

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA (PPGBIOTEC)

FLAVIA LUANA TORRES

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À PLANTAS DO CERRADO

SÃO CARLOS- SP

Março, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA (PPGBIOTEC)

FLAVIA LUANA TORRES

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE
FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À PLANTAS DO CERRADO

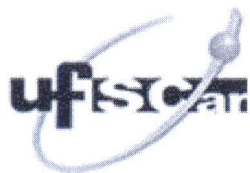
Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores: Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

SÃO CARLOS- SP

Março, 2018



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Flavia Luana Torres, realizada em 27/03/2018:

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa
UFSCar

Profa. Dra. Andrea Cristina Bogas
ESALQ/USP

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal
UFSCar

Dedico e ofereço

Aos meus pais Ana Maria e Vitor pelo incentivo, paciência, dedicação e muito amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por estarem sempre me protegendo e dando forcas para superar os obstáculos da vida.

Ao prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava pela orientação, compreensão, paciência e por ter acreditado na minha capacidade de trabalho, minha eterna gratidão e carinho.

À prof. Dra. Cristina Paiva de Sousa pela orientação, confiança, aprendizado e oportunidade de tê-la como orientadora.

À Universidade Federal de São Carlos – UFSCar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBiotec.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Dra. Andrea Bogas, pelos ensinamentos, paciência e pela ajuda no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos professores e aos técnicos do Departamento de Morfologia e Patologia, pela amizade, ensinamentos e por nunca nos deixar faltar nada.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia e Patologia.

À Claudia Pastega, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSCar.

Aos meus pais Ana Maria e Vitor, pelo amor puro e incondicional, pelos valores morais, confiança durante toda vida e por me apoiar nas minhas decisões.

Ao Papo de cumade, Léo, Michelle, Ana Laura e Mariana pela amizade e pela torcida.

Aos amigos do LaMib que com certeza fizeram toda diferença.

A Paula, Paulo, Felipe e Ailton (turminha do misto quente), pela amizade, cafés, almoços, risadas, paciência e auxílio durante o desenvolvimento do meu trabalho. Muito obrigada!

A Carla (Gema) pela amizade, paciência e disponibilidade.

A todos que me apoiaram e ajudaram na realização deste trabalho, meu muito obrigada!

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À PLANTAS DO CERRADO

RESUMO

Os microorganismos endofíticos são fungos ou bactérias que colonizam o interior dos tecidos vegetais sem causar dano à planta hospedeira. Os fungos endofíticos têm interessado a comunidade científica devido à produção de metabolitos secundários com aplicação nas indústrias biotecnológicas e farmacêuticas. Desta forma, o presente estudo objetivou isolar, purificar, identificar genotipicamente e avaliar a atividade antagonista, o potencial biotecnológico para solubilização de fosfato e produção de enzimas de 66 fungos endofíticos de folhas e ramos isolados de *S. adstringens* e *S. lycocarpum* St. Hill. Para isso, folhas e caules saudáveis de *S. adstringens* e *S. lycocarpum* foram coletadas e submetidas à assepsia superficial. Após a incubação do material botânico procedeu-se o isolamento, identificação molecular dos fungos endofíticos. Posteriormente, os isolados endofíticos foram avaliados *in vitro* quanto ao potencial antagonista contra os fitopatógenos *Colletotrichum* sp., *Fusarium oxysporum* e *Lasiodiplodia subglobosa*, quanto a solubilização de fosfato inorgânico e a produção de enzimas (amilase, celulase, pectinase, protease, lipase e esterase). Os resultados mostraram que a comunidade endofítica fúngica associada à *S. adstringens* é composta por: *Diaporthe* sp., *Neopestalotiopsis* sp., *Nigrospora* sp., *Paraconiothrium* sp., *Phomopsis* sp., *Pseudofusicoccum* sp., *Schizophyllum* sp. e *Xenoacremonium* sp. e os gêneros da comunidade fúngica de *S. lycocarpum* St. Hill. é composta por: *Colletotrichum* sp., *Curvalaria* sp., *Diaporthe* sp., *Neurospora* sp., *Phlebiopsis* sp., *Phomopsis* sp. e *Schizophyllum* sp.. Os fungos endofíticos se mostraram promissores contra *Colletotrichum* sp., *Fusarium oxysporum* e *Lasiodiplodia subglobosa* sendo observados elevados índices de inibição e a maioria das interações do tipo A, onde há um bloqueio de crescimento do fitopatógeno com contato micelial do fungo endofítico. Além disso, os fungos endofíticos apresentaram potencial de solubilizar fosfato inorgânico com índice de solubilização de fosfato médio. Quanto à produção de enzimas, os isolados fúngicos de ambas as espécies vegetais apresentaram maior atividade pectinolítica com produção de pectato liase e a poligalactorose. Com base nos resultados o estudo evidencia a importância dos fungos endofíticos na produção de compostos de interesse para biotecnologia e para a conservação das espécies vegetais do Cerrado, as quais abrigam esses micro-organismos promissores.

Palavras-chaves: Cerrado; fungos endofíticos; diversidade genética; antagonismo; solubilização de fosfato; produção de enzimas.

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF ENDOPHYTIC FUNGI ASSOCIATED TO PLANTS OF BRAZILIAN SAVANNAH

ABSTRACT

Endophytic microorganisms are fungi or bacteria that colonize the interior of plant tissues without causing damage to the host plant. Endophytic fungi have interested the scientific community due to the production of secondary metabolites for application in the biotechnology and pharmaceutical industries. The present study aimed to isolate, purify, genotypically identify and evaluate the antagonistic activity, the biotechnological potential for phosphate solubilization and the enzyme production of 66 endophytic fungi from leaves and branches isolated from *S. adstringens* and *S. lycocarpum* St. Hill. For this, healthy leaves and stems of *S. astringens* and *S. lycocarpum* were collected and submitted to superficial asepsis. After the incubation of the botanical material, it was proceeded the isolation and molecular identification of the endophytic fungi. The endophytic isolates were evaluated in vitro for the antagonistic potential against phytopathogens *Colletotrichum* sp., *Fusarium oxysporum* and *Lasiodiplodia subglobosa*, for the solubilization of inorganic phosphate and the production of enzymes (amylase, cellulase, pectinase, protease, lipase and esterase). The results showed that the fungal endophytic community associated with *S. adstringens* is composed of: *Diaporthe* sp., *Neopestalotiopsis* sp., *Nigrospora* sp., *Paraconiothrium* sp., *Phomopsis* sp., *Pseudofusicoccum* sp., *Schizophyllum* sp. and *Xenoacremonium* sp. and the genera of the fungal community of *S. lycocarpum* St. Hill. is composed of: *Colletotrichum* sp., *Curvalaria* sp., *Diaporthe* sp., *Neurospora* sp., *Phlebiopsis* sp., *Phomopsis* sp. and *Schizophyllum* sp. Endophytic fungi have shown to be promising against *Colletotrichum* sp., *Fusarium oxysporum* and *Lasiodiplodia subglobosa*, with high inhibition rates and most type A interactions, where there is a block of phytopathogen growth with mycelial contact of the endophytic fungus. In addition, endophytic fungi had the potential to solubilize inorganic phosphate with a mean phosphate solubilization index. As for enzyme production, the fungal isolates of both plant species showed higher pectinolytic activity with pectate lyase production and polygalactorosis. Based on the results, the study evidences the importance of endophytic fungi in the production of compounds of interest for biotechnology and for the conservation of Cerrado plant species, which harbor these promising microorganisms.

Keywords: Brazilian Savannah; endophytic fungi; genetic diversity; antagonism; phosphate solubilization; production of enzymes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Árvore de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. Fonte: autor. 15
- Figura 2.** Árvore de *Solanum lycocarpum* A. St. Hill. Fonte: autor..... 17
- Figura 3.** Modelo esquemático de uma placa de Petri representando a técnica de pareamento direto *in vitro* para avaliação do potencial antagônico dos fungos endofíticos associados ao barbatimão e a lobeira em relação ao fungo fitopatogênico testado. **Fonte:** autor. 31
- Figura 4.** Amostragem da diversidade de fungos endofíticos de *Stryphnodendron adstringens* encontrada no Cerrado de São Carlos, estado de São Paulo. Fonte: autor. 35
- Figura 5.** Quantidade de fungos endofíticos isolados a partir das folhas e de ramos de barbatimão 36
- Figura 6.** Amostragem de diversidade de fungos endofíticos isolados de *Solanum lycocarpum* St. Hill. encontrada no Cerrado de São Carlos, estado de São Paulo. **Fonte:** autor..... 36
- Figura 7.** Quantidade de fungos endofíticos isolados a partir das folhas e de ramos de lobeira. 37
- Figura 8.** Atividade antagônica dos fungos endofíticos de *S. adstringens* contra *Colletotrichum sp*, *Fusarium oxysporum* e *Lasiodiplodia subglobosa*. 41
- Figura 9.** Interações apresentadas entre os fungos endofíticos isolados de folhas e ramos de *Stryphnodendron adstringens* e os patógenos avaliados. A) Interação tipo CA1, com crescimento parcial do endófito sobre o fitopatógeno depois do *deadlock* inicial com contato micelial contra *Colletotrichum sp*. (BRA3 com *Colletotrichum sp*). B) Controle do fitopatógeno *Colletotrichum sp*. C) Interação do tipo A com *deadlock* com contato micelial contra *Fusarium oxysporum* (BRA1 com *F. oxysporum*). D) Controle do fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. E) Interação do tipo A, *deadlock* com contato micelial contra *L. subglobosa* (BRA4 com *Lasiodiplodia subglobosa*). F) Controle do fitopatógeno *Lasiodiplodia subglobosa* sem o endófito. 43
- Figura 10.** Atividade antagônica dos fungos endofíticos de lobeira contra *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum* e *Lasiodiplodia subglobosa*. 44
- Figura 11.** Interações apresentadas entre os fungos endofíticos isolados de folhas e ramos de *Solanum lycocarpum* St. Hill. e os patógenos avaliados. A) Interação tipo A, *deadlock* com contato micelial contra *Colletotrichum sp*. (LFO1 com *Colletotrichum sp*). B) Controle do fitopatógeno *Colletotrichum sp*. sem o fungo endofítico C) Interação do tipo CA1 com crescimento parcial do endófito sobre o fitopatógeno depois do *deadlock* inicial com contato micelial contra *Fusarium oxysporum* (LRA13 com *Fusarium oxysporum*). D) Controle do fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. E) Interação do tipo CA1, com crescimento parcial do endófito sobre o fitopatógeno depois do *deadlock* inicial com contato micelial contra *Lasiodiplodia subglobosa* (LRA4 com *Lasiodiplodia subglobosa*). F) Controle do fitopatógeno *Lasiodiplodia subglobosa*..... 47
- Figura 12.** Representação dos diâmetros dos halos indicadores de solubilização (Dh) e os diâmetros das colônias (Dc) em meio conteúdo fosfato de cálcio insolúvel formado pelo isolado LRA3 positivo. O círculo branco corresponde o halo indicadores de solubilização. ... 50
- Figura 13.** Atividade enzimática dos fungos endofíticos isolados de folhas de barbatimão. ... 53

Figura 14. Atividade enzimática dos fungos endofíticos isolados de ramos de barbatimão destacando a maior porcentagem para a produção de poligalacturose.....	55
Figura 15. Atividade enzimática dos fungos endofíticos isolados de folhas de lobeira destacando a maior porcentagem para a produção de poligalacturose.....	56
Figura 16. Atividade enzimática dos fungos endofíticos isolados de ramos de lobeira destacando a maior porcentagem para a produção de pectato liase.	58
Figura 17. Ensaio <i>in vitro</i> qualitativo de produção de enzimas. A) Produção de amilase. B) Produção de celulase. Fonte: autor.....	59
Figura 18. Ensaio <i>in vitro</i> qualitativo de produção de enzimas. A) Produção de pectato liase. B) Produção de poligalacturonase. Fonte: autor.....	60
Figura 19. Ensaio <i>in vitro</i> qualitativo de produção de enzimas. A) Produção de protease. B) Produção de lipase. Fonte: autor	60
Figura 20. Ensaio <i>in vitro</i> qualitativo de produção de esterase.....	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Identificação molecular em nível de gênero dos fungos endofíticos associados a <i>S. adstringens</i> e o índice de similaridade encontrado no NCBI (National Center for Biotechnology Information).	38
Tabela 2. Identificação molecular em nível de gênero dos fungos endofíticos associados a <i>S. lycocarpum</i> St. Hil e o índice de similaridade encontrado no NCBI (National Center for Biotechnology Information).	39
Tabela 3. Interações baseadas na escala de Badalyan et al. (2002) entre fungos endofíticos isolados de folhas e de ramos de <i>Stryphnodendron adstringens</i> contra os fitopatógenos <i>Colletotrichum sp.</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Lasiodiplodia subglobosa</i> utilizados nos testes de antagonismo <i>in vitro</i> e o índice de antagonismo em porcentagem (IA%) (Edginton et al., 1971; Quiroga et al. 2001).	42
Tabela 4. Interações baseadas na escala de Badalyan et al. (2002) entre fungos endofíticos isolados de folhas e de ramos de <i>Solanum lycocarpum</i> St. Hill. contra os fitopatógenos <i>Colletotrichum sp.</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Lasiodiplodia subglobosa</i> utilizados nos testes de antagonismo <i>in vitro</i> e o índice de antagonismo em porcentagem (IA%) (Edginton et al., 1971; Quiroga et al. 2001).	45
Tabela 5. Resultado do ensaio <i>in vitro</i> de solubilização de fosfato de cálcio insolúvel com os fungos endofíticos isolados de folhas e ramos de <i>Stryphnodendron adstringens</i> e o índice de solubilização dos mesmos de acordo com Silva Filho e Vedor (2000).	49
Tabela 6. Resultado do ensaio <i>in vitro</i> de solubilização de fosfato de cálcio insolúvel com os fungos endofíticos isolados de folhas de <i>Solanum lycocarpum</i> St. Hill. e o índice de solubilização dos mesmos de acordo com Silva Filho e Vedor (2000).	51
Tabela 7. Avaliação das atividades enzimáticas dos fungos endofíticos isolados folhas de barbatimão.	54
Tabela 8. Avaliação das atividades enzimáticas dos fungos endofíticos isolados de barbatimão.	55
Tabela 9. Avaliação das atividades enzimáticas dos fungos endofíticos isolados de folhas de lobeira.	57
Tabela 10. Avaliação das atividades enzimáticas dos fungos endofíticos isolados de ramos de lobeira.	59

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1. Cerrado: Aspectos gerais	13
2.2. <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	14
2.3. <i>Solanum lycocarpum</i> A. St. Hill.....	16
2.4 Fungos endofíticos	18
2.4. Biodiversidade de fungos endofíticos.....	20
2.5. Controle biológico de fungos fitopatogênicos por fungos endofíticos.....	21
2.6. Solubilização de fosfato por fungos endofíticos.....	23
2.7. Produção de enzimas por fungos endofíticos	24
3. OBJETIVOS.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Local da realização do trabalho e coleta do material vegetal	28
4.2. Isolamento dos fungos endofíticos a partir de plantas da espécie <i>S.adstringens</i> e <i>S. lycocarpum</i> St. Hill.	28
4.3. Extração de DNA dos fungos endofíticos.....	29
4.4. Amplificação da região ITS do rDNA	29
4.5. Purificação dos Produtos de PCR e análise das sequencias.....	30
4.6. Identificação molecular dos fungos endofíticos isolados de barbatimão e lobeira.....	30
4.7. Atividade antagônica de fungos endofíticos contra fungos fitopatogênicos	31
4.8. Solubilização de fosfato inorgânico.....	32
4.9. Avaliação da atividade enzimática	32
4.9.1. Atividade aminolítica	33
4.9.2. Atividade proteolítica	33
4.9.3. Atividade celulolítica.....	33
4.9.4. Atividade pectinolítica.....	34
4.9.5. Atividade lipolítica e esterolítica.....	34
5. RESULTADOS	35
5.1. Isolamento de fungos endofíticos isolados de <i>Stryphnodendron adstringens</i> - Barbatimão e <i>Solanum lycocarpum</i> St. Hill.- Lobeira.....	35
5.2. Identificação molecular dos fungos endofíticos	37

5.2.1. Identificação molecular dos fungos endofíticos associados à <i>Stryphnodendron adstringens</i>	37
5.3. Atividade antagonica contra fungos fitopatogênicos.....	40
5.3.1. Atividade antagonica dos fungos endofíticos de <i>S. adstringens</i> contra fungos fitopatogênicos	40
5.3.2. Atividade antagonica dos fungos endofíticos de <i>Solanum lycocarpum</i> St. Hill. (lobeira) contra fungos fitopatogênicos.....	44
5.4. Solubilização de fosfato.....	48
5.4.1. Solubilização de fosfato por fungos endofíticos isolados de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	48
5.4.2. Solubilização de fosfato por fungos endofíticos isolados de <i>Solanum lycocarpum</i> St. Hill.	49
5.5. Produção enzimática	52
5.5.1. Produção enzimática por fungos endofíticos de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	52
5.5.2. Produção de enzimas por fungos endofíticos associados à <i>Solanum lycocarpum</i> St. Hill.	55
6. DISCUSSÃO.....	62
7. CONCLUSÃO	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais contribuem de forma mais significativa para o fornecimento de compostos bioativos, especialmente as plantas e os micro-organismos que proporcionam substâncias estruturalmente diversificadas, as quais possuem inúmeras atividades biológicas e farmacológicas (NEWMAN e CRAGG, 2015; MATSUMOTO e TAKAHASHI, 2017). Os biomas brasileiros correspondem a uma porção expressiva da biodiversidade mundial devido aos altos níveis de riqueza de espécies fazendo com que o Brasil possua uma vocação natural para os produtos naturais (VALE et. al, 2010). Boa parte desta riqueza de espécies nativas é encontrada no mosaico de biomas do Cerrado, que atualmente por meio dos avanços das fronteiras agrícolas está entre os 25 “Hotspots” mundiais, que são conjuntos de ecorregiões prioritárias para conservação em nível mundial (SOUSA; SERRANO; LACAVA, 2017).

Visando evidenciar a importância da conservação das espécies do Cerrado e das suas interações biológicas com o ecossistema, podem-se destacar duas plantas, *Stryphnodendron adstringens* (Mart), cujo nome popular é barbatimão e *Solanum lycocarpum* A. St. Hill., comumente chamada de lobeira, ambas com propriedades medicinais descritas na literatura.

Stryphnodendron adstringens (Mart) é uma espécie da família Fabaceae e amplamente distribuída pelo Cerrado (MELO et al., 2007). A espécie *S. adstringens* possui atividade farmacológica principalmente pelo seu alto teor de taninos (LIMA et al., 2016). Além disso, possui aplicação medicinal por suas propriedades anti-inflamatórias (HENRIQUES et al., 2016), cicatrizantes (PASSARETTI et al., 2016) e antimicrobianas (LUIZ et al., 2015). Já a lobeira, *Solanum lycocarpum* St. Hill., que possui esse nome por ser alimento principal do lobo-guará atrai interesse por usada como sedativo no tratamento de epilepsia, por reduzir níveis de colesterol e no tratamento de diabetes (COSTA et al, 2015). Outras propriedades medicinais já foram descritas, como a utilização do fruto de lobeira no tratamento de asma, gripes e resfriados (ARAUJO; COELHO; AGRA, 2010).

O barbatimão, a lobeira, assim como todas as plantas, potencialmente vivem em associação com micro-organismos, os quais podem colonizar os espaços intercelulares do tecido vegetal (colonização endofítica), as superfícies dos vegetais (colonização epifítica) ou ocasionar danos aos tecidos vegetais (colonização patogênica) (BOGAS, 2010). A associação de plantas com os micro-organismos é uma área de exploração científica, principalmente no Brasil, um país de clima tropical e que possui uma considerável biodiversidade de flora e de microbiota (FAVORETTO, 2010). Sendo assim, pode se destacar os endofíticos, que são

bactérias e fungos, que habitam o interior das plantas, de modo geral, os caules, as raízes e as folhas, sem causar nenhuma alteração morfológica ou dano à planta hospedeira (AZEVEDO et al. 2000; LACAVA e AZEVEDO, 2013, 2014).

No geral, os endófitos adentram nas plantas por aberturas naturais e feridas, sendo a maior porta de entrada as raízes (MENDES e AZEVEDO, 2007). A descoberta destes micro-organismos foi em 1866, pelo fitopatologista Anton DeBary, que os descreveu sendo aqueles que colonizam assintomaticamente o interior de tecidos vegetais (PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Nas últimas décadas, os micro-organismos endofíticos têm sido estudados principalmente como agentes de controle biológico de doenças de plantas, promotores de crescimento vegetal, produtores de enzimas e ácidos orgânicos de interesse industrial e vetores para expressão de genes heterólogos nas plantas (LACAVA e AZEVEDO, 2013, 2014; AZEVEDO, 2014; BOGAS et al., 2015; LACAVA e SOUSA, 2016; SEBASTIANES; AZEVEDO; LACAVA, 2017; BATISTA et al., 2018; MAROLDI et al., 2018).

Por meio da conservação da riqueza das espécies do Cerrado, sobretudo dos vegetais, consequentemente resulta na preservação da microbiota associada aos mesmos. Além disso, estudos entre endófitos e planta é uma área com potencial significativo a se explorar (RODRIGUEZ; GONZALEZ; GIORDANO, 2016). Dentro deste contexto, o presente estudo visou estudar a diversidade filogenética de fungos endofíticos cultiváveis de folhas e ramos das espécies *S. adstringens* e *S. lycocarpum* St. Hill., e o potencial biotecnológico destes endófitos quanto a solubilização de fosfato inorgânico, produção de enzimas e biocontrole de fitopatógenos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Cerrado: Aspectos gerais

O Cerrado, também conhecido como savana brasileira é o segundo maior bioma do território brasileiro, com cerca de 2.036.448 km², em uma área que equivale a quase um quarto (23,52%) do território nacional (EMBRAPA, 2008; FERREIRA et al., 2013; RAMPELOTTO et al., 2013). No Cerrado estão presentes cerca de 30% da biodiversidade total brasileira, parte representativa é composta de espécies endêmicas que estão associadas à produção de produtos naturais (KLINK e MACHADO, 2005; FRANÇOSO et al., 2015) o que faz do bioma, desde 2010, uma das 25 áreas do mundo consideradas prioritárias para conservação em nível mundial (*hotspot*) (FAVORETTO, 2010; BATALHA, 2011; SOUSA; SERRANO; LACAVALHO, 2017).

As plantas nativas do Cerrado despertam interesse para produção de compostos bioativos devido à alta concentração de polifenóis, que elas possuem por estarem adaptadas às condições do bioma: solo ácido devido à concentração de alumínio, com poucos nutrientes, estresse hídrico, exposição aos raios UV e para se defender de ataques de herbívoros e fitopatógenos (BAILÃO et al., 2015).

Sendo assim, dentre as savanas do mundo, o Cerrado brasileiro é o que possui a maior biodiversidade de flora, mas também, possui um alto número de micro-organismos, aves, répteis e anfíbios e em menor número, os mamíferos (CARRANZA et al., 2014). A ocorrência natural do fogo faz com que as plantas apresentem específicas adaptações para se estabelecerem e assim determinam a diversidade de fitofisionomias que caracterizam esse bioma (KLINK e MACHADO, 2005; PINHEIRO; DURIGAN, 2012; PAUSAS 2017).

O Cerrado perdeu aproximadamente 55% da sua cobertura vegetal natural (ALEIXO et al., 2010; FRANCO et al., 2014), cerca de 11.812 km²/ano entre os anos de 2005 a 2010 (FRANÇOSO et al., 2015; BAILÃO et al., 2015; BEUCHLE et al., 2015). As causas deste desmatamento são principalmente pelos avanços das fronteiras agrícolas e da pecuária (CASTRO et al., 2009). Desta forma, o bioma se tornou fonte econômica nos cultivos de soja, arroz, milho e algodão, além de ser a maior área destinada para criação de gado (PREVEDELLO e CARVALHO, 2006).

Conseqüentemente, as atividades agrícolas geram perda e fragmentação de habitats, erosão de solo e invasão de espécies exóticas e uma alteração que acomete todo bioma, o ciclo de queimadas, que é algo natural do Cerrado (KLINK e MACHADO, 2005). Além disso, este

desmatamento coloca em risco os recursos naturais do cerrado, os estoques de carbono e toda função hidrológica do continente Sul-americano, além de colocar em risco toda biodiversidade associada a esse bioma (LOPES e MIOLA, 2010).

