

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia

Tese de Doutorado

**Taxonomia, diversidade e bioprospecção de fungos endofíticos
associados à planta medicinal *Lafoensia pacari* A. St. Hil. (mangava-
brava) presente no Pantanal Mato-grossense**

Soraya Sander Amorim

Belo Horizonte, MG
2018

Soraya Sander Amorim

Taxonomia, diversidade e bioprospecção de fungos endofíticos associados à planta medicinal *Lafoensia pacari* A. St. Hil. (mangava-brava) presente no Pantanal Mato-grossense

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa
Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais - ICB/UFMG

Co-orientadora: Dra. Camila Rodrigues de Carvalho
Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais - ICB/UFMG

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Soares
Departamento de Botânica e Ecologia- Universidade Federal do Mato Grosso - UFMT

Belo Horizonte, MG
2018

Colaboradores:

Dr. Carlos Leomar Zani

Dra. Tânia Maria de Almeida Alves

Grupo de Pesquisa: Química de Produtos Naturais Bioativos, Instituto René Rachou/Fiocruz-MG.

Dra. Silvane Murta

Dr. Policarpo Sales Jr.

Grupo de Pesquisa: Genômica Funcional e Proteômica de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*, Instituto René Rachou/Fiocruz-MG.

Dra. Jaqueline Germano de Oliveira

Grupo de Pesquisa: Imunologia Celular e Molecular, Instituto René Rachou/Fiocruz-MG.

Agradecimentos

A Deus, meu Pai querido que abençoou todos os meus caminhos, realizou meus sonhos e me permitiu chegar até aqui. Sem Ele nada seria e nada poderia. A Ele eu dedico não apenas essa conquista, mas toda a minha vida.

Ao Professor Luiz Rosa, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe, pela orientação, por acreditar em mim, pelos ensinamentos e confiança. Agradeço por todas as oportunidades durante o período do doutorado. A sua confiança em mim serviu de incentivo para eu querer ser cada dia uma profissional melhor. Muito obrigada por tornar esses quatro anos mais fáceis e muito mais agradáveis.

Ao Prof. Marcos Antônio Soares pela co-orientação, pela ajuda e disponibilidade mesmo que a distância.

A Camila Carvalho, minha co-orientadora, amiga e *roommate*. Obrigada por estar comigo desde o começo, na escrita do projeto, na coleta no Pantanal, no desenvolver dos experimentos, nas viagens ao longo do doutorado e nas correções da qualificação e da tese. Como aprendi com você! Muito obrigada pela paciência, amizade e conselhos, tanto profissionais quanto de vida! Um anjinho sem asas que Deus colocou na minha vida!

Aos membros da banca examinadora, Dr. Daniel Santos, Dra. Renata Guerra, Dra. Jovita Gazzinelli, e Dra. Betania Cota, assim como as Dra. Valéria Godinho e Dra. Mariana Costa Ferreira, por terem aceitado o convite e pelas contribuições que certamente serão muito importantes para a melhoria e continuidade dos nossos estudos.

A Mariana Costa, pelos conselhos, incentivos, e toda ajuda, tanto teórica quanto prática no desenvolver do projeto. Agradeço por ser a suplente interna e pela relatoria da tese. E claro, pela amizade, por ter me apresentado a IBC, igreja que tanto amo, e por ser minha irmã em Cristo, minha conselheira, meu ombro amigo sempre quando precisei.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa e a Prof. Dra. Susana Johann pelos ensinamentos, conselhos, sugestões, ajuda para execução dos experimentos e pela excelente convivência.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, pela oportunidade, e ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos os professores, funcionários, técnicos e colegas do Departamento de Microbiologia-ICB/UFMG.

Ao Professor Dr. Euziclei de Almeida, pela logística e ajuda na coleta no Pantanal.

A Professora Dr. Ana Maria Soares Pereira, pela oportunidade de aprender as técnicas de cultura de tecidos vegetais em seu laboratório na Faculdade Unaerp, Ribeirão Preto.

Ao pessoal do Grupo de Pesquisa Química de Produtos Naturais Bioativos do Instituto René Rachou/FIOCRUZ, por toda ajuda e por disponibilizarem a infraestrutura necessária para a realização dos experimentos. Meus agradecimentos em especial ao Dr. Carlos Zani, Dra. Tânia Alves, Daniela Naback, Fátima Marques, Alisson Caldeira e Markus Kohlhoff.

A Graciéle, pela amizade, parceria na bancada, risadas, brincadeiras, e por termos a oportunidade de crescermos juntas! Como as trocas de experiências e a rotina da bancada melhoraram após você ter chegado!

A Jéssica Catarine, melhor estagiária que eu poderia ter! Obrigada pela amizade construída, risadas, por tanto me ajudar no desenvolver do projeto, e também, claro pelas extrações de DNA dos filamentosos!

A todos os outros colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais, pela cumplicidade diária e ajuda mútua. Em especial meus agradecimentos a Vivi, Iara, Mara, Mayara, Jordana, Thamar, Lívia Costa, Lívia Almeida, Camila Silva, Raíssa, Eldon, Hebert, Isabel, Débora Barreto e Aline.

A todos os colegas do LabFungos, pelo ambiente agradável de trabalho, pelo compartilhamento de conhecimento e ensinamentos, pelas muitas amizades, tanto dos que já saíram do laboratório quanto dos que ainda permanecem. Em especial a Ana Raquel, Camila Gontijo, Fran, Raquel Cadete, Tais, Lana, Mari Anzai, Grazy e Thelma.

Aos meus pais, Ary e Conceição, por serem o meu maior tesouro, meu porto seguro, minha força, abaixo apenas de Deus. Obrigada pelo amor, cuidado, apoio, incentivo, orações constantes, encorajamento e por acreditarem em mim. Não tenho palavras para agradecer por tudo que fizeram para me ajudar a estudar, das grandes coisas até aos pequenos detalhes na rotina diária da nossa casa. Como foi bom voltar a morar com vocês nesses dois últimos anos. Sem vocês eu não teria conseguido. Muito obrigada, amo tanto vocês!

A minha querida irmã Sarah, por sempre cuidar de mim e me apoiar. Obrigada por sua amizade, preocupação e amor, amo muito você! Te agradeço por me proporcionar conhecer um novo tipo de amor, o amor de Tia. Qualquer preocupação, ansiedade ou tristeza se desfaz ao olhar para os rostinhos dos nossos pequenos, Lili e Bernadinho, amores da titia.

Aos meus tios Ney e Amélia, e primos Raquel, Gustavo e Izabela por me acolherem em sua casa nos anos iniciais do doutorado, e por todo apoio, amor e carinho.

Aos meus avôs, tios e primos, das famílias Sander e Amorim pela torcida e orações.

A Babi, pela amizade, torcida, companhia e por estar comigo no dia da defesa do projeto de doutorado.

A todos os meus amigos da Igreja Batista Central, em especial à minha querida Célula Kainós, pela amizade, apoio, compreensão, momentos de distração e principalmente pelas orações.

Meu muito obrigada por todas as pessoas que de alguma forma torceram e se alegraram com essa vitória!

“Ó profundidade das riquezas, tanto da sabedoria, como da ciência de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis os seus caminhos!”

Romanos 8:33

Sumário

Lista de Abreviaturas	X
Lista de Figuras	XII
Lista de Tabelas	XIII
Lista de Anexos	XIV
Resumo	1
Abstract	3
1 Justificativa e Relevância	5
2 Revisão de Literatura	7
2.1 Micro-organismos endofíticos	7
2.2 Fungos endofíticos: diversidade e interação com a planta hospedeira.....	8
2.3 Metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos endofíticos associados a plantas medicinais	13
2.5 Agroquímicos	17
2.6 Cultura de tecidos vegetais e seus fungos endofíticos “verdadeiros”	23
2.7 <i>Lafoensia pacari</i> A. St.-Hil. e o Pantanal Mato-grossense	24
3 Objetivos	28
3.1 Objetivo Geral	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4 Materiais e Métodos	29
4.1 Área de amostragem	29
4.2 Coleta, isolamento e preservação dos fungos endofíticos	29
4.3 Identificação dos fungos endofíticos	30
4.3.1 Fungos Filamentosos	30
4.3.2 Leveduras	34
4.3.3 Purificação dos amplicons	35
4.3.4 Reações de sequenciamento	35
4.3.5 Análise computacional das sequências.....	36
4.4 Diversidade da comunidade fúngica: índices de abundância, riqueza e dominância	37
4.5 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Lafoensia pacari</i>	38
4.5.1 Germinação das sementes.....	38
4.5.2 Obtenção de fungos endofíticos a partir das plântulas de <i>Lafoensia pacari</i> .	38
4.6 Cultivo dos fungos e preparo dos extratos	39
4.6.1 Fungos filamentosos e leveduras.....	39
4.6.2 Folhas e cascas dos caules de <i>Lafoensia pacari</i>	40
4.6.3 Recultivo e reteste dos extratos ativos.....	40

4.6.4 Preparo dos extratos a partir dos fungos isolados das plântulas de <i>L. pacari</i>	41
4.7 Ensaio Biológicos	41
4.7.1 Ensaio in vitro com a forma amastigota-like de <i>Leishmania (leishmania) amazonensis</i>	41
4.7.2 Ensaio in vitro com as formas tripomastigotas e as formas intracelulares amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
4.7.3 Triagem da atividade antiviral contra o vírus da Dengue sorotipo 2 (DENV2)	43
4.7.4 Determinação da atividade herbicida	44
5 Resultados e Discussão	46
5.1 Coleta e isolamento dos fungos endofíticos	46
5.2 Identificação dos fungos endofíticos	47
5.3 Composição da comunidade de fungos endofíticos associados às folhas, cascas dos caules e sementes de <i>Lafoensia pacari</i>	54
5.4 Cultivo in vitro de <i>Lafoensia pacari</i>	60
5.4.1 Germinação de sementes de <i>L. pacari</i> em Meio Murashige & Skoog (MS). 60	
5.4.2 Germinação de sementes de <i>Lafoensia pacari</i> em Meio <i>Wood plant</i> (WP). 60	
5.5 Diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados às folhas, cascas dos caules, sementes e plântulas de <i>Lafoensia pacari</i>	65
5.6 Ensaio biológicos	70
5.6.1 Determinação da atividade leishmanicida e antiviral	70
5.6.2 Determinação da atividade tripanocida	71
5.6.3 Determinação da atividade herbicida	77
6 Conclusões	82
7 Referências Bibliográficas	83
Anexos.....	106

Lista de Abreviaturas

% - por cento

µg/mL - miligramas por mililitro

µM - micromolar

BAP - 6-benzilaminopurina

BDA - Batata Dextrose Agar

BLASTn - *Basic Local Alignment Search Tool*

BOD - *Biochemical Oxygen Demand*

CN - Controle negativo

CP - Controle positivo

CP - Controle do solvente

CTAB - Brometo de Cetil Trimetilamonio

DENV1 - Vírus da Dengue sorotipo 1

DENV2 - Vírus da Dengue sorotipo 2

DENV3 - Vírus da Dengue sorotipo 3

DENV4 - Vírus da Dengue sorotipo 4

DMEM - *Dulbecco/Vogt modified Eagle's (Harry Eagle) Minimal Essential Medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DTN - Doenças tropicais negligenciadas

ECP - Efeito citopático viral

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EUA - Estados Unidos da América

g - gramas

g/L - gramas por litro

GFP - Grupo de Pesquisa Genômica Funcional e Proteômica de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*

GPS - Sistema de Posicionamento Global

HCl - Ácido Clorídrico

CI₅₀ - Concentração Inibitória de 50%

ITS - Região transcrita interna
LC₅₀ - Concentração Letal de 50%
Lp - indivíduo de *Lafoensia pacari*
M - molar
MEGA - *Mega Molecular Evolutionary Genetics Analysis*
mg/L - miligramas por litro
mg/mL - miligramas por mililitro
mL - mililitro
mm - milímetro
mM - milimolar
MS - Murashige & Skoog
MSP - PCR - PCR microsatélite
MTT - Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólico
NaCl - Cloreto de Sódio
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
ng/μL - nanogramas por mililitro
°C - graus Celsius
P.A. - para análise
p/v - peso por volume
pb - pares de bases
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
pH - potencial hidrogeniônico
QPNB - Grupo de Pesquisa Química de Produtos Naturais Bioativos
r.p.m. - rotações por minuto
rDNA - DNA ribossomal
RPB2 - RNA polimerase II
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute Medium*
rRNA - RNA ribossomal
SDS - Sódio Dodecil Sulfato
SFB - Soro Fetal Bovino
TBE - Tris borato
Tris - Trishidroximetilaminometano
UTD - Unidades taxonômicas distintas
WP - *Wood Plant*

Lista de Figuras

Figura 1. Hipótese do múltiplo antagonismo balanceado envolvendo os fungos endofíticos (Shulz <i>et al.</i> , 2015).....	12
Figura 2. Aspecto geral de <i>Lafoensia pacari</i> . a) Indivíduo adulto. b) Casca. c) Folhas. d) Fruto. e) Sementes (Foto: S. S. Amorim).....	26
Figura 3. Frequência de isolamento dos fungos endofíticos provenientes das folhas, fragmentos de cascas e sementes de espécimes de <i>Lafoensia pacari</i> (Lp) amostrados.	46
Figura 4. Porcentagem dos fungos endofíticos associados à <i>Lafoensia pacari</i> classificados em nível de classe.	49
Figura 5. Plântulas de <i>L. pacari</i> cultivadas <i>in vitro</i> . a) Plântula cultivada em meio Murashige & Skoog com crescimento estagnado. b) Plântulas cultivadas em meio <i>Wood Plant</i> com crescimento intermediário. c) Plântulas cultivadas em meio <i>Wood Plant</i> com melhor desenvolvimento.	61
Figura 6. Árvore filogenética dos fungos endofíticos do gênero <i>Cladosporium</i> associados à <i>Lafoensia pacari</i> , obtidos tanto da planta no ambiente natural quanto <i>in vitro</i> (em negrito). As sequências dos isolados foram comparados com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no <i>GenBank</i> após análises utilizando o BLAST. A árvore foi construída com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA utilizando o método <i>Maximum composite likelihood</i> e modelo <i>Jukes-Cantor</i>	63
Figura 7. Curva de rarefação de espécies (índice de Mao-Tau) dos fungos endofíticos associados a <i>L. pacari</i> construída com intervalo de confiança de 95%. a) Folhas e cascas dos caules. b) Plântulas <i>in vitro</i>	69

Lista de Tabelas

Tabela 1. Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos com atividades antiparasitária, antiviral e herbicida.....	19
Tabela 2. Identificação molecular dos fungos endofíticos associados à <i>Lafoensia pacari</i>	50
Tabela 3. Identificação molecular dos fungos endofíticos associados às plântulas de <i>Lafoensia pacari</i> cultivadas <i>in vitro</i>	64
Tabela 4. Abundância dos fungos endofíticos associados à <i>Lafoensia pacari</i> amostrada em seu ambiente natural e às plântulas <i>in vitro</i>	66
Tabela 5. Índices de diversidade, riqueza e dominância dos fungos endofíticos associados à <i>Lafoensia pacari</i>	69
Tabela 6. Atividade tripanocida dos extratos brutos vegetais e produzidos a partir dos fungos endofíticos associados à <i>Lafoensia pacari</i>	75
Tabela 7. Atividade herbicida dos extratos brutos vegetais e produzidos a partir dos fungos endofíticos e endofíticos “verdadeiros” associados à <i>Lafoensia pacari</i>	77

Lista de Anexos

Anexo 1. Atividades desenvolvidas e produções obtidas durante o período do curso .	106
Anexo 2. Artigo da tese.....	108

Resumo

Fungos endofíticos são aqueles que colonizam o interior de tecidos vegetais por pelo menos uma fase de seu ciclo de vida sem causar sintomas aparentes de doença. Estes fungos exercem importantes papéis ecológicos e fisiológicos na interação com suas plantas hospedeiras e são potenciais fontes de metabólitos secundários bioativos de interesse farmacológico e agrícola. Dentre os critérios existentes para a seleção da espécie hospedeira alvo para isolamento de seus fungos endofíticos destacam-se as plantas medicinais, bem como aquelas que ocorrem em regiões de grande biodiversidade. *Lafoensia pacari*, planta medicinal encontrada no Pantanal Mato-grossense, é utilizada principalmente para o tratamento de distúrbios gástricos por meio do macerado das folhas e da casca. Considerando o exposto, este trabalho objetiva-se por caracterizar a comunidade de fungos endofíticos associados à *L. pacari*, bem como avaliá-la como fonte de metabólitos antiparasitários, antivirais e herbicida. A partir de fragmentos de folhas, cascas e sementes de *L. pacari* foram isolados 236 fungos filamentosos e três leveduras. A identificação dos fungos filamentosos foi realizada por meio do sequenciamento da região transcrita interna ITS-5.8S da região do gene do rRNA, bem como pelo sequenciamento parcial do gene da β -tubulina. As leveduras foram submetidas ao sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade maior do DNA ribossomal. Sessenta táxons de fungos filamentosos e três de leveduras foram identificados e pertencentes as classes *Dothideomycetes*, *Sordariomycetes*, *Eurotiomycetes* e *Saccharomycetes* (*Ascomycota*), *Ustilaginomycetes* (*Basidiomycota*) e *Zygomycetes* (*Zygomycota*). Os gêneros identificados com maior frequência foram *Phyllosticta*, *Diaporthe*, *Lasiodiplodia*, *Colletotrichum*, *Pseudofusicoccum*, *Aspergillus* e *Penicillium*. As sementes de *L. pacari* foram também germinadas em meios Murashige & Skoog (MS) e *Wood plant* (WP) para o isolamento de seus fungos endofíticos “verdadeiros” a partir das plântulas, das quais foram obtidos nove isolados pertencentes aos táxons *Cladosporium* sp. 1, *Cladosporium* sp. 2, *Aspergillus* sp. e *Eremothecium gossypii*. A diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados a *L. pacari* apresentou-se alta, com grande riqueza de espécies e dominância de alguns táxons, enquanto que para as plântulas estes índices foram menores. Extratos brutos diclorometânicos foram produzidos a partir de todos os isolados fúngicos obtidos das plantas no ambiente natural, e a partir das folhas e cascas de *L. pacari*. Já os isolados obtidos a partir das plântulas cultivadas *in vitro* foram submetidos à extração em acetato

de etila. Todos os extratos obtidos foram submetidos a ensaios biológicos a fim de avaliar as atividades antiparasitárias, antivirais e herbicida. Nenhum extrato apresentou atividade frente *Leishmania amazonensis* e o vírus da dengue. Quatro extratos pertencentes aos táxons *Aspergillus aculeatus*, *Coniothyrium* sp. e *Valsariaceae* sp. foram ativos frente *Trypanosoma cruzi*, os quais apresentaram alta eficiência e baixa citotoxicidade, sendo considerados promissores para o isolamento de substâncias tripanocidas. Os extratos também foram avaliados quanto à atividade herbicida frente a sementes de *Latuca sativa* (alface) e *Allium schoenoprasum* (cebolinha verde). Dos extratos avaliados, 49 apresentaram atividade herbicida, sendo que 14 inibiram 100% a germinação dos dois modelos estudados. Dentre os fungos bioativos, três endofíticos “verdadeiros” apresentaram atividade herbicida para alface. A partir dos resultados obtidos verifica-se que a planta medicinal *L. pacari* representa um promissor reservatório de diversificados fungos endofíticos capazes de produzir metabólitos bioativos que podem ser utilizados tanto para fins terapêuticos quanto para a agricultura.

15

Palavras chave: fungos endofíticos, *Lafoensia pacari*, endofíticos “verdadeiros”, metabólitos secundários bioativos.

20

25

30

Abstract

Endophytes are microorganisms that inhabit plant tissues during at least one stage of their life cycle and they do not cause any apparent symptom of disease on their hosts. They play important ecological and physiological roles in the interaction with their host plants and are a potential source of bioactive secondary metabolites of pharmacological and agricultural interest. The criteria for the selection of the target host species is a choice of medicinal plants and those that occur in regions of great biodiversity. *Lafoensia pacari*, a medicinal plant found in the little studied Pantanal Mato-Grossense, used for the treatment of gastric disorders by macerating the leaves and the bark. Considering the above, this work aims to characterize the community of endophytic fungi associated with *L. pacari*, as well as evaluating it as a source of antiparasitic, antiviral and herbicidal metabolites. From the fragments of leaves, bark and seeds of *L. pacari*, 236 filamentous fungi and 3 yeasts were isolated. They were identified by sequencing the internal transcribed region ITS-5.8S of the rRNA gene region, as well as by the partial sequencing of the β -tubulin gene. Yeasts were subjected to sequencing of the D1/D2 domains of the major subunit of ribosomal DNA. A total of 60 filamentous fungal taxa and tree yeast taxa were obtained, represented by the classes *Dothideomycetes*, *Sordariomycetes*, *Eurotiomycetes*, and *Saccharomycetes* (*Ascomycota*); *Ustilaginomycetes* (*Basidiomycota*); and *Zygomycetes* (*Zygomycota*). The most abundant genera were *Phyllosticta*, *Diaporthe*, *Lasiodiplodia*, *Colletotrichum*, *Pseudofusicocum*, *Aspergillus* and *Penicillium*. *Lafoensia pacari* seeds were germinated in the Murashige & Skoog (MS) and Wood plant (WP) media for the isolation of their “true” endophytes from the seedlings and nine isolates were obtained in the taxa *Cladosporium* sp. 1, *Cladosporium* sp. 2, *Aspergillus* sp. and *Eremothecium gossypii*. The diversity of the endophytic fungi community associated with *L. pacari* was high, with higher taxonomic richness values and lowest taxonomic dominance. For the seedlings, these indexes were lower, indicating lower diversity and higher dominance. The production of bioactive secondary metabolites was evaluated. Dichloromethane crude extracts were produced from all fungal isolates obtained from the leaves and barks of *L. pacari*. The isolates obtained from the seedlings cultured *in vitro* were extracted with ethyl acetate. All extracts were submitted to biological assays to evaluate antiparasitic, antiviral and herbicidal activities. No extract showed activity against *Leishmania amazonensis* and the dengue virus. Four extracts belonging to taxa

Aspergillus aculeatus, *Coniothyrium* sp. and *Valsariaceae* sp. were active against *Trypanosoma cruzi*, which present high efficiency and low cytotoxicity, because this the extracts were considered promising for the isolation of trypanocidal compounds. The extracts were also evaluated for herbicidal activity against the seeds of *Latuca sativa* (lettuce) and *Allium schoenoprasum* (chives). Forty nine extracts showed herbicidal activity, and 14 inhibited 100% of the germination of the both models used at the assay. Among the bioactive fungi, three “true” endophytes showed herbicide activity for lettuce. From the results obtained it is verified that the medicinal plant *L. pacari* represents a promising reservoir of diversified endophytic fungi capable of producing bioactive metabolites that can be used for both therapeutic and agricultural purposes.

Key words: endophytic fungi, *Lafoensia pacari*, “true” endophyte, secondary bioactive metabolites.

15

20

25

1 Justificativa e Relevância

Micro-organismos endofíticos colonizam inter- e/ou extracelularmente tecidos saudáveis de plantas sem causar manifestações aparentes de doença (Wilson, 1995). Considerando que as regiões tropicais e subtropicais abrigam a maior diversidade vegetal do planeta, a diversidade de fungos endofíticos nesta zona climática também
5 pode ser considerada elevada, uma vez que todas as espécies de plantas vasculares examinadas até o momento apresentaram ao menos uma espécie de fungo endofítico associado (Rosa *et al.*, 2011). Os fungos endofíticos coexistem com a planta hospedeira produzindo substâncias bioativas para protegê-la contra patógenos e herbívoros, além de
10 atuarem como promotores de crescimento, permitindo que a planta cresça e sobreviva em condições desfavoráveis (Clay & Holah, 1999).

As interações entre os fungos endofíticos e as plantas hospedeiras podem promover alterações metabólicas que resultam na produção de moléculas bioativas passíveis de diferentes aplicações biotecnológicas e industriais (Paes *et al.*, 2014). Mais
15 da metade dos fármacos registrados são derivados de substâncias naturais ou estão relacionados a eles, e de um total de 1.073 pequenas moléculas registradas, apenas 36% são consideradas verdadeiramente sintéticas (Khazir *et al.*, 2013). Por razões como estas, os fungos têm recebido especial atenção uma vez que têm sido reconhecidos como um repositório de novos metabólitos secundários com importância farmacêutica e
20 na agricultura (Schulz *et al.*, 2002; Strobel, 2002; Rosa, *et al.*, 2010). Todavia, a aplicação dos fungos como produtos comerciais ainda é limitada, devido tanto à falta de financiamento para este campo de pesquisa, quando às regulamentações severas adotadas por diferentes países (Masi *et al.*, 2018.)

As plantas medicinais há muito fazem parte na tradição da medicina popular
25 brasileira e são consideradas como os primeiros recursos terapêuticos das populações. Entre elas, *Lafoensia pacari* A. St.-Hil (*Lythraceae*) é uma espécie que apresenta propriedades antimicrobiana, cicatrizante, anti-inflamatória, antitumoral, entre outras (Solon *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2006; Porfírio *et al.*, 2009) e, desta forma, considerada como uma planta alvo promissora para obtenção de fungos endofíticos produtores de
30 metabólitos bioativos. *L. pacari* pode ser encontrada no Pantanal Mato-grossense, uma paisagem natural pouco explorada, mas caracterizada por uma grande biodiversidade (Neto *et al.*, 2008).

A partir do exposto acima, o presente trabalho tem como proposta caracterizar a diversidade e avaliar o potencial biotecnológico da comunidade de fungos endofíticos

associados a *L. pacari* coletada no Pantanal Mato-grossense, de modo a responder as seguintes questões:

1. Qual a composição taxonômica e diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados à *L. pacari*?
2. Fungos endofíticos associados a *L. pacari* são boas fontes de metabólitos bioativos?
3. Os metabólitos bioativos dos fungos endofíticos possuem alguma relação com as atividades e/ou metabólitos bioativos produzidos por *L. pacari*?

10

15

20

25

30

35

2 Revisão de Literatura

2.1 Micro-organismos endofíticos

O termo “endofítico” é designado para os organismos que colonizam tecidos vivos de plantas sem causar efeitos negativos aparentes (Petrini, 1991). As primeiras evidências de uma possível relação de simbiose entre endofíticos e vegetais surgiram por meio da análise de tecidos fossilizados de caules e folhas de plantas superiores; a partir daí, algumas hipóteses sugeriram que esta relação se iniciou há centenas de milhares de anos, o que despertou a curiosidade em diversos pesquisadores numa tentativa cada vez maior de entender sua dinâmica (Strobel, 2006).

Os organismos endofíticos incluem protozoários, bactérias e fungos que podem passar parte ou todo o ciclo de vida colonizando os tecidos vivos de uma planta hospedeira, sem causar sintomas aparentes de doenças ou algum malefício (Tan & Zou, 2001). As bactérias e os fungos representam os endofíticos mais comuns, entretanto, os fungos são aqueles geralmente isolados com maior frequência (Strobel & Daisy, 2003).

A composição de micro-organismos endofíticos parece variar de acordo com a planta hospedeira. Dentro da mesma espécie vegetal eles não variam apenas de região para região, mas também se diferenciam devido às mudanças nas condições climáticas de uma mesma região (Chareprasert *et al.*, 2006). Nos últimos anos, alguns estudos foram realizados para avaliar o padrão de colonização dos endofíticos nos tecidos vegetais, bem como seus efeitos sobre o crescimento das plantas. Essas publicações indiretamente sugerem sua importância para o hospedeiro e o ambiente (Nair & Padmavathy, 2014).

De acordo com Nair & Padmavathy (2014), os micro-organismos endofíticos possuem variados papéis e aplicações, tais como:

- 1) Fitoestimulação: possuem papel na captura de elementos essenciais para a planta hospedeira;
- 2) Produção de pigmentos: *Penicillium purpurogenum*, isolado de *Ginkgo biloba*, foi capaz de produzir grande quantidade de pigmentos vermelhos solúveis que podem ser usados como fonte natural de corante;
- 3) Produção de enzimas de importância comercial: lipases, amilases, proteases, peroxidases e celulasas são produzidas por fungos endofíticos como *Acremonium terricola*, *Aspergillus japonicas*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Fusarium lateritium*, *Monodictys castaneae*,

Nigrospora sphaerica, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium glandicola*, *Pestalotiopsis guepinii*, *Phoma tropica*, *Phomopsis archeri*, *Tetraploa aristata* e *Xylaria* sp.

- 4) Fonte de metabólitos bioativos: são capazes de produzir moléculas bioativas que são utilizadas pelas plantas na defesa contra patógenos;
- 5) Agentes de controle biológico: são considerados eficientes agentes de controle biológico, estratégia alternativa para o controle químico;
- 6) Ciclagem de nutrientes: possuem a habilidade de degradar compostos orgânicos incluindo celulose, lignina e hemicelulose;
- 7) Biorremediação/biodegradação: possuem uma poderosa capacidade de degradar compostos recalcitrantes.

2.2 Fungos endofíticos: diversidade e interação com a planta hospedeira

Fungos endofíticos são definidos como endossimbiontes que residem em tecidos internos de plantas de maneira assintomática durante ao menos uma fase do seu ciclo de vida (Petrini *et al.*, 1992; Schulz & Boyle, 2005), sendo conhecidos representantes pertencentes aos filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Glomeromycota* e *Zygomycota* (Hardoim *et al.*, 2015). Este grupo de micro-organismos exerce papéis fisiológicos (Malinowski *et al.*, 2004) e ecológicos (Malinowski & Belesky, 2006; Tintjer & Rudgers, 2006) na simbiose com as plantas hospedeiras, podendo influenciar no desempenho e na forma da comunidade das mesmas. Os fungos endofíticos também conferem resistência aos estresses abióticos (temperatura, pH, pressão osmótica e períodos de seca), e bióticos (invasão por patógenos como bactérias, fungos, nematódeos e herbivoria por insetos) (Rodriguez *et al.*, 2001). Tal resistência ocorre por meio da produção de uma série de metabólitos secundários que podem ajudar na defesa da planta hospedeira contra estas diferentes condições de estresses (Carroll & Carroll, 1978; Redman *et al.*, 2002; Strobel, 2003; Rodriguez *et al.*, 2004; Marquez *et al.*, 2007; Suwannarach *et al.*, 2013). Entretanto, a importância ecológica desse grupo de fungos em diferentes ecossistemas ainda permanece mal caracterizada (Rosa *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2014).

De acordo com Rodriguez e colaboradores (2009), os fungos endofíticos podem ser classificados em dois grupos principais, os quais são discriminados com base em suas diferenças nas relações evolutivas, taxonômicas, interação com a planta hospedeira e funções ecológicas, tais como: (1) fungos clavicipitaceos (C-endofíticos), os quais são

capazes de colonizar apenas algumas espécies de gramíneas; e (2) fungos não clavicipitaceos (NC-endofíticos), que são encontrados vivendo de forma assintomática em tecidos de plantas avasculares, vasculares sem sementes, gimnospermas e angiospermas.

5 Os C-endofíticos pertencem à família *Clavicipitaceae* (*Hypocreales*; *Ascomycota*), dos quais muitas espécies são capazes de produzir moléculas bioativas, principalmente os gêneros *Cordyceps*, *Balansia*, *Epichloë/Neotyphodium*, *Claviceps* e *Myriogenospora*. Em contraste, os NC-endofíticos formam um grupo que ainda não foi bem definido taxonomicamente, mas que a maioria das espécies pertence aos filos
10 *Ascomycota* e *Basidiomycota*, representados por diferentes gêneros como *Alternaria*, *Arthrotrichum*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Coprinellus*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phoma*, entre outros.

A diversidade biológica dos fungos endofíticos, especialmente em florestas tropicais e temperadas, é enorme (Strobel, 2003), ao considerar que estes fungos tem
15 potencial para serem encontrados em cerca das 300 mil espécies de plantas terrestres estimadas (Strobel & Daisy, 2003). Estudos relatam que os fungos endofíticos estão associados com plantas há mais de 400 milhões de anos (Strobel, 2006), e estimativas recentes baseadas em diferentes métodos moleculares aliados ao sequenciamento de alta performance sugerem a existência de até 5,1 milhões de espécies de fungos de maneira
20 ubíqua em plantas ao longo do globo terrestre (O'Brien *et al.*, 2005; Blackwell, 2011). Em um levantamento bibliográfico realizado por Nair e Padmathy (2014) foi mostrado que de um modo geral, os gêneros que são isolados com maior frequência como fungos endofíticos são em geral *Phomopsis*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Phyllosticta*, *Penicillium* e *Acremonium*. Já para as regiões tropicais a grande maioria pertence ao
25 filo *Ascomycota*, principalmente aos gêneros *Alternaria*, *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Diaporthe/Phomopsis*, *Nodulisporium*, *Pestalotia*, *Phoma*, *Phyllosticta*, *Trichoderma* e *Xylaria*, os quais são os mais comumente encontrados (Suryanarayanan *et al.*, 2002). A diversidade taxonômica exibida por estes fungos faz deles alvos especiais na busca de produtos naturais bioativos de interesse na indústria
30 farmacêutica e na agricultura (Peláez *et al.*, 1998; Rosa *et al.*, 2012).

As comunidades dos fungos endofíticos podem ser divididas em dois grandes grupos básicos: os (1) fungos generalistas, os quais são encontrados em alta abundância entre plantas de espécies diferentes; e (2) os singletos, que são encontrados em baixa abundância e em uma planta hospedeira específica. Acredita-se que as plantas tropicais

abrigam uma população altamente diversificada de endofíticos, principalmente singletos (Dreyfuss & Chapela, 1994).

A composição dos fungos endofíticos parece refletir a interação dos mesmos com as espécies hospedeiras, a distância geográfica e os fatores climáticos (U'ren *et al.*, 2012), dos quais temperatura e umidade são as variáveis mais importantes para explicar a diversidade fúngica (Talley *et al.*, 2002). Além disso, muitos micro-organismos endofíticos exibem padrões de diferenciação genética, morfológica e funcional relacionadas com a distribuição de seus hospedeiros (Papke & Ward, 2004). A comunidade endofítica é então um reflexo do estado fisiológico da planta hospedeira que pode mostrar variações ao longo das estações climáticas devido a fatores como disponibilidade de água, nutrientes, luz, temperatura, entre outros (Vieira *et al.*, 2012).

É válido ressaltar também que alguns estudos têm demonstrando diferentes padrões na preferência do fungo pela planta hospedeira e /ou tecido vegetal, variando de alta (Mckenzie *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2010) a baixa especificidade tecidual (Cannon & Simmons, 2002). A retirada de espécies vegetais de seu ambiente natural resulta em plantas mais susceptíveis ao ataque por diferentes patógenos, uma vez que podem ocorrer perturbações nas comunidades endofíticas específicas ou aquelas provenientes de uma co-evolução (Taylor *et al.*, 1999).

De acordo com Schulz e Boyle (2005), a interação entre o endofítico e o seu hospedeiro resulta de um antagonismo balanceado, em que os mecanismos de defesa da planta hospedeira estão em equilíbrio com os fatores de virulência do fungo. Para o estabelecimento de uma associação bem sucedida entre a planta e um fungo presente no ambiente é necessário que haja, primeiramente, um encontro físico entre eles, seguido pela superação de várias barreiras físicas e químicas. (Kusari *et al.*, 2012). Para Schulz e Boyle (2005), a hipótese do antagonismo balanceado foi inicialmente proposta para demonstrar como um endófito poderia evitar a ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, garantindo assim a sua própria prevalência antes de ser inibido pelos metabólitos tóxicos do hospedeiro, assim como para garantir seu crescimento no tecido vegetal sem causar manifestações visíveis de infecção ou de doença. Esta fase é apenas um período transitório em que fatores ambientais desempenham um papel importante para desestabilizar tal delicado equilíbrio antagônico (Kusari *et al.*, 2012). Além disso, alguns fungos são capazes de criar um mecanismo de defesa para sua prevalência, sugerindo a ocorrência de uma coexistência estável (Sirikantaramas *et al.*, 2009). Neste contexto, a produção de metabólitos secundários pelos fungos parece ajudá-los a

sobreviver no interior da planta hospedeira (Strobel & Daisy, 2003; Kusari *et al.*, 2012).

5 Se os mecanismos de defesa da planta se contrapuserem completamente aos fatores de virulência do fungo, o último pode não resistir e morrer; ao contrário, se a planta sucumbir à virulência do fungo, a relação planta/patógeno pode levar a planta à doença, e neste caso, o fungo torna-se um fitopatógeno (Kusari *et al.*, 2012). Entretanto, o mecanismo oposto, pelo qual um fungo patogênico poderia tornar-se endofítico ainda não está elucidado.

10 Schulz e colaboradores (2015) propõem que para se estabelecerem de maneira assintomática dentro da planta hospedeira, os fungos endofíticos precisariam manter um antagonismo balanceado não apenas com a planta hospedeira, como também com os outros micro-organismos competidores que vivem em associação com a planta, sejam eles fungos ou bactérias, tanto patógenos como endofíticos. Assim, os metabólitos secundários são fatores importantes para a manutenção do equilíbrio, resultando em
15 uma simbiose compatível e uma planta saudável (**Figura 1**). Estas interações ajudam a explicar o porquê dos metabólitos antibacterianos e antifúngicos produzidos pelos fungos endofíticos, uma vez que eles não despenderiam energia na produção de metabólitos que não tivessem uma função *in situ*. Estudos adicionais ainda se fazem necessários para elucidar as vias metabólicas e de sinalização envolvidas nessas
20 interações.

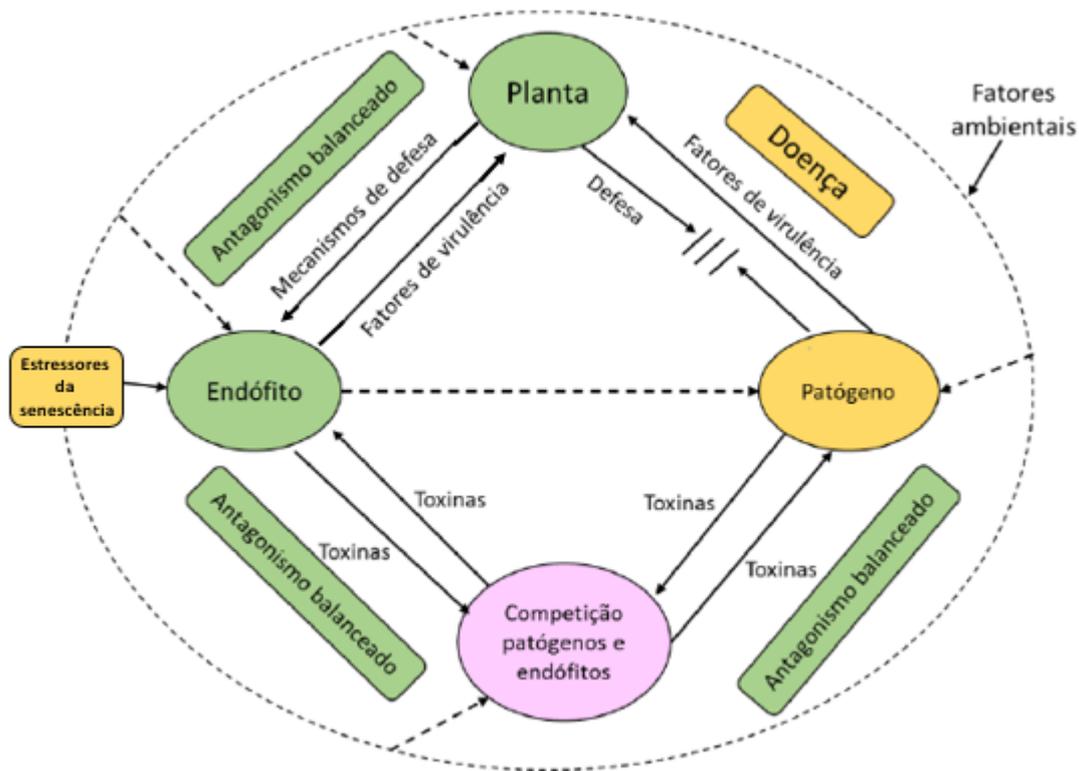


Figura 1. Hipótese do múltiplo antagonismo balanceado envolvendo os fungos endofíticos (Shulz *et al.*, 2015).

