento. Dentre os 22 isolados, os gêneros encontrados foram *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Talaromyces* sp. e *Nigrospora* sp.. O isolado do gênero *Talaromyces* sp. foi o melhor solubilizador de fosfato *in vitro* encontrado, seguido pelo gênero *Alternaria* sp.. Abdala e colaboradores (2020) realizaram um estudo acerca dos fungos endofíticos de plantas medicinais e seus potenciais de solubilização de fosfato. O isolamento foi realizado de raízes, caules e folhas. Dos 11 isolados obtidos, 6 isolados foram identificados como do gênero *Talaromyces* sp., sendo obtidos dos três tecidos vegetais estudados. Um deles isolado de raíz de *C. orbiculata*, 1 de folha de *M. comosus*, 1 de caule de *C. orbiculata* e 2 de folha de *P. zombamontana*. O teste de solubilização de fosfato *in vitro* foi realizado com 3 isolados de *Talaromyces* sp., sendo que um deles apresentou alto potencial de solubilização de fosfato (caule de *C. orbiculata*), médio potencial de solubilização de fosfato (folha de *P. zombamontana*) e potencial nulo de solubilização de fosfato (folha de *M. comosus*). No presente estudo, o endófito do gênero *Talaromyces* sp. que apresentou alto potencial de solubilização de fosfato inorgânico *in vitro* foi isolado de folha de *P. notatum*. No estudo de Sahu *et al.* (2018) não foi reportado o tecido de isolamento desse gênero, mas Abdala *et al.* (2020) reportou que o isolado de folha não apresentou capacidade de solubilização, apenas os isolados de caule e raíz, diferentemente do que encontrado no atual trabalho. Além disso, Sahu *et al.* (2018) realizou um teste quantitativo comparativo entre os gêneros fúngicos quanto a capacidade de solubilização de fosfato *in vitro*. Com os resultados do atual projeto, não foi possível realizar um comparativo sem realizar um teste que quantifique esse potencial.

Dentro deste contexto, selecionar gêneros com o potencial de solubilização de fosfato pode ser de grande importância para o desenvolvimento de insumos de origem microbiana,

visando uma alternativa para fornecimento de fósforo na agricultura, elemento tão essencial para o desenvolvimento vegetal (Lacava, Machado, Andrade, 2021; Bogas *et al.*, 2024).

Analisando os resultados do antagonismo, dos isolados de *P. atratum*, foi possível verificar que de 6 isolados do gênero *Fusarium* sp., 4 deles apresentaram inibição ao *Colletotrichum* sp., em cerca de 57% e 55%, e dois deles apresentaram inibição do *Bipolaris* sp., em aproximadamente 58% e 57%, o gênero *Colletotrichum* sp. apresentou 60% de inibição do *Bipolaris* sp., o gênero *Penicillium* sp. apresentou cerca de 58% de inibição do *Bipolaris* sp., o gênero *Phoma* sp. apresentou cerca de 58% de inibição do *Bipolaris* sp., e o gênero *Neosartorya* sp. apresentou cerca de 57% de inibição do *Bipolaris* sp.. Em relação aos isolados do gênero *Aspergillus* sp., um dos isolados apresentou aproximadamente 58% de inibição ao *Bipolaris* sp., e o outro isolado apresentou cerca de 58% de inibição do *Colletotrichum* sp.. O gênero *Microdochium* sp. apresentou cerca de 62% de inibição do gênero *Bipolaris* sp..

Os resultados dos isolados de *P. notatum* mostraram que o *Penicillium* sp. inibe o *Colletotrichum* sp. em cerca de 64 % e o *Bipolaris* sp. em cerca de 88 %. O gênero *Talaromyces* sp. também apresentou potencial de inibição de crescimento do *Colletotrichum* sp. e do *Bipolaris* sp. em cerca de 85 % e 80 %, respectivamente. O isolado *Aspergillus* sp. apresentou aproximadamente 82 % de inibição do *Colletotrichum* sp., e os dois isolados de *Colletotrichum* sp. apresentaram inibição do *Bipolaris* sp. em cerca de 64% e 65%. Dos 5 isolados de *Ceratobasidium* sp., 3 deles apresentaram inibição do *Bipolaris* sp., sendo 2 deles em cerca de 64% e 54%. Os outros 2 isolados de *Ceratobasidium* sp. inibiram o *Colletotrichum* sp. em 55% aproximadamente. Os isolados dos gêneros *Curvularia* sp. inibiu o *Bipolaris* sp. em cerca de 61%. Dos 2 isolados do gênero *Curvularia* sp., ambos inibiram o *Bipolaris* sp. em aproximadamente 61% e 58%. Dos 2 isolados de *Fusarium* sp., um deles inibiu cerca de 61% o gênero *Bipolaris* sp. e o outro inibiu cerca de 58% o gênero *Colletotrichum* sp..

Neste sentido, os gêneros que melhor inibiram o *Bipolaris* sp. foram *Aspergillus* sp., *Ceratobasidium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Microdochium* sp., *Neosartorya* sp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp. e *Talaromyces* sp..

E os gêneros que melhor inibiram o *Colletotrichum* sp. foram *Aspergillus* sp., *Ceratobasidium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Talaromyces* sp..

