

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Caracterização de fungos endofíticos bioativos associados às espécies vegetais longínquas presentes em fragmento de Mata Atlântica do estado de Minas Gerais com potencial para aplicação contra doenças tropicais negligenciadas e de importância na agricultura

Marina Bahia de Menezes

Belo Horizonte, MG

2022

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Caracterização de fungos endofíticos bioativos associados às espécies vegetais longínquas presentes em fragmento de Mata Atlântica do estado de Minas Gerais com potencial para aplicação contra doenças tropicais negligenciadas e de importância na agricultura

Marina Bahia de Menezes

Tese apresentada ao Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientador: Dr. Luiz Henrique Rosa
Departamento de Microbiologia/ICB, UFMG/MG

Co-orientadora: Dra. Mariana Costa Ferreira
Química de Produtos Naturais Bioativos – QPNB
Instituto René Rachou – IRR
Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz Minas

Belo Horizonte, MG

043

Menezes, Marina Bahia de.

Caracterização de fungos endofíticos bioativos associados às espécies vegetais longínquas presentes em fragmento de Mata Atlântica do estado de Minas Gerais com potencial para aplicação contra doenças tropicais negligenciadas e de importância na agricultura [manuscrito] / Marina Bahia de Menezes. – 2022.

138 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Luiz Henrique Rosa. Co-orientadora: Dra. Mariana Costa Ferreira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Endófitos. 3. Bioprospecção. I. Rosa, Luiz Henrique. II. Ferreira, Mariana Costa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

NOME DA ALUNA: MARINA BAHIA DE MENEZES - 2018726670

Título do Trabalho: "Caracterização de fungos endofíticos bioativos associados às espécies vegetais longínquas presentes em fragmento de Mata Atlântica do estado de Minas Gerais com potencial para aplicação contra doenças tropicais negligenciadas e de importância na agricultura"

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Microbiologia.

Aprovada em 01 de julho de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Membros da banca:

Profa. Dra. Mariana de Lourdes Almeida Vieira

Dra. Camila Rodrigues de Carvalho

Dra. Betânia Barros Cota

Dra. Denise de Oliveira Scoaris

Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa - Orientador

Dra. Mariana Costa Ferreira - Coorientadora

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza

(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia/UFMG)



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 16/08/2022, às 09:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1677965** e o código CRC **9BE875A0**.

Colaboradores:

Dra. Tânia Maria de Almeida Alves

Dr. Carlos Leomar Zani

Dr. Markus Kohlhoff

Química de Produtos Naturais Bioativos

Instituto René Rachou, FIOCRUZ/MG

Dra. Silvana Maria Fonseca Murta

Genômica Funcional de Parasitos

Instituto René Rachou, FIOCRUZ/MG

Dra. Isabela Penna Cerávolo

Imunopatologia

Instituto René Rachou, FIOCRUZ/MG

Dedicatória

A minha família e amigos que me ajudaram a percorrer este caminho.

Agradecimentos

Agradeço imensamente a todas as pessoas que colaboraram para que fosse possível a realização, e, principalmente conclusão desta tese.

Agradeço a Deus, aos meus pais e irmão que sempre me apoiaram incondicionalmente nas minhas decisões.

Ao professor Luiz Rosa pela orientação, ensinamentos, ajuda, oportunidade de crescimento profissional e pela oportunidade de desenvolvimento da pesquisa.

A Marina Costa, pela co-orientação, incentivo, ensinamentos, amizade, paciência e suporte em todos os momentos.

Aos funcionários do Parque Estadual do Rio Doce pela ajuda e disponibilidade, em especial ao Lino.

A todos os amigos e colaboradores do Lab fungos, pela amizade, parceria, troca e ensinamentos.

Em especial a Débora, Mayara, Tamar e Eldon, que me ajudaram quando eu mais precisei. A Ana Raquel, Katharina, Láuren, Lívia, Matheus, Gisele, Flávia, Isabel e Camila pela amizade.

Ao professor Carlos Rosa pela amizade e conselhos.

Ao Oscar e Liliane da UFOP que mesmo distantes me ajudaram imensamente.

A Débora secretária da pós-graduação por todo auxílio e boa vontade.

Os autores agradecem à Rede Plataformas Tecnológicas da FIOCRUZ, pelo apoio e financiamento dos serviços prestados pelas Plataformas de Bioprospecção de Produtos Naturais, Bioensaios, PlaBio-Tc e Sequenciamento/FIOCRUZ-Minas. Agradeço em especial a Daniela, Alisson, Tania, Markus e Carlos.

A Nayara curadora do herbário BHCB pela ajuda e presteza.

A Universidade Federal de Minas Gerais pelo ensino gratuito e de excelência.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos.

"Ah, tem uma repetição, que sempre outras vezes em minha vida acontece. Eu atravesso as coisas – e no meio da travessia não vejo! – a gente quer passar um rio a nado, e passa; mas vai dar na outra banda é num ponto muito mais em baixo, bem diverso do que em primeiro se pensou. Mas tudo vai vivendo demais, se remexendo [...] Tudo o que já foi, é o começo do que vai vir. Quem sabe, tudo o que já está escrito tem constante reforma – mas que a gente não sabe em que rumo está – em bem ou mal, todo-o-tempo reformando! Viver é uma questão de rasgar-se e remendar-se [...] Afinal, há é que ter paciência, dar tempo ao tempo. Já devíamos ter aprendido, e de uma vez para sempre, que o destino tem de fazer muitos rodeios para chegar a qualquer parte. Afinal, quem elegeu a busca, não pode recusar a travessia..."

João Guimarães Rosa

RESUMO

Fungos endofíticos tropicais, conhecidos por habitar diferentes tecidos vegetais sem causar dano aparente aos seus hospedeiros, são considerados fontes promissoras de produtos naturais biologicamente ativos, os quais podem ser aplicados em diferentes segmentos da biotecnologia. Estes micro-organismos são estudados quanto a sua capacidade em produzir diferentes metabólitos bioativos de interesse na medicina e agricultura. Entre as plantas alvos para estudos da comunidade de fungos endofíticos, aquelas consideradas longínquas, endêmicas e com adaptações particulares vem demonstrando representarem promissoras fontes para caracterização de espécies produtoras de moléculas bioativas. Neste contexto, espécies vegetais nativas da Mata Atlântica do Brasil representam alvos interessantes para bioprospecção de fungos endofíticos associados produtores de metabólitos bioativos. A partir do exposto, essa tese teve como objetivo conhecer o potencial dos fungos endofíticos associados às espécies vegetais longínquas de um fragmento de Mata Atlântica de Minas Gerais *Swietenia macrophylla*, *Lecytis pisonis* e *Joannesia princeps* capazes de produzir metabólitos secundários bioativos de interesse na medicina e agricultura. Fragmentos das folhas e raízes adventícias das plantas alvos foram amostrados e utilizados para isolamento dos fungos endofíticos. Um total de 372 isolados de fungos filamentosos foram obtidos, dos quais 201 obtidos dos tecidos de *S. macrophylla*, 52 de *L. pisonis* e 119 de *J. princeps*. Os fungos obtidos foram submetidos ao processo de fermentação sólida para obtenção dos seus metabólitos secundários. Desses, 12 fungos se mostraram produtores de substâncias herbicidas. Os isolados *Pyricularia* sp. UFMGCB 17499 e *Diaporthe* sp. UFMGCB 17510 exibiram atividade herbicida de amplo espectro caracterizado pela inibição das sementes dos alvos *Allium schoenoprasum* (monocotiledônea) e *Lactuca sativa* (dicotiledônea). Quatro extratos obtidos de táxons do gênero *Colletotrichum* (UFMGCB 17500, 174511, 17482 e 18126) exibiram atividade seletiva contra *A. schoenoprasum*, enquanto os isolados UFMGCB 17496 e 17485 exibiram efeito herbicida apenas para *L. sativa*. Além disso, os fungos obtidos foram avaliados quanto à produção de metabólitos capazes de inibir os parasitas *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas), *Leishmania amazonensis* (leishmaniose) e *Plasmodium falciparum* (malária), reconhecidos agentes causadores de doenças tropicais negligenciadas (DTNs). Sete fungos demonstraram ser produtores de metabólitos ativos contra os parasitas causadores de DTN. O extrato fúngico produzido a partir do fungo *Fusarium* sp. UFMGCB 17514 apresentou atividade tripanossomicida com $IC_{50} = 4,39 \mu\text{g mL}^{-1}$. A substância ativa identificada no extrato do táxon

Fusarium sp. UFMGCB 17514 correspondeu a micotoxina beauvericina que exibiu atividade ($IC_{50} = 1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). O extrato do fungo *Fusarium* sp. UFMGCB 18279 foi capaz de inibir *P. falciparum* ($IC_{50} = 5,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e a análise putativa *in sílico* sugeriu que ciclosporina é a substância antimalárica produzida pelo fungo. Já o extrato do fungo *Colletotrichum* sp. UFMGCB 17511 inibiu formas amastigotas de *L. amazonensis* ($IC_{50} = 0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$) e as análises *in sílico* sugeriram que a substância bioativa pertença a classe das glicerofosfocolinas. Além disso, os fungos endofíticos obtidos das raízes de *S. macrophylla* foram avaliados quanto a capacidade de estimular o desenvolvimento das plântulas de soja e feijão *in vivo*. Os isolados *Fusarium* sp. UFMGCB 18289 e 18290 foram capazes de induzir o ganho de biomassa seca e comprimento do caule das plântulas de *Phaseolus vulgaris* (feijão) por meio da adição do meio líquido fermentado. Por outro lado, táxons identificados como espécies de *Fusarium* e *Dactylonectria* foram capazes de inibir a germinação de sementes em plântulas de *P. vulgaris* (feijão) e *Glycine max* (soja). A partir dos resultados obtidos, o presente trabalho contribuiu para o conhecimento do potencial biotecnológico da comunidade de fungos endofíticos associados a plantas longínquas da Mata Atlântica do estado de Minas Gerais, os quais se mostram bons candidatos como produtores de metabólitos para uso contra DTNs e com potencial aplicação na agricultura. Apesar dos metabólitos bioativos dos táxons dos gêneros *Fusarium* e *Colletotrichum* serem conhecidos, os resultados dessa tese sugerem que os fungos avaliados podem ser considerados promissoras “fábricas” eucarióticas produtoras de metabólitos bioativos. Além disso, os fungos endofíticos das plantas longínquas também foram capazes de produzir metabólitos de interesse na agricultura, seja pela sua atividade herbicida ou pela capacidade de estimular o desenvolvimento de plântulas de interesse econômico. Ainda, os resultados também demonstraram que alguns fungos presentes em equilíbrio na raiz de *S. macrophylla* foram capazes de causar efeitos negativos em plântulas de feijão e soja *in vivo*, o que chama a atenção para a não devastação de ecossistemas naturais, incluindo plantas nativas que possuem uma comunidade endofítica em simbiose em seus tecidos.

Palavras chaves: Fungos endofíticos; Metabólitos secundários; Mata atlântica.

ABSTRACT

Tropical endophytic fungi, known to inhabit different plant tissues without causing apparent damage to their hosts, are considered promising sources of biologically active natural products, which can be applied in different segments of biotechnology. These microorganisms are studied as to their ability to produce different bioactive metabolites of interest in medicine and agriculture. Among the plants targeted for studies of the community of endophytic fungi, those considered distant, endemic and with “particular biology” have shown to represent promising sources for the characterization of species producing bioactive molecules. In this context, plant species native to the Atlantic Forest of Brazil represent interesting targets for bioprospecting of associated endophytic fungi producing bioactive metabolites. From the above, this thesis aimed to know the potential of endophytic fungi associated with distant plant species of an Atlantic Forest fragment of Minas Gerais *Swietenia macrophylla*, *Lecythis pisonis* and *Joannesia princeps* capable of producing bioactive secondary metabolites of interest in medicine and agriculture. Fragments of leaves and adventitious roots of the target plants were sampled and used to isolate endophytic fungi. A total of 372 isolates of filamentous fungi were obtained, of which 201 were obtained from the tissues of *S. macrophylla*, 52 of *L. pisonis* and 119 of *J. princeps*. The fungi obtained were submitted to the solid fermentation process to obtain their secondary metabolites. Of these, 12 fungi were shown to be producers of herbicide substances. *Pyricularia* sp. isolates UFMGCB 17499 and *Diaporthe* sp. UFMGCB 17510 exhibited broad-spectrum herbicide activity by inhibiting the seeds of the targets *Allium schoenoprasum* (monocotyledon) and *Lactuca sativa* (dicotyledonea). Four extracts obtained from taxa of the genus *Colletotrichum* (UFMGCB 17500, 174511, 17482 and 18126) exhibited selective activity against *A. schoenoprasum*, while the isolates UFMGCB 17496 and 17485 exhibited herbicide effect only for *L. sativa*. In addition, the fungi obtained were evaluated to produce metabolites capable of inhibiting the parasites *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease), *Leishmania amazonensis* (leishmaniasis) and *Plasmodium falciparum* (malaria), recognized agents causing neglected tropical diseases (NTD). Seven fungi have been shown to be producers of active metabolites against the parasites causing NTD. The fungal extract produced from the fungus *Fusarium* sp. UFMGCB 17514 showed trypanosyactivity with $IC_{50} = 4.39 \mu\text{g mL}^{-1}$. The active substance identified in *Fusarium* sp. UFMGCB 17514 corresponded to the mycotoxin beauvericin that exhibited activity ($IC_{50} = 1.6 \mu\text{g mL}^{-1}$). The extract of the fungus *Fusarium* sp. UFMGCB 18279 was able to inhibit *P. falciparum* ($IC_{50} = 5.1 \mu\text{g mL}^{-1}$) and the putative analysis in syl suggested that cyclosporine is the antimalarial substance produced by the fungus. The extract of the fungus *Colletotrichum* sp. UFMGCB 17511 inhibited amastigote forms of *L. amazonensis* ($IC_{50} = 0.02 \mu\text{g}$

mL⁻¹) and in syphilic analyses suggested that the bioactive substance belongs to the glycerophosphocholine class. In addition, the endophytic fungi obtained from the roots of *S. macrophylla* were evaluated for the ability to stimulate the development of soybean seedlings and beans *in vivo*. The isolates *Fusarium* sp. UFMGCB 18289 and 18290 were able to induce the dry biomass gain and stem length of *Phaseolus vulgaris* (beans) seedlings by adding the fermented liquid medium. On the other hand, lints identified as *Fusarium* and *Dactylonectria* species were able to inhibit seed trowning in seedlings of *P. vulgaris* (beans) and *Glycine max* (soybean). Based on the results obtained, the present work contributed to the knowledge of the biotechnological potential of the community of endophytic fungi associated with distant plants of the Atlantic Forest of the state of Minas Gerais, which are shown to be good candidates as producers of metabolites for use against NTDs and with potential application in agriculture. Although the bioactive metabolites of the *Fusarium* and *Colletotrichum* are known, the results of this thesis suggest that the evaluated fungi can be considered promising eukaryotic "factories" producing bioactive metabolites. In addition, endophytic fungi of distant plants were also able to produce metabolites of interest in agriculture, either by their herbicide activity or by the ability to stimulate the development of seedlings of economic interest. Furthermore, the results also demonstrated that some fungi present in equilibrium at the root of *S. macrophylla* were able to cause negative effects in bean and soybean seedlings *in vivo*, this draws attention to the non-devastation of natural ecosystems, including native plants that have an endophytic community in symbiosis in their tissues.

Key words: Endophytic fungi; Secondary metabolites; Atlantic forest.

Lista de Figuras

Figura 1. Representação hipotética do antagonismo balanceado entre a virulência endofítica, competidores microbianos e resposta de defesa da planta, proposta por Schulz et al. (2015).	21
Figura 2. Fluxograma da metodologia empregada nessa tese.	37
Figura 3. Localização e limites do Parque Estadual do Rio Doce (PERD). (Fonte: IEF: http://www.ief.mg.gov.br/noticias/1/component/content/195).	38
Figura 4. Disposição das amostras na placa de ensaio herbicida.	41
Figura 5. Cromatograma do extrato do <i>Fusarium</i> sp. UFMGCB 17514 (20-40 min) com a linha vermelha indicando a fração ativa que eluiu em 34-34,5 min.	57
Figura 6. HRMS espectros da fração bioativa 69, eluindo de 34,0 a 34,5 min, mostrando (A) os íons $[M+2Na]^{2+}$ e (B) os íons $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ e $[M+H_2O+H]^+$ compatíveis com a substância com fórmula molecular $C_{45}H_{57}N_3O_9$	58
Figura 7. O painel superior mostra o espectro HRMS da fração ativa com os íons identificados na figura anterior. O painel médio corresponde ao espectro de fragmentação HRMS-MS do íon com m/z 784.4157 $[M+H]^+$, o qual pode ser comparado com a fragmentação correspondente da beauvericina padrão (painel inferior).	59
Figura 8. Cromatograma do extrato do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. UFMGCB 17511 (0-60 min) na fração ativa, que eluiu entre 38 e 48 min.	61
Figura 9. Espectro HRMS da fração ativa do extrato do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. UFMGCB 17511.	62
Figura 10. Estrutura molecular de diacilglicerofostatidilcolinas.	63
Figura 11. Cromatograma do extrato do fungo <i>Fusarium</i> sp. UFMGCB 18279.	64
Figura 12. Espectro HRMS da fração ativa do extrato do fungo <i>Fusarium</i> sp. UFMGCB 18279.	64
Figura 13. Estrutura molecular da ciclosporina.	65
Figura 14. Sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> que não germinaram no solo vegetal autoclavado. (A) <i>Fusarium</i> sp. UFMGCB 18279, (B) <i>Dactylonectria</i> sp. UFMGCB 18285, (C) UFMGCB 18290 e (D) <i>Fusarium</i> sp. UFMGCB 18289.	70
Figura 15. Avaliação do peso seco de <i>Phaseolus vulgaris</i> (A) e <i>Glycine max</i> (B) submetidas a inoculação de fungos provenientes da raiz de <i>Swietenia macrophylla</i>	71
Figura 16. Avaliação do comprimento da raiz de <i>Phaseolus vulgaris</i> (A) e <i>Glycine max</i> (B) submetidas a inoculação de fungos provenientes da raiz de <i>Swietenia macrophylla</i>	72
Figura 17. Avaliação comprimento do caule de <i>Phaseolus vulgaris</i> (A) e <i>Glycine max</i> (B) submetidas a inoculação de fungos provenientes da raiz de <i>Swietenia macrophylla</i>	73
Figura 18. Avaliação do comprimento do caule de <i>Phaseolus vulgaris</i> (A) e <i>Glycine max</i> (B) submetidas a inoculação de meio líquido fermentado contendo possível auxina produzida de fungos advindos da raiz de <i>Swietenia macrophylla</i>	77
Figura 19. Avaliação do peso seco de <i>Phaseolus vulgaris</i> (A) e <i>Glycine max</i> (B) submetidas a inoculação de meio líquido fermentado contendo possível auxina produzida de fungos advindos da raiz de <i>Swietenia macrophylla</i>	78
Figura 20. Avaliação do comprimento da raiz de <i>Phaseolus vulgaris</i> (A) e <i>Glycine max</i> (B) submetidas a inoculação de meio líquido fermentado contendo possível auxina produzida de fungos advindos da raiz de <i>Swietenia macrophylla</i>	79
Figura 21. Análise da componente principal das variáveis que influenciaram as plântulas de <i>Phaseolus vulgaris</i> submetidas a inoculação de meio líquido fermentado contendo auxina produzida de fungos advindos da raiz de <i>Swietenia macrophylla</i>	80

Figura 22. Análise da componente principal das variáveis que influenciaram as plântulas de <i>Glycine max</i> submetidas a inoculação de meio líquido fermentado contendo possível auxina produzida de fungos advindos da raiz de <i>Swietenia macrophylla</i>	80
Figura 23. Curva de calibração com auxina.	116
Figura 24. Diluição seriada contendo hormônio auxina.	116

Lista de Tabelas

Tabela 1. Estudos sobre aplicação de substâncias bioativas de fungos endofíticos contra doenças tropicais negligenciadas.....	27
Tabela 2. Fungos endofíticos produtores de giberelinas.	30
Tabela 3. Métodos de infecção por fungos endofíticos em plantas hospedeiras para avaliação do efeito e produção de fito-hormônios.....	32
Tabela 4. Quantificação dos fungos endofíticos obtidos a partir de cada órgão vegetal.....	54
Tabela 5. Atividades biológicas e identificação taxonômica dos fungos endofíticos bioativos isolados das plantas <i>Joannesia princeps</i> , <i>Lecythis pisonis</i> e <i>Swietenia macrophylla</i>	55
Tabela 6. Atividade tripanonossomicida do extrato do fungo <i>Fusarium</i> sp. UFMGCB 17514 e atividade citotóxica contra as células de fibroblasto L929 de camundongo.	56
Tabela 7. Atividade tripanonossomicida da beauvericina e sua atividade citotóxica contra células de fibroblasto L929 de camundongo.	60
Tabela 8. Atividade leishmanicida do extrato do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. UFMGCB 17511.	62
Tabela 9. Atividade antiplasmodial do extrato do fungo <i>Fusarium</i> sp. UFMGCB 18279 e atividade citotóxica contra as células BGM de rim de macaco.....	63
Tabela 10. Parâmetros físico-químicos do solo vegetal autoclavado e não autoclavado para utilização em experimento de para cultivo de <i>Phaseolus vulgaris</i> e <i>Glycine max</i>	66
Tabela 11. Identificação taxonômica dos fungos endofíticos obtidos da raiz da planta <i>Swietenia macrophylla</i>	68
Tabela 12. Ensaio biológico agrônômico envolvendo inoculação dos fungos provenientes da raiz de <i>Swietenia macrophylla</i> em sementes de <i>Glycine max</i> e <i>Phaseolus vulgaris</i>	69
Tabela 13. Identificação dos fungos recuperados das plântulas de <i>Phaseolus vulgaris</i> após inoculação em suas sementes.	74
Tabela 14. Ensaios biológicos agrônômicos envolvendo inoculação de meio líquido fermentado contendo auxina nas sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> e <i>Glycine max</i>	76
Tabela 15. Localização geográfica dos espécimes vegetais.	112
Tabela 16. Valores de p obtidos no teste T para os parâmetros do desenvolvimento biológico das plântulas de <i>Phaseolus vulgaris</i>	112
Tabela 17. Valores de p obtidos no teste T para os parâmetros do desenvolvimento biológico das plântulas de <i>Glycine max</i>	113
Tabela 18. Valores de p obtidos no teste T para os parâmetros do desenvolvimento biológico das plântulas de <i>Phaseolus vulgaris</i>	114
Tabela 19. Valores de p obtidos no teste T para os parâmetros do desenvolvimento biológico das plântulas de <i>Glycine max</i>	115

Lista de Abreviaturas

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AIA: Ácido indolacético

BASF: Badische Anilin & Soda Fabrik

BDA: Ágar Batata Dextrose

BEA: Beauvericina

BOD: Demanda Bioquímica de Oxigênio

CN: Controle Negativo

CP: Controle Positivo

CS: Controle do Solvente

DA: Dermatite Atópica

DC: Doença de Chagas

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EUA: Estados Unidos da América

GA: Giberelinas

GBH: Herbicida a Base de Glifosato

GPS: Sistema de Posicionamento Global

IARC: Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

IC₅₀: Concentração Inibitória

ITS: Região Transcrita Interna

ITS1-5.8S-ITS2: Região Transcrita Interna do Gene do rRNA

LT₅₀: Tempo Letal médio

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

IRR/FIOCRUZ: Instituto René Rachou/ Fundação Oswaldo Cruz

NaCl: Cloreto de Sódio

NCBI: NCBI: National Center for Biotechnology Information

ng/μL: Nanogramas por mililitro

°C : graus Celsius

NGM: Nematode Growth Media

M³: Metros cúbicos

mL: Mililitro

MTT: Metil-Tiazolil-Tetrazólio

OMS: Organização Mundial de Saúde

P.A: Para Análise

p/v: Peso por Volume

pb: Pares de Bases

PCR: Reação em Cadeia de Polimerase

PERD: Parque Estadual do Rio Doce

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

PVR: Podridão Vermelha da Raiz

UV: Ultravioleta

USDA: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

$\mu\text{g mL}^{-1}$: Microgramas por mililitro

μL : Microlitro

μM : Micromolar

μmol : Micromol

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	10
1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Fungos endofíticos e a relação com a planta hospedeira	20
2.2 Doenças tropicais negligenciadas	23
2.2.1 Leishmaniose.....	24
2.2.2 Doença de Chagas	24
2.2.3 Malária	25
2.2.4 Metabólitos fúngicos contra doenças negligenciadas	26
2.3 Aplicação de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos na agricultura	28
2.3.1 Fito-hormônios produzidos por fungos endofíticos	29
2.4 Espécies vegetais para prospecção de fungos endofíticos.....	33
2.4.1 <i>Lecythis pisonis</i> Cambes (Lecythidaceae)	33
2.4.2 <i>Joannesia princeps</i> Vell Ducke (Euphorbiaceae).....	34
2.4.3 <i>Swietenia macrophylla</i> King (Meliaceae).....	34
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral.....	36
3. 2 Objetivos específicos	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Área de coleta	38
4.2 Coleta, purificação e preservação dos fungos endofíticos	39
4.3 Preparo dos extratos fúngicos e vegetais para utilização nos ensaios antiparasitários e herbicida.....	39
4.4 Determinação da atividade herbicida.....	40
4.4.1 Bioensaio com <i>Lactuca sativa</i> e <i>Allium schoenoprasum</i>	40
4.5 Ensaios <i>in vitro</i> com as formas tripomastigotas e as formas intracelulares amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
4.6 Ensaio <i>in vitro</i> com a forma amastigota-like de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	42
4.7 Ensaio contra o parasita <i>Plasmodium falciparum</i>	42
4.8 Ensaio de citotoxicidade em células BGM	43
4.9 Fracionamento químico biomonitorado	44
4.9.1 Identificação putativa <i>in sílico</i> dos constituintes químicos.....	45

4.10	Avaliação do efeito de fungos endofíticos em vegetais de interesse agrônômico	45
4.10.1	Avaliação físico-química do solo autoclavado para cultivo de <i>Glycine max</i> (soja) e <i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão).....	45
4.10.2	Infecção por fungos em vegetais de interesse agrônômico	45
4.10.3	Avaliação do efeito da inoculação de meio líquido fermentado produzido por fungos endofíticos da raiz de <i>Swietenia macrophylla</i> sobre <i>Glycine max</i> (soja) e <i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão)	46
4.10.4	Determinação do peso seco e comprimento dos vegetais	46
4.10.5	Tratamento estatístico dos dados.....	46
4.10.6	Quantificação de ácido indolacético (AIA).....	47
4.11	Identificação dos fungos endofíticos bioativos.....	47
4.11.1	Extração do DNA total dos fungos	49
4.11.2	Amplificação utilizando os iniciadores (GTG) ₅ e (GAC) ₅	49
4.11.3	Amplificação da região ITS	50
4.11.4	Purificação dos amplicons.....	50
4.11.5	Reações de sequenciamento	51
5.	RESULTADOS	53
5.1	Coleta dos fungos endofíticos.....	53
5.2	Atividade biológica antiparasitária e herbicida.....	54
5.2.1	Micro-fracionamento químico biomonitorado do extrato tripanossomicida do <i>Fusarium</i> sp. UFMGCB 17514.....	56
5.2.2	Micro-fracionamento químico biomonitorado do extrato leishmanicida do fungo <i>Colletotrichum</i> sp. UFMGCB 17511	60
5.2.3	Micro-fracionamento químico biomonitorado do extrato antimalárico do fungo <i>Fusarium</i> sp. UFMGCB 18279.....	63
5.3	Avaliação físico-química do solo e esterilidade após autoclavação para cultivo de <i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão) e <i>Glycine max</i> (soja).....	65
5.4	Avaliação da ação dos fungos endofíticos da raiz de <i>Swietenia macrophylla</i> sobre fisiologia de plântulas de <i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão) e <i>Glycine max</i> (soja)	67
5.4.1	Recuperação dos fungos filamentosos inoculados nas plântulas de <i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão)	74
5.5	Avaliação do efeito da inoculação de meio líquido fermentado produzido por fungos endofíticos da raiz de <i>Swietenia macrophylla</i> sobre <i>Glycine max</i> (soja) e <i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão).....	74

6. DISCUSSÃO	81
6.1 Isolamento dos fungos endofíticos.....	81
6.2 Atividade antiparasitária	81
6.2.1 Avaliação do micro-fracionamento químico biomonitorado	82
6.3 Atividade herbicida	84
6.4 Avaliação físico-química do solo autoclavado para cultivo de <i>Glycine max</i> (soja) e <i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão).....	85
6.5 Avaliação da ação dos fungos endofíticos da raiz de <i>Swietenia macrophylla</i> sobre fisiologia de plântulas de <i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão) e <i>Glycine max</i> (soja)	86
6.5.1. Avaliação da recuperação dos fungos por meio das plântulas infectadas.....	89
6.6 Avaliação do efeito da inoculação de meio líquido fermentado produzido por fungos endofíticos da raiz de <i>Swietenia macrophylla</i> sobre <i>Glycine max</i> (soja) e <i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão).....	89
7. CONCLUSÕES	91
8. REFERÊNCIAS	92
9. APÊNDICES	112
APÊNDICE A- Coletas vegetais.	112
APÊNDICE B- Testes estatísticos efetuados para as plântulas com fungos inoculados.....	112
APÊNDICE C- Testes estatísticos efetuados para as plântulas sob influência do meio líquido fermentado contendo auxina.	114
APÊNDICE D- Ensaio colorimétrico da Auxina.....	116
10. ANEXOS	117

1. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Fungos endofíticos tropicais são considerados fontes promissoras de produtos naturais biologicamente ativos, os quais podem ser aplicados em diferentes segmentos da indústria (BHADRA, 2022). Esses fungos são conhecidos por sintetizar um amplo espectro de metabólitos secundários, chegando a uma produção de até 73% superior à de outras classes de micro-organismos (DREYFUSS, 1994; SPECIAN, 2014). Entre a gama de classes de substâncias identificadas, estão ácidos fenólicos, benzopirranonas, flavonoides, alcaloides, quinonas, terpenoides, tetralonas, xantonas, entre outros (TAN ZOU, 2001; GUNATILAKA, 2006). A identificação de novas substâncias produzidas por fungos endofíticos, ou mesmo aquelas heterólogas a seus hospedeiros, estimulam a continuidade dos estudos para a bioprospecção do potencial biotecnológico destes fungos, para subsidiar as demandas na indústria farmacêutica e na agricultura, principalmente (TAN et al., 2001; KUSARI et al., 2014).

Os metabólicos fúngicos apresentam-se como potencial precursor de moléculas protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, os quais são considerados vantajosos em relação aos produtos sintéticos, sendo uma das razões, o fato de serem produzidos em sistemas vivos, potencializando sua interação com os receptores biológicos, além de ser uma fonte sustentável e de baixo custo (GANJHUG et al., 2015). Dentre os usos desses metabólitos, destaca-se o desenvolvimento de fármacos contra as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), grupo de enfermidades que acometem as populações de baixa renda, afetando mais de um bilhão de pessoas no mundo (OPAS, 2019). Entre elas destacam-se Malária, Leishmaniose e Doença de Chagas, as quais são consideradas “negligenciadas” porque não recebem recursos suficientes de governos e instituições de pesquisa (CAPPELARI & MENEGHEL, 2021). Grandes indústrias farmacêuticas não despertam interesse nos estudos dessas doenças tropicais, provavelmente devido a falta de retorno financeiro satisfatório, o que resulta na carência de formulações que combatam o agente etiológico (WHO, 2020).

De maneira similar, o setor de agricultura do Brasil se mostra desprovido de insumos sustentáveis para o manejo das culturas. Desde 2008 o país é o maior consumidor de agrotóxicos no mundo, refém de um sistema de produção agrária de alimentos totalmente dependente do uso desses produtos, e ainda, estima-se que o brasileiro consuma, em média, 7 kg de agrotóxicos por ano (ABSC, 2012; FROTA & SIQUEIRA, 2021). De acordo com dados divulgados pela rede ambientalista *Friends of the Earth Europe* (2022), a cada dois dias, uma pessoa morre por intoxicação de agrotóxicos no Brasil – cerca de 20% dessas vítimas são crianças e adolescentes de até 19 anos. Esse consumo torna-se particularmente preocupante se considerarmos o impacto que

gera na saúde individual e coletiva; esses agravos representam um aumento na demanda dos serviços públicos de saúde como consequência de intoxicações agudas e doenças crônicas relacionadas aos efeitos deletérios dos agrotóxicos (DUTRA & SOUZA, 2007; FROTA & SIQUEIRA, 2021). Dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) indicam que o uso de agrotóxicos e as intoxicações deles derivadas aumentaram de 2007 a 2016, ocupando o segundo lugar entre as intoxicações exógenas e a primeira posição em letalidade (LARA et al., 2019). Além disso, os agrotóxicos impactam negativamente o meio ambiente por meio da contaminação do solo, mananciais de água e da eliminação de espécies nativas (FROTA & SIQUEIRA, 2021). Estudos conduzidos por Medici et al. (2021), constataram a presença de dois carbamatos (aldicarb e carbaril), três organofosfatos (diazinon, malation e fosdrin), dois piretróides (deltametrina e permetrina) e dois metais tóxicos (cádmio e chumbo) em diferentes amostras de tecido de anta, alguns em concentrações altas o suficiente para causar efeitos adversos à saúde. Em 90% das antas que foram submetidas a um exame pós-morte completo (n = 25), foram observadas alterações macroscópicas de fígado e/ou tecido renal. Por esses motivos, torna-se imprescindível a busca por substâncias menos tóxicas ao meio ambiente e aos animais. Desta maneira justifica-se a busca por substâncias naturais advindas da biodiversidade.

Análises estatísticas realizadas por Bills et al. (2002) indicaram que endofíticos de regiões tropicais fornecem um número maior de moléculas ativas do que os presentes em regiões temperadas do globo. De acordo com Frohlich & Hyde (1999) e Arnold (2008), a diversidade de fungos endofíticos nas florestas tropicais é maior em comparação com outros biomas do planeta, devido principalmente à elevada riqueza de plantas endêmicas, variedade fitogeográfica e às altas taxas pluviométricas, que aumentam a dispersão dos esporos (SLIPPERS & WINGFIELD, 2007; TERHONEN et al., 2019). Arnold (2007) indica que folhas e raízes representam as interfaces mais dinâmicas entre as plantas e o meio ambiente, e que os fungos que habitam estes tecidos biologicamente ativos podem compartilhar características que lhes permitem crescer e persistir em um ambiente de constante mudança bioquímica, sendo portanto, órgãos alvos interessantes para prospecção.

Strobel & Daisy (2002; 2003) estabeleceram algumas estratégias para racionalizar a busca de endofíticos interessantes frente as miríades de plantas, selecionando vegetais com as seguintes características: plantas de ambientes peculiares; especialmente aquelas com biologia e estratégia de sobrevivência incomum, com histórico etnobotânicos, endêmicas, que apresentam longevidade incomum ou localizadas em ambientes ancestrais e plantas de ambientes com grande diversidade biológica. Neste contexto, o presente trabalho visou prospectar metabólitos bioativos de fungos endofíticos associados às espécies vegetais *Joannesia princeps* Vell (Cutieira), *Lecythis pisonis*

Cambess (Sapucaia) (LORENZI & MATOS, 2002; FRANCO & BARROS, 2006) e *Swietenia macrophylla* King (Mogno Brasileiro) (GROGAN et al., 2002). As três espécies de plantas são consideradas longínquas em termos de tempo de vida, com registros de aplicações etnobotânicas, presentes na Mata Atlântica, um *hotspot* da biodiversidade mundial (MYERS et al., 2000; MITTERMEIER et al., 2011; IUCN, 2016). A partir dessas prerrogativas, essas três espécies vegetais podem representar importante abrigo de fungos produtores de substâncias que podem ser utilizados como protótipos para o desenvolvimento de fármacos para uso contra as DTNs e para utilização na agricultura.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungos endofíticos e a relação com a planta hospedeira

O termo “endofítico” foi introduzido na literatura ecológica por Bary (1866) e desde então vem sendo utilizado por pesquisadores no mundo inteiro (WILSON, 1995; BAGCHI, 2021). Segundo Petrini (1991), os endofíticos são micro-organismos que vivem no interior dos tecidos vegetais em qualquer momento do seu ciclo de vida sem causar quaisquer sintomas de doença. Podem se desenvolver na porção intercelular (apoplasto) quanto na intracelular (simplasto) (JAYANTHI et al., 2022), incluem bactérias, actinomicetos e fungos. Endofíticos são endossimbiontes encontrados de criptógamas a angiospermas, ou seja, em todas as espécies vegetais estudadas até o momento, indicando que a estratégia de propagação obteve sucesso ao longo dos anos (VERMA et al., 2017).

A dispersão destes fungos pode ocorrer por meio de dois mecanismos: horizontal e vertical. Na transmissão horizontal o fungo se dissemina de um vegetal para o outro por meio dos esporos, artifício predominante em plantas lenhosas (SAIKKONEN et al., 2004). Nesse caso os fungos podem penetrar e colonizar o hospedeiro através da zona radicular, por abertura de estômatos, hidatódio ou injúrias presentes nos órgãos vegetais como folhas, caules, cotilédones, flores e frutos (SAIKKONEN et al., 2004; VIEIRA, 2015). Na transmissão vertical ocorre transferência entre gerações através de sementes, de forma sistêmica, onde tendem a desenvolver uma relação mutualística com seus hospedeiros, enquanto, aqueles transmitidos horizontalmente (forma não sistêmica) são mais propensos a apresentarem uma relação antagonista (SAIKKONEN et al., 2004; RODRIGUEZ et al., 2009).

Quando o fungo estabelece este tipo de relação mutualística com o vegetal, ele pode sintetizar e liberar antibióticos, proteases, quitinases, bacteriocinas, sideróforos e lipopeptídeos que controlam os fitopatógenos e melhoram o crescimento e a saúde da planta (KHAN, 2020). Em

contrapartida, o fungo se beneficia por receber da planta energia, nutrientes e abrigo (ARNOLD et al., 2003; HARTMANN et al., 2009).

Não se sabe ao certo como os fungos endofíticos superam a resistência do hospedeiro, possibilitando o crescimento assintomático dentro dos tecidos. Mas é sugerido que os metabólitos secundários também exerçam influência nesse processo. Os metabólitos secundários são substâncias extracelulares secretadas durante o crescimento e diferenciação do organismo e podem interferir das seguintes formas com a planta e competidores: (i) secreção de metabólitos tóxicos para seus hospedeiros; (ii) modulação de fitormônios dos hospedeiros; (iii) desintoxicação de metabólitos constitutivos de defesa e (iv) secreção de enzimas líticas (SCHULZ et al., 2015).

Schulz & Boyle (2005) e Schulz et al. (2015) sugerem que não existem interações neutras e que há sempre um grau de virulência por parte do fungo que permite a infecção, enquanto a defesa do hospedeiro limita o desenvolvimento dos invasores. Além disso, sugere-se que para crescer e sobreviver na planta, estes fungos devem manter um equilíbrio de antagonismo não só com a planta hospedeira, mas também com competidores microbianos (HARTMANN et al., 2009; SCHULZ et al., 2015), como demonstrado na **Figura 1**.

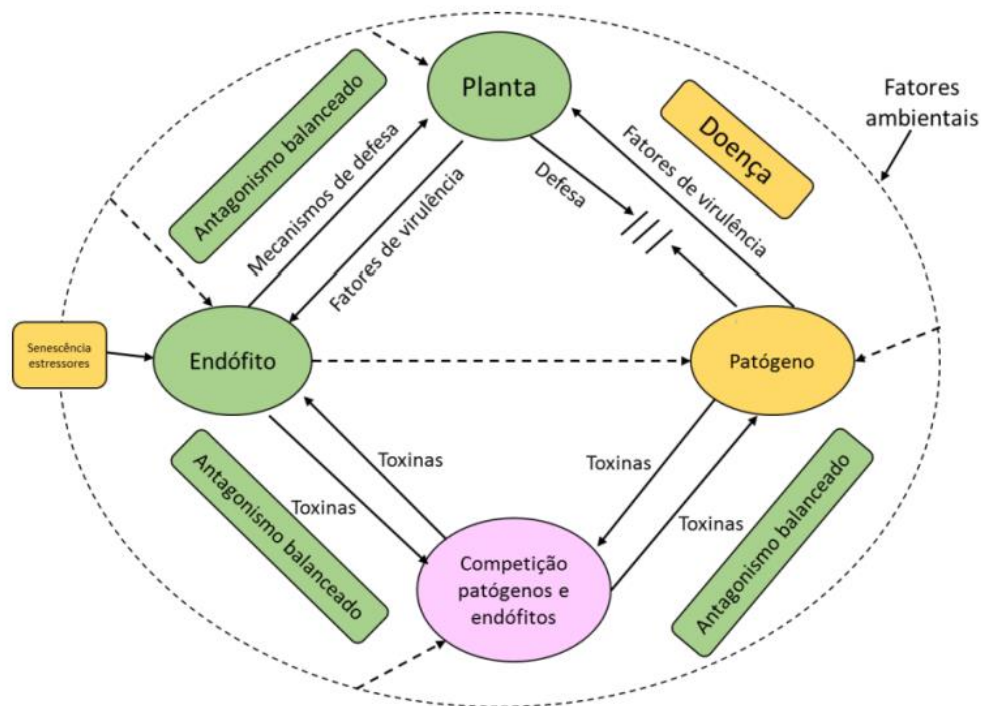


Figura 1. Representação hipotética do antagonismo balanceado entre a virulência endofítica, competidores microbianos e resposta de defesa da planta, proposta por Schulz et al. (2015).