2.2. *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville

Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville é popularmente conhecida como barbatimão, barba-de-timão, borãozinho-roxo, casca-da-virgindade, uabatimó e casca-damocidade (CASTRO et al., 2009; LIMA et al., 2016). O vegetal pertence à família Fabaceae e a subfamília Mimosoidae sendo considerada uma leguminosa utilizada na medicina popular, principalmente por sua adstringência, ação cicatrizante (MACHADO et al., 2010; PASSARETTI et al., 2016), atividade antimicrobiana (FIORI et al., 2013), atividade antifúngica (MOREY et al., 2016; TROLEZI et al., 2017), atividade antioxidante (SOUZA et al., 2009; SABINO et al., 2017) e por ser agente anti-inflamatório (LIMA; MARTINS; DE SOUZA, 1998; HENRIQUES et al., 2016).

Além disso, esta planta é endêmica do Cerrado e possui uma ampla distribuição no território brasileiro, principalmente no Sudeste e Centro-oeste (SOUZA et al., 2009), sendo encontrada com mais frequência no cerrado típico, campo-sujo e cerradão (OLIVEIRA & FIGUEIREDO, 2007). O gênero *Stryphnodendron*, o qual a espécie está inserida possui cerca de vinte e nove espécies e está distribuído em Minas Gerais, São Paulo, Maranhão, Piauí e Mato Grosso do Sul (ALMEIDA et al., 1998).

A planta de barbatimão (Figura 1) é de pequeno porte, com altura variando de 2 a 8 metros, com o tronco tortuoso e casca rígida e rugosa. As folhas são bipinadas com 5 a 8 pares de pinas, com 6 a 8 pares de folíolos em cada pina. Os frutos são vagens de 6-9 centímetros de comprimento com frutificação que ocorre entre os meses de novembro a junho (LORENZI, 1998).



Figura 1. Árvore de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. Fonte: autor.

A casca do barbatimão é rica em taninos (10- 37%) de estrutura hidrolisável ácido gálico e taninos condensados, como a galocatequina e epigalocatequina (JACOBSON et al.,2005; SOUZA et al., 2009). Os taninos são substâncias encontradas no interior dos vacúolos vegetais, oriundas do metabolismo do carbono e são usadas na medicina por sua ação antioxidante, cicatrizante e anti-inflamatória (CASTRO et al., 2009). Ademais, essa espécie vegetal possui compostos bioativos isolados como alcaloides, flavonoides, esteroides, estilbenos, que são substâncias com atividade antioxidante, uma vez que atuam como sequestradores de radicais de oxigênio. Também possui inibidores de tripsina que são responsáveis pela adstringência e precipitação de proteínas solúveis (SOUZA et al., 2007; LUCENA; MENDES; BRANDEBURGO, 2009).

Em 2009 a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos publicaram o barbatimão na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) entre as espécies vegetais com propriedade medicinais para uso no SUS (Sistema Único de Saúde) (BRASIL, 2010; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2011). Para demonstrar a atividade farmacológica da planta é comercializada a pomada denominada de FITOSCAR®. O medicamento é composto por extrato seco de *S. adstringens* a 50% (60mg) e excipientes (macrogol, propilenoglicol,

metilparabeno e probilparabeno) e é indicado como agente cicatrizante em lesões de tecidos epiteliais (MENDONCA et al., 2012).

Além disso, o barbatimão tem uso popular terapêutico sendo empregado como cicatrizante e antiulcerígeno, no tratamento de problemas ginecológicos, de leucorreia, diarreia e disenteria (FERREIRA; SILVA; SOUZA, 2013; HENRIQUES et al., 2016). Segundo Santana e seus colaboradores (2016) que estudaram plantas medicinais usadas por uma comunidade quilombola na costa atlântica da Bahia, o barbatimão foi considerado uma das espécies que mais despertou interesse farmacológico por sua aplicação no tratamento de feridas, inflamações, problemas vaginais e gastrite. Sendo assim, é relevante o estudo do vegetal com o intuito de preservar a espécie, o Cerrado e os fungos endofíticos que vivem em associação com as plantas.

2.3. *Solanum lycocarpum* A. St. Hill.

Solanum é um dos 150 gêneros da família Solanaceae com ampla distribuição na América do Sul. Este gênero desperta interesse por ter espécies cultivadas para alimentação, como o tomate (*Solanum lycopersicum*), berinjela (*Solanum melongena*) e a batata (*Solanum tuberosum*) (COSTA et al., 2015). Além disso, inclui a espécie em estudo, *Solanum lycocarpum* A. St. Hill., popularmente conhecida como lobeira, fruto-do-lobo, jurubebao ou maçã do cerrado (MOURA; OLIVEIRA; CHAVES, 2010).

A lobeira é uma espécie típica do Cerrado sendo comumente encontrada na região central e também nos estados do Rio de Janeiro, Pará, Amazonas e Paraná. É considerada uma planta daninha por ser típica de área antrópicas, como terras ácidas e pobres em nutrientes podendo comumente ser encontrada em bordas de fragmentos (GALLON et al., 2015). Por ocupar estas áreas, a espécie vegetal atua como um *stepping-stone*, que auxilia na conectividade genética entre as populações (MOURA et al., 2011).

Além disso, cerca de 100 espécies do gênero *Solanum* possuem atividades biológicas descritas e se fazem importantes na biossíntese de heterosídeos alcalóidicos ou glicoalcalóides (MUNARI et al., 2014; BAILAO et al., 2015). Dentre os frutos das espécies de *Solanum*, o fruto de *S. lycocarpum* A. St. Hill. apresentou concentração mais expressiva de dois compostos comumente produzidos por este gênero, a solasonina e solamargina, os quais têm sido estudados como anti-parasitas, com ação contra protozoários (MARTINS et al., 2015),

antifúngico (NARUZAWA e PAPA, 2011), em algumas linhagens de células tumorais (MUNARI et al., 2014; TIOSSI et al., 2014) e no tratamento de diabetes.

Yoshikawa e seus colaboradores (2007) realizaram um estudo com extrato metanólico de frutos de lobeira, os resultados mostraram efeito inibitório no aumento dos níveis de glicose em ratos que recebiam alta concentração de sacarose via oral. Além disso, segundo Costa e seus colaboradores (2015) as folhas de lobeira possuem potencial antibacteriano, anti-inflamatório e antioxidante devido às concentrações de polifenóis, como os flavonoides, que são metabólitos secundários produzidos naturalmente pela planta como forma de defesa contra herbivoria ou ataque de fitopatógenos. Ademais, outros compostos bioativos já foram isolados, como lobofrusídeo (pseudoalcaloide esteroideal oliglicosídico), loconosídeos Ia, Ib, II, III, IV (saponinas esteroídais) e polissacarídeos (MARTINS, 2013; TIOSSI et al., 2012).

O vegetal *S. lycocarpum* (Figura 2) possui porte arbustivo ou arbóreo, perene, atinge cerca de quatro metros de altura. É revestido de densos pelos, ramos lenhosos, (VIDAL; STACCIARINI-SERAPHIN; CAMARA, 1999) folhas pecioladas e raízes profundas (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2003). A planta é considerada de fácil cultivo e alvo de estudo, uma vez floresce o ano inteiro (MOURA; OLIVEIRA; CHAVES, 2010).



Figura 2. Árvore de *Solanum lycocarpum* A. St. Hill. Fonte: autor.

Os frutos são globosos, atingem cerca de 8 a 12 cm, tem a cor verde, cuja massa varia de 400 a 900g e a colheita é entre julho e janeiro (SILVA et al., 1994). Segundo uma análise nutricional do fruto foi comprovado altos teores de vitamina C, fósforo e ferro, sendo rica fonte nutricional (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2003), principalmente para o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*). O mamífero possui 50% da sua dieta baseada nos frutos de lobeira, os quais possuem ação terapêutica contra verme-gigante-dos-rins, doença fatal ao animal, que é o principal dispersor de sementes desta espécie (MOURA; OLIVEIRA; CHAVES, 2010).

Devido às propriedades medicinais associadas e a fácil obtenção do vegetal oriundo do Cerrado, este estudo preconiza o isolamento de fungos endofíticos isolados de lobeira, enfatizando a obtenção de produtos naturais de interesses biotecnológicos e farmacêuticos.

2.4 Fungos endofíticos

Os fungos endofíticos são micro-organismos que habitam, em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, o interior de plantas sem causar doenças e sem produzir estruturas externas visíveis em seu hospedeiro (AZEVEDO et al., 2000; TAN e ZOU, 2001; OWEN e HUNDLEY, 2004; AZEVEDO, 2014).

Uma redefinição de micro-organismo endofítico foi realizada por Azevedo e Araújo (2007), que considera a definição anterior, mas também acrescenta uma divisão dos endófitos em dois tipos: Tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta e tipo II, os que produzem estruturas externas à planta. Sendo assim, os micro-organismos endofíticos habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar nenhum prejuízo ao hospedeiro e são considerados fonte de moléculas bioativas e possuem aplicação nos processos biotecnológicos, contudo, o potencial desses fungos ainda não é totalmente explorado (SURYANARAYANAN et al., 2009; CHEN et al., 2010; RIVERA-ORDUNA et al., 2011; LACAVA e AZEVEDO, 2013, 2014).

Os micro-organismos endofíticos podem colonizar os tecidos vegetais por aberturas naturais (via estômatos ou hidatódios), produzindo enzimas líticas capazes de degradar a parede vegetal ou por feridas ocasionadas por insetos ou fungos fitopatogênicos, sendo que a raiz é porta de entrada mais utilizada (AZEVEDO, 1998; ARAÚJO et al., 2014). Além disso, a colonização pelos endófitos nos vegetais pode ser por meio das sementes do hospedeiro, quando o micro-organismo endofítico é difundido sistematicamente entre gerações da planta e pode se instalar durante toda a vida hospedeira (PETRINI, 1991).

Toda planta superior existente pode abrigar diferentes espécies de fungos endofíticos, mas existem espécies que são mais frequentes em um determinado hospedeiro (espécies dominantes) (SPECIAN et al., 2014; PAMPHILE et al., 2017). Há estudos realizados com fungos endofíticos isolados de plantas tradicionalmente cultivadas no Brasil, como cana-de-açúcar (STUART et al., 2010), soja (PIMENTEL et al., 2006; BERNARDI-WENZEL et al., 2012) e café (SANTAMARIA e BAYMAN, 2005).

A interação dos endófitos com a planta não é completamente compreendida podendo variar de um hospedeiro para outro, mas os mecanismos que os micro-organismos endofíticos e os fitopatógenos usam para colonizar e se estabelecer no hospedeiro são similares (BOGAS, 2010). Essa interação mutualística fungo-planta sugere que os fungos endofíticos coevoluíram com seus hospedeiros, ao passo que o vegetal proporciona nutrientes e proteção para o fungo, e em troca recebe compostos químicos, como enzimas, alcaloides e antibióticos fazendo com que a planta tenha maior resistência em ambientes de estresse causado por fatores biológicos (inseto, herbívoros, micro-organismos) e fatores abióticos (pH, temperatura, estresse hídrico) (LACAIVA; SEBASTIANES; AZEVEDO, 2010; PAMPHILE et al., 2017). Ademais, por meio desta interação, o endófito pode produzir as mesmas substâncias químicas da planta que o hospeda indicando haver uma transposição de genes entre as plantas e fungos (AZEVEDO, 1998; ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2013; KUSARI et al., 2013; LUDWIG-MÜLLER, 2015).

O interesse científico por produtos naturais oriundos de fungos endofíticos vem crescendo pelo fato de ser uma nova fonte de biomoléculas ativas de estrutura única e com grande atividade biológica, que desperta interesse na indústria farmacêutica, na agricultura e na biotecnologia (LUNARDELLI et. al, 2016). O que demonstra isto é a descoberta da produção do composto anticancerígeno, o taxol, um diterpenoide produzido pela planta *Taxus brevifolia*, usado no tratamento de câncer mamário e de útero, que também é produzido por um fungo endofítico, *Taxomyces andreanae*, isolado do vegetal (STIERLE; STROBEL; STIERLE 1993).

Além disso, por ocuparem o mesmo nicho que fitopatógenos, os fungos endofíticos são uma ferramenta emergente no controle biológico de insetos-pragas da agricultura devido a sua ação contra herbívoros, nematoides parasitas de plantas e micro-organismos fitopatogênicos (LACAIVA; SEBASTIANES; AZEVEDO, 2010; BOGAS et al., 2015). O mecanismo de ação dos fungos endofíticos neste controle biológico pode ser associado à produção de metabolitos ou toxinas, como no caso do *Beauveria spp.*, que produz metabolitos como beauvericim, bassialcanoide e beauverioloide que possui ação no controle de artrópodes

(VEGA et al., 2008; VALERO-JIMÉNEZ et al., 2016), por meio de competição por espaço e nutrientes e/ou pela produção de compostos químicos como alcaloides e enzimas (BOGAS, 2010; FILLAT et al., 2017).

Ademais, os fungos endofíticos são responsáveis pela produção de enzimas de interesse industrial, tais como celulases, xilanases, pectinases e amilases (LACAVA; SEBASTIANES; AZEVEDO, 2010). Os fungos endofíticos no período de colonização do vegetal são capazes de degradar paredes celulares e facilitar sua entrada no hospedeiro por meio da produção de enzimas líticas (pectinases, celulases e lipase). As enzimas também funcionam como um modo de resistência para o fungo para superar as defesas da planta durante a invasão microbiana e como uma forma dos fungos obterem alimentos para seu hospedeiro, além de serem necessárias para o crescimento e manutenção do organismo, como é o caso das proteases e das endonucleases (TAN & ZOU, 2001; ORNALDELLI et al., 2012).

Conforme visto, os fungos endofíticos são empregados para diversos fins e o entendimento das interações entre fungos endofíticos e as plantas hospedeiras podem abrir novas perspectivas para bioprospecção de moléculas biologicamente ativas e estudos de diversidade desses organismos promissores nas áreas agrícolas, médicas e farmacêuticas.

2.4. Biodiversidade de fungos endofíticos

Os fungos são presentes qualquer nicho ecológico sendo encontrados em quase todos ambientes terrestres constituindo um grupo grande, heterogêneo e uma fonte de compostos com atividade biológica comprovada e de novas biomoléculas. Estima-se que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos e apenas 90 mil espécies foram catalogadas (ESPÓSITO e AZEVEDO, 2010) evidenciando o potencial de exploração destes micro-organismos.

No isolamento de micro-organismos endofíticos, os fungos são frequentemente os mais isolados, representando em uma fonte de diversidade genética com muitas espécies ainda não descritas (LACAVA; SEBASTIANES; AZEVEDO, 2010; ARAÚJO et al., 2014). Um estudo realizado por Impullitti e Malvick (2013) que analisou a diversidade de fungos endofíticos associados à soja, uma das principais culturas da produção agrícola do Brasil teve como resultado os seguintes gêneros, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Diaporthe* e *Epicoccum* evidenciando a biodiversidade desses fungos em plantas já tradicionalmente cultivadas.

Outro estudo realizado por Ribeiro e seus colaboradores (2018) que objetivou analisar a diversidade fungos endofíticos associados *Pachystachys lutea* (planta ornamental conhecida como camarão amarelo) teve como resultado a predominância do gênero *Diaphorte*, mas

também *Colletotrichum*, *Phyllosticta*, *Xylaria*, *Nemania* e *Alternaria*. Já Sebastianes et. al (2013) estudaram a diversidade de fungos endofíticos associados ao mangue do Litoral de São Paulo e como resultados tiveram 34 gêneros diferentes da comunidade endofítica fúngica, sendo que os gêneros mais frequentes foram *Diaphorthe*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Xylaria*.

Com base nos estudos de diversidade de fungos endofíticos nota-se que todas as plantas possuem um ou mais gêneros de fungos associados a elas (ALURAPPA et al., 2018). Para a identificação das cepas isoladas há os marcadores morfológicos, como as estruturas somáticas e estruturas esporulantes, a característica dos esporos, quando presentes ou a característica da colônia com base na taxa de crescimento do fungo são importantes na classificação e na identificação por taxonomia clássica (TAKAHASHI et al., 2017).

Outra forma de identificar os micro-organismos é explorando a biologia molecular, a qual tem facilitado à determinação dos gêneros e/ou espécies de fungos devido à sensibilidade, especificidade e por um enorme número de sequências específicas de DNA de espécies fúngicas que se encontrarem depositadas em um banco de dados (LEITE et al., 2013).

2.5. Controle biológico de fungos fitopatogênicos por fungos endofíticos

Em países como o Brasil que a agricultura representa uma importância na economia é necessário investir em novas formas para evitar doenças que geram perdas nas colheitas, geralmente ocasionadas por insetos herbívoros, micro-organismos fitopatogênicos e nematoides parasitas de plantas (LACAVA; SEBASTIANES; AZEVEDO, 2010; LACAVA e AZEVEDO, 2013, 2014; AZEVEDO, 2014). De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) estima-se que 25% das culturas mundiais são afetadas por alguma doença de planta todo ano (KATOCH e PULL, 2017).

A principal medida usada no controle de fitopatógenos é a aplicação de fungicidas e inseticidas (insumos agrícolas), os quais são relativamente de baixo custo, porém são tóxicos ao homem durante a aplicação e pelos resíduos que são deixados nos alimentos (COOK, 1993; TALAPATRA et al., 2017). Ademais, os insumos agrícolas possuem componentes químicos que podem causar problemas ambientais como contaminação de solo, águas superficiais e subterrâneas, ocasionar eliminação de espécies úteis, como insetos controladores de pragas e micro-organismos em associação com as plantas (micro-organismos

endofíticos e epifíticos) e perder sua efetividade devido à seleção de resistência em populações de fitopatógenos e pragas (LACAVA e AZEVEDO, 2014; FERREIRA et al., 2015).

Diante da necessidade de reduzir o uso desses insumos na agricultura, mas objetivando o rendimento econômico das colheitas, o controle natural e biológico vem despertando cada vez mais interesse de pesquisadores (LACAVA; SEBASTIANES; AZEVEDO, 2010; LACAVA e AZEVEDO, 2014).

Segundo Guetsky e seus colaboradores (2002) o controle biológico é uma estratégia ao uso de agroquímicos, pois trata-se de uma medida não-química de contenção de um fitopatógeno. Por ocuparem um nicho ecológico semelhante ao dos fitopatógenos, os fungos endofíticos são importantes no controle biológico dos mesmos, geralmente atuando por micoparasitismo devido a produção de antibióticos, por competição por nutrientes e/ou espaço, produção de enzimas envolvidas na hidrólise da parede celular e por induzir a planta a desenvolver mecanismos de defesa e resistência (LACAVA e AZEVEDO, 2014; TALAPATRA et al., 2017).

No controle biológico os fungos endofíticos podem atuar como micoparasitas que produzem enzimas (β -1,3 glucanases e quitinases) que degradam a parede celular do fungo parasita e assim, conseguem extrair os nutrientes do hospedeiro (CAO et al., 2009; LEITE, 2010).

Segundo um estudo realizado por Toghueo e colaboradores (2016) com duas espécies de *Trichoderma* spp., fungo endofítico mais utilizado no controle biológico por ter atividade sob diversas espécies de fitopatógenos, foi testado contra *Fusarium solani*, fungo fitopatogênico que causa doença no feijão. Os resultados deste estudo mostraram que o endófito obteve um índice de antagonismo contra *F. solani* variando entre 27% a 86% e mostraram que as espécies de *Trichoderma* inibem o crescimento do micro-organismo alvo por crescerem mais rápido que o patógeno. Além disso, estes fungos também competem por nutrientes, limitando-os e causando morte de fitopatógenos.

Na antibiose, os endófitos produzem compostos antifúngicos associados ao metabolismo secundário que é capaz de matar, inibir o crescimento ou a reprodução de micro-organismos fitopatogênicos (SARAIVA et al., 2014; MACHADO, 2015). Outra forma de controle biológico de doenças é a indução de resistência sistêmica (IRS). As plantas possuem mecanismos de defesa que são aparentemente inativos ou latentes. Quando o fungo endofítico penetra na planta induz a mesma produzir compostos que atuam sobre o patógeno impedindo o processo de infecção e/ou colonização ou modificar sua morfologia. As alterações

morfológicas e fisiológicas podem dificultar a entrada do patógeno e seu desenvolvimento na planta hospedeira, neste caso, pode ter aumento da parede celular por deposição de lignina, glucanas, aumento da espessura da cutícula e a síntese de fitoalexinas que são compostos antimicrobianos de baixo peso molecular (PEIXOTO-NETO; AZEVEDO, 2003; BERNARDI-WENZEL et al., 2012).

Sendo assim, a utilização dos endófitos no controle biológicos de pragas tem mostrado resultados promissores e ganhado destaque nas últimas décadas abrindo novas perspectivas e alternativas, principalmente por reduzir o uso de agroquímicos na agricultura (LACAVA e AZEVEDO, 2014; LACAVA e SOUSA, 2016).

2.6. Solubilização de fosfato por fungos endofíticos

O Fósforo (P), depois do Nitrogenio (N) é o elemento mais importante para o crescimento das plantas e corresponde a 0,2% do peso seco das mesmas (SCHACHTMAN; REID; AYLING, 1998). Esse componente é encontrado em ácidos nucleicos, fosfolípidos e na adenosina trifosfato (ATP) e desempenha um papel importante em processos metabólicos vegetais, como a fotossíntese, transferência de energia e regulação de vias metabólicas (RIBAS et al., 2016).

O P é abundante nos solos, a maior parte encontra-se na forma inorgânica, contudo, os vegetais são incapazes de utilizar o fosfato, pois cerca de 95% está indisponível (COUTINHO et al., 2014). Desta maneira, para compensar a deficiência são necessárias adubações com fosfatos solúveis em água para suprir as necessidades da planta. Contudo, as plantas absorvem pequenas porções deste fosfato e o resto é convertido em complexos insolúveis, se tornando indisponível para as mesmas (KAPRI e TEWARI, 2010). Além disso, para suprir a demanda desses fertilizantes, o Brasil importa cerca de 50% acarretando perdas em seu potencial competitivo (SILVA et al., 2010).

A aplicação frequente de fertilizantes fosfatos de alta solubilidade é ambientalmente indesejável, principalmente no Brasil, que é um país tropical com chuvas torrenciais, as quais agravam o arraste de fósforo para o leito dos rios, riachos e lagos (CHAVES e OBA, 2004). Sendo assim, uma forma alternativa segura e economicamente viável é o uso de micro-organismos solubilizadores de fosfato melhorando assim o aproveitamento dos fosfatos já existentes e a produção agrícola dos solos com baixa concentração de P (OLIVEIRA et al., 2012; LACAVA e AZEVEDO, 2013).

Os micro-organismos solubilizam o fósforo inorgânico por meio da liberação de ácidos orgânicos e/ou polissacarídeos extracelulares que são sintetizados por eles, tornando disponível para as plantas (KAPRI e TEWARI, 2010; MENDES et al., 2013). Já a mineralização do fósforo orgânico ocorre através da síntese de enzimas fosfatases, produzidas por micro-organismos, que catalisam a hidrólise de ésteres fosfóricos disponibilizando uma forma solúvel de fosfato inorgânico (RIBAS et al., 2016).

Desta maneira, estudos vêm sendo realizados explorando o potencial de fungos endofíticos para solubilizar fosfato. Entre os gêneros estão o *Trichoderma* (LEITAO et al., 2010; KAPRI e TEWARI, 2010; OLIVEIRA et al., 2012; e *Aspergillus* (MENDES et al., 2013) incitando novos estudos com fungos endofíticos nessa área.

2.7. Produção de enzimas por fungos endofíticos

As enzimas são normalmente de origem proteica (há enzimas constituídas de RNA, as ribozimas) produzidas pelas células com a finalidade de acelerar as reações químicas aumentando a velocidade de reação sendo essenciais para os processos biológicos de todos os organismos vivos (ANGELO, 2010; ORDANDELLI et al., 2012).

As enzimas possuem aplicação em diversos processos industriais como nas cervejarias, alimentos, combustíveis, ração animal, papel, indústria têxtil, detergente, entre outros. A utilização de enzimas nos processos apresentam grandes vantagens frente aos catalisadores químicos, por serem produtos naturais biológicos e biodegradáveis, por possuírem alta especificidade nas reações, por não serem consumidas durante o processo, por aumentar a velocidade de reação diminuindo a energia de ativação. Sendo assim, o mercado industrial procura novos métodos para tornar os produtos mais competitivos e com menos prejuízos ambientais (SPECIAN et al., 2015). As enzimas de origem microbiana vêm chamando a atenção, por apresentarem um grande potencial devido a grande biodiversidade que se tem de bactérias e de fungos e por sua produção em grande escala otimizando as condições dos processos fermentativos por mutações ou por meio da tecnologia do DNA recombinante (MONTEIRO e SILVA et al., 2009; MACHADO, 2015).