Tratando-se do controle biológico de *Bipolaris* sp., Liljeroth & Bryngelsson (2002) realizaram um estudo sobre o potencial antagônico do *Microdochium* sp. contra o fungo *Bipolaris* sp. em raiz e folha de cevada que estavam infectadas. O isolamento do gênero *Microdochium* sp. foi realizado de pastagens no Sul da Suécia. Os resultados obtidos demonstraram que o *Microdochium* sp. reduziu o tamanho da lesão em raízes em 50%, e o

tratamento das sementes para posterior análise das folhas que foi realizado com a inoculação de esporos, demonstrou uma diminuição cerca de 40% a 50% do tamanho da lesão. Embora o atual projeto não tenha sido realizado *in vivo*, foi possível notar que *in vitro*, o *Microdochium* sp. inibiu 62,35% do *Bipolaris* sp., indicando seu potencial de controle, assim como encontrado por Liljeroth & Bryngelsson (2002).

Nandhini *et al.* (2018) realizaram um estudo com 6 fungos isolados da rizosfera do trigo, sendo 3 do gênero *Aspergillus* sp., 1 do gênero *Penicillium* sp. e 2 do gênero *Trichoderma* sp.. Nesse estudo, foram avaliados o potencial antagonico desses fungos em relação a *Bipolaris* sp., *in vitro*. Os resultados demonstraram que os isolados com maior desempenho foram do gênero *Trichoderma* sp. (apresentando 61,34% e 53,98%), seguido por *Aspergillus* sp. (43,6%. 36% e 27,45%), e por fim *Penicillium* sp. (17,62%). O atual projeto encontrou para *Aspergillus* sp. os valores de 58,82% e 54,11%, e para *Penicillium* sp. o valor de 88,23%. Com esses resultados, foi possível notar que para a cepa cedida pela Embrapa Pecuária Sudeste, os resultados foram mais promissores para os isolados fúngicos de *Paspalum* sp. dos gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. em relação aos isolados e as cepas fitopatogênicas utilizadas por Nandhini *et al.* (2018).

Não há relatos na literatura a respeito de fungos endofíticos do gênero *Neosartorya* sp. para controle biológico de *Bipolaris* sp., mas o trabalho desenvolvido por Chalearmsrimuang *et al.* (2019) realizou um estudo com fungos isolados de esponjas do mar retiradas de recifes de corais da Tailândia. Nesse estudo, os 4 isolados do gênero *Neosartorya* sp. apresentaram inibição de 62,69%, 60,91%, 41,32% e 40,74% do gênero *Bipolaris* sp. *in vitro*. Embora a localidade seja bastante distinta do local de isolamento dos fungos do atual projeto, esse resultado foi o único encontrado e o que se assemelha ao resultado encontrado de 57,64% de inibição.

Também não foi encontrado na literatura a respeito de fungos endofíticos do gênero *Talaromyces* sp. para controle biológico de *Bipolaris* sp., entretanto, o trabalho desenvolvido por Dethoup *et al.* (2018) realizou um isolamento de fungos de esponjas do mar, encontrando o gênero *Talaromyces* sp.. Esse isolado foi testado quanto ao seu potencial antagonista a *Bipolaris* sp., de forma que a porcentagem de inibição foi de 40,89%. O resultado de inibição do endófito isolado no presente trabalho é o dobro do encontrado por Dethoup *et al.* (2018), com cerca de 80% de inibição. A localidade dos isolamentos, de certo, apresenta uma influência em relação aos potenciais dos isolados.

Não foi possível encontrar na literatura a respeito do controle biológico de *Bipolaris* sp. pelo gênero *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Ceratobasidium* sp. e *Curvularia*

sp.. Entretanto, com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se sugerir um promissor potencial de biocontrole desse gênero fitopatogênico.

Tratando-se do controle biológico de *Colletotrichum* sp., Brum *et al.* (2012) desenvolveram um projeto de investigação dos fungos endofíticos de folhas de uva, e suas capacidades de inibição do crescimento *in vitro* do fungo fitopatogênico do gênero *Colletotrichum* sp.. Dos isolados obtidos, o gênero *Fusarium* sp. foi identificado, e sua atividade antagônica frente ao fungo do gênero *Colletotrichum* sp. foi nula, ou seja, não apresentou potencial de inibição. No atual projeto, os resultados de inibição do isolado do gênero *Fusarium* sp. em relação ao *Colletotrichum* sp. foi favorável por apresentar inibição de 60,00%, resultado contrário ao encontrado por Brum *et al.* (2012).

No trabalho desenvolvido por Landum *et al.* (2016) foram estudados os potenciais antagônicos dos isolados fúngicos endofíticos de oliveiras, frente ao fitopatógeno *Colletotrichum* sp.. Nesse estudo, dentre os gêneros isolados, os gêneros identificados foram *Fusarium* sp. e *Aspergillus* sp.. A porcentagem de inibição do *Colletotrichum* sp. por *Aspergillus* sp. foi de 86%, e a do *Fusarium* sp. foi de 16% e 30%. No trabalho atual, a porcentagem de inibição do *Bipolaris* sp. encontrada pelo isolado *Aspergillus* sp. foi semelhante à encontrada por Landum *et al.* (2016), com cerca de 82% de inibição. E, embora Brum *et al.* (2012) não tenha encontrado atividade antagônica do *Fusarium* sp. em relação ao *Bipolaris* sp., Landum *et al.* (2016) encontrou uma atividade relativamente mediana, de forma que o atual trabalho encontrou um isolado com maior potencial, com cerca de 58% de inibição.