Strobel (2003) sugere que a relação do endofítico com o vegetal hospedeiro evoluiu a centenas de milhões de anos atrás, quando as plantas superiores irradiaram na Terra. Evidências

desta associação foram descobertas em tecidos fossilizados de caules e folhas; a partir disto, é possível presumir que alguns destes micro-organismos tenham desenvolvido sistemas genéticos capazes de permitir a transferência horizontal de informação com seu hospedeiro em detrimento de sua coevolução (STROBEL & DAISY, 2003; TAN & ZOU, 2001). Esta constatação se tornou ainda mais forte quando pesquisadores ao redor do mundo descobriram que os fungos endofíticos eram capazes sintetizar as mesmas substâncias que de seus hospedeiros (STROBEL & DAISY, 2003). Um exemplo bem conhecido foi a descoberta realizada por um grupo de pesquisadores da Universidade de Montana nos EUA, que relataram a obtenção do taxol a partir da espécie de fungo endofítico *Taxomyces andreana*, isolado das cascas de *Taxus brevifolia* (*Taxaceae*) (STIERLE et al., 1993). O Taxol é um diterpenóide produzido pela planta *T. brevifolia* e largamente utilizado no tratamento de câncer mamário e de útero. Entretanto, para se extrair 1 kg de taxol, precisa-se de 10 toneladas de cascas de *T. brevifolia*, o que representa a necessidade do plantio de 3.000 árvores. Dada a inviabilidade sustentável na obtenção da substância, a descoberta do fungo produtor abriu um novo panorama para prospecção de produtos naturais na indústria farmoquímica (STIERLE et al., 1993).

O uso de metabólitos bioativos obtidos a partir de fungos endofíticos apresentam inúmeras vantagens, quando comparado com a extração dessas substâncias diretamente das plantas. Por exemplo, eliminam-se o efeito da sazonalidade, problemas ambientais ou políticos como o corte ou a coleta de partes das plantas, além da obtenção de melhores rendimentos industriais com fácil escalonamento (GONÇALVES et al., 2013). Entretanto, essa expectativa tem sido, em parte, frustrada, visto que as condições de crescimento em laboratório podem influenciar fortemente a produção de metabólitos secundários ou até mesmo cessá-la. Uma explicação para este fenômeno seria a de que após algumas repicagens os fungos endofíticos diminuem ou perdem a capacidade de produzir os metabólitos secundários desejáveis (FREIRE et al., 2014).

Ainda não se conhecem as razões responsáveis pela instabilidade na produção de metabólitos pelos fungos endofíticos, embora existam algumas hipóteses, como, por exemplo, a ausência do estímulo do hospedeiro nas condições de cultivo e/ou o silenciamento de alguns genes durante cultivo após sucessivas repicagens (FREIRE et al., 2014). Além disso, algumas tentativas para reverter essa supressão, como adicionar partes dos hospedeiros ou extratos de tecidos do hospedeiro ao meio de cultivo, não têm tido sucesso (FREIRE et al., 2014), o que levou muitos pesquisadores avaliarem criticamente possíveis mecanismos de produção de metabólitos secundários de plantas por fungos endofíticos (FREIRE et al., 2014).

Alguns autores como Kusari (2012) e Strobel & Daisy (2013) sugerem que a recombinação genética dos endofíticos com seus hospedeiros levaria à incorporação de rotas genéticas do

hospedeiro ao genoma do endofítico. Contudo, não existe ainda prova da suposta transferência horizontal de genes entre a planta hospedeira e o fungo endofítico associado (SACHIN et al., 2013). Uma explicação cada vez mais aceita para a capacidade dos fungos endofíticos na produção de metabólitos secundários é a existência, nos seus genomas, de “*genes clusters*” (um grupo de genes permanentemente alinhados e que são coletivamente responsáveis em um processo multivariado na biossíntese de metabólitos) (FREIRE et al., 2014). Estes genes são responsáveis por codificar diversos mecanismos genéticos para a aquisição de nutrientes, síntese/degradação de metabólitos essenciais e adaptativos (VANDEPOL et al., 2020).

Mesmo diante de inúmeras hipóteses, os avanços na engenharia genética ainda não permitiram desvendar o mecanismo de ativação e silenciamento dos “*genes cluster*” em eucariotos; visto que a base de dados referentes a estes genes é maior para procariotos que em eucariotos (STROHL, 2001; TEIJARO et al., 2019). A complexidade na expressão dessas propriedades faz com que a escolha do vegetal seja crucial para seleção do fungo heterólogo, assim como o meio de fermentação e o fornecimento de precursores, os quais são fatores essenciais na fabricação de produtos naturais-alvo (TEIJARO et al., 2019).

2.2 Doenças tropicais negligenciadas

As Doenças negligenciadas são definidas como sendo aquelas que não só prevalecem em condições de pobreza, mas também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam forte entrave ao desenvolvimento (OLIVEIRA et al., 2018). De acordo com Morel et al. (2005) as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são por definição doenças que não dispõe de tratamentos eficazes ou adequados (FIOCRUZ, 2018). As DTN's compõem um grupo de 17 enfermidades que afetam mais de 1 bilhão de pessoas, principalmente as que residem em países subdesenvolvidos (WHO, 2020). Esse grupo de doenças recebe essa denominação em virtude do pouco interesse no desenvolvimento de novos fármacos, se comparado com outras enfermidades (WENG et al., 2018). Dentre as doenças, estão alguns exemplos: Tuberculose, Leishmaniose, Doença de Chagas (DC), Malária, Esquistosomose, Dengue, Tripanossomíase Africana (Doença do Sono), infecções por helmintos específicos (filariais), HIV pediátrico, Lepra, Conjuntivite Granular, entre outras. Dentre as doenças supracitadas, destacam-se Leishmaniose, Malária e Doença de Chagas, uma das principais doenças vetoriais (doenças metaxênicas) sujeitas a controle no Brasil (TAUIL, 2006). Na presente tese as DTNs Leishmaniose, Doença de Chagas e Malária foram abordadas, pois foram os alvos dos potenciais metabólitos produzidos pelos fungos endofíticos.

2.2.1 Leishmaniose

As leishmanioses são causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. São transmitidas por meio de vetores flebotômíneos (mosquito-palha, birigui, cangalha ou tatuquira) infectados e possuem um espectro grande de manifestações clínicas, as quais são diferenciadas pelas espécies de *Leishmania* envolvida (PELISSARI et al., 2011; WHO, 2022). As formas clínicas predominantes são a tegumentar (LT) e a visceral (LV) (PELISSARI et al., 2011; WHO, 2022). A leishmaniose tegumentar americana (LTA) está entre uma das endemias de maior importância em saúde pública no Brasil, devido sua ampla distribuição pelo território nacional, e pela ocorrência de formas clínicas graves. A severidade da doença varia da forma cutânea benigna e de cura espontânea até formas severas, muitas vezes mutilantes, como a leishmaniose mucocutânea (ASHFORD, 2000; DORVAL et al., 2006).

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença endêmica em cinco continentes, com casos humanos relatados em 54 países localizados em regiões tropicais e subtropicais. Mais de 90% dos casos mundiais ocorrem em Bangladesh, Índia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. A incidência anual estimada da doença é de cerca de 200 a 400 mil novos casos. Muitos fatores podem ter contribuído para a dispersão geográfica da LV no Brasil, entre eles o movimento de cães entre áreas endêmicas e não endêmicas, e mudanças na ecologia do vetor (MARCONDES & ROSSI, 2013). O vetor da LV está disseminado pelo Brasil e encontra-se adaptado para colonizar o meio ambiente antropizado. Isso significa que a introdução de cães infectados em áreas não endêmicas, onde existam potenciais vetores, podem resultar em um novo foco da doença (DANTAS-TORRES, 2009).

Atualmente a terapêutica contra a leishmaniose baseia-se na utilização de cinco fármacos: os antimoniais pentavalentes, anfotericina B e a sua formulação lipossômica, miltefosina, paromomicina e pentamidina (SANTIAGO et al., 2021). Estas substâncias apresentam limitações que dificultam a adesão do paciente ao tratamento, tendo como principais desafios: a elevada toxicidade e a necessidade de administração prolongada por via parenteral, além da possível seleção de cepas resistentes (SANTIAGO et al., 2021).

2.2.2 Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma infecção humana ocasionada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, cujos vetores são os triatomíneos hematófagos. A enfermidade apresenta-se em duas fases, a aguda e a crônica. A transmissão ocorre pelas formas: vetorial (triatomíneos), transfusional, transplante, congênita e oral (VARGAS et al., 2018). Na forma aguda, a doença apresenta-se frequentemente assintomática ou se manifestar com sinais e sintomas pouco evidentes ou

inespecíficos, como febre, mal-estar e cefaleia (VARGAS et al., 2018). A presença de febre de maior intensidade, hepatoesplenomegalia, miocardite, meningite, adenomegalia caracteriza um quadro grave, que pode evoluir para o óbito (GOMES et al., 2020). Devido a sua forma de manifestação ser assintomática na maioria dos casos, a fase aguda da doença muitas vezes passa despercebida e o diagnóstico só é feito na fase crônica, o que reduz a quantidade de casos notificados (GOMES et al., 2020).

A Doença de Chagas constitui um importante problema de saúde pública, sobretudo na América Latina, onde se estima que existam seis milhões de indivíduos infectados e 28 milhões sob o risco de contrair a infecção, com mais de 10 mil óbitos anuais (WHO, 2010; GALL, 2021). Apesar disso, as opções terapêuticas continuam limitadas e atualmente no mundo inteiro, dispõe-se apenas de dois fármacos para combater especificamente o parasita da DC: benzonidazol (BZN) e nifurtimox 2,4 (FERREIRA et al., 2019). No Brasil, o medicamento mais comumente utilizado é o BZN, entretanto, há uma série de efeitos adversos como alterações no sangue; dor abdominal; dor de cabeça; alergias na pele; fadiga; insuficiência do fígado e dos rins causados durante o tratamento que faz com que o paciente descontinue o uso do medicamento (GALL, 2021; PONTES, 2010; FERREIRA et al., 2019). Benzonidazol é, entre os dois, o mais tolerado dentro do corpo e por isso é considerada a primeira opção de tratamento. Por se tratar de um fármaco de baixa solubilidade, é de interesse tecnológico a busca de novas formulações que visem a sua melhor solubilidade e que também busquem novas rotas de liberação, auxiliando na diminuição destes efeitos e uma melhora no controle das doses e do tratamento (GALL, 2021).

2.2.3 Malária

A malária é uma infecção parasitária causada por um protozoário intracelular obrigatório (gênero *Plasmodium*), cuja transmissão se dá através da picada da fêmea do mosquito *Anopheles* contaminada pelo protozoário que infecta o homem com os esporozoítos presentes na saliva (TECCHIO et al., 2021). Quando inoculados, os esporozoítos permanecem depositados na pele e então saem para a circulação sanguínea e, gastam entre trinta minutos a duas horas para chegarem às células hepáticas (REIS et al., 2018). O ciclo de vida do parasita envolve dois hospedeiros: o homem e o mosquito e divide-se em três fases: a fase sexuada que ocorre no hospedeiro invertebrado (mosquito), designado ciclo esporogônico e duas fases assexuadas que ocorrem no homem, o ciclo exoeritrocítico (fígado) e o ciclo eritrocítico (glóbulos vermelhos) (GARGATÈ, 2014).

São descritas mais de 150 espécies para o gênero *Plasmodium*, mas apenas cinco infectam o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e mais recentemente *P. knowlesi*, uma espécie que causa malária em macacos no sudeste asiático (REIS et al., 2018). A Malária é a doença

parasitária mais frequente no homem, encontrando-se infectada cerca de 5% da população mundial, e *P. falciparum* o agente mais disseminado, responsável por mais de 80% dos casos mundiais e o que apresenta uma patogenia mais agressiva (REIS et al., 2018).

A OMS registrou, em 2017, mais de 217 mil casos de malária no Brasil, o que caracterizou um aumento de 84% sobre o ano anterior, elencando o segundo maior número de casos das Américas 22%, perdendo somente para a Venezuela, que teve com cerca de 50% dos casos (MENDES et al., 2020). Mais de 90% dos registros brasileiros ocorrem na região amazônica, onde questões socioeconômicas, culturais e ambientais tendem a favorecer a reprodução do vetor e, conseqüentemente, a infecção pelo *Plasmodium* (MENDES et al., 2020).

Os fármacos antimaláricos disponíveis atualmente podem ser utilizados para profilaxia ou para o tratamento da doença. Os esquizotomicidas sanguíneos atuam sobre as formas eritrocíticas do plasmódio inibindo o desenvolvimento de esquizontes na corrente sanguínea, sendo eles: amodiaquina, cloroquina, quinina, mefloquina, halofantrina, lumefantrina, artemisinina e seus derivados, tetraciclina, proguanil, pirimetamina, sulfas e sulfonas (SANTOS, 2020). A não adesão à terapia antimalárica é considerada como uma das principais causas de insucesso no tratamento e, como consequência, pode-se observar o desenvolvimento de resistência aos antimaláricos, a permanência de pessoas como fonte de transmissão, recaídas, o controle inadequado da doença e o aumento dos gastos de saúde (ABDON et al., 2001; SANTOS, 2020).

2.2.4 Metabólitos fúngicos contra doenças negligenciadas

O Relatório sobre a ‘Saúde do Mundo para 2004’ da OMS define a pesquisa em saúde como prioridade, reconhecendo-a como dinamizador de saúde (OMS, 2004). Nesse relatório são discutidos aspectos da pesquisa como requisito para o desenvolvimento econômico dos países impactados devido à DTNs (OLIVEIRA et al., 2018). Tendo isso em vista, estudos com metabólitos de fungos endofíticos isolado de plantas de ecossistemas brasileiros vêm demonstrando que esses micro-organismos são fontes promissoras de moléculas para estudos contra DTNs, como demonstrado por Costa et al. (2020) e Azevedo et al. (2021). Outros estudos são listados a seguir (Tabela 1).

Tabela 1. Estudos sobre aplicação de substâncias bioativas de fungos endofíticos contra doenças tropicais negligenciadas.

Fungo endofítico	Planta hospedeira	Tecido do isolamento	Atividade biológica	Referência
<i>Cochliobolus</i> sp.	<i>Piptadenia adiantoides</i>	Não descrito	Leishmanicida (<i>L. amazonensis</i>)	Campos et al. (2008)
<i>Diaporthe miriciae</i>	<i>Vellozia gigantea</i>	Folhas e raízes	Antimalárica (<i>P. falciparum</i>)	Ferreira et al. (2017)
<i>Diaporthe</i> cf. <i>mayteni</i> , <i>Endomelanconiopsis</i> sp. <i>Colletotrichum</i> sp. <i>Guignardia mangiferae</i> , <i>Pestalotiopsis</i> sp. e <i>Diaporthe melonis</i>	<i>Carapa guianensis</i>	Folhas	Tripanossomicida (formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>) Inibição da proliferação do vírus (flavivírus) da febre amarela.	Ferreira et al. (2015)
<i>Mycosphaerella</i> sp.	<i>Eugenia bimarginata</i>	Folhas	Antifúngica (<i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>)	Pereira et al. (2015)
<i>Aspergillus calidoustus</i>	<i>Acanthospermum australe</i>	Folhas	Tripanossomicida (<i>T. cruzi</i>)	Carvalho et al. (2016)
<i>Alternaria</i> , <i>Arthrinium</i> , <i>Cochliobolus</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i> e <i>Gibberella</i>	<i>Ageratum myriadenia</i> , <i>Palicourea tetraphylla</i> , <i>Piptadenia adiantoides</i> e <i>Trixis vauthieri</i>	Folhas	Tripanomicida (<i>T. cruzi</i>) e Leishmanicida (<i>L. amazonenses</i>)	Rosa et al. (2010)
Sem identificação	<i>Anadenanthera macrocarpa</i>		Tripanossomicida (<i>T. cruzi</i>) e Leishmanicida (<i>L. amazonensis</i>)	Lócio (2019)

5 2.3 Aplicação de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos na agricultura

O Brasil é reconhecido mundialmente por ser o maior consumidor de agrotóxicos do mundo desde 2008, sendo a região sul do país a que se destaca pelo uso de uma ampla variedade de agroquímicos e pelos altos níveis de intoxicação humana (CLASEN et al., 2019). Dentre os herbicidas utilizados estão: glifosato, carbofurano, atrazina, clomazona, tebuconazol, difenoconazol, tetraconazol, propoxur, 2,4-D, propanil, mancozeb, penoxsulam, imazethapyr, imazapique, mancozeb, fipronil e quinclorac (CLASEN et al., 2019).

O glifosato (*N-fosfonometil-glicina*) é um herbicida desenvolvido pela Monsanto. Estima-se que em 2014 cerca de 800 mil kg de herbicidas à base de glifosato (GBHs) foram usados para a produção de culturas em todo o mundo (CENTNER et al., 2019). Em diversos tipos de cultivo, o GBH costuma ser pulverizado sendo, em geral, absorvido na planta através de suas folhas e dos caulículos novos (AMARANTE JÚNIOR et al., 2002). O herbicida é, então, transportado por toda a planta, agindo em diferentes sistemas enzimáticos, inibindo o metabolismo de aminoácidos (ARL, 2021).

Na lavoura quanto herbicida, o GBH atua principalmente contra as ervas daninhas, que sob certas condições, causam mais perdas econômicas à agricultura do que pragas de insetos e fungos patogênicos (CENTNER et al., 2019), pois além de competirem com a lavoura por água, luz, nutrientes e espaço, as ervas daninhas também podem abrigar pragas que atacam a lavoura, reduzindo assim o rendimento e aumentando o custo de produção (SURYANARAYANAN, 2019). Contudo, a ação do GBH é considerada de amplo espectro, isto é, não seletiva e as plantas tratadas com glifosato morrem lentamente, em poucos dias ou semanas e, devido ao transporte por todo o sistema, nenhuma parte da planta sobrevive (AMARANTE JÚNIOR et al., 2002; ARL, 2021).

Ademais, pesquisas com GBHs vêm demonstrando que essas substâncias podem causar sérios danos ao homem e ao meio ambiente, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou o glifosato como "provavelmente cancerígeno para seres humanos (Grupo 2A)". Há fortes evidências de que a exposição ao glifosato é genotóxica por pelo menos dois mecanismos que se sabe estar associado a danos ao DNA (CENTNER et al., 2019). Além disso, estudos apontam para seu potencial como disruptor endócrino sobre trabalhadores expostos por longo período (CHACÓN COBOS et al., 2022).

De acordo com a Sociedade Nacional de Agricultura (2018), o mercado global de herbicidas deverá chegar a US\$ 44.56 bilhões em 2023. Esta informação aliada aos impactos negativos dos herbicidas (clorados e fosfatados) ao meio ambiente cria a necessidade de prospectar novos

5 compostos que tenham biodegradabilidade e baixa toxicidade (PINTO et al., 2002; SNA, 2018). Neste contexto, a procura por alternativas aos agroquímicos, que portem tais características mencionadas acima, tem sido foco de muitas pesquisas. O mercado mundial de biopesticidas (à base de bactérias, fungos, extratos e compostos fitoquímicos) tem se expandido desde 2005 a uma taxa de crescimento de 9,9% ao ano, e estima-se que movimente cifras superiores a U\$ 1 bilhão (EMBRAPA, 2012).

10 Como alternativa aos agroquímicos, os fungos endofíticos mostram-se como uma fonte promissora de metabólitos (BARRETO et al. 2021), sendo prospectados em diversos trabalhos para tais fins. Schulz (1995) identificou linhagens endofíticas de *Pezicula* como importantes fontes produtoras de metabólitos com atividade herbicida. Já Azevedo (2019) detectou fungos do vegetal *Carapichea ipecacuanha* que foram capazes de produzir substâncias herbicidas de amplo espectro.

15 Zhang et al. (2013) isolaram do fungo endofítico *Aspergillus fumigatus* associado à planta *Melia azedarach*, a brevianamida F, que apresentou atividade herbicida contra sementes de alface (*Lactuca sativa*).

Embora se reconheça a dependência dos agroquímicos no atual modelo de agricultura nas regiões tropicais, cresce a demanda social por alimentos compatíveis que cumpram com a

20 manutenção da qualidade dos ecossistemas, das demandas sociais e que sejam livres de estimulantes de crescimento e de defensivos agrícolas (BONIFÁCIO, 2021). Tais exigências impõem à comunidade científica novos paradigmas de exploração da agricultura, que ao mesmo tempo em que respeite a preservação dos recursos naturais, garanta a oferta de alimentos de qualidade, sem resíduos de produtos químicos (GARCIA et al., 2021).

25 Nessa busca por alternativas sustentáveis de manejo agrícola, espécies de fungos têm sido precariamente estudadas, quando comparados às de animais e plantas superiores. Estima-se que as cerca de 100 mil espécies de fungos já descritas correspondam a apenas 7% do total, o que reforça ainda mais o incentivo a pesquisa a esse grupo de organismos (CANUTO & RODRIGUES, 2012).

2.3.1 Fito-hormônios produzidos por fungos endofíticos

30 Além de fontes de metabólitos bioativos, os fungos endofíticos também são reconhecidos como produtores de hormônios vegetais como giberelinas (GA) e auxinas (AIA) (LU et al., 2000; ROWAN & POPAY, 2017). Os hormônios vegetais são conhecidos como moléculas de sinalização ou mensageiros químicos que desempenham um papel importante no crescimento, na reprodução e no desenvolvimento da planta (LU et al., 2000). Esses hormônios também controlam respostas às

35 mudanças ambientais, as quais desencadeiam respostas bioquímicas, fisiológicas e morfológicas específicas (RODRIGUEZ et al., 2012).

5 Waqas et al. (2012) isolaram e identificaram fungos endofíticos produtores de fito-hormônios, os quais melhoraram o crescimento do vegetal estudado e aumentaram a tolerância à salinidade. Mesmo alguns trabalhos demonstrando o efeito positivo dos fito-hormônios produzidos por fungos endofíticos, o mecanismo exato do efeito destas substâncias são precariamente explorados (ARNOLD et al., 2007).

10 A respeito das giberilinas (GAs) endógenas, pouco ainda é conhecido sobre sua influência nos vegetais em resposta aos estresses ambientais, particularmente sob à interação endofítica. GAs fisiologicamente ativas (GA₃ e GA₄) são ativadas para melhorar o crescimento das plantas por meio do crescimento de brotos e do alongamento celular (GANGWAR et al., 2011). A **Tabela 2** apresenta espécies de fungos endofíticos produtores de GAs.

15 **Tabela 2.** Fungos endofíticos produtores de giberelinas.

Espécie de fungo endofítico	Planta hospedeira	Fito-hormônio giberelina (GA)	Referência
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Glycine max</i>	GA ₄ , GA ₉ , GA ₁₂ , GA ₁ , GA ₃ , GA ₄ ,	Khan et al. (2011)
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	<i>G. max</i>	GA ₇ , GA ₅ , GA ₁₅ , GA ₁₉ , GA ₂₄ GA ₁ , GA ₃ , GA ₄ ,	Hamayun et al. (2010)
<i>Cadophora malorum</i>	<i>Calystegia soldanella</i>	GA ₇ , GA ₉ , GA ₁₂ , GA ₂₀ , GA ₂₄ , GA ₃₄ , GA ₅₃	You et al. (2012)
<i>Penicillium commune</i>	<i>Sesamum indicum</i>	GA ₁ , GA ₃ , GA ₄ , GA ₇ , GA ₉	Choi et al. (2005)

A auxina, outro fito-hormônio que pode ser produzido por endofíticos, possui papel importante na regulação de uma ampla gama de processos fisiológicos e de desenvolvimento das plantas, dentre elas, o crescimento de plântulas, dominância apical, padrões vasculares, respostas trópicas, embriogênese, crescimento e desenvolvimento radicular (SUKUMAR et al., 2013). Em nível celular, sabe-se que as auxinas regulam muitos aspectos da divisão, diferenciação e alongamento por meio da ativação de genes e da acidificação da parede celular (FUKAKI & TASAKA, 2009). Além disso, podem promover o aumento da biomassa e resistências a estresses abióticos (ROWAN & POPAY, 2017) e aumentar a biomassa radicular e o número de raízes laterais, como observado por Sirrenberg et al. (2007), os quais identificaram a síntese de auxina pelo fungo endofítico *Piriformospora indica* isolado da planta *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae).

5 A manipulação e a indução da produção destes hormônios vegetais podem favorecer a
produção de cultivos de interesse agrônômico (ARNOLD et al., 2007; SUKUMAR et al., 2013),
principalmente de leguminosas, como o feijão e a soja, que estão entre os grãos mais consumidos no
Brasil e no mundo. A combinação de vegetais e fungos pode ser mais vantajosa para a produção,
tanto economicamente, quanto fisiologicamente, quando comparados aos biorreguladores vegetais
10 (SILVA et al., 2021), os quais são substâncias sintéticas aplicadas exógenamente, que possuem ações
similares aos grupos de reguladores vegetais conhecidos (citocininas, giberelinas, auxinas, ácido
abcísico e etileno) (VIEIRA & CASTRO, 2002). Alguns pesquisadores vêm estudando a melhor
forma de inocular estes fungos nos vegetais conforme apresentado na **Tabela 3**.

5 **Tabela 3.** Métodos de infecção por fungos endofíticos em plantas hospedeiras para avaliação do efeito e produção de fito-hormônios.

Planta hospedeira	Tecido do isolamento	Fungo endofítico	Planta infectada	Método de infecção	Referência
<i>Euphorbia pekinensis</i>	Folha, raiz e caule	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Euphorbia pekinensis</i>	Foram pulverizados nas folhas de cada planta, 5 mL de água contendo esporos na concentração de 10 ⁶ mL ⁻¹ . A inoculação foi repetida 10 dias depois.	Dai et al. (2008)
<i>Glycine max</i>	Raiz	<i>Aspergillus fumigatus</i> e <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	waito-c rice e <i>Glycine max</i>	A cultura fúngica foi liofilizada e suspensa em 1 mL de água destilada esterilizada. Uma alíquota de 10 µL da suspensão foi aplicada no meristema apical das plantas no estágio de duas folhas.	Hamayun et al. (2009c)
<i>Ipomea batatas</i>	Folha, raíze e caule	<i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Emericella nidulans</i>	<i>Oryza sativa</i>	No estágio de 2 folhas, 50 µL da cultura fúngica filtrada foi aplicado nos ápices apicais.	Hipol (2012)
<i>Ixeris repenes</i>	Raiz	<i>Penicillium citrinum</i>	waito-c rice, <i>Atriplex gemelinii</i>	10 µL de solução fúngica foram aplicados no meristema apical de plântulas no estágio de duas folhas.	Khan et al. (2008)
<i>Cucumis sativus</i>	Raiz	<i>Phoma glomerata</i> e <i>Penicillium</i> sp.	waito-c rice, Dongjin-byeo rice	Foram inoculadas nas sementes com 200 mL de filtrado de cultura fúngica.	Waqas et al. (2012b)
<i>Suaeda japonica</i>	Raiz	<i>Penicillium</i> sp.	waito-c rice, <i>Suaeda japonica</i>	A planta no estágio de duas folhas foi tratada com fungo liofilizado (10 uL).	You et al. (2012)
<i>G. max</i>	Raiz	<i>A. fumigatus</i>	waito-c rice, <i>Glycine max</i>	Sementes foram cultivadas em meio ágar (0,8%) em câmara (ciclo dia/noite 14 h; 28°C por 10 dias. Depois de atingir dois fase de folhas, solução de 10 µL CF de fungos endofíticos foi aplicado no ápice do arroz Waito-C e Dongjin-byeo mudas.	Khan et al. (2011a)
<i>Sesamum indicum</i> , <i>G. max</i>	Raiz	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Vicia faba</i> , <i>Glycine max</i> e <i>Sesamum indicum</i>	O hormônio foi separado e aplicado na planta.	Hasan (2002)
<i>G.max</i>	Raiz	<i>A. fumigatus</i>	waito-c rice, <i>Glycine max</i>	Sementes foram cultivadas em meio ágar (0,8%) em câmara (ciclo dia/noite 14 h; 28°C por 10 dias. Depois de atingir dois fase de folhas, solução de 10 µL CF de fungos endofíticos foi aplicado no ápice do arroz Waito-C e Dongjin-byeo mudas.	Khan et al. (2011a)
<i>S. indicum</i> , <i>G. max</i>	Raiz	<i>F. oxysporum</i>	<i>Vicia faba</i> , <i>Glycine max</i> e <i>Sesamum indicum</i>	O hormônio foi separado e aplicado na planta.	Hasan (2002)
<i>Zoysia tenuifolia</i>	Raiz	<i>Penicillium simplicissimum</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Contaminou-se primeiramente o solo e posteriormente inoculou a planta.	Hossain et al. (2007)
<i>Prosopis juliflora</i> , <i>Zizyphus nummularia</i>	Raiz	<i>Piriformospora indica</i> e <i>Sebacina vermicifera</i>	<i>Mentha piperita</i> e <i>Thymus vulgaris</i>	Foi realizado um co-cultivo dos dois fungos e os vegetais em frasco contendo meio MS. Foram inoculados discos miceliais de 5 mm de diâmetro. Quando as plantas atingiram o estágio com duas folhas, a porção apical foi cortada, e então inserida um disco micelial.	Dolatabadi et al. (2012)

5 Dada à importância socioeconômica das leguminosas, algumas pesquisas vêm sendo dirigidas para essas culturas, no sentido de se alcançar maiores produtividades associada à redução nos custos de produção (ARAÚJO, 2000). Nesta perspectiva, aliado ao conhecimento das exigências nutricionais e hídricas e o uso de cultivares com elevadas produtividades, resistentes a pragas, doenças e à adaptação as mais diversas condições edafoclimáticas, faz-se necessária a busca por tecnologias inovadoras que auxiliem na expressão do rendimento destas culturas (MORTELE et al., 2008). De acordo com o Departamento de Agricultura dos EUA - USDA (2018), o Brasil é o líder mundial na produção de suco de laranja e café, o segundo maior produtor de soja - com base em estimativas para a safra 2018/2019, e o terceiro maior de feijão (CLASEN et al., 2019). Diante do exposto justifica-se o aprofundamento de estudos de fungos endofíticos para melhoramento da produção destas culturas.

15 2.4 Espécies vegetais para prospecção de fungos endofíticos

Como subsídio à descoberta de fungos endofíticos promissores para a aplicação biotecnológica, torna-se imprescindível racionalizar a seleção dos vegetais alvos para prospecção, como sugerido por Strobel & Daisy (2002; 2003), que afirmam que plantas com biologia e estratégia de sobrevivência incomuns, com histórico etnobotânicos, endêmicas, que apresentam longevidade incomum ou localizadas em ambientes ancestrais e grande diversidade são promissoras para prospecção. Os vegetais *Joannesia princeps* Vell (Cutieira), *Lecythis pisonis* Cambess (Sapucaia) (LORENZI & MATOS, 2002; FRANCO & BARROS, 2006) e *Swietenia macrophylla* King (Mogno Brasileiro) (GROGAN et al., 2002) se enquadram em todos os critérios supracitados anteriormente, sua biologia e aplicação são discutidas a seguir.

25 2.4.1 *Lecythis pisonis* Cambes (Lecythidaceae)

Lecythis pisonis é uma árvore silvestre brasileira conhecida popularmente como castanha sapucaia, marmita-de-macaco, cumbuca-de-macaco ou simplesmente "sapucaia", ocorre nos biomas da Amazônia e da Mata Atlântica (BRAGA et al., 2007). Pode atingir 20 a 30 m de altura, com tronco de 50 a 90 cm de diâmetro (LORENZI, 1992). Os constituintes químicos identificados em plantas desta família incluem os triterpenos pentacíclicos e glicosídeos, diterpenos neo-clerodanos, sesquiterpenos, monoterpenos, esteroides, alcaloides, compostos fenólicos simples, flavonoides, ácido elágico e derivados e vitamina E (OLIVEIRA et al., 2010).

As folhas de sapucaia são popularmente utilizadas na forma de banhos para o tratamento da coceira (prurido) do corpo e o óleo extraído das sementes é utilizado como um emoliente na redução da dor muscular (FRANCO & BARROS, 2006). Já as amêndoas são consumidas pela população e são pouco conhecidas e estudadas. As sementes oleaginosas são ricas em ácidos graxos, particularmente

os ácidos linoleico e oleico, além de proteínas, aminoácidos essenciais e minerais, como fósforo, potássio, magnésio e cálcio, sendo pobres em sódio, favorecendo assim o sistema cardiovascular (CARVALHO et al., 2012b; VALLILO et al., 1999). Além disso, são ainda consideradas boas fontes de fibras com quantidades razoáveis de tiamina, e de vitaminas B1 e B2. Em estudo realizado com as sementes da sapucaia, Vieira et al. (2015) detectaram um peptídeo bioativo com forte efeito inibitório contra a levedura oportunista *Candida albicans*.

2.4.2 *Joannesia princeps* Vell Ducke (Euphorbiaceae)

Joannesia princeps popularmente conhecida como boleira e cutieira é uma árvore encontrada nas regiões norte, nordeste e sudeste, principalmente em floresta pluvial de mata atlântica (SOUSA et al., 2007). Plantas desta família são empregadas na medicina popular para tratamento de inflamação, diabetes, úlceras, diarreia, rins, colesterol, distúrbios hepáticos e como estomáquica antidiarréica e cicatrizante (LORENZI & MATOS, 2002). *Joannesia princeps* também é indicada como purgativo, para perturbações menstruais, febre pernicioso, antimicrobiano, sífilis, escrofulose, inchaço e inflamação (BALBACH, 1969). Tanto o óleo da semente como a casca da raiz são utilizados como laxante, extratos das mudas exibiram forte atividade anti-helmíntica, que foi atribuída a alcaloides isolados de diferentes partes da mesma (ACHENBACH & BENIRSCHKE, 1997).

Alguns metabólitos foram isolados a partir do extrato metanólico de semente de *J. princeps* tais como isoamericanina A, americanol A e isoamericanol A, até então lignana desconhecida e os novos sesquiterpenolignanos (WAIBEL et al., 2003). Além disso, a prospecção fitoquímica conduzida por Sousa et al. (2009) indicou a presença de flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides, esteroides e alcaloides.

2.4.3 *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae)

Swietenia macrophylla, popularmente conhecida como mogno, foi uma das espécies de maior valor madeireiro do mundo em 2001 com o m² de qualidade vendido por cerca de US\$ 1.200,00 (GROGAN et al., 2002; GULLISON et al., 2003). É uma espécie muito apreciada e demandada, principalmente no exterior. Por correr riscos de extinção, sua exploração, transporte e comercialização foram suspensos por tempo indeterminado no Brasil em 19 de outubro de 2001 através da Instrução Normativa nº 17 (CARVALHO et al., 2016a). O mogno tem sementes com alto poder de germinação, cresce rápido em condições de luz plena ou parcial, e pode atingir grande estatura (mais de 1,5 m de diâmetro e 40 m de altura) após mais de cem anos (GROGAN et al., 2002).

Devido à sua vasta distribuição, a espécie apresenta enorme amplitude ecológica e é encontrada em florestas pluviais, florestas de montanha e matas de galeria em ambientes com precipitação anual entre 1.200 e 4.000 mm e localizados entre as latitudes 20° norte e 20° sul. Possui uma alta plasticidade

5 genética, de onde vem sua capacidade de apresentar várias adaptações na morfologia foliar tais como tamanho, enrugamento, espessura da cutícula e densidade facultativa (ALVARADO, 2009).

Não existe informação disponível sobre a estrutura genética do mogno na América do Sul, a região abriga a maioria das populações não filiadas desta madeira valorizada (LEMES et al., 2003). Por esta razão, as indústrias chegaram a remover até 95% das árvores adultas de florestas primárias sem considerar a regeneração das plântulas. De acordo com Grogan et al. (2005) a dinâmica de crescimento e sobrevivência das plântulas é pouco entendida, uma vez que em condições naturais a taxa de mortalidade no sub-bosque é alta. Em contrapartida, plântulas de mogno podem sobreviver a eventos de inundação e crescem vigorosamente após a morte do dossel, por meio de vias biológicas que permanecem não esclarecidas (GULLISON et al., 2003).

15 *Swietenia macrophylla* tem sido utilizada como abortivo, também para o tratamento da hipertensão, diabetes, malária, leishmaniose, como antifúngico, antibacteriano, anti-mutagênico e antitumoral (EID et al., 2013). Além disso, a semente e os extratos foliares de várias espécies da família das meliáceas têm sido relatados como fonte de substâncias redutoras do crescimento de insetos. Espécies dessa família foram examinadas devido à excelente bioatividade dos limonóides (triterpeno e derivados), que têm uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo antifúngico, efeitos antibacterianos, antivirais e medicinais em animais e humanos (LAETEMIA & ISMAN, 2004).

5 3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Prospectar as comunidades de fungos endofíticos presentes nas raízes e folhas das espécies vegetais *Joannesia princeps*, *Lecythis pisonis* e *Swietenia macrophylla* capazes de produzir substâncias de interesse contra doenças tropicais negligenciadas e úteis para agricultura.

10 3.2 Objetivos específicos

- Obter fungos endofíticos a partir das amostras de folhas de plântulas jovens (mudas), folhas de indivíduos adultos, e, da raiz das espécies *Joannesia princeps*, *Lecythis pisonis* e *Swietenia macrophylla* presentes em fragmento de Mata Atlântica do estado de Minas Gerais;
- Depositar todos os isolados de fungos endofíticos obtidos na Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais e contribuir para preservação *ex situ* da diversidade de fungos tropicais, bem como para a montagem de uma coleção temática de fungos endofíticos tropicais;
- Preparar extratos brutos a partir das culturas dos fungos endofíticos e de suas plantas hospedeiras para montagem de uma extratoteca para estudos de bioprospecção;
- Avaliar a atividade biológica dos extratos fúngicos e vegetais obtidos contra protozoários *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*;
- Avaliar a atividade herbicida dos extratos dos fungos endofíticos frente aos modelos *Lactuca sativa* e *Allium schoenoprasum*;
- Caracterizar os metabólitos bioativos produzidos pelos fungos contra as DTNs utilizando o fracionamento químico biomonitorado e técnicas cromatográficas;
- Avaliar a ação de fungos endofíticos obtidos da raiz de *S. macrophylla* sobre a germinação de plântulas de *Glycine max* (soja) e *Phaseolus vulgaris* (feijão).
- Identificar todos os fungos ativos obtidos utilizando técnicas de taxonomia polifásica;

5 4. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada neste trabalho está dividida em etapas conforme indicado no fluxograma apresentado na **Figura 2**.

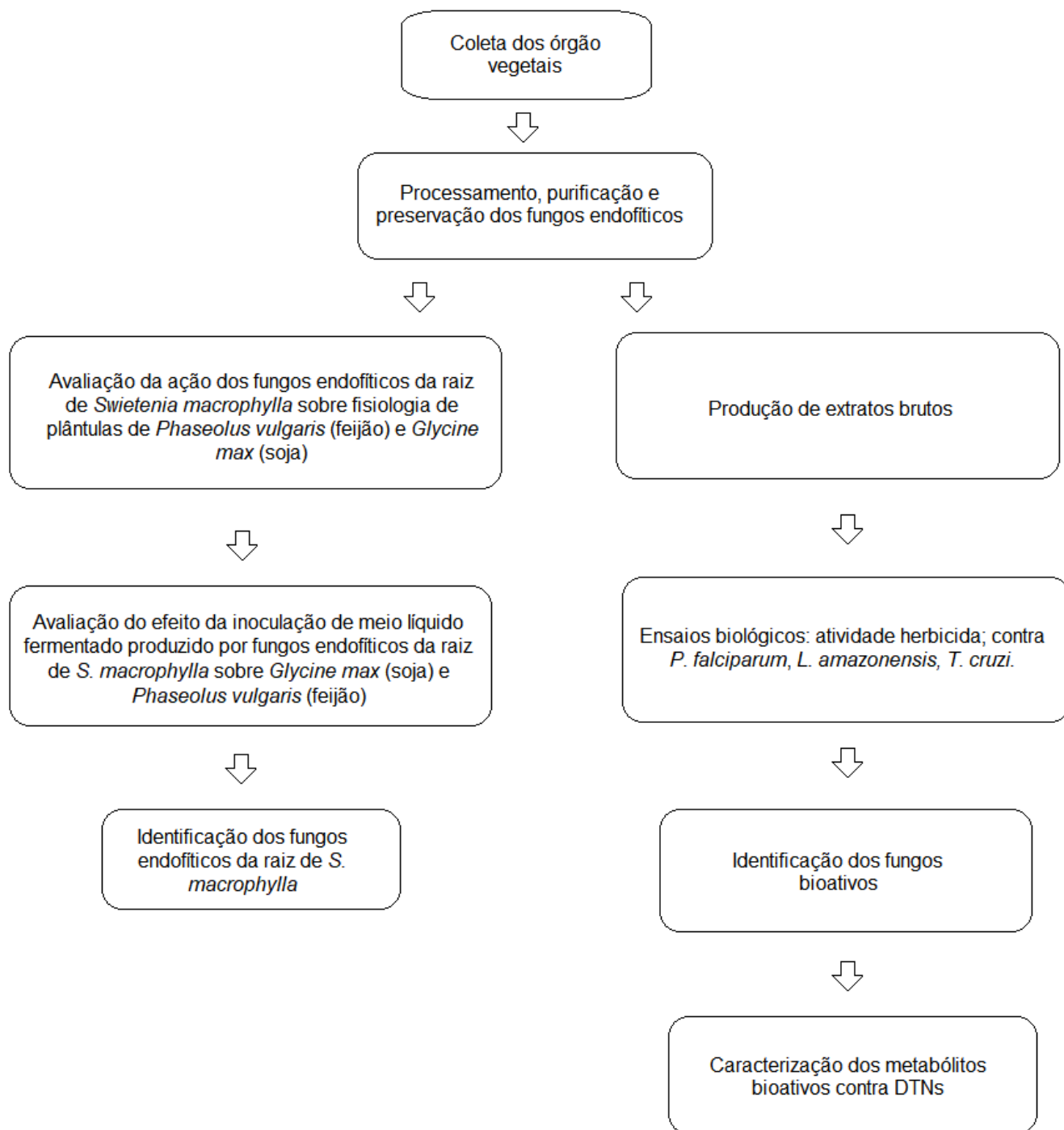


Figura 2. Fluxograma da metodologia empregada nessa tese.

