

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COEBB – COORDENAÇÃO DO CURSO DE ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

LEANDRA KARPINSKI

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA PLANTA
MEDICINAL *Kalanchoe daigremontiana* E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO APLICADO A AGRICULTURA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO – PR

2021

LEANDRA KARPINSKI

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA PLANTA
MEDICINAL *Kalanchoe daigremontiana* E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO APLICADO A AGRICULTURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dra. Patricia Dayane Carvalho Schaker

TOLEDO – PR

2021

FOLHA DE APROVAÇÃO

LEANDRA KARPINSKI

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA PLANTA MEDICINAL
Kalanchoe daigremontiana E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO APLICADO A AGRICULTURA**

Data da aprovação, 27 de agosto de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o Dr. Cleverson Busso

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

Dra. Ane Stéfano Simionato

SUPERBAC BIOTECHNOLOGY SOLUTIONS

Prof^a Dra. Patricia Dayane Carvalho Schaker

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Luiz Carlos e Juliana, por serem aqueles que mais acreditaram em mim, apoiaram minhas decisões e me auxiliaram sempre que precisei. Nada disso seria possível sem vocês.

A minha orientadora, Patrícia Schaker, pela dedicação e comprometimento.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação e que de alguma forma deixaram seus ensinamentos. Em especial, a professora Priscila Vaz de Arruda, pelo incentivo, inspiração e principalmente por me proporcionar as primeiras oportunidades, as quais foram, sem dúvida, imprescindíveis para meu desenvolvimento durante esta jornada.

A Ane Simionato, pelos conselhos e disposição para me auxiliar sempre que precisei.

Aos meus amigos, pelas conversas e momentos especiais. Em especial, a minha melhor amiga e namorada, Isabelle, por estar sempre ao meu lado.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná, por me proporcionar a experiência da graduação e pela concessão do auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho, o qual foi de grande valia.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para minha formação e execução deste trabalho, e que não foram mencionados aqui, muito obrigada!

RESUMO

Microrganismos endofíticos são definidos como organismos que vivem e passam todo ou parte do seu ciclo de vida colonizando os tecidos inter e/ou intracelulares de plantas hospedeiras saudáveis, sem lhes causar qualquer dano aparente. Eles têm se tornado atrativos devido ao seu potencial para biossíntese de compostos de interesse biotecnológico, dentre os quais os fungos se destacam. A planta *Kalanchoe daigremontiana* é reconhecida pela produção de substâncias bioativas, e a exploração da sua microbiota endofítica ainda é incipiente, tornando-a fonte promissora para bioprospecção de linhagens microbianas. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi isolar fungos endofíticos de *K. daigremontiana*, e avaliar o potencial de controle de fitopatógenos e ensaios *in vitro*. Os isolados fúngicos endofíticos foram obtidos a partir de fragmentos de caule e raiz. Após o período de armazenamento em óleo mineral, os isolados viáveis promissores foram escolhidos por meio de testes de antagonismo *in vitro* e quantificação da inibição do crescimento dos fungos fitopatogênicos *Colletotrichum falcatum*, *Ceratocystis paradoxa*, *Sclerotinia sclerotiorum* e duas cepas de *Rhizoctonia solani*. A partir do crescimento em meio líquido dos isolados endofíticos selecionados foi realizada a extração líquido-líquido de metabólitos secundários, e testados quanto a sua bioatividade pela técnica de poço difusão contra os mesmos cinco fitopatógenos. A identificação dos isolados foi realizada por meio do sequenciamento da região do ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Foram obtidos 40 isolados, dentre os quais 45 % foram recuperados, e três se mostraram promissores para o controle de fitopatógenos, sendo identificados como *Penicillium citrinum*, *Curvularia trifolii/coatesiae* e *Stagonosporopsis sp.* Nos ensaios de antagonismo direto, obteve-se índices de inibição que variaram entre 17,89 e 33,36 % para *C. falcatum*; 5,56 a 12,89 % para *C. paradoxa*; 27,63 e 42,24 % contra *R. solani* (folha); 18,43 a 31,77 % contra *R. solani* (raiz) e 30,38 a 31,88 % contra *S. sclerotiorum*, sendo que o endofítico *C. trifolii* apresentou os melhores resultados. A bioatividade dos extratos obtidos a partir da extração líquido-líquido se apresentou discrepante dos ensaios de antagonismo direto, sendo os extratos de *P. citrinum* e *Stagonosporopsis sp.* com maior potencial, no geral, de inibição dos fitopatógenos. A partir deste trabalho foi possível ter acesso à parte da biodiversidade de fungos endofíticos de *K. daigremontiana* e abre-se possibilidades para o desenvolvimento de bioprodutos a partir do seu estudo, especialmente para a área agrícola.

Palavras-chave: Antagonismo. Metabólitos secundários. Controle biológico.

ABSTRACT

Endophytic microorganisms are defined as organisms that live and spend all or part of their life cycle colonizing the inter- and/or intracellular tissues of healthy host plants, without causing them any apparent harm. They have become attractive due to their potential for biosynthesis of compounds of biotechnological interest, among which fungi stand out. The plant *Kalanchoe daigremontiana* is recognized for the production of bioactive substances, and the exploration of its endophytic microbiota is still incipient, making it a promising source for bioprospecting of microbial strains. In this context, the objective of the present work was to isolate endophytic fungi from *K. daigremontiana* and evaluate their potential for phytopathogen control and *in vitro* assays. The endophytic fungal isolates were obtained from stem and root fragments. After the storage period in mineral oil, the promising viable isolates were chosen by *in vitro* antagonism tests and quantification of growth inhibition of the phytopathogenic fungi *Colletotrichum falcatum*, *Ceratocystis paradoxa*, *Sclerotinia sclerotiorum* and two strains of *Rhizoctonia solani*. From the growth in liquid medium of the selected endophytic isolates, liquid-liquid extraction of secondary metabolites was performed, and tested for their bioactivity by the diffusion well technique against the same five phytopathogens. The identification of the isolates was performed by sequencing the ITS (Internal Transcribed Spacer) region. Forty isolates were obtained, from which 45 % were recovered, and three showed promise for the control of phytopathogens, identified as *Penicillium citrinum*, *Curvularia trifolii/coatesiae* and *Stagonosporopsis sp.* In the direct antagonism assays, inhibition indexes were obtained that varied between 17.89 and 33.36 % for *C. falcatum*; 5.56 to 12.89 % for *C. paradoxa*; 27.63 and 42.24 % against *R. solani* (leaf); 18.43 to 31.77 % against *R. solani* (root) and 30.38 to 31.88 % against *S. sclerotiorum*, with the endophytic *C. trifolii* showing the best results. The bioactivity of the extracts obtained from the liquid-liquid extraction was discrepant from the direct antagonism assays, being the extracts of *P. citrinum* and *Stagonosporopsis sp.* with the greatest potential, in general, of inhibition of the phytopathogens. From this work it was possible to have access to part of the biodiversity of endophytic fungi of *K. daigremontiana* and it opens possibilities for the development of bioproducts from its study, especially for the agricultural area.