Kaur *et al.* (2023) realizaram um estudo com fungos endofíticos do trigo (*Triticum aestivum*), da família do *Paspalum* sp. (Poaceae). Nesse estudo, dos 67 isolados, o isolado do gênero *Talaromyces* sp. apresentou capacidade de tolerância a seca, potencial de produção de auxina, AIA, sideróforos e atividades enzimáticas. Além disso, esse isolado apresentou capacidade de inibição do crescimento de *Aspergillus* sp. e *Colletotrichum* sp.. No trabalho desenvolvido por Fatinel *et al.* (2023), foram descritos endófitos da fruta tropical *Feijoa sellowiana*, conhecida como abacaxi-goiaba com capacidade de controle da antracnose, causada pelo fitopatógeno *Colletotrichum* sp.. Nesse estudo, foi utilizada a metodologia do contato direto, e os resultados demonstraram que os isolados do gênero *Talaromyces* sp. reduziram o crescimento micelial e a esporulação do *Colletotrichum* sp..

Peters e colaboradores (2020) analisaram o potencial antagonista de isolados fúngicos de açaizeiro para biocontrole da antracnose, causada pelo *Colletotrichum* sp.. Nesse estudo, a porcentagem de inibição *in vitro* do *Colletotrichum* sp. pelo *Penicillium* sp. foi de 50,6%. O estudo também analisou a severidade da doença quando em presença do endófito, de forma que

quando em presença do *Penicillium* sp., a severidade foi de 61,1%. No atual projeto, a maior inibição do fungo *Colletotrichum* sp. pelo *Penicillium* sp. foi de 64,70%, caracterizando um maior potencial em relação ao encontrado *in vitro* por Peters *et al.* (2020).

Não foi possível encontrar na literatura a respeito do controle biológico de *Colletotrichum* sp. pelo gênero *Ceratobasidium* sp., mas também temos indicativos de seu potencial de controle.

Neste cenário, a avaliação da atividade microbiana para controle biológico tem sido promissora, tendo resultados não antes descritos na literatura para os isolados do gênero *Paspalum* sp. Desta forma, os potenciais encontrados nos isolados fúngicos endofíticos das duas espécies de *Paspalum* sp, encontradas no BAG, podem se tornar alvos de estudos para se tornarem possíveis agentes de biocontrole em formulações microbianas para bioinsumos.

7 CONCLUSÃO

Raízes de *Paspalum atratum* apresentaram maior abundância de fungos endofíticos cultiváveis em relação as folhas. Folhas de *P. notatum* apresentaram maior abundância de fungos endofíticos cultiváveis em relação as raízes.

Do total de 385 isolados fúngicos, 213 isolados solubilizam fosfato inorgânico (55,32%), sendo 133 isolados de *P. atratum* e 80 isolados de *P. notatum*.

De acordo com o sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal, os isolados endofíticos selecionados de *P. atratum* pertencem aos gêneros *Aspegillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Microdochium* sp., *Neosartorya* sp., *Penicillium* sp. e *Phoma* sp., e os isolados endofíticos selecionado de *P. notatum* pertencem aos gêneros *Aspegillus* sp., *Ceratobasidium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Microdochium* sp., *Penicillium* sp. e *Talaromyces* sp..

A maior porcentagem de inibição do fitopatógeno *Colletotrichum* sp. foi de 85,88% pelo gênero *Talaromyces* sp. isolado de *P. notatum*. A maior porcentagem de inibição do fitopatógeno *Bipolaris* sp. foi de 88,23% pelo gênero *Penicillium* sp. isolado de *P. notatum*.

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Diversos isolados fúngicos apresentaram potencial para solubilização de fosfato, e, portanto, são potenciais candidatos para testes *in vitro* com diferentes rochas fosfáticas. Além disso, será importante testar *in planta* a capacidade de promoção de crescimento vegetal destes isolados endofíticos; assim como estudos da expressão gênica correlacionados com a solubilização de fosfato por estes endófitos.

Os isolados também apresentaram potencial de antagonismo à fitopatógenos, e, portanto, são potenciais candidatos para testes *in planta* para análise de controle biológico.