5 Ainda assim, algumas interações podem ser neutras e alguns endofíticos (como por exemplo, *Laphodermium piceae*) parecem ser decompositores latentes que passam a atuar após a morte do tecido da planta hospedeira (Deckert *et al.*, 2001; Korkama-Rajala *et al.*, 2008; Promputtha *et al.*, 2010). Além disto, alguns estudos demonstram que fungos transmitidos verticalmente (de forma sistêmica por sementes) tendem a desenvolver uma relação mutualística com seus hospedeiros, enquanto que aqueles transmitidos horizontalmente (forma não sistêmica, por esporos) são mais propensos a apresentar uma relação antagonista (Rodriguez *et al.*, 2009).

10 Como os fungos endofíticos exibem uma grande diversidade é de se esperar que a partir deles sejam descobertas importantes novidades biológicas. A possibilidade de isolamento de novos e eficazes metabólitos naturais a partir de endofíticos ainda não explorados têm encorajado pesquisadores a investirem em estudos neste campo de pesquisa (Katoch *et al.*, 2014).

2.3 Metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos endofíticos associados a plantas medicinais

Os produtos naturais são definidos como os compostos químicos produzidos por organismos vivos. Estes podem ser tanto provenientes do metabolismo primário quanto do metabolismo secundário. Um metabólito primário corresponde àquele sintetizado durante a fase de crescimento do organismo, enquanto que o metabólito secundário é definido como uma substância de baixo peso molecular produzido a partir da fase estacionária de crescimento do organismo (Lam, 2007; Selim *et al.*, 2012; Nisa *et al.*, 2015). Apesar de não estarem relacionados com o crescimento, os metabólitos secundários são frequentemente substâncias bioativas que desempenham funções importantes na defesa, competição, sinalização e interações ecológicas (Clardy & Walsh 2004; Bérdy 2005).

A descoberta de diferentes produtos naturais tem desempenhado papel importante na busca de novos fármacos e pode ser considerada como a fonte mais promissora para a descoberta de novas moléculas bioativas (Selim *et al.*, 2012). Neste contexto, os fungos representam um recurso chave para a exploração de moléculas com diferentes atividades biológicas, uma vez que são capazes de produzir metabólitos secundários complexos, dos quais poucos podem ser obtidos por meio da síntese química (Rosa *et al.*, 2011). Esta característica os tornam alvos atrativos para a descoberta de novas classes de produtos naturais bioativos, e dentre a diversidade de fungos bioativos, grande destaque é dado para os fungos tropicais, e entre eles, os fungos endofíticos têm se mostrado importantes para a triagem de diferentes atividades biológicas (Tenguria *et al.*, 2011; Nisa *et al.*, 2015). Muitas classes de substâncias químicas já foram isoladas de fungos endofíticos, tais como esteroides, xantonas, fenóis, isocumarinas, derivados de perileno, quinonas, depsipeptídeos, heterociclos nitrogenados, terpenóides e alcaloides (Santos *et al.*, 2003; Shulz & Boyle 2005; Gao *et al.*, 2018).

De acordo com Strobel & Daisy (2003) devem-se considerar alguns critérios para a seleção da planta hospedeira alvo, os quais incluem:

- Plantas endêmicas de determinadas regiões que apresentem longevidade incomum;
- Plantas de ambientes peculiares, especialmente aquelas que apresentam estratégias de sobrevivência pouco comuns;

- Plantas cujo desenvolvimento se dá em áreas de grande biodiversidade, tal como em florestas temperadas e tropicais;
- Plantas que apresentam um histórico etnobotânico, ou seja, que são tradicionalmente utilizadas como medicamento por tribos indígenas, grupos étnicos e pela população de um modo geral. Estas plantas vêm sendo escolhidas a partir de relatos da literatura e por meio do contato direto estabelecido com a população que as utilizam.

Fungos endofíticos associados a plantas medicinais são capazes de produzir metabólitos com diferentes atividades biológicas, tais como: antibacteriana (Clark *et al.*, 2013), antifúngica (Zhang *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2015b; Carvalho *et al.*, 2018), citotóxica (Ding *et al.*, 2014), tripanocida (Almeida *et al.*, 2014), antimicrobiana (Vieira *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2015) e antiviral (Ferreira *et al.*, 2015). Acredita-se que alguns endofíticos em associação com a planta medicinal hospedeira podem promover a acumulação de metabólitos secundários (incluindo componentes medicinais importantes) originalmente produzidos pelas plantas. Estes metabólitos podem ser produzidos por ambos, planta hospedeira e/ou fungo endofítico (Shwab & Keller 2008; Jia *et al.*, 2016). Tais descobertas fazem com que estes micro-organismos se tornem ainda mais atrativos como fonte de metabólitos bioativos que possuem propriedades de grande valor para a indústria farmacêutica.

O nosso grupo de pesquisa vem estudando comunidades de fungos endofíticos associados a plantas medicinais quanto à sua diversidade, bem como pela produção de metabólitos secundários bioativos. Como exemplo, Carvalho e colaboradores (2012) demonstraram no estudo realizado com a planta medicinal *Stryphnodendron adstringens* que a comunidade de fungos endofíticos associados a ela exibiu alta riqueza e diversidade. Os extratos produzidos a partir dos fungos endofíticos apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos, assim como atividade biológica contra linhagens de células tumorais humanas e a forma amastigota de *Leishmania amazonensis* (Carvalho *et al.*, 2012). Além disso, Ferreira e colaboradores (2015) demonstraram que a comunidade endofítica associada à planta medicinal *Carapa guianensis*, presente na floresta Amazônica, apresentou atividades antibacteriana, antiparasitária e antiviral, sugerindo que tais fungos endofíticos podem ser uma fonte de moléculas bioativas, incluindo aquelas capazes de inibir ou controlar doenças tropicais negligenciadas. Estes trabalhos reforçam a hipótese de que plantas medicinais, com

ocorrência no Brasil, podem representar um reservatório de fungos endofíticos com capacidade de produção de produtos naturais bioativos, assim como também representam uma fonte promissora de fungos endofíticos para estudos de taxonomia, diversidade, ecologia e história evolutiva.

5 Segundo Vieira e colaboradores (2014), embora tenha aumentado o interesse na biodiversidade de fungos associados às plantas medicinais, a diversidade, composição taxonômica, e potencial biotecnológico dos fungos endofíticos associados com as plantas medicinais tropicais permanecem pouco explorados. Além disto, reconhece-se também que produtos naturais de fonte microbiana podem ser mais econômicos e fáceis
10 de produzir, reduzindo assim, de maneira eficaz, o preço de mercado, o que reafirma a necessidade de estudos para este fim.

2.4 Doenças tropicias negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) formam um grupo diverso de
15 doenças infecciosas causadas por bactérias, parasitas ou vírus, que prevalecem especialmente em regiões tropicais e subtropicais (por ex.: leishmaniose, doença de Chagas, dengue, malária, dentre outras). Segundo relatos publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose visceral e Doença de Chagas estão entre as DTNs mais preocupantes (WHO, 2017). A prevalência das DTNs em algumas regiões
20 ocorre principalmente devido ao desinteresse da indústria farmacêutica em desenvolver novos fármacos. Apesar da existência de uma grande demanda, os consumidores potenciais não têm poder aquisitivo para adquirir os medicamentos. Em outras palavras, há demanda, mas não há mercado (WHO, 2010; Ventura-Garcia *et al.*, 2013).

A leishmaniose é uma das mais devastadoras DTN que causa substancial
25 mortalidade humana e incapacidade. Aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* (*Trypanosomatidae*) podem causar três variações da doença: leishmaniose cutânea, mucocutânea ou visceral (Dawit *et al.* 2013). De acordo com Kamhawi (2017) mais de um milhão de pessoas estão sendo vitimadas pela leishmaniose, e o número de mortes relatadas em todo o mundo é de cerca de 30.000 por ano. Com relação à leishmaniose
30 visceral, 90% dos casos relatados no ano de 2015 estavam concentrados em apenas sete países, dentre eles o Brasil (GHO, 2018). Ainda não existe vacina eficiente para controlar a doença (Dewitt *et al.*, 2013), e o tratamento atual consite no uso da anfotericina B, que apesar de eficaz, possui efeitos adversos altamente nefrotóxicos. O

tratamento também pode ser prejudicado devido ao custo elevado e pela dificuldade na obtenção de formulações orais da droga (Hefnawy *et al.*, 2017).

Há mais de um século, o parasita intracelular *Trypanosoma cruzi* foi descoberto como o agente etiológico da Doença de Chagas, e ainda nos dias de hoje, continua sendo um problema social e de saúde pública nos países da América Latina (Pérez-Molina & Molina 2017). Atualmente apenas duas drogas, descobertas há mais de um século, estão disponíveis para o tratamento da doença: os derivados heterocíclicos benzonidazol (Chagas, 1908) e nifurtimox (Chagas, 1909), sendo que nenhuma destas é eficaz durante a fase crônica da doença, além de ocasionar inúmeros efeitos adversos tóxicos (Santiago *et al.*, 2017).

A dengue é a doença arboviral de maior importância mundial. As infecções aumentaram drasticamente nas últimas décadas, podendo evoluir para formas graves e letais da doença, e por isso tem sido colocada de forma proeminente entre os principais problemas de saúde pública do mundo (WHO, 2014a). A transmissão de um dos quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4) para os humanos se dá por meio da picada dos mosquitos *Aedes* (Gubler, 2006). No entanto, não há nenhuma vacina licenciada eficaz disponível, apesar de várias vacinas estarem em processo de desenvolvimento (Marimuthu & Ravindler, 2016; Sharp *et al.*, 2017). Tendo em vista o aumento da prevalência e mortalidade da dengue globalmente, há uma necessidade em ampliar a pesquisa clínica pela busca de drogas e vacinas que atuem no combate à doença (WHO, 2006; Marimuthu & Ravindler, 2016). No estudo de Drumond e colaboradores (2013) sobre o vírus da dengue sorotipo 2 (DENV2) foi revelada a circulação simultânea de diferentes linhagens de DENV2 no Brasil, o que pode estar associado a um maior número de surtos epidêmicos e de manifestações graves da doença quando comparado aos outros três sorotipos da dengue. A existência de uma maior variabilidade genética entre o DENV2 também tem sido apontada como causa do insucesso em testes com vacinas (Campos *et al.*, 2008).

É iminente a necessidade de se encontrar novas drogas eficazes, com maior especificidade e baixa toxicidade para o hospedeiro humano. Entretanto, o desinteresse se apresenta como um fator importante para que essas doenças permaneçam como uma sentença de morte para as pessoas infectadas em países pobres (Santiago *et al.*, 2017). Apesar dos avanços na descoberta e desenvolvimento de drogas derivadas de plantas, as DTNs continuam sendo responsáveis pela morbidade e mortalidade em centenas de milhões de pessoas, especialmente em áreas

pobres (Goupil & McKerrow, 2014). Entre os organismos vivos, os fungos representam uma fonte promissora de substâncias naturais que poderiam ser usadas como uma ferramenta eficiente para projetar drogas contra patógenos humanos (Masi *et al.*, 2018). Diferentes metabólitos secundários bioativos contra parasitas e vírus já foram obtidos a partir de fungos endofíticos, alguns exemplos desses metabólitos e suas respectivas características encontram-se na **Tabela 1**.

2.5 Agroquímicos

Atualmente, o Brasil é um dos maiores consumidores de agroquímicos do mundo em valores absolutos, o que pode acarretar problemas de contaminação ambiental e para saúde humana, seja pela contaminação dos alimentos, seja pela exposição direta de trabalhadores aos produtos. Os agrotóxicos podem ser muito tóxicos, além de persistentes e móveis no solo, na água e no ar, tendendo a acumular-se no solo e na biota, e seus resíduos podem chegar às águas superficiais por escoamento, e às subterrâneas, por lixiviação (Brasil, 2018). Entre os agrotóxicos, os herbicidas são os mais utilizados, e entre eles, o glifosato foi o pesticida mais comercializado no Brasil no ano de 2016 (Brasil, IBAMA, 2018).

Um dos grandes problemas enfrentados pela agricultura está relacionado com plantas daninhas, as quais são capazes de competir com um grande número de culturas de importância econômica, o que acarreta em perdas severas em todo o mundo (Oerke, 2006). O uso extensivo de herbicidas, baseados em produtos químicos sintéticos, tornou-se danoso ao meio ambiente (Gianessi, 2013), pois além de serem responsáveis pela poluição do solo e da água, têm aumentado a resistência de plantas daninhas aos herbicidas utilizados, devido ao uso contínuo do mesmo produto durante anos (Clay, 1989; Waage, 1988; Green, 2014). Nenhuma substância química com um mecanismo de ação diferente dos já conhecidos foi sintetizado nas últimas décadas (Duke, 2012).

Atualmente, os recursos naturais, incluindo fungos endofíticos, vem sendo explorados para a busca de substâncias com propriedades agroquímicas, tais como substâncias que regulam o crescimento das plantas e bio-herbicidas (Strobel *et al.*, 2004). Estes metabólitos bioativos podem ser utilizados para inibir o crescimento de plantas, especialmente as plantas daninhas indesejáveis em um sistema agrícola (Zhang *et al.*, 2013), e poderiam garantir um menor impacto ambiental.

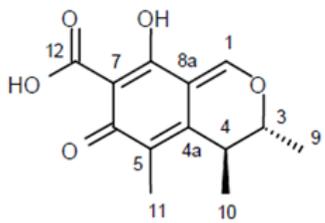
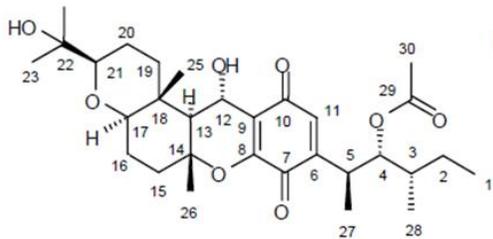
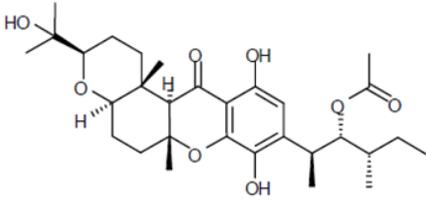
A maioria dos produtos comercializados como herbicidas nos EUA são provenientes de formulações baseadas em pesquisas com fungos, entretanto, poucos se

mantiveram bem-sucedidos a longo prazo (Harding & Raizada, 2015). Alguns endófitos já foram descritos como produtores de substâncias fitotóxicas para outras espécies de plantas que não sejam a hospedeira (Waqas *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014). Tais substâncias podem apresentar um potencial considerável como

5 modelos para o desenvolvimento de herbicidas com novos mecanismos de ação, que possam ser considerados menos danosos que os herbicidas sintéticos convencionais (Cimmino *et al.*, 2013; Varejão *et al.*, 2013). A **Tabela 1** ilustra exemplos de substâncias com atividade herbicida obtidas a partir de fungos endofíticos e suas respectivas características.

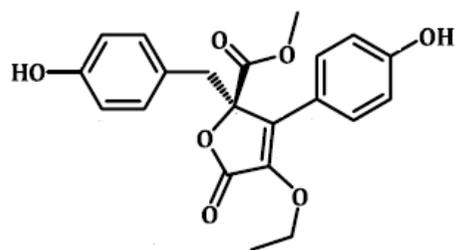
10

Tabela 1. Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos com atividades antiparasitária, antiviral e herbicida.

Fungo endofítico	Planta hospedeira	Molécula bioativa/Estrutura química	Atividade biológica	Referências
<i>Penicillium janthinellum</i>	<i>Melia azedarach</i> (Meliaceae)	 <p>Citrina</p>	Leishmanicida	(Marinho <i>et al.</i> , 2005)
<i>Cochliobolus</i> sp.	<i>Piptadenia adiantoides</i> (Fabaceae)	 <p>Cochlioquinona</p>	Leishmanicida	(Campos <i>et al.</i> , 2008)
<i>Cochliobolus</i> sp.	<i>Piptadenia adiantoides</i> (Fabaceae)	 <p>Isocochlioquinona</p>	Leishmanicida	(Campos <i>et al.</i> , 2008)

Aspergillus terreus

Carthamus lanatus
(Asteraceae)



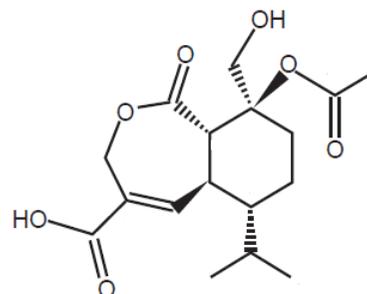
Terrenolida S

Leishmanicida

(Elkhayat *et al.*, 2015)

*Nectria
pseudotrichia*

Caesalpinia echinata
(Fabaceae)



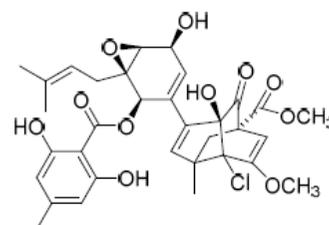
Ácido 10-acetil tricolorônico

Leishmanicida

(Cota *et al.*, 2018)

Pestalotiopsis fici

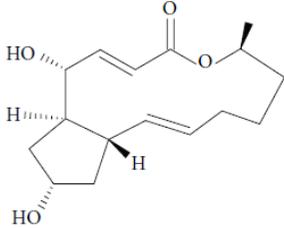
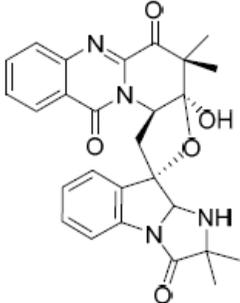
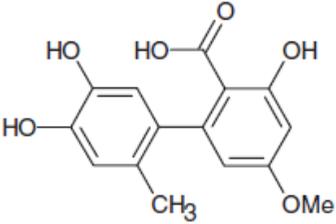
Não identificada



Cloropuceananina

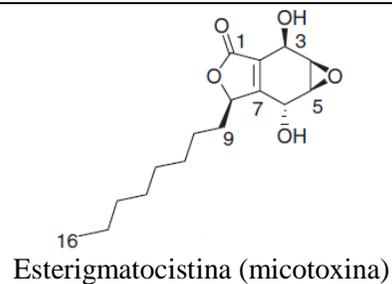
Antiviral

(Liu *et al.*, 2008)

<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Quercus variabilis</i> (<i>Fagaceae</i>)		Inibição da secreção de proteínas em células (droga antiviral)	(Klausner <i>et al.</i> , 1992; Wang <i>et al.</i> , 2007)
Brefeldina A (lactona macrocíclica)				
<i>Neosartorya udagawae</i>	Não identificada		Antiviral	(Yu <i>et al.</i> , 2016)
Neosartoriadina A				
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Trixis vauthieri</i> (<i>Asteraceae</i>)		Antimicrobiana, antioxidante e tripanocida	(Cota <i>et al.</i> , 2008)
Altenusina (bifenilo)				

Microthyriaceae sp.

Paspalum conjugatum
(*Poaceae*)

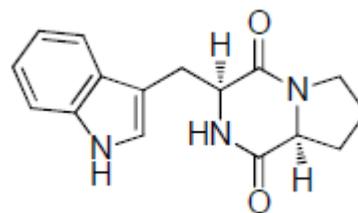


Tripanocida

(Almeida *et al.*, 2014)

Aspergillus
fumigatus

Melia azedarach
(*Meliaceae*)



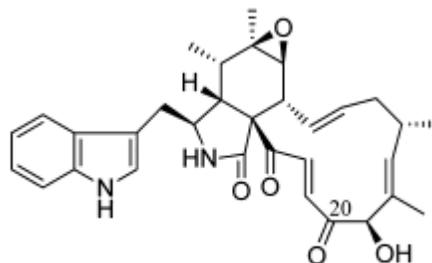
Brevianamida F

Herbicida para sementes
de alface

(Zhang *et al.*, 2013).

Chaetomium
globosum

Ginkgo biloba
(*Ginkgoaceae*)



Chaetoglobosina A

Fitotóxico para plântulas
de rabanete

(Li *et al.*, 2014)

2.6 Cultura de tecidos vegetais e seus fungos endofíticos “verdadeiros”

O cultivo de plantas *in vitro*, ou cultura de tecidos vegetais, pode ser definido como o cultivo em ambiente artificial sob condições assépticas e controladas de células vegetais isoladas, tecidos ou órgãos, que podem dar origem a plantas inteiras (Xiao & Kozai, 2011). Por meio da técnica de cultura de tecidos, uma semente ou mesmo um tecido vegetal, é inoculado em um meio de cultura contendo elementos capazes de permitir o crescimento e o desenvolvimento de uma plântula.

A micropropagação é a propagação vegetativa de um genótipo selecionado usando técnicas *in vitro* (Debergh & Read, 1991), para a obtenção de clones vegetais de maneira asséptica. Uma das finalidades da cultura de tecidos é a micropropagação de plantas medicinais devido à rápida produção de mudas num espaço físico reduzido. A tecnologia da micropropagação se constitui em uma valiosa ferramenta que possibilita a manipulação da produção de metabólitos bioativos e nos últimos anos ganhou grande visibilidade devido ao aumento da importância comercial dos metabólitos secundários das plantas medicinais (Debnath *et al.*, 2006). Além disso, a micropropagação é também uma valiosa ferramenta na identificação de micro-organismos endofíticos, para o estudo de suas relações e interações com a planta hospedeira em nível genético, celular e fisiológico (Barrow *et al.*, 2004).

A cultura de tecidos vegetais viabiliza ainda o estudo de transmissão vertical nos endofíticos, uma vez que o micro-organismo nunca deixa a planta hospedeira, sendo verticalmente transmitido por semente da planta parental para a próxima geração (Saikkonen *et al.*, 2010). Estes endofíticos são geralmente referidos como endofíticos “verdadeiros” (Hudgson, 2014).

Hardoim e colaboradores (2008) utilizaram a denominação de endofíticos obrigatórios para aqueles que são estritamente dependentes da planta hospedeira para seu crescimento e sobrevivência. Estes fungos passam todo o seu ciclo de vida dentro da planta sendo verticalmente transmitidos para outra planta. Enquanto que endofíticos transitantes são aqueles que eventualmente invadem os tecidos internos das plantas ao acaso e são transmitidos horizontalmente, via esporos.

A presença do fungo endofítico é considerada como um fator positivo capaz de auxiliar a planta, uma vez que vive no interior de seus tecidos sem causar sintomas de sua presença. No caso específico das culturas de tecido, a presença dos fungos endofíticos pode favorecer o ajuste osmótico, a produção de fitormônios e absorção de nutrientes (Pirttilä *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2009; Abreu-Tarazi *et al.*, 2010). Desse

modo, em cultura de tecidos, os endofíticos “verdadeiros” podem também assumir um papel de grande importância para a sobrevivência da plântula hospedeira, por meio da produção de metabólitos secundários, o que torna interessante a investigação dessa relação.

5

2.7 *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. e o Pantanal Mato-grossense

A planta *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. pertence a família *Lythraceae*, subclasse *Rosidae* e ordem *Myrtales*. *L. pacari* é uma planta característica do cerrado, compreendida normalmente entre cinco e 13 metros de altura, com folhas elípticas e coriáceas, apresenta inflorescência apical e a ocorrência da florescência se dá de março a outubro (**Figura 2**). Além disso, *L. pacari* é uma espécie brasileira e está presente desde o Amapá ao Rio Grande do Sul, sendo também encontrada no Paraguai e na Bolívia (Silva, 1998).

O gênero *Lafoensia* está amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais e *L. pacari* conhecida popularmente como: pacari, louro-de-serra (Santa Catarina), dedaleira-amarela, mangava-brava (Mato Grosso), copinho, dedal, dedaleiro (São Paulo). *L. pacari* é considerada uma planta com propriedades medicinais, sendo as folhas e a casca do caule mais comumente utilizadas por meio da infusão ou maceração em água ou vinho branco para administração oral (Mundo & Duarte 2007; Sampaio 2010).

Lafoensia pacari tem sido utilizada para o tratamento de feridas e coceiras, micoses cutâneas, câncer, úlceras, gastrite, inflamações e também como um tônico contra depressão (Solon *et al.*, 2000). Além de estudos que demonstram diferentes atividades, tais como antioxidante (Solon *et al.*, 2000), antimicrobiana (Lima *et al.*, 2006), anti-inflamatória, analgésica e antiedematosa (Rogerio *et al.*, 2006), e antiviral (Muller *et al.*, 2007). Em um estudo clínico, Menezes e colaboradores (2006) demonstraram que o extrato metanólico de *L. pacari* não apresentou atividade contra *Helicobacter pylori*, bactéria relacionada com vários distúrbios gástricos e duodenais. Entretanto, o extrato promoveu melhora considerável em relação aos sintomas para a grande maioria dos pacientes tratados, demonstrando assim o potencial farmacológico da planta.

No estado de Goiás, *L. pacari* é utilizada desde o princípio do século XIX por populações indígenas e o seu nome “pacari” é uma palavra de origem Tupi-Guarani que significa madeira preciosa. Já no estado do Mato Grosso, onde é popularmente

conhecida como mangava-brava, tem sido utilizada pela população pantaneira e de Cuiabá como um excelente cicatrizante e no tratamento de úlceras, por meio do macerado da casca do caule (Neto, 2006).

5 Estudos químicos relatam a presença de diversos metabólitos em diferentes partes da planta, entre os quais incluem saponinas e flavonoides encontrados na casca do caule, bem como taninos e triterpenos presentes tanto nas partes aéreas como na casca (Solon *et al.*, 2000). Além de polifenóis, quinonas e alcalóides que também podem estar presentes na planta (Porfírio *et al.*, 2009). Entretanto, os metabólitos secundários de *L. pacari* constituem-se, principalmente, de compostos fenólicos, tais como os taninos e flavonóides, destacando-se o polifenol conhecido como ácido elágico (Santos & Mello 2004; Sampaio 2010).

10 Carneiro e colaboradores (2016) relataram que a punicalagina é o principal constituinte, encontrado nas folhas de *L. pacari*, o qual apresenta uma ampla gama de atividades biológicas tais, como anti-inflamatória, antimicrobiana, antidiabética e antioxidante. Outro estudo recente mostra que os extratos etanólicos de *L. pacari* apresentaram atividade cicatrizante e anti-inflamatória, as quais devem estar relacionadas com a presença dos diferentes metabólitos secundários como o ácido elágico, punicalagina e punicalina (Pereira *et al.*, 2018).

15 A demanda crescente, o intenso extrativismo das espécies medicinais e as constantes queimadas vêm paulatinamente inserindo *L. pacari* na categoria de vulnerável, ou seja, aquela com probabilidade de passar à categoria de espécie em perigo de extinção (Fachim & Guarim, 1995; Ibama 2006). O seu uso, com objetivos terapêuticos, tem reduzido o número de indivíduos no ambiente natural de sua ocorrência, devido ao caráter meramente extrativista dessa prática. A retirada da casca, para fins medicinais leva a planta à morte, causada pelo anelamento do caule (Tonello, 1997). Na medicina popular brasileira, a casca do caule é frequentemente coletada por meio de cortes anelares, o que levou a um grave declínio na população desta espécie (Tonello, 1997).

30

5
10
15
20
25
30

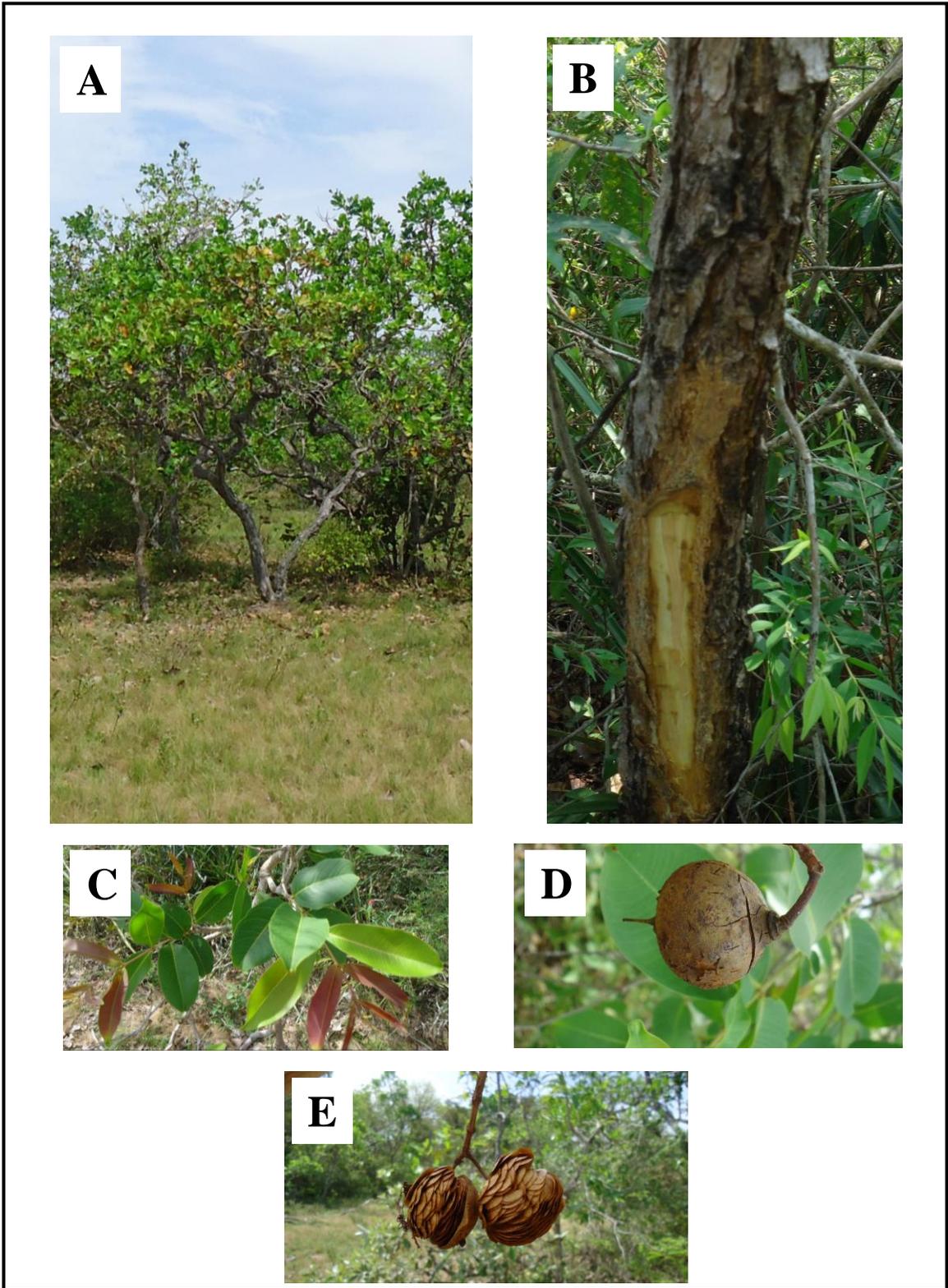


Figura 2. Aspecto geral de *Lafoensia pacari*. a) Indivíduo adulto. b) Casca. c) Folhas. d) Fruto. e) Sementes (Foto: S. S. Amorim).

O Pantanal brasileiro é um ecossistema único localizado na centro-oeste do país, considerado como a maior planície inundável do mundo (Alho, 2008), que possui uma grande biodiversidade e é considerado pela UNESCO como Patrimônio Natural da Humanidade (Roque *et al.*, 2016). O Pantanal é caracterizado por duas estações, a cheia e a seca, em que os ciclos de inundações e secas influenciam diretamente o influxo de nutrientes, contribuindo na formação de um ecossistema dinâmico (Dalmagro *et al.*, 2016).

As fases sazonais de cheia e seca das águas também possuem influência na riqueza, diversidade e distribuição das espécies vegetais, o que acarretou no desenvolvimento de uma diversidade biológica peculiar em relação à sua fauna e flora (Alho, 2008). Os ciclos também selecionaram plantas que podem crescer em abundância ou ausência de água (Brighenti *et al.*, 2017), e, conseqüentemente, influenciaram indiretamente nas comunidades de fungos endofíticos associados as plantas presentes no Pantanal. Devido as condições climáticas e ambientais diferenciadas, o potencial para produção de substâncias bioativas pelas plantas panteiras é alto (Brighenti *et al.*, 2017), entretanto, elas ainda precisam ser exploradas em relação as comunidades de potenciais fungos endofíticos bioativos.

20

25

30

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

5 Caracterizar a comunidade de fungos endofíticos associados à *Lafoensia pacari*, planta medicinal presente no Pantanal Mato-grossense, Brasil, bem como avaliá-la como fonte de metabólitos antiparasitários, antivirais e herbicidas.

3.2 Objetivos Específicos

- 10 • Obter fungos endofíticos de amostras de folhas, cascas dos caules e sementes de *L. pacari* presente em seu ambiente natural, bem como de plântulas obtidas por meio da cultura de tecidos;
- Depositar todos os isolados de fungos endofíticos obtidos na Coleção de Microorganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais e contribuir para preservação *ex situ* da diversidade de fungos tropicais e montagem de uma coleção temática de fungos tropicais;
- 15 • Identificar os fungos obtidos utilizando técnicas taxonômicas morfofisiológicas e moleculares;
- Caracterizar a diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados a *L. pacari* utilizando índices ecológicos;
- 20 • Preparar extratos brutos utilizando técnicas de fermentação no estado sólido a partir das culturas dos fungos endofíticos, e seus espécimes hospedeiros, para estudos de bioprospecção;
- Preparar extratos brutos utilizando técnicas de fermentação em meio líquido a partir das culturas dos fungos endofíticos recuperados das plântulas cultivadas *in vitro*;
- 25 • Determinar a atividade biológica dos extratos fúngicos e vegetais obtidos frente a:
 - formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*;
 - formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*;
 - vírus da Dengue sorotipo 2;
 - sementes de mono e dicotiledôneas como modelos de plantas para detecção de potencial herbicida;
- 30 • Avaliar a semelhança nas atividades entre os metabólitos bioativos produzidos pelos fungos endofíticos em relação aos produzidos por sua planta hospedeira.

4 Materiais e Métodos

4.1 Área de amostragem

As amostras de folhas e cascas dos caules de espécimes de *L. pacari* foram coletadas em outubro de 2014, no Município de Poconé, situado no Pantanal Mato-grossense, Brasil. A região da coleta foi o sítio de amostragem de Pirizal (S16°22'10.9" W56°18'31.6"), a aproximadamente 100 Km de Cuiabá, onde está situado o Núcleo de Estudos Ecológicos do Pantanal Mato-Grossense da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT).

O acesso a esta área foi realizado respeitando-se as legislações Estaduais e Federais de acesso à biodiversidade. Todos os espécimes vegetais hospedeiros dos fungos foram identificados a partir de suas estruturas vegetativas e reprodutivas e por meio de comparação com exsicatas previamente depositadas no Herbário do Departamento de Botânica da UFMG (Herbário BHCB), sendo que uma exsicata representativa foi depositada no Herbário BHCB com o número de registro 173389.

15

4.2 Coleta, isolamento e preservação dos fungos endofíticos

Para a realização do presente trabalho foram coletadas folhas e cascas dos caules de 30 indivíduos aparentemente saudáveis de *L. pacari*, sendo a localização dos mesmos determinada por coordenadas geográficas obtidas pelo *Global Positioning System* (GPS). As amostras coletadas foram armazenadas em sacos plásticos para posterior processamento em laboratório. Três folhas e três cascas do caule de cada indivíduo foram utilizadas, sendo cinco fragmentos de cada folha e casca inoculados para isolamento dos fungos endofíticos, totalizando 900 fragmentos na coleta.

Inicialmente ao processo de desinfestação, as folhas e cascas dos caules coletadas foram limpas superficialmente com detergente neutro e enxaguadas abundantemente com água destilada autoclavada. Em seguida, fragmentos de aproximadamente cinco milímetros de diâmetro foram retirados com auxílio de tesoura e pinças previamente esterilizadas, os quais foram desinfestados superficialmente com Extran 2% (um minuto), álcool 70% (um minuto), hipoclorito de sódio 2% (três minutos) e água destilada autoclavada (dois minutos) de acordo com Collado e colaboradores (1996) com modificações. Após este processo de desinfestação superficial, cinco fragmentos de cada folha e casca foram transferidos para placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose (BDA/Difco) suplementado com 100 mg/L de

cloranfenicol (Sigma), utilizado para inibir o crescimento de bactérias endofíticas contaminantes. Alíquotas da água destilada autoclavada utilizada no processo de desinfestação também foram inoculadas como controle para assegurar que somente os fungos endofíticos seriam isolados. As placas foram incubadas a 25 °C por um período de até 60 dias.

Adicionalmente, foram coletadas sementes de apenas dois espécimes vegetais de *L. pacari*. A coleta foi realizada no período de seca do Pantanal, portanto, não havia mais frutos na grande maioria das árvores. As sementes coletadas foram submetidas ao mesmo processo de desinfestação superficial descrito acima para o posterior isolamento de fungos endofíticos.

Todos os isolados crescidos foram transferidos para placas de Petri com BDA para purificação. Os isolados de fungos endofíticos obtidos foram preservados em duplicata, em água destilada autoclavada (Castellani, 1967), e em glicerol 15% a -80 °C, e depositados na Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG.

4.3 Identificação dos fungos endofíticos

4.3.1 Fungos Filamentosos

A taxonomia dos fungos é tradicionalmente baseada na morfologia comparativa e no desenvolvimento de estruturas reprodutivas sexuadas. Entretanto, de acordo com Phongpaichit *et al.* (2006) a maioria dos fungos endofíticos não produzem microestruturas sexuadas ou assexuadas em meio de cultura e apenas podem ser identificadas por métodos moleculares. Por isso, neste trabalho foram utilizadas análise da morfologia macroscópica associada às técnicas moleculares.

As colônias dos isolados de fungos filamentosos obtidas a partir das folhas e cascas dos caules de *L. pacari* foram fotografadas (frente e verso) e agrupadas de acordo com as seguintes características macromorfológicas: cor da colônia (frente e 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. Os isolados que apresentaram padrões de bandas idênticos foram confirmados como pertencentes ao mesmo grupo.

Um isolado de cada grupo molecular foi selecionado para sequenciamento da região transcrita interna ITS-5.8S da região gênica do rRNA. As identificações dos

grupos foram posteriormente confirmadas por meio do sequenciamento parcial do gene da β -tubulina e/ou da RNA Polimerase II. A escolha da região a ser sequenciada foi determinada de acordo com os gêneros encontrados por meio do sequenciamento da região ITS.

5

4.3.1.1 Extração do DNA Total

A extração de DNA total foi realizada de acordo com metodologia descrita por Rosa e colaboradores (2009) com modificações. Os fungos filamentosos foram crescidos por sete dias em BDA e então fragmentos de micélio foram colocados em tubo de 1,5 mL acrescidos de 400 μ L 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 dodecil sulfato 1%) e deixado a - 20 °C por no mínimo 10 minutos. Em cada tubo foram adicionadas três esferas de aço inox (3,175 mm de diâmetro) e posteriormente submetidos à trituração no equipamento Bullet Blender TM 24 (Uniscience). Em seguida, foram adicionados 162 μ L 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 μ L da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização, o tubo foi incubado por 30 minutos em gelo. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 14.000 r.p.m. por 10 minutos 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. Após homogeneização por inversão, os tubos foram incubados por 30 minutos em gelo e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e, em seguida, adicionado 50% do volume de isopropanol (Merck), sendo a suspensão gentilmente homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 14.000 r.p.m. por cinco minutos e o sobrenadante desprezado por inversão, seguido por homogeneização com etanol 70% (Merck) p/v. A amostra foi seca por aproximadamente 60 minutos, e então adicionado 50 μ L de Tris-EDTA (Tris-HCl 0,01 M e EDTA 0,001 M). A amostra foi então incubada a 65 °C por 60 minutos para hidratação do DNA e, posteriormente, armazenada em freezer a -20 °C.

4.3.1.2 Amplificação utilizando o iniciador (GTG)₅

O iniciador (GTG)₅ foi utilizado para amplificação de regiões de microssatélite, conforme descrito por Lieckfeldt e colaboradores (1993). A PCR (Reação em Cadeia da

Polimerase) foi realizada para um volume final de 25 μL contendo de 1,0 a 5,0 μL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 2,0 μL do iniciador (GTG)₅ 10 μmol^{-1} (MWG Biotech), 2,5 μL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 1,5 μL de MgCl_2 25mM, 1,0 μL de dNTP 10 mM, 0,2 μL de *Taq* DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água para injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycler (Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por dois minutos, seguido por 40 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 94 °C, um minuto de anelamento a 50 °C e um minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por seis minutos a 72 °C. 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 1 hora e 30 minutos a 80 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed (Biotium), e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, France).