Keywords: Antagonism. Secondary metabolites. Biological control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema simplificado de possíveis interações e papéis da planta vs. endófito na produção de metabólitos e a contribuição dos respectivos organismos para outras vias metabólicas.....	16
Figura 2 - Hipótese que descreve os diferentes mecanismos responsáveis pela produção de metabólitos por fungos endofíticos e pela planta hospedeira.....	17
Figura 3 - <i>Kalanchoe daigremontiana</i>	21
Figura 4 - Fluxograma com um apanhado geral das etapas que serão realizadas neste trabalho.	23
Figura 5 - Placas-mãe do caule de <i>K. daigremontiana</i> . Placas de Petri contendo meio de cultura BDA suplementado com antibióticos, onde dispôs-se de 7 a 10 fragmentos de mesmo tamanho por placa.....	29
Figura 6 - Placas-mãe da raiz de <i>K. daigremontiana</i> . Placas de Petri contendo meio de cultura BDA suplementado com antibióticos, onde dispôs-se de 7 a 10 fragmentos de mesmo tamanho por placa.....	30
Figura 7 - Placas controle do caule e raiz. Placas de Petri contendo meio de cultura BDA não suplementado com antibióticos e inoculadas com água da última lavagem da desinfecção.	30
Figura 8 – Isolados endofíticos de <i>K. daigremontiana</i> recuperados após preservação em óleo mineral.....	32
Figura 9 - Antagonismo preliminar dos endófitos provenientes da preservação em óleo mineral contra o fitopatógeno <i>R. solani</i> (folha). As placas com bordas tracejadas foram selecionadas para os testes seguintes.....	33
Figura 10 - Antagonismo preliminar dos endófitos provenientes da preservação em óleo mineral contra o fitopatógeno <i>R. solani</i> (raiz). As placas com bordas tracejadas foram selecionadas para os testes seguintes.....	33
Figura 11 - Antagonismo preliminar dos endófitos provenientes da preservação em óleo mineral contra o fitopatógeno <i>S. sclerotiorum</i> . As placas com bordas tracejadas foram selecionadas para os testes seguintes.....	34
Figura 12 – Gráfico de índice de percentual de atividade antagonista dos endófitos selecionados.	36
Figura 13 - Antagonismo direto <i>in vitro</i> dos isolados 11, 22 e 24.	37
Figura 14 - Aspecto dos cultivos líquidos dos fungos endofíticos 11, 24, 22 e controle, da esquerda para a direita. Cultivo realizado em meio de cultura batata dextrose caldo sob condições de incubação de 28 °C e 150 rpm.....	40
Figura 15 - Ciclo morfológico de fungos filamentosos.....	41
Figura 16 - Aspecto dos extratos durante a extração com solvente acetato de etila.....	41
Figura 17 - Bioatividade dos extratos de acetato de etila de metabólitos secundários dos endófitos selecionados 11, 22 e 24.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Origem e identificação dos isolados.....	31
Tabela 2 - Identidade genética dos isolados após sequenciamento da região ITS	35

LISTA DE SIGLAS

ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
BDA	Batata dextrose ágar
BDC	Batata dextrose caldo
DMSO	Dimetil sulfóxido
BCA	<i>Biological control agent</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Objetivos	12
1.1.1	Objetivo Geral	12
1.1.2	Objetivos Específicos	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Microrganismos endofíticos	13
2.2	Fungos endofíticos associados a plantas medicinais	14
2.3	Metabólitos fúngicos com potencial biotecnológico	15
2.3.1	Aplicações na agricultura	18
2.3.1.1	Controle biológico	19
2.4	<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	21
2.4.1	Características gerais e morfológicas	21
2.4.2	Composição química	22
3	METODOLOGIA.....	23
3.1	Material vegetal	23
3.2	Desinfecção do material vegetal.....	24
3.3	Isolamento de fungos endofíticos e preservação das cepas.....	24
3.4	Reativação dos isolados preservados	25
3.5	<i>Screening</i> preliminar e seleção dos isolados	25
3.6	Avaliação da atividade antagonista dos isolados	26
3.7	Produção de metabólitos secundários.....	27
3.8	Extração líquido-líquido de metabólitos secundários	27
3.9	Avaliação da atividade antifúngica dos extratos	28
3.10	Identificação molecular dos isolados selecionados	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1	Isolamento e preservação de fungos endofíticos	29
4.2	Reativação dos isolados preservados	31
4.3	<i>Screening</i> preliminar e seleção dos isolados	32
4.4	Identificação dos fungos endofíticos selecionados	35
4.5	Avaliação da atividade antagonista dos isolados selecionados	36
4.6	Produção e extração de metabólitos secundários	40
4.7	Avaliação da bioatividade dos extratos metabólicos.....	42

REFERÊNCIAS	47
--------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

A procura por novos compostos ativos provenientes de seres vivos é uma prática muito antiga que perdura até os dias atuais. Contribuições da etnobotânica, ou ainda, descobertas como a da penicilina por Alexander Fleming em 1928 (BENNETT; CHUNG, 2001), foram referências importantes para que pesquisas deste gênero percorressem uma ascendente trajetória ao longo dos anos.

Dentre os seres vivos, tem-se nos fungos uma importante fonte de compostos bioativos, como ácidos orgânicos, álcoois, antibióticos, substâncias promotoras de crescimento vegetal, enzimas e aminoácidos. Tal versatilidade levou a exploração destes microrganismos para a produção de diferentes produtos de importância comercial aplicados a agricultura e indústria (YUVARAJ; RAMASAMY, 2020). Inseridos neste conjunto, estão os fungos endofíticos, que, devido ao seu habitat especial, oferecem um enorme potencial para novas substâncias com diversas propriedades passíveis de aplicações farmacêuticas, agrícolas entre outras.

Fungos endofíticos são microrganismos que vivem e passam todo ou parte do seu ciclo de vida colonizando os tecidos inter e/ou intracelulares de plantas hospedeiras saudáveis, sem lhes causar qualquer dano aparente (MANGANYIA et al., 2018). Eles caracterizam um grupo relativamente inexplorado, sendo importantes para fornecer informações fundamentais para a avaliação da diversidade e distribuição fúngica global (STONE; WHITE; POLISHOOK, 2004).

A associação endófito-hospedeiro constitui, no geral, uma simbiose benéfica para ambas as partes, onde o endófito fornece constituintes bioativos para ajudar seu hospedeiro a resistir a tensões bióticas e abióticas externas, além de beneficiar seu crescimento, e em troca recebe habitação e nutrientes em abundância (ZHAO, 2011). Essa interação é complexa e compreende diversos mecanismos, envolvendo transferência de genes e sendo mediada por diversos fatores, como região, condições climáticas e espécie do hospedeiro. Todas essas variantes permitem uma enorme gama de diferentes microrganismos e conseqüentemente de compostos de interesse ainda desconhecidos.

Um dos maiores desafios da atualidade se encontra na alta e crescente demanda de alimentos, onde práticas agrícolas se encontram sob pressão para fornecer produtividade melhorada a fim de alimentar a população global em crescimento, que é esperada atingir 9,7 bilhões em 2050 (LE COCQ et al., 2017). Em contrapartida, o fato de que cerca de 10 a 16 % da produção global de alimentos é reduzida devido a doenças vegetais em campo e pós-colheita se apresenta como um entrave a ser superado; se constituindo como uma ameaça à segurança

alimentar, especificamente em países em desenvolvimento (DE SILVA et al., 2019). Em complemento, ambos os estresses bióticos e abióticos impõem limitações que tornam as produtividades agrícolas imprevisíveis (LE COCQ et al., 2017).

Para diminuir as perdas relacionadas a estes obstáculos, são aplicados agroquímicos, como fertilizantes químicos e pesticidas (DE SILVA et al., 2019), sendo este último o modo mais popular de controle de diversos patógenos, mesmo com evidência irrefutável da nocividade destes produtos para humanos e ambiente, além de causar a proliferação de cepas patogênicas resistentes (KADDES et al., 2019). Desta forma, encontra-se no controle biológico uma alternativa viável e ambientalmente amigável, onde são empregados microrganismos entomopatogênicos e antagonistas para reduzir ou eliminar o uso de agroquímicos na agricultura (ANAMIKA et al., 2018).