9 REFERÊNCIAS

- ABDALLA, Muna Ali *et al.* Isolation of endophytic fungi from South African plants, and screening for their antimicrobial and extracellular enzymatic activities and presence of type I polyketide synthases. **South African journal of botany**, v. 134, p. 336-342, 2020.
- ADHIKARI, P., & Pandey, A. (2018). **Phosphate solubilization potential of endophytic fungi isolated from *Taxus wallichiana* Zucc. roots**. Rhizosphere. doi:10.1016/j.rhisph.2018.11.002
- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n. 1, p. 1–20, 2014.
- ALEXANDER BJR, Stewart A (2001) Glasshouse screening for biological control agents of *Phytophthora cactorum* on apple (*Malus domestica*). **N Z J Crop Hortic Sci** 29:159–169.
- AL-SADI, A. M. *Bipolaris sorokiniana*-Induced Black Point, Common Root Rot, and Spot Blotch Diseases of Wheat: A Review. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 584899, 2021.
- ANNAPURNA, K. (Eds.). . Endophytes: Crop Productivity and Protection. Haryana: **Springer International Publishing**, 2017. v. 16p. 61–93.
- ANJOS, J.R.N., CHARCHAR, M.J.A., TEIXEIRA, R.N. & ANJOS, S.S.N. Ocorrência de *Bipolaris maydis* causando mancha foliar em *Paspalum atratum* cv. Pojuca no Brasil. **Fitopatologia Brasileira** 29:656-658. 2004.
- ARAÚJO, W. L. *et al.* **Micro-organismos Endofíticos: Aspectos Teóricos e Práticos de Isolamento e Caracterização**. 1. ed. Santarém: Universidade Federal do Oeste do Pará. 2014.
- AZEVEDO, J.L.; Maccheroni Jr., W.; Pereira, J.O.; Araújo, W.L. (2000). Endopytic microorganisms: a review on insect control and recente advances on tropical plantas. **EJB: Eletronic Journal of Biotecnology** [online], 3, <http://www.ejb.orglcontent/vol3/issuel/full/3/4>.
- AZEVEDO, J. L. (2014). Endophytic Fungi from Brazilian Tropical Hosts and Their Biotechnological Applications. **Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security**, 17–22. doi:10.1007/978-81-322-1801-2_2
- AZEVEDO, J. L. DE *et al.* **Biotecnologia microbiana ambiental**. Maringá: Eduem, 2018. 331 p. ISBN 978-85-7628-734-6.
- AZUDDIN, N.F., Mohamad Noor Azmy, M.S. & Zakaria, L. Molecular identification of endophytic fungi in lawn grass (*Axonopus compressus*) and their pathogenic ability. **Sci Rep** 13, 4239 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31291-7>
- AWAIS, M. *et al.* Isolation, characterization and inter-relationship of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of sugarcane and rice. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, n. September 2015, p. 312–321, 2017.
- BALE, J. S., Lenteren, J. C. V., & Bigler, F. (2008). Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, **Biological Sciences**, 363, 761–776.
- BANG, S., Song, J. H., Lee, D., Lee, C., Kim, S., Kang, K. S., ... Shim, S. H. (2019). Neuroprotective Secondary Metabolite Produced by an Endophytic Fungus, *Neosartorya fischeri* JS0553, Isolated from *Glehnia littoralis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. doi:10.1021/acs.jafc.8b05481

- BARBIERI, M. C. G. *et al.* First report of *Colletotrichum cliviae* causing anthracnose on soybean in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 9, p. 1677-1677, 2017.
- BATISTA, L. A. R.; REGITANO NETO, A. **Espécies do gênero *Paspalum* com potencial forrageiro**. IN: SEMANA DO ESTUDANTE, 13., 1999, São Carlos, SP. Utilização de forrageiras para intensificação da produção de carne e leite. Anais... São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 1999. p.59-71. Editado por Rogerio T. Barbosa, Armando A. Rodrigues, Eli Schiffler, Luciano A. Correa, Sergio Esteves.
- BECK, A. P. A. 2012. **Produção de sementes de dois ecótipos de *Paspalum notatum* Flügge sob diferentes doses de nitrogênio e regimes de corte**. 140 p. il. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- BIRCH L, Bachofen R (1990) Complexing agents from microorganisms. **Experientia** 46:827–834. <https://doi.org/10.1007/BF01935533>
- BOGAS, A. C. ; TORRES, F. L. ; SOUSA, C. P. ; LACAVA, P.T. . Bioactivity of Endophytes from the Brazilian Tropical Savannah. **Acta Scientific Microbiology**, v. 3, p. 15-22, 2020.
- BOGAS, A. C., Cruz, F. P. N., Lacava, P. T., & Sousa, C. P.. (2024). Endophytic fungi: an overview on biotechnological and agronomic potential. **Brazilian Journal of Biology**, 84, e258557. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.258557>
- BOLDRINI, I.I. *Paspalum notatum*. In: Coradin, L., Siminski, A., & Reis, A. (Eds.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011, cap. 5, pp. 338-341. Filgueiras, T.S.; Rodrigues, R.S. *Paspalum notatum*. In: Vieira, R. F.; Camillo, J.; Coradin, L. (Eds.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - Região Centro-Oeste**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2016, cap. 5, pp. 669-673
- BRUM, M. C. P. *et al.* Endophytic fungi from *Vitis labrusca* L. ('Niagara Rosada') and its potential for the biological control of *Fusarium oxysporum*. **Genet Mol Res**, v. 11, n. 4, p. 4187-4197, 2012.
- CHALEARMSRIMUANG, Tanaporn *et al.* Marine-derived fungi: A promising source of halo tolerant biological control agents against plant pathogenic fungi. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 209-223, 2019.
- COLLAVINO MM, Sansberro PA, Mroginski LA, Aguilar (2010) Comparison of *in vitro* solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. **Biol Fertil Soils** 46:727– 738. <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0480-x>
- DA COSTA SILVEIRA, Andreia Alves e colab. Biochemical characterization of multifunctional endophytic fungi from *Bambusa oldhamii* Munro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 50, p. 1–8, 2020.
- DE PAULA A.F, Cruz FPN, Dinato NB, de Andrade PHM, de Moraes CPM, Junior WB, Bernardi ACC, Vigna BBZ, Fávero AP and Lacava PT (2022) Endophytic and rhizospheric bacteria associated with *Paspalum atratum* and its potential for plant growth promotion with different phosphate sources. **Front Plant Sci**. 13:884716. [doi:10.3389/fpls.2022.884716](https://doi.org/10.3389/fpls.2022.884716)
- DEPETRIS MB, Acuña CA, Gutierrez S, Marcón F, Felitti SA. Fungal endophyte diversity in *Paspalum* and effects on plant growth. **Grass Forage Sci**. 2020;00:1–10. <https://doi.org/10.1111/gfs.12494>
- DEPETRIS, M.B., Acuña, C.A., Gutierrez, S. *et al.* First report of *Cercospora dianellicola* as an endophyte of *Paspalum notatum* (Poaceae). **Australasian Plant Dis. Notes** 17, 5 (2022). <https://doi.org/10.1007/s13314-022-00447-1>