Os fungos endofíticos representam uma fonte de produção enzimática, principalmente pelo fato de que eles precisam produzir enzimas para obter nutrientes do ambiente, por precisarem colonizar os tecidos vegetais e se estabelecerem dentro da planta (BORGES et al., 2009).

Os processos industriais com enzimas microbianas podem ser divididos em dois grandes grupos basicamente, o que os micro-organismos crescem na superfície do meio de cultura e o que os micro-organismos crescem em submersos em meio de cultura líquido, a fermentação submersa (FS) (ANGELO, 2010). As enzimas hidrolíticas, como as amilases, proteases, xilases, celulasas e pectinases são geralmente produzidas por fermentação em meio sólido (FMS) e os micro-organismos mais adaptados a este tipo de fermentação são os fungos filamentosos, pois as condições são semelhantes ao seu habitat natural (BORGES et al. 2009; ORNANDELLI et. al, 2012).

A classe de enzimas hidrolíticas é responsável por catalisar a hidrólise de diversos substratos, como proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídios, ésteres e fosfatos orgânicos. As proteases e as endonucleases, que estão inclusas nessa classe e são necessárias para o crescimento e manutenção do organismo do fungo, outras enzimas como as carboidrases podem ser excretadas por algumas espécies de fungos, quando os mesmos são submetidos a condições ambientais específicas (ANGELO, 2010). Além disso, os fungos endofíticos podem excretar enzimas, como β -1,3 glucanases e quitinases, que degradam a parede celular de fungos fitopatogênicos (CAO et al., 2008).

As hidrolases catalisam a clivagem hidrolítica de ligações -C-O, -C-N, -C-C. As enzimas amilolíticas pertencentes a essa classe são responsáveis pela hidrólise do amido, um polímero de glicose que tem função de reserva nos vegetais. A degradação desse polímero é realizada por essas enzimas, que são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas presentes no amido, destacando as α -amilases e β -amilases (ANGELO 2010; ORLANDELLI et al., 2012). Segundo Kojo e seus colaboradores (2017) os fungos do gênero *Aspergillus* é o fungo filamentoso mais usado nos processos de produção de amilase. As amilases, destacando a α -amilase possuem aplicação industrial na indústria de alimentos, de papel, têxtil e de detergentes (MACHADO, 2015).

As proteases são enzimas responsáveis pela clivagem hidrolítica das ligações peptídicas das proteínas e participam de processos industriais de alimentos (laticínios, carnes e de detergentes). Também são usadas no tratamento de couro sendo uma forma de diminuir o uso de compostos químicos e poluentes (COOMBS, et al., 1999). Segundo Orlandelli e seus colaboradores (2017), os fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum* Sw destacando as espécies *Phoma herbarum* e *Schizophyllum commune* apresentaram alta atividade na produção de protease.

O polímero mais abundante na natureza é a celulose formada por unidades de glicose ligadas por ligações glicosídicas β -1,4 (SANTOS, 2016). As enzimas celolíticas são

responsáveis pela hidrólise dessas ligações liberando oligossacarídeos, celebiose e glicose e possuem aplicações nas indústrias têxtil, de papel e celulose e na produção de etanol (KUHAD; GUPTA; SINGH, 2011). Os fungos tem sido estudados quanto a produção de celulase destacando o *Trichoderma* (ROMERO et al., 1999; ELLILA et al., 2017) e *Neurospora crassa* (SZENGYEL et al., 2000; O'REILLY; TURNER, 2015).

Pectinases são capazes de hidrolisar ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica de substâncias pécnicas. Os fungos possuem destaque para a síntese destas enzimas sendo os mais utilizados em escala industrial. As pectinases são usadas na industrial têxtil e de papel degradando a camada de pectina que recobre as fibras de celulose (FREITAS et al., 2015).

As lipases e esterases são enzimas associadas ao metabolismo e hidrólise de lipídeos. O que diferencia uma enzima da outra é que as lipases atuam preferencialmente em substratos insolúveis e catalisam hidrólise de triacilgliceróis de cadeias longas e as esterases catalisam a hidrólise dos triacilgliceróis de cadeias curtas atuando na maioria das vezes em substratos solúveis em água. Ambas as enzimas podem ser encontradas em animais, vegetais e em células de micro-organismos. A aplicação de lipase é principalmente na produção de laticínios, já as esterases são utilizadas na fabricação de detergentes, papel e celulose e na produção de fármacos quirais (ORLANDELLI et al., 2012).

Sendo assim, o presente trabalho visou de estudar a diversidade dos fungos endofíticos associados a plantas medicinais do Cerrado (barbatimão e lobeira) e analisar o potencial biotecnológico dos mesmos para produção de enzimas, no controle de fungos fitopatogênicos e na solubilização de fosfato.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo o isolamento e a identificação molecular de fungos endofíticos associados a espécies vegetais do Cerrado com potencial biotecnológico para antagonismos de fitopatógenos, solubilização de fosfato inorgânico e produção de enzimas. Para isso, os objetivos específicos foram:

3.2 Objetivos específicos

- 1) Isolar de folhas e ramos e identificar genotipicamente a comunidade fúngica endofítica cultivável associada ao barbatimão e a lobeira;
- 2) Avaliar *in vitro* o potencial antagônico dos isolados fúngicos em relação a fungos fitopatogênicos;
- 3) Avaliar *in vitro* o potencial para solubilização de fosfato inorgânico pelos isolados fúngicos;
- 4) Avaliar *in vitro* a produção das enzimas amilase, celulase, pectinase, protease, lipase e esterase pelos isolados endofíticos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Local da realização do trabalho e coleta do material vegetal

Amostras sadias de folha e ramos de *S. adstringens* e *S. lycocarpum* foram coletadas, sob as mesmas condições climáticas e no mesmo dia, na reserva ambiental do Cerrado (21°58', 47°52'W) da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, Brasil. Foi realizada uma única coleta de cada espécie vegetal no mês de abril de 2016, na parte manha, em uma temperatura no local de $\pm 21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Em seguida, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB), Departamento de Morfologia e Patologia localizado no Campus da Universidade de São Carlos, São Carlos- SP, Brasil.

4.2. Isolamento dos fungos endofíticos a partir de plantas da espécie *S.adstringens* e *S. lycocarpum* St. Hill.

As amostras foram lavadas em água corrente para retirada de resíduos de solo e poeira. Em seguida, os ramos e folhas foram submetidos à desinfecção superficial por imersão (Araújo et al., 2014) em etanol 70% (v/v) por um minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) contendo de 2 a 2,5% de cloro ativo por dois minutos, novamente em etanol 70% (v/v) por trinta segundos sendo lavadas em água destilada esterilizada duas vezes após o processo.

Após a etapa de desinfecção, as folhas e os ramos foram fragmentados (cinco fragmentos por placa) e depositados em placa de Petri (90 mm de diâmetro) contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) (Kasvi) e adicionado de tetraciclina ($50\mu\text{g mL}^{-1}$), antibiótico para evitar o crescimento bacteriano.

Em seguida, as placas com tecido vegetal foram incubadas a 28°C e como controle, alíquotas de água destilada esterilizada utilizada no fim do processo de desinfecção superficial foram distribuídas em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA para avaliar se a desinfecção foi bem sucedida. As placas de Petri foram observadas diariamente, até sete dias, para verificar crescimento fúngico a partir do material vegetal. Os fungos detectados foram repicados por estrias de esgotamento em placas de Petri com BDA sem antibiótico e mantidos sete dias na estufa B.O.D a temperatura de 28°C .

Os fungos purificados foram armazenados em duplicata em frascos com rosca do tipo penicilina com água destilada esterilizada e foram mantidos em temperatura ambiente, seguindo o método Castellani (1939).

As linhagens isoladas receberam códigos para facilitar a apresentação dos dados. Os endófitos de barbatimão receberam a sigla BFO (referente à espécie vegetal- barbatimão e do tecido de onde foi isolado- folha), BRA (referente à espécie vegetal- barbatimão e do tecido de onde foi isolado- ramo). Os fungos endofíticos de lobeira receberam códigos como LFO (referente à espécie vegetal- lobeira e ao tecido de onde foi isolada- folha) e LRA (referente à espécie vegetal- lobeira e ao tecido de onde foi isolada- ramo). Todos os ensaios foram iniciados com culturas novas crescidas em meio BDA a 28°C.

4.3. Extração de DNA dos fungos endofíticos

Para a extração de DNA dos fungos endofíticos, estes foram crescidos em BDA por 5-7 dias a 28° C na estufa B.O.D. Após o crescimento, os micélios dos fungos isolados foram macerados em 1500 µL de tampão de extração (TE) (SDS 10% 4mL; EDTA 0,5M pH 8,0 2mL; Tris-HCl 1M pH 8,0 8mL; NaCl 5M 2mL; Água ultrapura esterilizada) até se tornarem uma solução homogênea. Posteriormente, 1000 µL dessa solução foi transferida para um microtubo previamente autoclavado e foi adicionado 170 µL de SDS 10% (SDS 10,0g; água destilada 100mL), o qual foi incubado a 60° C durante 15 minutos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi então transferido para novos tubos contendo 300 µL de acetato de amônio, depois foi agitado e incubado no congelador a ± -6°C por 30 minutos. Após este tempo, o sobrenadante foi centrifugado nas mesmas condições anteriores e em seguida, o sobrenadante foi descartado. O DNA foi lavado com 500 µL de etanol 70%, centrifugado novamente por 5 minutos a 14000 rpm. Novamente o sobrenadante foi descartado, o DNA foi seco e eluído em 30 µL de H₂O ultrapura esterilizada.

4.4. Amplificação da região ITS do rDNA

A amplificação da região de DNA ribossomal, o ITS-5,8S-ITS2 foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (primers) ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS 4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et. al, 1990) pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando o termociclador (LongGene[®]) programado para realizar uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 35 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, seguido da extensão final de 72 °C por

10 minutos. A reação de amplificação foi realizada para um volume final 50 µL contendo 5 µL de High Fidelity Buffer (CELLCO BIOTEC); 7,4 µL de MgCl₂ [25 mM] (CELLCO BIOTEC); 2,0 µL de dNTP mix [5 mM]; 0,4 µL do oligonucleotídeo ITS1; 0,4 µL do oligonucleotídeo ITS4; 0,2 µL de Taq High Fidelity [2,5 U/µL] (CELLCO BIOTEC); 1 µL de DNA genômico; 33,8 µL de H₂O ultrapura autoclavada. No controle negativo continha todos os reagentes acima, com exceção do DNA genômico, que foi substituído por 1 µL de H₂O ultrapura autoclavada utilizada no processo. Após a ampliação, foi feito gel de agarose 0,8% usando o marcador de peso molecular (1Kb de DNA) (KASVI) e os produtos de PCR foram analisados pelo fotodocumentador (Gel DocTM EZ Imager).

4.5. Purificação dos Produtos de PCR e análise das sequencias

Os fragmentos da região ITS amplificados (cerca de 750 pb) foram purificados com o kit de purificação QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN). Sendo assim, para realização da purificação foi adicionado em um microtubo autoclavado 5 volumes de Tampão Buffer BP para 1 volume de reação de PCR e em seguida misturados. Para indicar que o pH ideal, a solução mudava a coloração, neste caso para amarelo/alaranjado. Posteriormente, todo o conteúdo do microtubo foi transferido para a coluna QIAquick e estes microtubos foram centrifugados por 60 segundos a 13.000 rpm. O conteúdo que passou pela coluna foi descartado e foi feita uma lavagem com 750µL do tampão PE e depois a amostra foi centrifugada na mesma condição anterior. Novamente, o conteúdo que passou pela coluna foi descartado e centrifugado por 60 segundos a 13.000 rpm. A parte da coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, foi adicionado 50 µL de água ultrapura autoclavada, depois de centrifugadas por 1 min, as amostras foram quantificadas e enviadas para o Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (USP) que realizaram o sequenciamento de produto de PCR.

4.6. Identificação molecular dos fungos endofíticos isolados de barbatimão e lobeira

As sequencias obtidas pelo sequenciamento foram utilizadas para identificação molecular dos isolados. As análises foram realizadas pelo software BioEdit Sequence Alignment Edit, onde as sequencias foram comparadas com base nos resultados observados

no BLASTn e obtidas na base de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.7. Atividade antagônica de fungos endofíticos contra fungos fitopatogênicos

Para analisar potencial de inibição de crescimento dos fungos endofíticos associados ao barbatimão e a lobeira contra fungos fitopatogênicos foram realizados testes de antagonismo *in vitro*. Os fungos fitopatogênicos utilizados foram: *Colletotrichum* sp., *Fusarium oxysporum* e *Lasiodiplodia subglosa*. Os fungos fitopatogênicos utilizados nesse trabalho fazem parte da coleção de culturas microbianas do LaMib. Para os testes de antagonismo procedeu-se da seguinte forma: disco de micélio contendo 0,5 cm de diâmetro do fungo endofítico foi inoculado em um dos lados de uma placa de Petri (90 mm de diâmetro) e, do outro lado da placa foi inoculado disco de micélio de 0,5 cm de diâmetro do fungo fitopatogênico a ser testado, de acordo com o Método da cultura pareada (MARIANO, 1993; ASSUMPCÃO et al., 2010) e como está exemplificado na Figura 3. A avaliação do experimento foi realizada quando o controle (placa contendo apenas o disco de micélio do fungo fitopatogênico) apresentou crescimento de uma extremidade à outra da placa de Petri. As placas foram incubadas na estufa BOD a 28 °C, de 3 a 7 dias, sendo o teste realizado em triplicata.

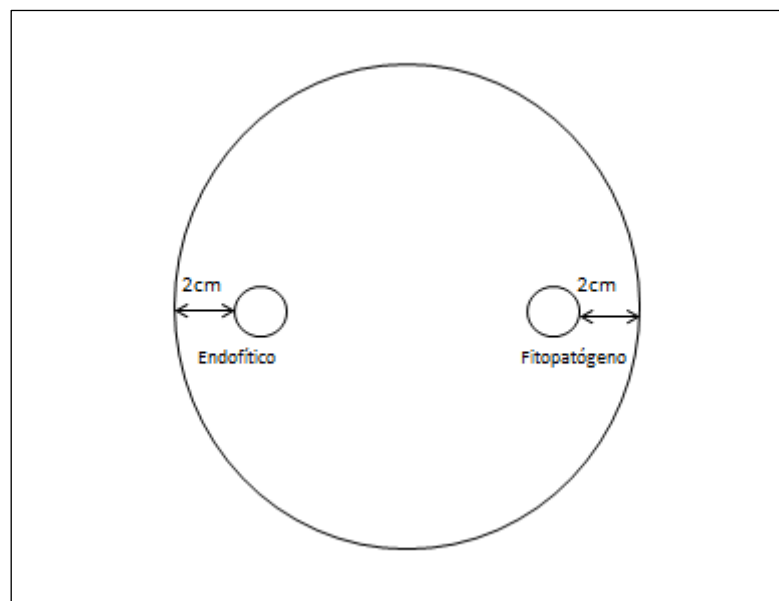


Figura 3. Modelo esquemático de uma placa de Petri representando a técnica de pareamento direto *in vitro* para avaliação do potencial antagônico dos fungos endofíticos associados ao barbatimão e a lobeira em relação ao fungo fitopatogênico testado. **Fonte:** autor.

Para avaliar o potencial de antagonismo dos isolados foram feitas as análises das interações endofítico-fitopatogênico baseadas na escala de Badalyan et al. (2002), com três

tipos de interação: A, B e C, aonde C é subdividida em CA1, CA2, CB1 e CB2, onde A representa o bloqueio de crescimento com contato micelial; B, o bloqueio de crescimento a distancia; C mostra o crescimento do endofítico sobre o fitopatogeno sem bloqueio de crescimento inicial; CA1 e CA2, o crescimento parcial e completo, respectivamente e CB1 e CB2 representa o crescimento parcial e completo, respectivamente, do endofítico sobre o fitopatogeno depois do bloqueio inicial a distância. O índice de antagonismo (IA) foi calculado segundo Quiroga et al., 2001 e Edignton et al. (1971) por meio da fórmula: $IA (\%) = (Dc - Dt / Dc) \times 100$; onde: Dc é diâmetro médio da colônia do patógeno da placa controle (sem antagonista) e Dt é o diâmetro médio da colônia do patógeno frente ao antagonista (isolado endofítico).

4.8. Solubilização de fosfato inorgânico

Para analisar a capacidade dos fungos endofíticos em solubilizar fosfato inorgânico, discos de micélios foram inoculados, em três pontos diferentes da placa de Petri, em triplicada, em meio de cultura sólido contendo: 10 g.L^{-1} de glicose; 5 g.L^{-1} de NH_4Cl ; 1 g.L^{-1} de NaCl ; 1 g.L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ de CaHPO_4 ; 15 g.L^{-1} de ágar (Kasvi); pH 7,2 a 28°C por 72 horas.

A presença de halo incolor ao redor das colônias indicou a capacidade dos isolados em solubilizar fosfato inorgânico. Para análise semi-quantitativa foram medidos os diâmetros dos halos claros formados ao redor de cada colônia (Dh), com auxílio de um paquímetro e os diâmetros das colônias correspondentes (Dc). Sendo assim, o índice de solubilização de fosfato (ISF) por meio da razão $(ISF) = (Dh)/(Dc)$, os endófitos que solubilizam mais fosfato inorgânico obtêm razões maiores (BERRAQUEIRO et al., 1976). A solubilização pode ser classificada como baixa ($ISF < 2$), média ($2 < ISF < 3$) e alta ($ISF > 3$) (SILVA FILHO e VIDOR, 2001).

4.9. Avaliação da atividade enzimática

A atividade enzimática dos isolados fungicos foram avaliados qualitativamente (ARAÚJO et al., 2014). Os testes enzimáticos foram feitos em placa de Petri (90 mm de diâmetro) contendo cerca de 20 mL do meio de cultura específico para cada enzima. Sendo assim, discos de micélio dos fungos previamente cultivados em BDA foram inoculados em três lugares da placa com cada meio específico. Após o crescimento dos fungos foi observado

a presença ou ausência de determinada atividade enzimática, por meio da formação de halo em torno da colônia.

O ensaio avaliou os fungos endofíticos quanto a sua capacidade de produzir enzimas, como: amilase, celulase, protease, pectinase (pH 5 e pH8), lipase e esterase. Sendo assim, discos de micélio dos fungos previamente cultivados em meio de cultura BDA (Kasvi) foram inoculados em três lugares da placa com cada meio de cultura específico.

As placas foram incubadas a 28 °C e observadas de acordo com o crescimento de cada fungo em cada meio específico. Os ensaios foram realizados em triplicata e como controle negativo, placas apenas com meio de cultura sem o fungo inoculado.

4.9.1. Atividade aminolítica

Os isolados foram cultivados em meio de cultura mínimo M9 contendo 200mL⁻¹ de solução estoque (64g.L⁻¹ de Na₂HPO₄. 7H₂O; 15g.L⁻¹ de KH₂PO₄; 2,5g.L⁻¹ de NaCl; 5g.L⁻¹ de NH₄Cl); 2mL de MgSO₄ 1M; 0,1 ml⁻¹ de CaCl₂ 1M, 10g. L⁻¹ de glicose e 15g.L⁻¹ de ágar (Kasvi), pH 7,2 contendo 0,5% de extrato de levedura e 1% de amido solúvel a 28°C durante 48 horas.

Após o crescimento dos fungos foram adicionados 10 mL de solução de iodo (Iodo 10 g; Iodeto de potássio (KI) 6 g; água destilada 20 mL; etanol 95% para completar 100 mL) e lavagem com água em seguida (a presença de um halo incolor em torno da colônia indicou produção de amilase).

4.9.2. Atividade proteolítica

Os fungos foram cultivados em meio de cultura Protease contendo: 5g.L⁻¹ de triptona; 2,5g.L⁻¹ de extrato de levedura; 1g.L⁻¹ de glicose; 2,5g.L⁻¹ de NaCl e 15g.L⁻¹ de ágar (Kasvi), pH 7,0. Após a esterilização adicionou-se 100mL de leite UTH desnatado. Após a incubação a 28°C durante 48 horas, a formação de um halo de degradação ao redor da colônia indicou a secreção de proteases.

4.9.3. Atividade celulolítica

Os isolados foram cultivados em meio de cultura mínimo M9 contendo 200mL^{-1} de solução estoque (64g.L^{-1} de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 15g.L^{-1} de KH_2PO_4 ; $2,5\text{g.L}^{-1}$ de NaCl ; 5g.L^{-1} de NH_4Cl); 2mL de MgSO_4 1M; $0,1\text{ ml}^{-1}$ de CaCl_2 1M, 10g.L^{-1} de glicose e 15g.L^{-1} de ágar (Kasvi), pH 7,2 contendo 0,5% de extrato de levedura e 1% de carboximetilcelulose (CMC) a 28°C durante 48 horas.

Após o crescimento dos fungos foram adicionados 10mL do corante Vermelho Congo (Vermelho Congo 1g em 1L de água destilada). Após 15 minutos com o corante, as placas foram lavadas com NaCl 5M seguindo a metodologia de Teather e Wood (1982). A formação de um halo amarelado/alaranjado ou incolor em torno da colônia indicou a secreção de celulase.

4.9.4. Atividade pectinolítica

Os isolados foram cultivados em meio de cultura mínimo M9 contendo 200mL^{-1} de solução estoque (64g.L^{-1} de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 15g.L^{-1} de KH_2PO_4 ; $2,5\text{g.L}^{-1}$ de NaCl ; 5g.L^{-1} de NH_4Cl); 2mL de MgSO_4 1M; $0,1\text{ ml}^{-1}$ de CaCl_2 1M, 10g.L^{-1} de glicose e 15g.L^{-1} de ágar (Kasvi) contendo 0,5% de extrato de levedura, 1% de pectina (v/v) a 28°C por 48 horas.

Após o crescimento dos fungos foram adicionados 10 mL de lugol e imediatamente efetuou-se a lavagem com água. A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou secreção de pectinases. O pH desse meio pode ser modificado para caracterização de duas diferentes pectinases: o meio com pH 8,00 é utilizado para caracterização de pectato liase e o meio com pH 5,0 para poligalacturonase.

4.9.5. Atividade lipolítica e esterolítica

Os fungos endofíticos foram cultivados em meio de cultura lipase/esterase contendo: 10g.L^{-1} de Peptona; 5g.L^{-1} de NaCl ; $0,1\text{g.L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 15g.L^{-1} de ágar (Kasvi), pH 7,4. Após a esterilização do meio de cultura foi adicionado 1% (v/v) de Tween 20, previamente esterilizado. Depois da incubação a 28°C por 48 horas, a formação de halo por cristais ao redor da colônia indicou a secreção de lipases. A mesma metodologia foi usada para a avaliação da produção de esterase, contudo, após a esterilização do meio de cultura foi adicionado 1% (v/v) de Tween 80 esterilizado. A formação de um halo claro ao redor da colônia indicou a secreção de esterase (SIERRA, 1957).

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento de fungos endofíticos isolados de *Stryphnodendron adstringens*-Barbatimão e *Solanum lycocarpum* St. Hill.- Lobeira

A partir do isolamento dos fungos endofíticos por fragmentação do tecido vegetal de folhas e de ramos foram obtidos, respectivamente quinze fungos endofíticos de folhas e seis de ramos, totalizando vinte e um isolados endofíticos. Na Figura 4 é possível observar o fenótipo de alguns desses isolados fúngicos já purificados.