5 4.1 Área de coleta

As amostras de raízes, folhas de mudas e de indivíduos adultos das espécies *J. princeps*, *L. pisonis* e *S. macrophylla* foram coletados no Parque Estadual do Rio Doce (PERD), que está situado na porção sudoeste do estado de Minas Gerais (19°42'23"S; 42°34'33"O) a 248 km de Belo Horizonte. O Parque está situado na região do Vale do Aço, inserido entre nos municípios de Marliéria, Dionísio e Timóteo (**Figura 3**).

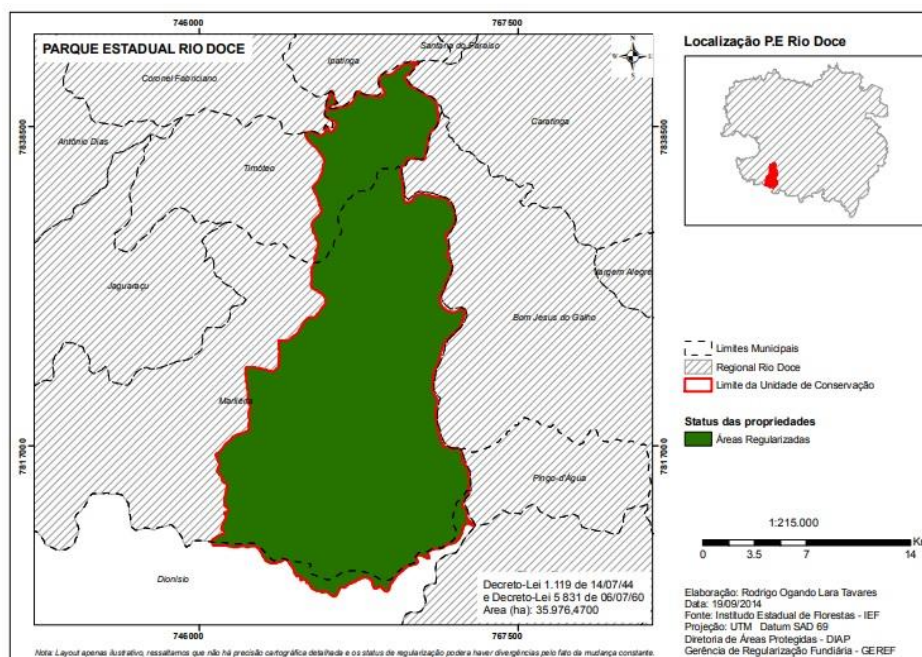


Figura 3. Localização e limites do Parque Estadual do Rio Doce (PERD). (Fonte: IEF: <http://www.ief.mg.gov.br/noticias/1/component/content/195>).

O PERD constitui-se na maior área remanescente de mata Atlântica no estado de Minas Gerais, com aproximadamente 36.000 ha. No tocante à vegetação, apesar de destacar-se no cenário das Unidades de Conservação do Estado, o Parque ainda carece de estudos mais detalhados (IEF, 2022). O acesso à região foi realizado respeitando-se as legislações Estaduais e Federais de acesso à biodiversidade. Todos os espécimes vegetais hospedeiras dos fungos foram identificados a partir de suas estruturas vegetativas e reprodutivas por meio de comparação com exsicatas previamente depositadas no Herbário do Parque e da UFMG.

As exsicatas dos vegetais coletados foram depositadas no Herbário BHCB da Universidade Federal de Minas Gerais para confirmação da identificação. Os códigos de depósitos das exsicatas de *S. macrophylla*, *J. princeps* e *L. pisonis* são: BHCB 195682, BHCB 195683 e BHCB 195684, respectivamente. Os indivíduos jovens (mudas) coletados no PERD foram representados por plantas

5 jovens, as quais apresentavam baixa estatura, folhas novas e copa menos alongada quando comparadas as plantas adultas.

4.2 Coleta, purificação e preservação dos fungos endofíticos

Foram coletadas amostras de folhas de mudas e de indivíduos adultos aparentemente saudáveis de *J. princeps* (10 mudas e 2 indivíduos adultos), *L. pisonis* (10 mudas e 1 indivíduo adulto) e *S. macrophylla* (10 mudas e 10 indivíduos adultos). Adicionalmente coletou-se raízes secundárias de seis indivíduos jovens (mudas) de *S. macrophylla*. A localização dos indivíduos foi determinada por coordenadas geográficas obtidas pelo *Global Positioning System* (GPS). As amostras coletadas foram armazenadas em sacos plásticos e processadas em um prazo inferior a 72 h.

Inicialmente ao processo de desinfestação, as folhas e raízes coletadas foram limpas superficialmente com detergente neutro e enxaguadas abundantemente com água destilada esterilizada. Em seguida, fragmentos foram retirados com auxílio de tesoura e pinças previamente esterilizadas. Fragmentos de aproximadamente 5 mm de diâmetro foram desinfestados superficialmente com álcool 70% (1 min), hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo (3 minutos) e água destilada esterilizada (2 minutos) (CARVALHO et al., 2012a). Após este processo de desinfestação superficial, cinco fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose (BDA/Difco) suplementado com 100 mg L⁻¹ de cloranfenicol (Sigma), utilizado para inibir o crescimento de bactérias contaminantes. Alíquotas da água destilada esterilizada utilizada no processo de desinfestação também foram inoculadas como controle para assegurar que somente os fungos endofíticos foram isolados. As placas foram incubadas a 25 °C por um período de até 60 dias.

25 4.3 Preparo dos extratos fúngicos e vegetais para utilização nos ensaios antiparasitários e herbicida

O preparo dos extratos dos fungos seguiu o protocolo estabelecido por Rosa et al. (2012). Os fungos filamentosos obtidos foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA a 25 °C com umidade de 70-80%. Para cada isolado obtido foram preparadas cinco placas de Petri para de se obter um maior rendimento dos metabólitos produzidos por eles. Após 15 dias de crescimento, o meio de cultura com o crescimento micelial foi transferido para frascos Erlenmeyers de 125 mL, congelados a -80 °C por 24 h e posteriormente submetidos ao processo de liofilização (Liofilizador LíoTop - L101). Após a desidratação completa do micélio foi acrescentado 50 mL de diclorometano PA (Vetec) para extração dos compostos preferencialmente aromáticos. Os frascos foram incubados a temperatura ambiente e após 72 h, o sobrenadante (fase diclorometânica) de cada frasco foi filtrado com auxílio de papel filtro esterilizado e transferido para frascos de cintilação.

5 Para a fabricação dos extratos foliares, as folhas foram liofilizadas por 72 h e colocadas em frascos Erlenmeyers de 50 mL com 35 mL de diclorometano PA. Após 72 h, o diclorometano (sobrenadante) de cada frasco Erlenmeyer foi filtrado e transferido para frascos de cintilação.

Alíquotas dos extratos brutos obtidos, dos fungos filamentosos e dos vegetais, foram secas a temperatura ambiente, solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO), a uma concentração de 20 mg mL⁻¹,
10 depositados na Extratoteca da Plataforma de Bioprospecção-MG RPT10A do IRR/FIOCRUZ e mantidos a -20 °C até utilização nos ensaios biológicos.

4.4 Determinação da atividade herbicida

4.4.1 Bioensaio com *Lactuca sativa* e *Allium schoenoprasum*

A atividade herbicida foi determinada de acordo com Gomes et al. (2018), utilizando-se
15 sementes de alface crespa (*Lactuca sativa*) como modelo para dicotiledôneas e sementes de cebolinha (*Allium schoenoprasum*) como modelo para monocotiledôneas. Para a realização dos ensaios, todas as sementes foram desinfestadas superficialmente em álcool 70% por 1 min, e posteriormente imergidas em hipoclorito de sódio 2-2,5% por 7 min e 30 seg. Em seguida, as sementes foram lavadas em água deionizada esterilizada por seis vezes e secas ao ar em um ambiente esterilizado. Os bioensaios foram
20 realizados em duplicata em placas de poliestireno de 24 poços esterilizadas (CoStar 3524, Corning Incorporated). Um disco de papel filtro (50 x 50 – 80 g) foi colocado em cada poço a ser utilizado. Aos poços de controle negativo (CN) foram adicionados 400 µL de água deionizada. Aos poços de controle positivo (CP) foram utilizados 400 µL de solução de glifosato a concentração de 3mg mL⁻¹. Para avaliação de toxicidade do solvente utilizado na solubilização das frações foi realizado o controle de
25 solvente (CS). Para tanto, foi adicionado ao poço 360 µL de água + 40 µL de acetona P.A. (por poço a ser testado). Aos poços testes, foram testados a atividade do extrato (EX) produzido foram adicionados 360 µL de água destilada estéril + 40 µL da solução de extrato (massa de 3-5 mg mL⁻¹) para conduzir o ensaio na concentração de 1mg mL⁻¹ (**Figura 4**).

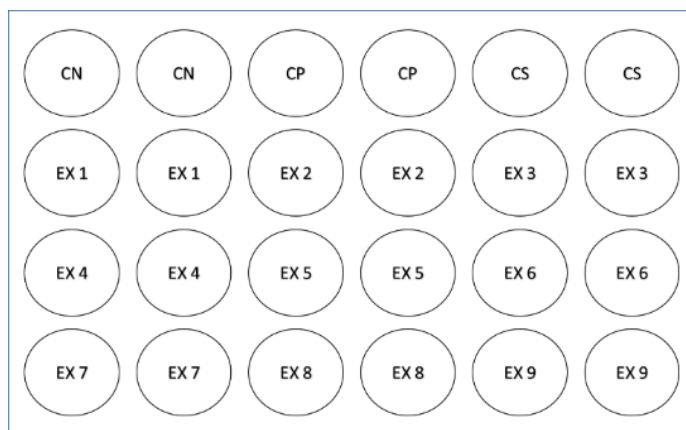


Figura 4. Disposição das amostras na placa de ensaio herbicida.

Toda a preparação placa foi realizada em um ambiente esterilizado para diminuir as chances de qualquer contaminação. Posteriormente cinco sementes do vegetal teste foram adicionadas a cada poço. As placas foram tampadas e seladas com parafilme, e posteriormente incubadas em estufa (Percival Scientific CU-36L5) sob condições de luz contínua ($120,1 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$) a 26°C por quatorze dias e dez dias. Após este período, uma estimativa qualitativa de fitotoxicidade foi feita atribuindo-se uma classificação de 0-5, onde 0 = todas as sementes germinaram, nenhum efeito, e, 5 = nenhuma semente germinou.

4.5 Ensaios *in vitro* com as formas tripomastigotas e as formas intracelulares amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Este ensaio foi realizado na Plataforma de Bioensaios para triagem de drogas anti-*Trypanosoma cruzi* (PlaBio Tc) da Fiocruze baseado no protocolo descrito anteriormente por Buckner et al. (1996) e modificado por Romanha et al. (2010), usando *T. cruzi* (cepa de Tulahuen) expressando o gene da β -galactosidase de *Escherichia coli*. As formas tripomastigotas infecciosas são obtidas através da cultura em monocamadas de fibroblastos L929 de camundongo em meio RPMI-1640, sem vermelho de fenol, contendo 10% de SFB fetal e 2 mM de glutamina. Para o bioensaio, 4.000 células L929 em 80 μL de meio suplementado são adicionadas a cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços. Após uma incubação *overnight*, 40.000 tripomastigotas em 20 μL são adicionados às células, e as células são incubadas por 2 horas. O meio contendo parasitas que não penetraram nas células é substituído por 200 μL de meio fresco e a placa é incubada por mais 48 h para estabelecer a infecção. O meio é então substituído pelos extratos a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ em meio fresco (200 μL) e a placa é incubada por 96 horas a 37°C . Após esse período, 50 μL de 500 μM de vermelho de clorofenol β -D-galactopiranosídeo em 0,5% Nonidet P é adicionado a cada poço e a placa é incubada por 18 horas a 37°C , e a absorbância a 570 nm medida, logo em seguida. São utilizados controles com células não infectadas, células infectadas não tratadas, células infectadas tratadas com benzonidazol a 3,8 μM (controle positivo) ou

- 5 DMSO a 1%. Os resultados são expressos como a percentagem de inibição do crescimento do *T. cruzi* em células testadas em composto em comparação com as células infectadas e células não tratadas. As duplicatas são executadas em duas placas diferentes. Foram considerados ativos, os extratos que inibiram o crescimento do parasita com porcentagem maior que 50%.

4.6 Ensaio *in vitro* com a forma amastigota-like de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

- 10 A manutenção das células axênicas de *L. (L.) amazonensis* e o ensaio com amastigotas-like foram realizados pela técnica Daniela Nabak do IRR/FIOCRUZ MG. Culturas axênicas da forma amastigota-like de *L. (L.) amazonensis*, previamente caracterizadas por meio de eletroforese de isoenzimas e depositadas na Coleção de *Leishmania* do Centro de Referência em Tipagem de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz, foram utilizadas para o ensaio. A concentração do parasita foi
15 ajustada para 1×10^8 células mL^{-1} e 90 μL foram adicionados a cada poço de placas de 96 poços, seguidos de 10 μL das soluções contendo as amostras e controle da droga (0,2 mg mL^{-1} Anfotericina B). As placas foram incubadas a 32 °C por 72 horas e o número de parasitas estimado pelo ensaio colorimétrico baseado em MTT. Os resultados foram calculados a partir das absorbâncias medidas usando a fórmula:

20
$$[1 - (Absexp/Abscontr) \times 100]$$

A fórmula expressa a porcentagem de morte do parasita em relação aos controles sem droga. Todas as amostras foram testadas em duplicata e os experimentos repetidos pelo menos uma vez. Os extratos que inibiram acima de 70% a proliferação dos parasitas foram considerados ativos.

4.7 Ensaio contra o parasita *Plasmodium falciparum*

- 25 A manutenção dos parasitos *Plasmodium falciparum* e o ensaio esquizontocidas *in vitro* foram realizados pelas pesquisadoras colaboradoras Isabela Cerávolo e Patrícia Pereira do IRR/FIOCRUZ MG. O ensaio realizado utilizou o fluoróforo SYBR, um intercalante de DNA, conforme Smilkestein et al. (2004) com algumas modificações. Para a realização deste ensaio, a cultura de parasitos foi ajustada para 0,5% de parasitemia e 2% de hematócrito, e mantida em uma placa de 96 poços de fundo
30 em U (180 $\mu\text{L poço}^{-1}$). Após este ajuste, 180 μL da suspensão de parasitos foi adicionada aos poços de uma placa de 96 poços contendo 20 μL da solução dos extratos, avaliados em triplicatas, e incubada a 37°C por 48h. O sobrenadante foi retirado, e 150 μL de PBS acrescentado a cada poço da placa que foi centrifugada por 5 minutos a 700 x 47 g. Após a retirada do sobrenadante, 100 μL de tampão de lise (0,2 μL de SYBR mL^{-1} em tampão de lise - Tris 20 mM pH 7,5; EDTA 5 mM; saponina 0,008% p/v e
35 triton X-100 0,08% v/v) foram acrescentados a cada poço, os conteúdos foram bem homogeneizados

5 e transferidos para uma placa de 96 poços de fundo chato, contendo 100 μL de PBS/poço. A placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente e sob abrigo da luz. A leitura da fluorescência foi realizada no leitor Synergy H4 (Biotek, Winooski, VT, EUA) em um comprimento de onda de excitação e de emissão de 485 e 535 nm, respectivamente, e com um ganho de 100. Para análise, a leitura do background dos poços das hemácias normais foi subtraída da contagem da fluorescência.

10 Quanto maior a fluorescência, maior a quantidade de DNA onde foi incorporado o SYBR, maior o número de parasitos viáveis e menor a atividade da droga sobre o parasito. A amostra foi considerada promissora quando, a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, apresentou uma porcentagem média de inibição de crescimento do parasito $\geq 40\%$ quando comparada ao controle sem adição de substância-teste em, pelo menos, dois ensaios independentes.

15 4.8 Ensaio de citotoxicidade em células BGM

A manutenção das células e o ensaio foram realizados pelas pesquisadoras colaboradoras Isabela Cerávolo e Patrícia Pereira do IRR/Fiocruz MG, para avaliar a citotoxicidade de drogas contra *P. falciparum*. A linha celular BGM, derivada do rim do macaco verde africano (ATCC, Manassas, VA, EUA) foi usada para conduzir os ensaios de citotoxicidade, foi mantida como sugerido pelos

20 fabricantes. As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm^2 com RPMI 1640 médio suplementado com soro fetal de bezerro inativado a 10% e 40 mg L^{-1} gentamicina em uma atmosfera de CO_2 de 5% a 37 °C. Para os testes *in vitro*, uma monocamada de células confluentes foi distribuída em uma placa de fundo plano de 96 poços (2×10^5 células mL^{-1}), e incubada por 18h a 37 °C para garantir a adesão celular. As células BGM foram incubadas com 20 μL dos medicamentos em diferentes concentrações

25 ($\leq 1 \text{ mg mL}^{-1}$) por 24 h em 5% de CO_2 a 37 °C. A viabilidade celular foi expressa como a porcentagem de absorção de controle das células não tratadas após subtrair os valores de *background*. A dose letal extrato para 50% das células foi determinada pela realização de testes em duplicatas para calcular a dose que matou 50% das células (MLD_{50}) ou CC_{50} , conforme descrito por do Céu de Madureira et al. (2002). O ensaio de absorção vermelho neutro foi usado para avaliar a integridade lisossomal e

30 distingue células vivas de mortos por sua capacidade de incorporar o corante (BORENFREUND et al., 1988). Resumidamente, foi adicionado ao poço 0,2 mL meio contendo 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de solução vermelha neutra. A placa foi incubada por mais 3h a 37 °C para permitir a absorção do corante vital nos lisossomos de células viáveis. Após a remoção do meio, 200 μL de uma mistura de 0,5% de formaldeído e 1% CaCl_2 foi adicionado às células, e incubado por 5 min a 37 °C. O supernante foi

35 removido e 100 μL de uma solução de ácido acético de 1% -50% de etanol foi adicionado a cada poço para extrair o corante. A densidade óptica de cada poço foi mensurada em um comprimento de onda de 540 nm usando um espectotômetro, uma vez que essa absorvância dá uma relação linear com o

5 número de células sobreviventes. A razão entre extratocitocidade (MLD_{50} BGM) e atividade (IC_{50} W2) foi utilizada para estimar o índice seletividade (IS), conforme determinado por Bézivin et al. (2003), onde o $IS \leq 10$ foi indicativo de citotoxicidade.

4.9 Fracionamento químico biomonitorado

10 Os extratos dos fungos bioativos selecionados foram submetidos ao micro-fracionamento químico biomonitorado pelos respectivos ensaios visando à identificação dos prováveis metabólitos responsáveis pela atividade biológica. Cada extrato foi fracionado em 78 partes, as quais foram adicionadas em microplacas de 96 poços contendo o parasita de interesse no qual o extrato apresentou atividade. Após a condução do reteste biológico e indicativo do poço ativo, realizou-se a elucidação estrutural dos constituintes químicos, iniciando pelas análises de cromatografia de massas.

15 As análises químicas foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC, Shimadzu Nexera) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução (HR-MS, Bruker maXis ESI-QTOF) e controlado pelo software Compass 1.5 (Bruker). Volumes de amostras entre 1 e 3 μ L foram injetados numa coluna Shim-Pack XR-ODSIII, C18, 2.2 μ m, 2.0 x150 mm (Shimadzu) em temperatura controlada de 40 °C e num fluxo constante de solventes de 400 μ L
20 min^{-1} . As fases moveis A e B (0,1% ácido fórmico em água ou acetonitrila, respectivamente) formaram um gradiente de eluição de 5 min 5% B no início, depois um gradiente linear para 100% B em 40 min, seguido de um passo isocrático de 5 min com 100% B. Cromatogramas UV foram adquiridos entre 190-450 nm de comprimentos de ondas. Os espectros de massas foram adquiridos no modo positivo em frequências de 5 Hz. Os parâmetros da fonte de íons foram definidos como 500 V end plate offset,
25 4500 V voltagem do capilar, 3 bar pressão do gás nebulizador, 8 L min^{-1} e 200 °C fluxo e temperatura de gás secador, respectivamente. A fragmentação dependente de dados de precursores foi feita com energias de colisão entre 15-60 eV. Os parâmetros do íon cooler foram otimizados para a faixa m/z 100-1500 utilizando uma solução de 1 mM formato de sódio em 50% 2-Propanol como calibrante. A calibração de massas foi feita pela infusão de 20 μ L de calibrante na fonte de íons no início da aquisição
30 de espectros e a recalibração dos dados brutos no processamento.

A detecção dos metabólitos foi realizada no processamento através de secção de picos cromatográficos, seguido pela determinação de fórmulas por meio de massas exatas e do envelope isotópico (MS1). A identificação foi baseada na comparação de espectros de fragmentação (MS2) com espectros de referência adquiridos “*in-house*” de padrões, acessíveis publicamente (MassBank, Horai
35 et al, 2010) e espectros gerados *in-silico* utilizando o Banco Universal de Produtos Naturais (UNPD-ISDB, ALLARD et al, 2016).

5 4.9.1 Identificação putativa *in silico* dos constituintes químicos

As análises de identificação putativa da estrutura molecular foram feitas através da utilização do *Software* Sirius, que utiliza dados LC-MS/MS para identificação de metabólitos e outras pequenas moléculas de interesse biológico. Sirius 4 integra CSI:FingerID que cruza os dados obtidos à bancos de dados de estrutura molecular (DUHRKOP et al., 2019).

10 4.10 Avaliação do efeito de fungos endofíticos em vegetais de interesse agrônômico

4.10.1 Avaliação físico-química do solo autoclavado para cultivo de *Glycine max* (soja) e *Phaseolus vulgaris* (feijão)

Com o intuito de avaliar o efeito das espécies químicas do solo sob efeito da esterilização de calor úmido sob pressão (127 °C 20 min⁻¹), realizou-se análises físico-químicas em triplicata de solo autoclavado e não autoclavado (grupo controle), onde cada replicata foi previamente peneirada e pesada em 250 g para realização das análises. Foram avaliadas a variação de pH, P, K, Na, Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺, Zn, Fe, Mn, Cu, B, S e H^{+Al}. As análises físicas avaliaram a variação da granulometria e classificação textural nos grupos de solos (ARAÚJO & GUERREIRO, 2010).

4.10.2 Infecção por fungos em vegetais de interesse agrônômico

Três discos miceliais de aproximadamente 3 mm de diâmetro de fungos endofíticos de raiz de *S. macrophylla* foram inoculados em tubos cônicos de 50 mL contendo 25 mL de Caldo Czapeck e 5 mg mL⁻¹ de L-triptofano e incubados em estufa BOD a 28 °C por 7 dias. Em seguida foram adicionadas três sementes orgânicas de *P. vulgaris* e *G. max* devidamente desinfestadas a cada meio de cultura. A desinfestação se deu por meio da submersão das sementes em álcool 70% por 1 min, seguido de hipoclorito de sódio (cloro ativo 2%) por 7,30 min e em água destilada autoclavada por três vezes durante 2 min. Dez microlitros da água da lavagem foram utilizadas para plaqueamento em meio BDA para confirmação da desinfestação. As culturas com as sementes infectadas foram incubadas a 28 °C por 24 h (FOUDA et al., 2015). Após este período, as sementes infectadas de cada fungo e não infectadas (controles) foram inoculadas em recipiente próprio para cultura de tecido contendo 40 g de solo peneirado (poro 2 mm), esterilizado por autoclavação (por 20 min) e umedecido de 3 mL de água destilada esterilizada. As sementes foram incubadas em BOD com fotoperíodo com exposição de luz de 12 h dia⁻¹ por 15 dias até que os vegetais controles atingissem o estado vegetativo de duas folhas (V2).

Com o intuito de confirmar se o fungo inoculado foi o causador dos efeitos observados sobre os vegetais, realizou-se o isolamento dos fungos a partir das folhas ou sementes, por meio da

5 metodologia descrita previamente. Posteriormente efetuou-se a identificação molecular conforme descrito no item 4.11.1 Extração do DNA total dos fungos.

4.10.3 Avaliação do efeito da inoculação de meio líquido fermentado produzido por fungos endofíticos da raiz de *Swietenia macrophylla* sobre *Glycine max* (soja) e *Phaseolus vulgaris* (feijão)

10 Todos os fungos isolados da raiz de *S. macrophylla* foram testados quanto a sua capacidade de produção de auxina e consequentes efeitos sobre as plantas. Para tal, três sementes orgânicas de *P. vulgaris* e *G. max* devidamente desinfestadas (conforme descrito no item 4.10 Avaliação do efeito de fungos endofíticos em vegetais de interesse agrônômico) foram inoculadas em recipiente próprio para cultura de tecido contendo 40 g de solo peneirado (poro 2 mm), esterilizado por autoclavação (por 20 min) e umedecido de 1 mL de caldo de fermentação produzido por cada fungo. O caldo foi produzido 15 cultivando os fungos em meio Czapek líquido acrescido com L-Triptofano. As culturas foram mantidas a 28 °C no escuro e sob agitação constante de 140 rpm durante 48 h. Após este período, as culturas líquidas foram centrifugadas a 7.000 g durante 10 min a 15 °C e o sobrenadante coletado foi liofilizado, posteriormente foram ressuspensos em água para aplicação na semente do vegetal por três vezes em um intervalo de 7 dias. As sementes foram incubadas em BOD com fotoperíodo com exposição de luz 20 de 12 h dia⁻¹ por 15 dias até que os vegetais controles atingissem o estado vegetativo de duas folhas (V2), onde as folhas primárias ficam totalmente abertas ficando na posição horizontal, são unifolioladas, e os cotilédones ainda estão presos na planta (WAQAS et al., 2012).

4.10.4 Determinação do peso seco e comprimento dos vegetais

25 Após o período de desenvolvimento até o estágio V2 em estufa, todos os vegetais tiveram o caule e raiz mensurados com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo 150 mm, 500-196-20B). Para a determinação do peso seco, as amostras foram identificadas, pesadas e inseridas em envelopes de papel pardo para evitar interferências da luz no processo fisiológico destas. Cada amostra foi seca à temperatura ambiente para retirar o excesso de umidade e, posteriormente, incubadas em estufa para secar a uma temperatura não superior a 60 °C (SCOLFORO et al., 2004). As amostras permaneceram 30 na estufa até a secagem total, que foi confirmada quando, ao serem realizadas sucessivas pesagens na mesma amostra, o seu peso permaneceu constante. Após a secagem, foi medido o seu peso seco, o qual foi relacionado ao peso verde da amostra e possibilitou o cálculo do peso seco total de cada planta (SCOLFORO et al., 2004).

4.10.5 Tratamento estatístico dos dados

35 A fim de verificar se a influência dos fungos sobre plantas foi estatisticamente significativa comparada ao grupo controle, aplicaram-se modelos matemáticos. Primeiramente verificou-se se os

5 dados de comprimento e peso seco de cada vegetal (controle e com inóculo fúngico) seguia a distribuição normal, utilizando o Software livre Past 18.1[®]. A partir dos resultados obtidos empregou-se Teste T de *student* considerando amostras com heterocedasticidade e variação bicaudal. Ainda, de forma complementar aplicou-se análise de componentes principais (ACP), técnica multivariada de modelagem da estrutura de covariância, que transforma linearmente um conjunto original de variáveis,
10 inicialmente correlacionadas entre si, num conjunto substancialmente menor de variáveis não correlacionadas que contém a maior parte da informação do conjunto original (HONGYU et al., 2016).

4.10.6 Quantificação de ácido indolacético (AIA)

Os níveis de ácido indoolacético (AIA) secretados pelos fungos isolados das raízes axiais de *S. macrophylla* foram estimados cultivando-os em meio Czapek líquido acrescido com L-Triptofano. As
15 culturas foram mantidas a 28 °C no escuro e sob agitação constante de 140 rpm durante 48 h. Após este período, as culturas líquidas foram centrifugadas a 7.000 g durante 10 min a 15 °C e o sobrenadante coletado. A quantidade de AIA por mL de cultura foi estimada conforme o protocolo de Gordon & Weber (1951) com algumas modificações, a qual consistiu na mistura de 2 mL de reagente de Salkowski ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2% + H_2SO_4 37%) com 1 mL do sobrenadante da cultura, a qual foi reservada
20 por 30 min em ambiente escuro para reação e manifestação de cor vermelha, mais intensa quando há maior quantidade de AIA. A intensidade da cor foi determinada em espectrofotômetro (modelo Beckman DU 640) com leitura em 530 nm de absorbância (ASGHAR et al., 2002). A concentração de compostos indólicos foi estimada utilizando uma curva padrão preparada com meio de cultura Czapek líquido e quantidades conhecidas do hormônio, as quais foram obtidas por meio de diluições de uma
25 solução 1 mg mL⁻¹ de AIA comercial padrão (Sigma-Aldrich).

4.11 Identificação dos fungos endofíticos bioativos

Os fungos que apresentaram bioatividade nos ensaios foram identificados. As colônias dos isolados de fungos filamentosos obtidos a partir das folhas e raízes foram fotografadas (frente e verso) e agrupadas de acordo com as seguintes características macromorfológicas: cor da colônia (frente e
30 verso), textura da superfície (frente e verso) e aspecto da borda. Posteriormente, os grupos formados por meio das características citadas acima foram submetidos à análise de perfis moleculares por meio da técnica de PCR microsatélite (MSP-PCR), utilizando o oligonucleotídeo sintético (GTG)₅ ou (GAC)₅. Os isolados que apresentaram padrões de bandas idênticos foram confirmados como pertencentes ao mesmo grupo.

- 5 Um isolado de cada grupo molecular foi selecionado para sequenciamento da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) do gene do rRNA. A escolha da região a ser sequenciada foi determinada de acordo com os gêneros encontrados por meio do sequenciamento da região ITS.

5 4.11.1 Extração do DNA total dos fungos

A extração de DNA total foi realizada de acordo com metodologia descrita por Rosa et al. (2009). Os micélios foram colocados em tubo de 1,5 mL acrescidos de 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl – trishidroximetilaminometano 0,05 M, EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS – sódio 10 dodecil sulfato 1%). Foram adicionadas em cada tubo três esferas de aço inoxidável (3,175 mm de diâmetro) e posteriormente submetidos a trituração no equipamento Bullet Blender™ (Uniscience). Após esta etapa foram acrescentados 162 µL de CTAB (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%), seguido de homogeneização e incubação por 40 minutos a 65°C. Posteriormente, foram acrescentados 570 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização em vórtex, o tubo foi incubado por 30 min em gelo. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 14.800 rpm por 10 min e o líquido sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, e acrescentado 10% do volume de uma solução de acetato de sódio 3M. O tubo foi homogeneizado por inversão, incubado a 0 °C por 30 min e centrifugado a 14,800 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e, em seguida, adicionado 50% do volume de isopropanol (Merck), a suspensão foi gentilmente homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 14.800 rpm por 5 min e o sobrenadante desprezado por inversão, seguido por homogeneização com etanol 70% (Merck) p/v. A amostra poderá ser seca em banho seco a 65 °C por aproximadamente 1 h, ou deixada *overnight* em temperatura ambiente. Para hidratar o DNA extraído, adiciona-se 50 µL de Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M), e posteriormente incuba-se a 65 °C por 60 min e, posteriormente, armazenada em freezer a -20 °C. Para os fungos originados da raiz de *S. macrophylla*, a extração do DNA foi realizada a partir da utilização do Kit de extração de DNA MiniPlant QIAGEN.

4.11.2 Amplificação utilizando os iniciadores (GTG)₅ e (GAC)₅

Os iniciadores (GTG)₅ e (GAC)₅ foram utilizados para amplificação de regiões de microssatélite, conforme descrito por Lieckfeldt et al (1993) e Thanh et al., (2013) respectivamente. A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi realizada para um volume final de 25 µL contendo de 1 a 5 µL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng µL⁻¹), 2,0 µL do iniciador (GTG)₅ ou (GAC)₅ 10 µmol⁻¹ (MWG Biotech), 2,5 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 1,5 µL de MgCl₂ 25mM, 1,0 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Express (Valpo.protect - Eppendorf). O programa para (GTG)₅ consistiu em uma desnaturação inicial a 94 °C por cinco minutos, seguido por 40 ciclos de 15 seg de desnaturação a 94 °C, 45 seg de anelamento a 55 °C e 90 seg de extensão a 72 °C, e uma extensão final

5 por 6 min a 72 °C. Para (GAC)₅ as condições foram as seguintes: 94 °C por 3 min; seguido de 30 ciclos de 94 °C por 40 seg, 52 °C por 40 seg e 72 °C por 1 min 30 seg; 72 °C por 10 min.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0), eluídos durante aproximadamente uma 1,5 h a 80 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed, e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber
10 Lourmat, France).

4.11.3 Amplificação da região ITS

Os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) foram utilizados para amplificação da região transcrita interna ITS-
15 5.8S da região do gene do rRNA, conforme descrito por White et al. (1990). A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi realizada em um volume final de 50 µL contendo de 1 a 5 µL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng µL⁻¹), 1 µL de cada iniciador ITS1 e ITS4 10 µmol⁻¹ (MWG Biotech), 5 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2 µL de MgCl₂ 25 mM, 2 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de Taq DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final
20 completado com água para injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador PCR Express (Valpo Protect - Eppendorf). O programa consistiu em uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 1 min de desnaturação a 94 °C, 1 min de anelamento a 55 °C e 1 min de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 5 min a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5
25 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0), eluídos durante aproximadamente 30 min a 120 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed, e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação de gel (Vilber Lourmat, França).

4.11.4 Purificação dos amplicons

Os amplicons gerados pela reação de PCR foram purificados utilizando-se EDTA. Ao produto
30 de PCR com volume de 47 µL, foram adicionados 11,25 µL de EDTA 125 mM e 135 µL de etanol absoluto (Sigma). Esta mistura foi submetida à centrifugação com rotação de 13.000 rpm durante 25 min. O sobrenadante foi descartado, e para lavagem do precipitado foi adicionado 120 µL de etanol 70% e realizado homogeneização por inversão. Após centrifugação a 13.000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado novamente e o restante do etanol foi secado por 20 min a 37 °C. O DNA
35 então foi ressuspensionado em 10 µL de água esterilizada. O produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

5 4.11.5 Reações de sequenciamento

O sequenciamento foi realizado utilizando-se o kit de sequenciamento *BigDye Terminator* v3.1 (*Applied Biosystem*, USA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730xl (*Applied Biosystem*, USA). Para as reações de sequenciamento foram utilizados 5-20 ng do DNA purificado. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 4 µL do pré-mix (presente no kit de sequenciamento), 2 µL do tampão de sequenciamento do kit, 1 µL do iniciador (3,2 pmol), e completou-se o volume final com água esterilizada. O programa consistiu em uma desnaturação inicial a 96 °C por um minuto, seguido por 25 ciclos de desnaturação a 96 °C por 10 seg, anelamento a 50 °C por 5 seg e extensão a 60 °C por 4 min. Para precipitação das reações de sequenciamento, 1 µL de acetato de amônio 7,5 M foi adicionado em cada poço da placa de 96 poços.

A solução de acetato de amônio foi dispensada na parede lateral dos poços e a placa levemente batida sobre a bancada para que as gotas do acetato de amônio se misturem à reação. Em seguida foram adicionados 28 µL de etanol absoluto (Merck). A placa foi submetida à agitação em vórtex e incubada por 20 min à temperatura ambiente, protegida da luz. Após período de incubação, a placa foi centrifugada por 45 min a 4.000 rpm. O sobrenadante foi descartado virando-se a placa sobre um papel absorvente. Em seguida, serão adicionados 150 µL de etanol 70% (Merck). A placa será novamente centrifugada por 15 min a 4.000 rpm e o sobrenadante então descartado. Para remoção do excesso de etanol, a placa foi invertida sobre um papel absorvente, e submetida a um pulso em centrífuga a 900 rpm durante 1 seg. Em seguida, a placa foi mantida em repouso durante 20-40 min, protegida da luz, para evaporação do etanol residual. O DNA das amostras precipitado em cada poço foi então ressuspensionado em 10 µL de “tampão de corrida” (presente no kit de sequenciamento). A placa foi então submetida à agitação em vórtex por 2 min, centrifugada por 1 seg a 900 rpm e armazenada a 4 °C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado ABI 3730xl.

4.11.9 Análise computacional das sequências

As sequências de DNA foram comparadas com sequências depositadas GenBank, utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool – versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), desenvolvido pelo *National Center For Biotechnology* e disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Os isolados que apresentaram sequência com identidade $\geq$ a 99% em relação às sequências de fungos depositadas no GenBank, foram considerados como pertencentes à mesma espécie. Para as sequências com identidade igual a 98% o gênero e espécies foram aceitos, mas o termo ‘cf.’ (latim for confer = comparado com) foi usado para indicar a espécie a qual se assemelha, mas apresenta pequenas diferenças com a espécie

- 5 referência. Já aqueles que apresentaram sequências com identidade entre 95 e 97% somente o gênero foi aceito, para sequências com identidade <95% os isolados foram identificados como espécies desconhecidas ou identificados em família, classe, ordem (GODINHO et al., 2013).

5. RESULTADOS

5.1 Coleta dos fungos endofíticos

A coleta do material biológico foi realizada em maio de 2018, licenciada pela autorização para pesquisa científica no Estado de Minas Gerais (001/2019), emitida pelo Instituto Estadual de Florestas. A coleta das amostras vegetais foi realizada em diferentes pontos do fragmento de Mata Atlântica do Parque Estadual do Rio Doce (PERD). Devido ao grande porte dos espécimes vegetais, as folhas foram coletadas com o auxílio de um escalador por meio de um amostrador *Big Shot* e vara de molinete com lançador. As informações dos pontos de coletas encontram-se registrados no **Apêndice A**. Assim que coletados, os vegetais foram armazenados em sacos plásticos, identificados e acondicionados em caixa de isopor resfriada, onde permaneceram até a chegada no Laboratório de Microbiologia Polar & Conexões Tropicais da UFMG para serem processados.

As exsicatas dos vegetais coletados foram depositadas no Herbário BHCB da Universidade Federal de Minas Gerais para confirmação da identificação, os códigos de depósitos das exsicatas (*barcode*) de *S. macrophylla*, *J. princeps* e *L. pisonis* são: BHCB 195682, BHCB 195683 e BHCB 195684, respectivamente. Os indivíduos jovens (mudas) coletados no PERD foram representados por plantas jovens, as quais apresentavam baixa estatura, folhas novas e copa menos alongada quando comparadas as plantas adultas. Foram amostrados 10 mudas dos três vegetais, e, 10 indivíduos adultos de *S. macrophylla*; 2 adultos de *J. princeps* e 1 indivíduo adulto de *L. pisonis*.

5.2 Isolamento dos fungos endofíticos

A partir do processamento das amostras vegetais foram obtidos 372 fungos endofíticos. A distribuição dos isolados fúngicos, de acordo com os tecidos vegetais, esta apresentada na **Tabela 4**. *Swietenia macrophylla* foi a planta alvo com o maior número de exemplares coletados, seguindo de *J. princeps* e *L. pisonis*.

5 **Tabela 4.** Quantificação dos fungos endofíticos obtidos a partir de cada órgão vegetal.

Espécie Vegetal	Estágio de desenvolvimento	Órgão do isolamento	Nº de isolados de fungos endofíticos
<i>Swietenia macrophylla</i>	Adulto	Folhas	76
<i>S. macrophylla</i>	Muda	Folha	117
<i>S. macrophylla</i>	Muda	Raiz axial	8
<i>Joannesia princeps</i>	Adulto	Folha	32
<i>J. princeps</i>	Muda	Folha	87
<i>Lecythis pisonis</i>	Adulto	Folha	12
<i>L. pisonis</i>	Muda	Folha	40

5.2 Atividade biológica antiparasitária e herbicida

Um total de 368 extratos diclorometânicos foi produzido, dos quais 362 foram obtidos a partir do cultivo dos fungos endofíticos e seis a partir das folhas das plantas adultas e das mudas de *L. pisonis*, *J. princeps* e *S. macrophylla*. Todos os extratos produzidos foram submetidos a ensaios de triagem para determinação da atividade antiparasitária e herbicida. A **Tabela 5** exibe a identificação taxonômica e atividade biológica dos fungos bioativos. Dos 10 extratos que apresentaram atividade antiparasitária, apenas sete mantiveram atividade no reteste.

Dos 49 extratos fúngicos avaliados para o potencial herbicida, apenas 12 (24%) mantiveram a atividade após realização dos testes de confirmação de atividade biológica. Um total de 67% do total de fungos que mantiveram atividade herbicida após sucessivos cultivos pertencem ao gênero *Colletotrichum*, seguidos de 17% pertencentes à *Diaporthe* e apenas 8% a *Pyricularia*. Dentre os isolados de *Colletotrichum* analisados, apenas os isolados UFMGCB 17496 e 17485 apresentaram atividade contra *L. sativa*; o restante exibiu atividade seletiva contra *A. schoenoprasum*. Apenas o isolado *Pyricularia* sp. UFMGCB 17499 apresentou atividade herbicida de amplo espectro frente a *L. sativa* e *A. schoenoprasum*.

5 **Tabela 5.** Atividades biológicas e identificação taxonômica dos fungos endofíticos bioativos isolados das plantas *Joannesia princeps*, *Lecythis pisonis* e *Swietenia macrophylla*.