- DETHOUP, Tida *et al.* Potential application of a marine-derived fungus, *Talaromyces tratensis* KUFA 0091 against rice diseases. **Biological Control**, v. 119, p. 1-6, 2018.
- DINATO, N. B., Santos, I. R. I., Leonardecz, E., Burson, B. L., Quarín, C. L., de Paula, A. F., et al. (2018). Storage of bahiagrass pollen at different temperatures. **Crop Sci.** 58, 2391–2398. doi: 10.2135/cropsci2018.03.0164
- DU W, Yao Z, Li J, Sun C, Xia J, Wang B, *et al.* (2020) Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from *Securinega suffruticosa* in the Yellow River Delta. **PLoS ONE** 15(3): e0229589.
- CUNHA, M. A. D. DA . *et al.*. Características morfológicas do *Paspalum atratum* cv. Pojuca submetido ao pastejo rotacionado. Dinâmica de perfilhamento e alongação de folhas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 935–940, maio 2001.
- EL-SAYED, A. S. A., Shindia, A. A., Ammar, H., Yassin, M., Hussein, H., Awad, S. A., & Ali, G. S. (2020). Production and bioprocess optimization of antitumor Epothilone B analogue from *Aspergillus fumigatus*, endophyte of *Catharanthus roseus*, with response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, 109718. doi:10.1016/j.enzmictec.2020.1097
- ETESAMI, H.; JEONG, B.R.; GLICK, B.R. Contribution of Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Phosphate–Solubilizing Bacteria, and Silicon to P Uptake by Plant. **Frontiers in Plant Science**. 2021 <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.699618>
- FANTINEL, Vinícius Spolaor et al. Endophytic fungal communities isolated from two genotypes of feijoa fruits (*Feijoa sellowiana* O. Berg.) and prospection of potential agents against anthracnose pathogens. **Biological Control**, p. 105288, 2023.
- FERREIRA, M. C. e DE ASSIS, J. C.S. e ROSA, L. H. Diversity of endophytic fungi associated with *Carapichea ippecacuanha* from a native fragment of the Atlantic Rain Forest. **South African Journal of Botany**, v. 134, p. 225–229, 1 Nov 2020.
- FONTANA, D.C.; de Paula, S.; Torres, A.G.; de Souza, V.H.M.; Pascholati, S.F.; Schmidt, D.; Dourado Neto, D. Endophytic Fungi: Biological Control and Induced Resistance to Phytopathogens and Abiotic Stresses. **Pathogens** 2021, 10, 570. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050570>
- FILGUEIRAS, T. S.; RODRIGUES R. S. *Paspalum atratum*. In: Vieira, R. F.; Camillo, J.; Coradin, L. (Eds.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - Região Centro-Oeste**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2016, cap. 5, pp. 655–658.
- FUJITA, S. I., Senda, Y., Nakaguchi, S., & Hashimoto, T. (2001). Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. **Journal of clinical microbiology**, 39(10), 3617–3622. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3617-3622.2001>
- GAIND S (2016) Phosphate dissolving fungi: mechanism and application in alleviation of salt stress in wheat. **Microbiol Res** 193:94–102. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.09.005>
- GARCÍA, A., Rhoden, S. A., Rubin Filho, C. J., Nakamura, C. V., & Pamphile, J. A. (2012). Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindus saponaria* L. and their localization by scanning electron microscopy. **Biological Research**, 45(2), 139–148. doi:10.4067/s0716-97602012000200006
- GARCÍA LEMOS, Adriana; Gil Cardeza, Maria Lourdes; Gomez, Elena del Valle; Felitti, Silvina Andrea; Fungal endophytes in species of *paspalum* and *bromus*, occurrence and *in vitro* antagonistic activity assessment; Research and Reviews; Research and Reviews: **Research Journal of Biology**; 5; 3; 9-2017; 15-25