O potencial para a aplicação de fungos como agentes de controle biológico contra fitopatógenos tem expandido, uma vez que estes organismos apresentam certas características favoráveis, como uma taxa de reprodução comparativamente alta, um tempo de geração baixo e o fato de que são alvo específicos. Além disso, na ausência do hospedeiro, eles podem sobreviver no ambiente através da transição de parasita para saprófito, mantendo, assim, sua viabilidade (THAMBUGALA et al., 2020). Desta forma, endófitos fúngicos se mostram como um potencial excepcional, uma vez que sua associação com o hospedeiro é normalmente conduzida sem causar sintomas de doença aparentes, além de fornecer benefícios no tocante a sobrevivência e condição física. Isso se dá por meio do melhoramento da resposta a estresses ambientais através de mecanismos como promoção de crescimento, alívio do estresse abiótico, biocontrole de pestes e patógenos vegetais e produção dos mesmos ou similares compostos originais do hospedeiro (ORTEGA; TORRES-MENDOZA; CUBILLA-RIOS, 2020).

Nesse contexto, o presente trabalho visa caracterizar o potencial de controle biológico aplicado a agricultura através da produção de metabólitos secundários de fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Kalanchoe daigremontiana*.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Isolar fungos endofíticos da planta *Kalanchoe daigremontiana* e caracterizar o potencial dos isolados em relação à produção de metabólitos com atividade antifúngica contra fitopatógenos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Obter isolados fúngicos endofíticos da raiz e caule de plantas adultas de *Kalanchoe daigremontiana*;
- Selecionar os isolados mais promissores por meio de testes de antagonismo direto *in vitro*, avaliando a capacidade de inibição de fitopatógenos de importância agrícola;
- Identificar a nível molecular os isolados mais promissores através da técnica de sequenciamento ITS (*primers* ITS1 e ITS4);
- Realizar a produção e extração líquido-líquido de metabólitos secundários extracelulares dos isolados selecionados;
- Avaliar a bioatividade dos metabólitos secundários obtidos contra os mesmos fitopatógenos testados nos ensaios de antagonismo direto *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Neste capítulo são abordados alguns conceitos importantes para melhor entendimento do trabalho, entre eles a definição de microrganismos e fungos endofíticos, metabólitos secundários associados a estes organismos e sua aplicabilidade, principalmente no que concerne o controle biológico de fitopatógenos fúngicos.

2.1 Microrganismos endofíticos

Microrganismos endofíticos são um fascinante grupo de organismos, composto por fungos e bactérias (GOUDA et al., 2016), que vivem associados a vários órgãos e tecidos de plantas terrestres e aquáticas, representando uma variada gama de ordens, famílias e gêneros, e uma diversificada matriz de habitats (BACON; WHITE, 2000).

Petrini (1991) define endófitos como todos os organismos que habitam as plantas em algum momento de sua vida, e que podem colonizar tecidos internos sem causar qualquer dano aparente a seu hospedeiro. Em geral, nesta associação, a planta tem papel de fornecer nutrição e proteção aos seus endófitos e, em contrapartida, os microrganismos endofíticos produzem metabólitos funcionais, compostos antimicrobianos ou toxinas, proporcionando uma melhor condição física, imunidade contra patógenos, resistência à seca e à herbivoria e aumento de captação de nutrientes, fatores que associados contribuem para a capacidade do hospedeiro em sobreviver em condições adversas e prosperar no ambiente (CLAY; SCHARDL, 2002; TAN; ZOU, 2001).

Durante o longo período de coexistência e processos evolutivos, foram estabelecidas diferentes relações entre endófitos e suas plantas hospedeiras, através de interações simbióticas, reconhecidas como mutualistas, antagonistas ou comensalistas (JIA et al., 2016; STROBEL; DAISY, 2003). Ainda, segundo Pirttilä e Frank (2018), um endófito pode se transformar em um patógeno dependendo das condições em que é submetido, ou tornar-se um saprófito após a morte de seu hospedeiro.

As comunidades endofíticas variam espacialmente na planta, e podem depender da interação com microrganismos patogênicos ou até mesmo com outros endófitos (RUBINI et al., 2005). O ecossistema no qual a planta está inserida também é uma variante, sendo os tropicais um grande reservatório de biodiversidade vegetal, e conseqüentemente da diversidade de endofíticos (HYDE; SOYTONG, 2008), o que implica em uma maior abundância química.

Desta forma, tem-se nesses ambientes a evidência dos endófitos como um enorme acervo de aplicações biotecnológicas, como potenciais agentes de controle biológico, fonte de novos metabólitos para a medicina ou proteção de plantas (BACON; WHITE, 2000).

2.2 Fungos endofíticos associados a plantas medicinais

Fungos endofíticos, ou micoendófitos, são os endófitos mais frequentemente isolados de plantas medicinais (RAI et al., 2012). Geralmente, ocupam tecidos acima do solo, como pecíolos, folhas, caules e cascas, tendo sua frequência de infecção influenciada pela idade da folhagem, distribuição do hospedeiro, e algumas condições ambientais como temperatura, umidade e iluminação (JIA et al., 2016; SINGH, 2019; STONE; WHITE; POLISHOOK, 2004). Usualmente, um hospedeiro abriga um ou mais endófitos, os quais podem se apresentar específicos para esse hospedeiro em particular (STONE; WHITE; POLISHOOK, 2004). No caso de plantas medicinais, isso está direta ou indiretamente envolvido na produção de fitoquímicos bioativos únicos (KOBBERL et al., 2013).

Segundo Moricca e Ragazzi (2008), tal especificidade exige uma longa adaptação evolutiva estreita entre micoendófito-hospedeiro, os quais acabam por desenvolver sistemas genéticos complementares. Desta forma, a relação fungo-planta é orientada por pequenas diferenças na expressão dos genes fúngicos em resposta ao hospedeiro, ou vice-versa. Ademais, tem-se que essa associação pode ser ativada através de mecanismos de transdução de sinais, onde algumas moléculas produzidas pelo hospedeiro atraem fungos presentes na rizosfera ou filosfera para se tornarem endofíticos (MAHESHWARI, 2017).

Essa complexa interação, mediada por tantos fatores, comporta uma rica fonte de novos compostos com inúmeras aplicações. Schulz, Boyle et al. (2002) apontam que os fungos endofíticos necessitam sintetizar metabólitos não só para competir com epífitos – microrganismos que colonizam o exterior da planta – e patógenos, mas também para regular o metabolismo do hospedeiro nesta equilibrada associação. Ainda, segundo Zhao, Zhou et al. (2010), tais microrganismos têm desenvolvido a habilidade de produzir as mesmas substâncias ou similares do que àquelas originadas de suas plantas hospedeiras, como é o famoso caso do paclitaxel (taxol), um diterpenoide amplamente utilizado no combate a diversos tipos de câncer, originalmente obtido da planta *Taxus brevifolia* e mais tarde descoberto a partir do seu fungo endofítico, *Taxomyces andreanae* (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993).