Espécie – Órgão de isolamento	¹ UFMGCB	Top BLAST (GenBank Cód. De Acesso) ^a	Nº de ⁴ pb	Cobertura (%)	Identidade (%)	E value	Táxon proposto (GenBank Cód. De Acesso)	Atividade antiparasitária			Atividade herbicida	
								<i>P. falciparum</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. sativa</i>	<i>A. schoenoprasum</i>
								² IC ₅₀ µg mL ⁻¹ ± desvio padrão médio			³ MIC µg mL ⁻¹ ± desvio padrão médio	
<i>S.macrophylla</i> - raiz axial	18279	<i>Fusarium Keratoplasticum</i> (NR130690) ^a	513	100	99,81	0,0	<i>Fusarium</i> sp. (OM638105)	(5,1± 0,4) ^c				
<i>J. princeps</i> - folha muda	18159	<i>Diaporthe passifloricola</i> (NR147595) ^a	405	99	100	0,0	<i>Diaporthe</i> sp. (ON679673)	(9,0± 2,1) ^b				
<i>S.macrophylla</i> - folha muda	17557	<i>Diaporthe rosae</i> (MG828894) ^a	449	97	100	0,0	<i>Diaporthe</i> sp. (ON679672)	(2,5 ± 0,5) ^c				
<i>S.macrophylla</i> - folha muda	17503	*								(0,03027)		
<i>S.macrophylla</i> - folha muda	17514	<i>Fusarium dlamini</i> (MH862668)	379	100	100	0,0	<i>Fusarium</i> sp. (ON679670)		(4,39 ± 0,06)			
<i>S.macrophylla</i> - folha muda	17511	<i>Colletotrichum feijoicola</i> (NR165581)	437	100	98,63	0,0	<i>Colletotrichum</i> sp. (ON679688)			(0,02547)		
<i>S.macrophylla</i> - folha muda	17544	<i>Diaporthe rosae</i> (MG828894) ^a	454	100	99,56	0,0	<i>Diaporthe</i> sp. (ON679671)	(2,7 ± 0,9) ^b				
<i>S.macrophylla</i> - folha muda	17499	<i>Pyricularia variabilis</i> (AY265333) ^a	365	100	99,73	0,0	<i>Pyricularia</i> sp. (ON679684)				(1000±1,33)	(1000±0,44)
<i>S.macrophylla</i> - folha muda	17515	<i>Colletotrichum feijoicola</i> (NR165581) ^a	403	100	99,26	0,0	<i>Colletotrichum</i> sp. (ON679685)					(1000±0,67)
<i>S.macrophylla</i> - folha muda	17495	<i>Diaporthe schini</i> (NR111861) ^a	432	100	100	0,0	<i>Colletotrichum</i> sp. (ON679686)					(500±0,89)
<i>S.macrophylla</i> - folha muda	17482	<i>Colletotrichum chrysophilum</i> (NR160821) ^a	423	100	100	0,0	<i>Colletotrichum</i> sp. (ON679687)					(1000±0,89)
<i>S.macrophylla</i> - folha muda	17510	<i>Diaporthe schini</i> (NR111861) ^a	456	99	99,12	0,0	<i>Diaporthe</i> sp. (ON679681)					(1000±1,11)
<i>S.macrophylla</i> - folha muda	17496	<i>Colletotrichum feijoicola</i> (NR165581) ^a	474	99	98,31	0,0	<i>Colletotrichum</i> sp. (ON679680)				(1000±0,0)	
<i>J. princeps</i> - folha muda	18126	*										(1000±1,11)
<i>S.macrophylla</i> - folha muda	17485	<i>Colletotrichum karsti</i> (NR144790) ^a	422	100	100	0.0	<i>Colletotrichum</i> sp. (ON679682)				(1000 ±0,67)	
<i>S.macrophylla</i> - folha muda	17500	<i>Colletotrichum karsti</i> (NR144790) ^a	433	100	100	0.0	<i>Colletotrichum</i> sp. (ON679683)					(500±0,44)
Controles												
Controle Positivo Anfotericina B												
Controle Positivo Cloroquina												
Controle Positivo Benzonidazol												
Controle Positivo Glifosato												
								(0,171 ± 0,055)		(0,003843)		
									1		3000	3000

¹UFMGCB: Coleção de micro-organismos e células da Universidade Federal de Minas Gerais; ^a táxon submetido a análise filogenética baseada na região ITS1-5.8S-ITS2 ; substância: tóxica^b; ativa^c ; ²IC₅₀: concentração letal média para inibir e/ou matar 50% da população; ³MIC: concentração inibitória mínima-para inibir o mínimo de três sementes; EX: extrato; pb: pares de base; *não identificado.

5 5.2.1 Micro-fracionamento químico biomonitorado do extrato tripanossomicida do *Fusarium* sp. UFMGCB 17514

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 5** selecionou-se o fungo UFMGCB 17514, o qual foi identificado como *Fusarium* sp. para o microfracionamento químico biomonitorado, com o intuito de caracterizar a substância ativa contra o parasita *T. cruzi*. A partir dos dados dispostos na **Tabela 6**, nota-se que a dose resposta com o extrato bruto indicou valor IC₅₀ de 4,39 µg mL⁻¹ e toxicidade à célula hospedeira apenas na concentração de 36,3 µg mL⁻¹.

O extrato do fungo foi submetido à análise UHPLC-DAD-HRMS/MS (**Figura 5**). O cromatograma exibiu um pico maior no tempo de retenção de 34 min. As frações foram coletadas a cada 0,5 min em uma microplaca de 96 poços. A placa contendo as 78 frações obtidas foi submetida ao ensaio de triagem contra *T. cruzi* nas formas amastigota e tripomastigota e revelou que apenas a fração 69, contendo as substâncias eluídas entre 34 e 34,5 min, foi ativa.

Tabela 6. Atividade tripanonossomicida do extrato do fungo *Fusarium* sp. UFMGCB 17514 e atividade citotóxica contra as células de fibroblasto L929 de camundongo.

Composto/substância testada	Concentração (µg mL ⁻¹)	Atividade (%)		IC ₅₀ e CC ₅₀ (µg mL ⁻¹)		⁴ Índice de Seletividade
		¹ A	¹ T	² (parasita)	³ (L929)	
Extrato fúngico	25	100	100	4,39 ± 0,1	36,3 ± 2,4	8,3
	12,5	100	98			
	6,25	94	95			
	3,12	18	21			
	1,56	0	0			
	0,78	0	0			
⁵ Benzonidazol	3,81 µM	-		3,8 µM	2,381 µM	625

¹Percentual de redução de amastigota (A) e tripomastigota (T); ²Concentração da substância que reduz o crescimento de 50% do parasita (IC₅₀); ³Concentração da substância que induz 50% da morte celular (CC₅₀); ⁴Relação entre CC₅₀ das células hospedeiras e IC₅₀ ao parasita. Os valores IC₅₀ e CC₅₀ foram calculados por interpolação linear; ⁵Controle positivo.

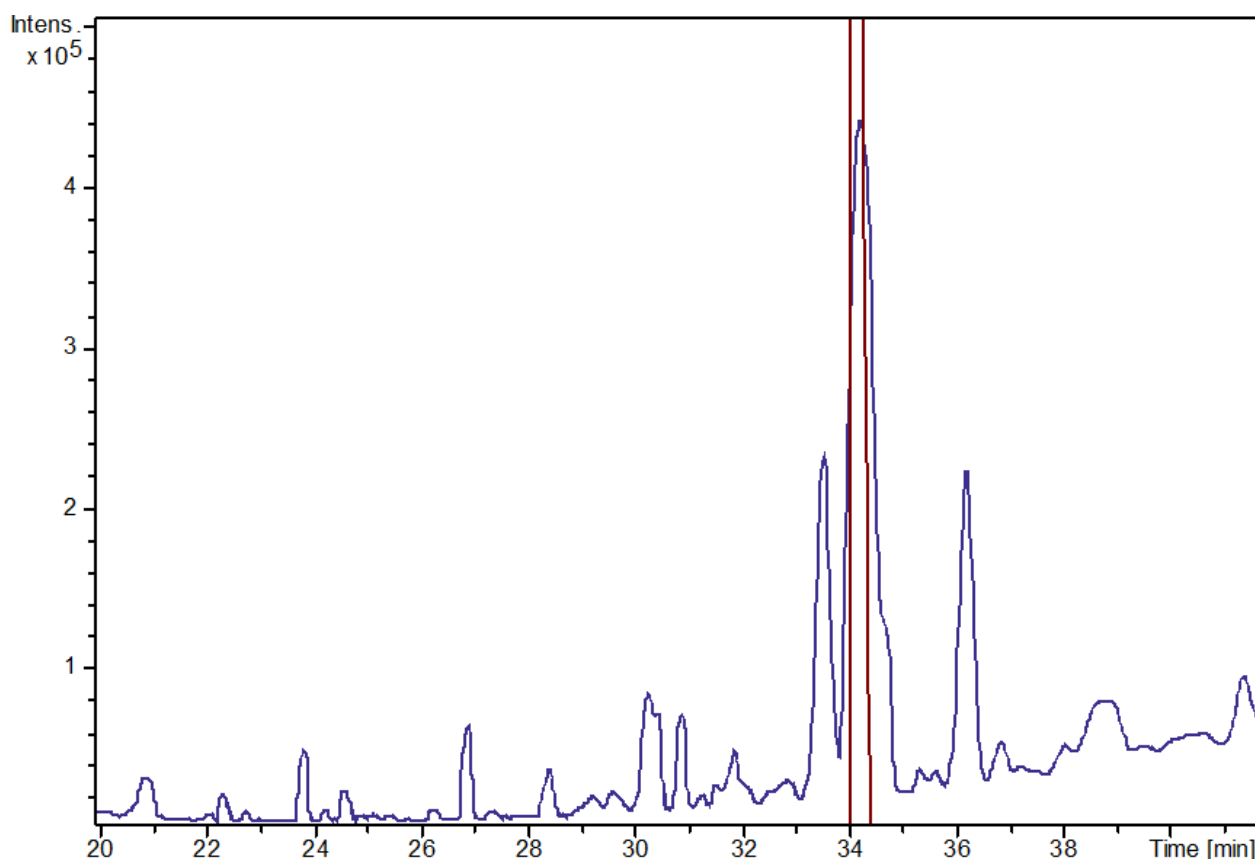


Figura 5. Cromatograma do extrato do *Fusarium* sp. UFMGCB 17514 (20-40 min) com a linha vermelha indicando a fração ativa que eluiu em 34-34,5 min.

A análise dos espectros hrms/ms desta fração mostrou a presença de $[M+2Na]^{2+}$ íons com m/z 414.6925, juntamente com íons correspondentes $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ e $[M+H_2O+H]^+$ com m/z 784.4157 (**Figura 6**). Todos esses íons são consistentes com a substância beuavericina, com $M=783.4093$ e fórmula molecular $C_{45}H_{57}N_3O_9$. Com o objetivo de caracterizar a substância ativa na fração do extrato, compararam-se os espectros HRMS/MS do íon com m/z 784.4157 utilizando o software de instrumento e uma biblioteca interna construída do HRMS/MS, que indicou a correspondência com pontuação alta do espectro experimental com o da beuavericina armazenado na biblioteca. Essa indicação foi avaliada através da co-injeção com um padrão comercial de beuavericina que confirmou a identidade do possível composto bioativo (**Figura 7**). Adicionalmente, testou-se o padrão de beuavericina contra as formas amastigota e tripomastigota de *T. cruzi* e a células hospedeiras representadas pelos de fibroblastos de rato L929 (**Tabela 7**). A substância apresentou alta atividade no ensaio com $IC_{50} = 1,6 \mu M$ e $IS = 7,8$, valores próximos ao do extrato bruto do fungo.

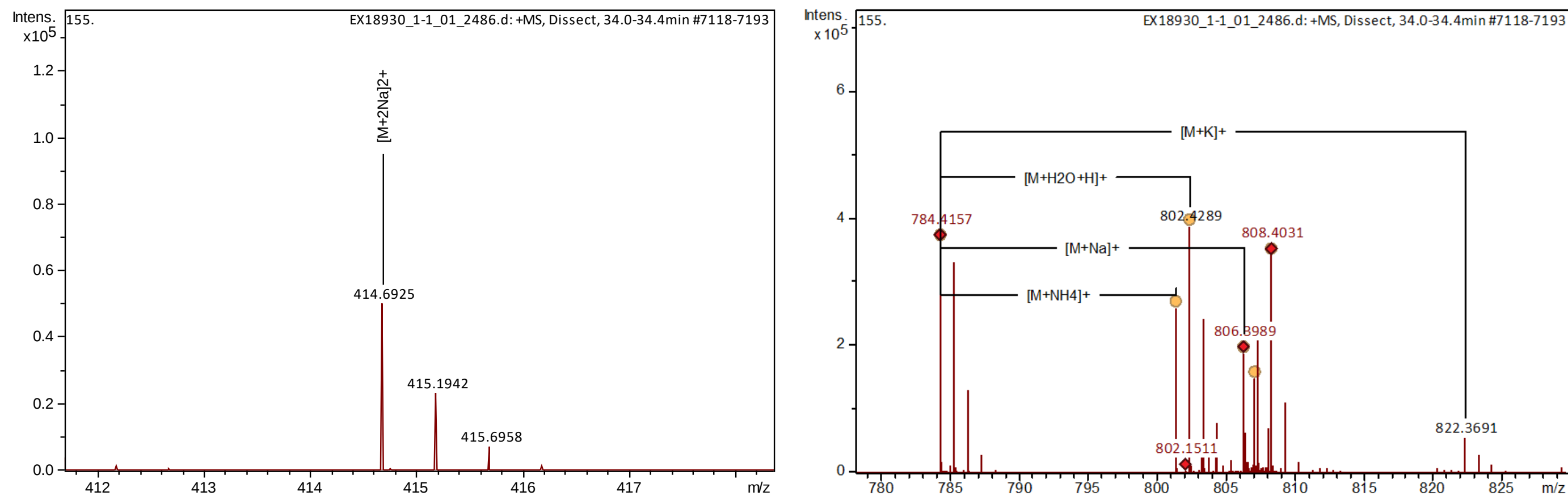


Figura 6. HRMS espectros da fração bioativa 69, eluindo de 34,0 a 34,5 min, mostrando (A) os íons [M+2Na]²⁺ e (B) os íons [M+H]⁺, [M+NH₄]⁺, [M+Na]⁺, [M+K]⁺ e [M+H₂O+H]⁺ compatíveis com a substância com fórmula molecular C₄₅H₅₇N₃O₉.

5

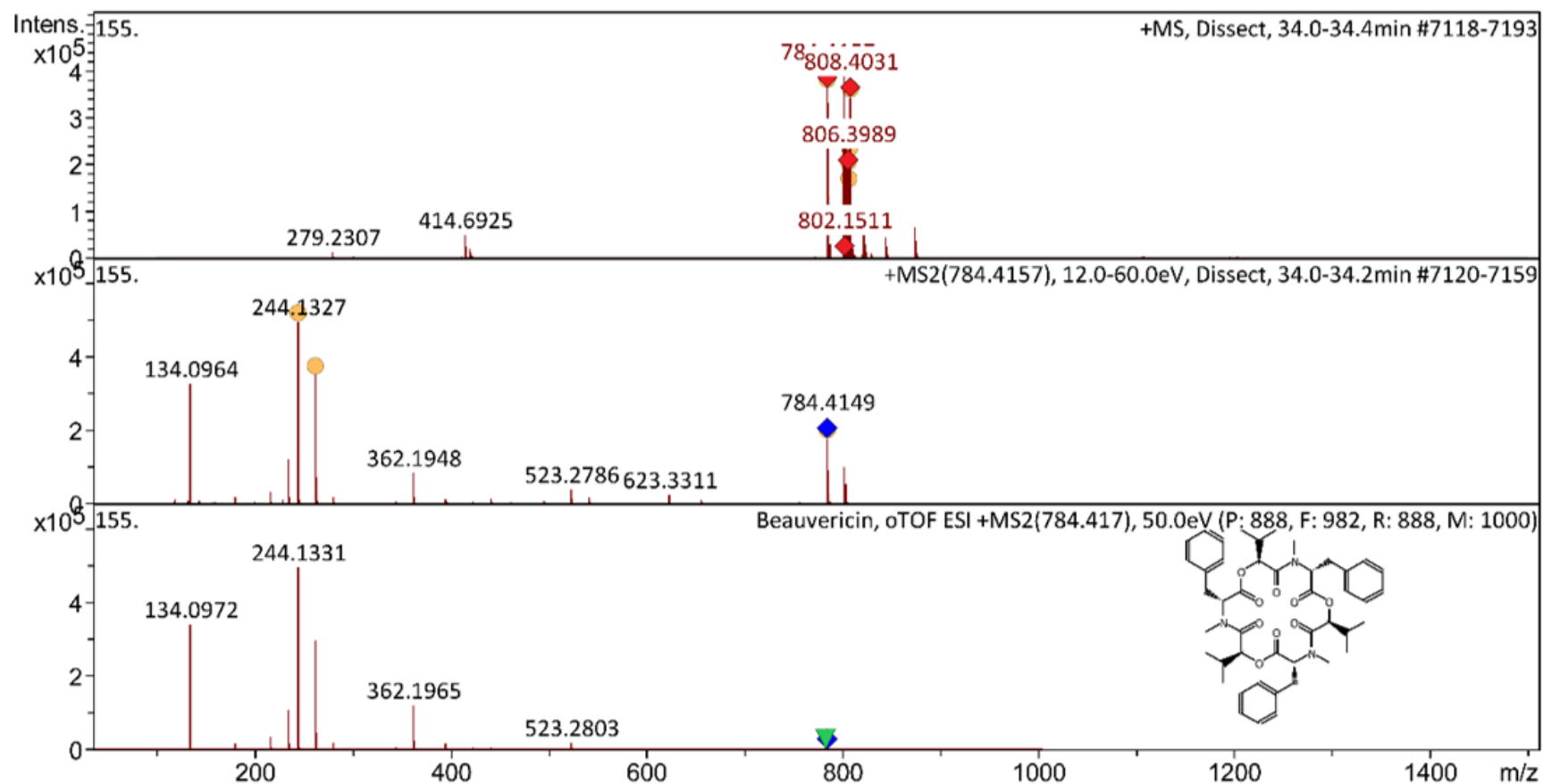


Figura 7. O painel superior mostra o espectro HRMS da fração ativa com os íons identificados na figura anterior. O painel médio corresponde ao espectro de fragmentação HRMS-MS do íon com m/z 784.4157 $[M+H]^+$, o qual pode ser comparado com a fragmentação correspondente da beauvericina padrão (painel inferior).

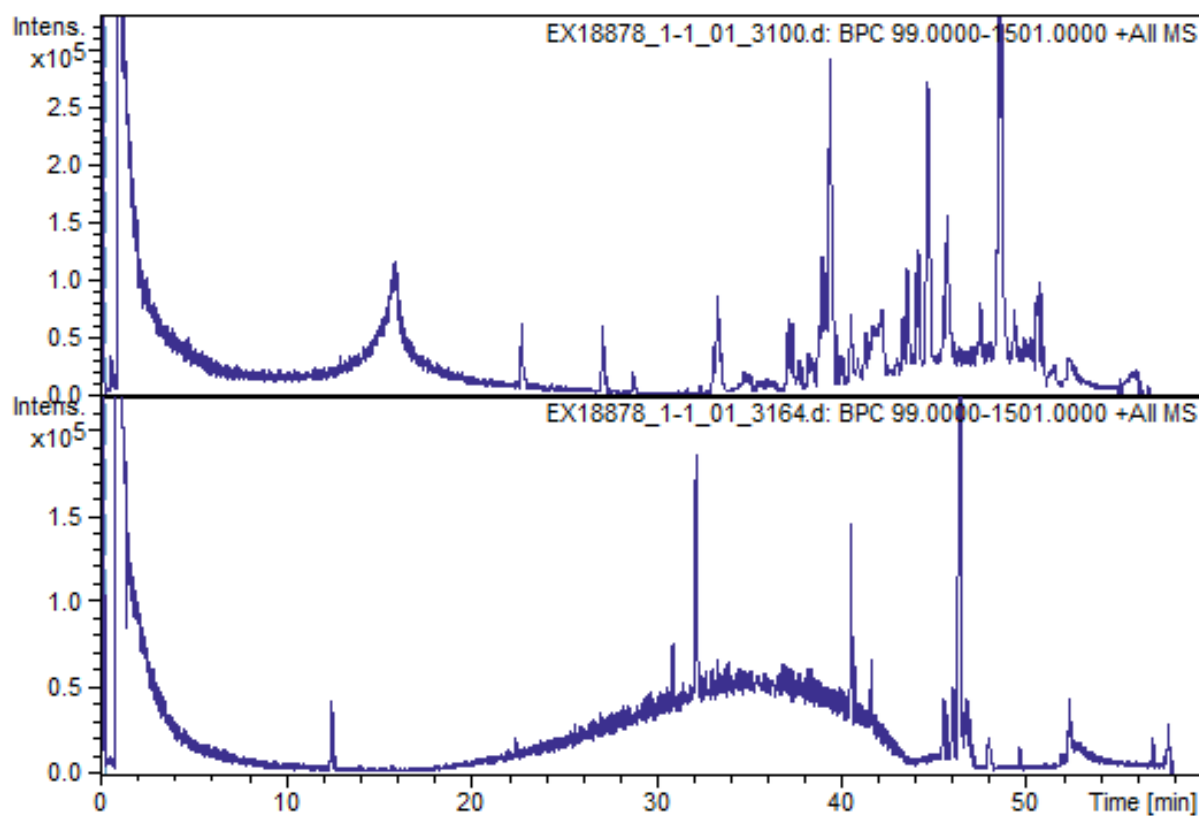
- 5 **Tabela 7.** Atividade tripanossomicida da beauvericina e sua atividade citotóxica contra células de fibroblasto L929 de camundongo.

Substância testada	Concentração (µM)	Atividade (%)		² IC ₅₀ <i>T. cruzi</i> (µM)	³ CC ₅₀ L929 (µM)	⁴ Índice de Seletividade
		¹ A	¹ T			
Beauvericina	16	100	100	1,6 ± 0,1	12,5 ± 1,2	7,8
	8	100	100			
	4	100	100			
	2	87,3	75,8			
	1	0	11,3			
	0,5	0	0			
	0,25	0	0			
	0,12	0	0			
⁵ Benzonidazol	3,81			3,8	2381	625

¹Percentual de redução de amastigota (A) e tripomastigota (T), ²Concentração da substância que reduz o crescimento de 50% do parasita (IC₅₀); ³Concentração da substância que induz 50% da morte celular (CC₅₀); ⁴Relação entre CC₅₀ das células hospedeiras e IC₅₀ ao parasita. Os valores IC₅₀ e CC₅₀ foram calculados por interpolação linear; ⁵Controle positivo.

10 5.2.2 Micro-fracionamento químico biomonitorado do extrato leishmanicida do fungo *Colletotrichum* sp. UFMGCB 17511

O extrato do fungo *Colletotrichum* sp. UFMGCB 17511 foi submetido à análise UHPLC-DAD-HRMS/MS e o cromatograma apresentou picos maiores entre os tempos de retenção de 38 a 48 min. As frações foram coletadas a cada 0,5 min em uma microplaca de 96 poços contendo os parasitas na forma *Leishmania-like*, onde o bioensaio revelou que apenas a fração 76 foi ativa com 37% de inibição frente ao parasita. Contudo, o extrato bruto do fungo exibiu 80% de inibição do parasita na maior concentração testada. Na **Figura 8** é apresentado o cromatograma da fração bruta e na **Figura 9** o painel de maior pico ativo. Os resultados relativos às concentrações de extrato e respectivas porcentagens de inibição contra *L. amazonensis* são exibidos na **Tabela 8**. A elucidação da substância ativa presente no poço 76 foi realizada a partir de análises putativas *in silico* dos dados obtidos a partir do micro-fracionamento utilizando o *Software* Sirius CSI-FingerID. As análises químicas revelaram que a atividade leishmanicida esta relacionada a uma mistura de dois lipídeos da classe das glicerofosfolinas e subclasse diacilglicerofostatidilcolinas (**Figura 10**). Entretanto, a espectrometria de massas não distingue a localização nem a estereoquímica das duplas ligações, podendo variar entre as seguintes conformações: C₄₂H₈₀NO₈P, C₄₂H₈₀NO₈P e C₄₂H₈₀NO₈P.



5

Figura 8. Cromatograma do extrato do fungo *Colletotrichum* sp. UFMGCB 17511 (0-60 min) na fração ativa, que eluiu entre 38 e 48 min.

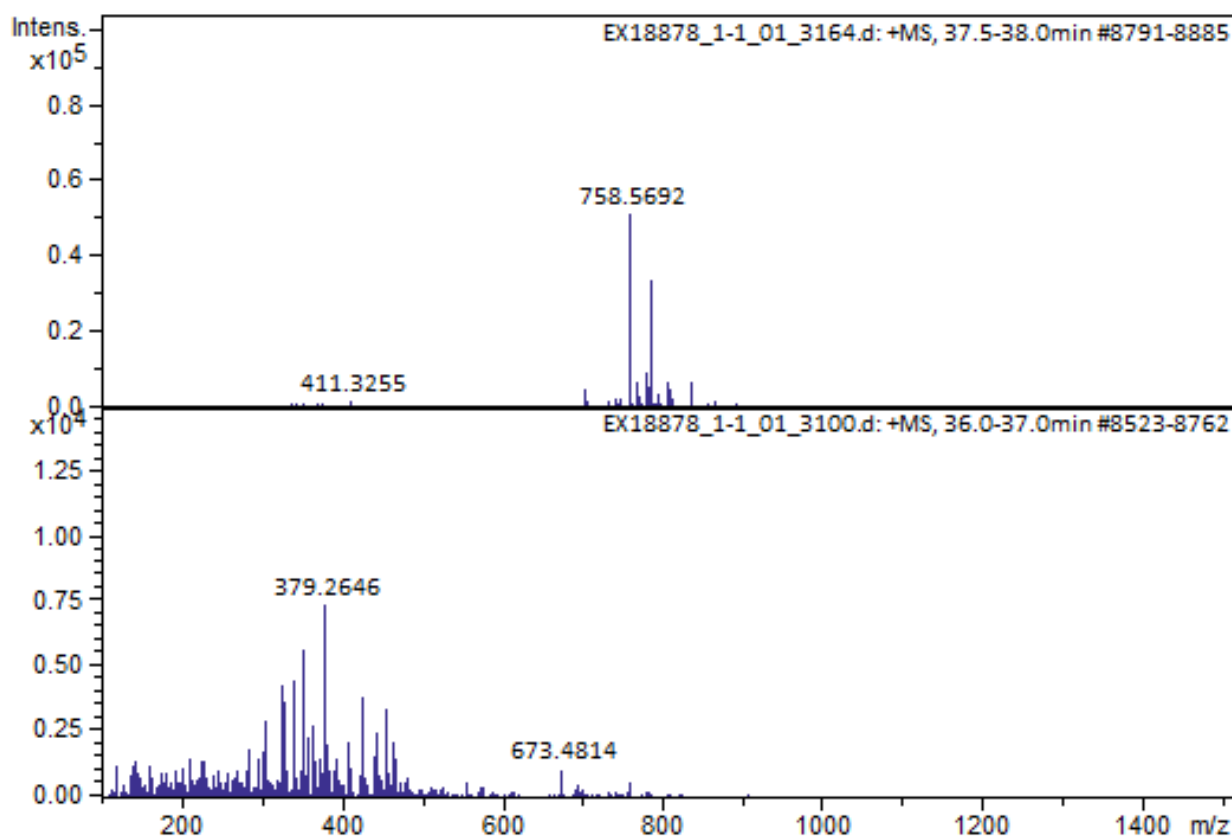


Figura 9. Espectro HRMS da fração ativa do extrato do fungo *Colletotrichum* sp. UFMGCB 17511.

5

Tabela 8. Atividade leishmanicida do extrato do fungo *Colletotrichum* sp. UFMGCB 17511.

Composto/ Substância testada	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Atividade (%)	$^2\text{IC}_{50}$ <i>L. amazonensis</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Extrato fúngico	100	80	0,02547
	50	71,50	
	25	59,50	
	12,5	39,50	
	6,25	30	
	3,12	27,50	
	1,56	12	
^1AMB	0,2	79	

1 Amphotericina B, controle positivo. 2 Concentração da substância que reduz o crescimento de 50% do parasita (IC_{50}).

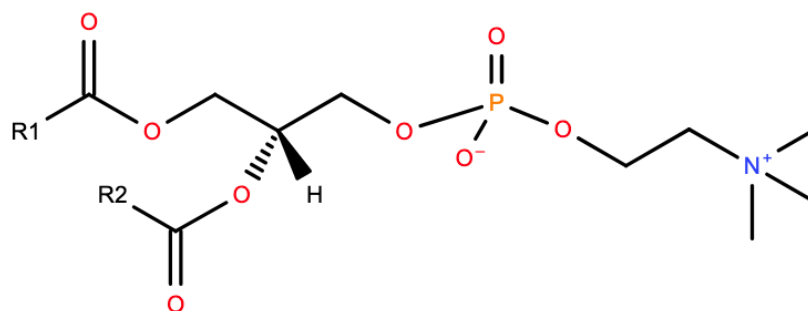


Figura 10. Estrutura molecular de diacilglicerofostatidilcolinas.

5.2.3 Micro-fracionamento químico biomonitorado do extrato antimalárico do fungo *Fusarium* sp. UFMGCB 18279

Os resultados do ensaio com o extrato bruto pe apresentado na (**Tabela 9**). Posteriormente ao ensaio, o extrato do fungo *Fusarium* sp. UFMGCB 18279 foi submetido à análise UHPLC-DAD-HRMS/MS e suas parcelas coletadas a cada 0,5 min totalizando 78 frações, as quais foram coletadas em uma microplaca de 96 poços. As frações foram avaliadas quanto a inibição do parasita *P. falciparum*. Os resultados revelaram que apenas a fração 76 (37,5-38 min) (**Figura 11**) foi a mais ativa com 65% de inibição ao parasita. As análises realizadas na Plataforma *Sirius CSI-Figer ID* para análise putativa da estrutura molecular ativa revelaram que a substância majoritária correspondente ao pico aos 37, 8 min e com m/z 1202,8469 (

Figura 12) identificado como ciclosporina ($C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$) m/z diff -1,72 mDa) (**Figura 13**).

Tabela 9. Atividade antiplasmodial do extrato do fungo *Fusarium* sp. UFMGCB 18279 e atividade citotóxica contra as células BGM de rim de macaco.

Composto/ Substância testada	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Atividade %	² IC ₅₀ <i>P.</i> <i>falciparum</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	³ CC ₅₀ BGM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	⁴ Índice de Seletividade
Extrato fúngico	50	94,60	5,1 ± 0,40	141,20 ± 13,60	28
	25	91,58			
	12,50	84,02			
	62,50	53,45			
	3,13	45,18			
	1,56	17,40			
	0,78	9,17			
¹ Cloroquina			0,171 ± 0,055		

- 5 ¹Controle positivo; ²Concentração da substância que reduz o crescimento de 50% do parasita (IC₅₀); ³Concentração da substância que induz 50% da morte celular (CC₅₀); ⁴Relação entre CC₅₀ das células hospedeiras e IC₅₀ ao parasita. Os valores IC₅₀ e CC₅₀ foram calculados por interpolação linear.

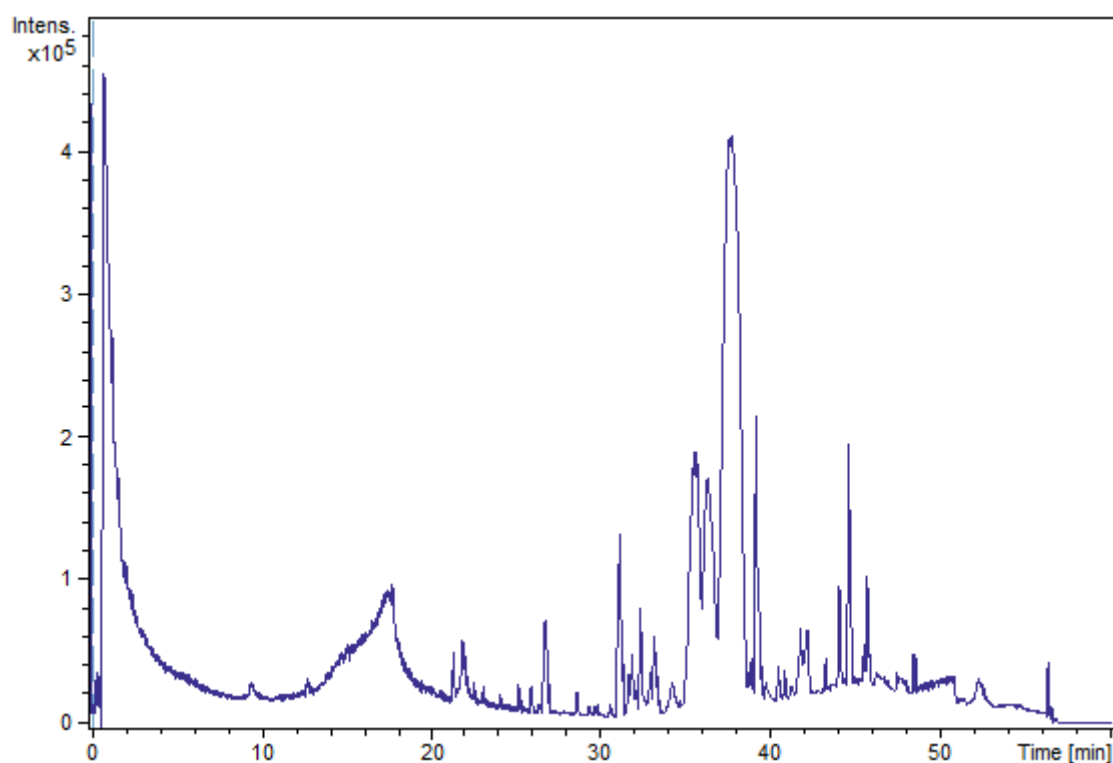


Figura 11. Cromatograma do extrato do fungo *Fusarium* sp. UFMGCB 18279.

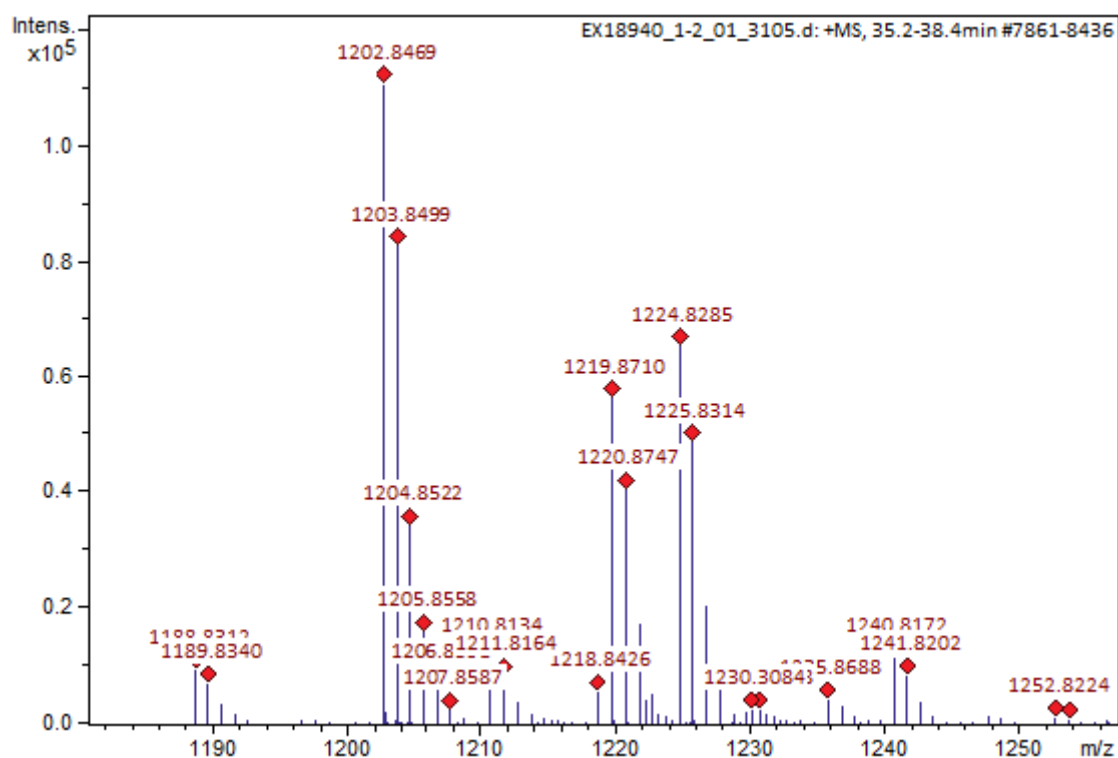
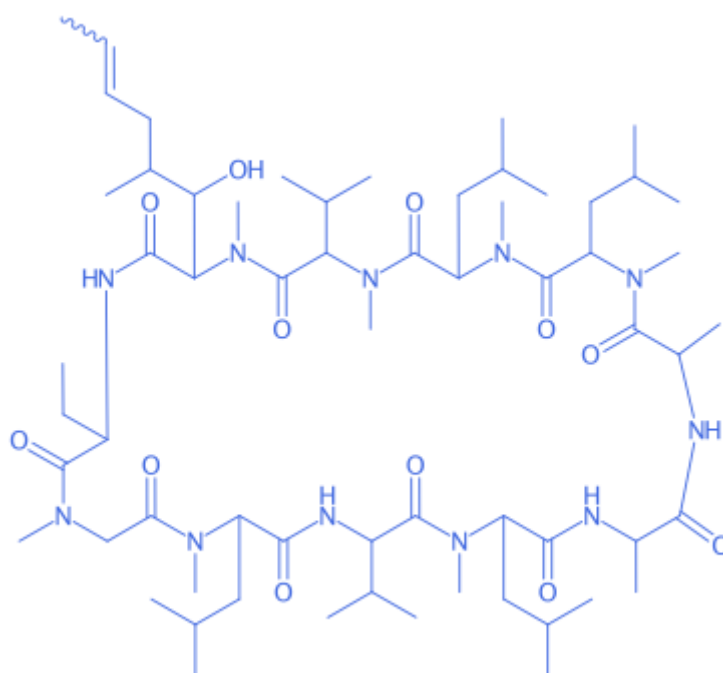


Figura 12. Espectro HRMS da fração ativa do extrato do fungo *Fusarium* sp. UFMGCB 18279.



10

10

15

5 **Tabela 10.** Parâmetros físico-químicos do solo vegetal autoclavado e não autoclavado para utilização em experimento de para cultivo de *Phaseolus vulgaris* e *Glycine max*.

Amostra	pH	P	K	Na	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	MO	P-rem	Zn	Fe	Mn	Cu
	H ₂ O		Mg/dm ³			dcmol dm ³			°Dag kg ⁻¹	Mg L ⁻¹			Mg dm ³⁻¹	
^a C1	5,8	75,5	560	56	3,00	1,40	0	8,25	7,25	27,1	5,9	113,8	21,8	2,2
^a C2	5,8	64,5	580	57	3,01	1,40	0	8,58	7,93	27,1	5,0	83,6	19,0	1,9
^a C3	5,7	64,5	650	63	3,33	1,47	0	8,91	9,27	24,1	5,4	98,3	28,1	2,6
^b AU1	5,6	72,7	610	61	3,59	1,54	0	8,25	8,33	31,6	5,7	144,7	29,6	0,4
^b AU2	5,6	75,5	590	59	3,21	1,45	0	8,25	8,87	33,8	5,9	152,6	29,5	0,5
^b AU3	5,5	81,2	600	58	3,28	1,47	0	7,26	8,06	33,8	6,0	172,2	30,0	0,4
^c Valor de P	0,013	0,13	0,91	0,79	0,19	0,15		0,18	0,70	0,004	0,255	0,008	0,129	0,012

^a C1 – Controle replicata 1, C2 – controle replicata 2, C3- controle replicata 3; ^bAU1- Solo autoclavado replicata 1, ^bAU2- Solo autoclavado replicata 2, ^bAU3- Solo autoclavado replicata 3; ^cValor de P: considerando α : 0,05. ^d cmol: centimol de carga, ^e dag: decagrama

5 **5.4 Avaliação da ação dos fungos endofíticos da raiz de *Swietenia macrophylla* sobre fisiologia de plântulas de *Phaseolus vulgaris* (feijão) e *Glycine max* (soja)**

Com o intuito de verificar a influência dos fungos provenientes da raiz da planta *S. macrophylla* (**Tabela 11**) sobre plântulas de interesse agrônômico determinou-se o peso seco, comprimento das raízes e dos caules das espécies vegetais *G. max* e *P. vulgaris* após alcançarem a fenologia vegetativa de duas folhas (V2). Os resultados obtidos no experimento são apresentados na **Tabela 12**. Na **Figura 15**, **Figura 16** e **Figura 17** são apresentados os gráficos do tipo *box plot*, com a tendência central e a variabilidade do conjunto de dados. Os gráficos identificaram a mediana como linha central, os registros máximo e mínimo e os quartis inferior (percentil 25%) e superior (percentil 75%). Constatase ainda, que os parâmetros comprimento do caule e raiz foram as variáveis que apresentaram maior amplitude de variação dos dados.

Para verificar se o efeito sobre os vegetais inoculados é estatisticamente significativo em relação ao grupo controle, realizou-se o teste estatístico T de duas matrizes, considerando a distribuição heteroscedática, os resultados são apresentados no **Apêndice B**. Para identificação molecular dos fungos estudados, foram utilizadas as sequências obtidas a partir da região transcrita interna ITS-5.8S da região do gene do rRNA. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências de espécies tipo depositadas no *GenBank* (**Tabela 11**). Na **Figura 14** são exibidas as sementes de *P. vulgaris* que não germinaram sob efeitos dos fungos inoculados.