4.3.1.3 Amplificação da região ITS

Os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) foram utilizados para amplificação da região transcrita interna ITS-5.8S da região do gene do rRNA, conforme descrito por White e colaboradores (1990). A PCR foi realizada em um volume final de 50 μL contendo de 1,0 a 5,0 μL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 1,0 μL de cada iniciador ITS1 e ITS4 10 μmol^{-1} (MWG Biotech), 5,0 μL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0 μL de MgCl_2 25mM, 2,0 μL de dNTP 10 mM, 0,2 μL de *Taq* DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água para injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycler (Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por cinco minutos, seguido por 35 ciclos de um minuto de desnaturação a 94 °C, um minuto de anelamento a 55 °C e um minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por cinco minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, eluídos durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed (Biotium), e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

4.3.1.4 Amplificação parcial do gene da β -tubulina

Os iniciadores BT2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) e BT2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC) foram utilizados para amplificação parcial do gene da β -tubulina, conforme descrito por Glass & Donaldson (1995). A PCR foi realizada em um volume final de 50 μ L contendo de 1,0 a 5,0 μ L de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/ μ L), 1,0 μ L de cada iniciador BT2a e BT2b 10 μ mol⁻¹ (MWG Biotech), 5,0 μ L de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0 μ L de MgCl₂ 25 mM, 2,0 μ L de dNTP 10 mM, 0,2 μ L de *Taq* DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água para injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycler (Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por cinco minutos, seguido por 35 ciclos de um minuto de desnaturação a 94 °C, um minuto de anelamento a 59 °C e 90 segundos de extensão a 72 °C e uma extensão final por sete minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, eluídos durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed (Biotium) e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

4.3.1.5 Amplificação parcial da RNA Polimerase II

Os iniciadores RPB2 5F (GATGACCGTGGACCACTTCGG) e RPB2 7R (CCCATGGCTTGTTTGCCCAT) foram utilizados para amplificação parcial do gene da RNA polimerase II conforme descrito por Malkus *et al.* (1999). A PCR foi realizada em um volume final de 50 μ L contendo de 1,0 a 5,0 μ L de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/ μ L), 1,0 μ L de cada iniciador RPB2 5F e RPB2 7F 10 μ mol⁻¹ (MWG Biotech), 5,0 μ L de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0 μ L de MgCl₂ 25mM, 2,0 μ L de dNTP 10 mM, 0,2 μ L de *Taq* DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água para injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycler (Eppendorf). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94 °C por três minutos, seguido por 35 ciclos de 20 segundos de desnaturação a 94 °C, 30 segundos de anelamento a 55 °C e 60 segundos de extensão a 72 °C e uma extensão final por 10 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, eluídos durante aproximadamente 30 minutos

a 120 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed (Biotium), e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

5 4.3.2 Leveduras

As leveduras foram agrupadas de acordo com os perfis moleculares obtidos por meio da técnica de PCR microsatélite (MSP-PCR), utilizando o oligonucleotídeo sintético (GTG)₅. Os isolados que apresentaram padrões de bandas idênticos foram confirmados como pertencentes ao mesmo grupo. Um isolado de cada grupo molecular foi selecionado para sequenciamento dos domínios D1/D2 da subunidade maior do DNA ribossomal utilizando os iniciadores NL1 e NL4.

4.3.2.1 Extração do DNA total

O DNA genômico dos isolados de leveduras foi extraído segundo Sambrook *et al.* (1986) com modificações. Os isolados foram crescidos em Ágar Batata Dextrosado por 24 horas a 25 °C. Após crescimento, as colônias foram ressuspensas em 100 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 dodecil sulfato 1%), agitado em vórtex e aquecido a 65 °C por 30 minutos. Após esta etapa, foram adicionados 200 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e homogeneizados por inversão. Em seguida, centrifugou-se a 14.000 r.p.m. por 15 minutos. Transferiu-se a fase superior para novo tubo e para a precipitação do DNA adicionaram-se 100 µL de isopropanol (Merck) seguido de centrifugação a 14.000 r.p.m. por 10 minutos. O DNA foi lavado com 200 µL de etanol 70% (Merck) e centrifugado a 14.000 r.p.m. por 10 minutos. A amostra foi seca por aproximadamente 90 minutos a temperatura ambiente e dissolvida em 100 µL de TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM). Todos os produtos obtidos foram quantificados em espectrofotômetro a 260/280 nm (NanoDrop ND 1000 Technologies) e estocados a -20 °C até sua utilização.

30 4.3.2.2 Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4

Os isolados de leveduras foram submetidos ao sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA utilizando os iniciadores NL1 (GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) e NL4 (GGTCCGTGTTTCAAGACGG),

segundo Lachance *et al.* (1999). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo: 1,0 a 5,0 µL de DNA (variando de acordo com a concentração do DNA, a qual deve estar entre 50-500 ng/µL), 1,0 µL de cada iniciador NL1 e NL4 10 µmol⁻¹, 5,0 µL de tampão de PCR 5X (Fermentas), 2,0 µL de MgCl₂ 25 mM, 2,0 µL de dNTP 10 mM, 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase 5U (Fermentas) e o volume final completado com água para injeção esterilizada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Mastercycler (Eppendorf), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por dois minutos, seguida por 35 ciclos de: desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 54 °C por 25 segundos e extensão a 72 °C por 20 segundos, seguida por extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (Pronadisa), em tampão TBE 0,5X, eluídos durante aproximadamente uma hora a 120 V. As bandas foram coradas com solução de GelRed (Biotium), e os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação gel (Vilber Lourmat, França).

15

4.3.3 Purificação dos amplicons

Os amplicons gerados pela reação de PCR foram purificados utilizando-se EDTA. Ao produto de PCR com volume de 47 µL foram adicionados 11,75 µL de EDTA 125 mM e 141 µL de etanol absoluto (Merck). Esta mistura foi submetida à centrifugação com rotação de 14.000 r.p.m. durante 25 minutos. O sobrenadante foi descartado, e para lavagem do precipitado foi adicionado 120 µL de etanol 70%, sendo posteriormente homogeneizado por inversão. Após centrifugação a 14.000 r.p.m. por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado novamente e o restante do etanol foi secado por 20 minutos a 37 °C. O DNA então foi ressuspensionado em 10 µL de água para injeção esterilizada. O produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) para ser utilizado nas reações de sequenciamento.

25

4.3.4 Reações de sequenciamento

As reações de sequenciamento dos produtos obtidos após a purificação dos amplicons foram realizadas no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular (LPCM) do Instituto René Rachou/Fiocruz MG, utilizando o kit Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730. A reação de sequenciamento foi realizada em microplacas de

30

96 poços (Applied 5 Biosystems, EUA) preparada para um volume final de 10 µL, em que foram adicionados: 1 µL do iniciador ($5 \mu\text{mol}^{-1}$), 1 µL de tampão (presente no kit de sequenciamento), 1 µL de Big Dye, 1 a 5 µL de DNA (de modo que a reação final contenha entre 15 e 20 ng) e o restante de água para injeção esterilizada para completar o volume, se necessário. O programa de ciclagem utilizado consistiu de uma desnaturação inicial a 36 °C por um minuto, 36 ciclos de anelamento a 96 °C por 15 segundos, seguido por 15 segundos de extensão a 50 °C e quatro minutos de extensão final a 60 °C.

Para precipitação das reações de sequenciamento, 1,0 µL de EDTA 125 mM, 1,0 µL de acetato de sódio 3M e 50 µL de etanol absoluto (Merck) foram adicionados em cada poço da placa de 96 poços. A placa foi submetida à agitação em vórtex e incubada por 15 minutos à temperatura ambiente.

Após o período de incubação, a placa foi centrifugada por 45 minutos a 4.000 r.p.m. a 4 °C. O sobrenadante foi descartado por inversão da placa. Em seguida, foram adicionados 100 µL de etanol 70% (Merck). A placa foi novamente centrifugada por 15 minutos a 4.000 r.p.m. a 4 °C e o sobrenadante descartado por inversão. Para remoção do excesso de etanol, a placa foi invertida sobre um papel absorvente, e submetida a um pulso em centrífuga a 900 r.p.m. durante um segundo. Em seguida, a placa foi mantida em repouso durante 20 minutos para evaporação do etanol residual. O DNA das amostras precipitado em cada poço foi então ressuscitado em 10 µL de Formamida HI DI (Applied Biosystems, EUA). A placa foi e armazenada a 4 °C, protegida da luz, até injeção das amostras no sistema automatizado ABI 3730.

4.3.5 Análise computacional das sequências

As sequências de DNA dos fungos endofíticos foram comparadas com as sequências de espécies tipo ou referência de fungos, depositadas no GenBank e pertencentes a coleções de culturas internacionais, 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*. Os fungos que apresentaram sequências com valor de E = 0, cobertura e identidade $\geq 99\%$, bem como proximidade quando analisadas filogeneticamente com sequências de espécies tipo ou referência, utilizando o programa MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Tamura *et al.*, 2013), foram considerados como pertencentes à mesma espécie. Para fungos com sequências com valor de E diferente de

zero, e cobertura e identidade $\leq 98\%$, os mesmos foram identificados em nível de espécie, gênero ou níveis hierárquicos mais altos após a análise filogenética. Para identificação molecular foram utilizadas as sequências ≥ 350 pares de bases. Informações sobre os níveis hierárquicos utilizados na taxonomia dos fungos foram obtidos no MycoBank (<http://www.mycobank.org/>), Index Fungorum e (<http://www.Índexfungorum.org/>) e Kirk e colaboradores (2008).

4.4 Diversidade da comunidade fúngica: índices de abundância, riqueza e dominância

10 A abundância de cada táxon foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: porcentagem de abundância do táxon A = número de isolados do táxon A x 100/soma de isolados de todos os táxons. Estes dados foram utilizados para determinar a prevalência de cada táxon em comparação com o total de táxons presente nas comunidades fúngicas na área de coleta.

15 Para avaliar a diversidade de espécies no local de coleta, foram utilizados os seguintes índices: (a) Fisher- α (diversidade), (b) Margalef (riqueza) e (c) Simpson (dominância). O índice de diversidade de Fisher- α é adequado para frequências em que diferentes espécies ocorrem de forma aleatória onde, comumente, algumas espécies são tão raras que sua chance de inclusão é pequena. Este índice é calculado pela fórmula $S = a \cdot \ln(1+n/a)$ onde, S é o número de táxons presente na amostra, n é o número de indivíduos e a representa o índice de Fisher- α . O Índice de Margalef é uma medida utilizada em ecologia para estimar a riqueza de espécies de uma comunidade com base na distribuição numérica dos indivíduos das diferentes espécies em função do número total de indivíduos existentes na amostra analisada. Sua fórmula é dada por $S = (n-1)/\ln(N)$, onde n é o número de táxons encontrados e N representa o número de indivíduos. Quanto mais alto o valor de S maior a riqueza de espécies do local amostrado. O índice de Simpson é muitas vezes utilizado para quantificar a biodiversidade de um ecossistema. Ele leva em conta o número de espécies presentes no local, bem como a abundância de cada espécie. Trata-se de um índice de dominância que mede a probabilidade de dois indivíduos, selecionados ao acaso na amostra, pertencer à mesma espécie. O cálculo da Dominância de Simpson é dado pela fórmula $D = \sum(n / N)^2$, onde n é o número total de organismos de uma mesma espécie e N o número total de organismos de todas as espécies. O valor estimado de D pode variar de 0 a 1, sendo que 0 representa o máximo de diversidade e 1 o mínimo de diversidade.

Sendo assim, uma comunidade de espécies com maior diversidade terá uma menor dominância.

Uma curva de rarefação foi traçada utilizando o índice de Mao Tau, o qual interpola valores entre zero e o número de amostras analisadas, e calcula a riqueza esperada e o intervalo de confiança. Este cálculo permite uma comparação estatística direta entre a riqueza e os conjuntos de dados (Colwell *et al.*, 2004). Todos os resultados foram obtidos com 95% de confiança, e os valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 repetições. Todos os índices foram calculados utilizando o programa computacional PAST 1.90.

10

4.5 Cultivo *in vitro* de *Lafoensia pacari*

4.5.1 Germinação das sementes

As sementes obtidas a partir de frutos de dois indivíduos de *L. pacari* foram submetidas a um processo de desinfestação superficial, em câmara de fluxo laminar, composto de álcool 70% (um minuto), hipoclorito de sódio 1% (15 minutos) e lavagem por seis vezes em água destilada autoclavada. Após lavagem, as sementes foram colocadas sobre papel filtro, por duas horas, a fim de secá-las.

As sementes superficialmente desinfestadas foram inoculadas em tubos de vidro contendo o meio Murashigue & Skoog (MS) (Sigma) (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com giberelina (Sigma) nas concentrações 2 e 3 mg/L, sacarose opcional nas concentrações de zero, 20 e 30 g/L, solidificado com Phytigel (Sigma) 2,5 g/L e com o pH ajustado para 5,8. Os tubos foram vedados e mantidos em incubadora sob fotoperíodo de 16 horas no claro e oito horas no escuro, temperatura de 22 ± 2 °C e irradiância de $35 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, durante 90 dias.

Posteriormente, as sementes também foram inoculadas no meio *Wood Plant* (WP) (Caisson) (McCown & Lloyd, 1980) suplementado com sacarose 30 g/L, 6-benzilaminopurina (BAP) (Sigma) 0,5 mg/L, giberelina (Sigma) 2 mg/L opcional, e solidificado com Phytigel (Sigma) 2,5 g/L e com o pH ajustado para 6,0 (Pina *et al.*, 2016). Os tubos foram incubados sob a mesma condição descrita acima.

30

4.5.2 Obtenção de fungos endofíticos a partir das plântulas de *Lafoensia pacari*

4.5.2.1 Plântulas crescidas em meio Murashigue & Skoog

Em ambiente estéril, as folhas das plântulas obtidas a partir da germinação das sementes realizada em meio MS foram trituradas em 1 mL de solução salina (NaCl 0,85%). Após trituração, 1 mL do triturado foi submetido a diluição seriada, e uma alíquota de 100 µL das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} transferidas para placas de Petri
5 contendo BDA suplementado com 100 mg/L de cloranfenicol. Alíquotas da solução salina utilizada no processo de diluição também foram inoculadas como controle, para assegurar o isolamento somente de fungos endofíticos. As placas foram seladas com parafilme e incubadas a 25 °C por um período de 90 dias.

10 **4.5.2.2 Plântulas crescidas em meio *Wood plant***

Em ambiente estéril, uma massa variando entre 90 e 130 mg das folhas das plântulas obtidas a partir da germinação das sementes realizada em meio WP foi triturada em 1 mL de solução salina (NaCl 0,85%). Após trituração, 1 mL do triturado foi submetido a diluição seriada, e uma alíquota de 100 µL do triturado assim como das
15 diluições 10^{-1} e 10^{-2} foi transferida para placas de Petri contendo BDA suplementado com 100 mg/L de cloranfenicol. Alíquotas da solução salina utilizada no processo de diluição também foram inoculadas como controle.

Para as plântulas que se encontravam em maior estágio de desenvolvimento, foi realizado a transferência direta de fragmentos de folhas e do caule para placas de Petri
20 contendo BDA suplementado com 100 mg/L cloranfenicol. Para isso, fragmentos de aproximadamente cinco milímetros de diâmetro foram cortados com auxílio de bisturis, lâminas e pinças previamente esterilizados. Todas as placas, tanto as contendo alíquotas dos triturados das folhas quanto aquelas contendo fragmentos das plântulas, foram seladas com parafilme e incubadas a 25 °C por um período de 90 dias.

25

4.6 Cultivo dos fungos e preparo dos extratos

4.6.1 Fungos filamentosos e leveduras

Os fungos filamentosos e leveduras obtidos foram crescidos em cinco placas de Petri de 90 x 15 mm contendo meio BDA a 25 °C com umidade de 70-80%. Após 15
30 dias de crescimento, o meio de cultura com o crescimento micelial/colônias de levedura foi transferido para frascos de vidro (tipo Erlenmeyers) de 125 mL, congelados a -80 °C por 24 horas e, posteriormente, submetidos ao processo de liofilização (Liofilizador LioTop – K105) por 96 horas. Após a desidratação completa do meio contendo micélio/

colônias de levedura foram acrescentados 80 mL de diclorometano P.A. (Synth). Os frascos foram incubados a temperatura ambiente, e após 96 horas o sobrenadante (fase diclorometânica) de cada frasco foi filtrado com auxílio de papel filtro (50 x 50 – 80g). O procedimento foi repetido, de forma que 80 mL de diclorometano foram novamente adicionados aos frascos e o sobrenadante de cada frasco filtrado após 72 horas de incubação, sendo posteriormente transferidos para frascos de cintilação (Rosa *et al.*, 2012).

4.6.2 Folhas e cascas dos caules de *Lafoensia pacari*

Folhas e cascas dos caules dos indivíduos de *L. pacari* amostrados foram liofilizadas por 72 horas (Liofilizador LioTop – K105) e colocadas em frascos de vidro tipo Erlenmeyers de 125 mL com 80 mL de diclorometano P.A. (Synth). Os frascos foram mantidos ao abrigo da luz e, após 15 dias, o diclorometano (sobrenadante) de cada Erlenmeyer foi filtrado para frascos de vidro. O procedimento descrito foi repetido, e ao final, o filtrado transferido para frascos de cintilação.

Todos os extratos brutos obtidos, dos fungos (filamentosos e leveduras), e dos vegetais, foram secos a temperatura ambiente e solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma), a uma concentração de 20 mg/mL. Posteriormente, os extratos foram depositados na Extratoteca do Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais da UFMG e na Extratoteca do Grupo de Pesquisas Química de Produtos Naturais Bioativos (QPNB) do Instituto René Rachou/Fiocruz MG, sendo mantidos a -20 °C até a utilização nos ensaios biológicos. Outra parcela dos extratos foi mantida à 4 °C até a utilização nos ensaios herbicidas.

4.6.3 Recultivo e reteste dos extratos ativos

Os extratos que apresentaram atividade em todas as etapas dos ensaios biológicos realizados no Instituto René Rachou/Fiocruz MG foram novamente produzidos a fim de avaliar a manutenção da atividade após recultivo. Para tanto, os fungos bioativos selecionados foram submetidos ao processo de extração descrito anteriormente no item **4.5.1** deste trabalho, e posteriormente retestados nos ensaios específicos.

4.6.4 Preparo dos extratos a partir dos fungos isolados das plântulas de *L. pacari*

Os fungos filamentosos e as leveduras endofíticas obtidas a partir das plântulas *in vitro* foram cultivados em 125 mL de caldo batata dextrose (Difco) sendo mantidos em incubadora shaker (New Brunswick) a 40 °C e 150 r.p.m. por 15 dias. Os isolados foram cultivados em duplicada, e como controle foi utilizado o meio de cultura sem o inoculo fúngico. Após 15 dias, em capela de fluxo laminar, o cultivo foi filtrado em papel filtro (50 x 50 – 80g) autoclavado, e o filtrado armazenado em tubos cônicos tipo Falcon de 50 mL. As etapas descritas acima foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais da UFMG.

Os diversos tubos contendo todo o material filtrado foram encaminhados ao QPNB/Instituto René Rachou/Fiocruz e armazenados a 4 °C. O filtrado da cultura fúngica, assim como o controle, foram submetidos à extração líquido-líquido, realizada em funil de separação, sendo utilizados 100 mL de acetato de etila P.A. (Alphatec) e o processo repetido por quatro vezes. Após a separação das fases, a fase aquosa foi descartada e à fase orgânica foi adicionado sulfato de sódio anidro (Synth), sendo posteriormente filtrada e concentrada em evaporador rotatório sob vácuo, em temperaturas inferiores a 40 °C. Os extratos foram secos em centrífuga a vácuo, solubilizados à 20 mg/mL em DMSO, e depositados na Extratoteca do QPNB, sendo então submetidos aos ensaios biológicos antiparasitários e antivirais. Em paralelo, uma parcela dos extratos obtidos foi depositada na Extratoteca da UFMG e submetida ao ensaio herbicida.

4.7 Ensaios Biológicos

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

A manutenção das células axênicas de *L. (L.) amazonensis* e o ensaio com amastigotas-like foram realizados por técnicos especializados pertencentes ao Grupo de Pesquisa Química de Produtos Naturais Bioativos/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. As formas amastigotas foram semeadas a 10⁸ parasitos/mL e deixadas em meio apropriado, na presença ou não dos extratos e drogas controle. Após 72 horas, a

atividade dos extratos testados sobre as amastigotas nos poços teste foi medida pelo método colorimétrico do MTT (Sigma/USA). A absorvância dos poços testes foi comparada com as absorvâncias dos controles com e sem drogas de referência (Anfotericina B). Os extratos capazes de inibir acima de 70% a proliferação dos parasitas foram considerados ativos. Para os extratos considerados ativos, diferentes concentrações são testadas para cálculo da Concentração Letal (LC₅₀).

4.7.2 Ensaio *in vitro* com as formas tripomastigotas e as formas intracelulares amastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Os ensaios *in vitro* com as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* foram realizados de acordo com protocolos estabelecidos por Buckner e colaboradores (1996) com algumas modificações (Romanha *et al.*, 2010). A manutenção dos parasitas, bem como os ensaios foram realizados por técnicos especializados do Grupo Genômica Funcional e Proteômica de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* (GFP) do Instituto René Rachou/Fiocruz, MG. Os extratos foram testados por meio de ensaio colorimétrico, sendo utilizada a linhagem de *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen) e extratos fúngicos diluídos numa concentração de 20 mg/mL.

A linhagem de *T. cruzi* é transformada para expressar beta-galactosidase, enzima que é capaz de catalisar uma reação colorimétrica quando o *cloro-phenol red beta-D-galactopyranoside* (CPRG) é utilizado como substrato. Para a triagem dos extratos, 4,0 x 10³ células L929 (fibroblasto de camundongo) em meio RPMI (pH 7,2 - 7,4) foram semeadas por poço em placas de 96 poços, no volume de 80 µL, seguido de incubação para a adesão das células à superfície. Após incubação, a infecção foi realizada com 4,0 x 10⁴ formas tripomastigotas por poço no volume de 20 µL, durante duas horas. Após, o meio contendo as formas tripomastigotas que não penetrarem nas células foi substituído por 200 µL de meio fresco e a placa novamente incubada. Após 48 horas, o meio foi novamente descartado e substituído por 180 µL de meio fresco e 20 µL dos extratos a serem testados. Cada extrato foi testado em duplicata.

Após 7 dias de incubação, o CPRG na concentração final de 100 µM e o Nonidet P-40 na concentração final de 0,1 % foram adicionadas as placas, seguidos de incubação overnight a 37 °C, e a absorvância foi medida a λ 570 nm em leitor automático de microplaca. Como controles foram utilizadas células não infectadas, células infectadas não tratadas, benzonidazol a 1 mg/mL (3,81 µM) (controle positivo) e

DMSO diluído em meio a uma concentração final de 1 % (controle negativo). Os resultados foram expressos como a porcentagem de redução da absorbância dos poços experimentais em comparação com a absorbância dos poços com células infectadas não tratadas.

5 Os extratos que apresentarem atividade igual ou maior que 50% foram considerados ativos e submetidos ao ensaio descrito acima para determinação da concentração do extrato necessária para inibir o desenvolvimento de aproximadamente 50% dos parasitos (CI₅₀). Para isso, os extratos foram testados em concentrações decrescentes, a partir de 20 µg/mL em diluições 1:3 (solução estoque do extrato: meio) 10 até se chegar ao CI₅₀. Os ensaios de determinação do CI₅₀ foram realizados em triplicata.

4.7.2.1 Testes de avaliação da atividade citotóxica *in vitro* dos extratos tripanocidas

Os extratos brutos considerados ativos foram submetidos ao ensaio *in vitro* para determinação da atividade citotóxica em células L929 não infectadas utilizando o 15 corante alamarBlue® (Romanha *et al.*, 2010). As células foram expostas aos extratos em concentrações crescentes a partir do CI₅₀ para *T. cruzi*. Após 96 h de exposição foi adicionado o alamarBlue® e a absorbância medidas nos λ 570 e 600 nm após 4 – 6 h. A viabilidade celular foi expressa como a porcentagem de redução entre células tratadas e não tratadas. Os valores de CI₅₀ foram calculados por interpolação linear e o índice de 20 seletividade (IS) foi determinado com base na razão do valor do CI₅₀ na célula hospedeira dividida pelo valor do CI₅₀ do parasita.

4.7.3 Triagem da atividade antiviral contra o vírus da Dengue sorotipo 2 (DENV2)

A manutenção dos vírus e os ensaios foram realizados em colaboração com a 25 Dra. Jaqueline Germano de Oliveira do Instituto René Rachou. O ensaio utilizado para a realização da triagem da atividade antiviral contra o vírus da dengue sorotipo 2 (DENV2), em células BHK-21, constituiu-se da avaliação do efeito citopático (ECP) viral por microscopia ótica. O método de cruces (+) rotineiramente utilizado em laboratórios de virologia foi utilizado para a classificação da intensidade do ECP viral (gradação de 0 a 4+) na presença ou ausência do extrato (Tang *et al.*, 2012), permitindo 30 assim, uma avaliação visual do efeito do extrato no ECP causado pelo DENV2 nas células BHK-21.

Os ensaios foram realizados em duplicata em placas de 96 poços onde a localização de todos os extratos é intencionalmente a mesma da placa contendo os

extratos solubilizados. Tais placas são denominadas “placas espelho”. Para o ensaio antiviral foram adicionadas 1×10^4 de células BHK-21 por poço das “placas espelho” contendo meio DMEM adicionado de 5% de SFB e antibióticos. A monocamada celular com 80% de confluência foi observada após incubação de 24 horas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Para determinação do volume de suspensão viral necessário para m.o.i. desejada considera-se que cada poço possuía aproximadamente $1,6 \times 10^4$ células/poço no momento da adição do vírus e do extrato às placas após 24 horas de incubação. O volume adequado de suspensão de DENV2 foi diluído em meio DMEM suplementado com 2% de SFB e 1% de antibióticos. Em seguida, o meio de cultura das placas com a monocamada celular foi removido e adicionado 100 µL das diluições das amostras de extratos com concentração de 25 µg/mL e 100 µL da suspensão viral em cada poço. Portanto, o volume final em cada poço com a monocamada celular foi de 200 µL de meio DMEM suplementado com 2% de SFB e antibióticos.

Os seguintes controles foram realizados, a saber: células não tratadas e não infectadas sem DMSO (CC), células não tratadas e não infectadas em meio de cultura contendo DMSO; células não tratadas e infectadas sem o DMSO (CV) e de células não tratadas e infectadas em meio contendo DMSO. Em seguida, as placas foram incubadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, a 37 °C, por 72 horas. Após o tempo de incubação e observação do efeito citopático de aproximadamente de 100% no controle de vírus, considerado como 4+ (100% de ECP), foi feita leitura para a avaliação da viabilidade celular com o extrato testado utilizando os seguintes critérios: (1+) até 25% de ECP, (2+) 26% a 50% de ECP, (3+) 51 % a 75 % de ECP, e (4+) a partir de 76 % a 100 % de ECP.

25

4.7.4 Determinação da atividade herbicida

A atividade herbicida foi determinada utilizando-se 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% (1 minuto), hipoclorito de sódio a 2 - 2,5% (7 minutos e meio). Posteriormente, as sementes foram lavadas em água deionizada autoclavada por seis vezes e secas sobre papel filtro em um ambiente esterilizado por duas horas. Os bioensaios foram realizados em duplicata em placas de poliestireno de 24 poços esterilizadas (TPP 92024). Um disco de papel de

filtro qualitativo (50 x 50 – 80g) foi colocado em cada poço utilizado. Aos poços controle foram adicionados 400 µL de água deionizada autoclavada. Para avaliação de toxicidade do solvente utilizado na solubilização dos extratos foi realizado o controle de solvente. Para tanto, foi adicionado ao poço 360 µL de água e 40 µL de acetona PA.

5 Aos poços testes foram adicionados 360 µL de água e 40 µL da diluição do extrato na concentração de 1 mg/mL. Posteriormente, cinco sementes de cada vegetal teste foram adicionadas a cada poço. As placas foram tampadas e seladas com parafilme, sendo incubadas em BOD sob condições de luz contínua ($120,1 \text{ umol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$) a 25 °C por 10 dias para *L. sativa* e 14 dias para *A. schoenoprasum*.

10 Após o período de germinação de cada semente foi realizada uma estimativa qualitativa de fitotoxicidade atribuindo-se uma classificação de 0-5 onde 0= não ocorreu nenhum efeito de inibição da germinação (todas as sementes germinaram) e 5= sem crescimento ou germinação das 5 sementes avaliadas. Glifosato (3 mg/mL) foi utilizado como controle positivo de inibição da germinação. Todos os extratos foram avaliados
15 em duplicata, e aqueles considerados ativos foram submetidos a um reteste para a confirmação da atividade.

20

25

30

35

5 Resultados e Discussão

5.1 Coleta e isolamento dos fungos endofíticos

Após o processo de isolamento foram obtidos 236 fungos filamentosos e três leveduras. Dentre os fungos filamentosos, 177 (75%) foram obtidos de fragmentos foliares, 58 (24,58%) das cascas e apenas um (0,42%) proveniente de semente. As três leveduras isoladas foram obtidas a partir de cada um dos tecidos vegetais, sendo uma de folha, uma de casca e uma de semente. De acordo com Verna e colaboradores (2007), a folha vegetal é um tecido ideal para o estudo dos endofíticos e seus metabólitos secundários, e têm mostrado ser o maior reservatório de riqueza de espécies e colonização por fungos endofíticos, que ocorrem mais freqüentemente nos segmentos foliares do que nos tecidos do caule e da casca. No presente estudo foi possível realizar o isolamento de fungos endofíticos a partir das folhas de todos os espécimes amostrados. Entretanto, foram isolados fungos endofíticos a partir das cascas de apenas 20 indivíduos. A frequência de isolamento a partir das folhas variou de 0,42 a 4,25%, já para as cascas foi entre 0,42 e 2,97%, e para as sementes foi de apenas 0,42% (**Figura 3**).

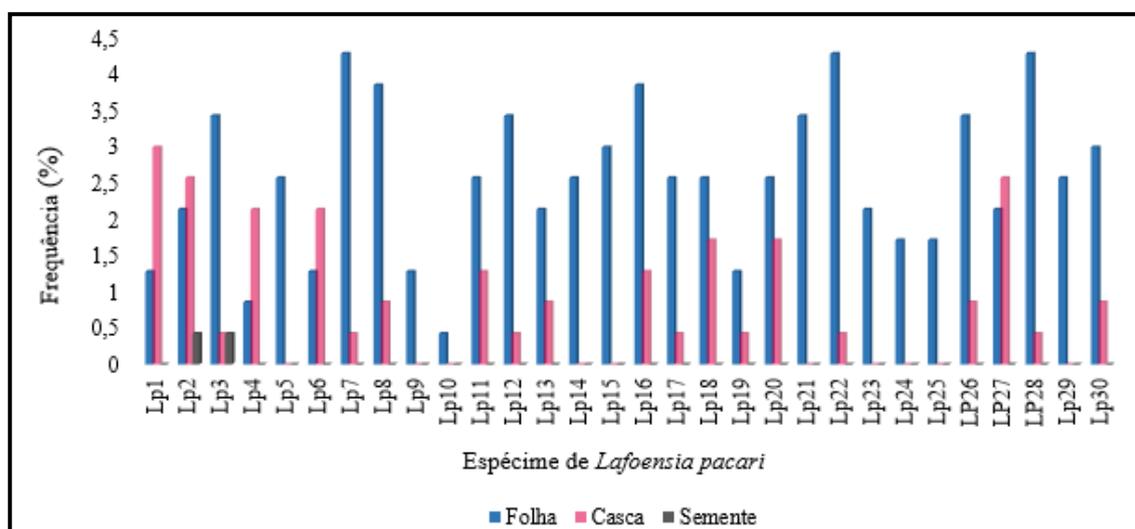


Figura 3. Frequência de isolamento dos fungos endofíticos provenientes das folhas, fragmentos de cascas e sementes de espécimes de *Lafoensia pacari* (Lp) amostrados.

A desinfestação superficial é o primeiro passo e crítico no processamento das amostras para garantir o isolamento de fungos endofíticos e evitar os micro-organismos contaminantes (Zheng *et al.*, 2015). A metodologia utilizada foi suficiente para eliminar os fungos epifíticos e possíveis patógenos que vivem na superfície dos tecidos vegetais

(Santamaria & Bayman, 2005; Arnold & Lutzonoi, 2007), o que foi indicado pela falta de crescimento microbiano na placa de Petri controle com o meio BDA contendo alíquotas da água utilizadas na lavagem das amostras durante o processo de desinfestação. Por outro lado, o elevado número de isolados de fungos endofíticos obtidos sugere que a desinfestação superficial não foi capaz de matar sistematicamente os fungos endofíticos, reforçando a eficiência do procedimento. Essa metodologia tem sido utilizada em diferentes estudos e considerada um método eficiente para a obtenção de fungos endofíticos e análise de sua diversidade em diferentes plantas hospedeiras (Tan & Zou, 2011; Vieira *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2012, Vieira *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2017b).

5.2 Identificação dos fungos endofíticos

A partir do agrupamento macromorfológico foram obtidos 91 morfotipos de fungos filamentosos. Destes, 60 ocorreram como singletos, ou seja, como apenas um único isolado. Os isolados pertencentes a um mesmo grupo morfológico foram submetidos à análise de perfis moleculares por meio da técnica de PCR microsatélite (MSP-PCR) para confirmação do agrupamento morfológico. Um isolado ou mais de cada grupo foi então selecionado para sequenciamento da região transcrita interna ITS-5.8S da região do gene do rRNA (**Tabela 2**).

A maioria dos fungos endofíticos não produz conídios ou esporos sexuais quando cultivados em meios de cultivo convencionais impossibilitando a identificação morfológica (Vaz *et al.*, 2009). Por esse motivo, a região ITS1-5.8S-ITS2 do gene do rRNA tem sido utilizada como o código de barras universal para a identificação molecular de fungos filamentosos, porque se trata de uma região gênica discriminatória de espécies (Schoch *et al.*, 2012). Sendo assim, as sequências obtidas da região ITS foram utilizadas para novos agrupamentos moleculares, e possibilitou a identificação ao menos em nível de gênero, baseando-se na comparação com as sequências depositadas no *GenBank*.

Um ou mais representantes dos agrupamentos realizados com base na região ITS foram, posteriormente, submetidos à amplificação e sequenciamento parcial do gene da β -tubulina. O sequenciamento dessa região gênica produz um fragmento de DNA com tamanho similar a 540 pb para os fungos filamentosos pertencentes ao filo *Ascomycota*, e o polimorfismo observado entre as diferentes espécies reflete a variabilidade no número de intróns (Glass & Donaldson, 1995). Em alguns casos, ainda foi realizada a

amplificação do gene da RNA Polimerase II (RPB2), que codifica a segunda maior subunidade proteica da RNA Polimerase, e se caracterizada como uma região conservada de um gene de cópia única em fungos, sendo assim é utilizada para análises filogenéticas (Malkus *et al.*, 2006).

5 Dos 236 isolados de fungos filamentosos, 212 (89,8%) foram identificados, mas 24 (10,2%) não puderam ser identificados. A não identificação destes isolados pode estar relacionada à falta de obtenção de um DNA total de boa qualidade, sem contaminantes inibidores, à não amplificação de nenhuma das regiões propostas, ou até mesmo à obtenção de sequências de qualidade insatisfatória. Alguns dos isolados
10 produziram metabólitos que foram responsáveis pela mudança de coloração do meio de cultura, dificultando a obtenção de um DNA translúcido devido à presença dos pigmentos que atrapalham a solubilização do DNA. De acordo com Schori e colaboradores (2013), os metabólitos secundários podem interferir na extração de DNA, nas amplificações, bem como na reação de sequenciamento.

15 Em relação às leveduras, os isolados Lp16F1 (folha), Lp22C3 (casca) e Lp2S1 (semente) foram identificados como *Pseudozyma hubeiensis* (*Ustilaginomycetes*, *Basidiomycota*), *Candida parapsiiosis* (Clado *Candida albicans/Loderromyces*) (*Saccharomycetes*, *Ascomycota*) e *Aureobasidium* sp. (*Dothideomycetes*, *Ascomycota*), respectivamente. A levedura Lp2S1 provavelmente representa uma espécie nova dentro
20 do gênero *Aureobasidium*, uma vez que sua sequência diferiu em 14 substituições no domínio D1/D2 na subunidade maior do gene do rRNA e 3 *gaps* quando comparada com *Aureobasidium thailandense*, a espécie filogeneticamente mais próxima.

Ao final do processo de sequenciamento e análises filogenéticas, os 215 isolados de endofíticos (212 fungos filamentosos e três leveduras) foram identificados em 63
25 unidades taxonômicas distintas (UTD), das quais 60 pertencem a fungos filamentosos e três pertencem a leveduras. As UTDs identificadas foram representadas por 36 gêneros, pertencentes às classes *Dothideomycetes*, *Sordariomycetes*, *Eurotiomycetes* e *Saccharomycetes* (*Ascomycota*); *Ustilaginomycetes* (*Basidiomycota*); e *Zygomycetes* (*Zygomycota*) (**Figura 4**).

30

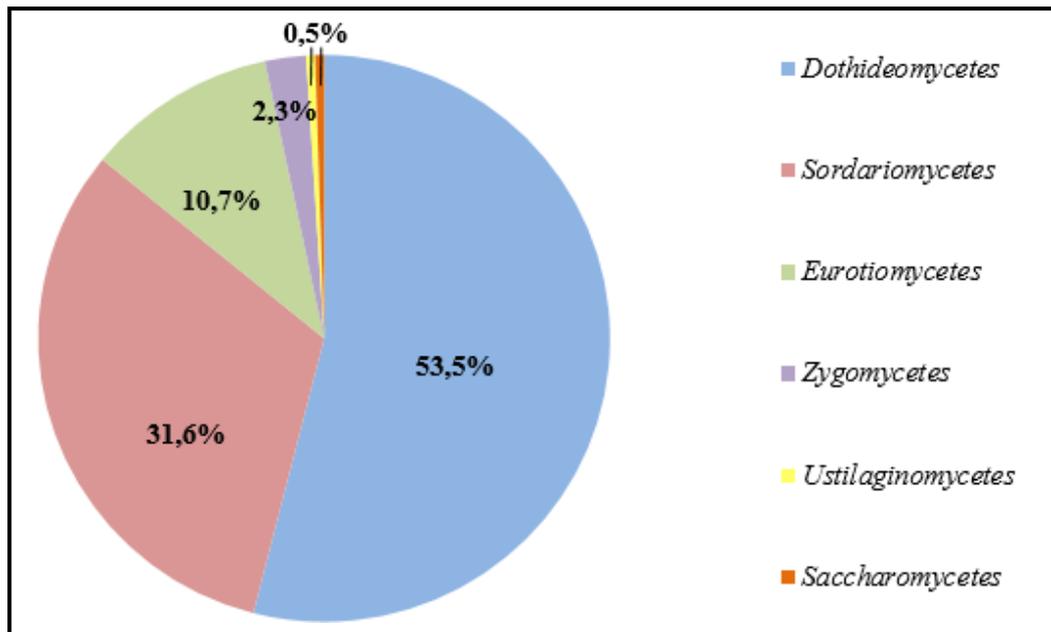


Figura 4. Porcentagem dos fungos endofíticos associados à *Lafoensia pacari* classificados em nível de classe.

5 A maioria das espécies de fungos endofíticos pertence ao filo *Ascomycota*, sendo predominantemente representados pelas classes *Dothideomycetes* e *Sordariomycetes* (Arnold *et al.*, 2009). Fato que corrobora com o presente estudo, uma vez que dentre os fungos endofíticos associados a *L. pacari* o filo *Ascomycota*, representado pelas classes *Sordariomycetes*, *Dothideomycetes*, e *Eurotiomycetes*, foi o mais frequentemente isolado e identificado (Rodríguez *et al.*, 2009). *Dothideomycetes* geralmente é composta por táxons oportunistas e generalistas (Botella & Diez 2011). Os endofíticos pertencentes à *Sordariomycetes* são frequentemente encontrados a partir de isolamentos realizados pelo cultivo em meio de cultura sólido, e são representados principalmente por endofíticos foliares. Enquanto que a classe *Eurotiomycetes* é, relativamente, representada por poucas espécies (Arnold *et al.*, 2007).