Diversos trabalhos têm demonstrado o enorme potencial advindo da associação entre fungos endofíticos e plantas medicinais (BEZERRA et al., 2015; HUANG et al., 2007; LIU; DOU; MA, 2016; THEANTANA; HYDE; LUMYONG, 2009). Ao estudar o potencial biológico de metabólitos de *Aspergillus fumigatus* isolado de *Melia azedarach*, Li et al. (2012) descobriram dois alcaloides indólicos, a fumiltremorgina e o verruculogeno, os quais demonstraram considerável ação inibidora do apetite para larvas de lagartas (*Mythimna separata*) (CANUTO et al., 2012). Al-Rashdi et al. (2020) isolaram dois fungos endofíticos da planta medicinal *Aloe dhufarensis* e constataram atividade antagonista contra os fitopatógenos *Fusarium sp.* e *Cladosporium sp.*

Wiyakrutta et al. (2004) obtiveram 581 isolados puros de 81 plantas medicinais tailandesas, e constataram que extratos de 92 destes inibiram *Mycobacterium tuberculosis*, seis foram eficazes contra *Plasmodium falciparum*; 60 eram ativos contra células de carcinoma epidermoide oral humano e 48 contra células cancerígenas da mama. Huang, Cai et al. (2008) classificaram 1160 isolados fúngicos isolados de 29 espécies de plantas medicinais e encontraram uma gama de metabólitos ativos, como alcaloides fenólicos, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, terpenoides fenólicos, quinonas, estilbenos e compostos alifáticos voláteis.

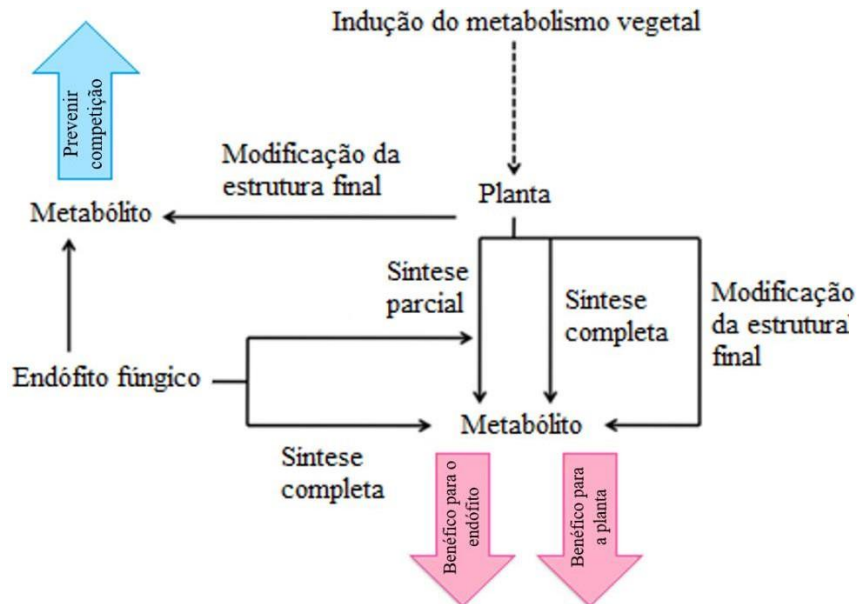
Além disso, constata-se que o número de metabólitos secundários produzidos por microendófitos é superior ao de qualquer outra classe de microrganismos endofíticos (ZHANG; SONG; TAN, 2006), e que oferecem a possibilidade de exploração comercial, visto que a fermentação de fungos endofíticos para produção de compostos bioativos possui produtividade viável, podendo ser cultivável em fermentadores e prover de forma inesgotável o produto de interesse (KAUL, 2012).

2.3 Metabólitos fúngicos com potencial biotecnológico

Metabólitos secundários são compostos de baixo peso molecular cuja produção se origina de uma adaptação a uma função específica na natureza (SINGH, 2019). Isto posto, é coerente que endófitos sejam excepcionais produtores desses compostos, uma vez que muitos deles habitam milhões de hospedeiros biologicamente singulares, e/ou que crescem em ambientes incomuns (VERMAA; KHARWARA; STROBEL, 2009).

A produção de metabólitos por endófitos é dentre outros fatores, mediada pela interação metabólica entre endófito-hospedeiro (Figura 1), onde um pode induzir o metabolismo do outro e vice-versa. Nesse contexto, o hospedeiro e endófito partilham partes de vias específicas; o endófito pode metabolizar substâncias secundárias do hospedeiro ou ainda, o hospedeiro pode metabolizar produtos do endófito e vice-versa (LUDWIG-MÜLLER, 2015), como por exemplo o caso do endófito produtor de camptotecina, cuja produção é dependente da enzima vegetal hospedeira strictosidina sintase - ausente no microrganismo - evidenciando que endófitos são capazes de utilizar uma ou mais enzimas das plantas hospedeiras para completar a biossíntese do produto final (KUSARI e SPITELLER, 2011). Além disso, sabe-se que ambos possuem vias de síntese similares em função da transferência de genes (WANG e DAI, 2011).

Figura 1 - Esquema simplificado de possíveis interações e papéis da planta vs. endófito na produção de metabólitos e a contribuição dos respectivos organismos para outras vias metabólicas.



Fonte: Adaptado de Ludwig-Müller (2015).

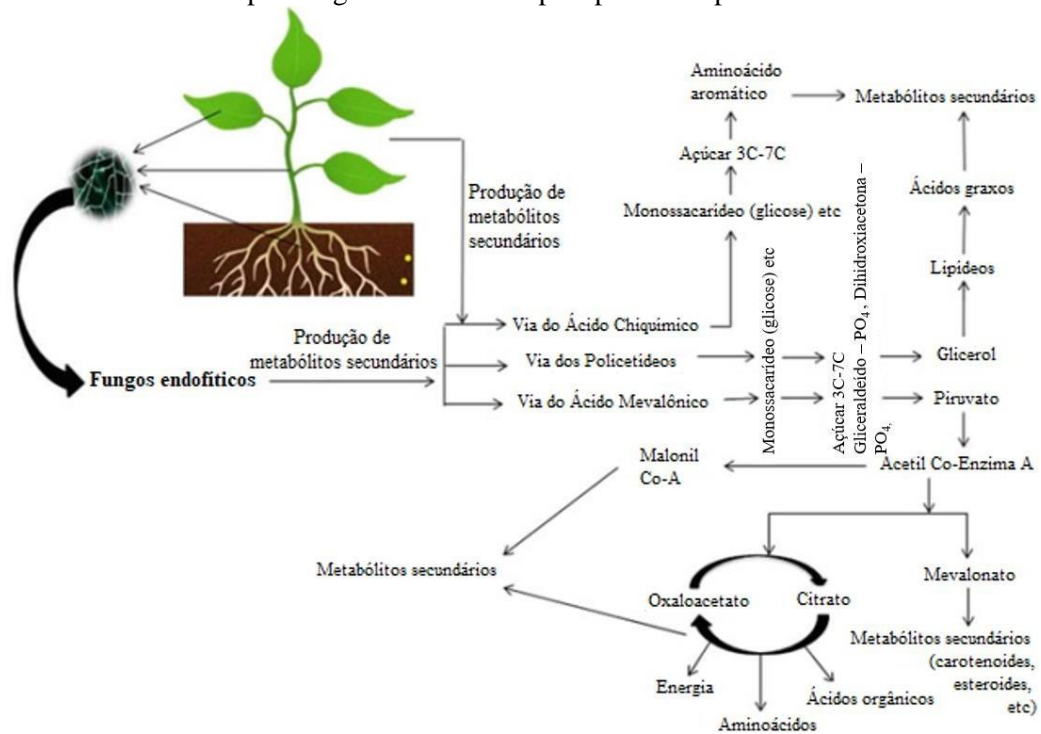
Distinto da maioria dos endófitos – que convergem sua produção em polissacarídeos, enzimas ou proteínas – os fungos endofíticos se destacam por serem os microrganismos que mais produzem metabólitos secundários (ZHANG; SONG; TAN, 2006). Além de seu potencial para descoberta de novas moléculas (SELIM et al., 2012), já foram isoladas de endófitos diversas classes de metabólitos, como alcaloides, peptídeos, terpenoides, compostos fenólicos, quinonas, quininos, flavonoides, esteroides, xantonas, isocumarinas, benzopirranonas, chiquimatos, isoprenoides, entre outros (ATIPHASAWORN et al., 2017; HARDOIM et al., 2015; MAHESHWARI et al., 2017; SINGH, 2019).