- GUNATILAKA, A. A. L. (2006). Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **J. Nat. Prod.** 69, 509–526. doi: 10.1021/np058128n
- JORDAAN, A.; Taylor, J.E. Rossenklaan, R. (2006). Occurrence and possible role of endophytic fungi associated with seed pods and *Colephospermum mopane* (Fabaceae) in Botswana. **South Africa Journal of Botany**, 72: 254.
- KAVROULAKIS, N. S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Haralampidis, K., and Papadopoulou, K. K. (2007). Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. **J. Exp. Bot.** 58, 3853–3864. doi: 10.1093/jxb/erm230
- KAUR, Ramandeep; SAXENA, Sanjai. Evaluation of drought-tolerant endophytic fungus *Talaromyces purpureogenus* as a bioinoculant for wheat seedlings under normal and drought-stressed circumstances. **Folia Microbiologica**, p. 1-19, 2023.
- KHARE, E. K., and Arora, N. K. (2015). “Effects of soil environment on field efficacy of microbial inoculants,” in *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets*, ed. N. K. Arora (Netherlands: **Springer**), 353–381. doi: 10.1007/978-81-322-2068-8_19
- KHARE, Ekta; MISHRA, Jitendra; ARORA, Naveen Kumar. Multifaceted interactions between endophytes and plant: developments and prospects. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2732, 2018.
- KISHORE N, Pindi PK, Reddy SR (2015) Phosphate-solubilizing microorganisms: a critical review. In: Bahadur B, Venkat Rajam M, Sahijram L, Krishnamurthy K (eds) *Plant Biology and Biotechnology*. **Springer**, New Delhi, pp 307–333. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6_12
- KLOEPPER, J. W., and Ryu, C.-M. (2006). “Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance,” in *Microbial Root Endophytes*, eds B. J. E. Schulz, C. J. C. Boyle, and T. N. Sieber (Berlin: **Springer**), 33–52. doi: 10.1007/3-540-33526-9
- KÖHL J, Kolnaar R and Ravensberg WJ (2019) Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. **Front. Plant Sci.** 10:845. doi: 10.3389/fpls.2019.00845
- LACAVA, P.T.; Machado, P.C.; Andrade, P.H.M. Phosphate Solubilization by Endophytes from the Tropical Plants. In: Maheshwari D.K.; Dheeman S.. (Org.). *Sustainable Development and Biodiversity*. 26ed. Springer Nature Switzerland AG: **Springer** International Publishing, 2021, v. 3, p. 207-226
- LACAVA, P. T.; BOGAS, A. C. ; MOREIRA, C. C. . Diversity and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi from Mangrove Forests. In: Qiang-Sheng Wu; Ying-Ning Zou; Yong-Jie Xu. (Org.). *Endophytic Fungi: Biodiversity, Antimicrobial Activity and Ecological Implications*. 1ed. **Hauppauge**: Nova Science Publishers, 2021, v. 1, p. 63-92.
- LANDUM, Miguel C. et al. Antagonistic activity of fungi of *Olea europaea* L. against *Colletotrichum acutatum*. **Microbiological research**, v. 183, p. 100-108, 2016.
- LATA, R., Chowdhury, S., Gond, S. K., and White, J. F. Jr. (2018). Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. **Lett. Appl. Microbiol.** 66, 268–276. doi: 10.1111/lam.12855
- LILIEROTH, E., & BRYNGELSSON, T. (2002). Seed Treatment of Barley with *Idriella bolleyi* causes Systemically Enhanced Defence against Root and Leaf Infection by *Bipolaris sorokiniana*. **Biocontrol Science and Technology**, 12(2), 235–249. doi:10.1080/09583150120124496.
- LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. DE .. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518-534, abr. 2018.

- MAJESWSKA-SAWKA, A., NAKASHIMA, H. (2004). Endophytic transmission via seeds of *Lolium perene* L.: immunodetection of fungal antigens. **Fungal Genetics and Biology**, 41:534-541.
- MANAMGODA, D. S. *et al.* The genus *Bipolaris*. **Studies in mycology**, v. 79, p. 221–288, 2014.
- MARCON, FLORENCIA *et al.* **Agronomic characterization of *Paspalum atratum* Swallen and *P. lenticulare* Kunth**. Trop. Grassl.-Forrajes Trop., Cali, v. 6, n. 2, p. 70-81, Aug. 2018. Available from <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2346-37752018000200070&lng=en&nrm=iso>. access on 05 July 2023. [https://doi.org/10.17138/tgft\(6\)70-81](https://doi.org/10.17138/tgft(6)70-81).
- MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de patologia de Plantas**, v. 1, p. 369-409, 1993.
- MATOS, A. D. M. *et al.* Phosphate Solubilization by Endophytic Bacteria isolated from *Oryza sativa*. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 6, n. 10, p. 2713–2721, 2017.
- MEHTA P, Walia A, Chauhan A, Kulshrestha S, Shirkot CK (2013) Phosphate solubilization and plant growth promoting potential by stress tolerant *Bacillus* sp. isolated from rhizosphere of apple orchards in trans Himalayan region of Himachal Pradesh. **Ann Appl Biol** 163:430–443
- MILLER, J. D., Mackenzie, S., Foto, M., Adams, G. W., and Findlay, J. A. (2002). Needles of white spruce inoculated with rugulosin-producing endophytes contain rugulosin reducing spruce budworm growth rate. **Mycol. Res.** 106, 471–479. doi: 10.1017/S0953756202005671
- MOLOTOKS, A.; SMITH, P.; DAWSON, T. P. Impacts of land use, population, and climate change on global food security. **Food and Energy Security**, v. 10, n. 1, p. e261, 2021.
- NATH, Ratul *et al.* Plant growth promoting endophytic fungi isolated from tea (*Camellia sinensis*) shrubs of Assam, India. **Appl Ecol Environ Res**, v. 13, n. 3, p. 877-891, 2015.
- NOORJAHAN A, Aiyamperumal B. Anantharaman P. Isolation and Charecterisation of Seaweed Endophytic Fungi as na Efficient Phosphate Solubilizers. **Biosci Biotech Res Asia** 2019;16(1).
- NOVO, P. E. *et al.*, Interspecific hybrids between *Paspalum plicatum* and *P. oteroi*: a key tool for forage breeding. **Scientia Agricola**, v. 73, p. 356–362, 2016.
- O'BRIEN, P.A. Biological control of plant diseases. **Australasian Plant Pathol.** 46, 293–304 (2017). <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0481-4>
- OLIVEIRA, J. A. dos S., Ferreira, A. P., Polli, A. D., Silva, A. A. da, Ribeiro, A. da S., Azevedo, J. L., & Pamphile, J. A. (2021). Plant growth-promoting activity of wild-type and bromate-resistant mutant of the endophytic fungus *Colletotrichum karstii*. **Acta Scientiarum.Technology**, 43(1), e55457. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v43i1.55457>
- PARK, Jong-Myong *et al.* Endophytic fungi of emersed halophytes in river deltas and tidal flats of the Korean Ramsar wetlands. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 9, n. 4, p. 430, 2021.
- PETERS, Leila P. *et al.* Selection of endophytes as antagonists of *Colletotrichum gloeosporioides* in açai palm. **Biological Control**, v. 150, p. 104350, 2020.
- PETRINI, O. (1991). Fungal endophyte of tree leaves: In: Andrews, L.; Hirano, S.S. (eds). **Microbial ecology of leaves**. Springer-Verlag, New York. pp. 179-197.
- PEZZOPANE, C.De, Lima, A. G., Cruz, P. G., Beloni, T., Fávero, A. P., and Santos, P. M. (2017). Evaluation and strategies of tolerance to water stress in *Paspalum germplasm*. **Trop. Grasslands-Forrajes Trop.** 5, 153–162. doi: 10.17138/tgft(5)153-162