15 Dentre os táxons identificados, as sequências dos isolados selecionados de seis diferentes morfotipos apresentaram baixas similaridades com as sequências ITS quando comparados com as de espécies fúngicas conhecidas depositadas no *GenBank*, e/ou apresentaram informações inconclusivas. Cinco destes morfotipos foram identificados em nível de família (*Chaetomiaceae* sp., *Cryphonectriaceae* sp., *Hypoxylaceae* sp., *Lophiotremataceae* sp., e *Valsariaceae* sp.) e um em nível de classe (*Dothideomycetes* sp.), sugerindo então que estes isolados podem se tratar de espécies novas de fungos filamentosos.

Tabela 2. Identificação molecular dos fungos endofíticos associados à *Lafoensia pacari*.

UFMGCB ^a	Tecido de isolamento ^b	N° de isolados	Sequências de referência do BLAST (n° de acesso <i>GenBank</i>) ^c	Cobertura (%)	Identidade (%)	N° de pb analisados	Identificação proposta
11306	F	1	<i>Alternaria destruens</i> (NR137143) ^d	100	100	451	<i>Alternaria</i> sp.
11413	F, C	9	<i>Aspergillus aculeatus</i> (NR111412) ^d	100	100	461	<i>Aspergillus aculeatus</i>
			<i>Aspergillus aculeatus</i> (HQ632667) ^e	100	98	315	
Lp2S1	S	1	<i>Aureobasidium thailandense</i> (JX462674) ^g	100	97	483	<i>Aureobasidium</i> sp.
11357	F	2	<i>Beltraniella acaciae</i> (NR147685) ^d	99	98	428	<i>Beltraniella</i> sp.
11271	F	3	<i>Botryosphaeria agaves</i> (NR111792) ^d	99	97	318	<i>Botryosphaeria</i> sp.
11430	C	1	<i>Arcopilus turgidopilosus</i> (KX976588) ^d	97	93	473	<i>Chaetomiaceae</i> sp.
11342	F	1	<i>Cladosporium welwitschiicola</i> (NR152308) ^d	100	100	429	<i>Cladosporium</i> sp.
			<i>Cladosporium psychrotolerans</i> (KJ596614) ^d	84		304	
					85		
11407	F, C	8	<i>Colletotrichum siamense</i> (NR144784) ^d	99	100	451	<i>Colletotrichum</i> sp. 1
			<i>Colletotrichum melanocaulon</i> (KX094290) ^d	100	99	344	
11352	F	1	<i>Colletotrichum aeshynomenes</i> (NR120133) ^d	100	99	413	<i>Colletotrichum</i> sp. 2
			<i>Colletotrichum melanocaulon</i> (KX094290) ^d	100	99	262	
11221	F	7	<i>Colletotrichum nupharicola</i> (NR120134) ^d	100	99	424	<i>Colletotrichum</i> sp. 3
11323	F	2	<i>Colletotrichum gigasporum</i> (NR145380) ^d	98	100	401	<i>Colletotrichum</i> sp. 4
11370	F	2	<i>Colletotrichum phyllanthi</i> (NR111698) ^d	100	100	404	<i>Colletotrichum</i> sp. 5
			<i>Colletotrichum karstii</i> (HM585428) ^e	99	100	331	
11290	F	2	<i>Colletotrichum citri-maximae</i> (KX943582) ^d	100	100	280	<i>Colletotrichum</i> sp. 6
11339	F	1	<i>Coniothyrium multiporum</i> (NR111617) ^d	82	96	416	<i>Coniothyrium</i> sp.

11293	F,C	4	<i>Luteocirrhus shearii</i> (NR120254) ^d	83	96	376	<i>Cryphonectriaceae</i> sp.
			<i>Cryphonectriaceae</i> sp. (JQ862953) ^d	99	87	434	
11282	F	5	<i>Diaporthe velutina</i> (NR152470) ^d	99	99	544	<i>Diaporthe inconspicua</i>
			<i>Diaporthe inconspicua</i> (KC344091) ^e	86	100	408	
11291	F	5	<i>Diaporthe terebinthifolii</i> (NR111862) ^d	100	99	363	<i>Diaporthe</i> sp. 1
			<i>Diaporthe schini</i> (KC344159) ^e	89	97	421	
11343	F	4	<i>Diaporthe ocoteae</i> (KX228293) ^d	99	93	469	<i>Diaporthe</i> sp. 2
11235	F	1	<i>Diaporthe diospyricola</i> (KX777156) ^d	96	97	398	<i>Diaporthe</i> sp. 3
			<i>Diaporthe velutina</i> (KX999223) ^e	95	96	402	
11426	F,C	3	<i>Diaporthe middletonii</i> (NR147536) ^d	100	98	462	<i>Diaporthe</i> sp. 4
11244	F	1	<i>Diaporthe acericola</i> (NR152507) ^d	100	100	271	<i>Diaporthe</i> sp. 5
11295	F	2	<i>Diaporthe citri</i> (NR152507) ^d	100	94	371	<i>Diaporthe</i> sp. 6
11356	F	3	<i>Diaporthe baccae</i> (NR152458) ^d	99	94	420	<i>Diaporthe</i> sp. 7
			<i>Diaporthe inconspicua</i> (KC344091) ^e	83	100	415	
11317	F	1	<i>Diaporthe miriciae</i> (NR147535) ^d	100	99	403	<i>Diaporthe</i> sp. 8
			<i>Diaporthe passifloricola</i> (KX228387) ^e				
11378	F	1	<i>Paramycoleptodiscus albizziae</i> (NR145403) ^d	53	97	394	<i>Dothideomycetes</i> sp.
11314	F	1	<i>Fusarium pseudonygamai</i> (NR137162) ^d	100	100	423	<i>Fusarium</i> sp.
			<i>Fusarium sudanense</i> (KU603909) ^e	100	98	271	
11381	F	1	<i>Gloniopsis calami</i> (KX669036) ^d	99	98	447	<i>Gloniopsis</i> sp.
11392	C	1	<i>Hypoxylon griseobrunneum</i> (KC968918) ^d	97	99	411	<i>Hypoxylon griseobrunneum</i>
11427	C	1	<i>Hypoxylon pulvicidum</i> (JX183075) ^d	77	90	327	<i>Hypoxylaceae</i> sp.
11305	F	1	<i>Jattaea mookgoponga</i> (EU367449) ^d	98	96	429	<i>Jattaea</i> sp.

11394	F,C	15	<i>Lasiodiplodia subglobosa</i> (KF234558) ^d	98	100	422	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1
			<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (EU673111) ^e	99	99	401	
11397	F,C	8	<i>Lasiodiplodia parva</i> (KF766192) ^d	100	100	432	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 2
			<i>Lasiodiplodia parva</i> (EU673114) ^e	100	100	395	
11320	F	1	<i>Lasiodiplodia gonubiensis</i> (KF766191) ^d	99	99	419	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 3
11424	C	1	<i>Lasiodiplodia laeliocattleyae</i> (KU507487) ^d	100	100	425	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
			<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (EU673110) ^e	100	100	427	
Lp22C3	C	1	<i>Candida parapsilosis</i> (KY106650) ^g	100	99	551	<i>Candida parapsilosis</i>
11379	F	1	<i>Atrocalyx bambusae</i> (NR153559) ^d	73	92	364	<i>Lophiotremataceae</i> sp.
11315	F	1	<i>Mucor ellipsoideus</i> (NR111683) ^d	100	100	510	<i>Mucor</i> sp.
11387	C	1	<i>Muscodor suthepensis</i> (JN558830) ^d	97	97	502	<i>Muscodor</i> sp.
11416	C	1	<i>Nemania primolutea</i> (EF026121) ^d	98	96	457	<i>Nemania</i> sp.
11277	F	1	<i>Neofusicoccum kwambonambiense</i> (NR137014) ^d	95	99	408	<i>Neofusicoccum</i> sp.
11206	F,C	5	<i>Neopestalotiopsis cocoes</i> (KX789687) ^d	99	100	401	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.
11388	C	4	<i>Paecilomyces formosous</i> (FJ389929) ^d	99	97	479	<i>Paecilomyces</i> sp.
11438	C	1	<i>Penicillium diversum</i> (DQ308553) ^d	98	98	434	<i>Penicillium chrysogenum</i>
			<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668) ^f	100	100	323	
11433	C	1	<i>Penicillium sanshaense</i> (NR153276) ^d	93	95	403	<i>Penicillium</i> sp. 1
11434	C	1	<i>Penicillium bilaiae</i> (JN714935) ^d	100	100	314	<i>Penicillium</i> sp. 2
11435	C	1	<i>Penicillium multicolor</i> (JN799647) ^d	100	99	420	<i>Penicillium</i> sp. 3
11436	C	1	<i>Penicillium viticola</i> (NR121209) ^d	100	99	409	<i>Penicillium</i> sp. 4
11355	F	1	<i>Penicillium citreosulfuratum</i> (KP016814) ^d	100	99	466	<i>Penicillium</i> sp. 5
11228	F	1	<i>Penicillium diversum</i> (DQ308553) ^d	100	99	386	<i>Penicillium</i> sp. 6

11432	C	2	<i>Penicillium wotroi</i> (NR119813) ^d	98	99	496	<i>Penicillium wotroi</i>
			<i>Penicillium wotroi</i> (GU981637) ^e	98	100	478	
11269	F	1	<i>Pestalotiopsis colombiensis</i> (KM199307) ^d	100	99	477	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
11380	F	1	<i>Phomatospora striatigera</i> (NR145386) ^d	100	92	461	<i>Phomatospora</i> sp.
11236	F	55	<i>Phyllosticta capitalensis</i> (NR144914) ^d	100	100	484	<i>Phyllosticta</i> sp. 1
11328	F	2	<i>Phyllosticta fallopii</i> (NR147316) ^d	100	99	328	<i>Phyllosticta</i> sp. 2
11217	F	1	<i>Phyllosticta catimbauensis</i> (MF466160) ^d	86	97	472	<i>Phyllosticta</i> sp. 3
			<i>Phyllosticta raphiolepidis</i> (MF466160) ^e	94	96	277	
11253	F	1	<i>Phyllosticta catimbauensis</i> (MF466160) ^d	85	100	418	<i>Phyllosticta</i> sp. 4
11340	F	2	<i>Preussia persica</i> (NR137730) ^d	96	98	447	<i>Preussia</i> sp.
11359	F	18	<i>Pseudofusicoccum adansoniae</i> (KF766220) ^d	100	98	435	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.
			<i>Pseudofusicoccum ardesiacum</i> (KX465069) ^e	100	98	377	
Lp16F1	F	1	<i>Pseudozyma hubeiensis</i> (KY108956) ^g	100	100	393	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>
11377	F	1	<i>Rasamsonia brevistipitata</i> (NR119935) ^d	100	94	481	<i>Rasamsonia</i> sp.
11393	C	4	<i>Syncephalastrum monosporum</i> (NR138374) ^d	100	97	436	<i>Syncephalastrum</i> sp.
11384	C	2	<i>Trichoderma neokoningii</i> (NR138446) ^d	99	99	521	<i>Trichoderma</i> sp.
			<i>Trichoderma reesei</i> (CP016238) ^e	74	93	251	
11294	F	1	<i>Myrmaecium fulvoproinatum</i> (NR145390) ^d	100	87	515	<i>Valsariaceae</i> sp.

^aUFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. ^bTecido de isolamento: F = Folha, C = Casca, S = semente. ^cSequência de referência obtida por meio do BLASTn e utilizada para comparação. ^dIdentificação realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos da região transcrita interna ITS-5.8S da região do gene do rRNA. ^eIdentificação realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos do gene da β -tubulina. ^fIdentificação realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos do gene da RNA Polimerase II. ^gIdentificação realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos da região D1/D2 da subunidade maior do rRNA.

5.3 Composição da comunidade de fungos endofíticos associados às folhas, cascas dos caules e sementes de *Lafoensia pacari*

A comunidade dos fungos endofíticos de *L. pacari* variou entre os tecidos vegetais estudados. A partir das folhas foram recuperadas 39 UTDs compreendidas em 20 gêneros distintos, já para as cascas, foram obtidas 16 UTDs em nove gêneros, enquanto que sete táxons foram comuns para os dois tecidos. Em relação as sementes, apenas uma levedura e um fungo filamentosos foram obtidos. As folhas representam uma considerável porta de entrada para os fungos, devido a abundância de aberturas naturais na forma de estômatos, hidatódios e aberturas glandulares, bem em como pela textura da folha que facilita a fixação e o acesso dos endofíticos para o interior do tecido, em contraste com os tecidos da casca e do caule (Mekkamol 1998; Chareprasert *et al.*, 2006). Uma vez que os diferentes tecidos vegetais possuem anatomia e funções distintas, estes podem ter influenciado na dominância de determinados táxons nos dois tipos de tecidos.

A comunidade de fungos endofíticos associados à *L. pacari* foi representada predominantemente por táxons do filo *Ascomycota* (97,2%) com maior representação para a classe *Dotyhideomycetes* (53,5%). Nesta classe, a ordem *Botryosphaeriales*, com 49,3% de isolamento, foi representada pelos gêneros *Phyllosticta*, *Lasiodiplodia*, *Pseudofusicoccum*, *Neofusicoccum* e *Botryosphaeria*. As espécies de *Botryosphaeriales* estão distribuídas mundialmente em uma ampla gama de diferentes plantas hospedeiras, e possuem uma ecologia diversificada, podendo ser encontradas como fungos sapróbios, endofíticos ou fitopatógenos (Slippers & Wingfield 2007; Jami *et al.* 2014; Trakunyingcharoen *et al.* 2015; Crous *et al.* 2016).

O gênero *Phyllosticta* foi o mais abundante, representado por 27,5% dos isolados identificados (**Tabela 2**), os quais foram distribuídos em quatro UTDs. De modo semelhante, Ribeiro e colaboradores (2018) demonstraram que uma ou mais espécies podem aparecer em alta abundância em diferentes hospedeiros. As espécies de *Phyllosticta* são geralmente conhecidas como fitopatógenos de vários hospedeiros e responsáveis por várias doenças com sintomas incluindo manchas pretas nas folhas e nos frutos (Wulandari *et al.*, 2009; Glienke *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). Entretanto, muitas espécies do gênero são endofíticos latentes por um longo período, mas que passam a atuar como fitopatógenos manifestando a doença quando a planta hospedeira passa a crescer em condições ambientais de estresse (Rodrigues *et al.*, 2004).

Todos os isolados de *Phyllosticta* no presente estudo foram obtidos a partir do tecido foliar. Semelhantemente, espécies endofíticas de *Phyllosticta* apresentaram especificidade para as folhas de 29 plantas medicinais chinesas (Huang *et al.*, 2008), assim como também foi relatado para outras plantas medicinais tais como *Tinospora cordifolia* na Índia (Mishra *et al.*, 2012) e *Echinaceae purpurea* nos Estados Unidos (Carvalho *et al.*, 2016).

A família *Botryosphaeriaceae* que também inclui os gêneros *Lasiodiplodia*, *Pseudofusicoccum*, *Neofusicoccum* e *Botryosphaeria* é composta por numerosas espécies fúngicas que ocorrem em tecidos vegetais saudáveis como patógenos latentes que persistem endofiticamente até que ocorra alguma situação ambiental desfavorável, ocasionando na manifestação dos sintomas da doença (Slippers & Wingfield 2007). *Lasiodiplodia* foi representado por 11,6% dos isolados identificados, o qual ocorre globalmente em plantas lenhosas nas regiões tropicais e subtropicais e está melhor adaptado às condições ambientais dessas regiões, onde tem sido associado com muitas doenças que afetam diferentes plantas (Punithalingam 1980; Cruywagen *et al.*, 2017; Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017). O gênero *Pseudofusicoccum* foi o terceiro mais abundante com 8,4% dos isolados identificados, dos quais todos foram obtidos exclusivamente a partir do tecido foliar. Sakalides e colaboradores (2011) estudaram a comunidade de fungos endofíticos presentes em diferentes espécies de baobás na região noroeste da Austrália e encontraram *Lasiodiplodia* e *Pseudofusicoccum* como os gêneros mais comuns, entre os quais o fungo *L. theobromae* foi o endofítico dominante, para a maioria das regiões e espécies de árvores amostradas.

Espécies dos gêneros *Botryosphaeria* e *Neofusicoccum* apresentaram baixas frequências em *L. pacari*, o primeiro com dois isolados e o segundo com apenas um representante. Espécies de *Botryosphaeria* já foram reportadas como endofíticos associados a plantas medicinais (Chen *et al.*, 2015; Carvalho *et al.*, 2016), bem como fungos com baixa frequência em manguezais na África do Sul (Osorio *et al.*, 2017). *Neofusicoccum* inclui espécies com uma ampla distribuição geográfica nos mais variados hospedeiros, incluindo plantas lenhosas de importância agrícola, florestal e econômica. Estes fungos são tipicamente endofíticos, mas sob condições de estresse algumas espécies podem causar sintomas de declínio e morte (Crous *et al.* 2006; Slippers & Wingfield 2007).

A ordem *Pleosporales* apresentou quatro táxons com baixas frequências pertencentes aos gêneros *Preussia* (0,9%), *Alternaria* (0,5%) e *Coniothyrium* (0,5%),

assim como um táxon que apresentou baixa similaridade com as sequências tipo depositadas no *GenBank*, sendo identificado em nível de família como *Lophiotremataceae* (0,5%).

5 Espécies de *Preussia* são frequentemente isoladas dos solos ou também como coprófilos, entretanto, representantes do gênero já foram encontradas como endofíticos associados às plantas medicinais *Smallanthus sonchifolous* (Gallo *et al.* 2009) e *Stryphnodendron adstringens* (Carvalho *et al.*, 2012), esta última uma planta da savana brasileira. Embora as espécies de *Alternaria* sejam caracterizadas, principalmente, por fungos sapróbios comumente encontrados no solo ou em tecidos vegetais em decomposição, muitos estudos demonstram que as espécies pertencentes ao gênero são compostas por endofíticos associados com plantas de ambientes tropicais e temperados (Morakotkarn *et al.*, 2006). Espécies de *Coniothyrium* foram previamente relatadas como endofíticas a partir da planta medicinal *Aquilaria sinensis* na China (Cui *et al.*, 2011) e da planta do algodão nos Estados Unidos (EK-Ramos *et al.*, 2013).

15 Ainda dentro de *Dothideomycetes*, outros grupos taxonômicos foram encontrados com menor frequência pertencentes aos gêneros *Cladosporium* (0,5%), *Gloniopsis* (0,5%), a levedura *Aureobasidium* sp. (0,5%), e um táxon identificado como *Dothideomycetes* sp. O gênero *Cladosporium* é comumente encontrado como endofítico de plantas medicinais brasileiras (Carvalho *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2015b; Khan *et al.*, 2017). De acordo com a literatura, este é o primeiro relato do gênero *Gloniopsis* como fungo endofítico.

A levedura endofítica *Aureobasidium* sp. foi isolada a partir de uma semente de *L. pacari*. Este gênero é comumente encontrado como endofítico, seja associado à planta medicinal (Silva-Hughes *et al.*, 2015), ou relatado como fungo transmitido verticalmente para a planta hospedeira (Parsa *et al.*, 2016; Shahzad *et al.*, 2018).

25 A segunda classe com maior representabilidade foi a *Sordariomycetes* com 32,5% dos isolados identificados. Como representantes da ordem *Diaporthales* destacam-se o gênero *Diaporthe* que representou 11,6% de todos os isolados, distribuídos em nove UTDs, e o táxon *Chyphonectriaceae* sp. (1,8%).

30 O gênero *Diaporthe*, estágio teleomorfo de *Phomopsis*, é composto por cerca de 800 espécies, sendo distribuído em todo o mundo em uma grande variedade de hospedeiros (Ribeiro *et al.*, 2018). Espécies do complexo *Diaporthe-Phomopsis* podem ser fitopatógenos, sapróbios ou endofíticos simbiotes (Gomes *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2016). Como endofíticos são comumente encontrados em associação com plantas

medicinais (Carvalho *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2014; Silva-Hughes *et al.*, 2015). Algumas espécies de *Diaporthe* podem também ser tanto endofíticos quanto patógenos, dependendo do tipo e do estado de saúde do hospedeiro (Gomes *et al.*, 2013).

Os fungos da família *Cryphonectriaceae* incluem fitopatógenos presentes em todo o mundo, tanto em ecossistemas naturais quanto em plantações (Gryzenhout *et al.* 2009). Entretanto, também já foram relatados de maneira endofítica em plantações de eucalipto na África do Sul (Mausse-Sitoe, *et al.*, 2016).

O gênero *Colletotrichum* foi o segundo mais representado dentro da classe *Sordariomycetes*, com 10,2% de todos os isolados identificados, distribuídos em seis UTDs. Espécies de *Colletotrichum* são conhecidas por serem fungos fitopatogênicos que causam a antracnose, doença que afeta uma vasta gama de plantas, incluindo frutas, verduras e legumes em todo o mundo, acarretando implicações para a economia (Han *et al.*, 2016). Entretanto, as espécies fitopatogênicas deste gênero são capazes de assumir associações mutualistas ou comensais com as plantas, além daquelas que causam doenças (Redman *et al.*, 2001). Diferentes espécies de *Colletotrichum* foram encontradas como comunidades fúngicas endofíticas em uma grande variedade de plantas de diferentes ecossistemas (Gonzaga *et al.*, 2014). A identificação por métodos moleculares das espécies de *Colletotrichum* é um grande desafio, pois o gênero apresenta alta diversidade genética, aliado ao fato da existência de muitas espécies depositadas incorretamente no *GenBank* (Hyde *et al.*, 2009; Gonzaga *et al.*, 2014).

Neopestalotiopsis foi encontrado com a frequência de 2,3%, enquanto que *Pestalotiopsis* com 0,5%. *Neopestalotiopsis* foi originalmente agrupado dentro de *Pestalotiopsis*, mas foi reclassificado como gênero separado em 2014 devido às análises morfológicas e moleculares (Maharachchikumbura *et al.*, 2014). Espécies de *Pestalotiopsis* têm distribuição mundial em variados substratos, seja como sapróbios ou como patógenos. Já como endofíticos muitas espécies de *Pestalotiopsis* foram isoladas como o gênero dominante de diferentes espécies de plantas que vivem em regiões tropicais e subtropicais (Vieira *et al.*, 2014).

Dentro de *Sordariomycetes* também foram identificados dois táxons com baixas frequências, *Trichoderma* e *Beltraniella*, ambos com 0,9%, e outros nove táxons caracterizados por singletos com apenas um isolado. Os singletos que puderam ser identificados em nível de gênero ou espécie foram *Fusarium* sp., *Hypoxyylon griseobrunneum*, *Jattaea* sp., *Phomatospora* sp., bem como membros de dois gêneros da família *Xylariaceae* (*Nemania* e *Muscodor*). Os outros três singletos restantes foram

identificados em nível de família como *Chaetomiaceae* sp., *Hypoxylaceae* sp. e *Valsariaceae* sp.

O complexo *Hypocrea* (teleomorfo)/*Trichoderma* (anamorfo) é formado por espécies geralmente consideradas como micro-organismos sapróbios do solo, mas que também podem colonizar as raízes das plantas formando uma relação simbiótica (Bailey *et al.*, 2009). Uma nova espécie do complexo, *Trichoderma martiale*, foi descrita como endofítica a partir do isolamento de *Theobroma cacao* (cacau) no Brasil (Hanada *et al.*, 2008), e mais quatro espécies endofíticas foram encontradas no caule e na casca da mesma planta (Bailey *et al.*, 2009).

Fusarium parece possuir ampla distribuição geográfica sendo comumente isolado de plantas como endofítico (Zheng *et al.*, 2015), e suas espécies frequentemente estão entre as isoladas com maior frequência em plantas tropicais (Vega *et al.*, 2010). Espécies do gênero *Hypoxylon* foram previamente reportadas como endofíticas a partir de folhas e da casca da planta medicinal *Taxus globosa* no México (Rivera-Orduña *et al.*, 2011) e também da raiz e caule de *Brassica napus* na China (Zhang *et al.*, 2014).

Em relação aos gêneros de *Xylariaceae* identificados, um isolado de *Muscodora* sp. foi isolado da folha da planta medicinal *Stryphnodendron adstringens* no Brasil (Carvalho *et al.*, 2014), enquanto que o gênero *Nemania* foi um dos endofíticos dominantes em folhas de *Agelatina adenofora* na China (Mei *et al.*, 2014). As espécies da família *Chaetomiaceae* são predominantemente não patogênicas para as plantas, no entanto, algumas delas são coprófilas, enquanto outras podem ser encontradas em sementes e no solo (Soytong & Quimio 1989; Somrithipol *et al.*, 2004), em compostos inorgânicos, além de endofíticas competidores de outros patógenos fúngicos das plantas (Soytong & Quimio 1989). Já em relação a *Beltraniella* sp., *Jattaea* sp. e *Valsariaceae* sp. não foram encontrados relatos como espécies endofíticas.

A classe *Eurotiomycetes* foi representada por 10,7% de todos os isolados identificados, sendo *Aspergillus aculeatus* e o gênero *Penicillium* com a frequência de 4,1% cada, este último distribuído em sete UTDs. Com menor frequência foram identificados os gêneros *Paecilomyces* (1,8%) e *Rasamsonia* (0,5%). O gênero *Aspergillus* representa um grupo diversificado de fungos, que estão entre os mais abundantes do mundo compreendendo mais de 185 espécies (Krijgsheld *et al.*, 2012). Os membros de *Aspergillus* se caracterizam por fungos filamentosos cosmopolitas e ubíquos, comumente encontrados no solo, restos de plantas e no interior de ambientes aerados, além de ser um dos fungos endofíticos mais encontrados em associação com

plantas terrestres e marinhas (Elkhatat *et al.*, 2015; Tawfike *et al.*, 2017). Recentemente, *A. aculeatus* foi obtido como endofítico a partir da folha da planta medicinal egípcia *Terminalia laxiflora* (Tawfike *et al.*, 2017) e da casca de planta medicinal *Symphonia globulifera* no Camarões (Ateba *et al.*, 2018).

5 O gênero *Penicillium* é composto por mais de 200 espécies conhecidas, que são encontradas principalmente no solo (Petit *et al.*, 2009), e é frequentemente isolado de plantas como endofítico (Yu *et al.*, 2018). *Paecilomyces* sp. já foi isolado como endofítico em associação com folhas e cascas das plantas medicinais *Symphonia globulifera* e *Tectona grandis*, respectivamente, em ecossistema tropical (Singh *et al.*, 10 2017; Ateba *et al.*, 2018). Em relação ao gênero *Rasamsonia*, não foi encontrado nenhum relato de espécies como endofítico, mas se trata de um gênero que anteriormente era membro dos gêneros *Penicillium/Talaromyces* e *Geosmithia* (Houbraken *et al.*, 2012).

A classe *Saccharomycetes* foi representada por um único isolado de levedura, 15 *Candida parapsiiosis* (Clado *Candida albicans/Loderromyces*). Esta espécie de levedura já foi previamente isolada como endofítica a partir de folhas de *Citrus sinensis* no Brasil (Gai *et al.*, 2009). O filo *Basidiomycota* foi representado pela classe *Ustilaginomycetes* com apenas um isolado de levedura identificado como *Pseudozyma hubeiensis*. O gênero *Pseudozyma* foi previamente reportado como endofítico de 20 algodão (*Gossypium hirsutum*) em baixa frequência, com a ocorrência de apenas um isolado (EK-Ramos *et al.*, 2013).

Zygomycota foi representado pela classe *Zygomycetes* com 2,3% dos isolados identificados, pertencentes a dois táxons dentro da ordem *Mucorales* [*Syncephalastrum* sp. (1,8%) e *Mucor* sp. (0,5%)]. Ibrahim e colaboradores (2017) obtiveram a espécie 25 *Syncephalastrum racemosum* como endofítico da planta *Markhamia tomentosa* na Nigéria. Estes autores constataram que o fungo pode atuar na proteção da planta hospedeira frente fungos fitopatogênicos. Este gênero também já foi obtido em baixa frequência a partir de *Theobroma cacao* no Brasil (Rubino *et al.*, 2005). Um isolado de *Mucor* sp. foi obtido a partir de folhas da planta medicinal brasileira *Solanum cernuum* 30 Vell. (Vieira *et al.*, 2012), bem como da casca da planta medicinal *Symphonia globulifera* (Ateba *et al.*, 2018).

5.4 Cultivo in vitro de *Lafoensia pacari*

5.4.1 Germinação de sementes de *L. pacari* em Meio Murashige & Skoog (MS)

A partir da germinação das sementes de *L. pacari* em meio MS, variando as concentrações de sacarose, desde a ausência até a presença de 20 e 30 g/L, foram obtidas cinco plântulas. Entretanto, estas plântulas não apresentaram um desenvolvimento satisfatório, mas sim um crescimento lento e estagnado. Do segundo ao quarto mês de idade as plântulas apresentaram o mesmo tamanho, sem nenhuma melhoria no desenvolvimento, chegando ao final do quarto mês com apenas duas folhas (**Figura 5a**). Mesmo com tamanho reduzido, as plântulas foram utilizadas para o isolamento dos fungos endofíticos conhecidos como endofíticos “verdadeiros”.

As plântulas foram submetidas a um processo de trituração, diluição seriada e plaqueamento em BDA. Após 90 dias de incubação visualizou-se o crescimento de uma colônia filamentosa sugerindo a ocorrência de um endofítico “verdadeiro” associado a *L. pacari*. O fungo endofítico isolado foi depositado na Coleção de Micro-organismos e Células da UFMG com o código UGMGCB 11449, o qual foi identificado por meio da amplificação da região ITS e do gene parcial da β -tubulina como *Cladosporium* sp. 1 (**Tabela 3**). Adicionalmente, foi produzido seu extrato diclorometânico e encaminhado para os ensaios biológicos para a avaliação das possíveis atividades antiparasitárias (contra *L. amazonensis* e *T. cruzi*), antiviral (contra DENV2) e herbicida.

Uma nova tentativa de se obter um crescimento satisfatório após a germinação das sementes de *L. pacari* foi realizada ao aumentar a concentração do hormônio giberelina, de 2 para 3 mg/L. Não foi observada nenhuma melhoria no crescimento das plântulas obtidas com a giberelina a 3 mg/L. As quatro plântulas obtidas também foram utilizadas na tentativa de isolamento de fungos endofíticos, entretanto nenhum endofítico foi obtido.

5.4.2 Germinação de sementes de *Lafoensia pacari* em Meio Wood plant (WP)

A fim de tentar obter uma germinação e conseqüente melhor taxa de crescimento e desenvolvimento das plântulas de *L. pacari* cultivadas *in vitro*, suas sementes foram inoculadas em meio WP suplementado com sacarose e os hormônios vegetais giberelina e BAP. Ao comparar a germinação nos dois diferentes meios, em WP foi bastante diferenciada, uma vez que após as sementes germinarem, as plântulas se desenvolveram com maior velocidade e vigor, ultrapassando o tamanho e número de folhas

desenvolvidas no final do quarto mês de idade, contrário do observado em meio MS (**Figura 5c**). Em relação à adição de hormônios, observou-se um melhor desenvolvimento das plântulas crescidas na ausência de giberelina.

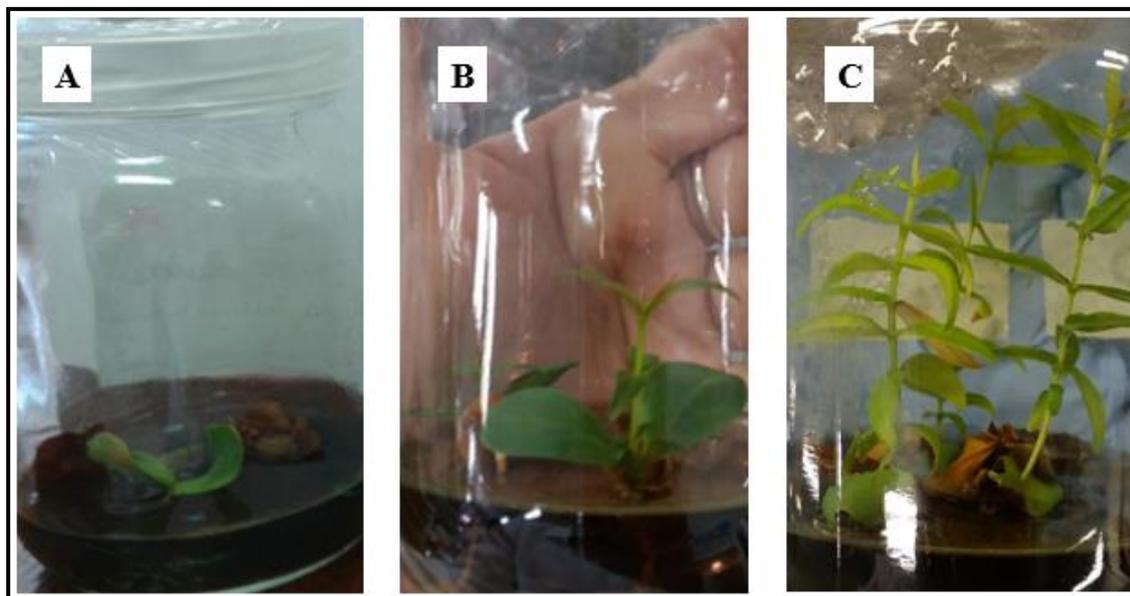


Figura 5. Plântulas de *L. pacari* cultivadas *in vitro*. a) Plântula cultivada em meio Murashige & Skoog com crescimento estagnado. b) Plântulas cultivadas em meio *Wood Plant* com crescimento intermediário. c) Plântulas cultivadas em meio *Wood Plant* com melhor desenvolvimento.

5

Aproximadamente 100 sementes foram submetidas à desinfestação para posterior inoculação em tubos contendo o meio WP a fim de se obter o máximo número possível de plântulas para o isolamento de fungos endofíticos “verdadeiros”. Oitenta e sete plântulas de *L. pacari* foram obtidas e conseqüentemente utilizadas para o isolamento dos fungos endofíticos. Tais plântulas se encontravam com quatro, sete e oito meses de idade. Destas, 36 apresentaram o desenvolvimento restrito a duas folhas iniciais, assim como observado para todas as sementes germinadas em meio MS; 23 apresentaram porte médio até o quarto mês de desenvolvimento (**Figura 5b**); e 28 estavam bem desenvolvidas.

15

Para as plântulas com apenas duas folhas e as com porte médio foi realizado o isolamento dos fungos a partir do triturado das folhas seguido pelo plaqueamento em ágar batata dextrose de uma alíquota de 100 μ L da diluição seriada 10^{-1} e 10^{-2} . Já para as plântulas com maior porte, foi realizado o isolamento tanto a partir das diluições do

macerado das folhas, quanto do plaqueamento direto de fragmentos de 5 mm de folhas e caule no meio de cultivo.

Após 90 dias de incubação foram obtidos dois isolados de leveduras e sete de fungos filamentosos. As leveduras foram submetidas ao sequenciamento do domínio D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA, sendo ambas identificadas como *Eremothecium gossypii*. Em relação aos isolados de fungos filamentosos, três foram agrupados em um mesmo morfotipo de acordo com as características morfológicas (UFMGCB 16639, UFMGCB 16640 e UFMGCB 16641), e os outros quatro em morfotipos únicos, sendo todos estes submetidos ao sequenciamento da região ITS. Após a análise filogenética foram identificados quatro táxons de endofíticos associados às plântulas de *L. pacari* cultivadas *in vitro*: um táxon de levedura (*Eremothecium gossypii*) e três de fungos filamentosos (*Cladosporium* sp. 1, *Cladosporium* sp. 2 e *Aspergillus* sp.), além de dois que não puderam ser identificados (**Tabela 3**). Todos os quatro isolados de *Cladosporium* sp. 1 recuperados a partir das plântulas estudadas foram obtidos por meio da trituração de suas folhas e uma destas plântulas foi cultivada em meio MS e as outras três no meio WP.

A sequência do isolado *Cladosporium* sp. 1 UFMGCB 11449 apresentou semelhanças com as sequências dos isolados *Cladosporium* sp. 1 UFMGCB 16639, 16640 e 16441, e, portanto, agrupados no mesmo morfotipo (**Figura 6**). Assim como a sequência do isolado *Cladosporium* sp. UFMGCB 11342, obtido da folha de um indivíduo de *L. pacari* amostrado em seu ambiente natural, apresentou semelhança com as sequências de DNA dos quatro isolados obtidos das plântulas (**Figura 6**). Tal semelhança pode sugerir que este táxon pode ser verticalmente transmitido por sementes e pode exercer algum papel para favorecer o estabelecimento e crescimento da planta hospedeira, uma vez que não foi observado nenhum sintoma ou evidência de doença em todas as plântulas estudadas. Por exemplo, espécies de *Cladosporium* podem produzir o hormônio vegetal giberelina e assim promover o crescimento da plântula hospedeira (Hamayun *et al.*, 2009). Além disso, os fungos endofíticos de plântulas podem protegê-las contra patógenos foliares (Arnold *et al.* 2003).

Os gêneros *Cladosporium* e *Aspergillus* já foram anteriormente descritos como endofíticos “verdadeiros”. Três isolados de *Cladosporium cladosporioides* e um de *Aspergillus ustus* foram obtidos a partir de plântulas de *Phaseolus vulgaris* (Parsa *et al.*, 2016). Hodson e colaboradores (2014) sugerem forte evidência de transmissão vertical

por *Cladosporium sphaerospermum*, sendo o fungo obtido tanto a partir das sementes quanto dos coltilédones e folhas verdadeiras das plântulas.

Não foi possível encontrar nenhum registro da levedura *Eremothecium gossypii* se comportando com levedura endofítica, mas o gênero já foi relatado como endofítico.

- 5 Carvalho e colaboradores (2015a) obtiveram dois isolados de *E. coryli* a partir de sementes de *Copaifera publiflora*, planta medicinal presente na amazônia brasileira. *Eremothecium gossypii* é uma levedura filamentosa pertencente à família *Saccharomycetaceae* que é comumente encontrada em regiões tropicais e subtropicais, agindo como fitopatógeno de café, algodão, soja e outras culturas, em que parece ser
- 10 vetorizada por insetos (Kurtzman *et al.*, 2011).

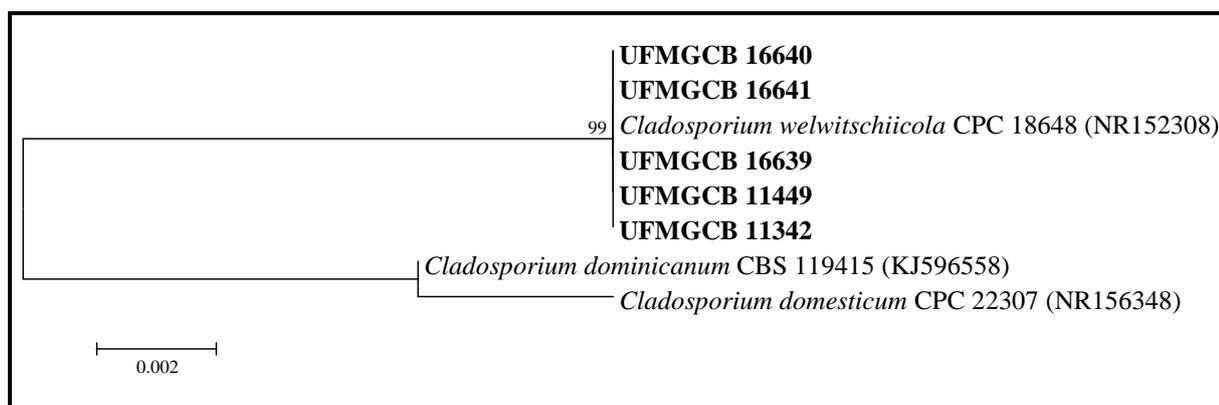


Figura 6. Árvore filogenética dos fungos endofíticos do gênero *Cladosporium* associados à *Lafoensia pacari*, obtidos tanto da planta no ambiente natural quanto *in vitro* (em negrito). As sequências dos isolados foram comparados com sequências de espécies tipo ou de referência depositadas no *GenBank* após análises utilizando o BLAST. A árvore foi construída com base nas sequências da região transcrita interna ITS da região gênica do rRNA utilizando o método *Maximum composite likelihood* e modelo *Jukes-Cantor*.

Tabela 3. Identificação molecular dos fungos endofíticos associados às plântulas de *Lafoensia pacari* cultivadas *in vitro*.