Em fungos endofíticos, foram identificadas três vias para produção desses compostos: a via do ácido mevalônico, a do ácido chiquímico e a dos policetídeos, sendo esta última a preferida entre a maioria dos fungos (MAHESHWARI, 2017; TURNER, 1976). Analogamente, tem-se que essas vias também são as responsáveis pela síntese de metabólitos secundários em plantas (SINGH, 2019).

De acordo com Garraway e Evans (1984), o acetil-CoA se apresenta como o precursor mais comum na via do ácido mevalônico, responsável principalmente pela síntese de terpenoides e esteroides (MAHESHWARI, 2017; SINGH, 2019). Em contrapartida, a via dos policetídeos, é uma das encarregadas da biossíntese de uma variedade de compostos aromáticos, além de ter seus produtos (policetídeos) por vezes interagindo com outros metabólitos de outras vias e gerando então novos metabólitos (MAHESHWARI, 2017).

Assim como a dos policetídeos, a via do ácido chiquímico também produz uma gama de compostos aromáticos (GARRAWAY; EVANS, 1984). Muitos aminoácidos aromáticos são produzidos através desta rota metabólica (SINGH, 2019), os quais, segundo Maheshwari (2017), desempenham papel de precursores na síntese de compostos mais complexos. A Figura 2 ilustra diferentes mecanismos de produção de metabólitos secundários por meio destas três vias.

Figura 2 - Hipótese que descreve os diferentes mecanismos responsáveis pela produção de metabólitos por fungos endofíticos e pela planta hospedeira.



Fonte: Adaptado de Maheshwari (2017).

Os metabólitos produzidos por micoendófitos possuem múltiplas aplicações, em especial na agroindústria, devido a sua atividade inseticida e antimicrobiana (LU et al., 2000; STRACQUADANIO et al., 2020; VINALE et al., 2017), promoção de crescimento vegetal (HWANG et al., 2011; KHAN et al., 2008b) e indução de resistência ao estresse (LEWIS, 2004). Estes compostos ainda apresentam importância na medicina humana, em função de suas propriedades antimicrobiana, anticancerígena, antioxidante, antireumática, antiviral, antidiabética, entre outras (MAHESHWARI et al., 2017; SINGH, 2019; ZHAO et al., 2010), e da sua baixa probabilidade de sintetizar produtos tóxicos, tendo em vista que tais microrganismos vivem em associação com hospedeiros eucarióticos (VERMAA; KHARWARA; STROBEL, 2009).

2.3.1 Aplicações na agricultura

Os fungos endofíticos possuem inúmeras potenciais aplicações e, embora a maioria dos estudos da associação entre eles e plantas medicinais seja voltado para uso clínico, muitas substâncias fúngicas apresentam atividades biológicas passíveis de exploração no campo da agricultura (CANUTO et al., 2012; VYAS; BANSAL, 2018). Tal premissa justifica-se no fato de que os endófitos fúngicos aumentam o crescimento de raízes e brotos da planta, melhoram a captação de nutrientes, aumentam a eficiência da fixação de nitrogênio, diminuem o estresse vegetal, diminuem a incidência de doenças e ainda melhoram a resistência através da produção de diversos compostos bioativos (GAUTAM; AVASTHI, 2019).

Vyas e Bansal (2018) apontam que tais microrganismos têm sido reportados por solubilizar fosfatos insolúveis e produzir hormônios promotores de crescimento vegetal, como citocininas, giberelinas e auxinas. Além disso, os metabólitos secundários advindos de fungos endofíticos possuem propriedades antifúngicas, antibacterianas e inseticidas, as quais inibem fortemente o crescimento de outros microrganismos, como patógenos vegetais (GAUTAM; AVASTHI, 2019). Dentre estes patógenos, tem-se nos fungos uma grande ameaça, principalmente no tocante à produção de alimentos e a estabilidade do ecossistema em todo o mundo. O uso extensivo de pesticidas químicos para o controle desses fitopatógenos resultou no surgimento de cepas resistentes. Desta forma, tem-se nos endófitos uma alternativa viável ao uso de pesticidas e fertilizantes químicos, uma vez que, com eles, é possível promover o crescimento vegetal e realizar o controle biológico de forma eficaz e segura (LIU; DOU; MA, 2016).

Diversos estudos têm comprovado estas declarações, como é o caso do trabalho de Li et al. (2012), onde os autores avaliaram o potencial de metabólitos de *Aspergillus fumigatus* isolado de *Melia azedarach* e descobriram dois alcaloides indólicos, fumitremorgina e verruculogeno, os quais apresentaram considerável ação inibidora do apetite para larvas de lagartas (*Mythimna separata*). Ou ainda o fracionamento bioguiado do extrato do endófito *Nigrospora sp.*, presente na raiz da planta medicinal moringa (*Moringa oleífera*), que resultou na obtenção de um composto denominado griseofulvina – um antibiótico comercial de uso clínico – o qual se mostrou ativo contra seis fungos fitopatogênicos: *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum orbiculare*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotium* (CANUTO et al., 2012). Ademais, no estudo de Surono e Narisawa (2017), os autores reportaram a capacidade do fungo endofítico *Phialocephala fortinii* em promover o crescimento vegetal de aspargos (*Asparagus officinalis*), provavelmente em razão da sua habilidade em mineralizar fontes orgânicas de nutrientes do solo, tornando-os assimiláveis.

2.3.1.1 Controle biológico

O termo biocontrole refere-se ao método sustentável onde antagonistas naturais reduzem a incidência de fitopatógenos que eventualmente podem causar danos a cultivares agrícolas (YADAV, 2017). O uso de fungos endofíticos como agentes de controle biológico (do inglês, BCAs) se mostra uma abordagem muito vantajosa, uma vez que a sua associação com plantas tem impacto direto no crescimento e desenvolvimento da espécie vegetal, afetando a performance do hospedeiro em termos de crescimento, morfologia, bioquímica e fisiologia (GAUTAM; AVASTHI, 2019).

Antagonismo é o mecanismo responsável pela inibição de organismos fitopatogênicos por meio da secreção de substâncias que interferem no ciclo de vida do microrganismo alvo (DE SILVA et al., 2019). Os antagonistas podem exibir mecanismos de ação diretos e indiretos, os quais estão envolvidos no controle biológico de doenças e proporcionam benefícios para a planta hospedeira. A inibição direta compreende a antibiose, competição e micoparasitismo, enquanto a indireta inclui a indução da resistência contra fitopatógenos intrínseca ao hospedeiro e o melhoramento do seu crescimento, onde os BCAs promovem o crescimento ao passo que os efeitos da doença são reduzidos, ou ainda por meio de hormônios, como os ácidos indol acético e giberélico (MEJÍA et al., 2008; THAMBUGALA et al., 2020).