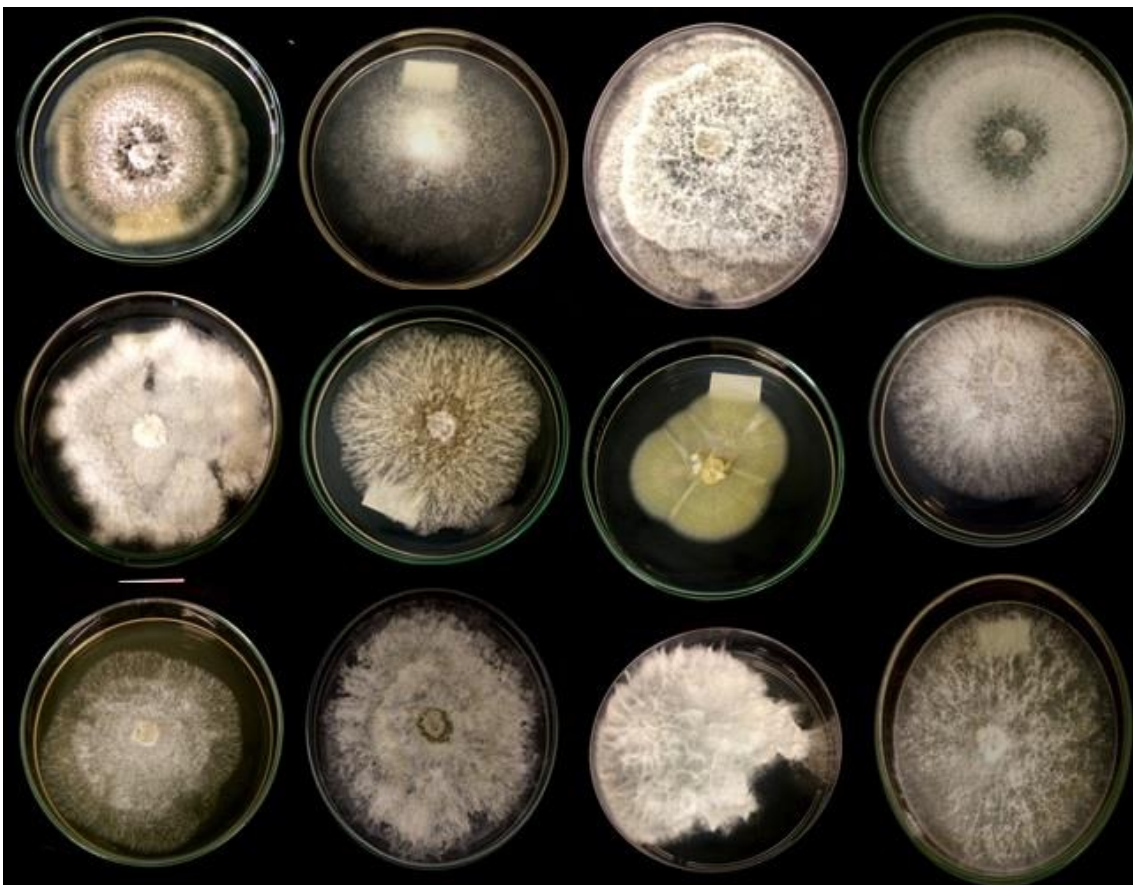


Figura 4. Amostragem da diversidade de fungos endofíticos de *Stryphnodendron adstringens* encontrada no Cerrado de São Carlos, estado de São Paulo. Fonte: autor.

O maior número de fungos endofíticos isolados foram nos fragmentos de folhas, como é possível observar na Figura 5:

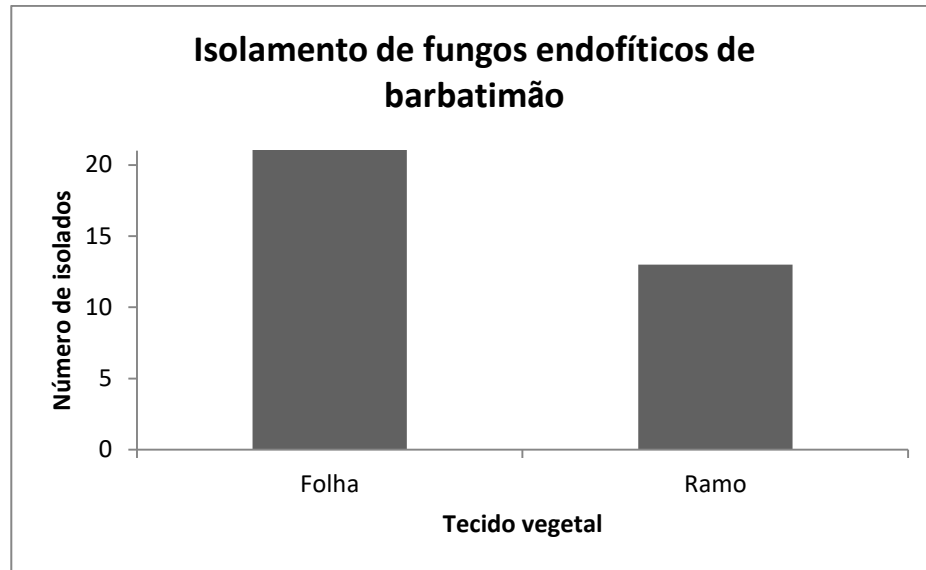


Figura 5. Quantidade de fungos endofíticos isolados a partir das folhas e de ramos de barbatimão

Dos fragmentos de folhas de *Solanum lycocarpum* St. Hill. foram isolados trinta e dois fungos endofíticos e de ramos foram obtidos treze isolados resultando em quarenta e cinco no total. Na Figura 6 é possível observar o fenótipo de alguns desses isolados fúngicos já purificados.



Figura 6. Amostragem de diversidade de fungos endofíticos isolados de *Solanum lycocarpum* St. Hill. encontrada no Cerrado de São Carlos, estado de São Paulo. **Fonte:** autor.

Similar ao resultado encontrado no barbatimão, o maior número de fungos endofíticos isolados foram nas folhas de lobeira, como demonstrado abaixo na Figura 7:

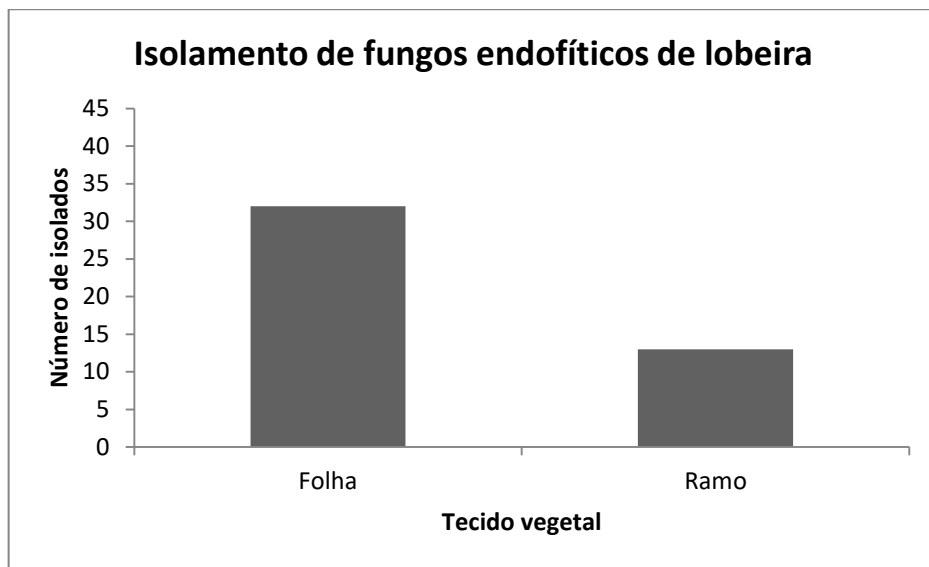


Figura 7. Quantidade de fungos endofíticos isolados a partir das folhas e de ramos de lobeira.

5.2. Identificação molecular dos fungos endofíticos

5.2.1. Identificação molecular dos fungos endofíticos associados à *Stryphnodendron adstringens*

Os fungos endofíticos associados à *S. adstringens* foram submetidos ao sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA e as sequências obtidas foram comparadas com aquelas depositadas com a utilização da ferramenta BLASTn no banco de dados do NCBI. Os gêneros e a porcentagem de identidade das sequências estão na Tabela 1.

Por meio do sequenciamento da região ITS do rDNA foi observado que a comunidade endofítica fúngica associada à *S. adstringens* é composta pelos seguintes gêneros: *Diaporthe*, *Neopestalotiopsis*, *Nigrospora*, *Paraconiothrium*, *Phomopsis*, *Pseudofusicoccum*, *Schizophyllum* e *Xenoacremonium*.

Tabela 1. Identificação molecular em nível de gênero dos fungos endofíticos associados a *S. adstringens* e o índice de identidade encontrado no NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Isolado	Identificação	Número de Acesso (NCBI)	Identidade (%)
BFO1	<i>Nigrospora</i> sp.	KY569632.1	100%
BFO2	<i>Nigrospora</i> sp.	KY569632.1	100%
BFO3	<i>Phomopsis</i> sp.	JX944170.1	100%
BFO4	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	MF150253.1	100%
BFO5	<i>Diaphorte</i> sp.	MF547407.1	100%
BFO6	<i>Phomopsis</i> sp.	MG775290.1	100%
BFO8	<i>Nigrospora</i> sp.	KY569632.1	100%
BFO12	<i>Schizophyllum</i> sp.	LC317779.1	100%
BFO14	<i>Nigrospora</i> sp.	KY569632.1	100%
BFO15	<i>Diaporthe</i> sp.	KY962984.1	100%
BRA1	<i>Neofusicoccum</i> sp.	MG775292.1	100%
BRA2	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	KT728919.1	100%
BRA3	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	KT728919.1	100%
BRA4	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	KT728919.1	100%
BRA5	<i>Xenoacremonium</i> sp.	KX881582.1	100%
BRA6	<i>Paraconiothrium</i> sp.	MG572394.1	100%
BFO7	Não identificado	-	-
BFO9	Não identificado	-	-
BFO10	Não identificado	-	-
BFO11	Não identificado	-	-
BFO13	Não identificado	-	-

5.3.2 Identificação molecular dos fungos endofíticos isolados de *Solanum lycocarpum* St. Hill.

Dos quarenta e cinco fungos endofíticos isolados de *S. lycocarpum* St. Hil., vinte e dois foram submetidos ao sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, com a utilização do programa BLASTn no banco de dados do NCBI e a identificação dos isolados encontra-se na Tabela 2.

De acordo com o resultado do sequenciamento dos fungos endofíticos associados a *S. lycocarpum* St. Hil. verificou-se sete gêneros: *Colletotrichum* sp., *Curvalaria* sp., *Diaporthe* sp., *Neurospora* sp., *Phlebiopsis* sp., *Phomopsis* sp. e *Schizophyllum* sp. Os mais dominantes foram *Phomopsis* sp. e *Diaporthe* sp.

Tabela 2. Identificação molecular em nível de gênero dos fungos endofíticos associados a *S. lycocarpum* St. Hil e o índice de identidade encontrado no NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Isolado	Identificação	Número de acesso (NCBI)	Identidade (%)
LFO2	<i>Diaporthe</i> sp.	KR023624.1	100%
LFO3	<i>Phlebiopsis</i> sp.	KP135404.1	99%
LFO5	<i>Schizophyllum</i> sp.	LC317779.1	100%
LFO6	<i>Phomopsis</i> sp.	JN153068.1	100%
LFO7	<i>Phomopsis</i> sp.	KX381154.1	94%
LFO11	<i>Diaporthe</i> sp.	MF663540.1	100%
LFO12	<i>Phomopsis</i> sp.	GQ370368.1	99%
LFO13	<i>Colletotrichum</i> sp.	MG812307.1	100%
LFO14	<i>Diaporthe</i> sp.	MF663540.1	100%
LFO15	<i>Diaporthe</i> sp.	MF663540.1	100%
LFO16	<i>Phomopsis</i> sp.	JN153068.1	100%
LFO20	<i>Phomopsis</i> sp.	KX381154.1	100%
LFO21	<i>Phomopsis</i> sp.	KX381154.1	100%
LFO22	<i>Phomopsis</i> sp.	KJ404215.1	99%
LFO23	<i>Phomopsis</i> sp.	KX381154.1	100%
LFO24	<i>Diaporthe</i> sp.	KU204568.1	100%
LFO27	<i>Curvalaria</i> sp.	MG571759.1	99%
LFO28	<i>Neurospora</i> sp.	KX987245.1	100%
LFO30	<i>Diaporthe</i> sp.	KY962984.1	100%
LRA7	<i>Phomopsis</i> sp.	KU204579.1	100%
LRA8	<i>Phomopsis</i> sp.	KJ404215.1	100%
LRA11	<i>Phomopsis</i> sp.	KX381154.1	100%
LFO1	Não identificado	-	-
LFO4	Não identificado	-	-
LFO8	Não identificado	-	-
LFO9	Não identificado	-	-
LFO10	Não identificado	-	-
LFO17	Não identificado	-	-
LFO18	Não identificado	-	-
LFO19	Não identificado	-	-

Tabela 2- Identificação molecular em nível de gênero dos fungos endofíticos associados a *S. lycocarpum* St. Hil e o índice de similaridade encontrado no NCBI (National Center for Biotechnology Information).

(continuação)

Isolado	Identificação	Número de acesso (NCBI)	Similaridade (%)
LFO25	Não identificado	-	-
LFO26	Não identificado	-	-
LFO29	Não identificado	-	-
LFO31	Não identificado	-	-
LFO32	Não identificado	-	-
LRA1	Não identificado	-	-
LRA2	Não identificado	-	-
LRA3	Não identificado	-	-
LRA4	Não identificado	-	-
LRA7	Não identificado	-	-
LRA8	Não identificado	-	-
LRA10	Não identificado	-	-
LRA11	Não identificado	-	-
LRA12	Não identificado	-	-
LRA13	Não identificado	-	-

5.3. Atividade antagônica contra fungos fitopatogênicos

5.3.1. Atividade antagônica dos fungos endofíticos de *S. adstringens* contra fungos fitopatogênicos

Dos vinte e um fungos endofíticos avaliados contra os fungos fitopatogênicos, quatro apresentaram alguma atividade antagônica contra os fungos *Colletotrichum* sp., cinco contra *Fusarium oxysporum* e três contra *Lasiodiplodia subglobosa* (Figura 8).

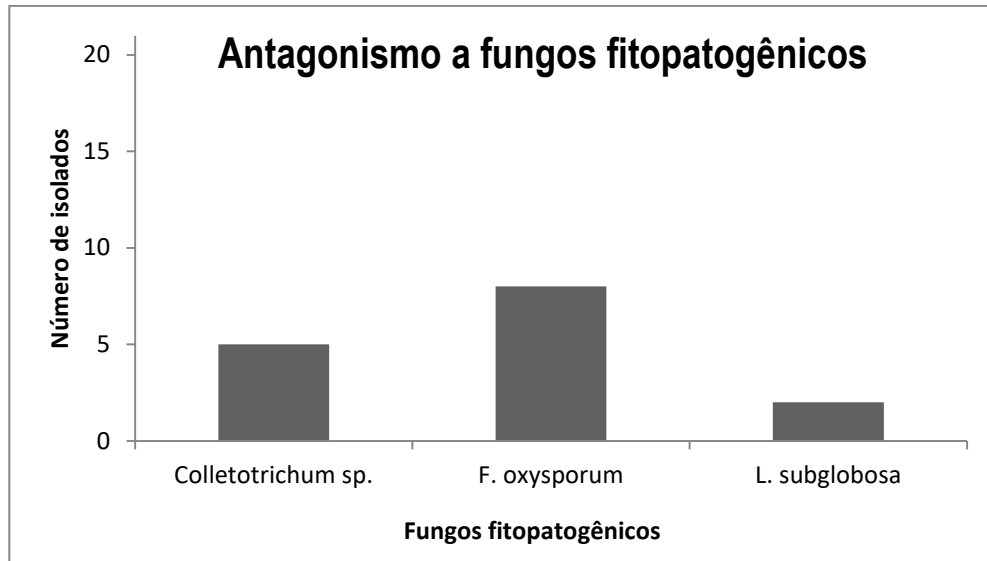


Figura 8. Atividade antagônica dos fungos endofíticos de *S. adstringens* contra *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum* e *Lasidiopodia subglobosa*.

Das interações apresentadas entre endófitos e fitopatógenos, três apresentaram interação do tipo A, com *deadlock* com contato micelial e um apresentou interação do tipo CA1, com crescimento parcial do endofítico sobre o fitopatógeno depois de *deadlock* inicial com contato micelial contra *Colletotrichum sp.*, cinco apresentaram interação do tipo A contra *F. oxysporum* e três apresentaram interação do tipo A contra *L. subglobosa*.

Observou-se que para ambos fitopatógenos a predominância das interações foi do tipo A, seguida da interação CA1. No *Colletotrichum sp.* o índice de antagonismo (IA%) (Edginton et al., 1971; Quiroga et al. 2001) variou de 35,71% a 85,36%. Contra o *F. oxysporum*, o índice de antagonismo variou entre 8,33% a 62,02% e contra *L. subglosa* variou de 28,57% a 45% (Figura 9) (Tabela 3).

Tabela 3. Interações baseadas na escala de Badalyan et al. (2002) entre fungos endofíticos isolados de folhas e de ramos de *Stryphnodendron adstringens* contra os fitopatógenos *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum* e *Lasiodiplodia subglobosa* e o índice de antagonismo em porcentagem (IA%) (Edginton et al., 1971; Quiroga et al. 2001).

Isolado	<i>Colletotrichum sp.</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Lasiodiplodia subglobosa</i>	
	Tipo de interação	%	Tipo de interação	%	Tipo de interação	%
BFO1	A	67,85	A	53,33	-	-
BFO2	-	-	-	-	-	-
BFO3	-	-	-	-	-	-
BFO4	-	-	-	-	-	-
BFO5	-	-	-	-	-	-
BFO6	-	-	-	-	-	-
BFO7	-	-	-	-	-	-
BFO8	-	-	-	-	-	-
BFO9	-	-	A	8,33	-	-
BFO10	-	-	-	-	-	-
BFO11	-	-	-	-	-	-
BFO12	-	-	-	-	-	-
BFO13	-	-	-	-	-	-
BFO14	-	-	-	-	-	-
BFO15	-	-	-	-	-	-
BRA1	A	63,41	A	62,02	-	-
BRA2	A	35,71	A	18,98	A	28,57
BRA3	CA1	85,36	A	40	A	40,98
BRA4	-	-	-	-	A	45
BRA5	-	-	-	-	-	-
BRA6	-	-	-	-	-	-
Controle	-	0	-	0	-	0

%: índice de antagonismo/ -: não apresentou antagonismo.

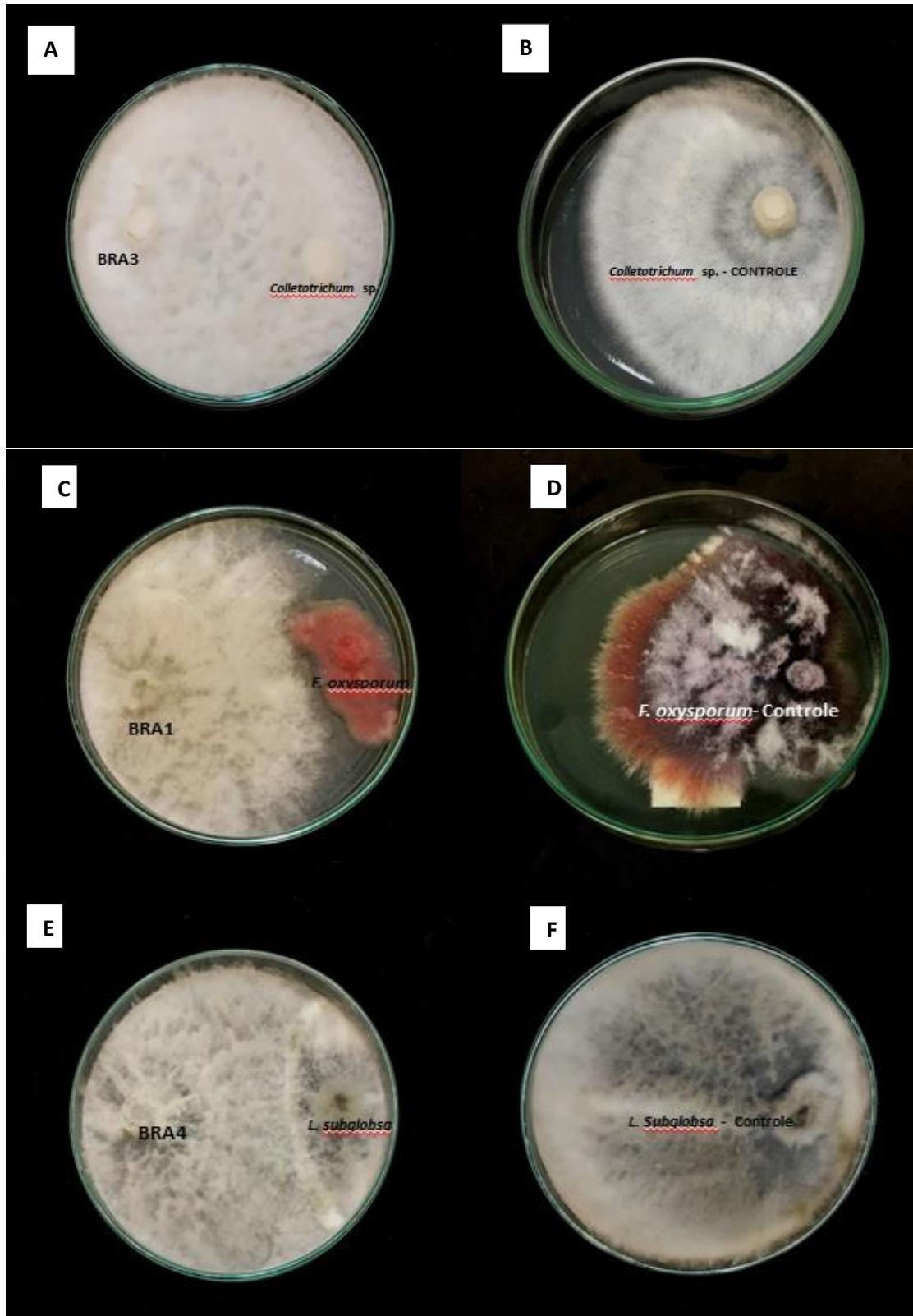


Figura 9. Interações apresentadas entre os fungos endofíticos isolados de folhas e ramos de *Stryphnodendron adstringens* e os patógenos avaliados. A) Interação tipo CA1, com crescimento parcial do endófito sobre o fitopatógeno depois do *deadlock* inicial com contato micelial contra *Colletotrichum* sp. (BRA3 com *Colletotrichum* sp). B) Controle do fitopatógeno *Colletotrichum* sp. C) Interação do tipo A com *deadlock* com contato micelial contra *Fusarium oxysporum* (BRA1 com *F. oxysporum*). D) Controle do fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. E) Interação do tipo A, *deadlock* com contato micelial contra *L. subglobosa* (BRA4 com *Lasiodiplodia subglobosa*). F) Controle do fitopatógeno *Lasiodiplodia subglobosa* sem o endófito.

5.3.2. Atividade antagônica dos fungos endofíticos de *Solanum lycocarpum* St. Hill. (lobeira) contra fungos fitopatogênicos

Dos 45 fungos endofíticos isolados de folhas e ramos de *Solanum lycocarpum* St. Hill., 5 apresentaram atividade antagônica contra *Colletotrichum* sp., 8 contra *Fusarium oxysporum* e 2 contra *Lasiodiplodia subglobosa*, conforme demonstrado na Figura 10.

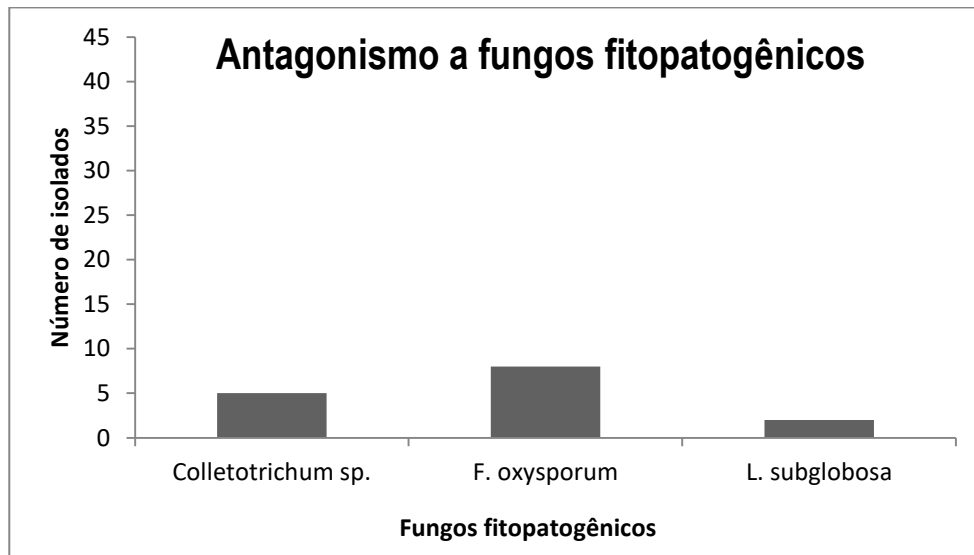


Figura 10. Atividade antagônica dos fungos endofíticos de lobeira contra *Colletotrichum* sp., *Fusarium oxysporum* e *Lasiodiplodia subglobosa*.