UFMGCB ^a	Tecido de isolamento ^b	Nº de isolados	Sequências de referência do BLAST (Número de acesso <i>GenBank</i>) ^c	Cobertura (%)	Identidade (%)	Nº de pb analisados	Identificação proposta
16641	D	4	<i>Cladosporium welwitschiicola</i> (NR152308) ^d	100	100	431	<i>Cladosporium</i> sp. 1
			<i>Cladosporium psychrotolerans</i> (KJ596614) ^e	84	85		
16637	D	1	<i>Aspergillus sydowii</i> (NR131259) ^d	100	100	397	<i>Aspergillus</i> sp.
16638	Ca	1	<i>Cladosporium rugulovarians</i> (KT600459) ^d	100	100	423	<i>Cladosporium</i> sp. 2
16642	Ca	1	NI				
16643	Ca	1	NI				
LpP32	D, Ca	2	<i>Eremothecium gossypii</i> (NR149706) ^e	100	99	410	<i>Eremothecium gossypii</i>

^aUFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. ^bTecido de isolamento: D = diluição proveniente das folhas, Ca = Caule. ^cSequência referência obtida por meio do BLASTn e utilizada para comparação. ^dIdentificação realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos da região transcrita interna ITS-5.8S da região do gene do rRNA. ^eIdentificação realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos do gene da β -tubulina. ^fIdentificação realizada por meio do BLASTn utilizando fragmentos da região D1/D2 da subunidade maior do rRNA.

Os fungos obtidos do cultivo *in vitro* de *L. pacari* foram cultivados por 15 dias em caldo batata dextrose e submetidos à extração dos metabólitos secundários em acetato de etila. Os extratos foram encaminhados aos ensaios biológicos para a avaliação das possíveis atividades antiparasitárias no Instituto René Rachou/Fiocruz-
5 MG. Os extratos também foram submetidos aos ensaios para a avaliação da atividade herbicida.

5.5 Diversidade da comunidade de fungos endofíticos associados às folhas, cascas dos caules, sementes e plântulas de *Lafoensia pacari*

10

A abundância de fungos endofíticos associados à *L. pacari* variou entre 0,45 e 24,7% (**Tabela 4**). Duzentos e quarenta e nove isolados de endofíticos foram obtidos em associação com *L. pacari*; destes, 239 das plantas amostradas em seu ambiente natural e 10 das plântulas cultivadas *in vitro*. Entretanto, 223 isolados foram utilizados
15 na determinação destes valores, uma vez que não foi possível chegar à identificação de 26 isolados com a metodologia de biologia molecular utilizada. Sessenta e sete táxons de fungos endofíticos (63 de fungos filamentosos e quatro de leveduras) foram identificados e os mais abundantes foram *Phyllosticta* sp. 1 (24,7%), *Pseudofusicoccum* sp. (8,1%), *Lasiodiplodia* sp. 1 (6,7%), *Colletotrichum* sp.1 (3,7%) e *Aspergillus aculeatus* (4,0%), os quais representam táxons bem caracterizados como endofíticos de
20 plantas de regiões tropicais (Sakalidis *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2017b; Ribeiro *et al.*, 2018).

Phyllosticta sp. 1 e *Pseudofusicoccum* sp. apresentam especificidade foliar. Dos tecidos de *L. pacari* amostrados no presente trabalho, as folhas apresentaram maior
25 frequência de isolamento, assim como o tecido de origem dos gêneros e táxons mais abundantes.

Dentre os 67 táxons associados a folhas, cascas, sementes e plântulas de *L. pacari*, 28 ocorreram como singletos com apenas um isolado. Estes táxons são compostos por fungos pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*,
30 *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Glioniopsis*, *Hypoxylon*, *Jattaea*, *Lasiodiplodia*, *Candida parapsiiosis* (Clado *Candida albicans/Loderromyces*), *Mucor*, *Muscodor*, *Neofusicoccum*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phomatospora*, *Phyllosticta*, *Pseudozyma hubeienseis* e *Rassamsonia*.

Tabela 4. Abundância dos fungos endofíticos associados à *Lafoensia pacari* amostrada em seu ambiente natural e às plântulas *in vitro*.

Táxon	Tecido de origem	Número de isolados	Abundância
<i>Phyllosticta</i> sp. 1	F	55	24,7
<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	F	18	8,1
<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1	F, C	15	6,7
<i>Aspergillus aculeatus</i>	F, C	9	4,0
<i>Colletotrichum</i> sp. 1	F, C	8	3,6
<i>Lasiodiplodia</i> sp. 2	F, C	8	3,6
<i>Colletotrichum</i> sp. 3	F	7	3,1
<i>Cladosporium</i> sp. 1	F, D	5	2,25
<i>Diaporthe inconspicua</i>	F	5	2,25
<i>Diaporthe</i> sp. 1	F	5	2,25
<i>Neopestalotiopsis</i> sp.	F, C	5	2,25
<i>Cryphonectriaceae</i> sp.	F, C	4	1,8
<i>Diaporthe</i> sp. 2	F	4	1,8
<i>Paecilomyces</i> sp.	C	4	1,8
<i>Syncephalastrum</i> sp.	C	4	1,8
<i>Botryosphaeria</i> sp.	F	3	1,3
<i>Diaporthe</i> sp. 4	F, C	3	1,3
<i>Diaporthe</i> sp. 7	F	3	1,3
<i>Beltroniella</i> sp.	F	2	0,9
<i>Colletotrichum</i> sp. 4	F	2	0,9
<i>Colletotrichum</i> sp. 5	F	2	0,9
<i>Colletotrichum</i> sp. 6	F	2	0,9
<i>Diaporthe</i> sp. 6	F	2	0,9
<i>Eremothecium gossypii</i>	Ca	2	0,9
<i>Penicillium wotroi</i>	C	2	0,9
<i>Phyllosticta</i> sp. 2	F	2	0,9
<i>Preussia</i> sp.	F	2	0,9
<i>Trichoderma</i> sp.	C	2	0,9
<i>Alternaria</i> sp.	F	1	0,45
<i>Aspergillus</i> sp.	D	1	0,45
<i>Aureobasidium</i> sp.	S	1	0,45
<i>Chaetomiaceae</i> sp.	C	1	0,45
<i>Colletotrichum</i> sp. 2	F	1	0,45
<i>Cladosporium</i> sp. 2	Ca	1	0,45

<i>Coniothyrium</i> sp.	F	1	0,45
<i>Dothideomycetes</i> sp.	F	1	0,45
<i>Diaporthe</i> sp. 3	F	1	0,45
<i>Diaporthe</i> sp. 5	F	1	0,45
<i>Diaporthe</i> sp. 8	F	1	0,45
<i>Fusarium</i> sp.	F	1	0,45
<i>Gloniopsis</i> sp.	F	1	0,45
<i>Hypoxylon griseobrunneum</i>	C	1	0,45
<i>Hypoxylaceae</i> sp.	C	1	0,45
<i>Jattaea</i> sp.	F	1	0,45
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	C	1	0,45
<i>Lasiodiplodia</i> sp. 3	F	1	0,45
<i>Candida parapsiiosis</i> (Clado <i>Candida albicans</i> / <i>Loderromyces</i>).	C	1	0,45
<i>Lophiotremataceae</i> sp.	F	1	0,45
<i>Mucor</i> sp.	F	1	0,45
<i>Muscodor</i> sp.	C	1	0,45
<i>Nemania</i> sp.	C	1	0,45
<i>Neofusicoccum</i> sp.	F	1	0,45
<i>Penicillium chrysogenum</i>	C	1	0,45
<i>Penicillium</i> sp. 1	C	1	0,45
<i>Penicillium</i> sp. 2	C	1	0,45
<i>Penicillium</i> sp. 3	C	1	0,45
<i>Penicillium</i> sp. 4	C	1	0,45
<i>Penicillium</i> sp. 5	F	1	0,45
<i>Penicillium</i> sp. 6	F	1	0,45
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	F	1	0,45
<i>Phomatospora</i> sp.	F	1	0,45
<i>Phyllosticta</i> sp. 3	F	1	0,45
<i>Phyllosticta</i> sp. 4	F	1	0,45
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	F	1	0,45
<i>Rasamsonia</i> sp.	F	1	0,45
<i>Valsariaceae</i> sp.	F	1	0,45
Total		223	100

F = folha, C = casca, S = semente, D = diluição proveniente das folhas das plântulas *in vitro*, Ca = caule das plântulas *in vitro*.

5 Nenhum trabalho a respeito da comunidade de fungos endofíticos associados a plantas do gênero *Lafoensia*, e em relação ao Pantanal, foi encontrado na literatura.

Apesar de ser uma planície inundável única, com uma diversidade de fauna e flora bem peculiares, os estudos a respeito de sua micobiota são escassos (Minter, 2010). A biodiversidade e bioprospecção de fungos endofíticos associados às plantas medicinais do Pantanal ainda são pouco exploradas. Hokama (2012) estudou a comunidade de fungos endofíticos associados à planta medicinal *Vochysia divergens* presente no Pantanal, a qual apresentou semelhanças com a comunidade fúngica encontrada para *L. pacari* com predominância da classe *Dothideomycetes* e do gênero *Phyllosticta*, o qual representou 53% de todos os isolados. No mesmo estudo, os gêneros *Neofusicoccum*, *Cladosporium* e *Pestalotiopsis* foram encontrados em baixa frequência; e a presença de gêneros em comum, tais como *Diaporthe*, *Colletotrichum* e *Pseudofusicoccum*.

A diversidade de espécies de fungos endofíticos associados à *L. pacari* foi determinada utilizando os índices Fisher- α (diversidade), Margalef (riqueza) e Simpson (dominância). Os índices foram calculados em três diferentes situações: 1) para os 214 isolados identificados pertencentes a 62 táxons obtidos a partir de folhas e cascas de *L. pacari*; 2) para os 10 isolados pertencentes aos seis táxons obtidos a partir das plântulas; 3) para os dois isolados obtidos a partir das sementes de *L. pacari* (**Tabela 5**).

Quanto maior o valor de do índice Fisher- α , maior a diversidade de espécies do ambiente analisado. Sendo assim, a diversidade das espécies associadas às folhas e cascas de *L. pacari* foi alta (29,3), enquanto que a diversidade associada às plântulas foi baixa (6,3). Em relação à riqueza de espécies, a comunidade associada às folhas e cascas apresentou um alto índice de Margalef (11,4), enquanto que para as comunidades fúngicas associadas às plântulas e sementes os índices foram baixos, com valores de 2,2 e 1,4 respectivamente. Para a análise da dominância utilizando o índice de Simpson, valores próximos a 1 demonstram uma comunidade com dominância por alguns táxons encontrados. A comunidade de fungos endofíticos associados a folhas e cascas de *L. pacari* apresentou índice de Simpson igual a 0,91 sugerindo que poucos táxons foram dominantes e se distribuíram de forma homogênea dentro da comunidade. Já para as plântulas, o índice de Simpson foi de 0,76, o que sugere uma menor dominância.

Tabela 5. Índices de diversidade, riqueza e dominância dos fungos endofíticos associados à *Lafoensia pacari*.

Índices	Folhas e casca do caule	Plântulas	Sementes
Fisher- α	29,3	6,3	0
Margalef	11,4	2,2	1,4
Simpson	0,91	0,76	0,5

O esforço amostral para o estudo da comunidade de fungos endofíticos associados a *L. pacari*, tanto a partir da amostragem com folhas e cascas da planta, quanto a partir das plântulas, foi avaliado por meio de curva de rarefação de espécies, que representa o número de espécies em função do número de amostras avaliadas (**Figura 7**). As curvas não atingiram uma assíntota, indicando que a diversidade total (riqueza e composição de espécies) não foi obtida nas duas situações. Estes resultados sugerem que o aumento da amostragem poderia levar a obtenção de outros táxons de fungos associados a *L. pacari*, tanto no ambiente natural quanto *in vitro*.

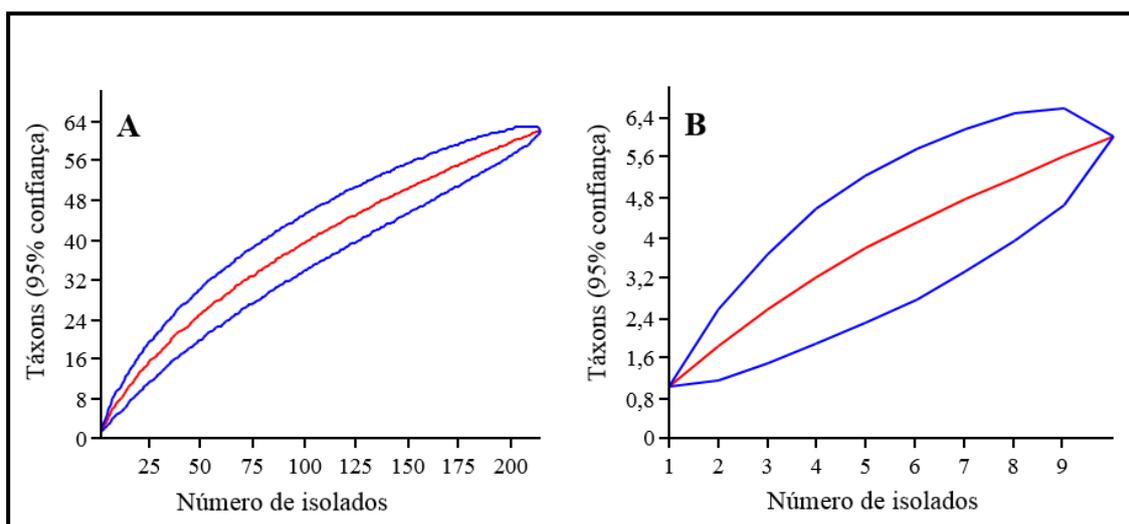


Figura 7. Curva de rarefação de espécies (índice de Mao-Tau) dos fungos endofíticos associados a *L. pacari* construída com intervalo de confiança de 95%. a) Folhas e cascas dos caules. b) Plântulas *in vitro*.

O número de táxons encontrados no presente estudo pode estar associado à metodologia de isolamento utilizada, que geralmente exclui a detecção de espécies não cultiváveis (Bogner *et al.*, 2016). Conseqüentemente, o número de gêneros observados

nas folhas, cascas, plântulas e sementes de *L. pacari* no presente estudo podem representar apenas fração da diversidade total dos fungos presentes.

5 Outro fator limitante nos estudos de diversidade dos fungos endofíticos é o crescimento rápido de algumas espécies consideradas ubíquas. Logo, espécies raras e com menor força competitiva, que necessitam de mais requisitos para crescerem no meio de cultura, podem permanecer como não isoladas e identificadas (Aly *et al.*, 2011). Ainda deve-se levar em consideração que o tempo entre a coleta das plantas e o isolamento dos endofíticos, o meio de cultura selecionado, o tamanho do fragmento da planta, e as condições de crescimento também podem afetar a frequência, diversidade e
10 composição de espécies (Arnold, 2007).

As plantas de regiões tropicais são de particular interesse para estudos das comunidades de fungos endofíticos, uma vez que elas exibem notável abundância e diversidade de espécies (Arnold 2000; Arnold 2007). A comunidade de fungos endofíticos associadas a *L. pacari* apresentou-se diversa, composta por alto número de
15 singletos, e por gêneros de fungos, que de acordo com a literatura, podem apresentar diferentes características e ecologia, tais como: sapróbios, fitopatógenos latentes, comensais, mutualistas, patógenos de humanos, cosmopolitas ou raros, comumente encontrado ou até então nunca descritos como endofíticos, que podem ser transmitidos verticalmente e possíveis espécies novas. De acordo com o que já é sabido sobre papel
20 dos fungos endofíticos em ajudar as plantas hospedeiras contra fatores ambientais bióticos e abióticos, pode-se inferir que estes fungos, tanto na planta no ambiente natural quanto *in vitro*, sejam capazes de contribuir para a sobrevivência, crescimento e resiliência da planta frente a diferentes formas de estresses ambientais.

25 **5.6 Ensaios biológicos**

5.6.1 Determinação da atividade leishmanicida e antiviral

Trezentos extratos diclorometânicos foram produzidos, 239 provenientes de fungos filamentosos e leveduras obtidos das plantas amostradas em seu ambiente natural e um do fungo *Cladosporium* sp. 1 UFMGCB 11449 obtido a partir de plântula
30 *in vitro* no meio MS. Também foram preparados 60 extratos a partir das folhas e cascas de *L. pacari*. Porém, somente 282 extratos (219 de fungos filamentosos, três de leveduras e 60 vegetais) foram utilizados para os ensaios antiparasitários e antiviral. Adicionalmente, foram produzidos oito extratos em acetato de etila a partir dos isolados

provenientes das plântulas *in vitro* no meio WP, os quais também foram submetidos aos ensaios biológicos.

Para *L. amazonensis*, o ponto de corte é a atividade com 70% de inibição/morte do parasita. Não foi observada nenhuma atividade igual e/ou acima deste valor para os extratos testados e, portanto, foram considerados inativos. O mesmo foi observado por Carvalho e colaboradores (2012) ao estudarem os fungos endofíticos associados à planta medicinal *S. adstringens* da savana brasileira, em que nenhum dos 320 extratos dos fungos apresentou atividade frente *L. amazonensis*. Semelhantemente, a comunidade de fungos endofíticos associados à planta *Vellozia gigantea*, endêmica do Campo Rupestre brasileiro, também não apresentou atividade frente *L. donovani* (Ferreira *et al.*, 2017a). De maneira similar, nenhum extrato diclorometânico foi considerado ativo contra o DENV2, por meio da avaliação do efeito citopático viral. Os ensaios antivirais com os extratos em acetato de etila ainda se encontram em andamento.

15 **5.6.2 Determinação da atividade tripanocida**

Os extratos utilizados para verificação da atividade tripanocida foram avaliados na concentração de 20 µg/µL, sendo considerados ativos aqueles que apresentaram 50% de inibição dos parasitas. Os ensaios com os extratos em acetato de etila dos fungos obtidos do cultivo *in vitro* de *L. pacari* ainda se encontram em andamento.

20 Dos 282 extratos diclorometânicos avaliados, 33 (11,7%) apresentaram atividade tripanocida na triagem inicial. Destes, 21 (7,4%) são provenientes de fungos filamentosos e 12 (4,25%) são de origem vegetal. Os 33 extratos ativos na triagem foram retestados a fim de confirmar a atividade inicial apresentada. No reteste, 14 (4,96%) extratos de fungos filamentosos e 10 (3,5%) vegetais confirmaram a atividade, 25 totalizando 24 extratos ativos (8,5%). Os 24 extratos com a atividade confirmada foram submetidos ao ensaio de determinação de CI₅₀ sobre o parasita, CI₅₀ sobre as células e índice de seletividade.

Todos os 10 extratos vegetais apresentaram atividade nos ensaios de determinação do CI₅₀. Em relação aos extratos dos fungos filamentosos, sete (2,5%) apresentaram atividade *Diaporthe inconspicua* UFMGCB 11282, *Valsariaceae* sp. UFMGCB 112494, *Coniothyrium* sp. UFMGCB 11339, *Aspergillus aculeatus* UFMGCB 114111, UFMGCB 11412, UFMGCB 11413 e *Lasiodiplodia* sp. 1 UFMGCB 11421. Os sete isolados de fungos ativos foram recultivados nas mesmas

condições iniciais para a avaliação da reprodutibilidade da atividade dos extratos nos ensaios de concentração inibitória a 50% (CI₅₀).

Após os ensaios com extratos provenientes do recultivo dos fungos, quatro mantiveram a atividade frente a *T. cruzi* - *Valsariaceae* sp. UFMGCB 11294, 5 *Coniothyrium* sp. UFMGCB 11339, *Aspergillus aculeatus* UFMGCB 114111 e UFMGCB 11413. Todos os resultados da atividade tripanocida encontram-se na **Tabela 6**. Estas perdas de atividade pelos fungos endofíticos são esperadas após sucessivos repiques e cultivos. É possível que aquando o fungo não se encontra mais na presença da planta hospedeira não há a necessidade de produzir as mesmas substâncias que 10 favoreciam seu estabelecimento no interior dos tecidos vegetais. Entretanto, são poucas as informações existentes sobre as relações bioquímicas e fisiológicas que ocorrem nas interações do endófito com seu hospedeiro (Strobel & Daisy, 2003).

Nos ensaios de CI₅₀ do *T. cruzi* é interessante que se obtenha um baixo valor sobre o parasita (concentração do extrato que reduz em 50% o crescimento do parasita), 15 um alto valor de CI₅₀ sobre as células (concentração do extrato que induz 50% da morte celular), e alto índice de seletividade (razão entre o CI₅₀ sobre as células e CI₅₀ sobre o parasita), assim como observado para o controle positivo benzonidazol. Tanto os extratos de fungos filamentosos quanto os extratos vegetais apresentaram alto valor de CI₅₀ nas células hospedeiras (>80 µg/mL), sugerindo baixa atividade citotóxica para as 20 células de fibroblasto L929 de camundongos. Os dois tipos de extratos foram promissores nas triagens de novos produtos naturais bioativos.

Dentre todos os extratos avaliados, os extratos dos fungos *Aspergillus aculeatus* UFMGCB 11411 (cultivo inicial e recultivo) foram os mais promissores, pois ambos apresentaram os maiores valores de CI₅₀ nas células hospedeiras (>80 µg/mL), maiores 25 índices de seletividade (>8,8 e >16) e menor CI₅₀ frente as formas amastigotas da linhagem Talahuen de *T. cruzi*, sugerindo alta eficiência contra o hospedeiro e baixa citotoxicidade para as células hospedeiras.

Os dois isolados de *A. aculeatus* que apresentam atividade tripanocida foram obtidos a partir da casca de *L. pacari*. Todos os extratos vegetais que apresentaram 30 atividade também foram provenientes das cascas, ressaltando a importância medicinal deste tecido na planta. A casca do caule de *L. pacari* é o tecido mais comumente utilizado pela população pantaneira, além de ser o mais usado nos estudos químicos da planta (Pereira *et al.*, 2008).

Membros do gênero *Aspergillus* são considerados produtores eficientes de metabólitos secundários bioativos, tais como alcalóides, policetídeos, terpenóides, xantonas e esteróides, os quais já demonstraram possuir propriedades antibacterianas, antifúngicas e citotóxicas (Sun *et al.*, 2012, He *et al.*, 2012). Carvalho e colaboradores (2015b) isolaram o fungo endofítico *Aspergillus calidoustus* recuperado a partir de 5 folhas de *Acanthospermum australe* (*Asteraceae*), uma planta medicinal nativa da savana brasileira. A partir deste endofítico foram isoladas duas substâncias, ofiobolina K e 6-epi-ofiobolina K, as quais apresentaram atividades tripanocidas com valores de CI₅₀ de 13,0 e 9,62 µM frente *T. cruzi*. No entanto, estes compostos apresentaram baixo 10 índice de seletividade contra o parasita e foram citotóxicos para as células hospedeiras de *T. cruzi*.

Em se tratando de *A. aculeatus*, o genoma do fungo foi recentemente sequenciado pelo *Joint Genome Institute*, entretanto, nenhum gene foi ainda relacionado com a produção de metabólitos ativos (Petersen *et al.*, 2015). Mas apesar disso, já foi 15 descrita a produção de diferentes metabólitos secundários importantes pelo *A. aculeatus*, incluindo as aculeacinas A-G (antibióticos e antifúngicos), CJ-15,183 (inibidor de esqualeno sintase e agente antifúngico), aspergillusol A (inibidor da α-glucosidase), ácidos secalônicos A, D e F (toxinas), asperparalina A, aculeatusquinonas citotóxicas A – D e dois alcalóides de okaramina, okaraminas H e I (Ingavant *et al.*, 2009). De acordo 20 com nosso conhecimento o atual trabalho se trata do primeiro relato da espécie *A. aculeatus* produzindo metabólitos tripanocidas.

Em relação aos outros dois táxons bioativos, já foi relatado que na família *Valsariaceae* encontram-se as espécies de *Myрмаecium* que são conhecidas como fontes de metabólitos secundários (Jaklistsh *et al.*, 2015), e que uma espécie de 25 *Coniothyrium*, endofítico isolado da planta *Pinus wallichiana* (pinheiro azul do Himalaia), apresentou atividade frente *Candida albicans* com CI₅₀ de 17 µg/mL (Qadri *et al.*, 2014). Entretando, não foi reportada atividade tripanocida para estes táxons.

A Doença de Chagas afeta aproximadamente entre sete e oito milhões de 30 indivíduos, com 50 mil novos casos diagnosticados por ano na América Latina, América do Norte e Europa, e estima-se que mais de 90 milhões de indivíduos estejam em risco de infecção pelo agente etiológico da doença, o parasita *T. cruzi* (Coura & Dias 2009; WHO, 2014b; Vazquez *et al.*, 2015). O tratamento convencional é baseado no benzonidazol e no nifurtimox, fármacos desenvolvidos há mais de um

século, que apresentam fortes efeitos adversos, como perda de apetite, vômitos, polineuropatia e dermatopatia. Muitos pacientes desistem do tratamento, pois aliado aos efeitos colaterais fortes destas drogas, existe a necessidade de um tratamento que se dá a longo prazo (Guedes *et al.*, 2011). Além disso, o benzimidazol e o nifurtimox são
5 mais eficazes na fase aguda da doença, com o parasita na forma sanguínea, e apresentam baixa eficácia contra as formas intracelulares do *T. cruzi* na fase crônica (Muellas-Serrano *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram-se promissores para a investigação de novas moléculas bioativas a partir dos três táxons que reproduziram a
10 atividade tripanocida após o recultivo. Uma vez que não há relatos de *A. aculeatus* como produtor de metabólitos tripanocidas, e os fungos *Valsariaceae* sp. UFMGCB 11294 e *Coniothyrium* sp. UFMCCB 11339 representam singletos de *L. pacari* que provavelmente se tratam de espécies ainda não descritas, estes fungos se tornam ainda mais atrativos para a descoberta de substâncias tripanocidas.

15

Tabela 6. Atividade tripanocida dos extratos brutos vegetais e produzidos a partir dos fungos endofíticos associados à *Lafoensia pacari*.

Código do extrato UFMGCB ^a	Táxon	% Inibição triagem inicial	% Inibição reteste	CI ₅₀ sobre o parasita ¹ (µg/mL)	CI ₅₀ sobre células ² (µg/mL)	Índice de seletividade
11205	<i>Aspergillus aculeatus</i>	102,5 (± 0,3)	90,1 (± 2,1)	–	–	–
11212	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 2	81,15 (± 4,8)	93,2 (± 11,3)	–	–	–
11214	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 2	60,5 (± 6,3)	–	–	–	–
11215	<i>Aspergillus aculeatus</i>	101,55 (± 2,2)	95 (± 3,1)	–	–	–
11221	<i>Colletotrichum</i> sp. 2	58,1 (± 0,9)	–	–	–	–
11236	<i>Phyllosticta</i> sp. 1	58,2 (± 1,4)	–	–	–	–
11237	<i>Diaporthe inconspicua</i>	56,8 (± 7,6)	–	–	–	–
11245	<i>Diaporthe inconspicua</i>	63,1 (± 15,5)	90,7 (± 7,2)	–	–	–
11263	<i>Phyllosticta</i> sp. 1	62,05 (± 4,4)	–	–	–	–
11282	<i>Diaporthe inconspicua</i>	68,35 (± 12,2)	81,95 (± 5,1)	49,2	>80	>1,6
11282 recultivo				–	–	–
11291	<i>Diaporthe</i> sp. 1	56,15 (± 0,2)	–	–	–	–
11294	<i>Valsariaceae</i> sp.	76,2 (± 11,0)	84 (± 1,7)	25,5	80	3,1
11294 recultivo				37,1	<80	<2,1
11339	<i>Coniothyrium</i> sp.	59,5 (± 1,8)	70,7 (± 10,6)	>5	<10	<2
11339 recultivo				27,8	>80	>2,9
11369	<i>Aspergillus aculeatus</i>	71,9 (± 7,5)	98,95 (± 2,2)	–	–	–
11394	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1	95,95 (± 3,8)	–	–	–	–
11409	<i>Aspergillus aculeatus</i>	73 (± 7,9)	96,65 (± 3,2)	–	–	–
11411	<i>Aspergillus aculeatus</i>	60,95 (± 4,7)	89,3 (± 5,9)	9,1	>80	>9,1

11411 recultivo				<5	>80	>16
11412	<i>Aspergillus aculeatus</i>	76 (± 4,9)	99,35 (± 3,3)	<5	5	>1
11412 recultivo				–	–	–
11413	<i>Aspergillus aculeatus</i>	72,95 (± 4,3)	92,5 (± 6,5)	<5	5	>1
11413 recultivo				16,4	20	1,2
11421	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1	99,55 (± 4,9)	100,9 (± 0,5)	5	< 10	<2
11421 recultivo				–	–	–
11431	NI	51,8 (± 2,7)	91,6 (± 7,5)	–	–	–
Lp 8 casca	–	58,15 (± 3,7)	95,8 (± 0,8)	6,9	80	11,6
Lp 9 casca	–	79,7 (± 4,6)	97,2 (± 5,1)	7,5	40	5,3
Lp 12 casca	–	62,5 (± 6,8)	95,8 (± 1,9)	7	40	5,7
Lp 13 casca	–	63,05 (± 9,2)	96,75 (± 0,9)	7,7	40	5,2
Lp 14 casca	–	64,4 (± 0,5)	95,6 (± 2,2)	<5	40	<8
Lp 22 casca	–	55,2 (± 3,2)	99,75 (± 1,0)	11,3	40	3,5
Lp 23 casca	–	65,2 (± 0,5)	94,4 (± 1,13)	8,6	40	4,6
Lp 28 folha	–	67,9 (± 14,2)	–	–	–	–
Lp 28 casca	–	96,55 (± 1,7)	81,7 (± 3,11)	14,1	>80	>5,7
Lp 29 casca	–	84,9 (± 2,9)	82,2 (± 10,6)	14,5	>80	>5,5
Lp 30 folha	–	86,6 (± 2,5)	–	–	–	–
Lp 30 casca	–	95,95 (± 3,7)	78,6 (± 5,2)	9,2	>80	>8,7
Benzonidazol ³	–	–	–	1	625	625

^aUFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. ¹Concentração do extrato que reduz em 50% o crescimento parasitário.

²Concentração do extrato que induz 50% de morte das células L929. ³Controle positivo. (-): resultado omitido ou não realizado devido a inatividade do extrato. NI: não identificado. Lp: indivíduo de *Lafoensia pacari*.

5.6.3 Determinação da atividade herbicida

A avaliação da atividade herbicida foi realizada por meio de uma análise qualitativa da inibição da germinação das sementes de *Lactuca sativa* (alface/dicotiledônea) e *Allium schoenoprasum* (cebolinha verde/monocotiledônea). Os extratos diclorometânicos vegetais e fúngicos, bem como os extratos produzidos em acetato de etila provenientes dos endofíticos “verdadeiros”, foram testados na concentração de 1 mg/mL. Quarenta e nove extratos apresentaram atividade herbicida; três extratos vegetais (dois de folhas e um da casca de *L. pacari*), 43 extratos fúngicos diclorometânicos e três extratos dos fungos endofíticos “verdadeiros”. Dentre os extratos considerados ativos, 21 inibiram a germinação das sementes de alface e cebolinha, 24 inibiram a germinação apenas das sementes de cebolinha e quatro inibiram a germinação apenas das sementes de alface (**Tabela 7**).

15 **Tabela 7.** Atividade herbicida dos extratos brutos vegetais e produzidos a partir dos fungos endofíticos e endofíticos “verdadeiros” associados à *Lafoensia pacari*.

Código do extrato UFMGCB ^a	Táxon	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>
11205	<i>Aspergillus aculeatus</i>	-	5 ± 0
11215	<i>A. aculeatus</i>	-	5 ± 0
11369	<i>A. aculeatus</i>	5 ± 0	5 ± 0
11409	<i>A. aculeatus</i>	5 ± 0	5 ± 0
11410	<i>A. aculeatus</i>	5 ± 0	5 ± 0
11412	<i>A. aculeatus</i>	5 ± 0	5 ± 0
11413	<i>A. aculeatus</i>	5 ± 0	5 ± 0
11357	<i>Beltroniella</i> sp.	3,5 ± 0,5	3,5 ± 0,5
11430	<i>Chaetomiaceae</i> sp.	5 ± 0	5 ± 0
11207	<i>Colletotrichum</i> sp. 2	-	3 ± 0
11221	<i>Colletotrichum</i> sp. 2	-	5 ± 0
11316	<i>Colletotrichum</i> sp. 2	-	4 ± 1
11237	<i>D. inconspicua</i>	-	4 ± 1
11245	<i>D. inconspicua</i>	3,5 ± 0,5	4,5 ± 0,5
11282	<i>D. inconspicua</i>	-	5 ± 0
11321	<i>D. inconspicua</i>	5 ± 0	5 ± 0
11322	<i>Diaporthe</i> sp. 4	5 ± 0	5 ± 0

11213	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1	5 ± 0	5 ± 0
11394	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1	5 ± 0	5 ± 0
11395	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1	-	3 ± 0
11399	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1	-	5 ± 0
11418	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1	-	4 ± 1
11419	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1	5 ± 0	5 ± 0
11209	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 2	-	3 ± 0
11397	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 2	5 ± 0	5 ± 0
11277	<i>Neofusicoccum</i> sp.	-	5 ± 0
11433	<i>Penicillium</i> sp. 1	-	4 ± 1
11435	<i>Penicillium</i> sp. 3	-	5 ± 0
11436	<i>Penicillium</i> sp. 4	3,5 ± 0,5	4,5 ± 0,5
11432	<i>Penicillium wotroi</i>	5 ± 0	4,5 ± 0,5
11250	<i>Phyllosticta</i> sp. 1	5 ± 0	5 ± 0
11256	<i>Phyllosticta</i> sp. 1	-	5 ± 0
11264	<i>Phyllosticta</i> sp. 1	-	5 ± 0
11311	<i>Phyllosticta</i> sp. 1	3 ± 0	3 ± 0
11313	<i>Phyllosticta</i> sp. 1	3 ± 0	-
11331	<i>Phyllosticta</i> sp. 1	-	3,5 ± 0,5
11332	<i>Phyllosticta</i> sp. 1	-	4 ± 1
11333	<i>Phyllosticta</i> sp. 1	-	4 ± 0
11294	<i>Valsariaceae</i> sp.	5 ± 0	5 ± 0
11208	NI	5 ± 0	5 ± 0
11270	NI	-	5 ± 0
11279	NI	-	3 ± 0
11439	NI	5 ± 0	5 ± 0
16441	<i>Cladosporium</i> sp. 1	4 ± 0	-
16640	<i>Cladosporium</i> sp. 1	3,5 ± 0,5	-
16642	NI	3 ± 0	-
Lp 1 folha	-	-	3 ± 0
Lp 22 folha	-	-	3,5 ± 0,5
Lp 29 casca	-	-	3 ± 0
CN	-	0 ± 0	0 ± 0
CP	-	5 ± 0	5 ± 0
CS	-	0 ± 0	0 ± 0

^aUFMGCB = Coleção de Micro-organismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais. (-): inatividade do extrato. NI: não identificado. Lp: indivíduo de *Lafoensia pacari*. CN: controle negativo – água. CP: controle positivo – glifosato. CS: controle do solvente – acetona. A fitotoxicidade foi avaliada de maneira qualitativa utilizando uma escala de escala de 0-5, onde 0 = não ocorreu nenhum efeito de inibição da germinação e 5 = sem crescimento ou sem germinação das 5 sementes avaliadas.

Os extratos vegetais provenientes das folhas e cascas de *L. pacari* apresentaram moderada atividade frente as sementes de cebolinha verde. O extrato Lp 29 também apresentou atividade tripanocida, o que reforça as propriedades da planta como fonte de diferentes metabólitos bioativos.

Os 14 isolados que apresentaram 100% de inibição da germinação para os dois modelos de sementes foram representados pelos táxons *A. aculeatus*, *Chaetomiaceae* sp., *D. inconspicua*, *Diaporthe* sp. 4, *Lasiodiplodia* sp. 1, *Lasiodiplodia* sp. 2, *Phyllosticta* sp. 1 e *Valsariaceae* sp. Oito extratos provenientes de isolados do gênero *Phyllosticta* apresentaram atividade para ambas ou apenas uma das sementes estudadas. Várias fitotoxinas, como por exemplo, filisinol e phyllostictinas A-D, já foram identificados como metabólitos produzidos a partir de espécies de *Phyllosticta* (Evidente *et al.*, 2008; Wikee *et al.*, 2011). Espécies deste gênero têm sido frequentemente isoladas como endofíticas e foram consideradas excelentes fontes de novas estruturas químicas (Rodrigues-Herrklotz *et al.*, 2011).

Dentre os isolados do gênero *Diaporthe*, quatro representantes de *D. inconspicua* e o fungo *Diaporthe* sp. 4 UFMGCB 11322 apresentaram atividade herbicida. Cimmino e colaboradores (2013) testaram vários compostos produzidos em cultura líquida por *Phomopsis* sp. (teleomorfo *Diaporthe*) para o controle da erva daninha *Carthamus lanatus*. Alguns compostos produzidos por *Diaporthe* spp. já foram relatados por apresentar atividade herbicida, tais como fomentoloxina B que causou pequenas manchas necróticas em algumas espécies de plantas, enquanto que gulypyrona A foi responsável pela necrose em plantas de *Helianthus annuus* (Kumaran *et al.*, 2009). Já para o gênero *Colletotrichum*, três isolados foram ativos para sementes de cebolinha. Este gênero está entre os candidatos mais visados para a produção de bioherbicidas (Harding & Raizada, 2015).

Os três isolados de endofíticos “verdadeiros”, cujos extratos inibiram a germinação das sementes de alface, foram *Cladosporium* sp. 1 UFMGCB 16640, *Cladosporium* sp. 1 UFMGCB 16641 e o fungo não identificado UFMGCB 16642. Waqas e colaboradores (2013) demonstraram que os extratos produzidos com acetato de etila a partir do fungo endofítico *Cladosporium cladosporioides* LWL5, isolado de *Helianthus annuus*, produziu metabólitos com alta atividade inibitória da germinação de sementes de alface. A atividade herbicida foi identificada como proveniente do ácido

benzoico, que pela primeira vez foi descrito como um metabólito inibidor de germinação produzido por *C. cladosporioides* LWL5.

Em relação aos isolados de *Aspergillus aculeatus*, cinco apresentaram inibição total da germinação de ambas as sementes, e dois isolados inibiram seletivamente somente as sementes de cebolinha. Dos isolados pertencentes ao táxon *Penicillium*, 5 quatro apresentaram atividade herbicida, sendo que *Penicillium* sp. 4 UFMGCB 11436 e *P. wotroi* UFMGCB 11432 inibiram a germinação das sementes de ambos os modelos utilizados. Khattak e colaboradores (2014) demonstraram que extratos brutos produzidos em acetato de etila a partir de *Aspergillus* e *Penicillium* têm o potencial fitotóxico para inibir o crescimento de *Lemna minor* (lentilha-de-água) e também 10 podem exercer atividade herbicida retardando a germinação das sementes da erva daninha *Silybum marianum*. Zhang e colaboradores (2013) isolaram a substância brevianamida F do fungo endofítico *A. fumigatus* obtido a partir da casca do caule planta medicinal *Melia azedarach*. A substância foi identificada como uma nova classe 15 de um potencial herbicida de amplo espectro, que apresentou atividade maior que o controle positivo do herbicida glifosato. Brevianamida F também inibiu o alongamento da raiz de nabo (*Raphanus sativus*) assim como inibiu fortemente o crescimento de plântulas de amaranto (*Amaranthus mangostanus*).

O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo e entre eles o glifosato é o herbicida mais comercializado no país (Brasil, IBAMA, 2018). Os 20 herbicidas à base de glifosato estão atualmente entre os produtos químicos agrícolas mais amplamente utilizados em todo o mundo (Gianessi & Reigner, 2006). Os impactos desta classe de herbicidas nas práticas modernas de agricultura são inegáveis, como por exemplo, o desenvolvimento de variedades de culturas resistentes e os impactos 25 ambientais e ecológicos (Gilbert, 2013). A utilização de herbicidas naturais no lugar dos herbicidas químicos tradicionais pode fornecer grande número de benefícios ambientais e sócio-econômicos, uma vez que poderia favorecer para um melhor manejo ambiental a fim de reduzir os impactos ambientais e para a saúde humana, assim como também controlar as plantas daninhas que estão resistentes aos atuais herbicidas.