- PRIYADHARSINI, Perumalsamy e MUTHUKUMAR, Thangavelu. The root endophytic fungus *Curvularia geniculata* from *Parthenium hysterophorus* roots improves plant growth through phosphate solubilization and phytohormone production. **Fungal Ecology**, v. 27, p. 69–77, 1 Jun 2017.
- QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 1, p. 89–96, 2001.
- RADIASTUTI, Nani e BAHALWAN, Hushshila A. e SUSILOWATI, Dwi Ningsih. Phylogenetic study of endophytic fungi associated with *Centella asiatica* from Bengkulu and Malaysian accessions based on the ITS rDNA sequence. **Biodiversitas**, v. 20, n. 5, p. 1248–1258, 1 Maio 2019.
- RAJAMANIKYAM, M., VADLAPUDI, V., AMANCHY, R. and UPADHYAYULA, S.M., 2017. Endophytic fungi as novel resources of natural therapeutics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 60, no. 0, p. e17160542. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2017160542>
- RAWAT, P.; DAS, S.; SHANKHDHAR, D.; SHANKHDHAR, S.C. Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. 2020. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00342-7>.
- ROTHEN, CAROLINA *et al.* *Microdochium Bolleyi* (Ascomycota: Xylariales): Physiological characterization and structural features of its association with wheat. **Bol. Soc. Argent. Bot.**, Córdoba , v. 53, n. 2, p. 1-10, jun. 2018 . Disponível em <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-23722018000200003&lng=es&nrm=iso>. acessado em 24 jul. 2023.
- RUDGERS J, A.; Clay, K. (2007). Endopytic symbiosis with tall fescue: how Strong are the impacts on communities and ecosystems? **Fungal Biology Reviews**, 21: 107-124.
- SAHU, Sharda; PRAKASH, Anil; SHENDE, Kishor. *Talaromyces trachyspermus*, an endophyte from *Withania somnifera* with plant growth promoting attributes. **Environmental Sustainability**, v. 2, p. 13-21, 2019.
- SEBASTIANES, F.L.S.; AZEVEDO, J.L.; LACAVALA, P.T. Diversity and Biotechnological Potential of Endophytic Microorganisms Associated with Tropical Mangrove Forests. In: João Lucio de Azevedo; Maria Carolina Quecine. (Org.). Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics. Ied.Gewerbestrasse: Springer International Publishing, 2017, v. 1, p. 37-56. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55804-2_3
- SECCO, Tadhine Raquel; FACHINETTO, Juliana Maria. **Uma revisão sobre o potencial forrageiro do gênero *Paspalum* L.** In: CARDOSO, Nayara Araújo; ROCHA, Renan Rhonalty; LAURINDO, Maria Vitória (org.). As Ciências Biológicas e da Saúde na Contemporaneidade 4. 4. ed. Belo Horizonte: Atena, 2019. p. 238-242. Disponível em: DOI 10.22533/at.ed.180192803. Acesso em: 26 jan. 2023.
- SHADMANI, L., Jamali, S. & Fatemi, A. Isolation, identification, and characterization of cadmium-tolerant endophytic fungi isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.) roots and their role in enhancing phytoremediation. **Braz J Microbiol** 52, 1097–1106 (2021). <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00493-4>
- SHEFFER-BASSO, Simone. *et. al.*, Morphophysiological and Anatomic Characterization of *Paspalum urvillei* (Steudel). **Revista Brasileira de Zootecnia**, 31 (R. Bras. Zootec., 2002 31(4)). <https://doi.org/10.1590/S1516-35982002000700009>.
- SHI, Y., Xie, H., Cao, L., Zhang, R., Xu, Z., Wang, Z., & Deng, Z. (2016). Effects of Cd- and Pb-resistant endophytic fungi on growth and phytoextraction of *Brassica napus* in metal-contaminated soils. **Environmental Science and Pollution Research**, 24(1), 417–426. doi:10.1007/s11356-016-7693-y