Das interações contra *Colletotrichum* sp. a do tipo A, com *deadlock* com contato micelial foi a mais recorrente, mas 2 fungos endofíticos apresentaram interação do tipo CA1, com crescimento parcial do endofítico sobre o fitopatógeno depois de *deadlock* inicial com contato micelial. Dos 8 endófitos com atividade antagônica contra *F. oxysporum*, 6 apresentaram interação do tipo A e 2 do tipo CA1. Já contra o fitopatogeno *L. subglobosa*, 1 apresentou interação do tipo A e o outro do tipo CA1.

O índice de antagonismo contra *Colletotrichum* sp. variou de 37,66% a 52%, em *F. oxysporum* variou de 9,58% a 65,71% e com *L. subglobosa* variou de 58,22% a 74,13% (Tabela 4) (Figura 11).

Tabela 4. Interações baseadas na escala de Badalyan et al. (2002) entre fungos endofíticos isolados de folhas e de ramos de *Solanum lycocarpum* St. Hill. contra os fitopatógenos *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum* e *Lasiodiplodia subglobosa* e o índice de antagonismo em porcentagem (IA%) (Edginton et al., 1971; Quiroga et al. 2001).

Isolado	<i>Colletotrichum sp.</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Lasiodiplodia subglobosa</i>	
	Tipo de interação	%	Tipo de interação	%	Tipo de interação	%
LFO1	A	52	-	-	-	-
LFO2	-	-	-	-	-	-
LFO3	-	-	-	-	-	-
LFO4	-	-	-	-	-	-
LFO5	-	-	-	-	-	-
LFO6	-	-	A	26,58	-	-
LFO7	-	-	-	-	-	-
LFO8	-	-	A	17,71	-	-
LFO9	-	-	-	-	-	-
LFO10	A	37,66	-	-	-	-
LFO11	-	-	-	-	-	-
LFO12	-	-	-	-	-	-
LFO13	-	-	-	-	-	-
LFO14	-	-	A	9,58	-	-
LFO15	-	-	-	-	-	-
LFO16	A	41,66	-	-	-	-
LFO17	-	-	A	32,83	-	-
LFO18	-	-	-	-	-	-
LFO19	-	-	-	-	-	-
LFO20	-	-	-	-	-	-
LFO21	-	-	-	-	-	-
LFO22	-	-	-	-	-	-
LFO23	-	-	-	-	-	-
LFO24	-	-	-	-	-	-
LFO25	-	-	-	-	-	-
LFO26	-	-	-	-	-	-
LFO27	-	-	-	-	-	-

Tabela 4. Interações baseadas na escala de Badalyan et al. (2002) entre fungos endofíticos isolados de folhas e de ramos de *Solanum lycocarpum* contra os fitopatógenos *Colletotrichum sp.*, *Fusarium oxysporum* e *Lasiodiplodia subglobosa* e o índice de antagonismo em porcentagem (IA%) (Edginton et al., 1971; Quiroga et al. 2001).

(continuação)

Isolado	<i>Colletotrichum sp.</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Lasiodiplodia subglobosa</i>	
	Tipo de interação	%	Tipo de interação	%	Tipo de interação	%
LFO28	-	-	-	-	-	-
LFO29	-	-	-	-	-	-
LFO30	-	-	-	-	-	-
LFO31	-	-	-	-	-	-
LFO32	-	-	A	21,51	-	-
LRA1	-	-	-	-	-	-
LRA2	-	-	-	-	-	-
LRA3	CA1	40	CA1	10	-	-
LRA4	CA1	45,12	A	36,70	CA1	74,13
LRA5	-	-	-	-	-	-
LRA6	-	-	-	-	-	-
LRA7	-	-	-	-	-	-
LRA8	-	-	-	-	-	-
LRA9	-	-	-	-	-	-
LRA10	-	-	-	-	-	-
LRA11	-	-	-	-	-	-
LRA12	-	-	-	-	-	-
LRA13	-	-	CA1	65,71	A	58,22
Controle	-	0	-	0	-	0

-%: índice de antagonismo/ -: não apresentou antagonismo.

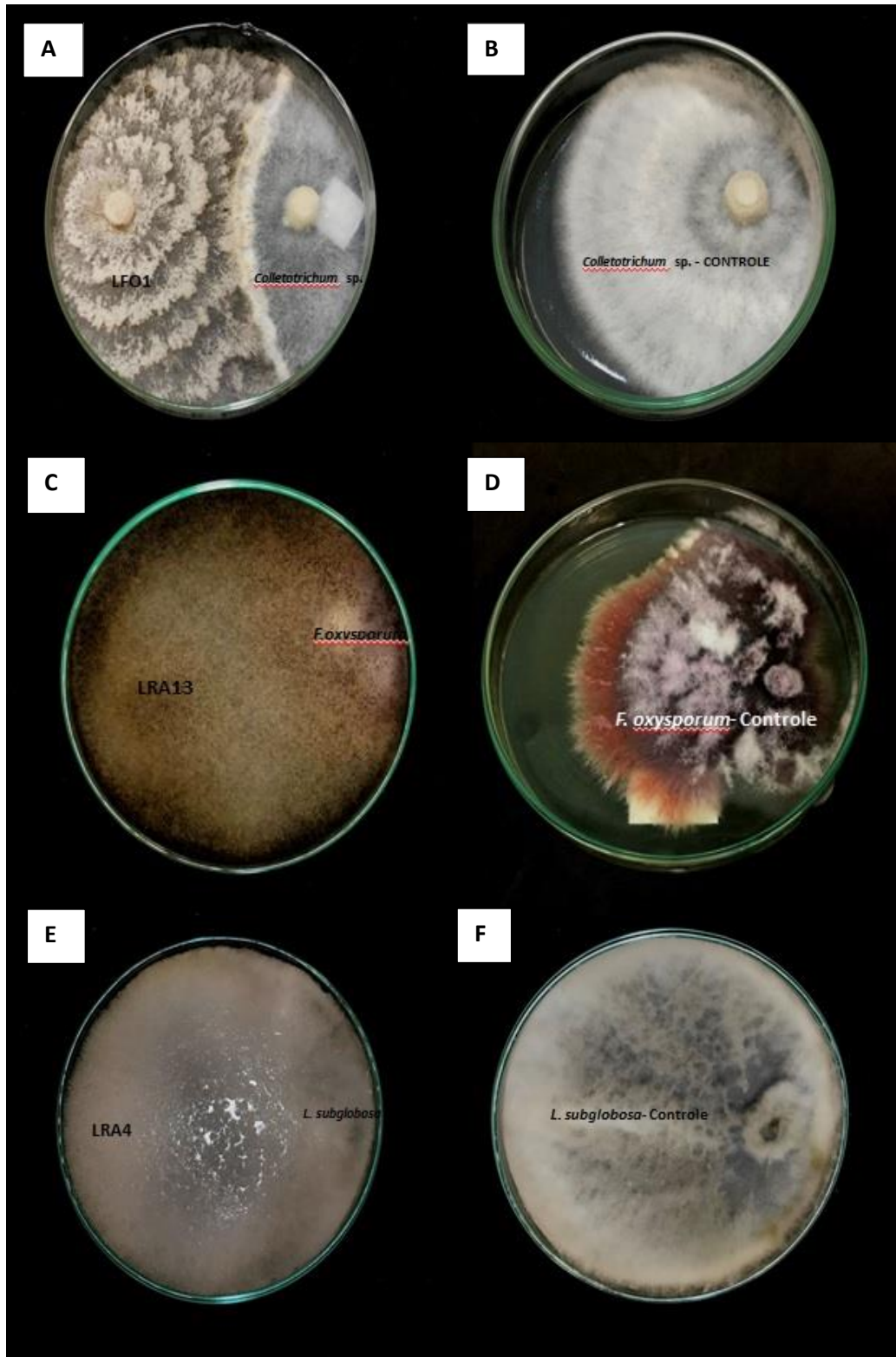


Figura 11. Interações apresentadas entre os fungos endofíticos isolados de folhas e ramos de *Solanum lycocarpum* St. Hill. e os patógenos avaliados. A) Interação tipo A, *deadlock* com contato micelial contra contra *Colletotrichum* sp. (LFO1 com *Colletotrichum* sp.). B) Controle do fitopatógeno *Colletotrichum* sp. sem o fungo endofítico C) Interação do tipo CA1 com crescimento parcial do endófito sobre o fitopatógeno depois do *deadlock* inicial com contato micelial contra *Fusarium oxysporum* (LRA13 com *Fusarium oxysporum*). D) Controle do fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. E) Interação do tipo CA1, com crescimento parcial do endófito sobre o fitopatógeno depois do *deadlock* inicial com contato micelial contra *Lasiodiplodia subglobosa* (LRA4 com *Lasiodiplodia subglobosa*). F) Controle do fitopatógeno *Lasiodiplodia subglobosa*.

5.4. Solubilização de fosfato

5.4.1. Solubilização de fosfato por fungos endofíticos isolados de *Stryphnodendron adstringens*

Dos vinte e um fungos endofíticos isolados de folhas e ramos de *Stryphnodendron adstringens* avaliados quanto a capacidade de solubilizar fosfato em meio sólido contendo CaHPO_4 , oito (38,09%) apresentaram halo em torno das colônias e indicaram potencial de solubilização de fosfato pelos mesmos.

De acordo com Silva Filho e Vidor (2001), os isolados que apresentaram resultado positivo para solubilização de fosfato podem ser classificados em três classes: Isolados com baixo potencial de solubilização ($\text{ISF} < 2$), com médio potencial de solubilização ($2 > \text{ISF} < 3$) e com alto potencial de solubilização ($\text{ISF} > 3$). Os isolados de lobeira apresentaram índice de solubilização de fosfato (ISF) menor que 1, desta forma foram classificados com baixo potencial de solubilização de fosfato (Tabela 5).

Tabela 5. Ensaio *in vitro* de solubilização de fosfato de cálcio insolúvel com os fungos endofíticos isolados de folhas e ramos de *Stryphnodendron adstringens* e o índice de solubilização dos mesmos de acordo com Silva Filho e Vedor (2000).

Isolado	Índice de solubilização fosfato (ISF)	Classificação do ISF
BFO1	1,46	Baixo
BFO2	-	-
BFO3	1,47	Baixo
BFO4	1,51	Baixo
BFO5	-	-
BFO6	1,60	Baixo
BFO7	-	-
BFO8	-	-
BFO9	1,93	Baixo
BFO10	-	-
BFO11	1,76	Baixo
BFO12	-	-
BFO13	1,68	Baixo
BFO14	-	-
BFO15	-	-
BRA1	1,81	Baixo
BRA2	-	-
BRA3	-	-
BRA4	-	-
BRA5	-	-
BRA6	-	-

(-): não apresentou potencial para solubilização de fosfato.

5.4.2. Solubilização de fosfato por fungos endofíticos isolados de *Solanum lycocarpum* St. Hill.

Dos quarenta e cinco fungos endofíticos isolados de folhas e ramos de *Solanum lycocarpum* St. Hill. avaliados quanto a capacidade de solubilizar fosfato em meio sólido

contendo CaHPO_4 vinte e três (51,11%) apresentaram halo em torno das colônias e indicaram potencial de solubilização de fosfato pelos mesmos.

O índice de solubilização de fosfato dos isolados de lobeira variou entre baixo ($\text{ISF} > 2$) a médio ($2 > \text{ISF} < 3$) (SILVA FILHO e VIDOR, 2001) (Tabela 6). O isolado LRA3 apresentou o melhor potencial de solubilização de fosfato dentre demais isolados, com ISF de 2,61 (Figura 12).

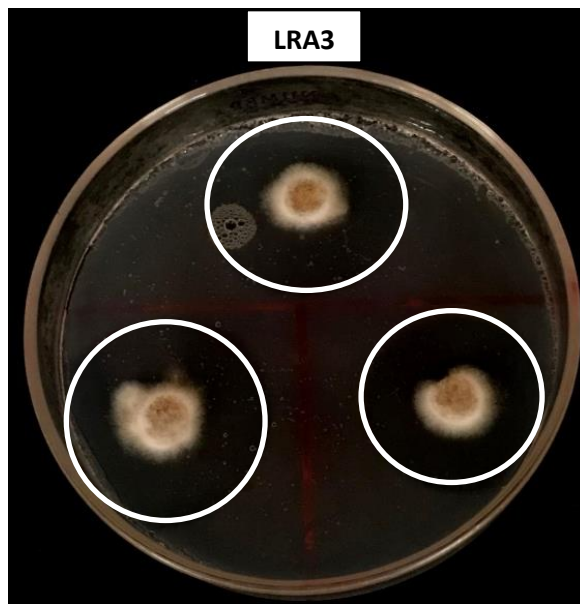


Figura 12. Representação dos diâmetros dos halos indicadores de solubilização (Dh) e os diâmetros das colônias (Dc) em meio contendo fosfato de cálcio insolúvel formado pelo isolado LRA3 positivo. O círculo branco corresponde o halo indicadores de solubilização.

Tabela 6. Resultado do ensaio in vitro de solubilização de fosfato de cálcio insolúvel com os fungos endofíticos isolados de folhas de *Solanum lycocarpum* St. Hill. e o índice de solubilização dos mesmos de acordo com Silva Filho e Vedor (2000).

Isolado	Índice de solubilização fosfato (ISF)	Classificação do ISF
LFO1	-	-
LFO2	-	-
LFO3	1,19	Baixo
LFO4	-	-
LFO5	-	-
LFO6	-	-
LFO7	1,46	Baixo
LFO8	1,78	Baixo
LFO9	1,92	Baixo
LFO10	1,32	Baixo
LFO11	-	-
LFO12	-	-
LFO13	-	-
LFO14	1,64	Baixo
LFO15	-	-
LFO16	-	-
LFO17	1,98	Baixo
LFO18	-	-
LFO19	1,97	Baixo
LFO20	1,59	Baixo
LFO21	1,73	Baixo
LFO22	1,92	Baixo
LFO23	1,64	Baixo
LFO24	-	-
LFO25	-	-
LFO26	-	-
LFO27	-	-

Tabela 6- Resultado do ensaio *in vitro* de solubilização de fosfato de cálcio insolúvel com os fungos endofíticos isolados de folhas de *Solanum lycocarpum* St. Hill. e o índice de solubilização dos mesmos de acordo com Silva Filho e Vedor (2000).

(continuação)		
Isolado	Índice de solubilização fosfato (ISF)	Classificação do ISF
LFO28	-	-
LFO29	1,53	Baixo
LFO30	1,67	Baixo
LFO31	-	-
LFO32	1,77	Baixo
LRA1	-	-
LRA2	-	-
LRA3	2,61	Médio
LRA4	2	Médio
LRA5	0,91	Baixo
LRA6	1,85	Baixo
LRA7	-	-
LRA8	1,39	Baixo
LRA9	2,04	Médio
LRA10	2,42	Médio
LRA11	-	-
LRA12	-	-
LRA13	1,36	Baixo

(-): não apresentou potencial para solubilização de fosfato.

5.5. Produção enzimática

5.5.1. Produção enzimática por fungos endofíticos de *Stryphnodendron adstringens*

Dentre os quinze fungos endofíticos isolados de folhas de barbatimão, dois apresentaram atividade amilolítica, cinco apresentaram atividade celulolítica, para atividade pectinolítica nove apresentaram atividade enzimática para pectato liase, sete apresentaram atividade enzimática da poligalacturonase, quatro apresentaram atividade proteolítica, quatro apresentaram atividade esterásica e seis apresentaram atividade lipolítica (Tabela 7).

As porcentagens totais de atividade enzimática de todos os isolados fúngicos endofíticos testados estão apresentadas na Figura 13.

O isolado com maior potencial enzimático é o BFO4 que apresentou atividade para produção de todas as enzimas testadas.

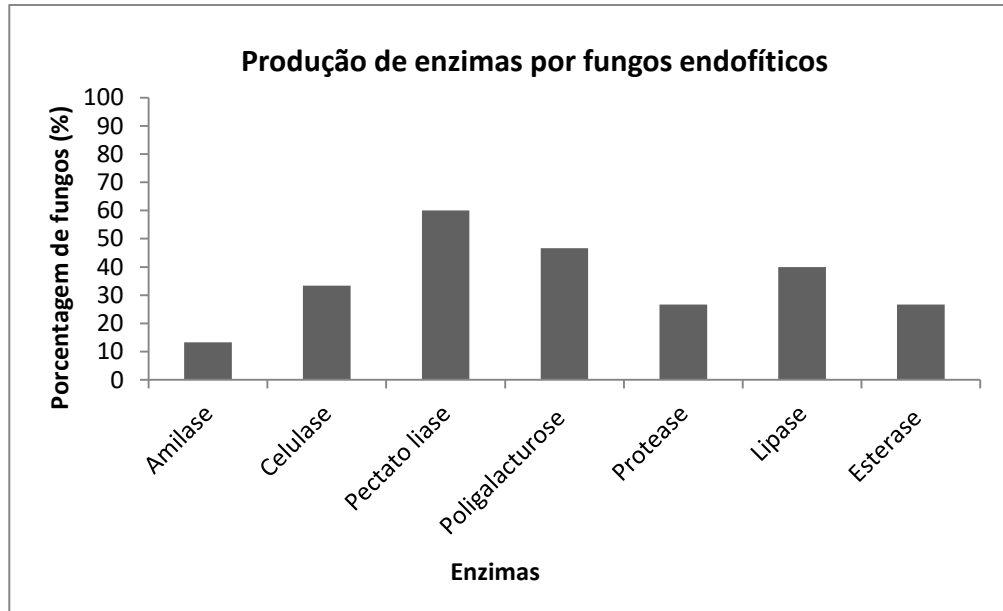


Figura 13. Atividade enzimática dos fungos endofíticos isolados de folhas de barbatimão.

Tabela 7. Avaliação das atividades enzimáticas dos fungos endofíticos isolados folhas de barbatimão.

Isolado	Amilase	Celulase	Pectato liase	Poligalacturonase	Protease	Lipase	Esterase
BFO1	-	+	+	-	-	-	-
BFO2	-	-	+	-	-	+	+
BFO3	+	-	-	+	+	-	-
BFO4	+	+	+	+	+	+	+
BFO5	-	+	+	+	-	-	-
BFO6	-	-	+	-	-	-	-
BFO7	-	-	-	-	-	-	-
BFO8	-	-	+	+	-	-	-
BFO9	-	-	-	-	-	-	-
BFO10	-	+	+	+	-	+	-
BFO11	-	-	-	-	-	-	-
BFO12	-	-	+	+	+	+	+
BFO13	-	+	-	-	-	+	+
BFO14	-	-	-	+	-	-	-
BFO15	-	-	+	-	+	+	-

(+) produção enzimática; (-) não foi detectada a produção enzimática.

Dentre os seis fungos endofíticos isolados de ramos de *S. adstringens*, quatro apresentaram atividade amilolítica, dois apresentaram atividade celulolítica, três apresentaram atividade pectato liase, seis apresentaram atividade poligalacturonase, um apresentou atividade proteolítica, um apresentou atividade lipolítica e nenhum apresentou atividade esterásica (Tabela 8). As porcentagens totais de produção enzimática dos isolados fúngicos de ramos são apresentados na Figura 14.

Dos isolados mais promissores, o BRA5 e o BRA6 se destacaram, pois apresentaram maior potencial de atividade para produção de quatro tipos de enzimas diferentes, ambos apresentaram atividade para amilase, celulase, poligalacturonase. O isolado BRA5 apresentou também atividade lipolítica e o BRA6 atividade proteolítica.

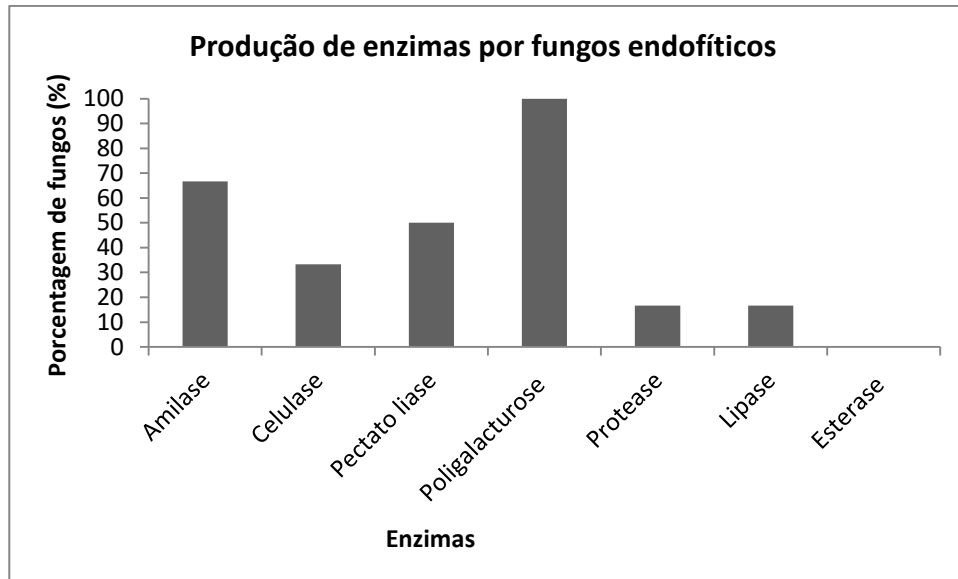


Figura 14. Atividade enzimática dos fungos endofíticos isolados de ramos de barbatimão destacando a maior porcentagem para a produção de poligalacturose.

Tabela 8. Avaliação das atividades enzimáticas dos fungos endofíticos isolados de barbatimão.

Isolado	Amilase	Celulase	Pectato liase	Poligalacturonase	Protease	Lipase	Esterase
BRA1	+	-	+	+	-	-	-
BRA2	-	-	+	+	-	-	-
BRA3	-	-	-	+	-	-	-
BRA4	+	-	+	+	-	-	-
BRA5	+	+	-	+	-	+	-
BRA6	+	+	-	+	+	-	-

(+) produção enzimática; (-) não foi detectada a produção enzimática.

5.5.2. Produção de enzimas por fungos endofíticos associados à *Solanum lycocarpum* St. Hill.

Dentre os trinta e dois fungos endofíticos isolados de folhas de lobeira, nove apresentaram atividade amilolítica, onze apresentaram atividade celulolítica, para atividade pecnolítica, vinte apresentaram atividade para pectato liase, vinte e dois para poligalacturonase, dezoito apresentaram atividade proteolítica, vinte e um apresentaram atividade lipolítica e sete apresentaram atividade esterásica (Tabela 9).

A porcentagem maior foi para produção de poligalacturonase, com 68,75%, seguida de lipase com 65,62% e de pectato liase com 62,5% dos isolados produzindo essas enzimas (Figura 15).

O isolado LFO3 apresentou atividade para celulase, pectato liase, poligalacturonase, protease, lipase e esterase, sendo assim o isolado com maior potencial de produção de enzimas.

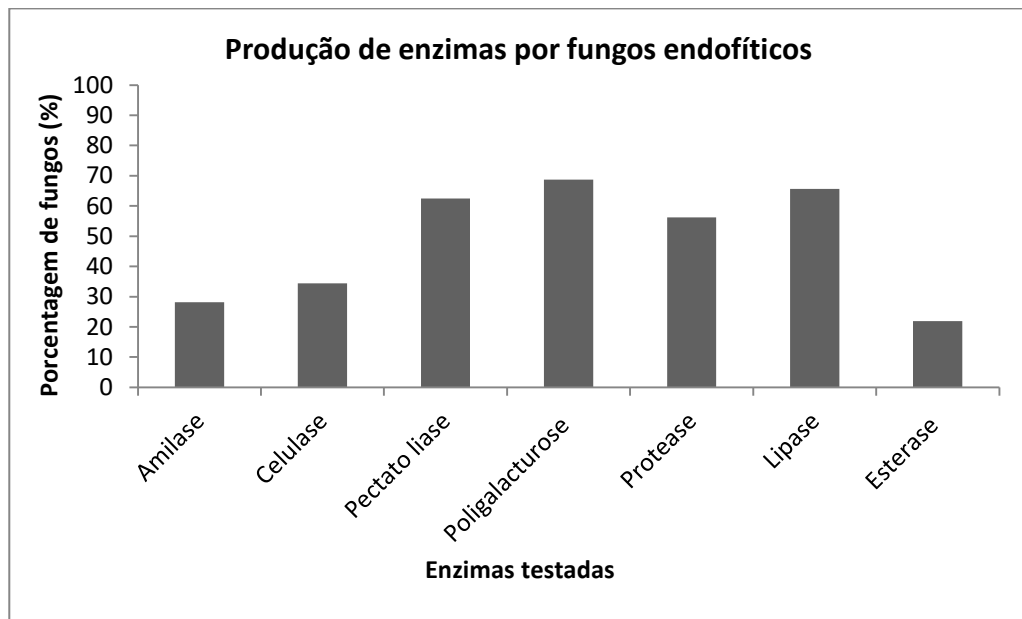


Figura 15. Atividade enzimática dos fungos endofíticos isolados de folhas de lobeira destacando a maior porcentagem para a produção de poligalacturose.