Com relação aos mecanismos de inibição direta, tem-se que a antibiose é mediada por metabólitos específicos como enzimas, compostos voláteis e antibióticos não voláteis, os quais podem apresentar propriedades biocidas ou biostáticas, sendo capazes de suprimir ou reduzir o crescimento de fitopatógenos (MEJÍA et al., 2008; YASHAVANTHA RAO; CHANDRA MOHANA; SATISH, 2020). A competição, atividade antagonista altamente reportada em endófitos, é definida como a disputa entre tais organismos e fitopatógenos por espaço e nutrientes, como carbono, nitrogênio e ferro, sendo uma forma crucial de limitar a incidência de doenças e severidade, uma vez que estes compostos são necessários para uma germinação, penetração e infecção eficazes de células hospedeiras por patógenos (ABDALLAH; JABNOUN-KHIAREDDINE; DAAMI-REMADI, 2019). Ainda, distintos da competição e antibiose, alguns endófitos exibem hiperparasitismo. Esses organismos agem como micoparasitas, atacando o fungo patogênico da planta com o objetivo de interromper seu crescimento ou de matá-lo. *Trichoderma* é um dos mais populares exemplos de micoparasitismo. Ele detecta o patógeno fúngico antes mesmo de fazer qualquer tipo de contato e produz baixos níveis de uma quitinase extracelular, catalizando a descarga de oligômeros da parede celular do fungo alvo (GAUTAM; AVASTHI, 2019). Ademais, a secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares pelo antagonista e a desintoxicação de fatores virulentos são outros mecanismos envolvidos no controle biológico de doenças (THAMBUGALA et al., 2020).

Portanto, diversos trabalhos têm constatado o potencial de endófitos fúngicos no controle biológico de inúmeros patógenos de importância na agroindústria (LEYLAIE; ZAFARI, 2018; LIU; DOU; MA, 2016; TCHAMENI et al., 2020). Rabha, Naglot et al. (2014) demonstraram a potente atividade de um isolado de *Camellia sinensis*, identificado como *Colletotrichum gloeosporioides*, contra *Pestalotiopsis theae*, espécie fúngica causadora de uma doença foliar em *Camellia sinensis*, uma das principais culturas comerciais da região nordeste da Índia. Rubini, Silva-Ribeiro et al. (2005) obtiveram resultados expressivos ao isolar fungos endofíticos de ramos do cacau (*Theobroma cacao* L.), onde *Gliocladium catenulatum* foi capaz de inibir o fungo *Crinipellis pernicioso*, agente causador da doença do cacau conhecida como “vassoura de bruxa”, um dos maiores fatores limitantes da produção do cacau na América do Sul e ilhas caribenhas.

Além disso, Zhao, Mou et al. (2010), ao estudarem os metabólitos produzidos pelo fungo endofítico *Pichia guilhermondii*, isolado da planta medicinal *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*, identificaram o esteroide 5 α ,8 α -epidioxyergosta-6,22-dien-3 β -ol, o qual possui

atividade antifúngica já conhecida contra o fungo *Magnaporthe oryzae*, importante patógeno da cultura do arroz.

2.4 *Kalanchoe daigremontiana*

2.4.1 Características gerais e morfológicas

O gênero *Kalanchoe* compreende espécies nativas da África e Brasil, habitando diferentes regiões, que vão desde florestas tropicais até ambientes áridos (BOULOS, 1999; RAUH, 1973). A espécie *Kalanchoe daigremontiana* (Figura 3), comumente conhecida como “mãe de milhares”, é uma planta medicinal bienal, suculenta, nativa de zonas secas em Madagascar (KOLODZIEJCZYK-CZEPAS et al., 2016; ÜRMÉNYI, 2016; HERRERA; NASSAR, 2009).

Figura 3 - *Kalanchoe daigremontiana*.



Fonte: Acervo do autor (2019).

A suculenta *K. daigremontiana* é descrita como uma planta com propagação rápida e várias características adaptativas às condições ambientais adversas (WANG et al., 2018). Segundo Winter, Garcia e Holtum (2008), sua estrutura foliar exhibe tolerância surpreendente em ambientes secos e de altas temperaturas.

Tais atributos proporcionam a *K. daigremontiana* uma vantagem de dispersão e estabelecimento em espaços abertos (HERRERA; NASSAR, 2009), conferindo à espécie um potencial invasivo, perfil já estabelecido nos Estados Unidos e Porto Rico (RANDALL, 2002).

2.4.2 Composição química

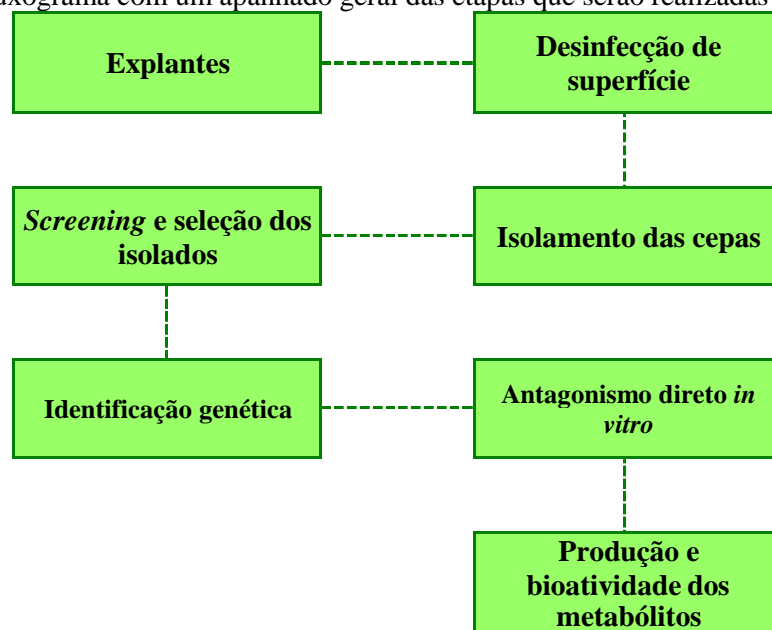
A composição química das espécies do gênero *Kalanchoe* é complexa, no entanto, muito interessante (KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS et al., 2016). Este gênero contém uma ampla gama de metabólitos secundários, em sua maioria terpenos, flavonoides, alcaloides, bufadienolídeos, glicosídeos, esteroides, saponinas, taninos, açúcares reduzidos e aminoácidos (ALBUQUERQUE; PATIL; MÁTHÉ, 2018). Tratando-se especificamente da espécie *K. daigremontiana*, ainda pouco estudada neste âmbito, já foram encontrados em seu conteúdo taninos, compostos fenólicos, terpenos, antocianinas e uma gama de bufadienolídeos (MEJÍA; GALLEGU; ARANGO, 2014; MONIUSZKO-SZAJWAJ et al., 2016; TAKAHAMA, 1993; ÜRMÉNYI, 2016).

Além disso, sabe-se que a espécie *K. daigremontiana* tem sido usada em tratamentos para ferimentos da pele, artrite, úlceras gástricas, ansiedade, alívio de tosse e vômito, tumores e doenças alérgicas e inflamatórias (KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS et al., 2016; MONIUSZKO-SZAJWAJ et al., 2016; ZHONG et al., 2013). Supratman et al. (2001) isolaram das folhas de *Kalanchoe daigremontiana x turbiflora* um composto denominado metil daigremonato, um bufadienolídeo inseticida, o qual apresentou atividade contra larvas de *Bombyx mori*. A atividade antimicrobiana dos extratos desta planta também já foi reportada, no entanto sem identificação dos compostos bioativos responsáveis (ÜRMÉNYI, 2016).

3 METODOLOGIA

De modo geral, realizou-se o isolamento de fungos endofíticos da planta *K. daigremontiana* e posterior análise de bioatividade contra fitopatógenos fúngicos. Para tal, realizou-se um *screening* preliminar a fim de selecionar os isolados mais promissores, os quais foram submetidos a ensaios de antagonismo direto *in vitro* e produção de metabólitos secundários, com o intuito de avaliar sua capacidade no tocante ao controle biológico dos mesmos fitopatógenos. A Figura 4 ilustra as etapas que foram efetuadas de maneira simplificada.

Figura 4 - Fluxograma com um apanhado geral das etapas que serão realizadas neste trabalho.



Fonte: Acervo do autor (2019).