5 **Tabela 11.** Identificação taxonômica dos fungos endofíticos obtidos da raiz da planta *Swietenia macrophylla*.

UFMGCB ¹	Top BLAST (código GenBank)	Nº pb	Cobertura (%)	Identidade (%)	Táxon proposto (código GenBank código)
18289	<i>Fusarium falciforme</i> (NR164424) ^a	516	100	99,18	<i>Fusarium</i> sp. (ON679678)
18293	<i>Talaromyces flavus</i> (MH855968) ^a	353	100	100	<i>Talaromyces</i> sp. (ON679679)
18288	<i>D. vitis</i> (MH865179) ^a	494	100	99,80	<i>Dactylonectria</i> sp. (ON679677)
18285	<i>D. vitis</i> (MH865179) ^a	496	100	99,80	<i>Dactylonectria</i> sp. (ON679676)
18283	<i>D. vitis</i> (MH865179) ^a	492	100	99,80	<i>Dactylonectria</i> sp. (ON679675)
18290	*				
18279	<i>Fusarium keratoplasticum</i> (NR130690) ^a	513	100	99,81	<i>Fusarium</i> sp. (OM638105)
18278	<i>Coprinellus magnoliae</i> (NR172438) ^a	509	100	92,8	<i>Coprinellus</i> sp. (ON679674)

¹UFMGCB: Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais; ^a Táxon submetido a análise filogenética baseada na região ITS1-5.8S-ITS2; *: sem identificação; pb: Pares de base.

5 **Tabela 12.** Ensaio biológico agrônômico envolvendo inoculação dos fungos provenientes da raiz de *Swietenia macrophylla* em sementes de *Glycine max* e *Phaseolus vulgaris*.

¹UFMGCB	ªFungo	Glycine max				Phaseolus vulgaris			
		Média do Comprimento – mm (desvio médio)			Média do peso g (desvio médio)	Média do Comprimento – mm (desvio médio)			Média do Peso g (desvio médio)
		Caule	Raiz	Total	Total	Caule	Raiz	Total	Total
18289	Fusarium sp.	-	-	-	-	-	-	-	-
18293	Talaromyces sp.	93,295 (6,065)	143,61 (8,6)	123,48	1,13 (0,051)	111,59 (14,40)	130,42 (13,45)	122,395	1,44 (0,31)
18288	Dactylonectria sp.	59,30 (20)	88,24 (52,40)	73,77	0,69 (0,18)	71,15 (25,80)	92,01 (19,23)	81,58	0,770 (0,22)
18285	Dactylonectria sp.	62,74 (31,19)	84,58 (49,45)	73,66	1,09 (0,37)	-	-	-	-
18283	Dactylonectria sp.	111,59 (14,40)	130,42 (13,45)	122,39	1,067 (0,22)	146,60 (7,7)	128,49 (13,23)	137,54	1,37 (0,088)
18290	*	-	-	-	-	-	-	-	-
18279	Fusarium sp.	-	-	-	-	-	-	-	-
18278	Coprinellus sp.	152,17 (25,44)	104,29 (24,13)	118,055	1,23 (0,19)	3	104,29 (24,13)	118,05	1,04 (0,24)
Controles		191,44 (47,34)	162,19 (29,39)	176,82	1,05 (0,07)	133,21 (8,34)	149,83 (15,25)	141,52	1,21 (0,02)

¹UFMGCB: Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais; ^a Táxon submetido a análise filogenética baseada na região ITS1-5.8S-ITS2; (*) Não identificado, +: sem caule; -: não germinou.

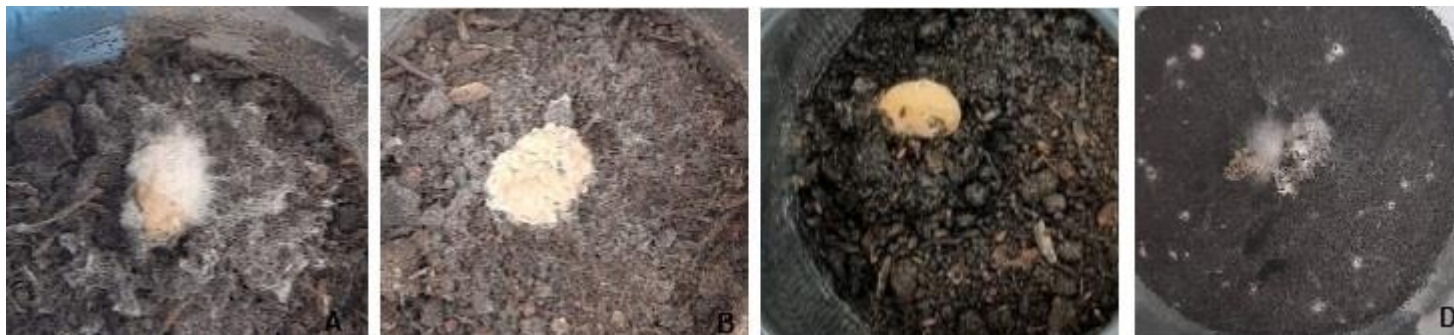
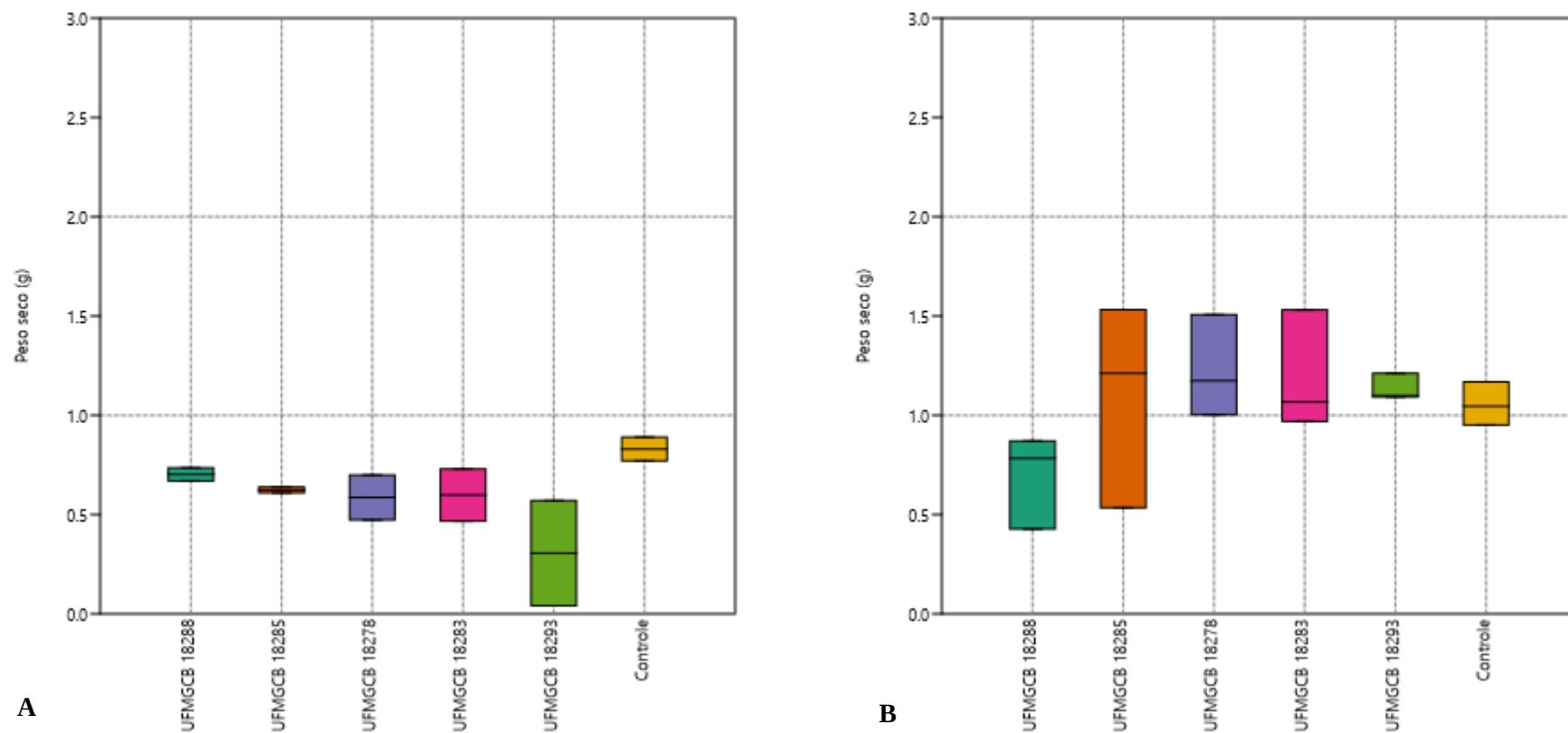
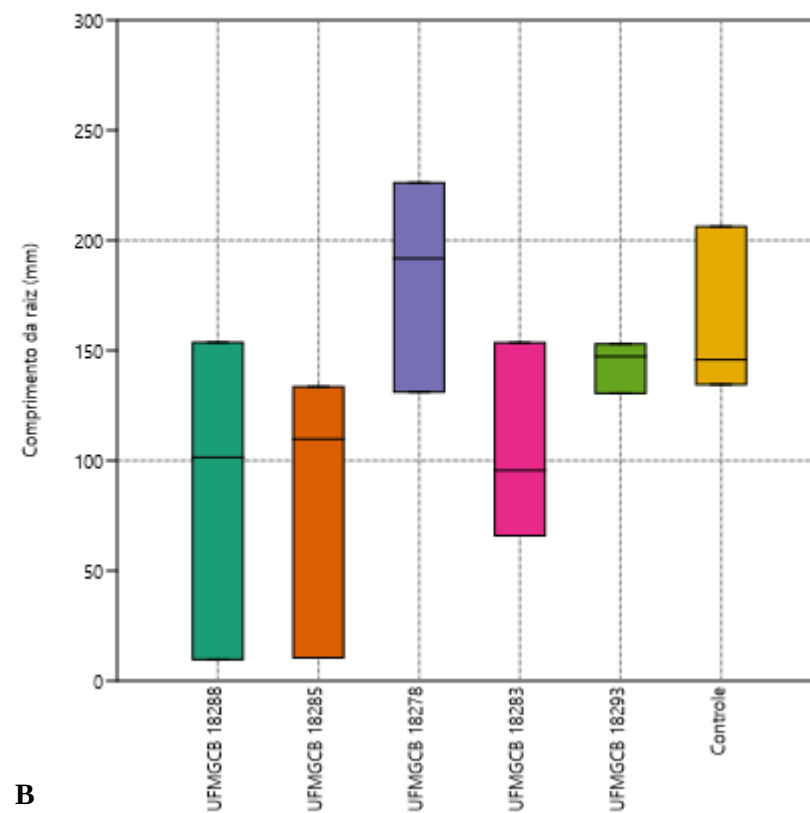
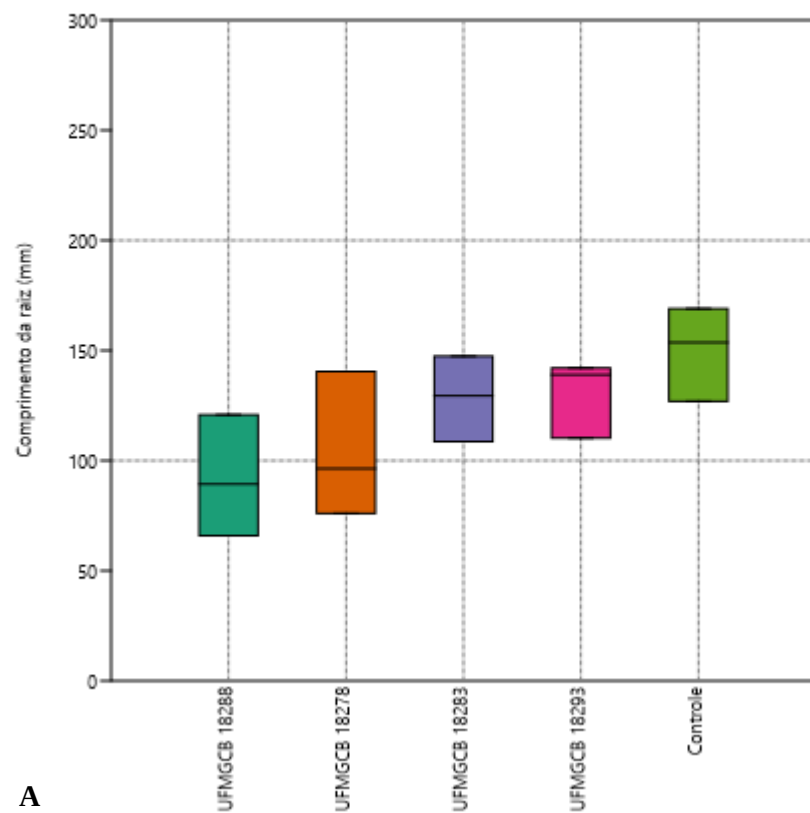


Figura 14. Sementes de *Phaseolus vulgaris* que não germinaram no solo vegetal autoclavado. (A) *Fusarium* sp. UFMGCB 18279, (B) *Dactylonectria* sp. UFMGCB 18285, (C) UFMGCB 18290 e (D) *Fusarium* sp. UFMGCB 18289.



5 **Figura 15.** Avaliação do peso seco de *Phaseolus vulgaris* (A) e *Glycine max* (B) submetidas a inoculação de fungos provenientes da raiz de *Swietenia macrophylla*.



5 **Figura 16.** Avaliação do comprimento da raiz de *Phaseolus vulgaris* (A) e *Glycine max* (B) submetidas a inoculação de fungos provenientes da raiz de *Swietenia macrophylla*.

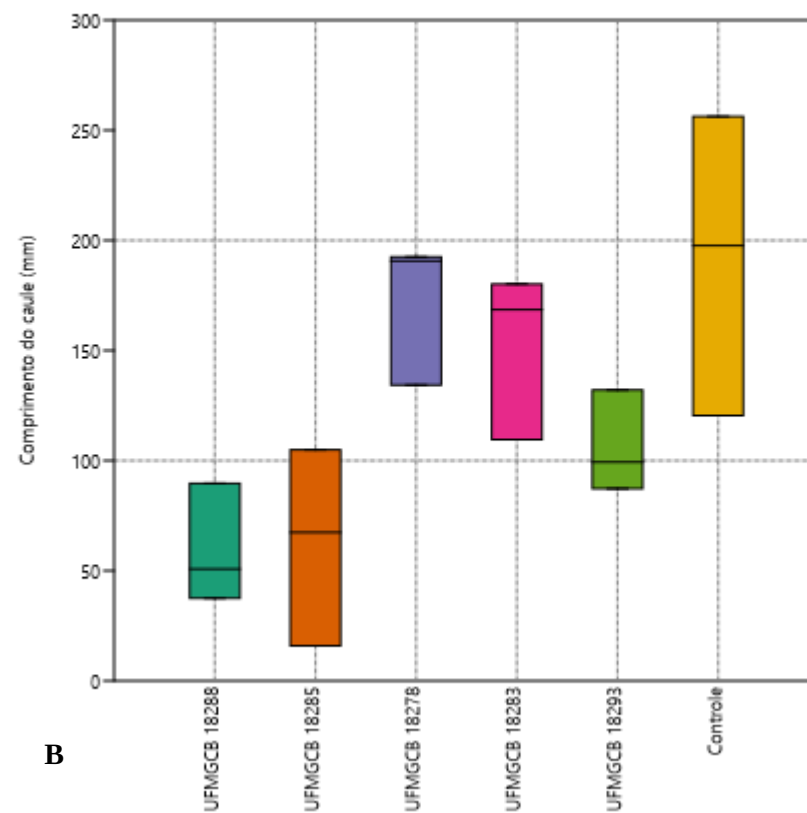
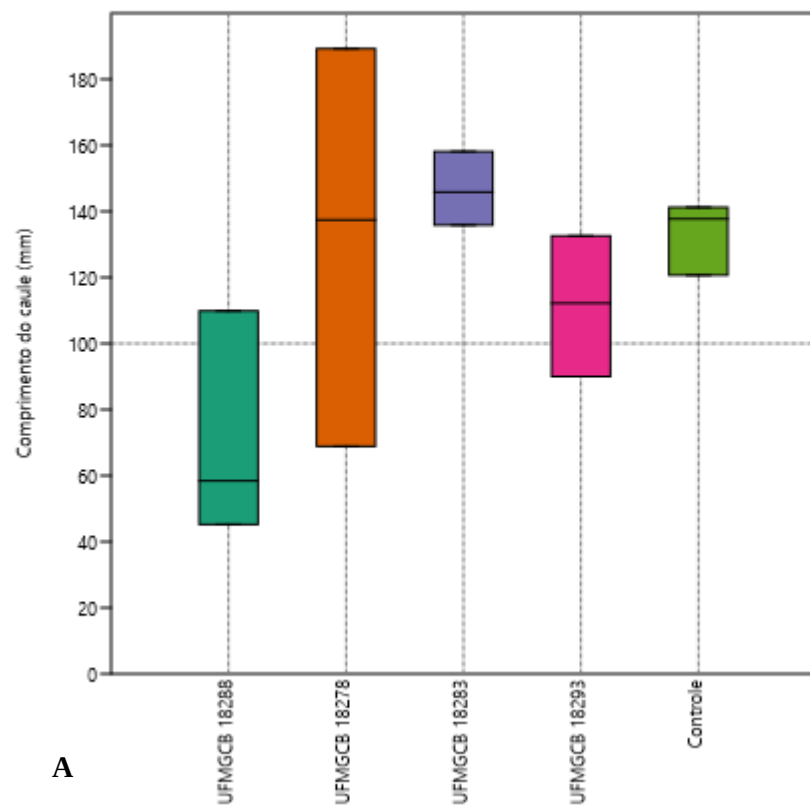


Figura 17. Avaliação comprimento do caule de *Phaseolus vulgaris* (A) e *Glycine max* (B) submetidas a inoculação de fungos provenientes da raiz de *Swietenia macrophylla*.

5 5.4.1 Recuperação dos fungos filamentosos inoculados nas plântulas de *Phaseolus vulgaris* (feijão)

Com o intuito de comprovar que os fungos inoculados nas plântulas foram os que geraram efeitos sobre elas, e, evidenciar que a metodologia de infecção utilizada foi eficaz, realizou-se o isolamento (recuperação) dos fungos a partir das plântulas do feijoeiro infectados previamente com os fungos. Os órgãos vegetais foram previamente desinfestados e foi realizado o isolamento do fungo. Posteriormente foi efetuado a extração de DNA, seguida do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2. A identificação obtida é apresentada na **Tabela 13**.

Tabela 13. Identificação dos fungos recuperados das plântulas de *Phaseolus vulgaris* após inoculação em suas sementes.

¹ UFMGCB	Top BLAST (código GenBank)	Nº pb	Cobertura (%)	Identidade (%)	Táxon proposto (código GenBank)
18283	<i>Dactylonectria vitis</i> (MH865179)	443	99	98.65	<i>Dactylonectria</i> sp. (ON679690)
18288	<i>D. vitis</i> (MH865179)	419	100	99.29	<i>Dactylonectria</i> sp. (ON679691)
18289	<i>Fusarium falciforme</i> (MH859035)	448	97	100	<i>Fusarium</i> sp. (ON679692)

¹UFMGCB: Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais; ^a Táxon submetido a análise filogenética baseada na região ITS1-5.8S-ITS2; pb: pares de base.

5.5 Avaliação do efeito da inoculação de meio líquido fermentado produzido por fungos endofíticos da raiz de *Swietenia macrophylla* sobre *Glycine max* (soja) e *Phaseolus vulgaris* (feijão)

Com o intuito de verificar os efeitos do meio líquido fermentado contendo auxina produzida pelos fungos da raiz de *S. macrophylla* sobre as plântulas de interesse agrônômico, avaliou-se o peso seco, comprimento das raízes e dos caules das plântulas de *G. max* e *P. vulgaris* após alcançarem a fenologia vegetativa de duas folhas (V2). As métricas obtidas no experimento são apresentadas na **Tabela 14** Na **Figura 18**, **Figura 19** e **Figura 20** são apresentados os gráficos do tipo *box plot* com a tendência central e a variabilidade do conjunto de dados. Os gráficos identificaram por conjunto de dados a mediana, os registros máximo e mínimo e os quartis inferior (percentil 25%) e superior (percentil 75%). Verifica-se que o peso seco e comprimento do caule de *P. vulgaris* foram as variáveis que mais apresentaram amplitude de variação diante do conjunto de dados. O efeito sobre os vegetais inoculados foi estatisticamente avaliado com o teste estatístico T (**Apêndice C**).

5 A curva de calibração para detecção de possíveis auxinas produzidas pelos fungos foi realizada a partir da variação da concentração do hormônio de 1,562 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (**Apêndice D**). A curva foi preparada utilizando água destilada e o meio de cultura utilizado para crescimento fúngico e ambos apresentaram o mesmo coeficiente de determinação. A coloração amarelo-alaranjada que se revelou na solução após a adição de Salkowski é um indicativo da presença de auxina no meio, confirmando a

10 eficácia do método escolhido. Também foi produzida componente principal para cada espécie de plântula (**Figura 21 e Figura 22**).

- 5 **Tabela 14.** Ensaios biológicos agrônômicos envolvendo inoculação de meio líquido fermentado contendo auxina nas sementes de *Phaseolus vulgaris* e *Glycine max*.

Fungo	UFMGCB ¹	Glycine max (soja)				Phaseolus vulgaris (feijão)				Auxina (µg mL ⁻¹)
		Média do Comprimento mm (desvio médio padrão)			Média do Peso g (desvio médio padrão)	Média do Comprimento mm (desvio médio padrão)			Média do peso g (desvio médio padrão)	
		Caule	Raiz	Total	Total	Caule	Raiz	Total	Total	
Fusarium sp.	18289	-	-	-	-	135,78 (27)	168,9 (22,03)	152,34	1,73 (0,32)	23,11
Talaromyces sp.	18293	30,1 (5)	+	+	0,31 (0,26)	113,48 (14,68)	125,29 (31)	119,38	0,42 (0,09)	16,96
Dactylonectria sp.	18288	28,2 (17,9)	156 (22)	92,046	0,702 (0,03)	10,24 (0)	155,93 (21,71)	107,37	0,6555 (0,07)	18,44
Dactylonectria sp.	18285	29,06 (11,21)	90,8 (34,8)	60	0,60 (0,03)	84,11 (14,26)	189,51 (41,9)	136,81	1,25 (0,40)	15,8
Dactylonectria sp.	18283	22,17 (1,55)	149,19 (61)	56	0,60 (0,13)	100,64 (12,8)	147,01 (29,05)	123,82	2,24 (0,24)	17,2
*	18290	-	-	-	-	140,8 (6,8)	93,24 (3,92)	117,02	1,36 (0,36)	25,02
Fusarium sp.	18279	-	-	-	-	142 (23,63)	84 (12)	113	1,98 (0,49)	14,3
Coprinellus sp.	18278	18 (2,25)	75,4 (38,25)	47	0,6 (0,11)	111,70 (3,52)	110 (15,5)	110,8	1,59 (0,38)	15,52
Controles		45 (10,7)	134 (10,7)	92,2	0,70 (0,05)	122,85 (10,81)	148,96 (6,28)	135,91	1,78 (0,31)	

¹UFMGCB: Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais;^a Táxon submetido a análise filogenética baseada na região ITS1-5.8S-ITS2;

(*) Não identificado, +: sem caule; -: não germinou.

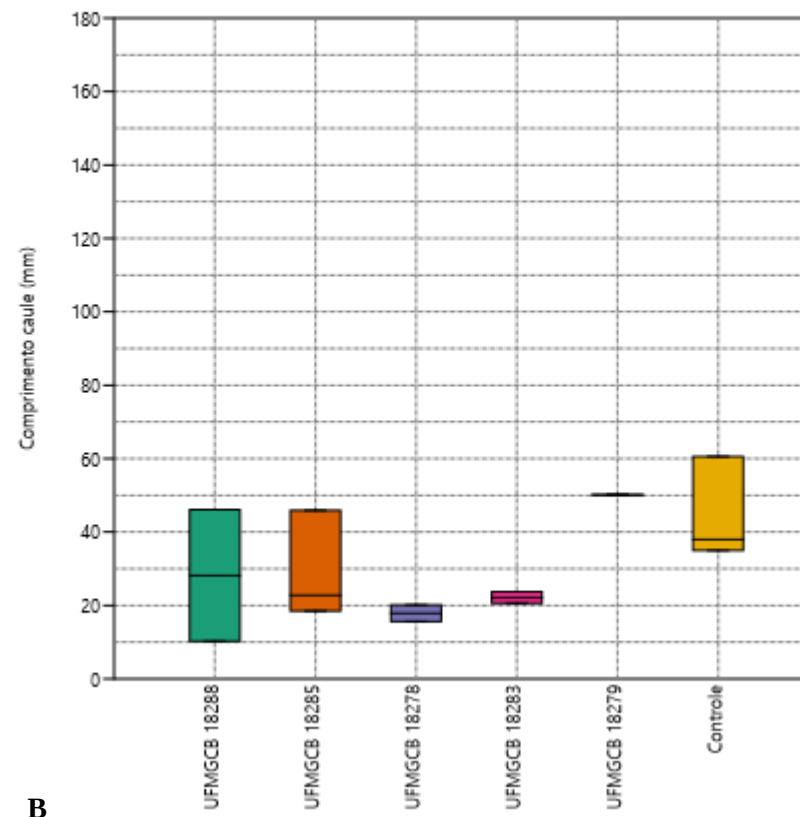
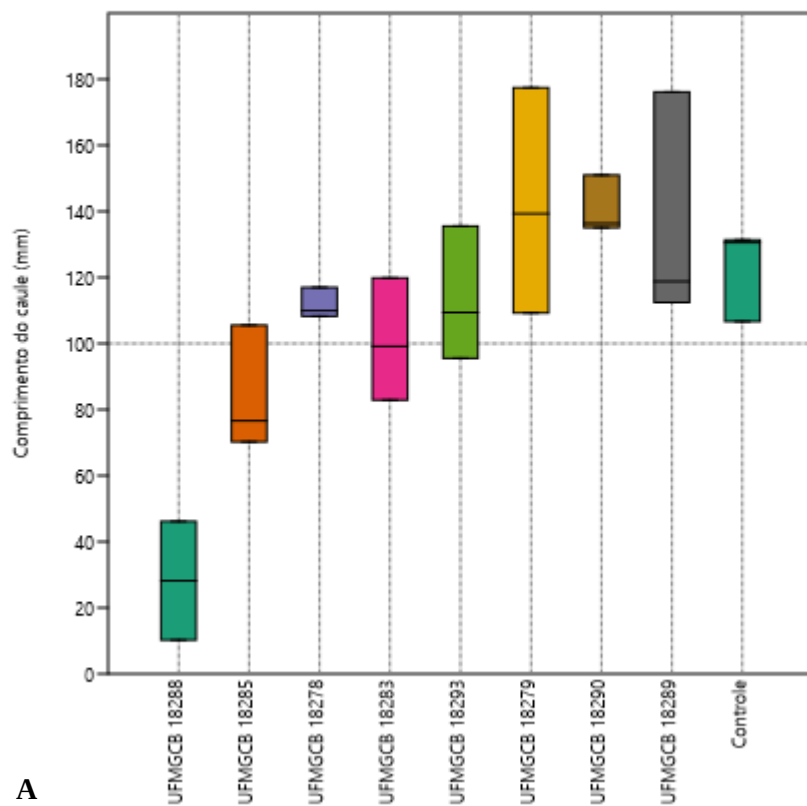
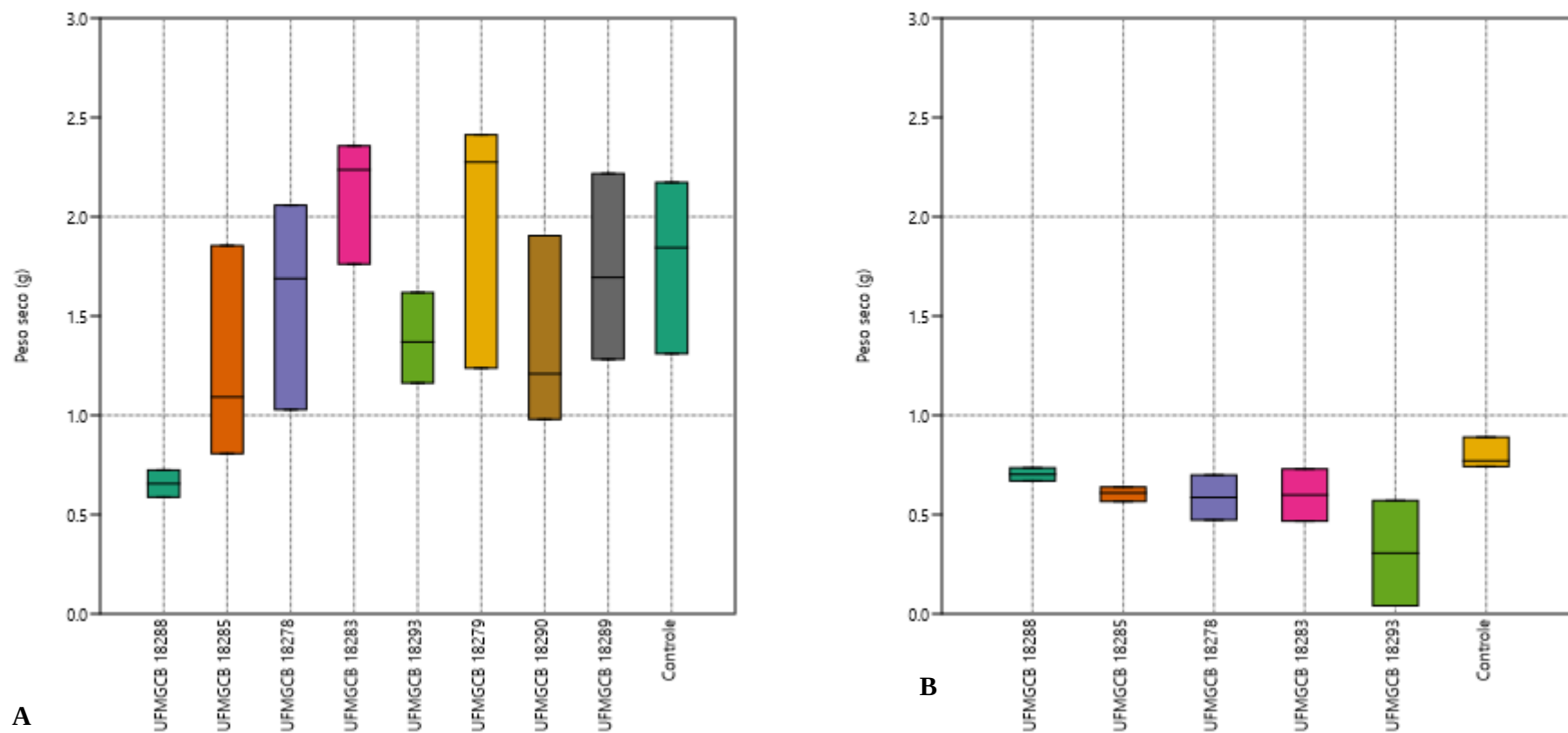
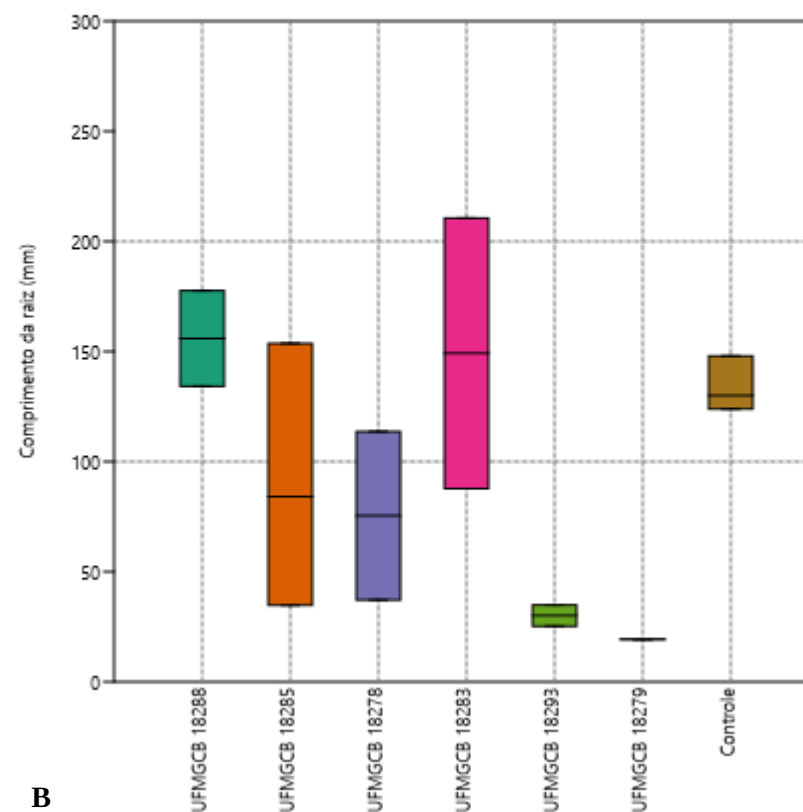
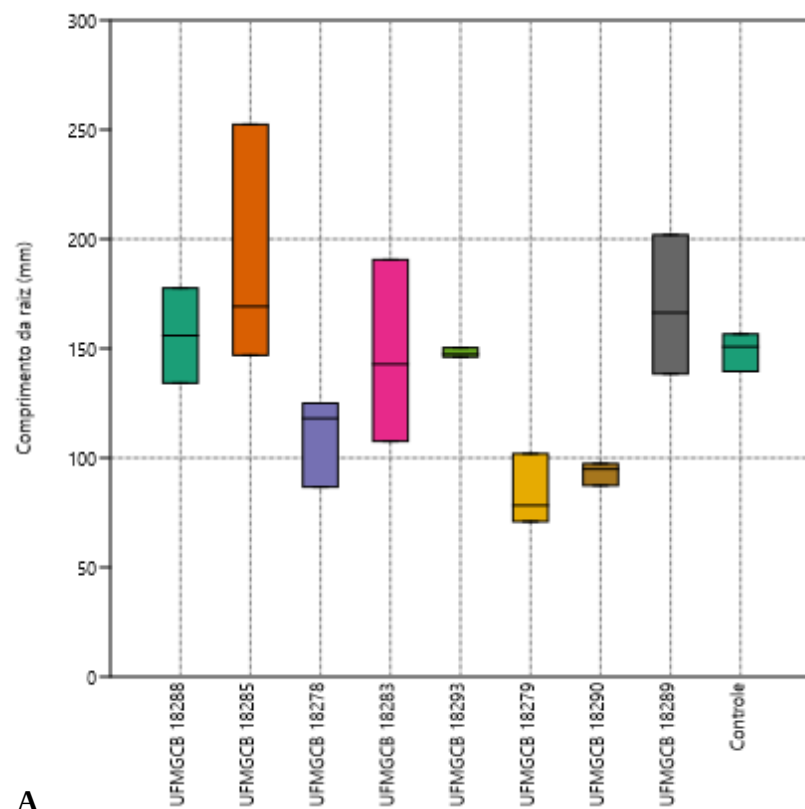


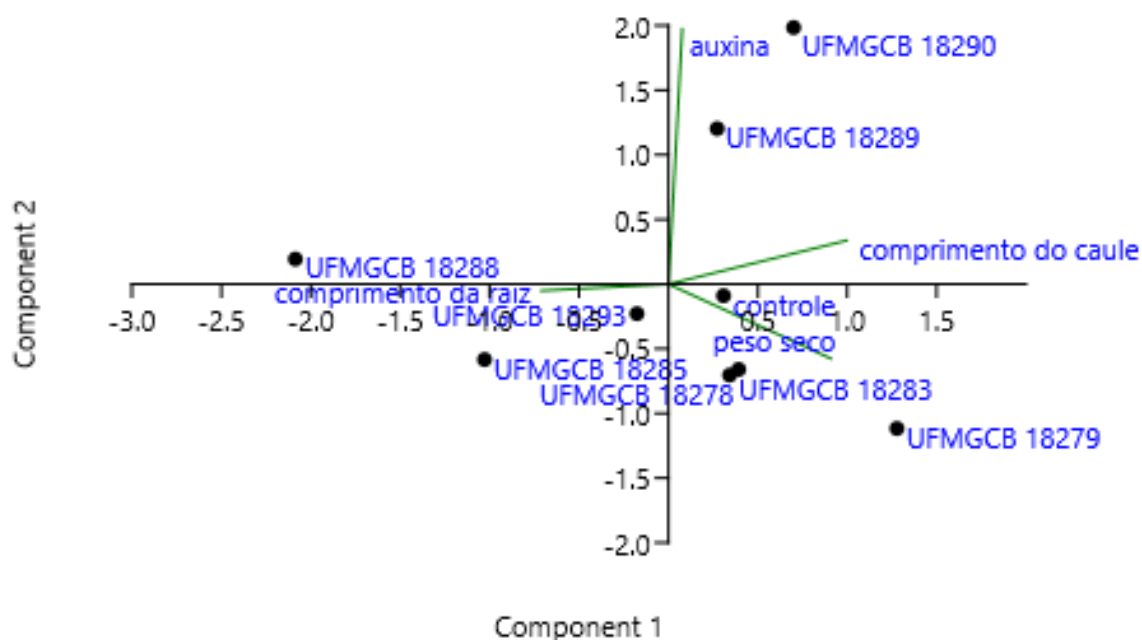
Figura 18. Avaliação do comprimento do caule de *Phaseolus vulgaris* (A) e *Glycine max* (B) submetidas a inoculação de meio líquido fermentado contendo possível auxina produzida de fungos advindos da raiz de *Swietenia macrophylla*.



5 **Figura 19.** Avaliação do peso seco de *Phaseolus vulgaris* (A) e *Glycine max* (B) submetidas a inoculação de meio líquido fermentado contendo possível auxina produzida de fungos advindos da raiz de *Swietenia macrophylla*.

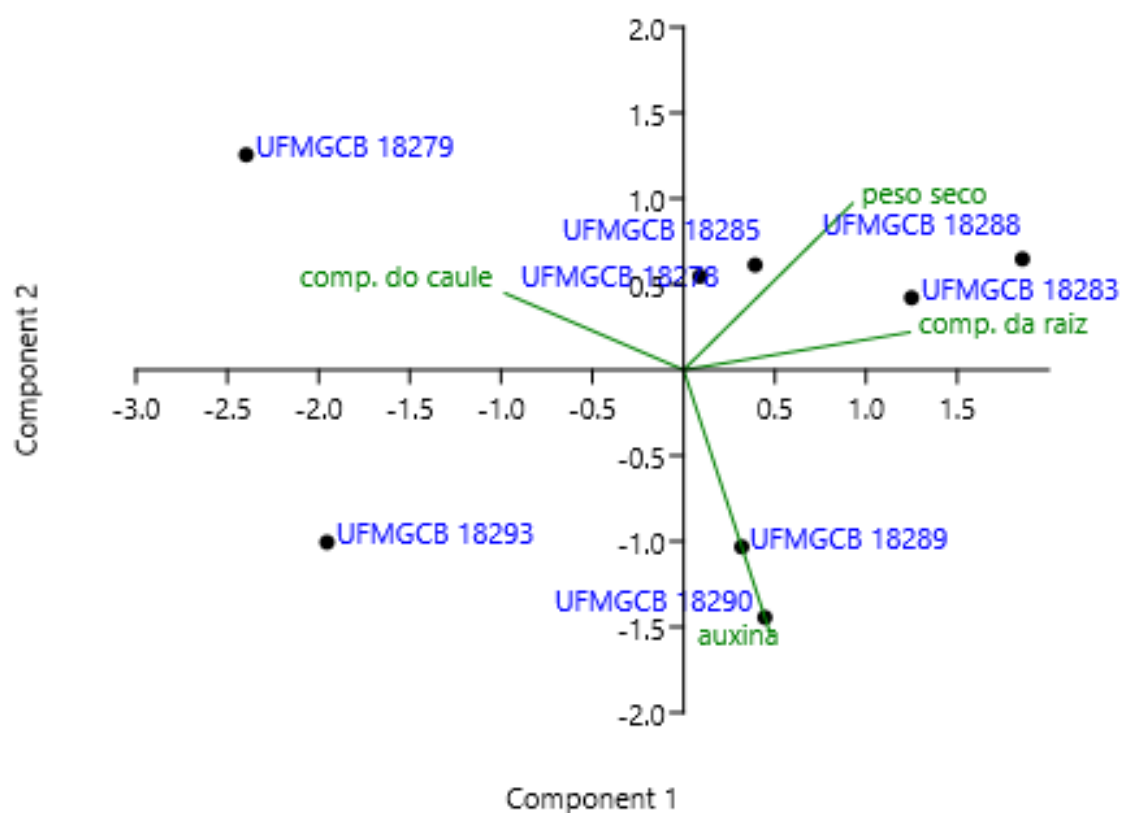


5 **Figura 20.** Avaliação do comprimento da raiz de *Phaseolus vulgaris* (A) e *Glycine max* (B) submetidas a inoculação de meio líquido fermentado contendo possível auxina produzida de fungos advindos da raiz de *Swietenia macrophylla*.



5

Figura 21. Análise da componente principal das variáveis que influenciaram as plântulas de *Phaseolus vulgaris* submetidas a inoculação de meio líquido fermentado contendo auxina produzida de fungos advindos da raiz de *Swietenia macrophylla*.



10 **Figura 22.** Análise da componente principal das variáveis que influenciaram as plântulas de *Glycine max* submetidas a inoculação de meio líquido fermentado contendo possível auxina produzida de fungos advindos da raiz de *Swietenia macrophylla*.