Tabela 9. Avaliação das atividades enzimáticas dos fungos endofíticos isolados de folhas de lobeira.

Isolado	Amilase	Celulase	Pectato liase	Poligalacturonase	Protease	Lipase	Esterase
LFO1	-	-	-	-	-	-	-
LFO2	-	-	-	+	+	+	-
LFO3	-	+	+	+	+	+	+
LFO4	-	-	-	+	-	+	-
LFO5	-	+	-	+	-	+	-
LFO6	-	-	+	+	+	+	-
LFO7	-	-	+	+	+	+	-
LFO8	-	-	-	-	-	+	-
LFO9	-	+	+	+	+	+	-
LFO10	-	+	-	+	-	-	-
LFO11	+	-	-	+	-	+	-
LFO12	-	-	+	+	+	+	-
LFO13	-	+	+	-	+	+	+
LFO14	+	-	+	-	-	+	-
LFO15	+	-	-	+	-	-	-
LFO16	+	+	-	+	+	-	-
LFO17	+	-	+	-	-	-	-
LFO18	-	-	+	+	+	-	+
LFO19	+	-	-	-	-	-	-
LFO20	-	-	+	+	+	-	+
LFO21	-	+	+	-	-	+	+
LFO22	-	-	+	+	+	+	-
LFO23	-	+	+	+	+	+	-
LFO24	-	-	+	-	+	+	-
LFO25	-	-	+	+	+	+	-
LFO26	+	-	+	+	-	+	+
LFO27	-	-	+	+	+	-	-
LFO28	-	+	+	+	+	+	-
LFO29	+	+	-	+	-	-	+
LFO30	+	-	+	-	-	-	-
LFO31	-	-	+	+	+	+	-
LFO32	-	+	-	-	+	+	-

(+): atividade enzimática/ (-): não foi detectada atividade enzimática.

Dentre os doze fungos endofíticos isolados de ramos de *S. lycocarpum*, três apresentaram atividade amilolítica, dois apresentaram atividade celulítica, para atividade

pectonolítica, onze apresentaram atividade para pectato liase e dez para poligalacturonase, dez apresentaram atividade proteolítica e oito apresentaram atividade lipolítica e dois apresentaram atividade esterásica (Tabela 10). Desta forma, 84,61% dos isolados fúngicos de ramos de lobeira apresentaram produção da enzima pectato liase conforme apresentado na Figura 16.

Os isolados que apresentaram melhores resultados foram LRA7 e LRA8, que apresentaram atividade para cinco enzimas, pectato liase, poligalacturonase, protease e lipase, sendo que o LRA7 também apresentou atividade amilolítica e o LRA8 para celulase.

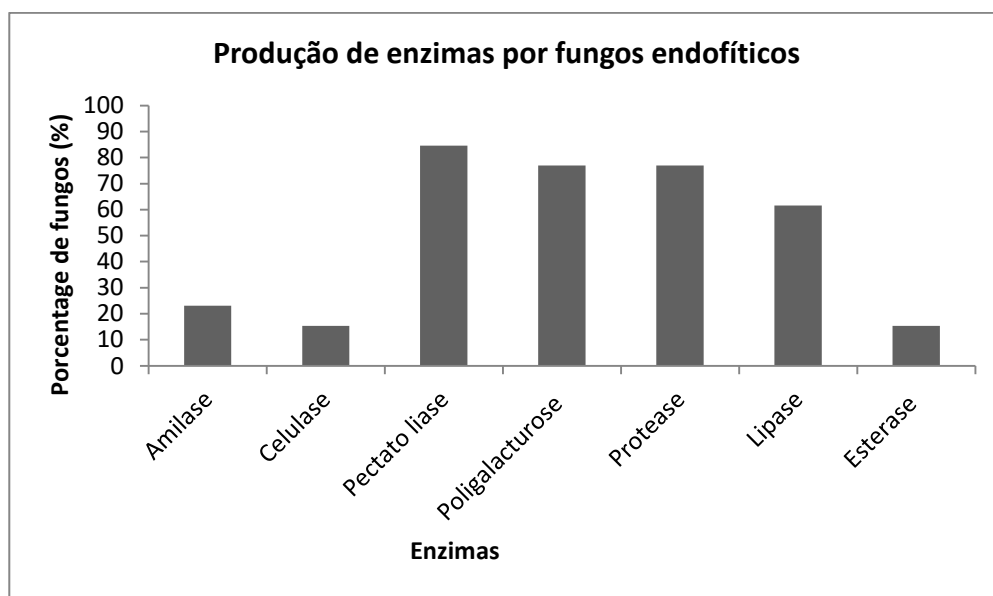


Figura 16. Atividade enzimática dos fungos endofíticos isolados de ramos de lobeira destacando a maior porcentagem para a produção de pectato liase.

Tabela 10. Avaliação das atividades enzimáticas dos fungos endofíticos isolados de ramos de lobeira.

Isolado	Amilase	Celulase	Pectato liase	Poligalacturonase	Protease	Lipase	Esterase
LRA1	-	-	+	+	+	-	-
LRA2	+	-	+	+	+	-	-
LRA3	-	+	-	-	+	+	-
LRA4	-	-	+	+	-	+	+
LRA5	-	-	+	+	+	+	-
LRA6	-	-	+	+	+	+	-
LRA7	+	-	+	+	+	+	-
LRA8	-	+	+	+	+	+	-
LRA9	-	-	+	+	+	+	-
LRA10	-	-	+	-	-	-	-
LRA11	+	-	+	+	-	-	-
LRA12	-	-	+	+	+	+	+
LRA13	-	-	-	-	+	-	-

(+): atividade enzimática/ (-): não foi detectada atividade enzimática.

A produção enzimática para confirmação da avaliação são apresentadas nas Figuras 17, 18, 19 e 20:

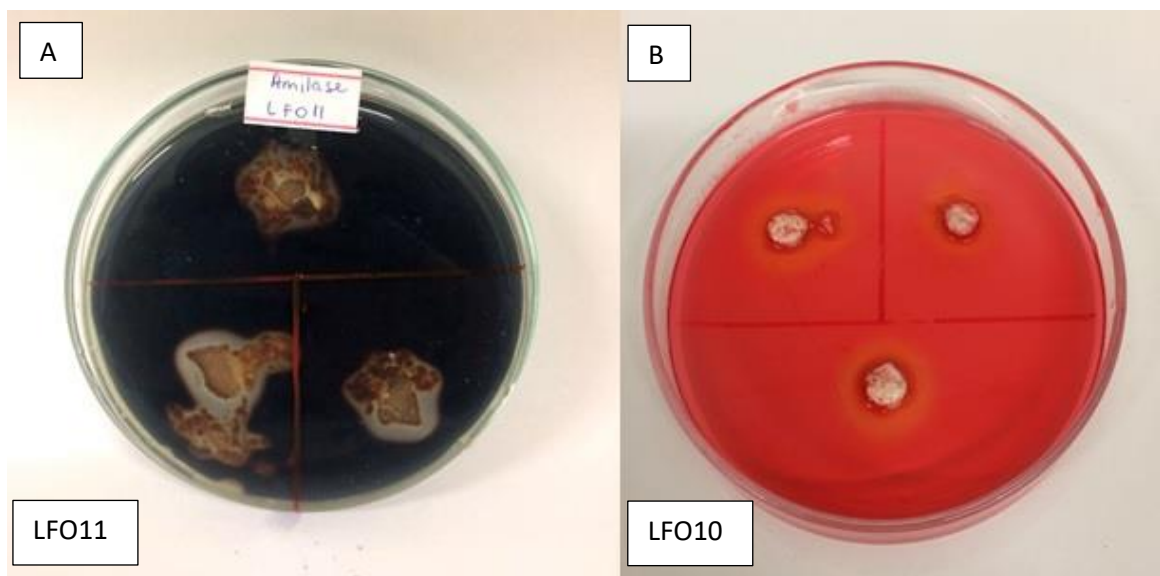


Figura 17. Ensaio in vitro qualitativo de produção de enzimas. A) Produção de amilase. B) Produção de celulase. Fonte: autor.

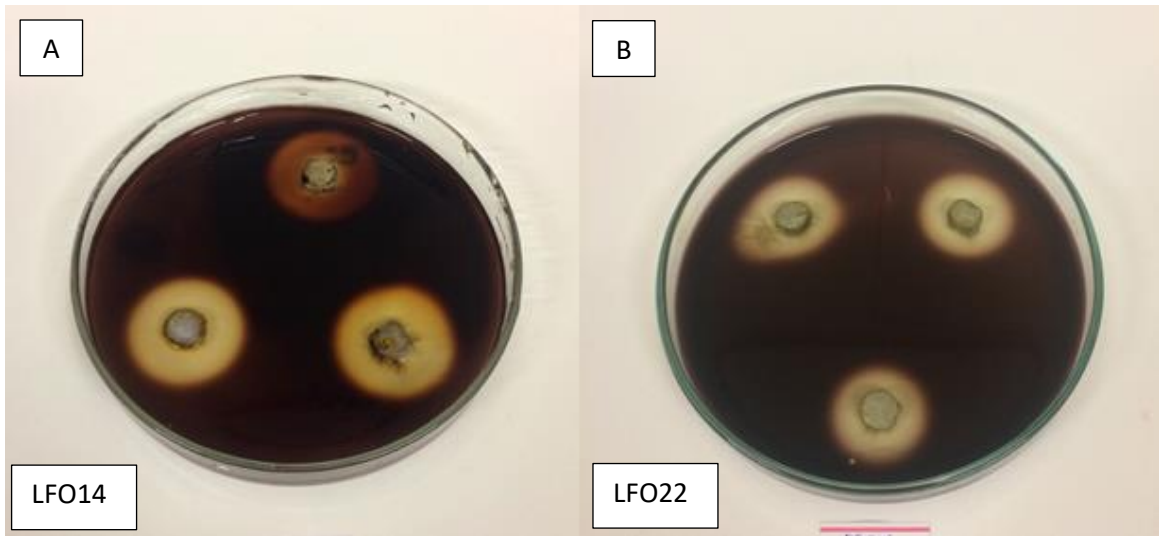


Figura 18. Ensaio in vitro qualitativo de produção de enzimas. A) Produção de pectato liase. B) Produção de poligalacturonase. Fonte: autor

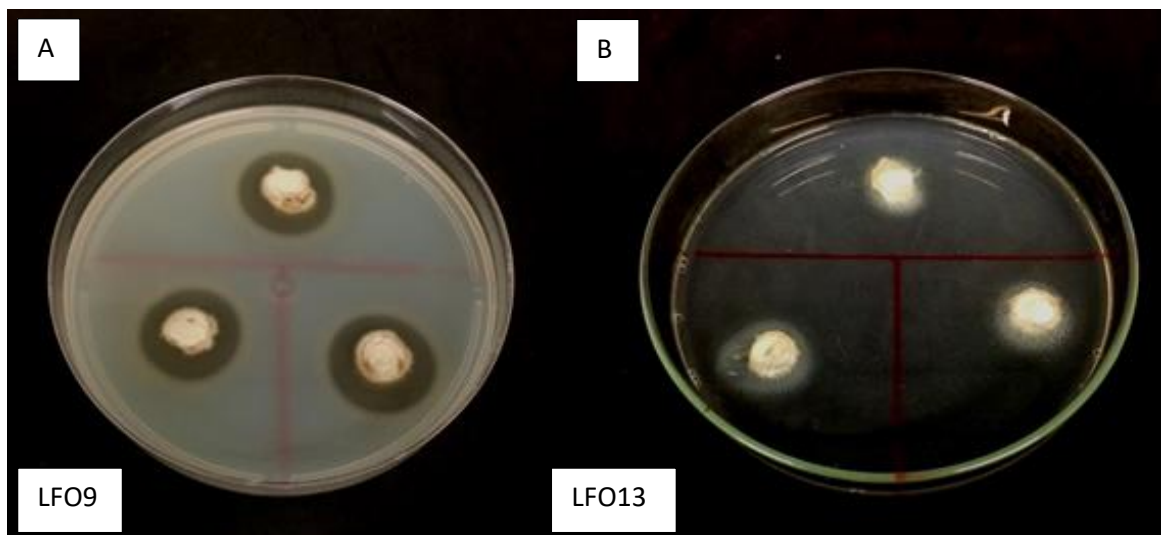


Figura 19. Ensaio in vitro qualitativo de produção de enzimas. A) Produção de protease. B) Produção de lipase. Fonte: autor

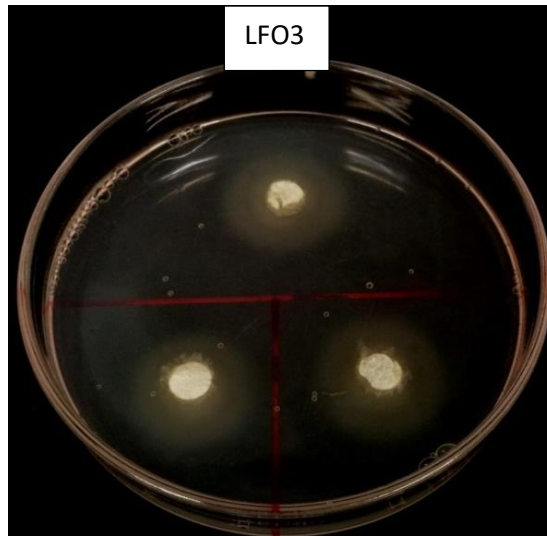


Figura 20. Ensaio in vitro qualitativo de produção de esterase

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho realizou o isolamento, identificação e avaliou o potencial biotecnológico, quanto ao antagonismo de fitopatógenos, solubilização de fosfato e produção de enzimas de interesse industrial de fungos endofíticos cultiváveis de folhas e ramos associados a duas espécies endêmicas e com propriedades medicinais do Cerrado (*Stryphnodendron adstringens* e *Solanum lycocarpum* St. Hill.).

Há relatos da presença de endófitos, bactérias e fungos, em todas as plantas vasculares e estes podem ser isolados de diferentes partes do tecido vegetal, tais como, raízes, ramos, folhas, pecíolos e sementes (ARNOLD et al., 2000; COSOVEANU; SABINA; CABRERA, 2018). Por meio do isolamento por desinfecção superficial de folhas e ramos de *S. adstringens* e *S. lycocarpum* St. Hill. foi possível isolar respectivamente, vinte e um fungos endofíticos de barbatimão, sendo quinze de folhas e seis de ramos e, quarenta e cinco de lobeira, sendo trinta e dois de folhas e treze de ramos. Desta maneira, obteve-se um maior número de isolados das folhas em ambas as espécies vegetais em estudo. Este resultado também foi encontrado por Mahapatra e Banerjee (2010), que reportaram maior colonização fúngica endofítica em folhas do que em ramos em espécies vegetais com aplicação medicinal e de clima tropical. No estudo realizado com fungos endofíticos isolados de capim citronela obtiveram maior colonização fúngica nas folhas do que no segmento de haste, resultado que corrobora com o presente estudo (LOPES et al., 2017).

Com o isolamento de fungos endofíticos de folhas e ramos de *S. adstringens* foi possível, até o presente momento, a identificação molecular dos seguintes gêneros: *Diaporthe*, *Neopestalotiopsis*, *Nigrospora*, *Paraconiothrium*, *Phomopsis*, *Pseudofusicoccum*, *Schizophyllum* e *Xenoacremonium*, já descritos como fungos endofíticos em outros trabalhos (COMBES et al., 2012; ZHAO et al., 2015; UZOR; OSADEBE; NWODO, 2017; BONGIORNO et al., 2016; SHETTY et al., 2016; REDDY et al. 2016). Em um estudo realizado por Carvalho e colaboradores (2012) de diversidade de fungos endofíticos associados a *S. adstringens* mostrou que a comunidade endofítica fúngica associada ao vegetal possui alta riqueza constituída por gêneros que foram isolados no presente trabalho, como *Nigrospora*, *Paraconiothyrium*. Além disso, *Diaporthe*, *Phomopsis* e *Pseudofusicoccum* foram os mais frequentes, corroborando com os dados do estudo em questão.

Na espécie vegetal *S. lycocarpum* St. Hill., os gêneros predominantes foram *Phomopsis* sp. e *Diaporthe* sp., assim como em um trabalho que estudou fungos endofíticos

associados a uma planta medicinal do Cerrado (*Baccharis trimera*) que teve como a espécie mais frequente *Diaporthe phaseolorum* (VIEIRA et al., 2014), evidenciando que o gênero é comumente presente em espécies vegetais do bioma. Além disso, em um estudo de fungos endofíticos de *Dalbergia odorifera* T. Chen mostrou que dentre os gêneros frequentemente mais isolados endofiticamente está incluso o *Phomopsis* (SUN et al., 2015). Estes dois gêneros, *Diaporthe* e *Phomopsis* são um dos endofíticos mais encontrados ramos e folhas de angiosperma de ecossistemas tropicais (UDAYANGA et al., 2011).

Outros gêneros também foram descritos na comunidade endofítica de *S. lycocarpum* St. Hill., como o *Colletotrichum* sp., *Curvalaria* sp, *Neurospora* sp, *Phlebiopsis* sp e *Schizophyllum* sp. Comparando com um trabalho de Vieira et al. (2008), que estudou a diversidade de fungos endofíticos isolados de ramos e folhas de uma planta medicinal, *Solanum cernuun* Vell., que corresponde ao mesmo gênero da lobeira, observou-se que o *Colletotrichum* sp. está entre os gêneros frequentemente isolados. Além disso, gêneros como *Curvalaria* sp., *Phlebiopsis* sp., *Schizophyllum* sp. também foram descritos na comunidade fúngica endofítica do vegetal.

Colletotrichum sp. apesar de ser um fitopatógeno responsável por ocasionar antracnose em árvores de guaraná e oliveira, pode também ser encontrado na forma endofítica e desperta interesse por produzir o fármaco taxol utilizado no tratamento de alguns tipos de cânceres (GANGADEVI e MUTHUMARY, 2008; SIA et al., 2013). Já *Curvalaria* sp. é comumente descrito como fungo endofítico (TAWFIKE; ABBOTT; YOUNG, 2018; HUANG et al., 2018) e possui potencial antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus* (HORMAZABAL E PIONTELLI, 2009). *Neurospora* sp. foi descrito como endófito por Sebastianes e colaboradores (2013) pertencendo a comunidade fúngica do mangue de São Paulo e como produtor de camptotecina, um alcaloide citotóxico com atividade antitumoral (REHMAN et al., 2008).

Os fungos endofíticos habitam um nicho similar ao dos fitopatógenos e por isso podem ser eficazes no controle biológico dos mesmos por meio de competição por nutrientes e espaço, por produzir substâncias antagônicas, por micoparasitismo ou por induzir a planta desenvolver resistência (BANERJEE, 2011; CANUTO et al., 2012; ORLANDELLI et al., 2012). Alguns gêneros de fungos endofíticos são descritos na literatura por sua aplicação efetiva no controle biológico, dentre eles destaca-se o *Trichoderma* sp. que possui atividade inibitória contra *Phytophthora* sp. (BAE et al., 2016), fitopatógeno que causa doença na batata e em diversas plantas e também contra *Fusarium solani*, que afeta produtividade de diferentes colheitas, como por exemplo culturas de feijão (TOGHUEO et al., 2016).

Nos ensaios *in vitro* de antagonismos contra *Colletotrichum* sp., *Fusarium oxysporum* e *Lasiodiplodia subglobosa* observou-se que dos vinte e um fungos endofíticos de barbatimão avaliados, quatro apresentaram atividade antagônica contra o fungo *Colletotrichum* sp., o isolado BFO1, BRA1, BRA2, sendo que o isolado BRA3 apresentou o maior índice de antagonismo, com 85,36% de inibição do patógeno. Contra *F. oxysporum*, cinco fungos apresentaram potencial contra o fitopatógeno, o isolado BFO1, BFO9, BRA2, BRA3, sendo que o BRA1 apresentou maior índice de antagonismo 62,02%. Contra *L. subglobosa*, três isolados apresentaram atividade antagônica BRA2, BRA3 e BRA4, que apresentou maior índice de antagonismo com 45% de inibição. Os isolados BRA2, BRA3 e BRA4 correspondem ao gênero *Pseudofusicoccum* sp. e há relato da capacidade antagônica, uma vez que este gênero apresentou atividade antifúngica contra *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (RAHMÉ, 2018). O outro isolado que obteve atividade antagônica contra dois fitopatógenos foi o BFO1, que corresponde ao gênero *Nigrospora* sp., com atividade biológica descrita devido a produção metabólitos secundários com ação antifúngica, como a griseofulvina. Esse gênero apresentou potencial antagônico contra 8 fungos fitopatogênicos, dentre eles *F. oxysporum* e *Colletotrichum orbiculare* (ZHAO et al., 2012). O isolado BRA1, que corresponde ao gênero *Neofusicoccum* sp., em um estudo realizado com fungos endofíticos de abacate mostrou que este gênero como endófito pode trazer benefícios para planta, protegendo-a de fatores bióticos e abióticos (SHETTY et al., 2011).

No ensaio *in vitro* com os fungos endofíticos de *S. lycocarpum* St. Hil, cinco apresentaram atividade antagônica contra *Colletotrichum* sp., oito contra *F. oxysporum* e dois contra *L. subglobosa*. O isolado fungíco com maior índice de antagonismo contra *Colletotrichum* sp. foi o LFO1 com 52%, LRA 13 contra *F. oxysporum* com 65,71% e LRA4 que reduziu a área do fitopatógeno *L. subglobosa* em 74,13%. Os isolados com maior índice de antagonismo ainda serão identificados molecularmente. Os gêneros *Phomopsis* e *Diaporthe* apresentaram potencial antagônico contra *F. oxysporum*. Ambos são gêneros descritos na literatura com potencial antifúngico, o *Diaporthe* sp. por apresentar atividade antagônica contra *Phytophthora infestans*, fitopatógeno que acomete culturas de batata e tomate, ambas espécies do gênero *Solanum* (PRADA et al., 2009) e o *Phomopsis* sp. que apresentou atividade antagônica inibindo o crescimento de *Rhizoctonia solani* por competição por nutrientes e espaço (LAHLALI e HIJRI, 2010).

Tantos os fungos endofíticos de barbatimão quanto os de lobeira apresentaram na sua maioria a interação do tipo A, a qual inibe o crescimento do fitopatógeno com contato micelial. Os fungos endofíticos podem atuar contra os fitopatógenos reduzindo o crescimento

e o desenvolvimento dos mesmos competindo por espaço, por nutrientes e se estabelecendo de modo que reduza o crescimento do fitopatogeno. Esse resultado também foi obtido por Bernardi-Wenzel et al. (2012) que isolou fungos endofíticos de soja e os testou contra *A. solani*, *F. solani*, *Phomopsis* sp. e *R. solani* e avaliando as interações dos endófitos com os fitopatogenos obteve predominância da interação tipo A com 64%. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que os fungos endofíticos de barbatimão e lobeira possuem potencial para aplicação no controle biológico de fitopatógenos sendo uma opção para reduzir ou até mesmo eliminar o uso de agroquímicos na agricultura.

Os micro-organismos podem ser ferramentas importantes no ciclo natural do fósforo disponibilizando o elemento que está insolúvel nos solos em solúvel e disponível as plantas (MENDES et al., 2013). Entre os gêneros de fungos que são conhecidos por esta capacidade destacam-se o *Aspergillus* e *Penicillium* (SILVA-FILHO et al., 2001; SILVA et al., 2010). No presente estudo, 38,09% dos isolados fúngicos de barbatimão foram capazes de solubilizar fosfato, já dos fungos endofíticos de lobeira 51,11% solubilizaram fosfato. Dos isolados de lobeira quatro apresentaram índices médios de solubilização e ambos os fungos foram isolados de ramos.