- SHRIVASTAVA M, Srivastava PC, D'Souza SF (2018) Phosphatesolubilizing microbes: diversity and phosphates solubilization mechanism. In: Meena V (ed) Role of Rhizospheric Microbes in Soil. **Springer**, Singapore, pp 137–165. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0044-8_5
- SIKES, B. A., Paszalek, J., de Leon, N. E., & Hawkes, C. V. (2017). Regardless of N-substrate, multiple fungal root endophytes isolated from pastures outgrow and outcompete those isolated from undisturbed sites. **Pedobiologia**, 63, 52–58. doi:10.1016/j.pedobi.2017.05.006.
- SOLANKI, M.; KUNDU, B. S.; NEHRA, K. Molecular diversity of phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere of chickpea, mustard and wheat. **Annals of Agrarian Science**, n. May 2017, p. 0–1, 2018.
- SOUZA, B.S. and SANTOS, T.T., 2017. Endophytic fungi in economically important plants: ecological aspects, diversity and potential biotechnological applications. **Journal of Bioenergy and Food Science**, vol. 4, no. 2, pp. 113-126. <http://dx.doi.org/10.18067/jbfs.v4i2.121>
- SRIVASTAV, Arun Lal. Chemical fertilizers and pesticides: role in groundwater contamination. In: **Agrochemicals detection, treatment and remediation**. Butterworth-Heinemann, 2020. p. 143-159.
- SYAMSIA, Syamsia *et al.* Combination on endophytic fungal as the Plant Growth-Promoting Fungi (PGPF) on cucumber (*Cucumis sativus*). **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 22, n. 3, 2021.
- TOGHUEO, R.M.K. and BOYOM, F.F., 2019. Endophytic fungi from Terminalia species: a comprehensive review. **Journal of Fungi**, vol. 5, no. 2, p. 43. <http://dx.doi.org/10.3390/jof5020043> PMID:31137730.
- TOMER S, Suyal DC, Goel R (2016) Biofertilizers: a timely approach for sustainable agriculture. In: Choudhary D, Varma A, Tuteja N (eds) Plant-microbe interaction: an approach to sustainable agriculture. **Springer**, Singapore, pp 375–395. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2854-0_17
- TROJAN, Daiane Garabeli; PRIA, Maristella Dalla. Validation of a diagrammatic scale to quantify the severity of corn leaf anthracnose. **Summa Phytopathologica**, v. 44, p. 56-64, 2018.
- VALLE, C.B.; EUCLIDES V.P.B., MACEDO M.C.M. **Características de plantas forrageiras do gênero *Brachiaria***. In: Simposio sobre o manejo da pastagem, 17., Piracicaba, 2001. Anais. Piracicaba: FEALQ, 2001. P. 133-176.
- VASCONCELLOS, S. P. ; LIMA, L. M. S. ; ROSWELL, M. R. ; LACAVA, P. T. . Tropical biomes as microbial sources for efficient biocatalysts to environmental purposes. In: Vijay Kumar Sharma; Ajay Kumar; Michel Rodrigo Zambrano Passarini; Shobhika Parmar; Vipin Kumar Singh. (Org.). Microbial Inoculants Recent Progress and Applications. 1ed.Amsterdã: **Elsevier**, 2023, v. 1, p. 229-252.
- VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, 2-3, p. 127–141, 2001.
- WAGAS, M., Khan, A. L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S. M., Kim, Y. H., et al. (2012). Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. **Molecules** 17, 10754–10773. doi: 10.3390/molecules170910754
- WALIA, A. *et al.* **Endophytic bacteria: Role in Phosphate solubilization**. In: MAHESHWARI, D. K.;
- WANG, W. X., Barak, T., Vinocur, B., Shoseyov, O., and Altman, A. (2003). “Abiotic resistance and chaperones: possible physiological role of SP1, a stable and stabilizing protein from Populus,” in **Plant Biotechnology 2000 and Beyond**, ed. I. K. Vasil (Dordrecht: Kluwer), 439–443. doi: 10.1007/978-94-017-2679-5_91
- WANI, S. H., Kumar, V., Shriram, V., and Sah, S. K. (2016). **Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants**. *Crop J.* 4, 162–176. doi: 10.1016/j.cj.2016.01.010

WHITE, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315- 322. In: PCR protocols: a guide to methods and applications.** Eds., M.A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, New York.

YODSING, Natanong *et al.* **Diversity of endophytic fungi isolated from thai medicinal plants (*Casearia grewiaefolia*) in Khon Kaen, thailand, and their bioactive compounds.** Chiang Mai J. Sci, v. 45, p. 45-59, 2018.