3.1 Material vegetal

A coleta do material vegetal foi realizada no dia 07/01/2020 às 14h no campus da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) (24°43'57.788"S 53°45'52.243"W), localizada na cidade de Toledo – PR. Os dados climáticos para esta hora e dia, segundo o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) foram de temperaturas máxima e mínima iguais a 24 – 26°C e 24°C, respectivamente, e umidade relativa entre 70 e 80%.

Após a coleta, o material foi transportado assepticamente até o laboratório onde se sucedeu sua desinfecção.

3.2 Desinfecção do material vegetal

O intuito da desinfecção do material vegetal é a eliminação de microrganismos epifíticos. Esta se realizou em fluxo laminar previamente limpo. Inicialmente, lavou-se a planta em água corrente para remoção de qualquer sujeira e detritos. Desinfectou-se os explantes provenientes da raiz e caule utilizando a metodologia proposta por Maheshwari (2017), com modificações, a qual consistiu na lavagem do material em água destilada estéril durante 2 minutos, seguida de etanol 70% por 1 minuto e hipoclorito de sódio 2% por 20 minutos. Por fim, lavou-se as amostras três vezes com água destilada esterilizada e então secou-as em papel filtro estéril.

Em seguida, com auxílio de um bisturi previamente esterilizado, cortou-se os explantes obtidos de ambas as partes em fragmentos de mesmo tamanho e dispôs-se (de sete a dez fragmentos por placa), em sextuplicata, em placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) (Kasvi) suplementado com 600 µL de ampicilina (50 µg/mL) e 100 µL de tetraciclina (50 µg/mL) a fim de evitar o crescimento de bactérias endofíticas. Então, selou-se as placas com parafilme e incubou-se a 28 ± 1 °C durante sete a 14 dias, a fim de se observar a presença de culturas fúngicas ao redor dos fragmentos.

Para checar a eficácia da desinfecção da superfície da planta, inoculou-se 100 µL da água utilizada na última lavagem de cada fragmento (caule e raiz) no mesmo meio de cultura (sem adição dos antibióticos) e incubou-se sob as mesmas condições citadas anteriormente (BEZERRA et al., 2015).

As placas mãe foram nomeadas segundo código composto pela letra C ou R, a depender da origem do fragmento (“C” para caule e “R” para raiz), bem como pelo número da placa da sextuplicata (de 1 a 6). Por exemplo, a placa com código C.1 se refere a placa 1 cujos fragmentos são de origem do caule. Já os controles, foram nomeados como “controle raiz” e “controle caule”.

3.3 Isolamento de fungos endofíticos e preservação das cepas

A partir do crescimento fúngico observado nos explantes, realizou-se a técnica de esgotamento em meio de cultivo BDA, a fim de se obter isolados purificados. Performou-se esse procedimento com auxílio de alça de inoculação estéril e bico de Bunsen. Incubou-se os cultivos à 28 ± 1 °C, observando seu crescimento diariamente.

Após a obtenção dos microrganismos isolados, realizou-se a preservação em óleo mineral, conforme Ayala-Zerme et al. (2017), com modificações. Primeiramente, preparou-se meio de cultura BDA e transferiu-se 5 mL para tubos falcon de 15 mL, seguido de autoclavagem a 121 °C e 1 atm durante 30 minutos. Finalizada a etapa de esterilização, os tubos permaneceram inclinados 45 ° até completa solidificação do ágar. Posteriormente, em bico de Bunsen e com auxílio de alça de inoculação estéril, realizou-se o inóculo dos fungos, os quais foram incubados a 28 ± 1 °C por aproximadamente 3 dias ou até crescimento aparente. Cobriu-se as culturas maduras com aproximadamente 8 mL de óleo mineral estéril – autoclavado sob as mesmas condições anteriormente citadas – e armazenou-as em refrigerador a 4 °C.

3.4 Reativação dos isolados preservados

Para a reativação dos isolados preservados, realizou-se o repique das culturas estoque em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA, fazendo uso de bico de Bunsen e alça de inoculação estéril. A transferência foi desempenhada com a prudência de deixar o excesso de óleo mineral escorrer antes de inocular o fungo na placa, uma vez que tal excedente pode ser prejudicial para o crescimento do microrganismo. A incubação se deu em BOD a 28 ± 1 °C e observou-se seu crescimento diariamente.

3.5 Screening preliminar e seleção dos isolados

A fim de selecionar os isolados mais promissores, performou-se um *screening* preliminar, empregando-se o método de antagonismo direto, utilizando-se os fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, isolado da folha, *Rhizoctonia solani*, isolado da raiz e *Sclerotinia sclerotiorum*, cedidos gentilmente pelo Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina (UEL), em Londrina - PR. Uma vez que o número de isolados obtidos foi relativamente alto e a fim de otimizar o tempo e economizar materiais e reagentes, optou-se por testar apenas estes três fitopatógenos, tendo em vista que ambos se caracterizam por infectar uma ampla variedade de hospedeiros, dentre os quais se encontram inúmeras culturas de importância comercial (AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2018; LI et al., 2019). Desta forma, baseou-se na metodologia de Yun et al. (2018), com modificações. Em uma placa de Petri de 90 mm, contendo meio de cultura BDA, transferiu-se um *plug* de ágar de uma cultura recente de cada endófito e de cada fitopatógeno, dispendo-os em lados opostos da placa. Os controles

foram preparados tal qual os tratamentos, com a diferença de que não houve inóculo do endófito, apenas do fitopatógeno. Em seguida, incubou-se por aproximadamente 5 dias em BOD a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ as placas contidas de *R. solani* e *S. sclerotiorum*, respectivamente. Os ensaios foram conduzidos em duplicata.

Decorrido o tempo de incubação, analisou-se os isolados que, no geral, apresentaram maiores zonas de inibição contra os fitopatógenos e então selecionou-se os que aparentemente exibiram maior atividade antagonista.

3.6 Avaliação da atividade antagonista dos isolados

A capacidade de inibição dos endófitos selecionados foi testada contra cinco fitopatógenos: *R. solani* (folha) e *R. solani* (raiz), que ataca inúmeras espécies comerciais, como milho, arroz, trigo, cevada, soja, tabaco entre outras (AJAYI-OYETUNDE; BRADLEY, 2018); *S. sclerotiorum*, causador de várias doenças em culturas comerciais, tais como soja, grão de bico, feijão seco etc (LI et al., 2019); e patógenos da cana-de-açúcar, *Colletotrichum falcatum* e *Ceratocystis paradoxa* (FÁVARO; SEBASTIANES; ARAÚJO, 2012). Utilizou-se a técnica de antagonismo direto, segundo metodologia proposta por Sallam et al. (2021), com adaptações. Inicialmente, a fim de se obter culturas recentes para a execução dos antagonismos, incubou-se os endófitos, bem como os fitopatógenos, em meio de cultura BDA durante 5 dias a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ – com exceção de *S. sclerotiorum*, que foi mantida a $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Depois, inseriu-se discos de aproximadamente 8,0 mm do fitopatógeno e do endófito, dispostos em lados opostos e a uma distância de 20 mm da borda da placa de Petri (90 mm), contida de meio de cultura BDA. Realizou-se o ensaio em triplicata e o controle consistiu no inóculo apenas do disco do fitopatógeno na placa, sem a presença do micoendófito. Incubou-se as placas por 5 dias ou até a placa controle atingir o crescimento máximo, e na temperatura específica do fitopatógeno testado, ou seja, $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para os tratamentos com *R. solani*, *C. falcatum* e *C. paradoxa*; e $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ para *S. sclerotiorum*.