30 Neste trabalho, nove singletos apresentaram atividade herbicida e dois apresentaram atividade tripanocida. Estes resultados sugerem que os singletos podem representar componentes importantes das comunidades fúngicas endofíticas, especialmente para a bioprospecção. Além disso, reforça a hipótese de Carvalho e colaboradores (2012), ao sugerirem que essas espécies únicas podem incluir espécies

raras, endêmicas ou novas, que poderiam ter importante papel ecológico para suas plantas hospedeiras.

Os extratos produzidos a partir dos fungos *A. aculeatus* UFMGCB 11413 e *Valsariaceae* sp. UFMGCB 11294 inibiram a germinação de todas as sementes de alface e cebolinha, assim como inibiram o crescimento de *T. cruzi*. Estes resultados apontam para a capacidade promissora destes fungos em um futuro isolamento de substâncias com diferentes propriedades, tanto para fins terapêuticos quanto para a agricultura.

10

15

20

25

30

35

40

6 Conclusões

O presente estudo contribuiu para o conhecimento acerca da comunidade dos fungos endofíticos associados às plantas medicinais brasileiras, bem como seu potencial valor como fonte de metabólitos bioativos. Desta forma, é possível indicar que:

5

- Folhas e cascas de *L. pacari* abrigam uma comunidade de fungos endofíticos diversa composta por elevado número de singletos e possíveis espécies novas de fungos filamentosos e leveduras;

10

- Plântulas de *L. pacari* abrigam os chamados endofíticos “verdadeiros”, como observado por meios da técnica de cultura de tecidos, os quais foram detectados como produtores de metabólitos herbicidas;

- Os endofíticos associados a *L. pacari*, em sua grande maioria, são fungos já conhecidos como endofíticos;

15

- A comunidade endofítica de *L. pacari* abriga potenciais fungos produtores de metabólitos secundários tripanocidas e herbicidas;

- Extratos da planta medicinal *L. pacari* apresentou atividade tripanocida a partir da casca do caule, bem como metabólitos com atividade herbicidas a partir das folhas e da casca, propriedades estas até então desconhecidas para a planta;

20

- Os resultados obtidos reforçam a importância das plantas medicinais presentes em ambientes naturais brasileiros pouco estudados, tais como o Pantanal Mato-Grossense, como reservatórios de elevada diversidade de fungos endofíticos, conhecidos ou ainda desconhecidos, os quais podem ser produtores de metabólitos secundários bioativos tanto para fins terapêuticos quanto para a agricultura.

25

30

7 Referências Bibliográficas

- ABREU-TARAZI, M.F.; NAVARRETE, A.A.; ANDREOTE, F.D.; ALMEIDA, C. V.;
TSAI, S.M.; ALMEIDA, M. Endophytic bacteria in long-term *in vitro* cultivated
“axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. World J Microbiol
5 Biotechnol, 26:555-560, 2010.
- ALHO, C. J. R. Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and
to environmental degradation. Brazilian Journal of Biology, Revista Brasileira de
Biologia, 68:957–966, 2008.
- ALMEIDA, C.V.; ANDREOTE, F.D.; YARA, R., TANAKA, F.A.O.; AZEVEDO, J.L;
10 ALMEIDA, M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable
endosymbionts. World J Microbiol Biotechnol, 25:1757-1764, 2009.
- ALMEIDA, C.; ORTEGA, H; HIGGINBOTHAM, S.; FAU - SPADAFORA, C.;
SARNOLD, A. E.; ARNOLD, A. E.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A.; GERWICK,
W. H.; CUBILLA-RIOS, L. Chemical and bioactive natural products from
15 *Microthyriaceae* sp., an endophytic fungus from a tropical grass. LID, 2014.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants
with great promises. Appl Microbiol Biotechnol 90 (6):1829–1845, 2011.
- ARNOLD, A. E. Endophytic fungi: hidden components of tropical community ecology.
In: CARSON, W. P. e SCHNITZER, S. A. (Ed.). Tropical Forest Community
20 Ecology, 254-271, 2008.
- ARNOLD, A. E.; MEJIA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.;
ROBBINS, N.; et al. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:15649–15654, 2003.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress,
25 challenges, and frontiers. Fungal Biol 21:51–66, 2007.
- ARNOLD, A. E.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes:
Are tropical leaves biodiversity hotspots? Ecology 88:541–549, 2007.
- ATEBA, J. E. T.; TOGHUEO, R. M. K.; AWANTU, A. F.; BRICE M. MBA’NING,
B. M.; GOHLKE, S.; SAHAL, D.; RODRIGUES-FILHO, E.; TSAMO, E.;
30 FABRICE F. BOYOM, F. F.; SEWALD, N.; LENTA, B. N. Antiplasmodial
Properties and Cytotoxicity of Endophytic Fungi from *Symphonia globulifera*
(*Clusiaceae*). J. Fungi, 4(70), 2018.

- BAILEY, B. A.; STREM, M. D.; WOOD, D. Trichoderma species form endophytic associations within *Theobroma cacao* trichomes. *Mycological research*, 113:1365-1376, 2009.
- 5 BARROW, J.R., OSUNA-AVILA, P. & REYES-VERA, I. Fungal endophytes intrinsically associated with micropropagated plants regenerated from native *Bouteloua eriopoda* torr. and *Atriplex canescens* (pursh) nutt. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 40:608-612, 2004.
- BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 58:1-28, 2005.
- 10 BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3):426:438, 2011.
- BOTELLA, L.; DIEZ, J. J. Phylogenic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Diversity*, 47:9–18, 2011.
- 15 BOGNER, C. W.; KARIUKI, G. M.; ELASHRY, A.; SICHTERMANN, G.; BUCH, A. K.; MISHRA, B.; THINES, M.; GRUNDLER, F. M. W.; SCHOUTEN, A. Fungal root endophytes of tomato from Kenya and their nematode biocontrol potential. *Mycol Progress* 15:30, 2016.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Acesso em 20/06/2018. <http://www.mma.gov.br/informma/item/11294-quantidade-de-agrotoxico>, 2018.
- 20 BRASIL, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. IBAMA. Acesso em 20/06/2018. <http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>, 2018.
- 25 BRIGHENTI, F. L.; SALVADOR, M. J.; GONTIJO, A. V. L.; DELBEM, A. C. B.; DELBEM, A. C. B.; SOARES, C. P.; OLIVEIRA, M. A. C., GIRONDI, C. M.; KOGA-ITO, C. Y. Plant extracts: initial screening, identification of bioactive compounds and effect against *Candida albicans* biofilms. *Future Microbiol.* 12(1), 15–27, 2017.
- 30 BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C. L.; LA FLAMME, A. C.; VAN VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother*; 40:2592-2597, 1996.
- CAMPOS, F. F.; ROSA, L. H.; COTA, B. B.; CALIGIORNE, R. B.; RABELLO, A. L. ALVES, T. M. A.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus* sp., an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). 1935-2735, 2008.

- CANNON, P. F.; SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana, 0027-5514, 2002.
- CARNEIRO, C.C., DA COSTA SANTOS, S., DE SOUZA LINO, R., BARA, M.T.F., CHAIBUB, B.A., DE MELO REIS, P.R., CHAVES, D.A., DA SILVA, A.J.R., SILVA, L.S., DE MELO E SILVA, D., CHEN-CHEN, L. Chemopreventive effect and angiogenic activity of punicalagin isolated from leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. Toxicol. Appl. Pharmacol. 310:1–8, 2016.
- CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. Canadian Journal of Botany, 56(24):3034-3043, 1978.
- CARVALHO, C. R. Diversidade e Bioprospecção de Fungos Endofíticos associados à plantas biotivas do Brasil e Estados Unidos. Tese de doutorado em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2015a.
- CARVALHO, C.; GONÇALVES, V.; PEREIRA, C.; JOHANN, S.; GALLIZA, I.; ALVES, T. A.; RABELLO, A.; SOBRAL, M. G.; ZANI, C.; ROSA, C.; ROSA, L. 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, 2012.
- CARVALHO, C. R.; VIEIRA, M. L. A.; CANTRELL, C. L.; WEDGE, D. E.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; PIMENTA, R. S.; JUNIOR, P. A. S.; MURTA, S. M. f.; ROMANHA, A. J.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Biological activities of ophiobolin k and 6-epi-ophiobolin k produced by the endophytic fungus *Aspergillus calidoustus*. Natural Product Research, p. 1-4, 2015b.
- CARVALHO. C. R.; WEDGE, D. E.; CHARLES L. CANTRELL, C. L.; SILVA-HUGHES, A. F.; PAN, Z.; MORAES, R. M.; VICTOR L. MADDOXX, V. L.; ROSA, L. H. Molecular Phylogeny, Diversity and Bioprospecting of Endophytic Fungi Associated with wild Ethnomedicinal North American Plant *Echinacea purpurea* (Asteraceae).2016.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. . The Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 42:181-184, 1967.
- CHAREPRASERT, S., PIAPUKIEW, J., THIENHIRUN, S., WHALLEY, A. J. S.; SIHANONTH, P. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. World. J. Microbiol. Biotechnol. 22:481–486, 2006.

- CLAY, K. *Clavicipitaceus*. Endophytes of grasses: Their potential as biocontrol agents. *Mycol. Res.* 92, 1–12, 1989.
- CHAGAS C. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem I Oswaldo Cruz*, 1: 159-218, 1909.
- CHAGAS C. *Trypanosoma minasense* (Nota preliminar). *Brazil Médico*, 22: 48, 1908.
- CHAREPRASERT, S.; PIAPUKIEW, J.; THIENHIRUN, S.; WHALLEY, A. S.; SIHANONTH, P. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(5):481-486, 2006.
- CHEN, Y.; YANG, Y.; LI, X.; ZOU, C.; ZHAO, P. Diterpenoids from the Endophytic Fungus *Botryosphaeria* sp. P483 of the Chinese Herbal Medicine *Huperzia serrata*. *Molecules*, 20(9):16924-16932, 2015.
- CIMMINO, A.; ANDOLFI, A.; ZONNO, M. C.; et al. Phomentrioloxin, a fungal phytotoxin with potential herbicidal activity, and its derivatives: a structure–activity J *AgricFood Chem.* 61:9645–9649, 2013.
- CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. *Nature*, 432:829-837, 2004.
- CLARK, T. N.; ELLSWORTH, K.; LI, H.; JOHNSON, J. A.; GRAY, C. A. Isolation of the plant hormone (+)-abscisic acid as an antimycobacterial constituent of the medicinal plant endophyte *Nigrospora* sp. 2013.
- CLAY, K.; HOLAH, J. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. 1999.
- COLLADO, J.; PLATAS, G. & PELÁEZ. Fungal endophytes in leaves, twigs and bark of *Quercus ilex* from Central Spain. *Nova Hedwigia.* 63:347-360, 1996.
- COLWELL, R. K.; MAO, C. X.; CHANG, J. INTERPOLATING, EXTRAPOLATING, AND COMPARING INCIDENCE-BASED SPECIES ACCUMULATION CURVES. *Ecology*, 85(10):2717-2727, 2004.
- COTA, B. B.; ROSA, L. H.; CALIGIORNE, R. B.; RABELLO, A. L. T.; ALVES, T. M. A.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Altenusin, a biphenyl isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp., inhibits trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett.* 285:177–182, 2008.
- COTA, B. B., TUNES, L. G.; MAIA, D. N. B.; RAMOS, J. P. R.; OLIVEIRA, D. M.; KOHLHOFF, M.; ALVES, T. M. A.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; CAMPOS, F. F.; ZANI, C. L. Leishmanicidal compounds of *Nectria pseudotrachia*, an

- endophytic fungus isolated from the plant *Caesalpinia echinata* (Brazilwood). Mem Inst Oswaldo Cruz. 113(2): 102-110, 2018.
- 5 COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104(Suppl 1):31-40, 2009.
- CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Global food and fibre security threatened by current inefficiencies in fungal identification. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 371:20160024, 2016.
- 10 CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; REEDER, J.; MARASAS, W. F. O., PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. Studies in Mycology 55:235-253, 2006.
- CRUYWAGEN, E. M.; SLIPPERS, B.; ROUX, J.; WINGFIELD, M. J. Phylogenetic species recognition and hybridisation in *Lasiodiplodia*: A case study on species 15 from baobabs. Fungal biology 121:420-436, 2017.
- DALMAGRO, H. J.; LATHUILLIÈRE, M. J.; VOURLITIS, G. L.; *et al.* Physiological responses to extreme hydrological events in the Pantanal wetland: heterogeneity of a plant community containing super-dominant species. J. Veg. Sci. 27(3):568–577, 2016.
- 20 DAWIT, G.; GIRMA, Z.; SIMENEW, K. A Review on biology, epidemiology and public health significance of Leishmaniasis. J Bacteriol Parasitol 4:2:166, 2013.
- DEBERGH P. C.; READ, P. E. Micropropagation. Kluwer Academic Publishers, 1991.
- DEBNATH, C. P.; MALIK, C. P.; BISEN, P. S. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant based medicines. Current Pharmaceutical 25 Biotchnology, 7:33-49, 2006.
- DECKERT, R. J.; MELVILLE, L. H.; PETERSON, R. L. Structural features of a Lophodermium endophyte during the cryptic life-cycle phase in the foliage of *Pinus strobus*. Mycological Research, 05(8): 991-997, 2001.
- 30 DING, G.; WANG, H.; LI, L.; SONG, B.; CHEN, H.; ZHANG, H.; LIU, X.; ZOU, Z. Trichodermane, a Spiro-cytochalasan with a Tetracyclic Nucleus (7/5/6/5) Skeleton from the Plant Endophytic Fungus *Trichoderma gamsii*. Journal of Natural Products, 77(1):164-167, 2014.
- DREYFUSS, M. M.; CHAPELA, I. H. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. 1994.

- DRUMOND, B. P.; MONDINI, A.; SCHMIDT, D. J.; DE MORAIS BRONZONI, R. V.; BOSCH, I.; NOGUEIRA, M. L. Circulation of different lineages of Dengue virus 2, genotype American/Asian in Brazil: dynamics and molecular and phylogenetic characterization. 2013.
- 5 DUKE, S. O. Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? *Pest Manag Sci.* 68:5022–5512, 2012.
- EVIDENTE, A.; CIMMINO, A.; ANDOL, A.; VURRO, M.; ZONNO, M. C.; CANTRELL C. L.; MOTTA, A. *Tetrahedron.* 64:1612–1619, 2008.
- EK-RAMOS, M. J.; ZHOU, W.; VALENCIA, C. U.; ANTWI, J. B.; KALNS, L. L.;
10 MORGAN, G. D.; KERNS, D. L.; SWORD, G. A. Spatial and Temporal Variation in Fungal Endophyte Communities Isolated from Cultivated Cotton (*Gossypium hirsutum*). *PLoS one*, 6(8), 2013.
- ELKHAYAT, E. S.; IBRAHIM, S. R.; MOHAMEDD, G. A.; SAMIR A. ROSS, S. A. Terrenolide S, a new antileishmanial butenolide from the endophytic fungus
15 *Aspergillus terreus*. *Natural Product Research*, 2015.
- FACHIM, E.; GUARIM, V. L. M. S. Conservação da biodiversidade: espécies da flora de Mato Grosso. *Acta Bot Bras* 9: 281- 302, 1995.
- FERREIRA, M. C. *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) e seus fungos endofíticos: diversidade e bioprospecção de substâncias bioativas. Tese de doutorado em
20 Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2017a.
- FERREIRA, M. C., VIEIRA, M. D. L. A., ZANI, C. L., DE ALMEIDA ALVES, T. M., JUNIOR, P. A. S., MURTA, S. M., ROSA, L. H. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis*. 2015.
- 25 FERREIRA, M. C.; CANTRELL, C. L.; WEDGE, D. E., GONÇALVES, V. N.; JACOB, M. R.; KHAN, S.; et al 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, 2017b.
- 30 GAI, C. S.; LACAVAL, P. T.; WALTER MACCHERONI JR., CHIRLEI GLIENKE, WELINGTON LUIZ ARAÚJO, THOMAS ALBERT MILLER AND JOÃO LÚCIO AZEVEDO. Diversity of endophytic yeasts from sweet orange and their localization by scanning electron microscopy. *Journal of Basic Microbiology*, 49:441–451, 2009.

- GALLO, M. B.; CHAGAS, F. O.; ALMEIDA, M. O., MACEDO, C. C., CAVALCANTI, B.; BARROS, F.; et al. Endophytic fungi found in association with *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. *J. Basic Microbiol.* 49: 142–151, 2009.
- 5 GAO, H.; LI, G.; LOU, H. Structural Diversity and Biological Activities of Novel Secondary Metabolites from Endophytes. *Molecules*, 23(646), 2018.
- GIANESSI, L. P. The increasing importance of herbicides in worldwide crop production. *Pest. Manag. Sci.* 69:1099–1105, 2013.
- GIANESSI LP, REIGNER N. Pesticide use in u.S. Crop protection: 2002. Washington, 10 D.C. 2006.
- GILBERT N. A hard look at GM crops. *Nature* 497: 24–26, 2013.
- GLASS, N.L.; DONALDSON, G. C. Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR to Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, Apr., p. 1323–1330, 1995.
- 15 GLIENKE, C.; PEREIRA, O.; STRINGARI, D.; FABRIS, J.; KAVA–CORDEIRO, V.; GALLI–TERASAWA, L.; CUNNINGTON, J.; SHIVAS, R.; GROENEWALD, J.; CROUS, P. W. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with citrus black spot. *Persoonia* 26:47–56, 2011.
- GLOBAL HEALTH OBSERVATORY (GHO) data. Leishmaniasis. World Health Organization (WHO). 20 http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/. Accessed 05 April 2018.
- GRYZENHOUT, M.; WINGFIELD, B. D. WINGFIELD MJ. Taxonomy, Phylogeny, and Ecology of Bark Inhabiting and Tree-pathogenic Fungi in the 25 *Cryphonectriaceae*. The American Phytopathological Society, USA, 119 pp., 2009.
- GOMES, R. R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, S. I. R.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia* 31:1–41, 2013.
- GONZAGA, L. L.; COSTA, L. E. O.; SANTOS, T. T.; ARAUJO, E. F.; QUEIROZ, M. 30 V. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. *Journal of Applied Microbiology* 118: 485--496, 2014
- GOUPIL, L. S.; MCKERROW, J. H. Introduction: drug discovery and development for neglected diseases. *Chem Rev* 114:11131–11137, 2014.

- GREEN, J. M. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. *Pest Manag Sci.* 70:1351–1357, 2014.
- GUBLER, D. J. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and status. Novartis Found Symp. 277:3–16. Discussion 16–22, 71–13, 251–253, 2016.
- 5 GUEDES, P. M. M.; SILVA, G. K.; GUTIERREZ, F. R. S.; SILVA, J. S. Current status of Chagas disease chemotherapy. *Expert Rev Anti-Infect Ther.* 2011; 9(5):609–620.
- GUIMARAES, D. O.; BORGES W. S.; KAWANO, C. Y.; RIBEIRO, P. H.; GOLDMAN, G. H.; GNOMIZO, A.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated
10 from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. 2008.
- HAMAYUN, M., KHAN, S. A.; AHMAD, N.; DONG-SHENG, T.; KANG, S. M.; NA, C. I.; et al. *Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.) Merr. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25:627–632, 2009.
- 15 HAN, J. H.; CHON, J. K.; AHN, J. H.; CHOI, I. Y.; LEE, Y. H.; KIM, K. S. Whole genome sequence and genome annotation of *Colletotrichum acutatum*, causal agent of anthracnose in pepper plants in South Korea. *Genom Data* 8:45–46, 2016.
- HANADA, R. E.; SOUZA, T. J.; POMELLA, A. W. V.; HEBBAR, K. P.; PEREIRA, J. O.; ISMAIEL, A.; SAMUELS, G. J. *Trichoderma martiale* sp. nov a new
20 endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. *Mycological reasearch* 112:1335-1343, 2008.
- HARDING, D. P.; RAIZADA, M. N. Controlling weeds with fungi, bacteria and viruses: a review. *Frontiers in Plant Science*, 6 (659), 2015.
- HARDOIM, P. R.; OBERWWEK, L. S. V.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A. M.;
25 COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DORING, M., SESSITCHE, A. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 79(3):293-320, 2015.
- HARDOIM, P. R.; OBERWWEK, L. S. V.; ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*,
30 16(10):463-471, 2008.
- HE, F., SUN, Y. L.; LIU, K. S.; ZHANG, X. Y.; QIAN, P. Y.; WANG, Y .. F.; QI, S. H. Indole alkaloids from marine-derived fungus *Aspergillus sydowii* SCSIO 00305. *J. Antibiot.* 65:109-111, 2012.

- HEFNAWY, A.; BERG, M.; DUJARDIN, J. C.; MUYLDER, G. Exploiting knowledge on *Leishmania* drug resistance to support the quest for new drugs. *Trends Parasitol* 33(3):162–174, 2017.
- 5 HOKAMA, Y. M. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae) DO PANTANAL SUL-MATOGROSSENSE E CONTROLE BIOLÓGICO DE *Phyllosticta citricarpa*. Dissertação de mestrado em Gnética, Universidade Federal do Paraná, 2012.
- 10 HOUBRAKEN, J.; SPIERENBURG, H.; FRISVAD ANTONIE VAN LEEUWENHOEK, J. C. *Rasamsonia*, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. 101:403–421, 2012.
- HYDE, K. D.; CAI, L.; MCKENZIE, E. H. C.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z.; PRIHASTUTI, H. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Divers* 39, 1–17, 2009.
- 15 HUANG, W. Y.; CAI, Y. Z.; HYDE, K. D.; CORKE, H.; SUN, M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity* 33:61–75, 2008.
- IBAMA. Plano de manejo da Arara-azul-de-Lear (*Anodorhynchus leari*). Brasília, edições do IBAMA, Série espécie ameaçadas, 6, 78p, 2006.
- 20 IBRAHIMA, M.; KAUSHIKB, N.; SOWEMIMOA, A.; CHHIPAB, H.; KOEKEMOERC, T.; VAN DE VENTERC, M.; ODUKOYAA, O. A. Antifungal and antiproliferative activities of endophytic fungi isolated from the leaves of *Markhamia tomentosa*. *Pharmaceutical Biology*. 55(1), 2017.
- 25 INGAVAT, N.; DOBEREINER, J.; WIYAKRUTTA, S.; et al. Aspergillusol A, an α -glucosidase inhibitor from the marine-derived fungus *Aspergillus aculeatus*. *J Nat Prod* 72:2049–2052, 2009.
- JAMI, F.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; GRYZENHOUT, M. Botryosphaeriaceae species overlap on four unrelated, native South African hosts. *Fungal Biology* 118: 168-179, 2014.
- 30 JAKLITSCH, W. M.; FOURNIER, J.; DAI, D. Q.; HYDE, K. D.; VOGLMAYR, H. *Valsaria* and the *Valsariales* *Fungal*. 73(1): 159–202, 2015.
- JIA, M.; CHEN, L.; XIN, H.; ZHENG, C.; RAHMAN, K.. HANT, T.; QUIN, L. A friendly relationship between andophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. *Frontiers in Microbiology*, 7:1-14, 2016.

- KAMAL, N.; VIEGELMANN, C. V.; CLEMENTS, C. J.; EDRADA-EBEL, R. Metabolomics-guides isolation of anti-trypanosomal metabolites from the endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae*. Plant. med., 2016.
- 5 KAMHAWI, S. The yin and yang of leishmaniasis control. PLoS Neglect. Trop. Dis., 2017.
- KATOCH, M.; SINGH, G.; SHARMA, S.; GUPTA, N.; SANGWAN, P.; SAXENA, A. Cytotoxic and antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Bacopa monnieri* (L.) Pennell (Scrophulariaceae). BMC Complementary and Alternative Medicine, 14(1):1-8, 2014.
- 10 KHATTAK, S.U.; IQBAL, Z.; LUTFULLAH, G.; BACHA, N.; KHAN, A. A.; SAEED, M.; ALI, M. Phytotoxic and herbicidal activities of *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from rhizosphere and soil. Pak J Weed Sci Res. 20:293–303, 2014.
- 15 KHAN, A. L.; GILANI, S. A.; WAQAS, M.; AL-HOSNI, K.; AL-KHIZIRI, S.; KIM, Y.; ALI, L.; KANG, S.; ASAF, S.; SHAHZAD, R.; HUSSAIN, J.; AL-HARRASI, I. L. Endophytes from medicinal plants and their potential for producing indole acetic acid, improving seed germination and mitigating oxidative stress. Biomed & Biotechnol, 18(2):125-137, 2017.
- 20 KHAZIR, J. MIR, B. A.; MIR, S. A.; COWAN, D. Natural products as lead compounds in drug discovery. J Asian Nat Prod Res 15(7):764–788, 2013.
- KIRK, P. M., CANNON, P. F., MINTER, D. W., & STALPERS, J. A. Dictionary of the Fungi. 10th ed. CAB International: Wallingford, U.K., 2008.
- 25 KLAUSNER, R. D.; DONALDSON J. G.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. 0021-9525, 1992.
- KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite--what decides? 1369-5266, 2006.
- 30 KORKAMA-RAJALA, T.; MULLER, M. M.; PENNANEN, T. Decomposition and fungi of needle litter from slow- and fast-growing Norway spruce (*Picea abies*) clones. 2008.
- KRIJGSHELD, P.; BLEICHRODT, R.; VELUW, G. J.; WANG, F.; MÜLLER, W. H.; DIJKSTERHUIS, J.; WÖSTEN, H. B. Development in *Aspergillus*. Stud Mycol. 74:1–29, 2012.

- KUMARAN, R. S.; HUR, B. Screening of species of the endophytic fungus *Phomopsis* for the production of the anticancer drug taxol. *Biotechnol Appl Biochem.*, 54:21–30.31, 2009.
- 5 KURTZMAN, C. P., FELL, J. W., BOEKHOUT, T. & ROBERT, V. *Eremothecium Borzi* emend. Kurtzman (1995). In *The Yeasts, a Taxonomic Study*, Vol 2, pp. 410, 2011.
- KUSARI, S.; HERTWECK C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. 2012.
- 10 LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in Microbiology*, 15(6):279-289, 2007.
- LIECKFELDT, E.; MEYER W FAU - BORNER, T.; BORNER, T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. 1993.
- LI, H.; XIAO, J.; GAO, Y. Q.; TANG, J. J.; ZHANG, A. L.; ANDGAO, J. M. Chaetoglobosins from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus in *Ginkgo biloba*, and their phytotoxic and cytotoxic activities. *J.Agric.FoodChem.* 62:3734–3741, 2014.
- 15 LIMA, M. R. F. D.; DE SOUZA LUNA, J.; DOS SANTOS, A. F.; DE ANDRADE, M. C. C.; SANT’ANA, A. E. G.; GENET, J.-P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(1–2):137-147, 2006.
- 20 LIU, L.; LIU, S.; JIANG, L.; CHEN, X.; GUO, L.; CHE, Y. Chloropupekeananin, the first chlorinated pupukeananine derivative, and its precursors from *Pestalotiopsis fici*. *Organic letters*, 10(7):1397-1400, 2008.
- MALINOWSKI, D. P.; BELESKY, D. P. Ecological importance of *Neotyphodium* spp. grass endophytes in agroecosystems. *Grassland Science*, 52(1):1-14, 2006.
- 25 MALINOWSKI, D. P.; ZUO, H.; BELESKY, D. P.; ALLOUSH, G. A. Evidence for copper binding by extracellular root exudates of tall fescue but not perennial ryegrass infected with *Neotyphodium* spp. endophytes. *Plant and Soil*, 267(1-2)p. 1-12, 2004.
- 30 MALKUS, A., CHANG, P. F. L., ZUZGA, S. M., CHUNG, K. R., SHAO, J., CUNFER, B. M., ... & UENG, P. P. RNA polymerase II gene (RPB2) encoding the second largest protein subunit in *Phaeosphaeria nodorum* and *P. avenaria*. *Mycological research*, 10:1152-1164, 2006.

- MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; HYDE, K. D.; GROENEWALD, J. Z.; XU, J.; CROUS, P. W. *Stud Mycol*, 79:121–86, 2014.
- MARIMUTHU, P.; RAVINDER J. Trends in clinical trials of dengue vaccine. *Perspectives in Clinical Research*, 7:161-164, 2016.
- 5 MARINHO, A. M. D. R.; RODRIGUES-FILHO, E.; MOITINHO, M. D. L. R.; SANTOS, L. S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16:280-283, 2005.
- MARQUEZ, L. M.; REDMAN R. S.; RODRIGUEZ, R. J.; ROOSSINCK, M. J. A virus
10 in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. 1095-9203, 2007.
- MASI, M.; NOCERA, P.; REVEGLIA, P.; CIMMINO, A.; EVIDENTE, A. Fungal Metabolites Antagonists towards Plant Pests and Human Pathogens: Structure-Activity Relationship Studies *Molecules*, 23:834, 2018.
- 15 MAUSSE-SITOE, S. N. D.; RODAS, C. A.; WINGFIELD, M. J.; CHEN, S.; ROUX, J. Endophytic *Cryphonectriaceae* on native Myrtales: Possible origin of *Chrysosporthe* canker on plantation-grown *Eucalyptus*. *Fungal biology*, 2016.
- MCCOWN, B.; LLOYD, G. “Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture,” in *Proceedings of the International Plant Propagators’ Society (IPPS ’80)*, pp. 421–427, Carlisle, Pa, USA, 1980.
- 20
- MEKKAMOL, S. Endophytic fungi in *Tectona grandis* L. (Teak). PhD thesis, John Moores University, Liverpool, England, 1998.
- MEI, L.; ZHU, M.; ZHANG, D.; WANG, Y.; GUO, J.; ZHANG, H. Geographical and
25 Temporal Changes of Foliar Fungal Endophytes Associated with the Invasive Plant *Ageratina adenophora*. *Microb Ecol.* 67:402–409, 2014.
- MENEZES, V. M.; ATALLAH, A. N.; LAPA, A. J.; CATAPANI, W. R.A. Assessing the therapeutic use of *Lafoensia pacari* St. Hil. extract (Mangava-brava) in the eradication of *Helicobacter pylori*: double-blind randomized clinical trial.
30 *Helicobacter*, 11:188-195, 2006.
- MCKENZIE, E. H. C.; BUCHANAN, P. K.; JOHNSTON, P. R. Checklist of fungi on *Nothofagus* species in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany*, 38(4):635-720, 2000.

- MORAKOTKARN, D.; KAWASAKI, H.; SEKI, T. Molecular diversity of bamboo-associated fungi isolated from Japan. *FEMSMicrobiol Lett* 266:10–19, 2006.
- MISHRA, A.; GOND, S. K.; KUMAR, A.; SHARMA, V. K.; VERMA, S. K.; KHARWAR, R. N.; SIEBER, T. N. Season and tissue type affect fungal endophyte communities of the Indian medicinal plant *Tinospora cordifolia* more strongly than geographic location. *Microb Ecol.* 64(2):388-98, 2012.
- MINTER, D. Fungi: the orphans of Rio. *International Society for Fungal Conservation*, 1(2):27-31, 2010.
- MUELAS-SERRANO, S.; LE-SENNE, A.; FERNANDEZ-PORTILLO, C.; NOGAL, J. J.; OCHOA, C.; GOMEZ-BARRIO, A. *In vitro* and *in vivo* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of a novel nitro-derivative. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97:553–557, 2009.
- MULLER, V.; CHAVEZ, J. H.; REGINATTO, F. H.; ZUCOLOTTI, S. M.; NIERO, R.; NAVARRO, D.; YUNES, R. A.; SCHENKEL, E. P.; BARARDI, C. R. M.; ZANETTI, C. R.; SIMOES, C. M. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. 2007.
- MUNDO, S. R.; DUARTE, M. R. Morfoanatomia foliar e caulinar de dedaleiro: *Lafoensia pacari* A. St.- Hil. (Lythraceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, 26 (4):522-529, 2007.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 1:473-497, 1962.
- NAIR, D. N.; PADMAVATHY, S. *Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans.* 2014.
- NETO, G. G. O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental. *Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental - Universidade Federal do Rio Grande*, 17, 2006.
- NETO, G. G.; GUARIM, V. L. M. S.; MACEDO, M.; NASCIMENTO, N. P. Flora, vegetação e etnobotânica: conservação de recursos vegetais no pantanal. *Gaia Scientia*, 2:41-46, 2008.
- NISA, H.; KAMILI, A. N.; NAWCHOO, I.A.; SHAFI, S.; SHAMEEM, N.; BANDH, S. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. *Microbiol Pathogenesis*, 1-10, 2015.
- OERKE, E.C. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci*, 144:31–43, 2006.
- O'BRIEN, H. E.; PARRENT, J. L.; JACKSON, J. A.; MONCALVO, J. M.; VILGALYS, R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of

- environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:5544 – 5550, 2005.
- OSORIO, J. A.; CROUS, C. J.; DE BEER, Z. W.; WINGFIELD, M. J.; ROUX, J. Endophytic *Botryosphaeriaceae*, including five new species, associated with mangrove trees in South Africa. *Fungal biology*, 121(93), 2017.
- 5 PAES, L. S.; LUCELENA, J. M. V. M.; BENTES, J. L. S.; MARQUES, J. D. O.; CASAS, L. L.; MENDONÇA, M. S. Endophytic mycobiota of three amazonian medicinal herbs: *Stachytarpheta cayennensis* (Verbenaceae), *Ayapana triplinervis* (Asteraceae) and *Costus spicatus* (Costaceae). *Int J Bot* 10(1):24–29, 2014.
- 10 PAPKE, R. T.; WARD, D. M. The importance of physical isolation to microbial diversification, 2004.
- PARSA, S.; GARCIA-LEMONS, A. M.; CASTILLO, K.; ORTIZ, V.; LOPEZ-LAVALLE, L. A. B.; BRAUN, J.; VEJA, F. E. Fungal endophytes in germinated seeds of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *Fungal biology* 120, 2016.
- 15 PELÁEZ, F.; COLLADO, J.; ARENAL, F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; MATAS, M. T. D.; GARCÍA, J. B.; DEL VAL, A. G.; GONZÁLEZ, V.; GORROCHATEGUI, J.; HERNÁNDEZ, P.; MARTÍN, I.; PLATAS, G.; VICENTE, F. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. *Mycological Research*, 102 (6):755-761, 1998.
- 20 PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. M. Chagas Disease. *The Lancet*, 2017.
- PETERSEN, L.; FRISVALD, J. C.; KUNDSSEN, P. B.; RHOLFS, M. R.; GOTSFREDSEN, C. H.; LARSEN, T. O. Induced sclerotium formation exposes new bioactive metabolites from *Aspergillus sclerotiicarbonarius*. *The Journal of Antibiotics*, 68, 603–608, 2015.
- 25 PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. 1056-9014, 1992.
- PETRINI, O. Fungal Endophytes of Tree Leaves. In: ANDREWS, J. e HIRANO, S. (Ed.). *Microbial Ecology of Leaves*. (Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience). ISBN 978-1-4612-7822-1. cap. 9, p.179-197. Springer New York, 1991.
- 30 PINA, E. S.; SILVA, D. B.; TEIXEIRA, S. P.; COPPEDE, J. S.; FURLAN, M.; FRANÇA, S. C.; LOPES, N. P.; PEREIRA, A. M. S. , LOPES, A. A. Mevalonate-derived quinonemethide triterpenoid from *in vitro* roots of *Peritassa laevigata* and

their localization in root tissue by MALDI imaging. Nature, scientific report, 1-7, 2016.

- PIRTTILÄ, A.M.; PODOLICH, O.; KOSKIMÄKI, J.J.; HOHTOLA, E; HOHTOLA, A. Role of origin and endophyte infection in browning of bud-derived tissue cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 95:47-55, 5 2008.
- PHONGPAICHIT, S.; NIKOM, J.; RUNGJINDAMAI, N.; SAKAYAROJ, J.; HUTADILOK-TOWATANA, N. RUKACHAISIRIKUL, V.; KANYAWIM, K. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. 10 *FEMS Immunol Med Microbiol* 51:517–525, 2007.
- PORFÍRIO, Z.; MELO-FILHO, G. C.; ALVINO, V.; LIMA, M. R. F.; SANT'ANA, A. E. G. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Lafoesia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19:785-789, 2009.
- 15 PROMPUTTHA, I.; HYDE, K.; MCKENZIE, E. C.; PEBERDY, J.; LUMYONG, S. Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes? *Fungal Diversity*, 41(1):89-99, 2010.
- PUNITHALINGAM E. *Plant Diseases Attributed to Botryodiplodia theobromae*. J. Cramer, Berlin, 1980.
- 20 QADRI, M.; I RAJPUT, R.; ABDIN, M. Z.; VISHWAKARMA, R. A.; RIYAZ-UL-HASSAN, S. Diversity, Molecular Phylogeny, and Bioactive Potential of Fungal Endophytes Associated with the Himalayan Blue Pine (*Pinus wallichiana*). *Microb Ecol*, 2014.
- REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis from 25 mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytol* 151,705–716, 2001.
- REDMAN, R. S.; SHEEHAN, K. B.; STOUT, R. G.; RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J. M. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. 1095-9203, 2002.
- RIBEIRO, A. S.; POLONIO, J. C.; COSTA, A. T.; SANTOS, C. M.; RHODEN, S. A.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Bioprospection of Culturable Endophytic 30 Fungi Associated with the Ornamental Plant *Pachystachys lutea*. *Current Microbiology*, 2018.
- RIVERA-ORDUÑA, F. N.; SUAREZ-SANCHEZ, R. A.; FLORES-BUSTAMANTE, Z. R.; GRACIDA-RODRIGUEZ, J. N.; FLORES-COTERA, L. B. Diversity of

endophytic fungi of *Taxus globosa* (Mexican yew). *Fungal Diversity* 47:65–74, 2011.

RODRIGUEZ, A.; DOUGALL, T.; DODD, J. C.; CLAPP, J. P. The large subunit ribosomal RNA genes of *Entrophospora infrequens* comprise sequences related to two different glomalean families. *New Phytologist*, 152 (1):159-167, 2001.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R.; HENSON, J. The Role of Fungal Symbioses in the Adaptation of Plants to High Stress Environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 9(3):261-272, 2004.

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE, J. F.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles.. 1469-8137, 2009.

RODRIGUES-HEERKLOTZ, K. F.; DRANDAROV, K.; HEERKLOTZ, J.; HESSE, M.; WERNER, C. *HELV. Chim. Acta* 84, 3766–3772, 2001.

RODRÍGUEZ-GÁLZEZ, E.; GUERRERO, P.; BARRADAS, C.; CROUS, P. W.; ALVES, A. Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. *Fungal biology*, 121:452-465, 2017.

ROGERIO, A. P.; FONTANARI, C.; MELO, M. C. C.; AMBROSIO, S. R.; DE SOUZA, G. E.; PEREIRA, P. S.; FRANCA, S. C.; DA COSTA, F. B.; ALBUQUERQUE, D. A.; FACCIOLI, L. H. Anti-inflammatory, analgesic and anti-oedematous effects of *Lafoensia pacari* extract and ellagic acid. 2006.

ROMANHA, A. J.; CASTRO, S. L.; SOEIRO, M. DE. N.; LANNES-VIEIRA, J.; RIBEIRO, I.; TALVANI, A.; BOURDIN, B.; BLUM, B.; OLIVIERI, B.; ZANI, C.; SPADAFORA, C.; CHIARI, E.; CHATELAIN, E.; CHAVES, G.; CALZADA, J. E.; BUSTAMANTE, J. M.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; ROMERO, L. I.; BAHIA, M. T.; LOTROWSKA, M.; SOARES, M.; ANDRADE, S. G.; ARMSTRONG, T.; DEGRAVE, W.; ANDRADE, Z. A. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105: 233-238, 2010.

ROSA, L. H.; VIEIRA, M. L. A.; COTA, B. B.; JOHANN, S.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A. Endophytic Fungi of Tropical Forests: A Promising Source of Bioactive Prototype Molecules for the Treatment of Neglected Diseases. *Medicinal Chemistry and Drug Design*, 1, 1-26, 2011.