5 6. DISCUSSÃO

6.1 Isolamento dos fungos endofíticos

A taxa de isolamento de fungos endofíticos foi variável, provavelmente devido a amostragem que não foi uniforme entre as espécies, fato que ocorreu devido às limitações de equipamento e condições adversas no campo. Apenas para *S. macrophylla* foi amostrado a mesma quantidade de
10 folhas para jovens e adultos. Para *S. macrophylla*, foi observado que ocorreu maior número de isolados a partir das folhas jovens em comparação com as folhas adultas, esse dado se contrapõe aos resultados encontrados por Pimentel et al. (2006) que isolou mais fungos de folhas adultas em relação as folhas jovens da erva mate (*Ilex paraguariensis*).

6.2 Atividade antiparasitária

15 Os resultados obtidos neste estudo detectaram que os fungos produtores de metabólitos bioativos antiparasitários contra DTNs compreenderam predominantemente os gêneros *Fusarium* e *Diaporthe*. Estes são reconhecidos como ricas fontes de diferentes metabólitos secundários (LI et al. 2020). A atividade antimalárica foi verificada no extrato de três isolados do gênero *Diaporthe* e em um do gênero *Fusarium*. Na triagem, os fungos considerados ativos apresentaram pelo menos 70% de
20 inibição frente ao parasita. As concentrações de extrato bruto variaram de 2,5 a 9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (IC_{50}), e o índice de seletividade variou de 5 a 24. Os extratos brutos dos isolados *Diaporthe* sp. UFMGCB 17544 e UFMGCB 18159 apresentaram índice de seletividade abaixo de 9, enquanto os isolados *Fusarium* sp. UFMGCB 18279 e *Diaporthe* sp. UFMG 17557 apresentaram IS superior a 24, denotando seletividade ao agente etiológico. Ressalta-se que valores inferiores a 10 são considerados tóxicos a
25 células de mamíferos representadas pelas células BGM, derivada do rim do macaco verde africano,

Em contraponto, Higginbotham et al. (2013) testaram cerca de 2700 extratos a uma concentração 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em DMSO, produzidos a partir de fungos endofíticos isolados de 3198 amostras de plantas, contra *P. falciparum*, e fungos do gênero *Diaporthe* exibiram valores de inibição entre 15 e 33%. Os resultados encontrados no presente estudo mostraram porcentagens de inibições
30 superiores aos achados de Higginbotham et al. (2013). O isolado *Fusarium* sp. UFMGCB 18279 apresentou uma IC_{50} de 5,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e um índice de seletividade de 28, considerado satisfatório frente as células de mamíferos. Kaushik et al. (2014) testou o extrato bruto de um isolado fúngico do gênero *Fusarium* isolados de *Sargassum wightii* e obteve IC_{50} de 72 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e IS de 36, denotando concentrações inibição superiores as encontrados na presente pesquisa.

35 A atividade tripanossomicida, foi observada apenas no extrato bruto do fungo *Fusarium* sp. UFMGCB 17514 exibindo um IC_{50} de 4,39 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Campos et al. (2015) testou o extrato bruto do

mesmo gênero a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra as formas de *T. cruzi* e obteve 40% de inibição, resultado inferior ao encontrado na presente pesquisa. Já os extratos metanólicos obtidos de fungos endofíticos da Macaúba testado por Fernandes (2015) não apresentaram atividade tripanossomicida nas concentrações testadas, que variaram de $(100-0,19 \mu\text{g mL}^{-1})$. Ainda, no supracitado estudo constatou-se uma atividade citotóxica acima da droga padrão para o tratamento de *T. cruzi*, nas formas testadas. Cabe destacar que outros gêneros de fungos endofíticos já foram reportados com atividade tripanossomicida, Cota et al. (2008) constatou atividade de metabólito obtidos a partir de *Alternaria* sp. com $\text{IC}_{50} 4,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, equiparando-se aos resultados obtidos para o extrato bruto de *Fusarium*, na presente pesquisa.

Os extratos ativos contra o parasita *L. amazonensis* (**Tabela 5**) foram obtidos a partir dos isolado UFMGCB 17503 e *Colletotrichum* sp. UFMGCB 17511, que apresentaram IC_{50} de $0,03027 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,02547 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente, enquanto o extrato de *Colletotrichum* sp. testado por Higginbotham et al. (2013) frente ao parasita *Leishmania donovani* apresentou inibição apenas de 10% nas concentrações de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Já o co-cultivo entre *Colletotrichum* sp. e *Phomopsis* sp. inibiram 50% dos parasitas *Leishmania infantum* na concentração de $17,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ (TRIASTUTI et al., 2016) ambos apresentaram resultados inferiores ao da presente pesquisa. Diante do exposto, conclui-se que os resultados obtidos a partir dos extratos brutos fúngicos são promissores para avaliação clínica, sobressaindo-se o extrato produzido a partir de *Colletotrichum* sp. UFMGCB 17511, que apresentou menor concentração inibitória dentre os extratos ativos.

6.2.1 Avaliação do micro-fracionamento químico biomonitorado

Os resultados obtidos no micro fracionamento biomonitorado (**Figura 7**) sugerem que a fração ativa responsável pela inibição do *T. cruzi*, pode ser a substância beauvericina (BEA). No teste com a substância padrão (**Tabela 7**) verificou-se que a concentração de $1,6 \mu\text{M mL}^{-1}$ de BEA foi capaz de inibir 50% dos parasitas, e na concentração de $12,5 \mu\text{M mL}^{-1}$ foi considerada tóxica às células de mamífero, apresentado IS de 7,8, próximo ao valor encontrado no extrato bruto, por tanto, acredita-se que a toxicidade encontrada no extrato bruto esteja relacionado quase que integralmente à presença da beauvericina.

A beauvericina é um hexadepsipeptideo cíclico, sintetizada por fungos como *Beaveria bassiana*, *Fusarium* spp. e por espécies endofíticas de *Fusarium*, como *Fusarium proliferatum* (MORETTI et al., 1994; PLATTNER et al., 1994), *Fusarium redolens* (XU et al. 2010) e *Fusarium* sp. (CAMPOS et al., 2015). É uma micotoxina emergente, caracterizada como um contaminante de alimentos e commodities alimentares, como milho, trigo e arroz (WU et al., 2019). Possui atividades antibacterianas, antivirais, antifúngicas, antiparasitárias, inseticidas e anticancerígenas; entretanto, não há estudos sobre o risco toxicológico relacionando exposição a longo prazo (CALONI et al., 2020).

5 Sua atividade biológica relaciona-se a capacidade de aumentar a permeabilidade de íons nas membranas biológicas, formando um complexo que pode afetar a homeostase iônica (WU et al., 2019).

Fato este, que pode explicar a toxicidade frente ao parasita *T. cruzi*. Steiniger et al. (2017) testaram um híbrido da beauvericina, a Octo-beauvericina contra *T. cruzi*, e constataram IC₅₀ de 0.54 μM cerca de 12 vezes menor que a substância padrão utilizada no tratamento clínico, o benzonidazol a 6,53 μM. Campos et al. (2015) encontrou valores de inibição de (IC₅₀ = 1,9 μg mL⁻¹, 2,43 μM) utilizando a beauvericina isolada de fungo endofítico do gênero *Fusarium*, e valores de citotoxicidade de IC₅₀ de 5 μg mL⁻¹ (6,38 μM) frente aos fibroblastos de rato L929. Os resultados obtidos por Campos et al. (2015), estão em concordância aos encontrados na presente pesquisa, embora as concentrações inibitórias tenham sido um pouco mais baixas. Embora reconhecida como uma micotoxina com toxicidade para humanos, animais e plantas, Shiwali et al. (2022), afirmam que análogos da beauvericina podem ser utilizados como potenciais medicamentos e precisam ser explorados, além disso seus efeitos não foram avaliados por longas exposições, devendo ser investigado.

Os resultados obtidos no micro fracionamento biomonitorado contra *L. amazonensis* revelaram que as frações dissociadas apresentaram uma queda brusca da atividade. Enquanto o extrato bruto denotou inibição de 80% a 12% nas concentrações de 100 μg mL⁻¹ a 1,563 μg mL⁻¹ respectivamente, a fração 76, que apresentou maior percentual de atividade entre as frações, exibiu apenas 37% de inibição sobre o parasita. Este resultado é um indicativo de que conjunto das substâncias que compõe o extrato bruto que é o responsável pela toxicidade. De acordo com Zagatto & Bertoletti (2008) uma mistura de diferentes substâncias que interagem entre si, pode reagir de maneiras adversas. São vários os efeitos que resultam dessas interações: (1) sinérgicos, onde o efeito combinado de substâncias individuais; (2) de potenciação, ocorre quando uma substância tem efeito tóxico apenas em conjunto com de outras substâncias e (3) aditivo, quando o efeito combinado das substâncias é igual à soma dos efeitos das substâncias individuais. Por tanto, acredita-se que os componentes ativos presentes no extrato bruto estejam sujeitos a tais variações.

30 As análises efetuadas no *Software* Sirius, indicaram que as substâncias ativas presentes no poço 76, referem-se a uma combinação de lipídeos da classe das glicerofosfocolinas. Esta classe é descrita como marcadores do aumento do *turnover* de síntese de membrana celular ou aumento da densidade celular (BRISSEON et al., 2014). As glicerofosfocolinas já tiveram sua atividade leishmanicida descrita por Croft et al. (1987) e Bourass et al. (1996), contudo ambos os autores utilizaram substância padrão. Não há registros de atividade de glicerofosfocolinas produzidas por fungos endofíticos com atuação leishmanicida na literatura, por esta razão se torna alvo importante para estudos de prospecção de atividade biológica.

5 Os dados obtidos por meio das análises putativas das estruturas químicas do poço ativo do extrato bruto de *Fusarium* sp. UFMGCB 18279 contra *P. falciparum*, indicaram que a substância majoritária possui maior similaridade com a substância ciclosporina. Esta substância é um polipeptídeo cíclico lipofílico isolado a priori da espécie *Beauveria nivea* (anteriormente denominado de *Tolypocladium inflatum*) (FORSYTHE & PATERSON, 2014), é o primeiro imunossupressor de
 10 origem fúngica (SINHA et al., 2022). Possui propriedades imunossupressoras e imunomodulatórias, foi usado pela primeira vez na medicina humana para evitar a rejeição de órgãos transplantados e posteriormente para o tratamento de dermatites atópica (DA) e psoríase (FORSYTHE & PATERSON, 2014). Além disso, também apresenta atividades antifúngicas, antimicrobianas e inseticidas (BERESTETSKY & HU, 2021). Além das espécies supracitadas, a substância já foi reportada a partir
 15 do fungo endofítico *Trichoderma polysporum* (ADELEKE & BABALOLA, 2021).

Este polipeptídeo é um inibidor de calcineurina cujo principal modo de ação é inibir a ativação de células T. A ciclosporina atinge sua atividade imunossupressora ligando-se à proteína receptora intracelular ciclofilina-1. O complexo ciclosporina-ciclofilina resultante inibe a calcineurina, que impede a desfosforilação e ativação do fator de transcrição, fator nuclear de células T ativadas (nF-
 20 AT) (GUAGUERE et al., 2004). Kumar et al. (2005) e Dobson et al. (1999) relataram que a atividade antimalárica proveniente da ciclosporina se deve a inibição da ciclofilina parasitária (Cyp), que provoca a inibição do crescimento eritrocítico do parasita.

6.3 Atividade herbicida

Entre os extratos fúngicos que inicialmente demonstraram potencial herbicida, apenas 24% dos
 25 fungos foram capazes de manter a atividade após o processo de recultivo. Perdas de atividades são comumente relatadas após cultivos sucessivos, uma vez que, nem sempre é possível estabelecer uma correlação direta entre os metabólitos produzidos por fungos endofíticos quando estes se encontram em seu hospedeiro e quando eles são cultivados externamente em meios de cultura (STROBEL et al., 2003; FREIRE et al., 2014).

30 Os fungos capazes de produzir substâncias herbicidas foram identificados como táxons dos gêneros *Colletotrichum*, *Diaporthe* e *Pyricularia*. As espécies de *Colletotrichum* são reconhecidas como fontes prolíferas de diferentes metabólitos secundários com extensa atividade herbicida. Vieira et al. (2018), Boyette et al. (2019), Li et al. (2020), Rodrigues et al. (2020) e Sigh (2021) analisaram diversas espécies do gênero *Colletotrichum* como mico-herbicidas sobre uma ampla variedade de ervas daninhas e constaram ação efetiva frente a inibição dos vegetais. Além disso, já existem no mercado de bioinsumos herbicidas a base de metabólitos secundários de *Colletotrichum* como (i) Collego™
 35 produzidos a partir de *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* atualmente comercializado

5 com o nome de LockDown e utilizado para controle de ervas daninhas em culturas de soja e arroz nos Estados Unidos; (ii) BioMalR=Mallet WP elaborado a partir dos metabólitos de *Colletotrichum gloeosporioides* utilizado contra *Malva* spp.; (iii) Lubao elaborado a partir de *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp., utilizado contra *Cuscuta* spp.

10 Embora não haja formulações de bioherbicidas comerciais à base de metabólitos do gênero de *Diaporthe*, há registros de sua capacidade de produzir substâncias herbicidas. Souza et al. (2015) inoculou o meio de cultura líquido fermentado por *Diaporthe* sp. sobre sementes de *Cucumis sativus* e constatou 100% de inibição. Resultados similares foram encontrados por Pes et al. (2016) que também aplicou o meio líquido fermentado sobre as sementes *Echinochloa* sp., *Conyza* sp. e *L. multiflorum* e registraram 100% de inibição da germinação, o qual foi considerado com potencial para
15 desenvolvimento de bioherbicidas comerciais.

O gênero *Pyricularia* é descrito como importante fitopatógenos de lavouras de arroz e trigo no Brasil, levando ao desenvolvimento de brusone. Os metabólitos produzidos na infecção já foram testados como bioherbicida, por Peng et al. (2004), e, em particular para o biocontrole do capim (*Cenchrus ciliaris*) por Masi et al. (2020). Além do controle de capins e outras espécies de
20 monocotiledôneas, não há registro de sua ação contra vegetais dicotiledôneas conforme constatadas no presente estudo.

6.4 Avaliação físico-química do solo autoclavado para cultivo de *Glycine max* (soja) e *Phaseolus vulgaris* (feijão)

O tratamento biocida empregado visou inibir os componentes biologicamente ativos
25 presentes no solo para desta forma, avaliar apenas a influência dos fungos inoculados sobre os vegetais de interesse agrônomo (CARTER & GREGORICH, 2007). Sabe-se que com o processo de autoclavação, não somente eliminam-se os micro-organismos, mas também inativa as enzimas secretadas pelos mesmos (TIBBETT et al., 2000; CARTER & GREGORICH, 2007).

A partir dos dados apresentados nas **Tabela 10** é possível constatar que o processo de
30 autoclavação do solo conferiu alterações estatisticamente significativas para os elementos pH, P-rem, Fe e Cu em relação ao solo controle. Observou-se redução do potencial hidrogeniônico e do Cobre, enquanto, denotou-se aumento das concentrações de P-rem e Ferro.

Carter et al. (2007) não encontraram alterações significativas quanto a variação do pH, ao contrário do encontrado no presente estudo, entretanto, as alterações detectadas não impactam no
35 desenvolvimento das plântulas, uma vez que a faixa de pH ideal dos solos para a agricultura é entre 5,5 e 6,5. Isto porque é nesta faixa que os nutrientes ficam mais disponíveis às plantas, ou seja, na solução do solo. Durante o cultivo de leguminosas, o solo é acidificado devido à liberação de prótons das raízes.

5 Como consequência desta liberação, as plantas acumulam ânions orgânicos que podem, se retornados e decompostos no solo, neutralizando os ácidos (YAN et al., 1996). Apesar de ter ocorrido variações significativas em alguns elementos químicos analisados (**Tabela 10**), não ocorreria prejuízo ao cultivo das plantas, pois os elementos se encontram em concentrações ideais para cultivo. Mendes (2007) avaliaram a concentração de macro e micronutrientes e constatou que esses constituintes podem variar
10 na biomassa vegetal submetidos ao mesmo tratamento.

Por tanto, o modelo proposto de utilização de solo peneirado e autoclavado é satisfatório para o desenvolvimento do vegetal e para avaliação dos efeitos dos fungos sobre as plântulas. Além disso, para todas as replicatas analisadas (controle e autoclavada) foram classificadas como sendo de textura de franco-argilo-arenosa, textura média, indicando que o processo de assepsia não influenciou na
15 granulometria do solo.

6.5 Avaliação da ação dos fungos endofíticos da raiz de *Swietenia macrophylla* sobre fisiologia de plântulas de *Phaseolus vulgaris* (feijão) e *Glycine max* (soja)

A partir das métricas apresentadas na **Tabela 12**, é possível constatar que houve diferenças no desenvolvimento das plântulas de feijão e de soja infectadas em relação ao grupo controle, e que as
20 espécies vegetais responderam de maneira diferente à alguns fungos testados. Na **Tabela 16** e **Tabela 17 (Apêndice C)** constata-se que as diferenças foram estatisticamente significativas, sobre as variáveis comprimento do caule, da raiz e peso seco para as plântulas de feijão infectadas pelos isolados *Coprinellus* sp. UFMGCB 18278, *Dactylonectria* sp. UFMGCB 18283 e *Talaromyces* sp. UFMGCB 18293, bem como para as plântulas de soja infectadas pelos isolados *Dactylonectria* sp. UFMGCB
25 18288, *Dactylonectria* sp. UFMGCB 18285, *Coprinellus* sp. UFMGCB 18278, *Dactylonectria* sp. UFMGCB 18283, *Talaromyces* sp. UFMGCB 18293. Ressalta-se que o único parâmetro que não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, foi o comprimento da raiz do feijão sob influência do fungo *Dactylonectria* sp. UFMGCB 18288.

Os isolados *Fusarium* sp. UFMGCB 18289, UFMGCB 18290 e UFMGCB 18279 não permitiram a germinação das sementes de soja e feijão, e o fungo *Dactylonectria* sp. UFMGCB 18285
30 inibiu apenas as sementes do feijoeiro. Estes resultados estão em concordância com os encontrados por Rodrigues & Menezes (2002), que avaliaram a influência de fungos, como os do gênero *Fusarium* sobre a germinação de sementes de feijão, e, constataram necrose nos cotilédones, como as do presente experimento (**Figura 14**).

35 O gênero *Fusarium* é amplamente conhecido por abrigar espécies de patógenos vegetais bem conhecidos de culturas agrícolas, bem como aqueles que produzem micotoxinas (AGRIOS, 2005). De acordo com Agrios (2005) possuem capacidade de induzir marchas vasculares em diversos órgãos

5 vegetais de cultivos perenes e anuais, levando a planta a morte, como registrado no presente experimento. Doenças provocadas por *Fusarium* possuem gestão complicada devido à sua alta variabilidade genética e especificidade ampla de hospedeiros (PERINCHERRY et al., 2019).

A manifestação da doença pode ocorrer na fase inicial do desenvolvimento da cultura e na fase da reprodução. As condições ideais são temperatura entre 20° C e 28°C, alta umidade do solo, e com
10 pH abaixo de 6, nas mesmas condições experimentais executadas no presente estudo. Com o progresso da doença, as plantas apresentam amarelecimento das folhas e podem evoluir até a sua morte. Em alta umidade, forma-se micélio branco sobre a haste onde são formados os clamidosporos, estruturas de resistência (ITO, 2013).

A doença intitulada vulgarmente de a “murcha do Fusário” é uma das mais importantes doenças
15 do feijoeiro comum. A murcha foi relatada pela primeira vez nos EUA (KENDRIK & SNYDER, 1942), sendo constatada posteriormente no Canadá, Colômbia, Índia e África Central (HOLLIDAY, 1970), na Nigéria (OYEKAN, 1977) e Brasil (RIOS, 1988). Sabe-se que os danos provocados por esta enfermidade são muito variáveis, podendo afetar apenas algumas plantas ou até 80% da lavoura, isto porque a murcha do fusário inicia-se em pequenas reboleiras e, após alguns anos de cultivo dissemina-
20 se por toda área (CÂNDIDA et al., 2009). Após a penetração, a hifa do fungo é capaz de colonizar inter e intracelularmente a planta, atingindo o seu sistema vascular, especificamente os vasos do xilema. O fungo permanece confinado nos vasos até a doença atingir estádios mais avançados de desenvolvimento, levando à morte do hospedeiro (DALLA PRIA; SILVA, 2010). Na severidade da doença é maior a temperatura de 20 °C e, em condições de campo, o desenvolvimento do patógeno é
25 favorecido em temperaturas entre 26° e 28 °C, em solos arenosos, ácidos, sob condições de estresse hídrico em solos compactados e com pouca drenagem também podem agravar a severidade da doença (SCHWARTZ et al., 2015).

Outra doença causada pelo gênero é a “podridão vermelha da raiz”, considerada uma das doenças mais severas de soja (*G. max*) (OLIVEIRA, 2009). A podridão vermelha da raiz (PVR),
30 também conhecida como síndrome da morte súbita, é uma doença relativamente nova na cultura da soja. A doença atinge várias áreas de cultivo de soja no Brasil e outros países (REIS, 2013). O dano devido à PVR varia entre 20% e 80%, dependendo do estágio de desenvolvimento da cultura no momento da infecção (FREITAS et al., 2013). Essa doença foi observada pela primeira vez na safra 1981/82, em São Gotardo (MG). A partir da safra 96/97, sua presença foi verificada desde o Maranhão
35 ao Rio Grande do Sul, sendo os estados Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais os mais afetados. A necrose situa-se no tecido cortical, enquanto o lenho da raiz adquire uma coloração castanho-clara, estendendo-se pelo tecido lenhoso da haste a vários centímetros acima do nível do solo (REIS, 2013).

5 Ainda, o gênero *Dactylonectria* também é reportado como importante fitopatógeno de culturas, é conhecido por causar a podridão “negra da raiz” levando apodrecimento do órgão. A injúria já foi descrita em videiras na Espanha por Álvarez-Pérez et al. (2017), em culturas de morango e framboesas no norte da Alemanha por Weber & Entrop (2017), em culturas de morangos na China por Chen et al. (2021). Entretanto, no Brasil a podridão negra da raiz tem sido comumente associada a fungos do
10 gênero *Scytalidium* (SERRA et al. 2009) em cultivares de mandioca pela espécie *Rhizoctonia* spp. e em morangueiros pela espécie *Pythium* spp. (EMBRAPA, 2016). Doenças causadas pelo gênero *Dactylonectria* não foram relatadas no Brasil, como evidenciado no experimento.

 Além da associação ao deterioramento da raiz, o gênero *Dactylonectria* foi relacionado a doença multifatorial que afeta sistemas contínuos de cultivo de macieiras, a ação do fungo leva a uma
15 redução progressiva do rendimento e das perdas de qualidade em pomares de macieiras adultas (MANICI et al., 2018). De acordo com Manici et al. (2018) os compostos extracelulares liberados por *Dactylonectria* contribuem para a redução severa do crescimento das plantas, como observados nas plântulas de feijão sobre efeito dos isolados *Dactylonectria* sp. UFMGCB 18288 e *Dactylonectria* sp. UFMGCB18283 (**Tabela 12, Figura 15, Figura 16 e Figura 17**). Apesar de se tratar de fungos do
20 mesmo gênero observou-se pequenas variações entre as replicatas, entretanto, os efeitos foram majoritariamente negativos sobre os vegetais.

 As plântulas de *P. vulgaris* que se desenvolveram sobre a influência do isolado *Talaromyces* sp. UFMGCB 18293 apresentaram efeito estatisticamente significativo negativo (**Figura 15, Figura 16 e Figura 17**) sobre o peso seco, comprimento da raiz e do caule em relação ao grupo controle. Este
25 gênero já foi isolado do solo, de plantas, esponjas (poríferos) e culturas alimentícias (ZHAI et al., 2016). Embora relatado como um gênero com espécies endêmicas no milho, Yang et al. (2020) descreveu espécies fitopatogênicas nas culturas de milho na China, e, Liu et al (2020), demonstrou que o gênero está associado a podridão da raiz do vegetal. Em estudos conduzidos por Goh et al. (2020), apontam o gênero como um importante antagonista a fungos fitopatogênicos, quando associado a
30 consórcios e aplicados a vegetais de interesse agrônomo.

 O isolado UFMGCB 18278 pertencente ao gênero *Coprinellus* causou danos estatisticamente significativo sobre as plântulas analisadas. Fungos coprinoides, diferenciados pela forma de crescimento do píleo e presença ou não de véu, entre outras características, ocorrem em vários substratos, mais frequentes na terra, ou no húmus e esterco, na madeira e outros materiais vegetais em
35 decomposição, em gramados, e parasitando outros fungos (SINGER, 1986; GOMES, 2017). Errasti et al. (2010) constatou fungos do gênero como endofíticos associados a caules de árvores exóticas situadas em reservas naturais da Argentina, com importante atividade antioxidante em ensaios *in vitro*.

5 No entanto, o gênero ainda não havia sido descrito como possível fitopatógeno de plantas, ainda que conhecido como um fungo sapróbio, conforme constatado no estudo.

Não obstante, os fitopatógenos são descritos amplamente em todos os territórios estudados, sabe-se que as epidemias de doenças de plantas são os resultados da combinação dos elementos: vegetal hospedeiro suscetível, patógeno virulento e condições favoráveis de ambiente, ocorrendo por um período suficientemente longo. Esses três fatores conjuntamente formam o chamado triângulo de doenças. O homem pode desempenhar importante papel para o surgimento e desenvolvimento das epidemias (REIS, 2013). O avanço da fronteira agrícola sobre as florestas naturais, o desmatamento, e o aquecimento global são fatores extremamente importantes para o estabelecimento e surgimento de novos patógenos. De acordo com dados do IPCC (2021) a temperatura do Brasil poderá aumentar de 3°C a 3,5°C, influenciando o padrão e intensidade das chuvas. Ito (2013) e Schwartz et al. (2015) esclarecem que o aumento da temperatura e das chuvas é fator crucial para o aumento de severidade e dispersão de pragas fúngicas, por tanto, estes fatores associados podem impactar negativamente a produção de alimento no futuro.

6.5.1. Avaliação da recuperação dos fungos por meio das plântulas infectadas

20 Os três fungos recuperados a partir das plântulas de *P. vulgaris* infectadas, e, identificados na **Tabela 13**, mostraram-se com identificação compatível com os isolados inoculados (**Tabela 11**). Não foi possível identificar todos os fungos, uma vez que o DNA obtido apresentou baixa qualidade. Salienta-se que a extração de DNA dos fungos endofíticos das raízes de *S. macrophylla* para identificação foi realizado com o kit de extração comercial da QIAGEN, e, por isso apresentou uma qualidade melhor, ao contrário do obtido no isolamento após infecção. Contudo, os resultados apresentados levam a crer que os fungos inoculados foram os responsáveis pelos efeitos observados nas plântulas, confirmando a eficácia da metodologia empregada.

6.6 Avaliação do efeito da inoculação de meio líquido fermentado produzido por fungos endofíticos da raiz de *Swietenia macrophylla* sobre *Glycine max* (soja) e *Phaseolus vulgaris* (feijão)

30 Os resultados obtidos com a inoculação do meio líquido fermentado contendo auxina demonstrou que o meio de cultivo líquido teve influência estatisticamente significativa sobre as plântulas avaliadas. A partir dos dados exibidos na **Figura 21**, constata-se que a componente 1 demonstra estar mais associada ao peso seco, comprimento do caule, enquanto a componente 2 à auxina. O comprimento da raiz denotou dissociado dos dois parâmetros. As variáveis comprimento do caule e peso seco foram mais determinantes sobre o conjunto de dados. Como demonstrado na **Figura 21** e na **Tabela 14** os teores de auxina mostraram ter influência apenas sobre as plântulas que tiveram

domínio dos isolados UFMGCB 18290 e *Fusarium* sp. UFMGCB 18289 e para o restante, exibiu pouco ou quase nenhuma influência. As concentrações de auxina quantificadas por esses fungos foram as maiores entre os fungos os testados. De acordo com Vrabka et al. (2019), a capacidade de produzir fito-hormônios varia significativamente entre as espécies de *Fusarium* e tais diferenças impactam diretamente o vegetal. Em experimento similar Bilal et al. (2018) constatou que o filtrado do meio de cultivo líquido contendo *Fusarium proliferatum* foi capaz de melhorar a biomassa, o teor de clorofila e o comprimento da raiz do arroz mutante *Waito-C*.

O isolado *Fusarium* sp. UFMGCB 18279 influenciou o crescimento do caule e o ganho de biomassa seca do feijoeiro, apresentando resultados significativos (**Tabela 17**). Apesar do ACP (**Figura 21**), não ter demonstrado relação com a auxina produzida, os resultados obtidos levam a crer que o isolado fúngico possa ter outras habilidades como produção giberelina conforme verificado Mohiddin et al. (2021) em experimento em que testou 119 espécies do gênero; solubilização de fosfato conforme descrito por Radhakrishnan et al. (2015), que também contribuiria para o desenvolvimento do caule e aumento da biomassa seca.

Acredita-se que no processo de fermentação no meio de cultura líquido para produção da auxina, os fungos do gênero *Talaromyces* e *Dactylonectria* possam ter produzidos exsudados capazes de acometer o desenvolvimento das plântulas vegetais, como verificado por Schafhauser et al (2016) e Manici et al. (2018) em estudos que avaliaram a produção de metabólitos secundários tóxicos e exsudados fúngicos sobre culturas de macieiras, respectivamente.

25

30

5 7. CONCLUSÕES

O presente trabalho contribuiu para o conhecimento do potencial biológico da comunidade de fungos endofíticos associados a plantas longínquas do fragmento de Mata Atlântica do estado de Minas Gerais, os quais se mostram bons candidatos para usos biotecnológicos contra doenças tropicais negligenciadas e com potencial aplicação na agricultura.

10 Em termos de metabólitos secundários bioativos, muitos produtos naturais, incluindo aqueles conhecidos como toxinas microbianas, são úteis como fármacos ou como ferramentas bioquímicas para investigar processos de doenças. Apesar de espécies de *Fusarium* e *Colletotrichum* serem reconhecidas como fontes de micotoxinas, nossos autores sugerem que aquelas em status ecológico endofítico podem ser consideradas promissoras “fábricas” eucarióticas de metabólitos bioativos, em
15 especial contra DTNs. Além disso, os metabólitos bioativos caracterizados podem ser úteis como moléculas protótipos para o desenho de derivados mais eficazes que possam servir como líderes de drogas para novos agentes quimioterápicos no tratamento da tripanossomíase, leishmaniose e da malária. Além disso, os fungos endofíticos das plantas longínquas também foram capazes de produzir metabólitos de interesse na agricultura, seja pela sua atividade herbicida ou pela capacidade de
20 estimular o desenvolvimento de plântulas de interesse econômico. Contudo, mais trabalhos são necessários para a utilização desses fungos com agentes controles de ervas daninhas ou para estimular o crescimento vegetal. Por fim, os resultados dessa tese também demonstraram que alguns fungos presentes em equilíbrio na raiz de *S. macrophylla* foram capazes de causar efeitos negativos em plântulas de feijão e soja *in vivo*, o que chama a atenção para a não devastação de ecossistemas naturais,
25 incluindo plantas nativas que possuem uma comunidade endofítica em equilíbrio em seus tecidos, incluindo potenciais fitopatógenos. Caso essas plantas sejam destruídas, esses fungos fitopatogênicos em equilíbrio podem ser liberados no meio ambiente e encontrar novos hospedeiros sem barreiras necessárias para seu controle, incluindo plantas hospedeiras de interesse econômico.

5 8. REFERÊNCIAS

- Achenbach, H., Benirschke, G. (1997). Joannesialactone and other compounds from *Joannesia princeps*. *Phytochemistry*, 45(1), 149-157.
- Adeleke, B. S., Babalola, O. O. (2021). Pharmacological potential of fungal endophytes associated with medicinal plants: A review. *Journal of Fungi*, 7(2), 147.
- 10 Aenda. Mercado de pesticidas agrícolas no Brasil: visão sumária – 2010. São Paulo, 2011.
- Alvarado, J. R. (2009). Dendrocronologia de árvores de mogno, *Swietenia macrophylla* King., *Meliaceae*, ocorrentes na floresta tropical Amazônica do Departamento de Madre de Dios, Peru (Doctoral dissertation, Dissertação. ESALQ, Piracicaba).
- Allard, P. M., Péresse, T., Bisson, J., Gindro, K., Marcourt, L., Pham, V. C., Wolfender, J. L. (2016).
- 15 Integration of molecular networking and in-silico MS/MS fragmentation for natural products dereplication. *Analytical chemistry*, 88(6), 3317-3323.
- Aly, A. H., Debbab, A., Kjer, J., & Proksch, P. (2010). Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal diversity*, 41(1), 1-16.
- Aly, A. H., Debbab, A., & Proksch, P. (2011). Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great
- 20 promises. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(6), 1829-1845.
- Amarante Junior, O. P. D., Santos, T. C. R. D., Brito, N. M., & Ribeiro, M. L. (2002). Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quimica nova*, 25(4), 589-593.
- Ancheeva, E., Daletos, G., & Proksch, P. (2020). Bioactive Secondary Metabolites from Endophytic Fungi. *Current Medicinal Chemistry*, 27(11), 1836-1854.
- 25 Araújo, A. C., Guiguer, E. L., Barbalho, S. M., Bueno, P. C., Lopes, J. A., da Silva, B. F., de Alvares Goulart, R. (2016). Phytochemical characteristics of seeds and its effects on the intestinal motility and toxicity of *Joannesia princeps*. *Journal of medicinal food*, 19(1), 68-72.
- Araujo, F. F. D., & Guerreiro, R. T. (2010). Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. *Ciência e Agrotecnologia*, 34(4),
- 30 837-844.
- Arl, R. (2021). Toxicidade reprodutiva do glifosato e herbicidas à base de glifosato: uma abordagem bibliográfica. Trabalho de Conclusão de Curso.
- Arnold, A. E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal biology reviews*, 21(2-3), 51-66.
- 35 Arnold, A. E. (2008). Endophytic fungi: hidden components of tropical community ecology. *Tropical forest community ecology*, 178-188.

- 5 Arnold, A. E., Henk, D. A., Eells, R. L., Lutzoni, F., & Vilgalys, R. (2007). Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia*, 99(2), 185-206.
- Arnold, A. E., Maynard, Z., Gilbert, G. S., Coley, P. D., & Kursar, T. A. (2000). Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology letters*, 3(4), 267-274.
- 10 Arnold, A. E., Mejía, L. C., Kylo, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., Herre, E. A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26), 15649-15654.
- Assalin, M. R., Piovesana, A. M., Rosa, M. A., Ferracini, V. L., Vieira, R. F. (2011). Identificação e quantificação de fitohormônios produzidos por bactérias por UPLC-ESI-MSMS. In *Embrapa Meio Ambiente-Resumo em anais de congresso (ALICE)*. In: Congresso Brasileiro de Espectrometria de massas. Campinas: Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas, 2011.
- 15 Asghar, H., Zahir, Z., Arshad, M., & Khaliq, A. (2002). Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in Brassica juncea L. *Biology and Fertility of Soils*, 35(4), 231-237.
- 20 Associação Brasileira de Saúde Coletiva. Dossiê ABRASCO (2012): um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Saúde Coletiva.
- Azevedo, R. N. D. (2020). Bioprospecção de metabólitos secundários bioativos de fungos endofíticos associados à Carapichea ipecacuanha (Rubiaceae).
- Azevedo, R. N. D., Ferreira, M. C., Assis, J. C. S. D., Junior, P. A. S., Maia, D. N. B., Almeida Alves, T. M. D., Rosa, L. H. (2021). Bioprospecting of Bioactive Secondary Metabolites of Endophytic Fungi of Carapichea ipecacuanha (Rubiaceae), a Neotropical Medicinal Species. In *Neotropical Endophytic Fungi* (pp. 321-336). Springer, Cham
- 25
- Balbach, A. (1969). A Flora Nacional na Medicina Doméstica, Edel-A Edificação do Lar. *A Flora Nacional na Medicina Doméstica, Edel: A Edificação do Lar*.
- 30 Bastos, B., Deobald, G. A., Brun, T., Dal Prá, V., Junges, E., Kuhn, R. C. & Mazutti, M. A. (2017). Solid-state fermentation for production of a bioherbicide from Diaporthe sp. and its formulation to enhance the efficacy. *3 Biotech*, 7(2), 1-9.
- Bagchi, B. (2021) Diversity of Endophytic fungi in Lianas-butea Superba from West Medinipur District and its seasonal and regional variation.
- 35 Bezerra, J. D., Nascimento, C. C., Barbosa, R. D. N., da Silva, D. C., Svedese, V. M., Silva-Nogueira, E. B., Souza-Motta, C. M. (2015). Endophytic fungi from medicinal plant Bauhinia forficata: Diversity and biotechnological potential. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 49-57.

- 5 Berestetskiy, A., Hu, Q. (2021). The chemical ecology approach to reveal fungal metabolites for arthropod pest management. *Microorganisms*, 9(7), 1379.
- Bhadra, F., Gupta, A., Vasundhara, M., Reddy, M. S. (2022). Endophytic fungi: a potential source of industrial enzyme producers. *3 Biotech*, 12(4), 1-17.
- Bilal, L.; Asaf, S.; Hamayun, M.; Gul, H.; Iqbal, A.; Ullah, I.; Lee, I.-J.; Hussain, A. Plant growth
10 promoting endophytic fungi *Asprgillus fumigatus* TS1 and *Fusarium proliferatum* BRL1 produce gibberellins and regulates plant endogenous hormones. *Symbiosis* 2018, 76, 117–127
- Bills, G.; Dombrowski, A.; Pelaez, F.; Polishook, J. (2002). Recent and future discoveries of pharmacologicallyactive metabolites from tropical fungi.
- Bonifácio, C. B. (2021). A criação e recriação do campesinato no Século XXI: a construção do discurso
15 e da prática agroecológica dentro do Movimento Sem Terra (MST) e a urgência do ecossocialismo frente ao sistema capitalista e o conservadorismo de Jair Bolsonaro.
- Bourass, J., Loiseau, P. M., Bories, C., Letourneux, Y. (1996). Antileishmanial activity of rac-1-dodecy1-2-octanamido-2-deoxy-glycerophosphocholine, a new dialkylglycerophosphocholine, in vitro. *Annals of Tropical Medicine Parasitology*, 90(5), 559-561.
- 20 Boyette, C. D., Hoagland, R. E., Stetina, K. C. (2019). Extending the host range of the bioherbicidal fungus *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Biocontrol Science and Technology*, 29(7), 720-726.
- Braga, L.F., Sousa, M.P., Gilberti., De Carvalho, M.A.C (2007) Caracterização morfológica de sementes de castanha de sapucaia (*Lecythis pisonis* Cambess - Lecythidaceae) RCAA, 5- 111-116.
- 25 Brisson, R. T., dos Santos, A. A. S. M. (2014). A ressonância magnética no diagnóstico e estadiamento dos gliomas cerebrais: a aplicação da técnica da espectroscopia de prótons. *Revista de Medicina*, 93(3), 135-145.
- Brun, T., Rabuske, J. E., Confortin, T. C., Luft, L., Todero, I., Fischer, M., Mazutti, M. A. (2020). Weed control by metabolites produced from *Diaporthe schini*. *Environmental Technology*, 1-26.
- 30 Brundrett, M. C. (2006). Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In *Microbial root endophytes* (pp. 281-298). Springer, Berlin, Heidelberg.49-57.
- Cafêu, M. C., Silva, G. H., Teles, H. L., Bolzani, V. D. S., Araújo, A. R., Young, M. C. M., Pfenning, L. H. (2005). Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Química Nova*, 991-995.
- 35 Caloni, F., Fossati, P., Anadón, A., Bertero, A. (2020). Beauvericin: The beauty and the beast. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 75, 103349.
- Camero, C. M., Temraz, A., Braca, A., De Leo, M. (2017). Phytochemical study of *Joannesia princeps* Vell.(Euphorbiaceae) leaves. *Biochemical Systematics and Ecology*, 70, 69-72.

- 5 Campos, F. F., Rosa, L. H., Cota, B. B., Caligiorne, R. B., Rabello, A. L. T., Alves, T. M. A., Zani, C. L. (2008). Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus* sp., an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). *PLoS neglected tropical diseases*, 2(12), e348.
- Cappelari, B. E., Meneghel, S. N. (2021). Violências e vulnerabilidades: desigualdade social e doenças tropicais negligenciadas. *Conexão-online revista eletrônica Univag*, (26).
- 10 Cândida, D. V., Costa, J. G. C., Rava, C. A., Carneiro, M. S. (2009). Controle genético da murcha do fusário (*Fusarium oxysporum*) em feijoeiro comum. *Tropical plant pathology*, 34(6), 379-384.
- Canuto, K. M., Rodrigues, T. H. S., de OLIVEI, F. S. A., Gonçalves, F. J. T. (2012). Fungos endofíticos: perspectiva de descoberta e aplicação de compostos bioativos na agricultura. *Embrapa Agroindústria Tropical-Documentos (INFOTECA-E)*.
- 15 Carbone, I., Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 553-556.
- Carvalho, C. A., da Silva, J. B., Alves, C. Z. (2016a). Envelhecimento acelerado em sementes de mogno. *Revista Ciência Agronômica*, 47(4), 691-699.
- Carvalho, C.R., Vieira, M. D. L. A., Cantrell, C. L., Wedge, D. E., Alves, T. M., Zani, C. L., Rosa, C. A. (2016b). Biological activities of ophiobolin K and 6-epi-ophiobolin K produced by the endophytic fungus *Aspergillus calidoustus*. *Natural product research*, 30(4), 478-481.
- 20 Carvalho, C. R., Gonçalves, V. N., Pereira, C. B., Johann, S., Galliza, I. V., Alves, T. M., Rosa, L. H. (2012a). The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. *Symbiosis*, 57(2), 95-107.
- 25 Carvalho, I. M. M., Queiros, L. D., Brito, L. F., Santos, F. A., Bandeira, A. V. M., de Souza, A. L., de Queiroz, J. H. (2012b). Chemical characterization of sapucaia nuts (*Lecythis pisonis* Cambess.) from zona da mata mineira region. *Bioscience Journal*.
- Carter, M. R., Gregorich, E. G. (Eds.). (2007). *Soil sampling and methods of analysis*. CRC press.
- 30 Castellani, A. (1967). Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(8), 181.
- Centner, T. J., Russell, L., Mays, M. (2019). Viewing evidence of harm accompanying uses of glyphosate-based herbicides under US legal requirements. *Science of the total environment*, 648, 609-617.
- 35 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. CLSI document M27-S4, Fourth International Supplement. (Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute), 2012.