A maioria dos fungos com potencial de solubilizar fosfato são os de solo devido suas características intrínsecas de solubilidade de fosfato como adaptações de colonizar este tipo de ambiente (SOUCHIE et al., 2005; COUTINHO; CAVALCANTI; YANO-MELO, 2011). Embora os micro-organismos de solo sejam potencialmente mais utilizados, os fungos endofíticos são capazes de solubilizar fosfato e são importantes para contribuir no crescimento vegetal e reduzir a necessidade de fertilizantes.

A produção de enzimas é um setor importante para biotecnologia industrial uma vez que esses catalisadores biológicos são capazes de acelerar processos químicos e são ecologicamente viáveis (ANGELO, 2010). Embora as enzimas mais estudadas sejam as de origem animal e vegetal, as enzimas microbianas apresentam potencial para aplicação industrial, uma vez que podem ser produzidas em larga escala e são facilmente expressas nos organismos (ORLANDELLI et al., 2012). O estudo do perfil enzimático *in vitro* dos fungos endofíticos de folhas de barbatimão mostrou que estes possuem potencial para produção de todas as enzimas testadas, contudo, os isolados fúngicos apresentaram maior potencial para produção de pectinases, sendo que nove (60%) dos quinze isolados produziram pectato liase. Os seis isolados fúngicos de ramos de barbatimão apresentaram atividade para produção de todas as enzimas testadas exceto a esterase. Todos os endófitos (100% dos testados) apresentaram atividade pectinolítica para poligalacturonase.

Os fungos endofíticos associados à lobeira possuem potencial de produzir as enzimas testadas, mas dos trinta e dois, vinte e dois (68,75%) isolados de folhas apresentaram maior atividade para produção de poligalacturonase. Dos treze isolados fúngicos de ramos, onze (84,61%) apresentaram produção da enzima pectato liase.

Os fungos endofíticos tem alta habilidade de produzir enzimas líticas, como as pectinases, celulasas e lipases. Essas enzimas são produzidas pelos endófitos para auxiliar na entrada dos mesmos no tecido vegetal, na obtenção de nutrientes e são necessárias para os fungos superarem o mecanismo de defesa do hospedeiro durante a colonização. Fungos com alta atividade lipolítica possuem alta capacidade de usar gordura como fonte de energia (SUNITHA; DEVI; SRINIVAS, 2013; CORREA et al., 2014). Além disso, os endófitos são produtores de enzimas hidrolíticas como as proteases, essas são usadas no controle biológico de fitopatógenos, pois degradam paredes celulares das suas hifas (ORLANDELLI et al., 2012).

Em um trabalho realizado por Suryanarayanan e seus colaboradores (2003) com fungos endofíticos isolados da floresta tropical da Índia (Western Ghats) relatou que os isolados apresentaram atividade na produção de amilase, celulase, pectato liase, protease sendo que lipase foi a enzima mais produzida entre os isolados (84% dos fungos apresentaram produção). Cuzzi et al. (2011) avaliou o potencial dos fungos endofíticos do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) na produção de enzimas extracelulares, os isolados apresentaram atividade na produção de lipase, amilase e protease. Os fungos endofíticos associados às sementes do guaranazeiro apresentaram atividade na produção de enzimas extracelulares, desta forma, todos os isolados fúngicos testados apresentaram atividade pectinolítica, amilolítica e lipolítica (SILVA, 2015). Outro estudo que se assemelha aos resultados do presente trabalho verificou os fungos endofíticos associados à plantas medicinais, os quais apresentaram atividade na produção de enzimas extracelulares, sendo que 64% dos isolados apresentaram atividade para lipase, 62% para pectinase e amilase e 32% para celulase (SUNITHA; DEVI; SRINIVAS, 2013) mostrando que os resultados coincidem com os do presente trabalho, uma vez que os endófitos isolados de folhas de lobeira apresentaram maior atividade pectinolítica (poligalacturonase) com 68,75% e atividade lipolítica (65,62%). Além disso, a produção enzimática dos fungos endofíticos é variável e está relacionada com a planta hospedeira (TAN e ZOU, 2001), isso mostra que os endófitos de plantas medicinais podem apresentar maior atividade pra estes tipos de enzimas.

Os isolados fúngicos que apresentaram maior atividade na produção das enzimas testadas foram *Neopestalotiopsis* sp. (isolado BFO4), *Xenoacremonium* sp. (isolado BRA5),

Paraconiothrium sp, e *Phomopsis* sp., com base nos resultados revela a produção de enzimas hidrolíticas por fungos endofíticos tem potencial para exploração e aplicação em vários setores industriais (ÂNGELO, 2010).

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos podemos concluir:

- Foram isolados sessenta e seis fungos endofíticos de *S. adstringens* e *S. lycocarpum* St. Hil., sendo quinze oriundos das folhas de barbatimão e seis de ramos e trinta e dois das folhas de lobeira e treze de ramos.
- A comunidade endofítica fúngica associada ao barbatimão é composta pelos seguintes gêneros: *Diaporthe*, *Neopestalotiopsis*, *Nigrospora* (gênero dominante), *Paraconiothrium*, *Phomopsis*, *Pseudofusicoccum*, *Schizophyllum* e *Xenoacremonium*.
- A comunidade endofítica fúngica associada à *S. lycocarpum* St. Hill. é composta por: *Colletotrichum* sp., *Curvalaria* sp., *Diaporthe* sp., *Neurospora* sp., *Phlebiopsis* sp., *Phomopsis* sp. e *Schizophyllum* sp., sendo *Diaporthe* e *Phomopsis* os gêneros dominantes
- O isolado BRA3 apresentou potencial antagônico contra os três fungos fitopatogênicos.
- O isolado LRA4 que apresentou potencial antagônico contra os três fitopatógenos.
- Dos isolados fúngicos de folhas e ramos associadas ao barbatimão, 38,09% solubilizaram fosfato inorgânico.
- Dos isolados fúngicos de folhas e ramos de lobeira, 51,11% solubilizaram fosfato inorgânico.
- Os ensaios de atividade enzimática *in vitro* revelaram que os fungos endofíticos de ambas as espécies vegetais possuem maior produção de enzimas pécticas.
- Para nosso conhecimento este é o primeiro trabalho que explora os fungos endofíticos de *S. adstringens* e *S. lycocarpum* St. Hil no antagonismo de fitopatógenos, solubilização de fosfato e produção de enzimas, sendo assim, um estudo promissor, uma vez que os endófitos possuem potenciais para as atividades biológicas testadas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÂNGELO, R. S. Enzimas hidrolíticas. In: Esposito, E.; Azevedo, J. L. (eds.), **Fungos, uma introdução à biologia, química e biotecnologia, 2nd edn. Universidade Caxias do Sul, Rio Grande do Sul**, p. 533-569, 2010.
- ARAÚJO, W. L.; Lima, A.O. S.; Azevedo, J. L.; Marcon, J.; Kukinsky-Sobral, J.; Lacava, P.T. **Manual: isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, p.86, 2002.
- ARAÚJO, N. D.; Coelho, V. P. D. M.; Agra, M. D. F. The pharmacobotanical comparative study of leaves of *Solanum crinitum* Lam., *Solanum gomphodes* Dunal and *Solanum lycocarpum* A. St-Hil,(Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.5, p. 666-674, 2010.
- ARAÚJO, W. L.; Quecine, M. C.; Lacava, P. T.; Aguilar-Vildoso, C. I.; Marcon, J.; Lima, A. O. S.; Kukinsky-Sobral, J.; Pizzirani-Kleiner, A. A.; Azevedo, J. L. **Micro-organismos Endofíticos: Aspectos Teóricos e Práticos de Isolamento e Caracterização**. 1. ed. Santarém: UFOPA, p. 257, 2014.
- ARNOLD, A. E.; Maynard, Z.; Gilbert, G. S.; Coley, P. D.; Kursar, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse?. **Ecology letters**, v. 3, n. 4, p. 267-274, 2000.
- ALEIXO, A. L.P.; Albernaz A. L.; Grelle, C. E. V.; Vale M.M.; Rangel, T. F. Mudanças climáticas e a biodiversidade dos biomas brasileiros: passado, presente e futuro, **Natureza & Conservação**, v.8, n.2, p. 194-496, 2010.
- ALMEIDA, S. P., C. E. B. Proença, S. M. Sano & J. F. Ribeiro. Cerrado, espécies vegetais úteis. **Embrapa - CPAC**, Planaltina. p.464, 1998.
- ALURAPPA, R.; Chowdappa, S.; Narayanaswamy, R.; Sinniah, U. R.; Mohanty, S. K.; Swamy, M. K. Endophytic Fungi and Bioactive Metabolites Production: An Update. In: **Microbial Biotechnology**. Springer, Singapore, p. 455-482, 2018.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes—secret producers of bioactive plant metabolites. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 7, p. 499-505, 2013.
- ASSUMPCÃO, L. C.; Lacava, P. T.; Dias, A. C. F.; Azevedo, J. L.; Menten, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2010.
- AZEVEDO, João Lúcio. Microrganismos endofíticos. **Ecologia microbiana**, p. 117-137, 1998.
- AZEVEDO, J.L; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI B. N; DESHMUKH, S.H. (Ed.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, chap.6, p. 189-207, 2007.

AZEVEDO, J. L.; Maccheroni Jr W.; Pereira, J. O.; Araújo, W. L. (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 15-16, 2000.

AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from Brazilian tropical hosts and their biotechnological applications. In: Kharwar RN, Upadhyay R, Dubey N, Raghuwansh R (eds) **Microbial diversity and biotechnology in food security**, Springer, New Delhi, p. 17-22, 2014.

BADALYAN, S. M.; Innocenti, G., Garibyan, N.G. Antagonistic activity of xylophilic mushrooms against pathogenic fungi of cereal in dual culture. **Phytopathologia Mediterranea**, v.1, n.3, p. 200-225, 2002.

BATALHA, Marco Antônio. O cerrado não é um bioma. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1, 2011.

BATISTA, B.D.; Lacava, P. T.; Ferrari, A.; Teixeira-Silva, N. S.; Bonatelli, M. L.; Tsui, S.; Mondin, M.; Kitajima, E. W.; Pereira, J. O.; Azevedo, J. L.; Quecine, M. C. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological research**, v. 206, p. 33-42, 2018.

BAE, S. J.; Mohanta, T. K.; Chung, J. Y.; Ryu, M.; Park, G.; Shim, S.; Hong, S-B; Seo, H.; Bae, D-W; Bae, I.; Kim, J-J.; Bae, H. Trichoderma metabolites as biological control agents against Phytophthora pathogens. **Biological control**, v. 92, p. 128-138, 2016.

BAILÃO, E.F.L.C.; Devilla, I.A.; Conceição, E.C.; Borges, L.L. 2015. Bioactive compounds found in Brazilian Cerrado fruits. **International journal of molecular sciences**, v16, n.10, p.23760-23783, 2015.

BANERJEE, Debdulal. Endophytic fungal diversity in tropical and subtropical plants. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 54, 2011.

BARRAQUEIRO, F.R.; Baya, A. M.; Cormenzana, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **ARS Pharm** v.17, p.399-406, 1976.

BERNARDI-WENZEL, J.; Siqueira, A. L.; Burin, F. A. G.; Hein, D. P. R.; Silveira, J.; Romani, S. Isolamento e atividade antagonística de fungos endofíticos isolados de soja (*Glycine max* L.(Merril)). **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 86-96, 2012.

BEUCHLE, R.; Grecchi, R.C.; Shimabukuro, Y.E.; Seliger, R.; Eva, H.D.; Sano, E.; Achard, F. Land cover changes in the Brazilian Cerrado and Caatinga biomes from 1990 to 2010 based on a systematic remote sensing sampling approach. **Applied Geography**, v.58, p.116-127, 2015.

BOGAS, A. C. **Avaliação da interação entre *Methylobacterium* spp. e citros**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2010.

BOGAS, A. C.; Ferreira, A. J.; Araújo, W. L.; Astolfi-Filho, S.; Kitajima, E. W.; Lacava, P. T.; Azevedo, J. L. Endophytic bacterial diversity in the phyllosphere of Amazon Paullinia

cupana associated with asymptomatic and symptomatic anthracnose. **SpringerPlus**, v.4, n.1, p258, 2015.

BONGIORNO, V. A.; Rhoden, S. A.; Garcia, A.; Polonio, J. C.; Azevedo, J. L.; Pereira, J. O.; Pamphile, J. A. Genetic diversity of endophytic fungi from *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 in organic crops. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 855-865, 2016.

BORGES, W. D. S.; Borges, K. B.; Bonato, P. S.; Said, S.; Pupo, M. T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, n. 12, p. 1137-1163, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto n. 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápico. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

CAMPANILE, G.; Ruscelli, A.; Luisi, N. Antagonistic activity of endophytic fungi toward *Diplodia cortícola* assessed by vitro and in plants tests. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 117, n.3, p.237-246, 2007.

CANUTO, K. M.; Rodrigues, T. H. S.; Oliveira, F. S. A.; Gonçalves, F. J. T. Fungos endofíticos: perspectiva de descoberta e aplicação de compostos bioativos na agricultura. **Embrapa Agroindústria Tropical-Documentos (INFOTECA-E)**, 2012

CAO, R.; Liu, X.; Gao, K.; Mendgen, K.; Kang, Z.; Gao, J.; Dai, Y.; Wang, X. Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. *Current microbiology*, v.59, n.6, p.584-592, 2009.

CARVALHO, C. R.; Gonçalves, V. N.; Pereira, C. B.; Johann, S. Galliza, I. V.; Alves, Rabello A; Sobral, M. E. G.; Zani, C. L.; Rosa C. A; Rosa, L. H. The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. **Symbiosis**, v. 57, n. 2, p. 95-107, 2012.

CARRANZA, T.; Balmford, A.; Kapos, V.; Manica, A. Protected area effectiveness in reducing conversion in a rapidly vanishing ecosystem: the Brazilian Cerrado. **Conservation Letters**, v.7, n.3, p.216-223, 2014.

CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v.42, n.3, p.225-226.

CASTRO, A.H.F.; Paiva, R.; Alvarenga, A.A.; Vitor, S.M.M. Calogênese e teores de fenóis e tatinos totais em barbatimão *stryphnodendron adstringens* (mart.) coville; Callogenesis and contents of total phenols and tannins in barbatimão *Stryphnodendron adsrtingens* (Mart.) Coville. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n.2, p.385-390, 2009.

CHAVES, Arthur Pinto; OBA, Carlos Alberto Ikeda. **Coletânea fertilizantes VI: Crítica ao modelo brasileiro de fertilizantes de alta solubilidade**, Rio de Janeiro: CETEM/MCT, p.25, 2004.

CHEN, L.; Luo, S.; Xiao, X.; Guo, H.; Chen, J.; Wan, Y.; Li, B.; Xu, T.; Xi, Q.; Rao, C.; Liu, C.; Liu, C. Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils. **Applied soil ecology**, v. 46, n. 3, p. 383-389, 2010.

COMBÈS, A.; Ndoye, I.; Bance, C.; Bruzard, J.; Djediat, C.; Dupont, J.; Nay, B.; Prado, S. Chemical communication between the endophytic fungus *Paraconiothyrium variabile* and the phytopathogen *Fusarium oxysporum*. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47313, 2012.

COOMBS, G. S.; Rao, M. S.; Olson, A. J.; Dawson, P. E.; Madison, E. L. Revisiting catalysis by chymotrypsin family serine proteases using peptide substrates and inhibitors with unnatural main chains. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 34, p. 24074-24079, 1999.

COOK, R. J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogen. **Annual Review Phytopathology**, v. 31, p. 53-80, 1993.

CORRÊA, R. C. G.; Rhoden, S. A.; Mota, T. R.; Azevedo, J. L.; Pamphile, J. A.; Souza, C. G. M.; Bracht, A.; Peralta, R. M. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467-1478, 2014.

COSOVEANU, A.; Rodriguez Sabina, S.; Cabrera, R. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. **Fungal Diversity**, v. 50, n. 1, p. 189, 2018.

COSTA, G. A. F.; Morais, M. G.; Saldanha, A. A.; Silva, A.; Caputo, I.; Aleixo, Á. A.; Ferreira, J. M. S.; Soares, A. C.; Duarte-Almeida, J. M.; Lima, L. A. R. D. S. Antioxidant, antibacterial, cytotoxic, and anti-inflammatory potential of the leaves of *Solanum lycocarpum* A. St. Hil. (Solanaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

COUTINHO, F. P.; Cavalcanti, M. A. D. Q.; Yano-Melo, A. M. Phosphate-solubilizing fungi isolated from a semiarid area cultivated with melon (*Cucumis melo* L. cv. gold mine). **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 4, p. 929-931, 2011.

COUTINHO, F. P.; Silva, J. F. D.; Santana, I. P. D.; Felix, W. P.; Yano-Melo, A. M. In vitro solubilization of phosphates by *Aspergillus brasiliensis* Varga, Frisvad & Samson in the presence of carbon sources. **Hoehnea**, v. 41, n. 2, p. 277-282, 2014.

CUZZI, C.; Link, S.; Vilani, A.; Onofre, S. B. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis Dracunculifolia* DC (ASTERAECEAE). **Global Science and Technology**, v. 4, n. 2, 2011.

EDGINTON, L. V.; KNEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 62, n. 7, p. 42 - 44, 1971.

ELLILÄ, S.; Fonseca, L.; Uchima, C.; Cota, J.; Goldman, G. H.; Saloheimo, M.; Sacon V.; Siika-aho, M. Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, n. 1, p. 30, 2017.

EMBRAPA. **EMBRAPA CERRADO:VI Plano Diretor da EMBRAPA Cerrados**. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/publico/pdu2008-2011.pdf>. 2008. Acesso em: 20 de janeiro de 2017.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L.. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul, **RS: EDUCS**, 2004.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Formulário de fitoterápicos**, 1ª Ed., ANVISA. 2011. 119p. Acesso em: 10 de julho de 2017.

FAVORETTO, Naira Beatriz. **Produção de substâncias bioativas por micro-organismos endofíticos isolados do Cerrado de São Carlos-SP**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos –UFScar, 2010.

FERREIRA, M. E.; Ferreira Jr, L. G.; Miziara, F.; Soares-Filho, B. S. Modeling landscape dynamics in the central Brazilian savanna biome: future scenarios and perspectives for conservation. **Journal of Land Use Science**, v. 8, n. 4, p. 403-421, 2013.

FERREIRA, E. C.; Silva, J. L.L.; Souza R. S. As propriedades medicinais e bioquímicas da planta *Stryphnodendron adstringens* “Barbatimão”. **Biológicas & Saúde**, v. 3, n.11, 2013.

FERREIRA, E. M. S.; Malta, C. M.; Coelho, C. M.; Sanzio, R. Substâncias GRAS no controle do crescimento de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium guttiforme* in vitro. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 2, n. 4, p. 183-188, 2015.

FIORI, G. M. L.; Fachin, A. L.; Correa, V. S.; Bertoni, B. W.; Giuliatti, S.; Amui, S. F.; Franca S. C.; Pereira, A. M. S. Antimicrobial activity and rates of tannins in *Stryphnodendron adstringens* Mart. accessions collected in the Brazilian Cerrado. **American Journal of Plant Sciences**, v.4, n.11, p.2193, 2013.

FILLAT, Ú.; Martín-Sampedro, R.; Macaya-Sanz, D.; Martín, J. A.; Ibarra, D.; Eugenio, M. E. Potential of Lignin-Degrading Endophytic Fungi on Lignocellulosic Biorefineries. In **Endophytes: Crop Productivity and Protection**, Springer, Cham, p. 261-281, 2017.

FRANCO, A. C.; Rossatto, D. R.; Silva, L. D. C. R.; Silva Ferreira, C. Cerrado vegetation and global change: the role of functional types, resource availability and disturbance in regulating plant community responses to rising CO₂ levels and climate warming. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 19-38, 2014.

FRANÇOSO, R.D.; Brandão, R.; Nogueira, C.C.; Salmona, Y.B.; Machado, R.B.; Colli, G.R. Habitat loss and the effectiveness of protected areas in the Cerrado Biodiversity Hotspot. **Natureza & Conservação**, v.1, n.1, p.35-40, 2015.

FREITAS, L. S.; Silva, E. M.; Ferreira, O. E. Produção e caracterização de α -amilase termoestável de *Syncephalastrum racemosum*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, n. 4, 2015.

GANGADEVI V.; Muthumary J. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. **Mycologia Balcanica**, v. 5, p. 1-4, 2008.

GALLON, M. E.; Barros, B. S. P.; Silva, M. A.; Dias, S. H. M.; Alves-da-Silva, G. Determinação dos parâmetros anatômicos, físico-químico e fitoquímicos das folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. a00101s1, p. 937-944, 2015.

GUETSKY, R.; Shtienberg, D.; Elad, Y.; Fischer, E.; Dinooor, A. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. **Phytopathology**, v. 92, n. 9, p. 976-985, 2002.

HENRIQUES, B. O.; Corrêa, O.; Azevedo, E. P. C.; Pádua, R. M.; Oliveira, V. L. S. D.; Oliveira, T. H. C.;Teixeira, M. M. In vitro TNF-inhibitory activity of Brazilian plants and anti-inflammatory effect of *Stryphnodendron adstringens* in an acute arthritis model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2016.

HORMAZABAL E; Piontelli E. Endophytic fungi from Chilean native gymnosperms: antimicrobial activity against human and phytopathogenic fungi. **World J Microbiol Biotechnol**, v.25, p. 813-19, 2009.

HUANG, J., H.; Xiang, M., M.; JIANG, Z., D. Endophytic Fungi of Bitter Melon (*Momordica charantia*) in Guangdong Province, China. **The Great Lakes Entomologist**, v. 45, n. 1 & 2, p. 2, 2018.

IMPULLITTI, A. E.; Malvick, D. K. Fungal endophyte diversity in soybean. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 5, p. 1500-1506, 2013.

JACOBSON, T. K. B.; Garcia, J. Costa S., S.; Duarte, J. B.; Farias, J. G.; Kliemann, H. J. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron* sp.). *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.35, n.3, p.163-169, 2005.

KAPRI, A.; Tewari, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 787-795, 2010.

KATOCH, M.; Pull, S. Endophytic fungi associated with *Monarda citriodora*, an aromatic and medicinal plant and their biocontrol potential. **Pharmaceutical biology**, v. 55, n. 1, p. 1528-1535, 2017.

KLINK, C.A.; Machado, R.B. Conservation of the Brazilian cerrado. **Conservation biology**, v.19, n.3, p.707-713, 2005.

KOJO, T.; Kadooka, C.; Komohara, M.; Onitsuka, S.; Tanimura, M.; Muroi, Y.; Kurazono, S.; Shiraishi, Y.; Oda, K.; Iwashita, K.; Onoue, M.; Okutsu, K.; Yoshizaki, Y.; Takamine, K.; Futagami, T.; Mori, K.; Tamaki, H. Characterization of amyolytic enzyme overproducing mutant of *Aspergillus luchuensis* obtained by ion beam mutagenesis. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 63, n. 6, p. 339-346, 2017.

KUHAD, R. C., Gupta, R., & Singh, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme research**, v. 2011, 2011.

KUSARI, S.; Pandey, S. P.; Spiteller, M.. Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. **Phytochemistry**, v. 91, p. 81-87, 2013.

LACAVA, P. T.; Sebastianes, F. L. S.; Azevedo, J. L. Fungos endofíticos: biodiversidade e aplicações biotecnológicas. . In: Esposito, E.; Azevedo, J. L. (eds.), **Fungos, uma introdução à biologia, química e biotecnologia, 2nd edn. Universidade Caxias do Sul, Rio Grande do Sul**, p. 533-569, 2010.

LACAVA, P. T.; Azevedo, J. L. Endophytic bacteria: a biotechnological potential in agrobiology system. In: **Bacteria in Agrobiology: Crop Productivity**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 1-44, 2013.

LACAVA, P. T.; Azevedo, J.L. Biological Control of Insect-Pest and Diseases by Endophytes. In: Verma, V. C.; Gange A. C. (eds.), **Advances in endophytic Research**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 231-256, 2014.

LACAVA, P. T.; Sousa, C. P. Role of endophytic actinomycetes in crop protection: plant growth promotion and biological control. In: **Plant Growth Promoting Actinobacteria**. Springer, Singapore, p. 147-160, 2016.

LAHLALI, R.; Hijri, M. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. **FEMS Microbiology Letters**, v. 311, n. 2, p. 152-159, 2010.