ROSA, L.; SOUZA-FAGUNDES, E.; MACHADO, K. G.; ALVES, T. A.; MARTINS-FILHO, O.; ROMANHA, A.; OLIVEIRA, R.; ROSA, C.; ZANI, C. Cytotoxic, immunosuppressive and trypanocidal activities of agrocybin, a polyacetylene

- produced by *Agrocybe perfecta* (Basidiomycota). World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22(6):539-545, 2006.
- ROSA, L.; VAZ, A. M.; CALIGIORNE, R.; CAMPOLINA, S.; ROSA, C. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (*Poaceae*). Polar Biology, 32(2):161-167, 2009.
- 5 ROSA, L. H.; ALMEIDA, V. M. D. L.; SANTIAGO, I. F.; ROSA, C. A. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (*Caryophyllaceae*) in Antarctica. 2010.
- ROSA, L. H.; GONÇALVES, V. N.; CALIGIORNE, R. B.; ALVES, T. M. A.; RABELLO, A.; SALES, P. A.; ROMANHA, A. J.; SOBRAL, M. E. G.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. 2010.
- 10 ROSA, L. H.; TABANCA N FAU - TECHEN, N.; TECHEN N FAU - PAN, Z.; PAN Z FAU - WEDGE, D. E.; WEDGE DE FAU - MORAES, R. M.; MORAES, R. M. Antifungal activity of extracts from endophytic fungi associated with *Smallanthus* maintained in vitro as autotrophic cultures and as pot plants in the greenhouse. 2012.
- 15 ROQUE, F.O.; OCHOA-QUINTERO, J.; RIBEIRO, D. B. *et al.* Upland habitat loss as a threat to Pantanal wetlands. Conserv. Biol., 2016.
- 20 RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; DOS SANTOS. D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. Int. J. Biol. Sci. 1: 24-33, 2005.
- 25 SAIKKONEN, K.; SAARI, S.; HELANDER, S. Defensive mutualism between and endophytic fungi? Fungal diversity, 41:101-113, 2010.
- SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T.J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. Annual Review of Ecology and Systematics 29:319-343, 1998.
- 30 SAKALIDIS, M. L.; HARDY, G. E. S.; BURGESS, T. I. Endophytes as potential pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*: a focus on the Botryosphaeriaceae. Fungal ecology, 4, 2011.
- SAMPAIO, B. L. Influência dos fatores ambientais sobre a concnetração de compostos fenólicos nas folhas e cascas dos caules de *Lafoensia pacari* A, St. -Hil.

- (*Lythraceae*). Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, 2010.
- SANTAMARIA, J.; BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*) *Microb Ecol* 50:1–8, 2005.
- 5 SANTIAGO, V. S.; RICCARDO, D.D.; MARROT, A.; LIMA, C. G. F. Challenges in the chemotherapy of Chagas disease: Looking for possibilities related to the differences and similarities between the parasite and host. *World J Biol Chem.* 26; 8(1): 57-80, 2017.
- SANTOS, R. M.; RODRIGUES, G.; FO, E.; ROCHA, W. C.; TEIXEIRA, M. F. S.
10 Endophytic fungi from *Melia azedarah*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19:767-770, 2003.
- SANTOS, T. T.; LEITE, T. S.; QUEIROZ, C B.; ARAÚJO, E. F.; PEREIRA, O. L.; QUEIROZ, M. V. High genetic variability in endophytic fungi from the genus *Diaporthe* isolated from common bean (*Phaseolus vulgaris*L.). *J Appl Microbiol*
15 120:388–401, 2016.
- SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. in: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 615-656, 2004.
- SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.;
20 LEVESQUE, C. A.; CHEN, W. Fungal Barcoding Consortium, 2012.
- SCHORI, M.; APPEL, M.; KITKO, A. R.; SHOWALTER, A. M. Engineered DNA polymerase improves PCR results for plastid DNA. *Applications in Plant Sciences*, 1(2), 2013.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. *The endophytic continuum*, 2005.
- 25 SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A.-K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 106(9):996-1004, 2002.
- SCHULZ, B.; HASS, S.; JUNKER, C.; ANDRÉE, N. SCHOBERT, M. Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. *Current Science*,
30 109(1):39-45, 2015.
- SELIM, K. A.; EL-BEIH, A. A.; ABDEL-RAHMAN, T. M.; EL-DIWANY, A.I. Biology of endophytic fungi. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 31-82, 2012.

- SHARP, T. M.; TOMASHEK K. M.; READ, J. S.; MARGOLIS, H. S.; WATERMAN, S. H. A new look at an old disease: recent insights into the global epidemiology of dengue. *Curr. Epidemiol. Rep.*, 4:11-21, 2017.
- 5 SHAHZAD, R.; A. L.; BILAL, S.; ASAF, S.; LEE, I. What Is There in Seeds? Vertically Transmitted Endophytic Resources for Sustainable Improvement in Plant Growth. *Frontiers in Plant Science*, 9(24), 2018.
- SHWAB, E. K.; KELLER, N. P. Regulation of secondary metabolites production in filamentous ascomycetes. *Mycol. Res*, 112:225-230, 2016.
- SILVA, S. R. *Plantas do Cerrado*. Brasília-DF.: Funatura, 1998.
- 10 SINGH, D. K.; SHARMA V. K.; KUMAR, J.; MISHRA, A.; VERMA, S. K.; SIEBER, T. N.; KHARWAR, R. N. Diversity of endophytic mycobiota of tropical tree *Tectona grandis* Linn.f.: Spatiotemporal and tissue type effects. *Scientific Reports*, 7:3745, 2017.
- SIRIKANTARAMAS, S.; YAMAZAKI, M.; SAITO, K. A survival strategy: the
15 coevolution of the camptothecin biosynthetic pathway and self-resistance mechanism. 2009.
- SILVA-HUGHES, A. F.; WEDGE, D. E.; CANTRELL, C. L.; CARVALHO, C. R.; PANB, Z.; MORAES, R. M.; MADOXE, V. L.; ROSA, L. H. Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal
20 cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. *Microbiological Research* 175:67–77, 2015.
- SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21: 90-106, 2007.
- 25 SOLON, S.; LOPES, L.; TEIXEIRA DE SOUSA, P. J. R.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. 0378-8741, 2000.
- SOMRITHIPOL, S. Coprophilous fungi. In E. B. G. Jones, M. Tanticharoen, & K. D. Hyde (Eds.), *Thai fungal diversity* (pp. 119–128). Thailand: BIOTEC, 2004.
- 30 SOYTONG, K., QUIMIO, T. H. A taxonomic study on the Philippine species of *Chaetomium*. *The Philippine agriculturist*, 72(1):59–72, 1989.
- STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. *Natural products from endophytic microorganisms*, 2004.
- STROBEL, G. A. *Rainforest endophytes and bioactive products*. 2002.

- STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. 2003.
- STROBEL G. Harnessing endophytes for industrial microbiology. *Curr Opin Microbiol.* 9:240–244, 2006.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4): 491-502, 2003.
- 5 SU, Y.-Y.; GUO, L.-D.; HYDE, K. Response of endophytic fungi of *Stipa grandis* to experimental plant function group removal in Inner Mongolia steppe, China. *Fungal Diversity*, 43(1):93-101, 2010.
- SUN, L.L., SHAO, C. L.; CHEN, J. F.; GUO, Z. Y., FU, X. M.; CHEN, M.; CHEN, Y. Y.; LI, R.; VOOGD, N. J.; SHE, Z. G.; LIN, Y. C.; WANG, C.; BIOORGS, Y. New bisabolane sesquiterpenoids from a marine-derived fungus *Aspergillus* sp. isolated from the sponge *Xestospongia testudinaria*. *Med. Chem. Lett.* 22:1326-1329, 2012.
- 10 SURYANARAYANAN, T. S.; MURALI, T. S.; VENKATESAN, G. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical across a rainfall gradient. *Canadian Journal of Botany*, 80(8): 818-826, 2001.
- SUWANNARACH, N.; KUMLA, J.; BUSSABAN, B.; HYDE, K.; MATSUI, K.; LUMYONG, S. Molecular and morphological evidence support four new species in the genus *Muscodora* from northern Thailand. *Annals of Microbiology*, 63(4)1341-1351, 2013.
- 20 TALLEY, S.; COLEY, P.; KURSAR, T. The effects of weather on fungal abundance and richness among 25 communities in the Intermountain West. *BMC Ecology*, 2(1):1-11, 2002.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30:2725-2729, 2013.
- 25 TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. 2001.
- TANG, L. I.; LING, A. P.; KOH, R. Y.; CHYE, S. M.; VOON, K. G. L. Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants, 2012.
- 30 TAYLOR, J.; HYDE, K.; JONES, E. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. *New Phytologist*, 142, 1999.
- TAWFIKE A. F.; TATE, R.; ABBOTT, G.; YOUNG, L.; VIEGELMANN, C.; SCHUMACHER, M.; DIEDERICH, M.; EDRADA-EBEL, R. Metabolomic Tools

- to Assess the Chemistry and Bioactivity of Endophytic *Aspergillus* Strain Biodiversity 14, e1700040, 2017.
- TENGURIA, R. K.; KHAN, F. N.; QUERESHI, S. Endophytes - mines of pharmacological therapeutics. world J. Sci. Technol., 1(5):127-149, 2011.
- 5 TINTJER, T.; RUDGERS, J. A. Grass-herbivore interactions altered by strains of a native endophyte. 2006.
- TONELLO, V. M. Estrutura de populações de *Lafoensia pacari* St. Hil. e dados etnobotânicos e fenológicos em Nossa Senhora do Livramento-MT, MSc Thesis, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Brasil, 94 pp, 1997.
- 10 TRAKUNYINGCHAROEN, T.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J. Z.; CHEEWANGKOON, R.; TO-ANUN, C.; CROUS, P. W. Caulicolous Botryosphaeriales from Thailand. Persoonia 34: 87-99, 2015.
- U'REN, J. M.; LUTZONI, F; MIADLIKOWSKA, J.; LAETSCH, A. D.; ARNOLD, A. E. Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a
15 continental scale. 2012.
- VAREJÃO, E. V. V.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; et al. The search for new natural herbicides – strategic approaches for discovering fungal phytotoxins. Crop Protec. 48:41–50, 2013.
- VAZ, A. B. M.; MOTA, R. C.; BOMFIM, M. R. Q.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA
20 LH. Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with *Orchidaceae* in Brazil. Canadian Journal of Microbiology 55:1381-1391, 2009.
- VAZQUEZ, B. P.; VAZQUEZ, T. P.; MIGUEL, C. B.; et al. Inflammatory responses and intestinal injury development during acute *Trypanosoma cruzi* infection are associated with the parasite load. Parasit Vectors. 8:206, 2015.
- 25 VEGA, F. E.; SIMPKINS, A.; AIME, M.C.; POSADA, F.; PEHNER, S.A.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; ARNOLD, A. E. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawai'i, Mexico and Puerto Rico. Fungal Ecol 3:122–138, 2010.
- VENTURA-GARCIA, L.; ROURA, M.; PELL, C.; et al. Socio-cultural aspects of Chagas disease: a systematic review of qualitative research. PLoS Negl Trop Dis.
30 7: e2410, 2013.
- VERMA, V. C.; GOND, S. K.; KUMAR, A.; KHARWAR, R. N.; STROBEL, G. The endophytic mycoflora of bark, leaf, and stem tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Varanasi (India). Microb. Ecol. 54, 119–125, 2007.

- VIEIRA, M. L.; HUGHES, A. F.; V. B.; GIL, V. B.; VAZ, A. B. M.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae). 2012.
- 5 VIEIRA, M. L. A.; JOHANN, S.; HUGHES, F. M.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. The diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Baccharis trimera* (Asteraceae) from the Brazilian savannah. *Can. J. Microbiol*, 60:847-856, 2014.
- XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 105:149-158, 2011.
- 10 YU, G.; ZHOU, G.; ZHU, M.; WANG, W.; ZHU, T.; GU, Q.; LI, D. Neosartoryadins A and B, Fumiquinazoline Alkaloids from a Mangrove-Derived Fungus *Neosartorya udagawae* HDN13-313. *Organic letters*, 18(2):244-7, 2016.
- YU, J.; WU, Y.; HE, Z.; LI, M.; ZHU, K.; GAO, B. Diversity and Antifungal Activity of Endophytic Fungi Associated with *Camellia oleifera*. *Mycrobiology*, 2018.
- 15 WAAGE, J. K.; GREATHEAD, D. J. Biological control: Challenges and opportunities. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 318, 111–128, 1988.
- WANG, F. W.; JIAO, R. H.; CHENG, A. B.; TAN, S. H.; SONG, Y. C. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(1):79-83, 2007.
- 20 WANG, X.; CHEN, G.; HUANG, F.; ZHANG, J.; HYDE, K. D.; LI, H. *Phyllosticta* species associated with citrus diseases in China. *Fungal Divers* 52:209–224, 2012.
- WAQAS, M.; KHAN, A. L.; ALI, L.; KANG, S. M.; KIM, Y. H.; ANDLEE, I. J.; Seed germination-influencing bioactive secondary metabolites secreted by the endophyte *Cladosporium cladosporioides* LWL5. *Molecules* 18, 15519–15530, 2013.
- 25 WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. PCR Protocols: A guide methods and applications. In: (Ed.). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315-322, 1990.
- 30 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The use of Herbal Medicine in Primary Health Care. World Health Organization. MYANMARI, Y. 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO/HTM/NTD/2010. Geneva: World Health Organization, 2010.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dengue and severe dengue. Fact sheet n° 117 (Internet), 2014 (updated 2014 March; cited 2014 July 22). WHO; 2014a..
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease (American trypanosomiasis). 2014b.
- 5 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) World malaria report. Geneve, 196 p. In: Licence CC BY-NC-SA 3.0 IGO, (2017).
- WIKKEE, S.; UDAYANGA, D.; CROUS, P. W.; CHUKEATIROTE, E.; MCKENZIE, E. H. C.; BAHKALI, A. H.; DAI, D.; HYDE, K. D. Fungal Divers, 2011.
- WILSON, D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and
10 definition. *Oikos*, 73:274-276, 1995.
- WULANDARI, N. F.; TO-ANUN, C.; HYDE, K. D.; DUONG, L.; DE GRUYTER, J.; MEFFERT, J.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of *Citrus maxima* in Asia. *Fungal Divers* 34:23–39, 2009.
- 15 ZHANG, Q.; WANG, S.Q.; TANG, H.Y.; LI, X.J.; ZHANG, L.; XIAO, J.; GAO, Y.Q.; ZHANG, A.L.; GAO, J.M. Potential allelopathic indole diketopiperazines produced by the plant endophytic *Aspergillus fumigatus* using the one strain-many compounds method. *J. Agric. Food Chem.* 67:11447–11452, 2013.
- ZHANG, Q.; ZHANG, J.; YANG, L.; ZHANG, L.; JIANG, D.; CHEN, W.; LI, G.
20 Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Biological Control* 72: 98–108, 2014.
- ZHENG. Y.; QIAO, X.; MIAO, C.; et al. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. *Ann Microbiol.* 66:529–542, 2015.

25

30

Anexos

Anexo 1. Atividades desenvolvidas e produções obtidas durante o período do curso.

5 **Apresentações em Congressos:**

AMORIM, S. S.; ASSIS, J. C. S.; CARVALHO, C. R.; SALES, P. A.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; ROSA, L. H. Trypanocidal activity of endophytic fungi associated with bioactive brazilian medicinal plant *Lafoensia pacari*. 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu, 2017.

AMORIM, SORAYA S.; ASSIS, J. C. S.; CARVALHO, C. R.; SALES, P. A.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; ROSA, L. H. Diversidade e Bioprospecção de fungos endofíticos associados à planta medicinal *Lafoensia pacari*. IV Simpósio de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

CARVALHO, C. R.; SILVA-HUGHES, A.; WEDGE, D. E.; CANTRELL, C. L.; PAN, Z.; MORAES, R. M.; **AMORIM, S. S.**; WANG, X.; TECHEN, N.; TABANCA, N.; QUEIROZ, S. C.; ROSA, L. H. MycoSymbiosis: Antifungal activity against phytopathogenic fungi produced by endophytic fungi associated with medicinal plants from Brazil and United States. 254th AMERICAN CHEMICAL SOCIETY NATIONAL MEETING, Washington, 2017.

COMPAGNANI, M. O.; CAMPOS, W. G.; **AMORIM, S. S.**; ROSA, L. H.; AUAD, A. M.; MAURICIO, R. M. Bioprospecção de fungos entomopatogênicos para controle biológico associados à *Mahanarva spectabilis* isolados em sistema silvipastoril. VIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2016, Florianópolis. VIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2016.

ASSIS, J. C. S.; **AMORIM, S. S.**; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; MARQUES, F. R.; SALES, P. A.; ROSA, L. H. Atividade Tripanosomicida de extratos de fungos endofíticos associados à planta medicinal *Lafoensia pacari*. XXV Semana de Iniciação Científica da UFMG, Belo Horizonte, 2016.

35 **Premiação:**

Destaque de melhor poster para o trabalho intitulado “Diversidade e Bioprospecção de fungos endofíticos associados à planta medicinal *Lafoensia pacari*”. IV Simpósio de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

40 **Capítulo de Livro Publicado:**

NICOLAU, V. G.; CARVALHO, C. R.; **AMORIM, S. S.**; MENEZES, G. C. A.; VITORELI, G. A.; ASSIS, J. C. S.; ROSA, L. H. Biologia e Biotecnologia de Fungos. Microbiologia Industrial – Bioprocessos, 2017, p. 137-179.

Capítulo de Livro Submetido:

CARVALHO, C.R.; FERREIRA, M.C.; **AMORIM, S.S.**; FLORINDO, R.H.S.; ASSIS, J.C.S.; ZANI, C.L.; ROSA, L.H. Bioactive Compounds from Endophytic Fungi

associated with Medicinal Plants. In: Recent Advancement in White Biotechnology through Fungi (ed.) Yadav, A.N.; Mishra, S.; Singh, S.; Gupta, A. Springer.

5 **Artigo publicado em colaboração:**

CAMPAGNANI, MICHELLE OLIVEIRA; CAMPOS, WELLINGTON GARCIA; **AMORIM, SORAYA SANDER**; ROSA, LUIZ HENRIQUE; AUAD, ALEXANDER MACHADO; CANGUSSÚ, MAURONI ALVES; MAURÍCIO, ROGÉRIO MARTINS.
10 Prospection and Fungal Virulence Associated with (Hemiptera: Cercopidae) in an Amazon Silvopastoral System. FLORIDA ENTOMOLOGIST, v. 100, p. 426-432, 2017.

15 **Artigo submetido em colaboração:**

CORREIA, VANESSA CAROLINA DE SENA; PEREIRA, RITA DE KÁSSIA DE OLIVEIRA; **AMORIM, SORAYA SANDER**; MEDEIROS, DANIEL SOL SOL DE; MEDEIROS, PATRÍCIA SOARES DE MARIA DE; TELES, CAROLINA BIONI GARCIA; ROSA, LUIZ HENRIQUE; OLIVEIRA JÚNIOR, WALDESSE PIRAGÉ
20 DE; PIMENTA, RAPHAEL SANZIO. Diversity and antimalarial activity of endophytic fungi associated with *Myrciaria dubia*, from the Cantão - Tocantins State Park, Brazil. ACTA AMZONICA.

25 **Co-orientação**

Trabalho de Conclusão de Curso para a Graduação em Ciências Biológicas da aluna Jéssica Catarine Silva de Assis: “Atividade Tripanosomicida de Extratos de Fungos Endofíticos Associados à Planta Medicinal *Lafoensia pacari*”. 2017, Universidade
30 Federal de Minas Gerais.

35

1 **Diversity and herbicidal activity of the endophytic fungi associated with the**
2 **medicinal plant *Lafoensia pacari* A. St. Hil. from the Brazilian Pantanal Mato-**
3 **grossense**

4

5 Soraya S. Amorim¹, Camila R. Carvalho¹, Jéssica C. S. Assis¹, Mariana C. Ferreira¹,
6 Marcos Antônio Soares², Luiz H. Rosa^{1*}

7

8 ¹Department of Microbiology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG,
9 Brazil

10 ²Department of Botany and Ecology, Federal University of Mato Grosso, Cuiabá, MT,
11 Brazil

12

13

14 **Running Head:** Endophytic fungi from *Lafoensia pacari*

15

16 *Corresponding author. Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas
17 Gerais, Belo Horizonte, MG, CEP 31270-901. Tel.: +55-31-3409 2749; Fax: +55-31-
18 3409 2730, Brazil. E-mail: lhrosa@icb.ufmg.br

19

20

21

22

23

24

25

26 **Abstract**

27 Endophytes are microorganisms that inhabit plant tissues during at least one stage of their
28 life cycle and they do not cause any apparent symptom of disease on their hosts. *Lafoensia*
29 *pacari* is a medicinal plant used for the treatment of gastric disorders by macerating the
30 leaves and the bark. This work aims to characterize the community of endophytic fungi
31 associated with *L. pacari*, as well as evaluating it as a source of herbicidal metabolites.
32 From the fragments of leaves, bark and seeds of *L. pacari*, 236 filamentous fungi and 3
33 yeasts were isolated. A total of 63 fungal taxa were obtained, represented by the classes
34 *Dothideomycetes*, *Sordariomycetes*, *Eurotiomycetes*, and *Saccharomycetes*
35 (Ascomycota); *Ustilaginomycetes* (Basidiomycota); and *Zygomycetes* (Zygomycota).
36 The most abundant genera were *Phyllosticta*, *Lasiodiplodia*, *Pseudofusicoccum*,
37 *Diaporthe* and the fungus *Aspergillus aculeatus*. The diversity of the endophytic fungi
38 community associated with *L. pacari* was high, with high taxonomic richness values and
39 low taxonomic dominance. The dichloromethane crude extracts were evaluated for
40 herbicidal activity against the seeds of *Latuca sativa* (lettuce) and *Allium schoenoprasum*
41 (chives). Forty-six extracts showed herbicidal activity, and 14 inhibited 100% of the
42 germination of the both models used at the assay. From the results obtained it is verified
43 that the medicinal plant *L. pacari* represents a promising reservoir of diversified
44 endophytic fungi capable of producing bioactive metabolites that can be used for
45 agricultural purposes.

46 **Key words:** endophytic fungi, *Lafoensia pacari*, secondary bioactive metabolites.

47

48

49

50

51 **1. Introduction**

52 Endophytic fungi inhabit asymptotically and internally within various tissues of host
53 plants during at least one stage of their life cycle (Petrini et al., 1992), and their ecological
54 functions attract increasing attention (Xi & Dai, 2015). These fungi are found in almost
55 all plants (Rodriguez et al., 2009). The endophyte and host plant establish a harmonious
56 symbiotic system interaction in which the microorganisms obtain energy, nutrients and
57 shelter, while they protect the hosts against pathogens, herbivores and insects and induce
58 plant growth or defense mechanisms (Firáková et al., 2007; Wang and Dai, 2011; Alvin
59 et al., 2014). Researchers in throughout the world have been shown that endophytes are
60 potential to biosynthesize diverse natural products with intriguing biological activities.

61 The diversity of endophytes is high, so endophytes have recently generated significant
62 interest in the microbial chemistry community due to their great potential to contribute to
63 the discovery of new bioactive compounds. It has been suggested that the close biological
64 association between endophytes and their host plant results in the production of a great
65 number and diversity of biologically active molecules compared to epiphytes or soil-
66 related microbes (Strobel, 2003).

67 Medicinal plants are reported to harbor endophytes (Strobel, 2002). Some endophytic
68 fungi could promote the accumulation of secondary metabolites (including important
69 medicinal components or drugs) originally produced by plants. These metabolites may be
70 produced by both of the host plants or/and endophytic fungi according to the references
71 surveyed (Shwab & Keller, 2008). However, several rare medicinal plants produce
72 important bioactive compounds to survive in unique environments and may host novel
73 and diverse fungal endophytes, and these have rarely been isolated and characterized
74 (Strobel, 2003; Pupo et al., 2006).

75 Natural resources, including fungal endophytes, are currently being explored for bioactive
76 substances including agrochemicals like plant growth-regulating substances and bio-
77 herbicides (Strobel et al., 2004). Compared to synthetic herbicides, natural herbicides are
78 reported to be environment friendly, biodegradable and less toxic (Phattanawasin et al.,
79 2007). Herbicide-resistant weeds are the main problem in weed control due to the number
80 of weed bio-types resistant to herbicides that constantly increases by the continuous use
81 of the same products for years (Green, 2014). Due to emergence of herbicide resistant
82 varieties and restriction towards use of synthetic herbicides, researchers are focusing on
83 natural products that may be developed as herbicides (Karthick & Aruna, 2012). Such
84 compounds could present a considerable potential as models for developing herbicides
85 with new modes of action (Cimmino et al., 2013; Varejão et al., 2013).

86 *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, is a medicinal plant known in Brazil as
87 dedaleiro, pacari or Mangava-brava. The leaves and stem bark are used in folk medicine
88 as wound healing, antipyretic, antidiarrhoeal, as well as in the treatment of gastritis,
89 ulcers, and cancer (Solon et al., 2000; Mundo & Duarte, 2007). Several pharmacological
90 studies involving extracts from *L. pacari* have shown antioxidant, antigenotoxic, anti-
91 inflammatory, analgesic, antiulcer, antimicrobial, and antidepressant like activities (Solon
92 et al., 2000; Rogerio et al., 2003, 2006, 2008a, 2008b, 2010; Lima et al., 2006, 2013;
93 Matos et al., 2008; Galdino et al., 2009; Silva-Júnior et al., 2010; Nascimento et al., 2011;
94 Pereira et al., 2011; Tamashiro-Filho et al., 2012). *L. pacari* can be found in Pantanal, a
95 unique tropical wetland area of Brazil, where it has been used as an excellent cicatrizing
96 and antiulcer, through the maceration of the stem bark (Neto, 2006).

97 **2. Materials and methods**

98 **2.1 Sample collection and isolation of fungal endophytes**

99 Specimens of *L. pacari* were collected in October 2014 at Pantanal Mato-grossense
100 (Brazil), in the region of Poconé (S16°22'10.9" W56°18'31.6"). Identification of *L.*
101 *pacari* was based on comparisons with the voucher specimen deposited at the herbarium
102 of the Institute of Biological Science (BHCB) of the Federal University of Minas Gerais,
103 Brazil (<http://sciweb.nybg.org/science2/IndexHerbariorum.asp>) under the code BHCB
104 173389. The collection of the plant material was carried out according to the Brazilian
105 biological diversity rules.

106 A total of 30 apparently healthy adult individuals of *L. pacari* were sampled. Three leaves
107 and 3 stem barks were obtained from each individual plant, placed in sterile plastic bags,
108 and stored for less than 24 h at 10 °C until the isolation of endophytic fungi. Five
109 fragments (approximately 0.5 cm long and 0.5 cm wide) of each leaf and bark were cut
110 using a flame-sterilised blade in a laminar flow hood. The tissue fragments were surface
111 disinfected by immersing in 70% ethanol (1 min) and 2% sodium hypochlorite (3 min),
112 followed by washing with sterile distilled water (2 min) (Carvalho et al., 2012). The
113 fragments were plated onto Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA; Difco,
114 USA) supplemented with 100 mg L⁻¹ chloramphenicol. The plates were incubated at 25
115 °C for up 60 days. To test the effectiveness of the surface sterilization, 100 µL of the final
116 rinsing water was plated on PDA medium and incubated under the same conditions.
117 Hyphal growth was monitored over an 8-week period. Using an aseptic technique,
118 endophytes were transferred to PDA contained in 60-mm Petri plates and photographed
119 after growth completion. The long-term preservation of filamentous fungal colonies was
120 carried out in cryotubes containing 15% sterile glycerol at -80 °C, and in sterile distilled
121 water at room temperature. All pure cultures of the endophytic fungal isolates were
122 deposited in the Culture Collection of Microorganisms and Cells of the Federal University
123 of Minas Gerais.

124 **2.2. Fungal identification**

125 The protocol for DNA extraction was described previously by Rosa et al. (2009). The
126 internal transcribed spacer (ITS) region was amplified with the universal primers ITS1
127 and ITS4 (White et al., 1990). Amplification of the ITS region was performed as
128 described by Rosa et al. (2009). Amplification of the b-tubulin (Glass and
129 Donaldson,1995) and ribosomal polymerase II genes (RPB2) (Houbraken et al., 2012)
130 were performed with the Bt2a/Bt2b and RPB2-5F-Pc/RPB2-7CR-Pc 7CR primers,
131 respectively, according to protocols established by Godinho et al. (2013). The obtained
132 sequences were analyzed with SeqMan P with Lasergene software (DNASTAR Inc.,
133 Madison, WI, USA), and a consensus sequence was obtained using Bioedit v. 7.0.5.3
134 software (Carlsbad, ON, Canada). Representative consensus sequences of fungal taxa
135 were deposited into GenBank (Table 1). To achieve species-rank identification based on
136 ITS, b-tubulin data and ribosomal polymerase B2, the consensus sequence was aligned
137 with all sequences from related species retrieved from the NCBI GenBank database using
138 BLAST (Altschul et al., 1997). Taxa that displayed query coverage and identities $\leq 98\%$
139 or an inconclusive taxonomic position were subjected to phylogenetic ITS, b-tubulin and
140 ribosomal polymerase B2-based analysis in comparison with sequences of type species
141 deposited in the GenBank database, with estimations conducted using MEGA Version
142 6.0 (Tamura et al., 2013). The maximum composite likelihood method was employed to
143 estimate evolutionary distances with bootstrap values calculated from 1000 replicate runs.
144 The information about fungal classification generally follows Kirk et al. (2008),
145 MycoBank (<http://www.mycobank.org>) and Index Fungorum
146 (<http://www.indexfungorum.org>) databases.

147 **2.3 Diversity, richness, dominance and distribution**

148 To quantify species diversity, richness and evenness, we used the following indices: (i)
149 Fisher's α , (ii) Margalef's and (iii) Simpson's. A rarefaction curve was calculated using
150 the Mao Tao index. All of the results were obtained with 95% confidence, and bootstrap
151 values were calculated from 1000 iterations. All diversity and similarity indices and
152 rarefaction curves calculations were performed using the software PAST, version 1.90
153 (Hammer et al., 2001).

154 **2.4 Preparation of fungal and plant extracts**

155 All fungal isolates were cultivated according to protocols established by Rosa et al.
156 (2013). Briefly, a five mm diameter plug of each fungus was placed on 20 mL of PDA
157 medium at the center of Petri dishes (90 mm diameter) and cultured for 15 days at 25 ± 2
158 °C (time enough to fungi to produce secondary metabolites). These fungal cultures were
159 lyophilized for 72 h, cut in small pieces and transferred to 150 mL glass tubes followed
160 by the addition of 50 mL of dichloromethane (Synth, Brazil). To compare the herbicidal
161 activity among endophytic fungal extracts and *L. pacari*, leaves and stems of each plant
162 specimens were collected, macerated with 50 mL of dichloromethane, and incubated for
163 15 days at 25 ± 2 °C. After 72 h at room temperature, the organic phase was filtered and
164 the solvent dried at room temperature. An aliquot of each dried extract was dissolved in
165 DMSO (Merck/USA) to prepare a 20 mg mL^{-1} stock solution, which was stored at -20
166 °C.

167 **2.5 Herbicide assay**

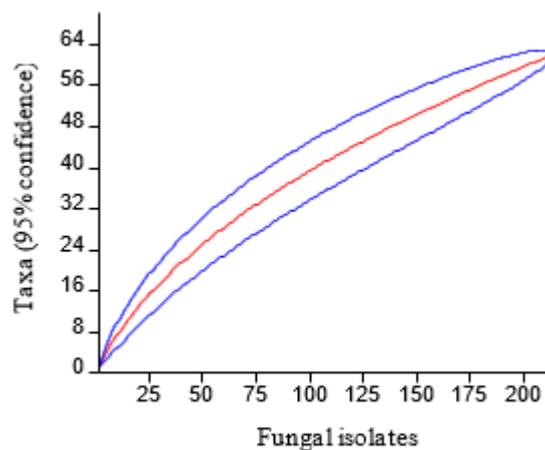
168 The herbicidal activities of fungal extracts at 1 mg mL^{-1} against *Lactuca sativa* (lettuce)
169 and *Allium schoenoprasum* (chive) were measured using methods according to Gomes et
170 al. (2018). Briefly, seeds of both plants were disinfected with ethanol 70% for 1 min,
171 sodium hypochlorite at 2 – 2.5% for 7.5 min, washed with sterilized distilled water four
172 times, and dried on sterilized filter paper at room temperature. Herbicidal activity was

173 quantitatively evaluated in 24-well microtiter plate by visually comparing the amount of
174 germination in each well between untreated and treat samples. Samples were incubated
175 at 26 °C in a germination incubator 710 (Thoth, Brazil) under continuous light conditions
176 for 10 days for *L. sativa* and 14 days for *A. schoenoprasum*. Test samples were dissolved
177 in acetone to a final concentration of 10% acetone. The control wells contained 400 µL
178 of deionized water. The control + solvent well contained 360 µL of water and 40 µL of
179 the solvent. Glyphosate at 3 mg mL⁻¹ (Sigma, USA) was used as a positive herbicide
180 control. All sample wells contained 360 µL of water and 40 µL of the appropriate dilution
181 of the sample. A quantitative estimate of herbicidal activity was evaluated using a rating
182 scale of 0–5, where 0 = no effect and 5 = no growth or no germination of the seeds. All
183 assays were performed in duplicate. All the extracts were evaluated in duplicate, and those
184 considered active were submitted to a retest to confirm the activity.

185 **3. Results**

186 Two hundred and thirty-six fungi were recovered as endophyte of *L. pacari*, and were
187 identified into 33 genera and 63 taxa of the Ascomycota, Basidiomycota and Zygomycota
188 phyla (Table 1). *Phyllosticta* sp. 1, *Pseudofusicoccum* sp., *Lasiodiplodia* sp. 1,
189 *Colletotrichum* sp.1 and *Aspergillus aculeatus* occurred in the highest frequency.
190 *Phyllosticta* was the most abundant genus with 59 endophytic isolates recovered only
191 from leaves. The taxa distribution in *L. pacari* tissue was as follows: seven taxa occurred
192 in both leaf and bark tissues, 39 were obtained only in the leaves, and 16 were only in the
193 bark. In addition, from the seeds were obtained only two taxa. Six fungal taxa presented
194 low molecular similarities or inconclusive information compared with known fungal
195 sequences deposited at GenBank, and were identified on the family or class levels and
196 may represent new species.

197 Among the total taxa identified, 28 (44.4%) occurred as singlets (occurrence of one
 198 isolate), including those of the genera, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*,
 199 *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Gloniopsis*, *Hypoxylon*, *Jattaea*,
 200 *Lasiodiplodia*, *Candida parapsiiosis* (*Candida albicans*/*Loderromyces* clade), *Mucor*,
 201 *Muscodor*, *Neofusicoccum*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phomatospora*, *Phyllosticta*,
 202 *Pseudozyma hubeienseis* e *Rassamsonia*. These taxa displayed a phylogenetic
 203 relationship with fungi obtained from different environments of the world.
 204 Additionally, the diversity indices of the endophytic fungal community displayed high
 205 values: Fisher $\alpha = 29.3$ (diversity), Margalef = 11.4 (richness), and Simpson = 0.91
 206 (dominance). The sample coverage was assessed using a rarefaction curve that represents
 207 number of species as a function of the number of samples (Fig 1), which did not reach an
 208 asymptote, indicating that not all of the diversity (species richness and species
 209 composition) was recovered.



210
 211
 212
 213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220 **Fig. 1** A species accumulation curve (Mao Tau = red lines) of the endophytic fungi
 221 associated with *Lafoensia pacari* A. St. Hil.

222 Among the extracts evaluated, 46 extracts represented by 19 fungal taxa and three plant
 223 extracts produced bioactive compounds with herbicidal activities (Table 2), when
 224 compared with the drug controls. The extracts from the taxa *A. aculeatus*, *Chaetomiaceae*

225 sp., *D. inconspicua*, *Diaporthe* sp. 4, *Lasiodiplodia* sp. 1, *Lasiodiplodia* sp. 2,
226 *Phyllosticta* sp. 1 e *Valsariaceae* sp. showed strong and selective herbicidal activity
227 against both monocotyledonous (*A. schoenoprasum*) and dicotyledonous (*L. sativa*)
228 targets. Thirteen extracts of *Beltroniella* sp., *Colletotrichum* sp. 2, *Diaporthe inconspicua*,
229 *Lasiodiplodia* sp. 1, *Lasiodiplodia* sp. 2, *Penicillium* sp. 4, *Phyllosticta* sp. 1, and from
230 leaves and bark of *L. pacari* presented moderate herbicidal activity (seed inhibition = 3
231 or 3.5).
232

Table 1. Molecular identification of endophytic fungi associated with *Lafoensia pacari* by sequence comparison with the BLASTn match with the NCBI GenBank database

UFMGCB ^a	Tissue ^b	N° of isolates	Top BLAST search results (GenBank accession number) ^c	Query cover (%)	Identity (%)	N° pf bp analyzed	Proposed species or taxonomic group
11306	L	1	<i>Alternaria destruens</i> (NR137143) ^d	100	100	451	<i>Alternaria</i> sp.
11413	L,B	9	<i>Aspergillus aculeatus</i> (NR111412) ^d	100	100	461	<i>Aspergillus aculeatus</i>
			<i>Aspergillus aculeatus</i> (HQ632667) ^e	100	98	315	
Lp2S1	S	1	<i>Aureobasidium thailandense</i> (JX462674) ^g	100	97	483	<i>Aureobasidium</i> sp.
11357	L	2	<i>Beltraniella acaciae</i> (NR147685) ^d	99	98	428	<i>Beltraniella</i> sp.
11271	L	3	<i>Botryosphaeria agaves</i> (NR111792) ^d	99	97	318	<i>Botryosphaeria</i> sp.
11430	B	1	<i>Arcopilus turgidopilosus</i> (KX976588) ^d	97	93	473	<i>Chaetomiaceae</i> sp.
11342	L	1	<i>Cladosporium welwitschiicola</i> (NR152308) ^d	100	100	429	<i>Cladosporium</i> sp.
			<i>Cladosporium psychrotolerans</i> (KJ596614) ^d	84	85	304	
11407	L, B	8	<i>Colletotrichum siamense</i> (NR144784) ^d	99	100	451	<i>Colletotrichum</i> sp. 1
			<i>Colletotrichum melanocaulon</i> (KX094290) ^d	100	99	344	
11352	L	1	<i>Colletotrichum aeshynomenes</i> (NR120133) ^d	100	99	413	<i>Colletotrichum</i> sp. 2
			<i>Colletotrichum melanocaulon</i> (KX094290) ^d	100	99	262	
11221	L	7	<i>Colletotrichum nupharicola</i> (NR120134) ^d	100	99	424	<i>Colletotrichum</i> sp. 3
11323	L	2	<i>Colletotrichum gigasporum</i> (NR145380) ^d	98	100	401	<i>Colletotrichum</i> sp. 4
11370	L	2	<i>Colletotrichum phyllanthi</i> (NR111698) ^d	100	100	404	<i>Colletotrichum</i> sp. 5
			<i>Colletotrichum karstii</i> (HM585428) ^e	99	100	331	
11290	L	2	<i>Colletotrichum citri-maximae</i> (KX943582) ^d	100	100	280	<i>Colletotrichum</i> sp. 6

UFMGCB ^a	Tissue ^b	N° of isolates	Top BLAST search results (GenBank accession number) ^c	Query cover (%)	Identity (%)	N° pf bp analyzed	Proposed species or taxonomic group
11339	L	1	<i>Coniothyrium multiporum</i> (NR111617) ^d	82	96	416	<i>Coniothyrium</i> sp.
11293	L,B	4	<i>Luteocirrhus shearii</i> (NR120254) ^d	83	96	376	<i>Cryphonectriaceae</i> sp.
			<i>Cryphonectriaceae</i> sp. (JQ862953) ^d	99	87	434	
11282	L	5	<i>Diaporthe velutina</i> (NR152470) ^d	99	99	544	<i>Diaporthe inconspicua</i>
			<i>Diaporthe inconspicua</i> (KC344091) ^e	86	100	408	
11291	L	5	<i>Diaporthe terebinthifolii</i> (NR111862) ^d	100	99	363	<i>Diaporthe</i> sp. 1
			<i>Diaporthe schini</i> (KC344159) ^e	89	97	421	
11343	L	4	<i>Diaporthe ocoteae</i> (KX228293) ^d	99	93	469	<i>Diaporthe</i> sp. 2
11235	F	1	<i>Diaporthe diospyricola</i> (KX777156) ^d	96	97	398	<i>Diaporthe</i> sp. 3
			<i>Diaporthe velutina</i> (KX999223) ^e	95	96	402	
11426	L,B	3	<i>Diaporthe middletonii</i> (NR147536) ^d	100	98	462	<i>Diaporthe</i> sp. 4
11244	L	1	<i>Diaporthe acericola</i> (NR152507) ^d	100	100	271	<i>Diaporthe</i> sp. 5
11295	L	2	<i>Diaporthe citri</i> (NR152507) ^d	100	94	371	<i>Diaporthe</i> sp. 6
11356	L	3	<i>Diaporthe baccae</i> (NR152458) ^d	99	94	420	<i>Diaporthe</i> sp. 7
			<i>Diaporthe inconspicua</i> (KC344091) ^e	83	100	415	
11317	L	1	<i>Diaporthe miriciae</i> (NR147535) ^d	100	99	403	<i>Diaporthe</i> sp. 8
			<i>Diaporthe passifloricola</i> (KX228387) ^e				
11378	L	1	<i>Paramycoleptodiscus albizziae</i> (NR145403) ^d	53	97	394	<i>Dothideomycetes</i> sp.
11314	L	1	<i>Fusarium pseudonygamai</i> (NR137162) ^d	100	100	423	<i>Fusarium</i> sp.
			<i>Fusarium sudanense</i> (KU603909) ^e	100	98	271	

UFMGCB ^a	Tissue ^b	N° of isolates	Top BLAST search results (GenBank accession number) ^c	Query cover (%)	Identity (%)	N° pf bp analyzed	Proposed species or taxonomic group
11381	L	1	<i>Gloniopsis calami</i> (KX669036) ^d	99	98	447	<i>Gloniopsis</i> sp.
11427	B	1	<i>Hypoxylon pulicidum</i> (JX183075) ^d	77	90	327	<i>Hypoxylaceae</i> sp.
11392	B	1	<i>Hypoxylon griseobrunneum</i> (KC968918) ^d	97	99	411	<i>Hypoxylon griseobrunneum</i>
11305	L	1	<i>Jattaea mookgoponga</i> (EU367449) ^d	98	96	429	<i>Jattaea</i> sp.
11394	L,B	15	<i>Lasiodiplodia subglobosa</i> (KF234558) ^d	98	100	422	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1
			<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (EU673111) ^e	99	99	401	
11397	L,B	8	<i>Lasiodiplodia parva</i> (KF766192) ^d	100	100	432	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 2
			<i>Lasiodiplodia parva</i> (EU673114) ^e	100	100	395	
11320	L	1	<i>Lasiodiplodia gonubiensis</i> (KF766191) ^d	99	99	419	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 3
11424	B	1	<i>Lasiodiplodia laeliocattleyae</i> (KU507487) ^d	100	100	425	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
			<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (EU673110) ^e	100	100	427	
Lp22C3	B	1	<i>Candida parapsilosis</i> (KY106650) ^g	100	99	551	<i>Lodderomyces (Candida) parapsilosis</i>
11379	L	1	<i>Atrocalyx bambusae</i> (NR153559) ^d	73	92	364	<i>Lophiotremataceae</i> sp.
11315	L	1	<i>Mucor ellipsoideus</i> (NR111683) ^d	100	100	510	<i>Mucor</i> sp.
11387	B	1	<i>Muscodor suthepensis</i> (JN558830) ^d	97	97	502	<i>Muscodor</i> sp.
11416	B	1	<i>Nemania primolutea</i> (EF026121) ^d	98	96	457	<i>Nemania</i> sp.
11206	L,B	5	<i>Neopestalotiopsis cocoes</i> (KX789687) ^d	99	100	401	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.