- 5 Chacón Cobos, D. A., Gómez Rosero, M. A., & Vargas Ortiz, V. A. (2022). Planteamiento de un protocolo de vigilancia para los trabajadores expuestos al glifosato en Colombia.
- Charudattan, R. (1991). The mycoherbicide approach with plant pathogens. In *Microbial control of weeds* (pp. 24-57). Springer, Boston, MA.
- Chen, J. J., Huang, S. S., Liao, C. H., Wei, D. C., Sung, P. J., Wang, T. C., Cheng, M. J. (2010). A new
10 phragmalin-type limonoid and anti-inflammatory constituents from the fruits of *Swietenia macrophylla*. *Food chemistry*, 120(2), 379-384.
- Clasen, B., Murussi, C., Storck, T. (2019). Pesticide Contamination in Southern Brazil. In *Pollution of Water Bodies in Latin America* (pp. 43-54). Springer, Cham.
- Colwell, R. K., Mao, C. X., Chang, J. (2004). Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-
15 based species accumulation curves. *Ecology*, 85(10), 2717-2727.
- Cota, B. B., Rosa, L. H., Caligiorne, R. B., Rabello, A. L. T., Almeida Alves, T. M., Rosa, C. A., Zani, C. L. (2008). Altenusin, a biphenyl isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp., inhibits trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiology letters*, 285(2), 177-182.
- Costa, M., de Oliveira, C. M. (2020). Endophytic Fungi in the Fight Against Neglected Tropical
20 Diseases. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 20(16), 1683-1693.
- Chen, J. J., Huang, S. S., Liao, C. H., Wei, D. C., Sung, P. J., Wang, T. C., Cheng, M. J. (2010). A new phragmalin-type limonoid and anti-inflammatory constituents from the fruits of *Swietenia macrophylla*. *Food chemistry*, 120(2), 379-384.
- CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: grãos: safra 2011/2012, nono levantamento, junho
25 2012. Brasília, DF, 2012. 34 p. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro>
- Costa Neto, P. R., Rossi, L. F., Zagonel, G. F., Ramos, L. P. (2000). Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. *Química nova*, 23(4), 531-537.
- Choi, Y. W., Hodgkiss, I. J., Hyde, K. D. (2005a). Enzyme production by endophytes of *Brucea*
30 *javanica*. *J Agric Technol*, 1, 55-66.
- Choi, W. Y., Rim, S. O., Lee, J. H., Lee, J. M., Lee, I. J., Cho, K. J., ... Kim, J. G. (2005b). Isolation of gibberellins-producing fungi from the root of several *Sesamum indicum* plants. *Journal of microbiology and biotechnology*, 15(1), 22-28.
- Dai, C. C., Yu, B. Y., Li, X. (2008). Screening of endophytic fungi that promote the growth of
35 *Euphorbia pekinensis*. *African Journal of Biotechnology*, 7(19).
- Dantas-Torres, F. (2009). Canine leishmaniosis in South America. *Parasites Vectors*, 2(1), 1-8.
- Da Silva, A. V., da Silva, C. M., da Silva, J. H. B. (2021). *Pesquisas em ciências agrárias-Volume 2*. Editora CRV.

- 5 Dobson, S., May, T., Berriman, M., Del Vecchio, C., Fairlamb, A. H., Chakrabarti, D., Barik, S. (1999). Characterization of protein Ser/Thr phosphatases of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: inhibition of the parasitic calcineurin by cyclophilin-cyclosporin complex. *Molecular and biochemical parasitology*, 99(2), 167-181.
- Dolatabadi, H. K., Goltapeh, E. M., Moieni, A., Varma, A. (2012). Evaluation of different densities of auxin and endophytic fungi (*Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera*) on *Mentha piperita* and *Thymus vulgaris* growth. *African Journal of Biotechnology*, 11(7), 1644-1650.
- 10 Dreyfuss, M. M., Chapela, I. H. (1994). Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. *Discovery of novel natural products with therapeutic potential*, 49-80.
- Dührkop, K., Fleischauer, M., Ludwig, M., Aksenov, A. A., Melnik, A. V., Meusel, M., ... Böcker, S. (2019). SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nature methods*, 16(4), 299-302.
- 15 Dutra, R. M. S., da Souza, M. M. O. (2017). Impactos negativos do uso de agrotóxicos à saúde humana. *Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde*, 13(24), 127.
- Eid, A. M. M., Elmarzugli, N. A., EL-ENSHASY, H. A. (2013). A review on the phytopharmacological effect of *Swietenia macrophylla*. *seeds*, 3, 5.
- 20 Ezra, D., Hess, W. M., Strobel, G. A. (2004). New endophytic isolates of *Muscodora albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology*, 150(12), 4023-4031.
- Faeth, S. H., Wilson, D. (2002). Induced responses in trees: Mediators of interactions among micro- and micro-herbivores? In *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems: 36th Symposium of the British Ecological Society* (Vol. 36, p. 201). Cambridge University Press.
- 25 Ferraz, S., Freitas, L. D. (2008). O controle de fitonematoides por plantas antagonistas e produtos naturais. *Departamento de Fitopatologia-UFV*, 1-17.
- Ferreira, A. M., Damasceno, R. F., Monteiro-Junior, R. S., Oliveira, I. A. C. D., Prates, T. E. C., Nunes, M. C. P., Haikal, D. S. A. (2019). Reações adversas ao benzonidazol no tratamento da Doença de Chagas: revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados e controlados. *Cadernos Saúde Coletiva*, 27, 354-362.
- 30 Ferreira, M. C., Cantrell, C. L., Wedge, D. E., Gonçalves, V. N., Jacob, M. R., Khan, S., ... Rosa, L. H. (2017). Antimycobacterial and antimalarial activities of endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic neotropical plant *Vellozia gigantea* from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(10), 692-697.
- 35 Ferreira, M. C., Vieira, M. D. L. A., Zani, C. L., de Almeida Alves, T. M., Junior, P. A. S., Murta, S. M., ... Vital, M. J. S. (2015). Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive

- 5 compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 59, 36-44.
- Fiocruz: Doenças Negligenciadas: Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>. Acesso em: 22 de Junho de 2018.
- 10 Firáková, S., Šturdíková, M., Múčková, M. (2007). Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Biologia*, 62(3), 251-257.
- Forsythe, P., Paterson, S. (2014). Ciclosporin 10 years on: indications and efficacy. *Veterinary Record*, 174(S2), 13-21.
- Fouda, A. H., Hassan, S. E. D., Eid, A. M., Ewais, E. E. D. (2015). Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). *Annals of*
 15 *Agricultural Sciences*, 60(1), 95-104.
- Fountoulakis, M., Juranville, J. F., Manneberg, M. (1992). Comparison of the Coomassie brilliant blue, bicinchoninic acid and Lowry quantitation assays, using non-glycosylated and glycosylated proteins. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 24(3-4), 265-274.
- Franco, E. A. P., Barros, R. F. M. (2006). Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho
 20 D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 8(3), 78-88.
- Freire, F. D. C. O., Vasconcelos, F. R., de Lima Coutinho, I. B. (2014). Fungos endofíticos: uma fonte de produtos bioativos de importância para a humanidade. *Essentia-Revista de Cultura, Ciência e Tecnologia da UVA*, 16(1).
- Freitas, T. M. D. Q., Meneghetti, R. C., Balardin, R. S. (2004). Dano devido à podridão vermelha da
 25 raiz na cultura da soja. *Ciência rural*, 34(4), 991-996.
- Frota, M. T. B. A., Siqueira, C. E. (2021). Agrotóxicos: os venenos ocultos na nossa mesa. *Cadernos de Saúde Pública*, 37.
- Fröhlich, J., Hyde, K. D. (1999). Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic?. *Biodiversity Conservation*, 8(7), 977-1004.
- 30 Fukaki, H., Tasaka, M. (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant molecular biology*, 69(4), 437.
- Galindo-Leal, C., de Gusmão Câmara, I. (Eds.). (2005). *Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas*. Fundação SOS Mata Atlântica.
- Gangwar, S., Singh, V. P., Srivastava, P. K., Maurya, J. N. (2011). Modification of chromium (VI)
 35 phytotoxicity by exogenous gibberellic acid application in *Pisum sativum* (L.) seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(4), 1385-1397.

- 5 Glass, N. L., Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1323-1330.
- Gomes, A. R. P. (2017). *Fungos coprinoides (Agaricales, Basidiomycota) em áreas do Nordeste brasileiro* (Master's thesis, Universidade Federal de Pernambuco).
- 10 Gomes, R. R., Glienke, C., Videira, S. I. R., Lombard, L., Groenewald, J. Z., Crous, P. W. (2013). Diaporthe: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 31, 1.
- Gonçalves, F. J. T., Freire, F. D. C. O., Lima, J. S. (2013). Fungos endofíticos e seu potencial como produtores de compostos bioativos. *Essentia-Revista de Cultura, Ciência e Tecnologia da UVA*, 15(1).
- 15 Gonçalves, V. N., Vaz, A. B., Rosa, C. A., Rosa, L. H. (2012). Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS microbiology ecology*, 82(2), 459-471.
- Gordon, S. A., Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, 26(1), 192.
- 20 Grogan, J., Barreto, P., Veríssimo, A. (2002). *Mogno na Amazônia brasileira: ecologia e perspectivas de manejo*. Imazon.
- Grogan, J., Landis, R. M., Ashton, M. S., Galvão, J. (2005). Growth response by big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) advance seedling regeneration to overhead canopy release in southeast Pará, Brazil. *Forest Ecology and Management*, 204(2-3), 399-412.
- 25 Gullison, R. E., Vriesendorp, C., Lobo, A. (2003). Effects of large-scale flooding on regeneration of big-leaf mahogany in the Bolivian Amazon. In *Big-Leaf Mahogany* (pp. 209-236). Springer, New York, NY.
- Gunatilaka, A. L. (2006). Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of natural products*, 69(3), 509-526.
- 30 Hamayun, M., Hussain, A., Khan, S. A., Kim, H. Y., Khan, A. L., Waqas, M., ... Lee, I. J. (2017). Gibberellins producing endophytic fungus *Porostereum spadiceum* AGH786 rescues growth of salt affected soybean. *Frontiers in microbiology*, 8, 686.
- Hamayun, M., Khan, S. A., Khan, A. L., Rehman, G., Kim, Y. H., Iqbal, I., ... Lee, I. J. (2010). Gibberellin production and plant growth promotion from pure cultures of *Cladosporium* sp. MH-6 isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Mycologia*, 102(5), 989-995.
- 35 Hartmann, A., Schmid, M., Van Tuinen, D., Berg, G. (2009). Plant-driven selection of microbes. *Plant and Soil*, 321(1-2), 235-257.

- 5 Hasan, H. A. H. (2002). Gibberellin and auxin production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. *Rostlinna vyroba*, 48(3), 101-106.
- Hipol, R. M. (2012). Molecular identification and phylogenetic affinity of two growth promoting fungal endophytes of sweet potato (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) from Baguio City, Philippines. *Electronic Journal of Biology*, 8(3), 57-61.
- 10 Holliday, P. (1970). *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. *CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria*, (220).
- Homans, A. L., Fuchs, A. (1970). Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of chromatography*, 51, 327-329.
- Hongyu, K., Sandanielo, V. L. M., de Oliveira Junior, G. J. (2016). Análise de componentes principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. *ES Engineering and science*, 5(1), 83-90
- 15 Horai, H. et al., 2010. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J. Mass Spectrom.* 45(7), pp. 703-714.
- Hossain, M. M., Sultana, F., Kubota, M., Koyama, H., Hyakumachi, M. (2007). The plant growth-promoting fungus *Penicillium simplicissimum* GP17-2 induces resistance in *Arabidopsis thaliana*
- 20 by activation of multiple defense signals. *Plant and cell physiology*, 48(12), 1724-1736.
- Huang, Y., Wang, J., Li, G., Zheng, Z., Su, W. (2001). Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 31(2), 163-167.
- Hyde, K. D., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Yang, Y. L., Zhang, J. Z., Prihastuti, H. (2009).
- 25 *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity*, 39(1), 1-17.
- Ikram, M., Ali, N., Jan, G., Jan, F. G., Khan, N. (2020). Endophytic fungal diversity and their interaction with plants for agriculture sustainability under stressful condition. *Recent patents on food, nutrition agriculture*, 11(2), 115-123.
- IUCN. Acesso em 18 de Julho de 2018. (2016) Disponível em: [http://atlas-for-the-end-of-the-](http://atlas-for-the-end-of-the-world.com/world_maps/world_maps_biological_hotspots.html)
- 30 [world.com/world_maps/world_maps_biological_hotspots.html](http://atlas-for-the-end-of-the-world.com/world_maps/world_maps_biological_hotspots.html)
- James, T. Y., Kauff, F., Schoch, C. L., Matheny, P. B., Hofstetter, V., Cox, C. J., Lumbsch, H. T. (2006). Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, 443(7113), 818.
- Jayanthi, D., Martin Paul, A., Sebastian, L. (2022). Isolation of Endophytic Actinobacteria from
- 35 Flowers, Fruits, and Seeds of Higher Plants. In *Methods in Actinobacteriology* (pp. 97-107). Humana, New York, NY.

- 5 Kaushik, N., Murali, T., Sahal, D., Suryanarayanan, T. (2014). A search for antiplasmodial metabolites among fungal endophytes of terrestrial and marine plants of southern India. *Acta Parasitologica*, 59(4), 745-757.
- Kendrik, J. B., Snyder, W. C. (1942) Fusarium yellows of beans. *Phytopathology*, St. Paul, v. 32, p. 1010-1014.
- 10 Khan, A. L., Hamayun, M., Kang, S. M., Kim, Y. H., Jung, H. Y., Lee, J. H., Lee, I. J. (2012). Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC microbiology*, 12(1), 3.
- Khan, A. L., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., Lee, I. J. (2015). Endophytic fungi: resource for gibberellins and crop abiotic stress resistance. *Critical reviews in biotechnology*, 35(1), 62-74.
- 15 Khan, S. A., Hamayun, M., Yoon, H., Kim, H. Y., Suh, S. J., Hwang, S. K., Kong, W. S. (2008). Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. *BMC microbiology*, 8(1), 1-10.
- Kumar, D. S. S., Hyde, K. D. (2004). Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity*.
- Kumar, R., Musiyenko, A., Barik, S. (2005). Plasmodium falciparum calcineurin and its association
20 with heat shock protein 90: mechanisms for the antimalarial activity of cyclosporin A and synergism with geldanamycin. *Molecular and biochemical parasitology*, 141(1), 29-37.
- Kusari, S., Singh, S., Jayabaskaran, C. (2014). Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. *Trends in biotechnology*, 32(6), 297-303.
- Leatemia, J. A., Isman, M. B. (2004). Insecticidal activity of crude seed extracts of *Annona* spp.,
25 *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* against lepidopteran larvae. *Phytoparasitica*, 32(1), 30-37.
- Lee, J. C., Lobkovsky, E., Pliam, N. B., Strobel, G., Clardy, J. (1995). Subglutinols A and B: immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. *The Journal of Organic Chemistry*, 60(22), 7076-7077.
- 30 Lemes, M. R., Gribel, R., Proctor, J., Grattapaglia, D. (2003). Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Molecular Ecology*, 12(11), 2875-2883.
- Li, J. Y., Sidhu, R. S., Ford, E. J., Long, D. M., Hess, W. M., Strobel, G. A. (1998). The induction of taxol production in the endophytic fungus—*Periconia* sp from *Torreya grandifolia*. *Journal of*
35 *Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(5), 259-264.
- Lieckfeldt, E., Meyer, W., Börner, T. (1993). Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *Journal of Basic Microbiology*, 33(6), 413-425.

- 5 Liu, F., Cai, L., Crous, P. W., Damm, U. (2014). The *Colletotrichum gigasporum* species complex. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 33, 83.
- Lombardi, J. A., Salino, A., Toledo, F. R. N., Marques, M. S. (1999). Lichens and other epiphyllous organisms on *Conchocarpus macrophyllus* JC Mikan in the Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brazil. *Brazilian Journal of Botany*, 22(3), 437-441.
- 10 Lopes, W., da Silva, A. F., de Souza, A. L., Neto, J. A. A. M. (2002). Estrutura fitossociológica de um trecho de vegetação arbórea no Parque Estadual do Rio Doce-Minas Gerais, Brasil. *Acta bot. bras*, 16(4), 443-456.
- Lorenzi, H., Matos, F. J. (2002). *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*.
- Lorenzi, H. (1992). Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas
15 do Brasil. Nova Odessa: Editora Plantarum 352p.-col. illus. Por Geog, 4.
- Lu, H., Zou, W. X., Meng, J. C., Hu, J., Tan, R. X. (2000). New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant science*, 151(1), 67-73.
- Malkus, A., Chang, P. F. L., Zuzga, S. M., Chung, K. R., Shao, J., Cunfer, B. M., Ueng, P. P. (2006). RNA polymerase II gene (RPB2) encoding the second largest protein subunit in *Phaeosphaeria*
20 *nodorum* and *P. avenaria*. *mycological research*, 110(10), 1152-1164.
- Mandyam, K., Jumpponen, A. (2005). Seeking the elusive function of the root-colonising dark septate endophytic fungi. *Studies in Mycology*, 53, 173-189.
- Masi, M., Santoro, E., Clement, S., Meyer, S., Scafato, P., Superchi, S., Evidente, A. (2020). Further secondary metabolites produced by the fungus *Pyricularia grisea* isolated from buffelgrass
25 (*Cenchrus ciliaris*). *Chirality*, 32(10), 1234-1242.
- Medici, E. P., Fernandes-Santos, R. C., Testa-José, C., Godinho, A. F., Brand, A. F. (2021). Lowland tapir exposure to pesticides and metals in the Brazilian Cerrado. *Wildlife Research*, 48(5), 393-403.
- Mendes, A. M. S. (2007). Introdução a fertilidade do solo. In *Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: CURSO DE MANEJO E CONSERVAÇÃO DO SOLO E DA ÁGUA,
30 2007, Barreiras. Palestras... Barreiras: MAPA; SFA-BA: Embrapa Semi-Árido; Embrapa Solos.
- Mi, C. N., Wang, H., Chen, H. Q., Cai, C. H., Li, S. P., Mei, W. L., Dai, H. F. (2019). Polyacetylenes from the Roots of *Swietenia macrophylla* King. *Molecules*, 24(7), 1291.
- Mittermeier, R. A., Turner, W. R., Larsen, F. W., Brooks, T. M., Gascon, C. (2011). Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. In *Biodiversity hotspots* (pp. 3-22). Springer, Berlin,
35 Heidelberg.
- Mitchell, D. H., Stiles, J. W., Santelli, J., Sanadi, D. R. (1979). Synchronous growth and aging of *Caenorhabditis elegans* in the presence of fluorodeoxyuridine. *Journal of gerontology*, 34(1), 28-36.

- 5 Moterle, L. M., Santos, R. F. D., Braccini, A. D. L., Scapim, C. A., Barbosa, M. C. (2008). Efeito da aplicação de biorregulador no desempenho agrônomo e produtividade da soja. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 30, 701-709.
- Moghadamtousi, S. Z., Goh, B. H., Chan, C. K., Shabab, T., Kadir, H. A. (2013). Biological activities and phytochemicals of *Swietenia macrophylla* King. *Molecules*, 18(9), 10465-10483.
- 10 Mohiddin, F. A., Majid, R., Bhat, A. H., Dar, M. S., Shikari, A. B., Sofi, N. R., Bhat, N. A. (2021). Molecular phylogeny, pathogenic variability and phytohormone production of *Fusarium* species associated with bakanae disease of rice in temperate agro-ecosystems. *Molecular Biology Reports*, 48(4), 3173-3184.
- Muhammed, M., Fuchs, B. B., Wu, M. P., Breger, J., Coleman, J. J., Mylonakis, E. (2012). The role of mycelium production and a MAPK-mediated immune response in the *C. elegans*-*Fusarium* model system. *Sabouraudia*, 50(5), 488-496.
- 15 Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853.
- Nassar, A. H., El-Tarabily, K. A., Sivasithamparam, K. (2005). Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. *Biology and Fertility of soils*, 42(2), 97-108.
- 20 Oliveira B.B., Deobald, G. A., Brun, T., Dal Prá, V., Junges, E., Kuhn, R. C., Mazutti, M. A. (2017). Solid-state fermentation for production of a bioherbicide from *Diaporthe* sp. and its formulation to enhance the efficacy. *3 Biotech*, 7(2), 1-9.
- 25 Oliveira, C. M., Araujo, A.R., Bolzani, V. S., Cafeu, M. C., Silva, G. H. (2006). Bioactive substances produced by AM-04 endophytic fungi isolated from *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae) leaves. 29 Annual meeting of the Brazilian Chemical Society Chemistry is energy: changes the life and keeps the environment Book of abstracts, (p. v). Brazil
- Oliveira, J. P. C., Ferreira, L. F., Chaves, M.H., Militão, G. C. G., V. Júnior, G.M., Costa, A. M., Pessoa, C., Moraes, M.O. de, Costa-Lotufo, L.V.(2012). Chemical constituents of *Lecythis pisonis* and cytotoxic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(5), 1140-1144.
- 30 Oliveira, R. G. D. (2018). Sentidos das Doenças Negligenciadas na agenda da Saúde Global: o lugar de populações e territórios. *Ciência Saúde Coletiva*, 23, 2291-2302.
- Oliveira, P. R. P. D. M. (2010). Variabilidade de isolados de *Fusarium* spp. causadores da podridão vermelha de raiz da soja.
- 35 Oyekan, P. O. (1975). Occurrence of cowpea wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* in Nigeria [Fungal diseases]. *Plant Disease Reporter*.
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2-3), 81-84.

- 5 Pedroso, L., Bertoldo, J. L., de Almeida Marchi, B., da Cruz, R. M. S., de Souza, B. C., Lermen, C., Alberton, O. (2017). Avaliação dos fitorreguladores auxina e giberelina na germinação e crescimento do arroz. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, 19(4).
- Peng, G., Byer, K. N., & Bailey, K. L. (2004). Pyricularia setariae: a potential bioherbicide agent for control of green foxtail (Setaria viridis). *Weed Science*, 52(1), 105-114.
- 10 Pereira, C. B., De Oliveira, D. M., Hughes, A. F., Kohlhoff, M., Vieira, M. L., Vaz, A. B. M., Alves, T. M. (2015). Endophytic fungal compounds active against Cryptococcus neoformans and C. gattii. *The Journal of antibiotics*, 68(7), 436.
- Perincherry, L., Lalak-Kańczugowska, J., Stępień, Ł. (2019). Fusarium-produced mycotoxins in plant-pathogen interactions. *Toxins*, 11(11), 664.
- 15 Petrini, O., Sieber, T. N., Toti, L., Viret, O. (1992). Ecology, Metabolite Production and Utilization in Endophytic Fungi. *Swiss Naturs Toxins*, 78, 196.
- Pes, M. P., Mazutti, M. A., Almeida, T. C., Curioletti, L. E., Melo, A. A., Guedes, J. V., Kuhn, R. C. (2016). Bioherbicide based on Diaporthe sp. secondary metabolites in the control of three tough weeds. *African Journal of Agricultural Research*, 11(42), 4242-4249.
- 20 Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., Rukachaisirikul, V., Sakayaroj, J. (2006). Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from Garcinia species. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 48(3), 367-372.
- Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P., Ho, W. H., McKenzie, E. H. C., Hyde, K. D. (2001). Fungi on Musa acuminata in Hong Kong. *Fungal Diversity*.
- 25 Pimentel, I. C., Kuczkowski, F. R., Chime, M. A., Auer, C. G., Junior, A. G. (2006). Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (Ilex paraguariensis A. St.-Hil.). *Floresta*, 36(1).
- Pinto, A. C., Silva, D. H. S., Bolzani, V. D. S., Lopes, N. P., Epifanio, R. D. A. (2002). Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química nova*, 45-61.
- Pontes, V. M. O. D., Souza Júnior, A. S. D., Cruz, F. M. T. D., Coelho, H. L. L., Dias, A. T. N., Coêlho, I. C. B., Oliveira, M. D. F. (2010). Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(2), 182-187.
- 30 Potter DA, Patterson CG, Redmond CT. 1992. Influence of turfgrass species and tall fescue endophyte on feeding ecology of Japanese beetle and southern masked chafer grubs (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Econ. Entomol.* 85:900–9
- 35 Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E. H. C., Hyde, K. D. (2009). Characterization of Colletotrichum species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity*, 39(1), 89-109.
- Pontes, V. M. O. D., Souza Júnior, A. S. D., Cruz, F. M. T. D., Coelho, H. L. L., Dias, A.

- 5 T. N., Coêlho, I. C. B., Oliveira, M. D. F. (2010). Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(2), 182-187.
- Quarles, W. (1992). Botanical pesticides from *Chenopodium*. *IPM practitioner*, 14(2), 1-11.
- Radhakrishnan, R., Khan, A. L., Kang, S. M., Lee, I. J. (2015). A comparative study of phosphate solubilization and the host plant growth promotion ability of *Fusarium verticillioides* RK01 and *Humicola* sp. KNU01 under salt stress. *Annals of microbiology*, 65(1), 585-593.
- 10 Rana, K. L., Kour, D., Sheikh, I., Dhiman, A., Yadav, N., Yadav, A. N., ... Saxena, A. K. (2019). Endophytic fungi: biodiversity, ecological significance, and potential industrial applications. In *Recent advancement in white biotechnology through fungi* (pp. 1-62). Springer, Cham.
- 15 Reis, E. F. D. (2013). Incidência de *Fusarium* spp. em soja sob diferentes preparos e coberturas do solo no inverno.
- Rezende, C. M., Fraga, S. R. (2003). Chemical and aroma determination of the pulp and seeds of murici (*Byrsonima crassifolia* L.). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14(3), 425-428.
- Ribeiro, M. A. D. V. (2011). Fungos endofitos dos azevens e das festucas: Efeitos da simbiose gramínea-endofito nos animais e nas plantas. *Pastos*, 231-243
- 20 Rios, G. P. (1988). Doenças fúngicas e bacterianas do caupi. *O caupi no Brasil*, 1, 547-589.
- Rodrigues, C., Mesquita, M. L. R., da Silva, A. P. G., Mondego, J. M. (2020) Potential of *Colletotrichum typhae* HC Greene mycoherbicide for bio-control of Southern cattail (*Typha domingensis* Pers.) plants.
- 25 Rodrigues, A. A., Menezes, M. (2002). Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de Serra Talhada e de Caruaru, Estado de Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira*, 27, 532-537.
- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., Redman, A. R. A. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytologist*, 182(2), 314-330.
- 30 Rodriguez, R. J., Woodward, C. J., Redman, R. S. (2012). Fungal influence on plant tolerance to stress. *Biocomplexity of plant-fungal interactions*. Oxford: Wiley-Blackwell, 155-163.
- Rosa, L. H., Cota, B. B., Machado, K. M., Rosa, C. A., Zani, C. L. (2005). Antifungal and other biological activities from *Oudemansiella canarii* (Basidiomycota). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(6-7), 983-987.
- 35 Rosa, L. H., Gonçalves, V. N., Caligiorne, R. B., Alves, T., Rabello, A., Sales, P. A., Zani, C. L. (2010). Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(2), 420-430.

- 5 Rosa, L. H., Vaz, A. B., Caligiorne, R. B., Campolina, S., Rosa, C. A. (2009). Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv.(Poaceae). *Polar Biology*, 32(2), 161-167
- Rosa, L. H., Vieira, M. L., Cota, B. B., Johann, S., Alves, T. M., Zani, C. L., Rosa, C. A. (2011). Endophytic fungi of tropical forests: a promising source of bioactive prototype molecules for the treatment of neglected diseases. In *Drug development-a case study based insight into modern strategies*. Intech.
- 10 Roze, L. V., Chanda, A., Linz, J. E. (2011). Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. *Fungal Genetics and Biology*, 48(1), 35-48.
- 15 Rowan, D. D., Popay, A. J. (2017). Endophytic fungi as mediators of plant-insect interactions. In *Insect-Plant Interactions* (1993) (pp. 99-120). CRC Press.
- Rustamova, N., Bozorov, K., Efferth, T., Yili, A. (2020). Novel secondary metabolites from endophytic fungi: synthesis and biological properties. *Phytochemistry Reviews*, 1-24.
- Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M., Sullivan, T. J. (1998). Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1), 319-343.
- 20 Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M., Faeth, S. H. (2004). Evolution of endophyte–plant symbioses. *Trends in plant science*, 9(6), 275-280.
- Santos, L., Rhoden, S. A., de Barros, I. T., Tonini, R. C. G., Marques, R. M., de Souza, V. H. E., Pamphile, J. A. (2013). A interação harmônica entre fungos e plantas: aspectos da relação endófito/hospedeiro. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, 8(1).
- 25 Schafhauser, T., Kirchner, N., Kulik, A., Huijbers, M. M., Flor, L., Caradec, T., van Pée, K. H. (2016). The cyclochlorotine mycotoxin is produced by the nonribosomal peptide synthetase CctN in *Talaromyces islandicus* ('*Penicillium islandicum*'). *Environmental Microbiology*, 18(11), 3728-3741.
- 30 Siciliano, I., Amaral Carneiro, G., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M. L. (2015). Jasmonic acid, abscisic acid, and salicylic acid are involved in the phytoalexin responses of rice to *Fusarium fujikuroi*, a high gibberellin producer pathogen. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(37), 8134-8142.
- Schulz, B., Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological research*, 109(6), 661-686.
- 35 Schulz, B., Sucker, J., Aust, H. J., Krohn, K., Ludewig, K., Jones, P. G., Döring, D. (1995). Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezicula* species. *Mycological Research*, 99(8), 1007-1015.

- 5 Schulz, B., Haas, S., Junker, C., Andrée, N., Schobert, M. (2015). Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. *Curr Sci*, 109(1), 39-45.
- Scolforo, J. R. S., Pérez, J. F. M., de Mello, J. M., de Oliveira, A. D., Camolesi, J. F., Borges, L. F. R., Júnior, F. W. A. (2015). Volume estimation, dry weight, oil content and quantufy of fenceposts of candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish). *Cerne*, 10(1), 087-102.
- 10 Serra, I. M. R. D. S., Silva, G. S. D., Nascimento, F. S., Lima, L. K. F. (2009). *Scytalidium lignicola* em mandioca: ocorrência no Estado do Maranhão e reação de cultivares ao patógeno. *Summa phytopathologica*, 35(4), 327-328.
- Sieber, T. N. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*, 21(2-3), 75-89.
- 15 Singh, A. K., Pandey, A. K. (2021) Evaluation of herbicidal activity of weed pathogenic fungi secondary metabolites as mycoherbicide for Weed *Sida acuta* Burm f. *International Journal of Research in Engineering and Science (IJRES)* : 2320-9364, ISSN (Print): 2320-9356.
- Sinha, R., Anand, S., Singh, D., Tripathi, S., Shukla, P., Singh, S., Srivastava, P. (2022). Bioprocessing strategies for microbial production and purification of immunosuppressants: an insight for process
20 intensification. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 108797.
- Sirrenberg, A., Göbel, C., Grond, S., Czempinski, N., Ratzinger, A., Karlovsky, P., Pawlowski, K. (2007). *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. *Physiologia Plantarum*, 131(4), 581-589.
- Slippers, B., Wingfield, M. J. (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody
25 plants: diversity, ecology and impact. *Fungal biology reviews*, 21(2-3), 90-106.
- Steiniger, C., Hoffmann, S., Mainz, A., Kaiser, M., Voigt, K., Meyer, V., Süssmuth, R. D. (2017). Harnessing fungal nonribosomal cyclodepsipeptide synthetases for mechanistic insights and tailored engineering. *Chemical science*, 8(11), 7834-7843.
- Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an
30 endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260(5105), 214-216.
- Sociedade Nacional de Agricultura. Disponível em: <http://www.sna.agr.br/mercado-de-herbicidas-deve-atingir-us-44-56-bilhoes-em-2023/>. Acesso em 24 de Junho de 2018.
- Souza, A. R. C., Baldoni, D. B., Lima, J., Porto, V., Marcuz, C., Ferraz, R. C., Mazutti, M. A. (2015). Bioherbicide production by *Diaporthe* sp. isolated from the Brazilian Pampa biome. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 575-578.
- 35 Sousa, O. V., Fioravante, I. A., Del-Vechio-Vieira, G., Caneschi, C. A. (2009). Investigação das atividades antinociceptiva e antiedematogênica do extrato etanólico das folhas de *Joannesia princeps* Vellozo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 30(1), 91-97.

- 5 Sousa, O. V., Fioravante, I. A., Yamamoto, C. H., Alves, M. S., Vieira, G. D. V., de Araújo, A. D. L. A. (2008). Propriedades biológicas das sementes de *Joannesia princeps* Vellozo. *HU Revista*, 33(1), 23-27.
- Souza, A. R. C. D., Baldoni, D. B., Lima, J., Porto, V., Marcuz, C., Machado, C., ... Mazutti, M. A. (2017). Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production. *brazilian journal of microbiology*, 48(1), 101-108.
- 10 Specian, V., Orlandelli, R. C., Felber, A. C., Azevedo, J. L., Pamphile, J. A. (2015). Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. *Journal of Health Sciences*, 16(4).
- Strobel, G., Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural
- 15 products. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 491-502.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural products*, 67(2), 257-268.
- Sukumar, P., Legue, V., Vayssieres, A., Martin, F., Tuskan, G. A., Kalluri, U. C. (2013). Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant–microorganism
- 20 interactions. *Plant, cell & environment*, 36(5), 909-919.
- Tabarelli, M., Pinto, L. P., Silva, J. M. C., Hirota, M. M., Bedê, L. C. (2005). Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade*, 1(1), 132-138
- Tan, R. X., Zou, W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural product reports*, 18(4), 448-459.
- 25 Tan, Y. Y., Spiering, M. J., Scott, V., Lane, G. A., Christensen, M. J., Schmid, J. (2001). In planta regulation of extension of an endophytic fungus and maintenance of high metabolic rates in its mycelium in the absence of apical extension. *Applied and environmental microbiology*, 67(12), 5377-5383.
- Tecchio, D. W., Dinon, A. L. N., De Moraes, M. N. C. (2021). MALÁRIA: Ciclo do parasita, patogenicia, tratamento e formas de profilaxia. *Revista Multidisciplinar em Saúde*, 2(4), 58-58
- 30 Teijaro, C. N., Adhikari, A., Shen, B. (2019). Challenges and opportunities for natural product discovery, production, and engineering in native producers versus heterologous hosts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(3-4), 433-444.
- Terhonen, E., Blumenstein, K., Kovalchuk, A., Asiegbu, F. O. (2019). Forest tree microbiomes and associated fungal endophytes: Functional roles and impact on forest health. *Forests*, 10(1), 42
- 35 Tibbett, M. (2000). Roots, foraging and the exploitation of soil nutrient patches: the role of mycorrhizal symbiosis. *Functional Ecology*, 14(3), 397-399...

- 5 Triastuti, A., Vansteelandt, M., Barakat, F., Jargeat, P., Rieusset, L., Fabre, N., Haddad, M. (2016). Search for novel metabolites in fungal endophytes: study of *Phomopsis* sp. and *Colletotrichum* sp. co-cultivation and *Botryosphaeria mamane* epigenetic modification. *Planta Medica*, 82(S 01), P662.
- Vallilo, M. I., Tavares, M., Aued-Pimentel, S., Campos, N. C., Neto, J. M. (1999). *Lecythis pisonis* Camb. nuts: oil characterization, fatty acids and minerals. *Food Chemistry*, 66(2), 197-200.
- 10 Vandepol, N., Liber, J., Desirò, A., Na, H., Kennedy, M., Barry, K., Bonito, G. (2020). Resolving the Mortierellaceae phylogeny through synthesis of multi-gene phylogenetics and phylogenomics. *Fungal diversity*, 104(1), 267-289.
- Verma, S. K., Gond, S. K., Mishra, A., Sharma, V. K., Kumar, J., Singh, D. K., Kharwar, R. N. (2017). Fungal Endophytes Representing Diverse Habitats and Their Role in Plant Protection. In *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology* (pp. 135-157). Springer, Singapore.
- 15 Venieraki, A., Dimou, M., Katinakis, P. (2017). Endophytic fungi residing in medicinal plants have the ability to produce the same or similar pharmacologically active secondary metabolites as their hosts. *Hellenic Plant Protection Journal*, 10(2), 51-66.
- 20 Vieira, B. S., Dias, L. V. S. A., Langoni, V. D., Lopes, E. A. (2018). Liquid fermentation of *Colletotrichum truncatum* UFU 280, a potential mycoherbicide for beggartick. *Australasian Plant Pathology*, 47(3), 277-283.
- Vieira, M. E. B., Vasconcelos, I. M., Machado, O. L. T., Gomes, V. M., Carvalho, A. D. O. (2015). Isolation, characterization and mechanism of action of an antimicrobial peptide from *Lecythis pisonis* seeds with inhibitory activity against *Candida albicans*. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 47(9), 716-729.
- 25 Vieira, M. L., Hughes, A. F., Gil, V. B., Vaz, A. B., Alves, T. M., Zani, C. L., Rosa, L. H. (2012). Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell.(Solanaceae). *Canadian Journal of Microbiology*, 58(1), 54-66.
- 30 Vieira, E. L., Castro, P. R. (2001). *Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical* (No. 631.8 C355a). Guaíba, BR: Editora Agropecuária.
- Vigneshwari, A., Rakk, D., Németh, A., Kocsubé, S., Kiss, N., Csupor, D., Szekeres, A. (2019). Host metabolite producing endophytic fungi isolated from *Hypericum perforatum*. *PloS one*, 14(5), e0217060.
- 35 Vizzotto, M., Krolow, A. C. R., Weber, G. E. B. (2010). Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. *Embrapa Clima Temperado-Docmentos (INFOTECA-E)*.

- 5 Vrabka, J., Niehaus, E. M., Münsterkötter, M., Proctor, R. H., Brown, D. W., Novák, O., Bergougnoux, V. (2019). Production and role of hormones during interaction of *Fusarium* species with maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Frontiers in plant science*, 9, 1936.
- Waibel, R., Benirschke, G., Benirschke, M., Achenbach, H. (2003). Sesquineolignans and other constituents from the seeds of *Joannesia princeps*. *Phytochemistry*, 62(5), 805-811.
- 10 Waqas, M., Khan, A. L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S. M., Kim, Y. H., Lee, I. J. (2012). Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules*, 17(9), 10754-10773.
- World Health Organization. (2020). Neglected Tropical Diseases <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/neglected-tropical-diseases>.
- 15 Weng, H. B., Chen, H. X., Wang, M. W. (2018). Innovation in neglected tropical disease drug discovery and development. *Infectious diseases of poverty*, 7(1), 1-9.
- Welsh, J., McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research*, 18(24), 7213-7218.
- Wilson, D. (1995). Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*,
20 274-276.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., Taylor, J. L. (1990). Amplification and direct sequencing of
25 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Panphut, W., Thongon, N., Danwisetkanjana, K., Ruangrunsi, N., Meevootisom, V. (2004). Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World journal of microbiology and*
30 *biotechnology*, 20(3), 265-272.
- Wrigley, S. (Ed.). (2000). Biodiversity: New leads for the pharmaceutical and agrochemical industries (Vol. 257). Royal Society of Chemistry.
- Wu, Q., Patocka, J., Kuca, K. (2019). Beauvericin, a *Fusarium* mycotoxin: anticancer activity, mechanisms, and human exposure risk assessment. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 19(3),
35 206-214.
- Xu, Z., Shi, M., Tian, Y., Zhao, P., Niu, Y., Liao, M. (2019). Dirhamnolipid produced by the pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* BWH-1 and its herbicidal activity. *Molecules*, 24(16), 2969.

- 5 Yan, F., Schubert, S., Mengel, K. (1996). Soil pH changes during legume growth and application of plant material. *Biology and Fertility of Soils*, 23(3), 236-242.
- Yang, R. Y., Feng, P. Y., Li, Q. (2006). Research advances on the activity of endophyte pesticides. *PESTICIDES-SHENYANG*-, 45(7), 440.
- Yuan, J. I., Jian-Nan, B. I., Bing, Y. A. N., Xu-Dong, Z. (2006). Taxol-producing fungi: a new approach to industrial production of taxol. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22(1), 1-6.
- 10 You, Y. H., Yoon, H., Kang, S. M., Woo, J. R., Choo, Y. S., Lee, I. J., Kim, J. G. (2013). *Cadophora malorum* Cs-8-1 as a new fungal strain producing gibberellins isolated from *Calystegia soldanella*. *Journal of basic microbiology*, 53(7), 630-634.
- Zaia, D. A., Zaia, C. T. B., Lichtig, J. (1998). Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química nova*, 21(6), 787-793.
- 15 Zagatto, P. A., Bertolleti, E. (2008). *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações* (Vol. 478). (Ed.). São Carlos: RiMa.

9. APÊNDICES

APÊNDICE A- Coletas vegetais.

Tabela 15. Localização geográfica dos espécimes vegetais.