LEITÃO, V. O.; Melo C. R. L., Vainstein, M. H.; Ulhoa, C. J. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*. **Biotechnology letters**, v. 32, n. 8, p. 1083-1088, 2010.

LEITE, T. S. **Diversidade de fungos endofíticos de folhas de soja (*Glycine max*) cultivada em Viçosa- MG**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa- UFV, 2010.

LEITE, T. S., Cnossen-Fassoni, A.; Pereira, O. L.; Mizubuti, E. S. G.; Araújo, E. F.; Queiroz, M. V. Novel and highly diverse fungal endophytes in soybean revealed by the consortium of two different techniques. **Journal of Microbiology**, v.51, n.1, p.56-69, 2013.

LIMA, J. C. S.; Martins, D. T. O.; De Souza, P. T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. **Phytotherapy Research**, v.12, n.3, p.218-220, 1998.

- LIMA, T. C. D. D.; Cardoso, M. V.; Modesto, T.; Oliveira, A. L. D. B.; Silva, M. N. D.; Monteiro, M. C. Breve revisão etnobotânica, fitoquímica e farmacologia de *Stryphnodendron adstringens* utilizada na Amazônia, **Revista Fitos**, v.10, n.3, p. 220-372, 2016.
- LOPES, R. B.; Miola, D. T. B. Sequestro de carbono em diferentes fitofisionomias do cerrado. **SYNTHESIS| Revistal Digital FAPAM**, v.2,n. 2, p.127-143, 2010.
- LOPES, J. C., Junior, A. F. C., da Costa Neves, A. C., Chapla, V. M., & da Rosa Batistella, C. A. Fungos endofíticos isolados do capim citronela e seleção de antagonistas a fitopatógenos. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 7, n. 3, p. 84-88, 2017.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. **Plantarum**, Nova Odessa. v.1, p.368, 1998.
- LUCENA, M. N.; Mendes, M. M.; Brandeburgo, M. I. H.. Avaliação da estabilidade da pomada à base de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Conville e sua eficácia na neutralização dos efeitos locais induzidos pela peçonha de *Bothrops pauloensis*. **Horizonte Científico**, v. 3, n. 1, 2009.
- LUDWIG-MÜLLER, Jutta. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production?. **Biotechnology letters**, v. 37, n. 7, p. 1325-1334, 2015.
- LUIZ, R. L. F.; Vila, T. V. M.; Mello, J. C. P.; Nakamura, C. V.; Rozental, S.; Ishida, K. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. **BMC complementary and alternative medicine**, v15, n.1, p.68, 2015.
- LUNARDELLI, P. C. N.; Oliveira E. S.; Chagas, D. P. A. C.; Honorata L. J. H.; Ikegaki, M. Importance and implications of the production of phenolic secondary metabolites by endophytic fungi: a mini-review. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v.16, n.4, p.259-271, 2016.
- MACHADO, J. E. B.; Ximenes, F. H. B.; Leite, C. R.; Silva M., V.; Borges, J. R. J.; Castro, M. B.; Godoy, R. F. Comparação entre os efeitos de diferentes tratamentos na cicatrização de pele por segunda intenção em ovinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n. 4, p. 298-302, 2010.
- MACHADO, P. C. **Identificação molecular e caracterização bioquímica de bactérias endofíticas associadas à cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) com potencial biotecnológico**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.
- MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Diversity and screening for antimicrobial activity of endophytic fungi from *Alstonia scholaris*. **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, v. 57, n. 3, p. 215-223, 2010.

- MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.1, p.369-409, 1993.
- MAROLDI, M. M. C.; Vasconcellos, V. M.; Lacava, P. T.; Farinas, C. S. Potential of Mangrove-Associated Endophytic Fungi for Production of Carbohydrolases with High Saccharification Efficiency. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 184, n. 3, p. 806-820, 2018.
- MARTINS, G. Z. Estudo Farmacognóstico e Screening Biológico de *Solanum lycocarpum* St. Hill (Solanaceae). Tese de doutorado, Unesp, Araraquara, 2013.
- MARTINS, G. Z.; Moreira, R. R.; Planeta, C. S.; Almeida, A. E.; Bastos, J. K.; Salgueiro, L.; Cavaleiro C.; Céu Sousa, M. Effects of the extract and glycoalkaloids of *Solanum lycocarpum* St. Hill on *Giardia lamblia* trophozoites. **Pharmacognosy magazine**, v. 11, n. Suppl 1, p. S161, 2015.
- MATSUMOTO, A., & Takahashi, Y. Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. **The Journal of antibiotics**, v.70, n.5, 514, 2017.
- MCKENZIE, R. H.; Roberts, T. L. Soil and fertilizers phosphorus update. In: **Proceedings of Alberta Soil Science Workshop Proceedings**, Feb. 20-22, Edmonton, Alberta, p. 84-104, 1990.
- MELO, J. O. D.; Endo, T. H.; Bersani-Amado, L. E.; Svidzinski, A. E.; Baroni, S.; Mello, J. C. P. D.; Bersani-Amado, C. A. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) bark on animal models of nociception. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.3, p.465-469, 2007.
- MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. **Micologia: avanços no conhecimento. Brazilian Society Microbiology Publ., Recife**, p. 129-140, 2007.
- MENDES R.; GARBEVA, P.; RAAIJMARKERS, J.M. The rizhosphero microbiome: significance o plant beneficial, plant pathogenic and human pathogenic microorganisms. **Federation of European Microbiological Societies**, Oxford, v. 37, p.634-663, 2013.
- MENDONÇA, P. C.; Bertoni, B. W.; Amui, S. F.; Giuliatti, S.; Corrêa, V. S. C.; Castro, S. F.; Pereira, A. M. S. Genetic diversity of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville determined by AFLP molecular markers. **Biochemical systematics and ecology**, v.41, p.16-20, 2012.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v.3, p. 9-23, 2009.
- MOREY, T. A.; C de Souza, F.; P Santos, J.; A Pereira, C.; D Cardoso, J.; SC de Almeida, R.; M Yamauchi, L.; Yamada-Ogatta F. S. Antifungal activity of condensed tannins from

Stryphnodendron adstringens: effect on *Candida tropicalis* growth and adhesion properties. **Current pharmaceutical biotechnology**, v.17, n.4, p365-375, 2016.

MOURA, T. M.; OLIVEIRA, G. C. X.; CHAVES, Lázaro J. Correlação entre floração, frutificação e variáveis ambientais em *Solanum lycocarpum* A. St. Hil, Solanaceae. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 3, 2010.

MOURA, T. M. D.; Sebbenn, A. M.; Martins, K.; Moreno, M. A.; Oliveira, G. C. X.; Chaves, L. J.; Kageyama, P. Y.I. Allelic diversity in populations of *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) in a protected area and a disturbed environment. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 4, p. 937-940, 2011.

MUNARI, C. C., de Oliveira, P. F., Campos, J. C. L., Martins, S. D. P. L., Da Costa, J. C., Bastos, J. K., & Tavares, D. C. Antiproliferative activity of *Solanum lycocarpum* alkaloidic extract and their constituents, solamargine and solasonine, in tumor cell lines. **Journal of natural medicines**, v. 68, n. 1, p. 236-241, 2014.

MUNARI, C. C., de Oliveira, P. F., Leandro, L. F., Pimenta, L. M., Ferreira, N. H., da Costa, J. D. C.; Tavares, D. C. In vivo assessment of genotoxic, antigenotoxic and anticarcinogenic activities of *Solanum lycocarpum* fruits glycoalkaloidic extract. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e111999, 2014.

NARUZAWA, E. S.; PAPA, M. F. S. Antifungal activity of extracts from brazilian Cerrado plants on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Corynespora cassiicola*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 408-412, 2011.

NEWMAN, D. J.; Cragg, G. M. Endophytic and epiphytic microbes as “sources” of bioactive agents. **Frontiers in chemistry**, v. 3, p. 34, 2015.

OLIVEIRA, A. L. S., & Figueiredo, A. D. L. Prospecção Fitoquímica das Folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.S2, p. 384, 2007.

OLIVEIRA JUNIOR, E. N. D.; Santos, C. D. D.; Abreu, C. M. P. D.; Corrêa, A. D.; Santos, J. Z. L. Nutritional analysis of "fruta-de-lobo" (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) during the ripening process. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 4, p. 846-851, 2003.

OLIVEIRA, A. G.; Chagas Junior, A. F., Santos, G. R.; Miller, L. O.; Chagas, L. F. B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012.

O'REILLY, E., & Turner, N. J. Enzymatic cascades for the regio- and stereoselective synthesis of chiral amines. **Perspectives in Science**, v. 4, p. 55-61, 2015

ORLANDELLI, R. C.; Alberto, R. N.; Rubin Filho, C. J.; Pamphile, J. A. Diversity of endophytic fungal community associated with *Piper hispidum* (Piperaceae) leaves. **Genet Mol Res**, v.11, n.2, p.1575-1585, 2012.

ORLANDELLI, R. C.; Sanches Santos, M.; Polonio, J. C.; Azevedo, J. L.; Alencar Pamphile, J. Use of agro-industrial wastes as substrates for α -amylase production by endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 39, n. 3, 2017.

OWEN, N. L.; Hundley, N. Endophytes—the chemical synthesizers inside plants. **Science progress**, v. 87, n. 2, p. 79-99, 2004.

PAMPHILE, J. A., Costa, A. T., Rosseto, P., Polonio, J. C., Pereira, J. O.; Azevedo, J. L. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. **REVISTA UNINGÁ**, v. 53, n. 1, p. 113-119, 2017.

PASSARETTI, T.; Guarnieri, A. P.; Filipini, R.; Alves, B. D. C. A.; Fonseca, F. L. A. Eficácia do uso do Barbatimão (*Stryfnodendron barbatiman*) no processo de cicatrização em lesões: uma revisão de literatura. **ABCS Health Sciences**, v.41, n.1, p. 51-54, 2016.

PAUSAS, Juli G. Homage to LM Coutinho: fire adaptations in cerrado plants. **International Journal of Wildland Fire**, v. 26, n. 3, p. 249-251, 2017.

PEIXOTO NETO, PA de S.; Azevedo, J. L.; Araújo, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biociência**, v. 29, p. 62-77, 2002.

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDRENA, J.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves**. Berlin: Springer-Verlag, p.179-197, 1991.

PIMENTEL, I. C.; Clenke-Blanco, C.; Gabardo, J.; Stuart, R, M.; Azevedo, J. L. Identification and colonization of endophytic fungi from Soybean (*Glycine max*) (L.) (Merril) under different environmental conditions. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.49, p. 705-711. 2006.

PINHEIRO, E. S.; Durigan, G.. Diferenças florísticas e estruturais entre fitofisionomias do Cerrado em Assis, SP, Brasil. **Revista Árvore**, v. 36, n. 1, 2012.

PRADA, H.; Avila, L.; Sierra, R.; Bernal, A.; Restrepo, S. Caracterización morfológica y molecular del antagonismo entre el endofito *Diaporthe* sp. aislado de frailejón (*Espeletia* sp.) y el fitopatógeno *Phytophthora infestans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 3, p. 198-201, 2009.

PREVEDELLO, J.A.; Carvalho, C.J. Conservação do Cerrado brasileiro: o método pan-biogeográfico como ferramenta para a seleção de áreas prioritárias. **Natureza e Conservação**, v.4, n.1, p.39-57, 2006.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 89 - 96, 2001.

RAMPELOTTO, P. H.; Siqueira, A. F., Barboza; A. D. M.; Roesch, L. F. W. Changes in diversity, abundance, and structure of soil bacterial communities in Brazilian Savanna under different land use systems. **Microbial ecology**, v. 66, n. 3, p. 593-607, 2013.

- RAHMÉ, Gustavo Morandi. **Prospecção química em *Pseudofusicoccum stromaticum*, um fungo Endofítico em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae).** Dissertação de mestrado, Unesp, Araraquara 2017.
- REDDY, M. S.; Murali, T. S.; Suryanarayanan, T. S.; Rajulu, M. G.; Thirunavukkarasu, N. Pestalotiopsis species occur as generalist endophytes in trees of Western Ghats forests of southern India. **Fungal Ecology**, v. 24, p. 70-75, 2016.
- REHMAN, S.; Shawl, A. S.; Kour, A.; Andrabi, R.; Sudan, P.; Sultan, P.; Verma, V.; Qazi, G. N. An endophytic Neurospora sp. from Nothapodytes foetida producing camptothecin. **Applied biochemistry and microbiology**, v. 44, n. 2, p. 203-209, 2008.
- RIBAS, P. P.; Rech, R.; Santos Matsumura, A. T.; Van Der Sand, S. T. Potencial in vitro para solubilização de fosfato por Trichoderma spp. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 14, n. 2, 2016.
- RIBEIRO, A. S.; Polonio, J. C.; Costa, A. T.; Santos, C. M.; Rhoden, S. A.; Azevedo, J. L.; Pamphile, J. A. Bioprospection of Culturable Endophytic Fungi Associated with the Ornamental Plant Pachystachys lutea. **Current microbiology**, p. 1-9, 2018.
- RIVERA-ORDUÑA, F. N.; Suarez-Sanchez, R. A.; Flores-Bustamante, Z. R.; Gracida-Rodriguez, J. N.; Flores-Cotera. Diversity of endophytic fungi of Taxus globosa (Mexican yew). **Fungal Diversity**, v. 47, n. 1, p. 65-74, 2011.
- RODRIGUEZ, P.; Gonzalez, D.; Giordano, S. R. Endophytic microorganisms: A source of potentially useful biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2017.
- ROMERO, M. D.; Aguado, J.; González, L.; Ladero, M. Cellulase production by Neurospora crassa on wheat straw. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 3-5, p. 244-250, 1999.
- SABINO, A. P. L.; Eustáquio, L. M. S.; Miranda, A. C. F.; Biojone, C.; Mariosa, T. N.; Gouvêa, C. M. C. P. Stryphnodendron adstringens (“Barbatimão”) Leaf Fraction: Chemical Characterization, Antioxidant Activity, and Cytotoxicity Towards Human Breast Cancer Cell Lines. **Applied biochemistry and biotechnology**, 1-15, 2017.
- SANTAMARIA, J.; Bayman, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (Coffea arabica). **Microbial Ecol.**, v. 50, p. 1-8, 2005.
- SANTANA, B.F.; Robert, A. Voeks, R.A.; Funch, L.S. Ethnomedicinal Survey of a Maroon Community in Brazil's Atlantic Tropical Forest. Elsevier. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 181, p. 37-49, 2016.
- SANTOS, C. M. **Prospecção enzimática e atividade antagonística in vitro de fungos endofíticos isolados de folhas de *Sapindus saponaria* L.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil, 2016.

SARAIVA, R. M.; França, P. E.; Borges, Á. V.; Maffia, L. A. Uso e perspectiva de *Clonostachys rosea* como agente de biocontrole. **Revista de Ciências Agrícolas**, v. 31, n. 1, p. 78-91, 2014.

SCHACHTMAN, D. P.; Reid, R. J.; Ayling, S. M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. **Plant physiology**, v. 116, n. 2, p. 447-453, 1998.

SEBASTIANES, F. L. S.; Romao-Dumaresq, A. S.; Lacava, P. T.; Harakava, R.; Azevedo, J. L.; Melo, I. S.; Pizzirani-Kleiner, A. A. Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. *Current genetics*, v.59, n.3, p.153-166, 2013.

SEBASTIANES, F. L. S.; Azevedo, J. L.; Lacava, P. T. Diversity and biotechnological potential of endophytic microorganisms associated with tropical mangrove forests. In: **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Springer, Cham, p. 37-56, 2017.

SHETTY, K. G.; Minnis, A. M.; Rossman, A. Y.; Jayachandran, K. The Brazilian peppertree seed-borne pathogen, *Neofusicoccum batangarum*, a potential biocontrol agent. **Biological control**, v.56, n.1, p.91-97, 2011.

SHETTY, K. G.; Rivadeneira, D. V.; Jayachandran, K.; Walker, D. M. Isolation and molecular characterization of the fungal endophytic microbiome from conventionally and organically grown avocado trees in South Florida. **Mycological progress**, v. 15, n. 9, p. 977-986, 2016.

SIA, E. F.; Marcon, J.; Luvizotto, D. M.; Quecine, M. C.; Tsui, S., Pereira; J. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; Azevedo, J. L. Endophytic fungi from the Amazonian plant *Paullinia cupana* and from *Olea europaea* isolated using cassava as an alternative starch media source. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 579, 2013.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 23, n. 1, p. 15-22, 1957.

SILVA, J. A.; Silva, D. B.; Junqueira, N. T. V.; Andrade, L. R. M. Frutas nativas dos cerrados. **Embrapa**, Brasília, p.166, 1994.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de micro-organismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, p.1495-1508, 2001.

SILVA, U. C.; Gomes, E. A.; LANA, U. D. P.; Marriel, I. E. Potencial de solubilização de fósforo in vitro por isolados fúngicos do solo. In: **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: Reunião brasileira de fertilidade do solo e nutrição de plantas, 29.; Reunião brasileira sobre micorrizas, 13.; Simpósio brasileiro de microbiologia do solo, 11.; Reunião brasileira de biologia do solo, 8., 2010, Guarapari. Fontes de nutrientes e

produção agrícola: modelando o futuro: anais. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2010.

SILVA, M. C. S. **Bioprospecção e caracterização de microrganismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose (*Colletotrichum* spp.)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2015.

SOUSA, C.P.; Serrano, N.F.G.; and Lacava, P.T. Endophytic Microorganisms of the Tropical Savannah: A Promising Source of Bioactive Molecules. **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Springer, Cham, p. 57-70ringer, 2017.

SOUCHIE, E. L.; Azcón, R.; Barea, J. M.; Saggin- Júnior, O. J.; Silva, E. M. R. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005.

SOUZA, T. M.; Severi, J. A.; Silva, V. Y. A.; Santos, E.; Pietro, R. C. L. R. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, n.2, p.221-226, 2009.

SPECIAN, V., Orlandelli, R. C., Felber, A. C., Azevedo, J. L., & Pamphile, J. A. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 4, 2014.

STIERLE, A.; Strobel, G.; Stierle, D.. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.

STUART, R. M.; Romão, A. S.; Pizzirani-Kleiner, A. A.; Azevedo, J. L.; Araújo, W. L. Culturable endophytic filamentous fungi from leaves of transgenic imidazolinone-tolerant sugarcane and its non-transgenic isolines. **Archives of microbiology**, v.192, n.4, p.307-313, 2010.

SUN, S.; Zeng, X.; Zhang, D.; Guo, S. Diverse fungi associated with partial irregular heartwood of *Dalbergia odorifera*. **Scientific reports**, v. 5, p. 8464, 2015.

SUNITHA, V. H.; Devi, D. N.; Srinivas, C. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 9, n. 1, p. 01-09, 2013.

SURYANARAYANAN, T. S.; Venkatesan, G.; Murali, T. S. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. **Current Science**, p. 489-493, 2003.

SURYANARAYANAN, T. S.; Thirunavukkarasu, N.; Govindarajulu, M. B.; Sasse, F.; Jansen, R.; Murali, T. S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, n. 1-2, p. 9-19, 2009.

SZENGYEL, Zsolt. **Ethanol from wood Cellulase enzyme production**. Department of Chemical Engineering, Lund University, 2000.

TAKAHASHI, J. A.; Lima, G. S.; Santos, G. F.; Lyra, F. H.; Hughes, A. F.; Gonçalves, F. A. G. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista Virtual de Química**, 2017

TALAPATRA, K.; Das, A. R.; Saha, A. K.; Das, P. In vitro antagonistic activity of a root endophytic fungus towards plant pathogenic fungi. **Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol**, v. 5, n. 2, p. 068-071, 2017.

TAN, R. X.; Zou, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural product reports**, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

TAWFIKE, A. F.; Abbott, G.; Young, L.; Edrada-Ebel, R. Metabolomic-Guided Isolation of Bioactive Natural Products from *Curvularia* sp., an Endophytic Fungus of *Terminalia laxiflora*. **Planta medica**, v. 84, n. 3, p. 182-190, 2018.

TEATHER, R. M.; Wood, P. J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and environmental microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982.

TIOSSI, R.F.J.; Miranda, M.A.; Sousa, J.P.B.; Praca, F.S.G.; Bentley M.V.L.B.; McChesney, J.D.; Bastos, J.K. A validated reverse phase HPLC analytical method for quantitation of glycoalkaloids in *Solanum lycocarpum* and its extracts. **J Anal Methods Chem**, v. 2012, 2012.

TIOSSI, R. F.; Costa, J. C.; Miranda, M. A.; Praça, F. S.; McChesney, J. D.; Bentley, M. V. L.; Bastos, J. K. In vitro and in vivo evaluation of the delivery of topical formulations containing glycoalkaloids of *Solanum lycocarpum* fruits. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 28-33, 2014.

TOGHUEO, R. M. K.; Eke, P.; Zabalgoceazcoa, Í.; Aldana, B. R. V.; Nana, L. W.; Boyom, F. F. Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from *Terminalia catappa* against the causative agent of Common Bean Root Rot (*Fusarium solani*). **Biological control**, v. 96, p. 8-20, 2016.

TROLEZI, R.; Azanha, J. M.; Paschoal, N. R.; Chechi, J. L.; Silva, M. J. D.; Fabris, V. E.; Vilegas W.; Kaneno R.; Fernandes-Junior, A.; Bosco, S. M. G. *Stryphnodendron adstringens* and purified tannin on *Pythium insidiosum*: in vitro and in vivo studies. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v.16, n.1, p.7, 2017.

UDAYANGA, D., Liu, X., McKenzie, E. H., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H., & Hyde, K. D. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. **Fungal Diversity**, v. 50, n. 1, p. 189, 2011.

UZOR, Philip F.; OSADEBE, Patience O.; NWODO, Ngozi J. Antidiabetic activity of extract and compounds from an endophytic fungus *Nigrospora oryzae*. **Drug research**, v. 67, n. 5, p. 308-311, 2017.

VALE, M. M.; Rangel, T. F.; Aleixo, A. L. P.; Grelle, C. E. V.; Albernaz, A. L. K. M. Mudanças climáticas e a biodiversidade dos biomas brasileiros: passado, presente e futuro. **Natureza & Conservação**, v.8, n.2, p.194-196, 2010.

VALERO-JIMÉNEZ, C. A.; Kan, J. A.; Koenraadt, C. J.; Zwaan, B. J.; Schoustra, S. E. Experimental evolution to increase the efficacy of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against malaria mosquitoes: Effects on mycelial growth and virulence. **Evolutionary applications**, v. 10, n. 5, p. 433-443, 2017.

VEGA, F. E.; Posada, F.; Aime, M. C.; Pava-Ripoll, M.; Infante, F.; Rehner, S. A. Entomopathogenic fungal endophytes. **Biological Control**, v.46, n.1, p.72-82, 2008.

VIDAL, M. C.; Stacciarini-Seraphin, E.; Câmara, H. H. L. L. Crescimento de plântulas de *Solanum lycocarpum* St. Hil.(lobeira) em casa de vegetação. **Acta Botanica Brasilica**, v. 13, n. 3, p. 271-274, 1999.

VIEIRA M.L.A. **Bioprospecção da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos ssociados a *Solanum cernuum* vell.(Solanaceae)**. Dissertação de mestrado, UFMG. Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

VIEIRA, M. L.; Johann, S.; Hughes, F. M.; Rosa, C. A.; Rosa, L. H. The diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with medicinal plant *Baccharis trimera* (Asteraceae) from the Brazilian savannah. **Canadian journal of microbiology**, v. 60, n. 12, p. 847-856, 2014.

YOSHIKAWA, M.; Nakamura, S.; Ozaki, K.; Kumahara, A.; Morikawa, T.; Matsuda, H. Structures of steroidal alkaloid oligoglycosides, robeneosides A and B, and antidiabetogenic constituents from the Brazilian medicinal plant *Solanum lycocarpum*. **Journal of natural products**, v.70, n.2, p.210-214, 2007.

ZHAO, J. H.; Zhang, Y. L.; Wang, L. W.; Wang, J. Y.; Zhang, C. L. Bioactive secondary metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an endophytic fungus of the medicinal plant *Moringa oleifera* Lam. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2107-2112, 2012.

ZHAO, S.; Chen, S.; Wang, B.; Niu, S.; Wu, W.; Guo, L.; Che, Y. Four new tetramic acid and one new furanone derivatives from the plant endophytic fungus *Neopestalotiopsis* sp. **Fitoterapia**, v. 103, p. 106-112, 2015.