UFMGCB ^a	Tissue ^b	N° of isolates	Top BLAST search results (GenBank accession number) ^c	Query cover (%)	Identity (%)	N° pf bp analyzed	Proposed species or taxonomic group
11277	L	1	<i>Neofusicoccum kwambonambiense</i> (NR137014) ^d	95	99	408	<i>Neofusicoccum</i> sp.
11206	L,B	5	<i>Neopestalotiopsis cocoes</i> (KX789687) ^d	99	100	401	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.
11388	B	4	<i>Paecilomyces formosous</i> (FJ388929) ^d	99	97	479	<i>Paecilomyces</i> sp.
11438	B	1	<i>Penicillium diversum</i> (DQ308553) ^d	98	98	434	<i>Penicillium chrysogenum</i>
			<i>Penicillium chrysogenum</i> (JX996668) ^f	100	100	323	
11433	B	1	<i>Penicillium sanshaense</i> (NR153276) ^d	93	95	403	<i>Penicillium</i> sp. 1
11434	B	1	<i>Penicillium bilaiae</i> (JN714935) ^d	100	100	314	<i>Penicillium</i> sp. 2
11435	B	1	<i>Penicillium multicolor</i> (JN799647) ^d	100	99	420	<i>Penicillium</i> sp. 3
11436	B	1	<i>Penicillium viticola</i> (NR121209) ^d	100	99	409	<i>Penicillium</i> sp. 4
11355	L	1	<i>Penicillium citreosulfuratum</i> (KP016814) ^d	100	99	466	<i>Penicillium</i> sp. 5
11228	L	1	<i>Penicillium diversum</i> (DQ308553) ^d	100	99	386	<i>Penicillium</i> sp. 6
11432	B	2	<i>Penicillium wotroi</i> (NR119813) ^d	98	99	496	<i>Penicillium wotroi</i>
			<i>Penicillium wotroi</i> (GU981637) ^e	98	100	478	
11269	L	1	<i>Pestalotiopsis colombiensis</i> (KM199307) ^d	100	99	477	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
11380	B	1	<i>Phomatospora striatigera</i> (NR145386) ^d	100	92	461	<i>Phomatospora</i> sp.
11236	L	55	<i>Phyllosticta capitalensis</i> (NR144914) ^d	100	100	484	<i>Phyllosticta</i> sp. 1
11328	L	2	<i>Phyllosticta fallopieae</i> (NR147316) ^d	100	99	328	<i>Phyllosticta</i> sp. 2
11217	L	1	<i>Phyllosticta catimbauensis</i> (MF466160) ^d	86	97	472	<i>Phyllosticta</i> sp. 3
			<i>Phyllosticta raphiolepidis</i> (MF466160) ^e	94	96	277	

UFMGCB ^a	Tissue ^b	N° of isolates	Top BLAST search results (GenBank accession number) ^c	Query cover (%)	Identity (%)	N° pf bp analyzed	Proposed species or taxonomic group
11253	L	1	<i>Phyllosticta catimbauensis</i> (MF466160) ^d	85	100	418	<i>Phyllosticta</i> sp. 4
11340	L	2	<i>Preussia persica</i> (NR137730) ^d	96	98	447	<i>Preussia</i> sp.
11359	L	18	<i>Pseudofusicoccum adansoniae</i> (KF766220) ^d	100	98	435	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.
			<i>Pseudofusicoccum ardesiacum</i> (KX465069) ^e	100	98	377	
Lp16F1	L	1	<i>Pseudozyma hubeiensis</i> (KY108956) ^g	100	100	393	<i>Pseudozyma hubeiensis</i>
11377	L	1	<i>Rasamsonia brevistipitata</i> (NR119935) ^d	100	94	481	<i>Rasamsonia</i> sp.
11393	B	4	<i>Syncephalastrum monosporum</i> (NR138374) ^d	100	97	436	<i>Syncephalastrum</i> sp.
11384	L	2	<i>Trichoderma neokoningii</i> (NR138446) ^d	99	99	521	<i>Trichoderma</i> sp.
			<i>Trichoderma reesei</i> (CP016238) ^e	74	93	251	
11294	L	1	<i>Myrmaecium fulvoproinatum</i> (NR145390) ^d	100	87	515	<i>Valsariaceae</i> sp.

^aUFMGCB = Culture of Microorganisms and Cells from the Federal University of Minas Gerais. ^bTissue: L = leaf, B = bark and S =seed. ^cTop BLAST search results represent the first sequences matched with the endophytic fungi sequences of *Lafoensia pacari*. Taxa subjected to phylogenetic analysis based on the ^dITS1-5.8S-ITS2, ^e β -tubulin, ^fPolymerase II and ^gD1/D2 regions for elucidation of taxonomic positions.

233 4. Discussion

234 The diversity of the endophytic fungi associated with *Lafoensia pacari* was consistent
235 with the studies of endophytes from other medicinal plants from tropical areas (Sakalidis
236 et al., 2011; Carvalho et al., 2012; Vieira et al., 2014; Ferreira et al., 2017; Ribeiro *et al.*,
237 2018). The process for surface sterilization of leaves, stems and seeds was efficient and
238 inhibited the growth of epiphytic microorganisms. The most abundant genera were
239 *Phyllosticta*, *Lasiodiplodia*, *Pseudofusicoccum*, *Diaporthe* and the fungus *Aspergillus*
240 *aculeatus*.

241 In this study, the endophytic genus *Phyllosticta* was the most abundant (27.5%) in the
242 foliar tissue of *L. pacari*. Similarly, several authors showed that one or two species of
243 endophytes appear in high abundance in different host. Species of the genus *Phyllosticta*
244 are mostly plant pathogens of a wide range of hosts and are responsible for diseases
245 including leaf spots and black spots on fruits (Wulandari et al., 2009; Glienke et al., 2011;
246 Wang et al., 2012). However, many species of this genus are endophytic latent for a long
247 time, but they act as phytopathogens manifesting the disease when the host plant grows
248 under environmental conditions of stress (Rodriguez et al., 2004). All isolates of
249 *Phyllosticta* in the present study were obtained from leaf tissue. Similarly, *Phyllosticta*
250 endophytic species exhibited specificity for the leaves of 29 Chinese medicinal plants
251 (Huang et al., 2008), as well as for other medicinal plants such as *Tinospora cordifolia* in
252 India (Mishra et al., 2012) and *Echinaceae purpurea* in the United States (Carvalho et al.,
253 2016).

254 *Lasiodiplodia* represented 11.6% of the identified isolates, which occurs globally in
255 woody plants in tropical and subtropical areas and is better adapted to the environmental
256 conditions of these areas, where it has been associated with many diseases that affect
257 different plants (Punithalingam 1980; Cruywagen et al., 2017; Rodríguez-Gálvez et al.,

258 2017). The genus *Pseudofusicoccum* was the third most abundant with 8.4% of the
259 isolates identified, all of which were obtained exclusively from the leaf tissue. Sakalides
260 et al. (2011) studied the community of endophytic fungi present in different species of
261 baobabs in the northwest area of Australia and found *Lasiodiplodia* and
262 *Pseudofusicoccum* as the most common genera, among which the fungus *L. theobromae*
263 was the dominant endophytic for most of the area and species of trees sampled.
264 *Diaporthe* represented 11.6% of all isolates. The genus *Diaporthe*, teleomorphic stage of
265 *Phomopsis*, is composed of about 800 species, distributed worldwide in a wide variety of
266 hosts (Ribeiro et al., 2018). Specimens of the *Diaporthe-Phomopsis* complex may be
267 phytopathogenic, saprobic or endophytic symbionts (Gomes et al., 2013, Santos et al.,
268 2016). As endophytes the species are commonly found in association with medicinal
269 plants (Carvalho et al., 2012, Vieira et al., 2014, Silva-Hughes et al., 2015). Some
270 *Diaporthe* species may also be both endophytic and pathogenic, depending on the type
271 and health status of the host (Gomes et al., 2013).
272 *Aspergillus aculeatus* was obtained with high frequency. The genus *Aspergillus*
273 represents a diverse group of fungi which are amongst the most abundant fungi in the
274 world (Krijgsheld et al., 2012). *Aspergillus* is a filamentous, cosmopolitan and ubiquitous
275 fungus commonly found in soil, plant debris and indoor air environment, as well as one
276 of the most common endophyte found in association with terrestrial and marine plants
277 (Elkhayat et al. 2015, Tawfike et al., 2017). Recently, *A. aculeatus* was obtained as
278 endophytic from the leaf of the Egyptian medicinal plant *Terminalia laxiflora* (Tawfike
279 et al., 2017) and from the bark of a medicinal plant *Symphonia globulifera* in Cameroon
280 (Ateba et al., 2018).
281 We were unable to find any other report of endophytic fungi associated to plants of the
282 genus *Lafoensia*, and in relation to the Pantanal. Despite being a unique tropical wetland,

283 with a diversity of fauna and flora very peculiar, studies on its mycobiota are scarce
284 (Minter, 2010). The biodiversity and bioprospecting of endophytic fungi associated with
285 medicinal plants in Pantanal are still little explored. Hokama (2012) studied the
286 community of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Vochysia divergens*
287 present in Pantanal, which had similarities with the fungal community found for *L. pacari*
288 with predominance of *Dothideomycetes* class and *Phyllosticta* genus, which represented
289 53% of all the isolates. In the same study, the genera *Neofusicoccum*, *Cladosporium* and
290 *Pestalotiopsis* were obtained at low frequencies; and the presence of some genera in
291 common, e.g., *Diaporthe*, *Colletotrichum* and *Pseudofusicoccum*.

292 In this study, the community of endophytic fungi associated to *L. pacari* was found to be
293 rich, diverse, composed of high number of singlets, and included taxa known to be
294 mutualistic, saprobic, and parasitic. According to what is already known about the role of
295 endophytic fungi in helping host plants against biotic and abiotic environmental factors,
296 it can be inferred that these fungi are capable of contributing to survival, plant growth and
297 resilience to different forms of environmental stress.

298 Fourteen isolates displayed strong and selective herbicidal activity against both
299 monocotyledonous (*A. schoenoprasum*) and dicotyledonous (*L. sativa*) targets with 100%
300 inhibition of the seed. They were represented by the taxa *A. aculeatus*, *Chaetomiaceae*
301 sp., *Diaporthe* sp. 4, *D. inconspicua*, *Lasiodiplodia* sp. 1, *Lasiodiplodia* sp. 2,
302 *Phyllosticta* sp. 1 and *Valsariaceae* sp. Eight extracts from *Phyllosticta* showed activity
303 for both or only one of the seeds studied. Several phytotoxins, e.g., phyllosinol, have been
304 identified from *Phyllosticta* species (Wikee et al., 2011). Species of this genus have
305 frequently been isolated as endophytes and have been considered to be excellent sources
306 of novel lead structures (Rodrigues-Herrklotz et al., 2011). *Diaporthe* spp. are known as

307 producers of secondary metabolites with the potential for preventing herbivory and for
308 biological control of weeds (Ash et al., 2010; Andolfi et al., 2015).

309 Five isolates of *Aspergillus aculeatus* showed total inhibition of germination of both seeds
310 models, and two isolates selectively inhibited only chive seeds. In the *Penicillium* taxa,
311 four showed herbicidal activity, and *Penicillium* sp. 4 UFMGCB 11436 and *P. wotroi*
312 UFMGCB 11432 inhibited the germination of the seeds of both models used at the assay.

313 Khattak et al. (2014) have shown that crude extracts produced in ethyl acetate from
314 *Aspergillus* and *Penicillium* have phytotoxic potential to inhibit the growth of *Lemna*
315 *minor* (water lentil) and may also exert herbicidal activity by delaying seed germination
316 of the weed *Silybum marianum*. Zhang et al., (2013) isolated the compound brevianamide
317 F from the endophytic fungus *A. fumigatus* obtained from the bark of the medicinal plant
318 stem *Melia azedarach*. The compound was identified as a new class of a potential broad-
319 spectrum herbicide, which showed greater activity than the positive control of the
320 glyphosate herbicide. Brevianamide F also inhibited the turnip root (*Raphanus sativus*)
321 as well as strongly inhibited the growth of amaranth seedlings (*Amaranthus*
322 *mangostanus*).

Table 2. Herbicidal activities of extracts obtained from cultures of fungal endophytes species isolated from *Lafoensia pacari*.

UFMGCB ^a	Fungal species	Herbicidal activity		UFMGCB ^a	Fungal species	Herbicidal activity	
		<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>			<i>Lactuca sativa</i>	<i>Allium schoenoprasum</i>
11205	<i>Aspergillus aculeatus</i>	-	5 ± 0	11433	<i>Penicillium s</i> . 1	-	4 ± 1
11215	<i>Aspergillus aculeatus</i>	-	5 ± 0	11435	<i>Penicillium</i> sp. 3	-	5 ± 0
11369	<i>Aspergillus aculeatus</i>	5 ± 0	5 ± 0	11436	<i>Penicillium</i> sp. 4	3,5 ± 0,5	4,5 ± 0,5
11409	<i>Aspergillus aculeatus</i>	5 ± 0	5 ± 0	11432	<i>Penicillium wotroi</i>	5 ± 0	4,5 ± 0,5
11410	<i>Aspergillus aculeatus</i>	5 ± 0	5 ± 0	11250	<i>Phyllosticta</i> sp. 1	5 ± 0	5 ± 0
11412	<i>Aspergillus aculeatus</i>	5 ± 0	5 ± 0	11256	<i>Phyllosticta</i> sp. 1	-	5 ± 0
11413	<i>Aspergillus aculeatus</i>	5 ± 0	5 ± 0	11264	<i>Phyllosticta</i> sp. 1	-	5 ± 0
11357	<i>Beltroniella</i> sp.	3,5 ± 0,5	3,5 ± 0,5	11311	<i>Phyllosticta</i> sp. 1	3 ± 0	3 ± 0
11430	<i>Chaetomiaceae</i> sp.	5 ± 0	5 ± 0	11313	<i>Phyllosticta</i> sp. 1	3 ± 0	-
11207	<i>Colletotrichum</i> sp. 2	-	3 ± 0	11331	<i>Phyllosticta</i> sp. 1	-	3,5 ± 0,5
11221	<i>Colletotrichum</i> sp. 2	-	5 ± 0	11332	<i>Phyllosticta</i> sp. 1	-	4 ± 1
11316	<i>Colletotrichum</i> sp. 2	-	4 ± 1	11333	<i>Phyllosticta</i> sp. 1	-	4 ± 0
11237	<i>Diaporthe inconspicua</i>	-	4 ± 1	11294	<i>Valsariaceae</i> sp.	5 ± 0	5 ± 0
11245	<i>Diaporthe inconspicua</i>	3,5 ± 0,5	4,5 ± 0,5	11208	NI	5 ± 0	5 ± 0

11282	<i>Diaporthe inconspicua</i>	-	5 ± 0	11277	<i>Neofusicoccum</i> sp.	-	5 ± 0
11321	<i>Diaporthe inconspicua</i>	5 ± 0	5 ± 0	11270	NI	-	5 ± 0
11322	<i>Diaporthe</i> sp. 4	5 ± 0	5 ± 0	11279	NI	-	3 ± 0
11213	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1	5 ± 0	5 ± 0	11439	NI	5 ± 0	5 ± 0
11394	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1	5 ± 0	5 ± 0	Lp 1 folha	-	-	3 ± 0
11395	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1	-	3 ± 0	Lp 22 folha	-	-	3,5 ± 0,5
11399	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1	-	5 ± 0	Lp 29 casca	-	-	3 ± 0
11418	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1	-	4 ± 1	CN	-	0 ± 0	0 ± 0
11419	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 1	5 ± 0	5 ± 0	CP	-	5 ± 0	5 ± 0
11209	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 2	-	3 ± 0	CS	-	0 ± 0	0 ± 0
11397	<i>Lasiodiplodia</i> sp. 2	5 ± 0	5 ± 0				

^aUFMGCB = Culture of Microorganisms and Cells from the Federal University of Minas Gerais. The qualitative estimate of phytotoxicity was evaluated by using a rating scale of 0–5, where 0 = no effect and 5 = no growth or no germination of the seeds. Plant targets: *L sativa* = *Lactuca sativa* (lettuce), *A. schoenoprasum* = *Allium schoenoprasum* (chive).

323 Brazil is one of the largest consumers of agrochemicals in the world and among them
324 glyphosate is the most commercialized herbicide in the country (Brazil, IBAMA, 2018).
325 Glyphosate-based herbicides are currently among the most widely used agricultural
326 chemicals in the world (Gianessi & Reigner, 2006). The impacts of this class of herbicides
327 on modern farming practices are undeniable, for example, the development of resistant
328 crop varieties and environmental and ecological impacts (Gilbert, 2013). The use of
329 natural herbicides in place of traditional chemical herbicides can provide a large number
330 of environmental and socio-economic benefits as it could favor better environmental
331 management in order to reduce environmental and human health impacts as well as
332 control weeds that are resistant to current herbicides.

333

334 **References**

- 335 A. Alvin, K.I. Miller, B.A. Neilan, Exploring the potential of endophytes from medicinal
336 plants as sources of antimycobacterial compounds, *Microbiol. Res.* 169 (2014) 483–
337 495.doi:10.1016/j.micres.2013.12.009
- 338 Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J.H., Zhang, Z., Miller, W., Lipman,
339 D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search
340 programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- 341 Andolfi A, Boari A, Evidente M, et al. Gulopyrones A and Band Phomentrioloxins B and
342 C produced by *Diaporthe gulyae*, a potential mycoherbicide for saffron thistle
343 (*Carthamus lanatus*). *J Nat Prod.* 2015;78:623–629.
- 344 Ash GJ, Stodart B, Sakuanrungrasirikul S, et al. Genetic characterization of a novel
345 *Phomopsis* sp., a putative biocontrol agent for *Carthamus lanatus*.
346 *Mycologia.* 2010;102:54–61.33.

347 Ateba, J. E. T.; Toghueo, R. M. K.; Awantu, A. F.; Brice M. Mba'ning, B. M.; Gohlke,
348 S.; Sahal, D.; Rodrigues-Filho, E.; Tsamo, E.; Fabrice F. Boyom, F. F.; Sewald, N.; Lenta,
349 B. N. Antiplasmodial Properties and Cytotoxicity of Endophytic Fungi from *Symphonia*
350 *globulifera* (Clusiaceae). *J. Fungi*, 4(70), 2018.

351 Brasil, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. IBAMA. Acesso em 20/06/2018.
352 <http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>, 2018.

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

358 Carvalho. C. R., Wedge, D. E.; Charles L. Cantrell, C. L.; Silva-Hughes, A. F.; Pan, Z.,,
359 Moraes, R. M.; Victor L. Madoxx, V. L.; Rosa, L. H. Molecular Phylogeny, Diversity
360 and Bioprospecting of Endophytic Fungi Associated with wild Ethnomedicinal North
361 American Plant *Echinacea purpurea* (Asteraceae). 2016.

362 Cimmino A, Andolfi A, Zonno MC, et al. Phomentrioloxin, a fungal phytotoxin with
363 potential herbicidal activity, and its derivatives: a structure–activity relationship study. *J*
364 *AgricFood Chem.* 2013;61:9645–9649.

365 Cruywagen, E. M.; Slippers, B.; Roux, J.; Wingfield, M. J. Phylogenetic species
366 recognition and hybridisation in *Lasiodiplodia*: A case study on species from baobabs.
367 *Fungal biology* 121:420-436, 2017.

368 Dayan FE, Romagni JG, Duke SO (2000) Investigating the mode of action of natural
369 phytotoxins. *J Chem Ecol* 26:2079–2094. <https://doi.org/10.1023/A:1005512331061>
370 [doi:10.1016/j.biortech.2014.11.112](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.112)

371 Elkhayat, E. S.; Ibrahim, S. R.; Mohamed, G. A.; Samir A. Ross, S. A. Terrenolide S,
372 a new antileishmanial butenolide from the endophytic fungus *Aspergillus terreus*. Natural
373 Product Research, 2015.

374 Ferreira, M. C.; Cantrell, C. L.; Wedge, D. E., Gonçalves, V. N.; Jacob, M. R.; Khan, S.;
375 et al Diversity of the endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic
376 neotropical plant *Vellozia gigantea* from the endangered Brazilian rupestrian grasslands.
377 Biochem Syst Ecol, 71:163–169, 2017.

378 G.A. Strobel, Microbial gifts from the rain forest, Can. J. Phytopath. 24 (2002)14-20.

379 Galdino, P.M., Nascimento, M.V.M., Sampaio, B.L., Ferreira, R.N., Paula, J.R., Costa,
380 E.A., 2009. Antidepressant-like effect of *Laflorensia pacari* A. St.-Hil. ethanolic extract
381 and fractions in mice. J. Ethnopharmacol. 124, 581–585.

382 Gianessi LP, Reigner N. 2006. Pesticide use in u.S. Crop protection: 2002. Washington,
383 D.C.

384 Gilbert N. 2013. A hard look at GM crops. Nature 497: 24–26.

385 Glass, N.L., Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with
386 the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl. Environ.
387 Microbiol. 61, 1323-1330.

388 Glienke C, Pereira O, Stringari D, Fabris J, Kava–Cordeiro V, Galli–Terasawa L,
389 Cunnington J, Shivas R, Groenewald J, Crous PW (2011) Endophytic and pathogenic
390 *Phyllosticta* species, with reference to those associated with citrus black spot. Persoonia
391 26:47–56

392 Glienke, C.; Pereira, O.; Stringari, D.; Fabris, J.; Kava–Cordeiro, V.; Galli–Terasawa, L.;
393 Cunnington, J.; Shivas, R.; Groenewald, J.; Crous, P. W. Endophytic and pathogenic
394 *Phyllosticta* species, with reference to those associated with citrus black spot. Persoonia
395 26:47–56, 2011.

396 Godinho, V.M., Furbino, L.E., Santiago, I.F., Pellizzari, F.M., Yokoya, N.S., Pupo, D.,
397 Alves, T.M.A., Junior, P.A.S., Romanha, A.J., Zani, C.L., Cantrell, C.L., Rosa, C.A.,
398 Rosa, L.H., 2013. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with
399 endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *ISME* 7,1434-1451.

400 Gomes, E. C.; Godinho, V. M.; Silva, D. A. S.; Paula, M. T. R.; Vitoreli1, G. A.; Zani,
401 C. L.; Alves, T. M. A.; Junior, P. A. S.; Murta, S. M. F.; Barbosa, E. B.; Oliveira, J. G.;
402 Oliveira, F. S.; Carvalho, C. R.; Ferreira, M. C.; Rosa, C. A.; Rosa, L. H. Cultivable fungi
403 present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of
404 antiparasitic and herbicidal metabolites. *Extremophiles*, 2018. doi.org/10.1007/s00792-
405 018-1003-1

406 Gomes, R. R.; Glienke, C.; Videira, S. I. R.; Lombard, L.; Groenewald, J. Z.; Crous, P.
407 *W. Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*
408 31:1–41, 2013.

409 Green JM. Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. *Pest Manag Sci*.
410 2014;70:1351–1357.

411 Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: paleontological statistics software
412 package for education and data analysis. *Palaeontol Electron* 4:1–9

413 Hokama, Y. M. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE
414 *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae) DO PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE
415 E CONTROLE BIOLÓGICO DE *Phyllosticta citricarpa*. Dissertação de mestrado em
416 Gnética, Universidade Federal do Paraná, 2012.

417 Houbraken, J., Frisvad, J.C., Seifert, K.A., Overy, D.P., Tuthill, D.M., Valdez, J.G.,
418 Samson, R.A., 2012. New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of
419 section *Chrysogena*. *Persoonia* 29, 78-100.

420 Huang, W. Y.; Cai, Y. Z.; Hyde, K. D.; Corke, H.; Sun, M. Biodiversity of endophytic
421 fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity* 33:61–
422 75, 2008.

423 Karthick RN, Aruna A. 2012. Necrosis inducing herbicidal protein from cowpea
424 pathogenic isolate *Fusarium oxysporum* and its herbicidal activity against common weed
425 *Peporomia wightiana*. Global J Biosci Biotechnol. 1:248–252.

426 Khattak, S.U.; Iqbal, Z.; Lutfullah, G.; Bacha, N.; Khan, A. A.; Saeed, M.; Ali, M.
427 Phytotoxic and herbicidal activities of *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from
428 rhizosphere and soil. Pak J Weed Sci Res. 20:293–303, 2014.

429 Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A., 2008. Dictionary of the Fungi,
430 tenth ed. CAB International, Wallingford, U.K.

431 Krijghsheld P, Bleichrodt R, Veluw GJ, Wang F, Müller WH, Dijksterhuis J, Wösten HAB.
432 2012. Development in *Aspergillus*. Stud Mycol. 74:1–29.

433 Krijghsheld, P.; Bleichrodt, R.; Veluw, G. J.; Wang, F.; Müller, W. H.; Dijksterhuis, J.;
434 Wösten, Hab. Development in *Aspergillus*. Stud Mycol. 74:1–29, 2012.

435 Lima, D.C.S., Silva, C.R., Sampaio, B.L., de Paula, J.R., Chen-Chen, L., 2013.
436 Antigenotoxic, and anticytotoxic activities of an ethanolic extract of *Lafoensia pacari*
437 (Lythraceae) stem bark in bacteria and mice. Genet. Mol. Res. 12, 3887–3896.

438 Lima, M.R.F., Ximenez, E.C.P.A., Luna, J.S., Santana, A.E.G., 2006. The antibiotic
439 activity of some brazilian medicinal plants. Rev. Bras. Farmacogn. 16, 300–306.

440 Matos, L.G., Santos, S.R., Ferreira, R.N., Pontes, I.S., Paula, J.R., Costa, E.A., 2008.
441 Anti-inflammatory, antinociceptive and sedating effects of *Lafoensia pacari* aqueous
442 extract. Pharm. Biol. 46, 341–346.

443 microorganisms associated with plants, Biologia 62 (2007) 251–257.
444 doi:10.2478/s11756-007-0044-1

445 Minter, D. Fungi: the orphans of Rio. International Society for Fungal Conservation,
446 1(2):27-31, 2010.

447 Mishra, A.; Gond, S. K.; Kumar, A.; Sharma. V. K.; Verma, S. K.; Kharwar, R. N.;
448 Sieber, T. N. Season and tissue type affect fungal endophyte communities of the Indian
449 medicinal plant *Tinospora cordifolia* more strongly than geographic location. *Microb*
450 *Ecol.* 64(2):388-98, 2012.

451 Mundo, S.R., Duarte, M.R., 2007. Morfoanatomia Foliar e Caulinar de *Dedaleiro*:
452 *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae). *Lat. Am. J. Pharm.* 26, 522–529.

453 Nascimento, M.V.M., Galdino, P.M., Florentino, I.F., Sampaio, B.L., Vanderlinde, F.A.,
454 Paula, J.R., Costa, E.A., 2011. Antinociceptive effect of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil.
455 Independente of anti-inflammatory activity of ellagic acid. *J. Nat. Med.* 65, 448–454.

456 NETO, G. G. O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação
457 ambiental. *Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental - Universidade*
458 *Federal do Rio Grande*, 17, 2006.

459 Pereira, E.M.R., Gomes, R.T., Freire, N.R., Aguiar, E.G., Brandão, M.G.L., Santos, V.R.,
460 2011. *In vitro* antimicrobial activity of brazilian medicinal plant extracts against
461 pathogenic microorganisms of interest to dentistry. *Planta Med.* 77, 401–404.

462 Petrini O, Sieber TN, Toti L, Viret O (1992) Ecology, metabolite production, and
463 substrate utilization in endophytic fungi. *Nat Toxins* 1: 185–196. PMID: 1344919.

464 Phattanawasin P, Pojchanakom K, Sotanaphun U, Piyapolrunroj N, Zungsontiporn S.
465 2007. Weed growth inhibitors from *Aspergillus fischeri* TISTR 3272. *Nat Prod Res.*
466 21:1286–1291.

467 Punithalingam E. *Plant Diseases Attributed to Botryodiplodia theobromae*. J. Cramer,
468 Berlin, 1980.

469 Pupo, M. T. *et al.* Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds.
470 (In: Taft CA, editor. *Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry*. Kerala:
471 *Research Signpost*, p 51-78, (2006).

472 Ribeiro, A. S.; Polonio, J. C.; · Costa, A. T.; Santos, C. M.; Rhoden, S. A.; Azevedo, J.
473 L.; Pamphile, J. A. Bioprospection of Culturable Endophytic Fungi Associated with the
474 Ornamental Plant *Pachystachys lutea*. *Current Microbiology*, 2018.

475 Rodrigues-Heerklotz, K. F.; Drandarov, K.; Heerklotz, J.; Hesse, M.; Werner, C. *Helv.*
476 *Chim. Acta* 84, 3766–3772, 2001.

477 Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS (2009) Fungal endophytes: diversity
478 and functional roles. *New Phytol* 182:314–330. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x
479 PMID: 19236579

480 Rodriguez, R.; Redman, R.; Henson, J. The Role of Fungal Symbioses in the Adaptation
481 of Plants to High Stress Environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global*
482 *Change*, 9(3):261-272, 2004.

483 Rodríguez-Gálvez, E.; Guerrero, P.; Barradas, C.; Crous, P. W.; Alves, A. Phylogeny
484 and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru.
485 *Fungal biology*, 121:452-465, 2017

486 Rogerio, A.P., Fontanari, C., Borducchi, E., Keller, A.C., Russo, M., Soares, E.G.,
487 Albuquerque, D.A., Faccioli, L.H., 2008a. Anti-inflammatory effects of *Lafoensia pacari*
488 and ellagic acid in a murine model of asthma. *Eur. J. Pharmacol.* 580, 262–270.

489 Rogerio, A.P., Fontanari, C., Melo, M.C., Ambrosio, S.R., Souza, G.E., Pereira, P.S.,
490 Franca, S.C., Costa, F.B., Albuquerque, D.A., Faccioli, L.H., 2006. Anti-inflammatory,
491 analgesic and anti-oedematous effects of *Lafoensia pacari* extract and ellagic acid. *J.*
492 *Pharm. Pharmacol.* 58, 1265–1273.

493 Rogerio, A.P., Sá-Nunes, A., Albuquerque, D.A., Anibal, F.F., Medeiros, A.I., Machado,
494 E.R., Souza, A.O., Prado-Junior, J.C., Faccioli, L.H., 2003. *Lafoensia pacari* extract
495 inhibits IL- 5 production in toxocariasis. *Parasite Immunol.* 25, 393–400.

496 Rogerio, A.P., Sá-Nunes, A., Albuquerque, D.A., Soares, E.G., Faccioli, L.H., 2008b.
497 Anti-eosinophilic effect of *Lafoensia pacari* in toxocariasis. *Phytomedicine* 15, 348–357.
498 Rogerio, A.P., Sá-Nunes, A., Faccioli, L.H., 2010. The activity of medicinal plants and
499 secondary metabolites oneosinophilic inflammation. *Pharmacol. Res.* 62, 298–307.
500 Rosa LH, Queiroz SCN, Moraes RM, Wang X, Tehen N, Pan Z, Cantrell CL, Wedge
501 DE (2013) *Coniochaeta ligniaria*: antifungal activity of the cryptic endophytic fungus
502 associated with autotrophic tissue cultures of the medicinal plant *Smalanthus*
503 *sonchifolius* (Asteraceae). *Symbiosis* 60:133–142. [http s://doi. org/10.1007 /s131 99-013-](http://doi.org/10.1007/s13199-013-0249-8)
504 0249 -8
505 Rosa, L.H., Vaz, A.B.M., Caligiorne, R.B., Campolina, S., Rosa, C.A., 2009. Endophytic
506 fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia Antarctica* Desv. (Poaceae). *Polar*
507 *Biol.* 32, 161-167.
508 S. Firáková, M. Šturdíková, M. Múčková, Bioactive secondary metabolites produced by
509 SAKALIDIS, M. L.; HARDY, G. E. S.; BURGESS, T. I. Endophytes as potential
510 pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*: a focus on the Botryosphaeriaceae.
511 *Fungal ecology*, 4, 2011.
512 Santos, T. T.; Leite, T. S.; Queiroz, C B.; Araújo, E. F.; Pereira, O. L.; Queiroz, M. V.
513 High genetic variability in endophytic fungi from the genus *Diaporthe* isolated from
514 common bean (*Phaseolus vulgaris*L.). *J Appl Microbiol* 120:388–401, 2016.
515 Shwab, E. K., and Keller, N. P. (2008). Regulation of secondary metabolite production
516 in filamentous ascomycetes. *Mycol. Res.* 112,225–230. doi:
517 10.1016/j.mycres.2007.08.021
518 Silva-Hughes, A. F.; Wedge, D. E.; Cantrell, C. L.; Carvalho, C. R.; Panb, Z.; Moraes, R.
519 M.; Madoxxe, V. L.; Rosa, L. H. Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi

520 associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United
521 States. *Microbiological Research* 175:67–77, 2015.

522 Silva-Júnior, I.F., Raimondi, M., Zacchino, S., Cechinel Filho, V., Noldin, V.F., Rao,
523 V.S., Lima, J.C.S., Martins, D.T.O., 2010. Evaluation of the antifungal activity and mode
524 of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and
525 ellagic acid. *Braz. J. Pharmacogn.* 20, 422–428.

526 Solon, S., Lopes, L., Sousa-Junior, P.T., Schmeda-Hirschmann, G., 2000. Free radical
527 scavenging activity of *Lafoensia pacari*. *J. Ethnopharmacol.* 72, 173–178.

528 Strobel, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes infect.* 5, 535–544
529 (2003).

530 Strobel, G.; Daisy, B.; Castillo, U.; Harper, J. Natural products from endophytic
531 microorganisms. *J. Nat. Prod.* 2004, 67, 257–268.

532 Tamashiro-Filho, P., Olaitan, B.S., Almeida, D.A.T., Lima, J.C.S., Marson-Ascêncio,
533 P.G., Ascêncio, S.D., Rios-Santos, F., Martins, D.T.O., 2012. Evaluation of antiulcer
534 activity and mechanism of action of metanol stem bark extract of *Lafoensia pacari* A. St.-
535 Hil. (Lythraceae) in experimental animals. *J. Ethnopharmacol.* 144, 497–505.

536 Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular
537 evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.

538 Tawfike A. F.; Tate, R.; Abbott, G.; Young, L.; Viegelmann, C.; Schumacher, M.;
539 Diederich, M.; Edrada-Ebel, R. Metabolomic Tools to Assess the Chemistry and
540 Bioactivity of Endophytic *Aspergillus* Strain Biodiversity 14, e1700040, 2017.

541 Varejão EVV, Demuner AJ, Barbosa LCA, et al. The search for new natural herbicides –
542 strategic approaches for discovering fungal phytotoxins. *Crop Protec.* 2013;48:41–50

543 Vieira, M. L. A.; Johann, S.; Hughes, F. M.; Rosa, C. A.; Rosa, L. H. The diversity and
544 antimicrobial activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Baccharis*
545 *trimera* (Asteraceae) from the Brazilian savannah. *Can. J. Microbiol.*, 60:847-856, 2014.

546 Wang X, Chen G, Huang F, Zhang J, Hyde KD, Li H (2012) *Phyllosticta* species
547 associated with citrus diseases in China. *Fungal Divers* 52:209–224

548 Wang, X.; Chen, G.; Huang, F.; Zhang, J.; Hyde, K. D.; Li, H. *Phyllosticta* species
549 associated with citrus diseases in China. *Fungal Divers* 52:209–224, 2012.

550 White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal
551 ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *Protocols, P.C.R. (Ed.), A Guide to Methods*
552 *and Applications*, vol. 18. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 315-322.

553 Wikey, S.; Udayanga, D.; Crous, P. W.; Chukeatirote, E.; McKenzie, E. H. C.; Bahkali,
554 A. H.; Dai, D.; Hyde, K. D. *Fungal Divers*, 2011.

555 Wulandari NF, To–Anun C, Hyde KD, Duong L, De Gruyter J, Meffert J, Groenewald
556 JZ, Crous PW (2009) *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of
557 *Citrus maxima* in Asia. *Fungal Divers* 34:23–39

558 Wulandari, N. F.; To–Anun, C.; Hyde, K. D.; Duong, L.; De Gruyter, J.; Meffert, J.;
559 Groenewald, J. Z.; Crous, P. W. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan
560 spot of *Citrus maxima* in Asia. *Fungal Divers* 34:23–39, 2009.

561 X.G. Xie, C.C. Dai, Degradation of a model pollutant ferulic acid by the endophytic
562 fungus *Phomopsis liquidambari*, *Bioresour. Technol.* 179 (2015) 35–42.

563 Y. Wang, C.C. Dai, Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation,
564 and biodegradation, *Ann. Microbiol.* 61 (2011) 207–215. doi:10.1007/s13213-010-0120-
565 6

566 Zhang, Q.; Wang, S.Q.; Tang, H.Y.; Li, X.J.; Zhang, L.; Xiao, J.; Gao, Y.Q.; Zhang, A.L.;
567 Gao, J.M. Potential allelopathic indole diketopiperazines produced by the plant

- 568 endophytic *Aspergillus fumigatus* using the one strain-many compounds method. J. Agric.
569 Food Chem. 67:11447–11452, 2013.