Vegetal	Código da Amostra	Longitude (W)	Latitude (S)
		GSM	
<i>Swietenia macrophylla</i> ^a	MAF	42°37'51.31"	19°45'45.65"
<i>Swietenia macrophylla</i> ^b	MMF	42°37'52"	19°45'46"
<i>Joannesia princeps</i> ^a	CAF	42°37'24"	19°45'56"
<i>Joannesia princeps</i> ^b	CMF	42°37'52"	19°45'46"
<i>Lecythis pisonis</i> ^a	SAF	42°38'09"	19°45'21"
<i>Lecythis pisonis</i> ^b	SMF	42°37'52"	19°45'46"

Legenda: a:adulto; b: muda.

10 **Fonte:** Elaborado pela autora.

APÊNDICE B- Testes estatísticos efetuados para as plântulas com fungos inoculados.

Tabela 16. Valores de p obtidos no teste T para os parâmetros do desenvolvimento biológico das plântulas de *Phaseolus vulgaris*.

¹ UFMGCB	^a Táxon proposto	^b Valores de p		
		Peso seco (g)	Comprimento da raiz (mm)	Comprimento do caule (mm)
18288	<i>Dactylonectria</i> sp.	0,13	0,049	0,076
18285	<i>Dactylonectria</i> sp.	-	-	-
18278	<i>Coprinellus</i> sp.	0,46	0,127	0,972
18283	<i>Dactylonectria</i> sp.	0,16	0,269	0,086
18293	<i>Talaromyces</i> sp.	0,44	0,292	0,216
18279	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
18290	*	-	-	-
18289	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-

15 **Legenda:** ¹UFMGCB: Coleção de micro-organismos e células da Universidade Federal de Minas Gerais; ^aTáxon submetido a análise filogenética baseada na região ITS1-5.8S-ITS2; ^bValor de P: considerando α : 0,05; (-): Quando não foi possível calcular o valor; (*) não identificado.

Fonte: Elaborado pela autora.

5

- 10 **Tabela 17.** Valores de p obtidos no teste T para os parâmetros do desenvolvimento biológico das plântulas de *Glycine max*.

¹ UFMGCB	^a Táxon proposto	^b Valores de p		
		Peso seco (g)	Comprimento da raiz (mm)	Comprimento do caule (mm)
18288	<i>Dactylonectria</i> sp.	0,10	0,22	0,063
18285	<i>Dactylonectria</i> sp.	0,91	0,17	0,06
18278	<i>Coprinellus</i> sp.	0,37	0,59	0,7
18283	<i>Dactylonectria</i> sp.	0,53	0,17	0,45
18293	<i>Talaromyces</i> sp.	0,35	0,50	0,13
18279	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
18290	*	-	-	-
18289	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-

Legenda: ¹UFMGCB: Coleção de micro-organismos e células da Universidade Federal de Minas Gerais; ^aTáxon submetido a análise filogenética baseada na região ITS1-5.8S-ITS2; ^bValor de P: considerando α : 0,05; (-): Quando não foi possível calcular o valor; (*) não identificado.

- 15 **Fonte:** Elaborado pela autora.

5

APÊNDICE C- Testes estatísticos efetuados para as plântulas sob influência do meio líquido fermentado contendo auxina.

Tabela 18. Valores de p obtidos no teste T para os parâmetros do desenvolvimento biológico das plântulas de *Phaseolus vulgaris*.

¹ UFMGCB	^a Táxon proposto	^a Valores de p		
		Peso seco (g)	Comprimento da raiz (mm)	Comprimento do caule (mm)
18288	<i>Dactylonectria</i> sp.	0,039	0,80	-
18285	<i>Dactylonectria</i> sp.	0,26	0,33	0,05
18278	<i>Coprinellus</i> sp.	0,66	0,06	0,30
18283	<i>Dactylonectria</i> sp.	0,34	0,94	0,18
18293	<i>Talaromyces</i> sp.	0,3	0,86	0,55
18279	<i>Fusarium</i> sp.	0,68	0,01	0,44
18290	*	0,33	0,00	0,15
18289	<i>Fusarium</i> sp.	0,90	0,39	0,60

Legenda: ¹UFMGCB: Coleção de micro-organismos e células da Universidade Federal de Minas Gerais; ^aTáxon submetido a análise filogenética baseada na região ITS1-5.8S-ITS2; ^bValor de P: considerando α : 0,05; (-): Quando não foi possível calcular o valor; (*) não identificado.

10

Fonte: Elaborado pela autora.

15

20

5

10

Tabela 19. Valores de p obtidos no teste T para os parâmetros do desenvolvimento biológico das plântulas de *Glycine max*.

¹ UFMGCB	^a Táxon proposto	^b Valores de p		
		Peso seco (g)	Comprimento da raiz (mm)	Comprimento do caule (mm)
18288	<i>Dactylonectria</i> sp.	0,18	0,49	0,52
18285	<i>Dactylonectria</i> sp.	0,03	0,34	0,26
18278	<i>Coprinellus</i> sp.	0,28	0,36	0,07
18283	<i>Dactylonectria</i> sp.	0,35	0,85	0,10
18293	<i>Talaromyces</i> sp.	0,31	0,001	-
18279	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
18290	*	-	-	-
18289	<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-

Legenda: ¹UFMGCB: Coleção de micro-organismos e células da Universidade Federal de Minas Gerais; ^aTáxon submetido a análise filogenética baseada na região ITS1-5.8S-ITS2; ^bValor de P: considerando α : 0,05; (-): Quando não foi possível calcular o valor; (*) não identificado.

Fonte: Elaborado pela autora.

15

5

APÊNDICE D- Ensaio colorimétrico da Auxina.

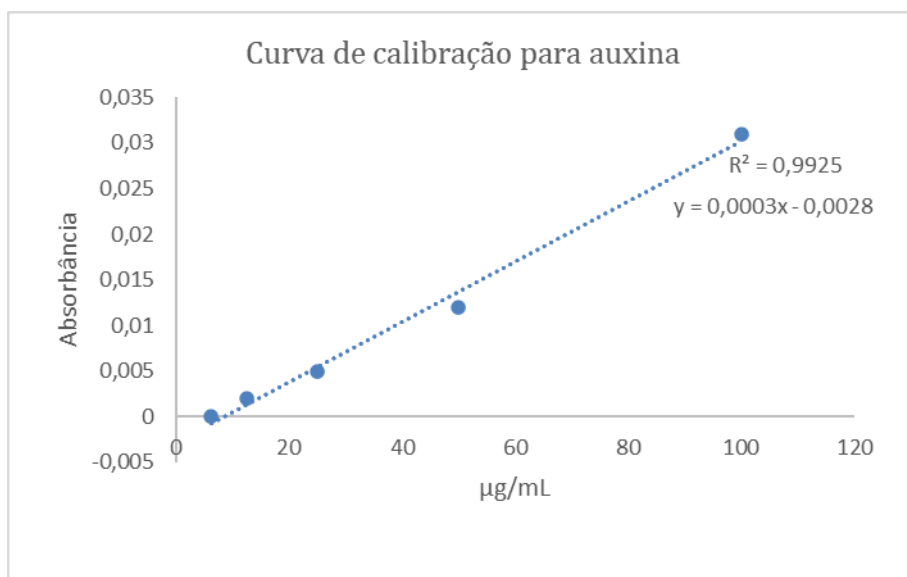


Figura 23. Curva de calibração com auxina.

Fonte: Elaborado pela autora.

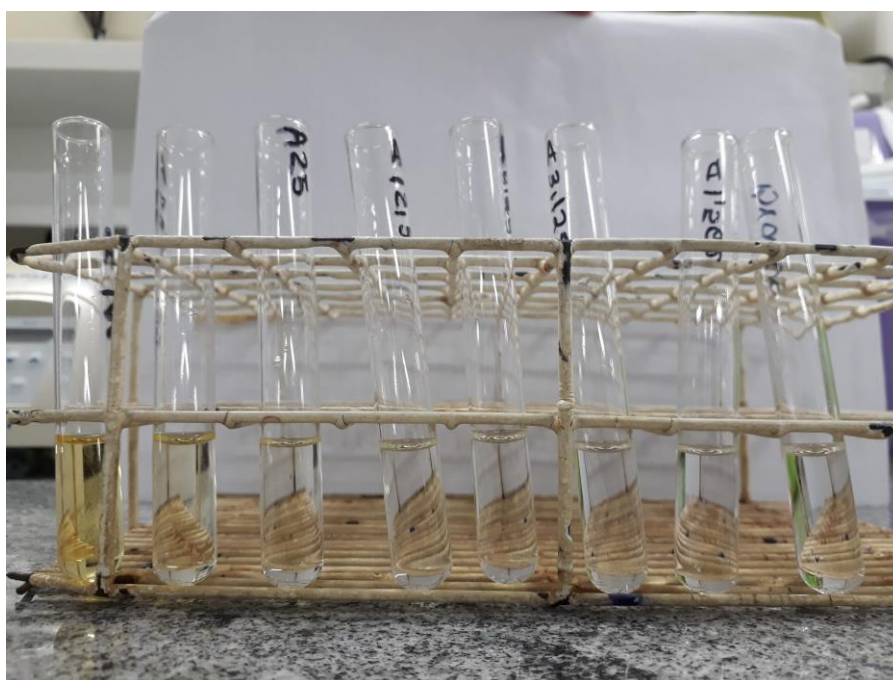


Figura 24. Diluição seriada contendo hormônio auxina.

Fonte: Elaborado pela autora.

10

5 **10. ANEXOS**

Chapter 10 1

Association of Endophytic Fungi 2

with Ancient Neotropical Plants 3

Marina Bahia and Luiz Henrique Rosa 4

Abstract The Neotropical region has the largest diversity of plants in the world 5
and includes seven of the 35 biodiversity hotspots present on the planet. It is still 6
unclear what factors are related to this region's high biodiversity. Only few plants in 7
this region have been studied so far for their associated endophytic fungi diversity. 8
Neotropical plant species with slow growth are known as centennial plants and con- 9
tain an interesting and promising natural reservoir of endophytic fungi that are still 10
unexplored. In addition, questions regarding the ecology, evolution, genetics, and 11
biotechnological applications of endophytic fungi associated with centennial plants 12
still remain unaddressed. Thus, this chapter aims to discuss the endophytic fungi 13
diversity of centennial plants in the Neotropical region. 14

Keywords Endophytic fungi · Neotropics · Centennial trees 15

10.1 Introduction 16

10.1.1 Neotropical Plants and Their Endophytic 17

Fungal Assemblages 18

The Neotropical region includes Central America, the Caribbean, and South 19
America. Although some parts of South America are not tropical, but the entire 20
region is included in the Neotropical region by definition. The different Neotropical 21
biomes are recognized for having the greatest diversity of plants in the world 22
(Tundisi et al. 2008), which includes seven of the 35 biodiversity hotspots on the 23
planet (Mittermeier et al. 2011). For this reason, the Neotropical biomes have 24

M. Bahia (✉)

Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas
Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

L. H. Rosa

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de,
Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

attracted the attention of researchers in different domains. For instance, the species present in this region have not been studied yet in terms of diversity, ecology, evolutionary history, preservation, and biotechnology (Tinoco et al. 2015). The recognized Neotropical biomes include the tropical Amazon and Atlantic forests, high Andean meadows (Páramos, Puna and Jalca), Pampas, seasonally dry forests, Savannas and Campos Rupestres, Chaco deserts, and Pantanal (Lima et al. 2018).

The underlying factors related to the history of the South and Central American continent, which would have influenced the origin of such a huge biodiversity, are still debatable (Ribas et al. 2018). The theory of forest refuges that is considered as an important paradigm regarding the mechanisms and patterns of distribution of flora and fauna in Neotropical America was the first to try to relate the history of the South American continent to the origin of its biological diversity. However, the facts and events concerning the refuge theory are centred towards the field of spatial projections of Quaternary climatic fluctuations (Ab' Sáber 1992). The Quaternary period, which includes the Pleistocene and the Holocene, is characterized as a period of great climatic fluctuations with long time periods of very low temperatures (glaciations) interspersed with warmer periods, such as the current period (Salgado-Labouriau 1994). The relative speed with which the Quaternary climatic fluctuations unfolded and the changes that took place in geoeological structure had important implications on the distribution of flora and fauna in the intertropical regions at various levels, including the mosaic of lowland vegetation, and the vegetation at different altitude ranges, mountain massifs, and blocks (Ab' Sáber 1992). From a phytogeographic point of view, this period depicts such behaviour due to the occurrence of various transformations in palaeovegetation that took place in different places, for instance, in the passage from glacial to interglacial stages and vice versa. These transformations added to the previously existing landscapes, filling old geoeological space and leading to a noticeable decrease in the available space for the survival of old regional stocks of vegetation (Ab' Sáber 1992).

However, detailed information about this process can be elucidated through the use of molecular data to unravel the phylogenetic and phylogeographic relationships (Ribas et al. 2018). The association of these results with the morphological and geographic variations of different organisms has led to the recent changes observed in the way the studies for understanding the patterns of diversification and biogeographic history have been carried out, mainly with the development of new methodological approaches, such as molecular biology. These studies have helped to further unveil the mechanisms that control the generation of biodiversity and, consequently, allowed to better understand the origin of patterns that are being rapidly de-characterized by the destruction of the Neotropical biomes (Ribas et al. 2018).

Despite the important status of Neotropical biomes, deforestation has a long history in this territory, mainly in the hotspot areas, where high annual species loss rates have been recorded over the years (Achard et al. 2002). An appropriate example of a threatened Neotropical biome is the Atlantic Forest, in which only 12.4% of

the forest that originally existed remains, and the remaining 80% is included in private areas (INPE 2019).

Although there is a high diversity of plant species in the Neotropics, only a few species have been studied in relation with their community of endophytic fungi (Arnold and Lutzoni 2007). Frohlich and Hyde (1999) and Arnold and Lutzoni (2007) proposed that on the planet, the diversity of endophytic fungi is greatly distributed in tropical forests than in other regions, mainly due to the richness of endemic plants, phytogeographic variety, and high rainfall rates, all of which increase the spread of fungal propagules facilitating the horizontal transmission (Slippers and Wingfield 2007). It is believed that the vast majority of endophytic fungi have not been described yet in different tissues of tropical trees (Arnold et al. 2001). Typically, hundreds of endophytic species can be isolated from a single plant (Orlandelli et al. 2012; Rhoden et al. 2012). However, information on the selectivity of endophytic fungi in relation to a specific host is limited. Bayman et al. (1998) carried out a study with centennial tropical trees and found no specificity of fungal species in different plant tissues. However, there are endophytic fungi that were shown to have a preference for a genus or family of a certain plant, as indicated in the study conducted by Bose (1947), who reported that the endophytic fungus *Phomopsis casuariane* is abundant only in the plant species of the genus *Casuarina*.

In general, endophytic fungi from centennial plants have been poorly studied. Issues regarding their ecology, evolution, genetics, and biotechnological applications are also poorly understood. Arnold and Lutzoni (2007) stipulated some questions regarding the relationship between endophytic fungi and centennial plants that are as follows:

1. How many fungal species are capable to form endophytic associations with a given host?
2. How specialized is the fungus with regard to the host plant?
3. Are the symbionts restricted to a specific host and geographic range?
4. Are these microorganisms related to the resilience and longevity of their host plants?

Strobel and Daisy (2003) proposed that the relationship between the endophytes and their host plants evolved hundreds of millions of years ago at the same time when the higher plants first appeared on Earth. The horizontal transfer of genetic material between distant organisms is considered to play an important role in the evolution of prokaryotes and eukaryotes, which may also have occurred in relation to fungi (Schmitt and Lumbsch 2009). Evidences of plants associated with microorganisms have been discovered from fossilized stem and leaf tissues. As a result of this long relationship, it is possible to imagine that some of these endophytes might have developed genetic systems that allow the transfer of genetic information between themselves and the host plants (Strobel and Daisy 2003).

10.2 Neotropical Centennial Plants and Their Endophytic Fungi

Some of the previous studies have shown that the geographic location of the plants and the age of the leaves directly influence the density of infection by the endophytes in the tropical forests (Azevedo 1998). However, according to Arnold and Herre (2003), the ecological factors underlying these observations have been poorly characterized so far. A significant proportion of tropical plants are centuries old. These trees are slow growing, and they take a lot of time to produce their woody tissue at a high density. Plant ontogeny can be divided into periods or stages based on the increase and extinction of reproductive function, and on certain juvenile and adult characteristics, which are distinguished by the pre-reproductive (juvenile), reproductive (adult), and post-reproductive periods (senile) (Gatsuk et al. 1980). However, a more detailed division of the ontogenetic sequences can be achieved using the information regarding the process of formation and development of plant structures, their changes, and death as well as the correlation of these processes in an organism. Senile plants have no fruits, and the signs of senescence are more evident in them (Gatsuk et al. 1980). Table 10.1 shows the assemblages of endophytic fungi associated with the centennial plants.

From the data presented in Table 10.1, it can be seen that there is a high proportion of studies on endophytic fungi in centennial trees in the Amazon. The Amazon biome is one of the largest in the Neotropical region, which includes Brazil, Peru, Bolivia, Colombia, Ecuador, and Venezuela. Despite the immensity, the concern with regard to the in situ genetic conservation of tree species in this region has been growing due to the constant advances in the agricultural front, burning, and deforestation (Ferreira et al. 2005). Carapa is an example of a centennial plant that hosts endophytic fungi in this biome. *Copaifera langsdorffii* (Fig. 10.1) has been shown to harbour endophytic fungi of the genus *Diaporthe* (Carvalho et al. 2018). Similarly, *Vellozia gigantea* (Fig. 10.2) that inhabits another biome, the Rupestrian grassland has been shown host to the same genus of fungi. Moreover, *Diaporthe miriciae* extracts showed antifungal, antibacterial, and antimalarial activities (Ferreira et al. 2017b). This genus includes pathogenic, endophytic, and saprobic species, with wide distribution in temperate and tropical regions. Although *Diaporthe* species have been distinguished mainly based on host association in the past, studies have confirmed several taxa with wide host ranges, suggesting that they move freely between different hosts, often co-colonizing the diseased or dead tissues, while some species are known for their host specificity. Because of its importance as a plant pathogen, the genus was thoroughly investigated for its secondary metabolites, aiming at the discovery of new bioactive natural products, but this information was never compiled properly (Chepkirui and Stadler 2017).

Hevea brasiliensis (rubber tree) (Table 10.1) is among one of the most studied trees in this biome for its endophytic biology, mainly due to its high economic value and its ability to produce latex, which is used in the industry for the manufacture of tyres, products for medical use, paramedics, stickers, and shoes. It has also been

Table 10.1 Studies of endophytic fungi associated with the centennial plants in the Neotropical region

Reference	Isolation organ	Host	Average host lifetime	Biome	Endophytic fungi	Biotechnological application
Gazis and Chaverri (2010)	Leaf, stalk, and latex	<i>Hevea brasiliensis</i>	230	Amazon	<i>Pestalotiopsis</i> aff. <i>Palmarum</i> and <i>Trichoderma harzianum</i> are more commonly found common found	–
Unterseher et al. (2013)	Leaf	<i>Hevea brasiliensis</i>	230	Amazon	<i>Metagenomic analysis demonstrated the most common genus: Hipocreales, Diaporthales, Eurotiales, Botryosphaeriales, and Taphriniales</i>	–
Gazis et al. (2012)	Albumen and leaf	<i>Hevea brasiliensis</i>	230	Amazon	Discovery of a new <i>Xylonomycetes</i> class	Cellulose and lignin degradator
Holanda et al. (2019)	Leaf	<i>Bertholletia excelsa</i>	500	Amazon	<i>Aspergillus bertholletiae</i> , <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium paxill.</i> and <i>Trichoderma</i> sp.	Degradation of chloramphenicol (persistent micropollutant)
Zanotto et al. (2009)	Seeds	<i>Bertholletia excelsa</i>	500	Amazon	8 unidentified fungi	Application in biocatalysis as suppliers of lipases linked to mycelium
Fernandes et al. (2019)	Seeds	<i>Copaifera langsdorffii</i>	400	Savanna and Amazon	–	Positive effects on seed germination

(continued)

Table 10.1 (continued)

Reference	Isolation organ	Host	Average host lifetime	Biome	Endophytic fungi	Biotechnological application
Ferreira et al. (2015)	Leaf	<i>Carapa guianensis</i>	100	Amazon	162 isolated fungi belonging to the genera <i>Aspergillus</i> , <i>Beltrania</i> , <i>Botryosphaeria</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Diaporthe</i> , <i>Endomelanconiopsis</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Guignardia</i> , <i>Pestalotiopsis</i> , <i>Phomopsis</i> , <i>Pilidiella</i> , <i>Trichoderma</i> , and <i>Xylaria</i> . Most frequent species are <i>C. guianensis</i> , <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Diaporthe</i> cf. <i>Mayteni</i> , and <i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp. and <i>Pilidiella wangiensis</i> showed selective antibacterial activity. <i>Diaporthe</i> cf. <i>mayteni</i> and <i>Endomelanconiopsis endophytica</i> showed high activity against anastigote forms of <i>Trypanosoma cruzi</i> . <i>Colletotrichum</i> sp. <i>Guignardia mangiferae</i> , <i>Pestalotiopsis</i> sp., and <i>Diaporthe melonis</i> were able to inhibit the proliferation of the yellow fever virus
Cannon and Simmons (2002)	Leaf	<i>Carapa guianensis</i>	100	Amazon	<i>Ascomycota</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Colletotrichum acutatum</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Ellisiopsis</i> , <i>Khuskia</i> , <i>Nodulisporium</i> , <i>Pestalotiopsis</i> , <i>Phomopsis</i> , and <i>Ramichloridium</i>	–
Cannon and Simmons (2002)	Leaf	<i>Jacaranda</i> sp.	100	Amazon	<i>Beltrania rhombica</i> , <i>Botryodiplodia theobromae</i> , <i>Clonostachys</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Hemicola</i> , <i>Nodulisporium</i> , and <i>Khuskia</i>	–
Cannon and Simmons (2002)	Leaf	<i>Manilkara bidentata</i>	100	Amazon	<i>Ascomycota</i> , <i>Beltrania rhombica</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Colletotrichum orbiculare</i> , <i>Pestalotiopsis</i> , and <i>Phomopsis</i>	–

t1.21
t1.22
t1.23
t1.24
t1.25
t1.26
t1.27
t1.28
t1.29
t1.30
t1.31
t1.32
t1.33
t1.34
t1.35
t1.36
t1.37
t1.38
t1.39
t1.40
t1.41
t1.42
t1.43

Reference	Isolation organ	Host	Average host lifetime	Biome	Endophytic fungi	Biotechnological application
Cannon and Simmons (2002)	Leaf	<i>Mora excelsa</i>	100	Amazon	<i>Pestalotiopsis</i> , <i>Phomopsis</i> , <i>Verticillium</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Colletotrichum orbiculare</i> , <i>Dicryochaeta triseptata</i> , <i>Guignardia</i> , <i>Hemicola</i> , <i>Khuskia</i> , <i>Nigrospora sphaerica</i> , <i>Nodulisporium</i> , and <i>Xylariaceae</i>	–
Cavalcanti et al. (2017)	Tree bark	<i>Schinopsis brasiliensis</i>	150	Catinga	5 unidentified fungi	Tanase for applications in the food, chemical beverage, and pharmaceutical industries
Mazarotto et al. (2019)	Seeds	<i>Aspidosperma polyneuron</i>	140	Atlantic forest	<i>Fusarium</i> spp. and <i>Phomopsis</i> spp.	–
Ferreira et al. (2017a)	Leaf and root	<i>Vellozia gigantea</i>	500	Rupestrian grassland	<i>Diaporthe</i> was the most abundant genus of the 70 endophytic	–
Oses et al. (2008)	Xylem	<i>Nothofagus obliqua</i>	100		<i>Xylaria</i> sp. and <i>Bjerkandera adusta</i>	
Carvalho et al. (2018)	Leaf	<i>Carapa pubiflora</i>	100	Amazon	<i>Diaporthe miricidae</i>	Fungal extract with antifungal activity against phytopathogens fungi <i>Colletotrichum acutatum</i> , <i>C. fragariae</i> , and <i>C. gloeosporioides</i>

t1.44
t1.45
t1.46
t1.47
t1.48
t1.49
t1.50
t1.51
t1.52
t1.53
t1.54
t1.55
t1.56
t1.57
t1.58
t1.59
t1.60
t1.61
t1.62
t1.63



Fig. 10.1 Picture of the centennial tree *Copaifera langsdorffii* living in the Amazon forest, Roraima State, Brazil. (Photo: C.R. Carvalho)

widely used in the transport and war product industries as a raw material, as it exhibits good insulating properties and impermeability to both air and water (Malmonge et al. 2009). *Bertholletia excelsa*, commonly known as Brazil nut tree, is among the tallest trees in this forest region. Its fruits, popularly known as Brazil nuts, are one of the main products that are collected and sold by the extractivists. They form a significant part of the nuts, which are harvested and exported to developed countries, and they are added to ice creams, chocolates, and other deserts. Due to its significance in local and regional economies, *B. excelsa* is protected by the law, and thus, the cutting and sale of Brazil nuts have been banned since 1987; however, deforestation of *B. Excelsa* still persists (Angelo et al. 2013).

Usually, the part of the plant mostly used for fungal isolation is the leaf. According to Arnold and Lutzoni (2007), leaves represent the most dynamic interface between the plants and the environment, and the fungi that inhabit these biologically active tissues share characteristics that allow them to grow and persist in an environment that is undergoing constant biochemical changes. Endophytic fungi that were isolated from the centenary plants have been shown to contribute to their development and resilience. For instance, *Trichoderma harzianum*, which was isolated from *H. brasiliensis*, contributes to the promotion of the plant growth and acts in the control of phytopathogens (Pomella and Ribeiro 2009). According to the in vitro research conducted by Altomare et al. (1999), the plant growth promoted by *T.*



Fig. 10.2 Picture of the centennial tree *Vellozia gigantea* living in the Serra do Cipó National Park (Rupestrian grassland), Minas Gerais State, Brazil. (Photo: L.H. Rosa)

harzianu is mainly due to its ability to solubilize important nutrients for the plant. According to Baugh and Escobar (2007), the action of *Trichoderma* spp. as a growth stimulator is complex and is carried out by interactions with biochemical factors and by the production of several enzymes and beneficial substances. The fungal species *Penicillium excelsum* that was isolated from different *B. excelsa* tissues produces kojic acid, which is used in the cosmetics industry (Taniwaki et al. 2012). Despite the importance of endophytic fungi, very little is known about their ecological and evolutionary relationships as well as their importance in the Neotropical centennial trees.

10.3 Co-evolution Between Endophytic Fungi and Hosts

Although the knowledge regarding the ecology, life history, and phylogeny of endophytic fungi has been rapidly acquired in the past two decades, basic questions revolving around the evolutionary origin, speciation, and ecological role of endophytes remain largely unanswered. Key elements for the evolution of the lifestyle of endophytic fungi are more complex and involve interactions between species and multidirectional flows, which are influenced by casual events, such as abiotic and biotic environmental conditions, which drive the life history of fungi in co-evolution

187 with host plants (Saikkonen et al. 2004). The co-evolution of plants and fungi seems
 188 to be the key factor for shaping the diversity in plants, and by far, the entire terres-
 189 trial ecosystem. Therefore, further research is needed to unravel this phenomenon.
 190 By integrating genotypes at the broadest phylogenetic scales, mycologists and bota-
 191 nists are trying to examine the recent as well as the historical features of important
 192 symbiotic systems in order to develop modern co-evolutionary models (Arnold
 193 et al. 2001).

194 Saikkonen et al. (2010) demonstrated that the genetic incompatibilities, maternal
 195 effects, and loss of infections commonly occur in the plant-endophyte interactions,
 196 and this may partially explain the differences detected in the infection frequencies
 197 and genetic structures among the natural plant populations (Lacap et al. 2003). For
 198 example, seeds produced by crossbreeding must possess a high frequency of incom-
 199 patibilities between the fungus and the grass, and therefore, pioneer grass popula-
 200 tions that exhibit a large proportion of newly established individuals must have low
 201 frequencies of infection than the old populations. Thus, the high frequency of
 202 grasses infected with endophytes is detected in the meadows compared to the sandy
 203 banks of rivers, which further support this view (Carroll 1995). Meadows are con-
 204 sidered as more stable and fertile environments, where the grass populations are
 205 well established due to clonal propagation (Carroll 1995; Arnold et al. 2001). In
 206 addition, it has been reported that the maternal environment can strongly affect the
 207 inflorescence in grasses with a time delay, and therefore, can also affect the disper-
 208 sion and competitive capacity of the plants that are infected with endophytic fungi.
 209 As predicted by the theory of co-evolution of the geographic mosaic (Thompson
 210 2005), plant-endophyte interactions seem to occur in the hot and cold points of
 211 selective pressures in an ecosystem. Co-evolution is a crucial process in the organi-
 212 zation of the biodiversity, mainly because it is flexible and conservative at the same
 213 time, and thus can shape the interspecies interactions in an environment undergoing
 214 constant changes (Thompson 2005).

215 Consequently, fungi provide selective advantages to the host in distinct environ-
 216 ments (Arnold et al. 2001) that are occupied by the most suitable fungus-plant geno-
 217 types in a local population. For example, the plant hormones such as gibberellins
 218 (GA) and auxins, including indolacetic acid (IAA), are also produced by the endo-
 219 phytic fungi (Khan et al. 2009; Waqas et al. 2012). However, this metabolomic
 220 potential has not been explored yet (Khan et al. 2015). The endophytic fungi can
 221 also control the responses to environmental changes, conditions in which they trig-
 222 ger specific biochemical, physiological, and morphological responses (Rodriguez
 223 et al. 2012). In a study conducted by Waqas et al. (2012), the researchers isolated
 224 and identified the phytohormone-producing endophytic fungi, which improved the
 225 growth of the studied plant and increased its salinity tolerance. However, the under-
 226 lying mechanism of the effect of phytohormones produced by the endophytic fungi
 227 is still poorly understood (Arnold and Lutzoni 2007). Similar studies in the context
 228 of endophytic fungi and centennial plants have not been executed yet. Moreover, in
 229 nature, the established endophytic and host plant combinations represent only a
 230 fraction of genetic variations available in different populations in nature. The genetic
 231 trait variations are important for the interaction between the plants and the fungal

species, thus promoting Darwin's first law of evolution by natural selection. Studies examining the relationship between the genotype of the host plant and its symbiotic expression revealed that the individual isolates of some fungal species can exhibit both parasitic and mutualistic lifestyles, majorly depending on the genotype of the colonized host (Redman et al. 2001; Unterseher and Schnittler 2010). Thus, the plant-fungus interaction must be considered as a flexible interaction, whose fate is determined based on the differences in the expression of fungal genes in response to the host or vice versa (Aly et al. 2011).

According to Schardl et al. (1991) and Saikkonen et al. (2002), the endophytes that are transmitted vertically grow inside the seeds, and are more likely to be mutualistic. However, the ones that are transmitted horizontally through the spores tend to be more antagonistic to the host. In addition, when leaf ageing or senescence occurs, endophytes can become pathogenic and more widespread, which makes them cause external infections (Saikkonen et al. 2002).

10.4 Conclusion

The key questions that are still unaddressed regarding the relationship between the endophytic fungi and the centennial plants are as follows: (i) how do the plant-endophyte interaction processes relate to their co-evolutionary patterns, and (ii) how do the host and the fungal endophyte phenotypes respond together or separately to the changing environments. In order to address these questions, a more comprehensive understanding of the genetic basis and phenotypic plasticity of the plant fungus characteristics is required. Therefore, the application of controlled combinations of fungal genotypes onto the plants in different environmental conditions is required for future studies. Finally, this work may contribute towards a better understanding of the endophyte-plant interactions, and also to open new perspectives on the biotechnological potential of endophytic microorganisms in the Neotropics that are practically unexplored in this field.

References

- Ab'Sáber AN (1992) A teoria dos refúgios: Origem e significado. Revista do Instituto Florestal Edição especial São Paulo
- Achard F, Eva HD, Stibig HJ, Mayaux P, Gallego J, Richards T, Malingreau JP (2002) Determination of deforestation rates of the world's humid tropical forests. Science 297:999–1002
- Altomare C, Norvell WA, Björkman T, Harman GE (1999) Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai. Appl Environ Microbiol 65:2926–2933
- Aly AH, Debbab A, Proksch P (2011) Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. Appl Microbiol Biotechnol 90:1829–1845

- Angelo H, Pompermayer RS, Almeida AND, Moreira JMMAP (2013) O custo social do desmatamento da Amazônia brasileira: o caso da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*). *Ciênc Florest* 23:183–191
- Arnold AE, Herre EA (2003) Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* 95:388–398
- Arnold AE, Lutzoni F (2007) Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 3:541–549
- Arnold AE, Maynard Z, Gilbert GS (2001) Fungal endophytes in dicotyledonous Neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycol Res* 12:1502–1507
- Azevedo JL (1998) Microrganismos endofíticos. *Ecologia microbiana*. Embrapa-CNPMA, pp 117–137
- Baugh CL, Escobar B (2007) The genus *Bacillus* and genus *Trichoderma* for agricultural bioaugmentation. *Rice Farm* 1:1–4
- Bayman P, Angulo-Sandoval P, Báez-ortiz Z, Lodge DJ (1998) Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico. *Mycol Res* 8:944–948
- Bose SR (1947) Hereditary (seed-borne) symbiosis in *Casuarina equisetifolia* Forst. *Nature* 159:512–514
- Cannon PF, Simmons CM (2002) Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia* 94:210–220
- Carroll G (1995) Forest endophytes: pattern and process. *Can J Bot* 73:1316–1324
- Carvalho CD, Ferreira-D'Silva A, Wedge DE, Cantrell CL, Rosa LH (2018) Antifungal activities of cytochalasins produced by *Diaporthe miriciae*, an endophytic fungus associated with tropical medicinal plants. *Can J Microbiol* 64:835–843
- Chepkirui C, Stadler M (2017) The genus *Diaporthe*: a rich source of diverse and bioactive metabolites. *Mycol Prog* 16:477–494
- Fernandes EG, Valério HM, Duarte KLR, Capuchinho LMDN, Fagundes M (2019). Fungi associated with *Copaifera oblongifolia* (Fabaceae) seeds: occurrence and possible effects on seed germination. *Acta Bot Bras* 33:179–182
- Ferreira LV, Venticinque E, Almeida S (2005) O desmatamento na Amazônia e a importância das áreas protegidas. *Estud Av* 19:157–166
- Ferreira MC, Vieira MDLA, Zani CL, Almeida Alves TM, Junior PAS, Murta SM, Vital, MJS (2015) Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). *Biochem Syst Ecol* 59:36–44
- Ferreira MC, Cantrell CL, Wedge DE, Gonçalves VN, Jacob MR, Khan S, Rosa LH (2017a) Diversity of the endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic Neotropical plant *Vellozia gigantea* from the endangered Brazilian rupestrian grasslands. *Biochem Syst Ecol* 71:163–169
- Ferreira MC, Cantrell CL, Wedge DE, Gonçalves VN, Jacob MR, Khan S, Rosa CA, Rosa LH (2017b) Antimycobacterial and antimalarial activities of endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic Neotropical plant *Vellozia gigantea* from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 112:692–697
- Fröhlich J, Hyde KD (1999) Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic? *Biodivers Conserv* 7:977–1004
- Gatsuk LE, Smirnova OV, Vorontzova LI, Zaugolnova LB, Zhukova LA (1980) Age states of plants of various growth forms: a review. *J Ecol* 68:675–696
- Gazis R, Chaverri P (2010) Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal ecol* 3:240–254
- Gazis R, Miadlikowska J, Lutzoni F, Arnold AE, Chaverri P (2012) Culture-based study of endophytes associated with rubber trees in Peru reveals a new class of Pezizomycotina: Xylonomycetes. *Mol Phylogenetics Evol* 65:294–304

- Holanda FH, Birolli WG, Morais EDS, Sena IS, Ferreira AM, Faustino SMM, Ferreira, IM (2019) Study of biodegradation of chloramphenicol by endophytic fungi isolated from *Bertholletia excelsa* (Brazil nuts). *Biocatal Agric Biotechnol* 20:101200
- INPE Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (2019) Available: http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=5115
- Khan SA, Hamayun M, Kim HY, Yoon HJ, Lee IJ, Kim JG (2009) Gibberellin production and plant growth promotion by a newly isolated strain of *Gliomastix murorum*. *World J Microbiol Biot* 25:829–833
- Khan AR, Ullah I, Waqas M, Shahzad R, Hong SJ, Park GS, Shin JH (2015) Plant growth-promoting potential of endophytic fungi isolated from *Solanum nigrum* leaves. *World J Microbiol Biot* 31:1461–1466
- Lacap DC, Hyde KD, Liew ECY (2003) An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Divers* 12:53–66
- Lima NE, Carvalho AA, Lima-Ribeiro MS, Manfrin MH (2018) Caracterização e história biogeográfica dos ecossistemas secos neotropicais. *Rodriguésia* 4:2209–2222
- Malmonge JA, Camillo EC, Moreno RMB, Mattoso LHC, McMahan CM (2009) Comparative study on the technological properties of latex and natural rubber from *Hancornia speciosa* Gomes and *Hevea brasiliensis*. *J Appl Polym Sci* 111:2986–2991
- Mazarotto EJ, Pimentel IC, Abreu DCAD, Santos AFD (2019) Association of *Fusarium* and *Phomopsis* with *Peroba Rosa* Seeds. *Floresta e Ambient* 26:1–7
- Mittermeier RA, Turner WR, Larsen FW, Brooks TM, Gascon C (2011) Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. In: Zachos FE, Habel JC (eds) *Biodiversity hotspots – distribution and protection of conservation priority areas*. Springer, Berlin, pp 3–22
- Orlandelli RC, Alberto RN, Rubin Filho CJ, Pamphile JA (2012) Diversity of endophytic fungal community associated with *Piper hispidum* (*Piperaceae*) leaves. *Genet Mol Res* 11:1575–1585
- Oses R, Valenzuela S, Freer J, Sanfuentes E, Rodríguez J (2008) Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Divers* 33:77–86
- Pomella AWV, Ribeiro RTS (2009) Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas: uma visão empresarial. *Biocont Doenças Plant* 1:239–243
- Redman RS, Dunigan DD, Rodriguez RJ (2001) Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytol* 151:705–716
- Rhoden SA, Garcia A, Rubin Filho CJ, Azevedo JL, Pamphile JA (2012) Phylogenetic diversity of endophytic leaf fungus isolates from the medicinal tree *Trichilia elegans* (*Meliaceae*). *Genet Mol Res* 11:2513–2522
- Ribas CC, Aleixo A, Gubili C, d'Horta FM, Brumfield RT, Cracraft J (2018) Biogeography and diversification of *Rhegmatorhina* (Aves: *Thamnophilidae*) implications for the evolution of Amazonian landscapes during the quaternary. *J Biogeogr* 4:917–928
- Rodriguez RJ, Woodward CJ, Redman RS (2012) Fungal influence on plant tolerance to stress. In: Southworth D (ed) *Biocomplexity of plant–fungal interactions*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp 155–163
- Saikkonen K, Ion D, Gyllenberg M (2002) The persistence of vertically transmitted fungi in grass metapopulations. *J Biol Sci* 269:1397–1403
- Saikkonen K, Wäli P, Helander M, Faeth SH (2004) Evolution of endophyte–plant symbioses. *Trends Plant Sci* 9:275–280
- Saikkonen K, Wäli PR, Helander M (2010) Genetic compatibility determines endophyte–grass combinations. *PLoS One* 6:1932–6203
- Salgado-Labouriau ML (1994) *História Ecológica da Terra*. Edgard Blucher Ltda, São Paulo
- Schardl CL, Liu JS, White JF, Finkel RA, An Z, Siegel MR (1991) Molecular phylogenetic relationships of nonpathogenic grass mycosymbionts and clavicipitaceous plant pathogens. *Plant Syst Evol* 178:27–41
- Schmitt I, Lumbsch HT (2009) Ancient horizontal gene transfer from bacteria enhances biosynthetic capabilities of fungi. *PLoS One* 4:4437
- Slippers B, Wingfield MJ (2007) *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biol Rev* 21:90–106

- 375 Strobel G, Daisy B (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products.
 376 Microbiol Mol Biol Rev 67:491–502
- 377 Taniwaki MH, Pitt JJ, Iamanaka BT, Sartori D, Copetti MV, Balajee A, Frisvad JC (2012)
 378 *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil nuts. PLoS One 7:42480
- 379 Thompson JN (2005) The geographic mosaic of coevolution. University of Chicago Press, Chicago
- 380 Tinoco CF, Lima NE, Lima-Ribeiro MS, Collevatti RG (2015) Research and partnerships in stud-
 381 ies on population genetics of Neotropical plants: a scientometric evaluation. Biochem Syst
 382 Ecol 61:357–365
- 383 Tundisi JG, Matsumara-Tundisi T, Tundisi JEM (2008) Reservoirs and human well being: new
 384 challenges for evaluating impacts and benefits in the neotropics. Braz J Biol 4:1133–1135
- 385 Unterseher M, Schnittler M (2010) Species richness analysis and ITS rDNA phylogeny revealed the
 386 majority of cultivable foliar endophytes from beech (*Fagus sylvatica*). Fungal Ecol 3:366–378
- 387 Unterseher M, Gazis R, Chaverri P, Guarniz CFG, Tenorio DHZ (2013) Endophytic fungi from
 388 Peruvian highland and lowland habitats form distinctive and host plant-specific assemblages.
 389 Biodivers Conserv 22:999–1016
- 390 Waqas M, Khan AL, Kamran M, Hamayun M, Kang SM, Kim YH, Lee IJ (2012) Endophytic
 391 fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress.
 392 Molecules 17:10754–10773
- 393 Zanutto SP, Romano IP, Lisboa LU, Duvoisin JrS, Martins MK, Lima FA, Albuquerque PM (2009)
 394 Potential application in biocatalysis of mycelium-bound lipases from Amazonian fungi. J Braz
 395 Chem Soc 20:1046–1059