Calculou-se a porcentagem do índice de inibição (POLONIO et al., 2015), utilizando-se o software ImageJ (v. 1.46 r). Fotografou-se as placas de Petri e analisou-se suas áreas, comparando-se os valores entre os tratamentos e controles. Para o cálculo, fez-se uso da Equação 1, onde Im% é a porcentagem do índice de inibição do crescimento micelial, MT é a média da área da triplicata medida por tratamento (mm^2) e MC é a média da triplicata do controle (mm^2).

$$Im\% = \left(1 - \frac{MT}{MC}\right) \cdot 100 \quad (1)$$

3.7 Produção de metabólitos secundários

Para a obtenção de metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos selecionados, realizou-se o cultivo líquido em batata dextrose caldo (BDC) (LEE et al., 2008), utilizando-se batatas (200 g/L), dextrose (20 g/L) e água destilada. Ferveu-se as batatas em água destilada, filtrou-as e utilizou-se o caldo do cozimento para o preparo do meio de cultura.

O cultivo em meio líquido se deu de acordo com a metodologia proposta por Sharma, Pramanik e Agrawal (2016), com modificações. Inicialmente, a fim de se obter culturas recentes, realizou-se o repique dos fungos endofíticos a serem testados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e incubou-se a 28 ± 1 °C por 4 dias. Então, inoculou-se 3 discos de ágar de aproximadamente 8,0 mm em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura BDC cada e incubados em *shaker* orbital a 150 rpm e 28 ± 1 °C durante sete dias. Os ensaios foram conduzidos em triplicata. Também se realizou um cultivo controle, em duplicata, cujo preparo se deu conforme já citado, tendo como única diferença dos demais a ausência de inóculo.

3.8 Extração líquido-líquido de metabólitos secundários

Previamente a extração de metabólitos secundários e a fim de certificar a pureza dos cultivos líquidos, transferiu-se uma alíquota representativa do conteúdo de cada um dos frascos para uma placa de Petri contendo meio de cultura BDA, em duplicata, e incubou-se em BOD a 28 ± 1 °C durante aproximadamente cinco dias.

Para a obtenção do extrato bruto, baseou-se nas metodologias apresentadas por Simionato et al. (2017), Baazeem et al. (2021) e Sharma, Pramanik e Agrawal (2016). Inicialmente, com apenas dois dos isolados selecionados, centrifugou-se os cultivos líquidos a 6000 rpm por 20 minutos a 4°C, a fim de separar o micélio mais “grosseiro” do sobrenadante. Para atingir objetivo equivalente, com o terceiro isolado, optou-se por realizar uma filtração por gravidade convencional, devido a característica do crescimento fúngico, o qual se apresentou em pequenos *pellets*. Em seguida, armazenou-se os sobrenadantes obtidos em tubos Falcon em refrigerador a -20°C para posterior extração. Mais tarde, após conferência da pureza dos cultivos, descongelou-se os sobrenadantes em banho-maria a 30°C e realizou-se filtração a

vácuo com filtro de Buchner a fim de se remover qualquer possível resquício micelial remanescente nas amostras. Então, extraiu-se os metabólitos duas vezes através do uso do solvente orgânico etil acetato. Adicionou-se ao filtrado o dobro de volume de solvente, agitou-se por 10 minutos e aguardou-se 5 minutos até que se formassem duas fases visivelmente imiscíveis. A camada superior foi então extraída utilizando-se funil de separação, etapa que antecedeu a evaporação do solvente, ocorrida em rotaevaporador a 40°C. Logo após, dissolveu-se o extrato bruto em solução 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) obtendo-se uma concentração final de 50 mg/mL. Armazenou-se a solução a 4°C até sua utilização.

3.9 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos

A avaliação da atividade antifúngica dos metabólitos produzidos foi realizada com o emprego do teste de poço de difusão em ágar, conforme Fernando et al. (2020) e Stracquadiano et al. (2020), com adaptações. Em placas de Petri de 90 mm contidas de meio de cultura BDA, fez-se quatro poços de 7 mm equidistantes do centro da placa com o auxílio de uma ponteira estéril de 100 µL, onde inseriu-se, em cada um, 40 µL do extrato em quatro concentrações diferentes (0, 10, 25 e 50 mg/mL). O controle negativo foi representado pela solução de DMSO 10% (0 mg/mL de extrato). Então, transferiu-se para o centro da placa um disco de ágar de aproximadamente 8,0 mm de culturas recentes de *R. solani* (folha), *R. solani* (raiz), *S. sclerotiorum*, *C. falcatum* e *C. paradoxa*. A incubação das placas se deu a 28 ± 1 °C durante 3 dias, com exceção das contidas de *S. sclerotiorum*, cuja temperatura foi de 23 ± 1 °C. O ensaio foi conduzido em triplicata.

3.10 Identificação molecular dos isolados selecionados

Para a identificação a nível molecular dos isolados foi sequenciada a região do ITS (*Internal Transcribed Spacer*), utilizando os *primers* ITS1 e ITS4. A análise foi realizada pela empresa GoGenetic e as sequências obtidas foram comparadas com as depositadas em bancos de dados públicos para definição do gênero e/ou espécie.

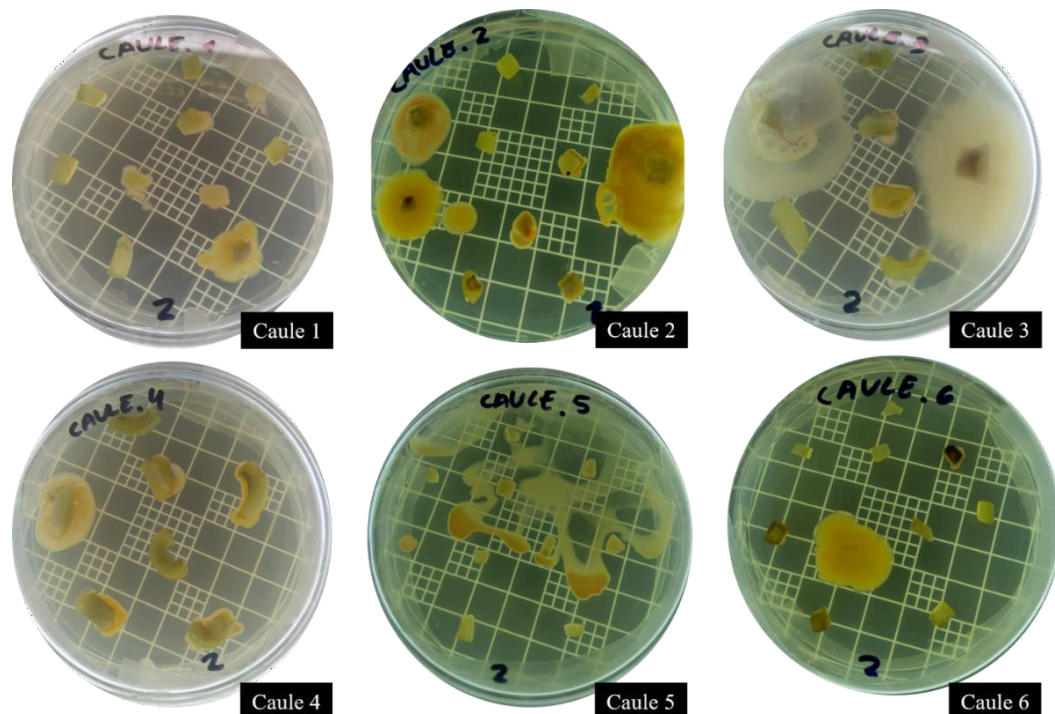
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são relatados os resultados obtidos a partir da metodologia adotada, bem como a investigação acerca destes resultados.

4.1 Isolamento e preservação de fungos endofíticos

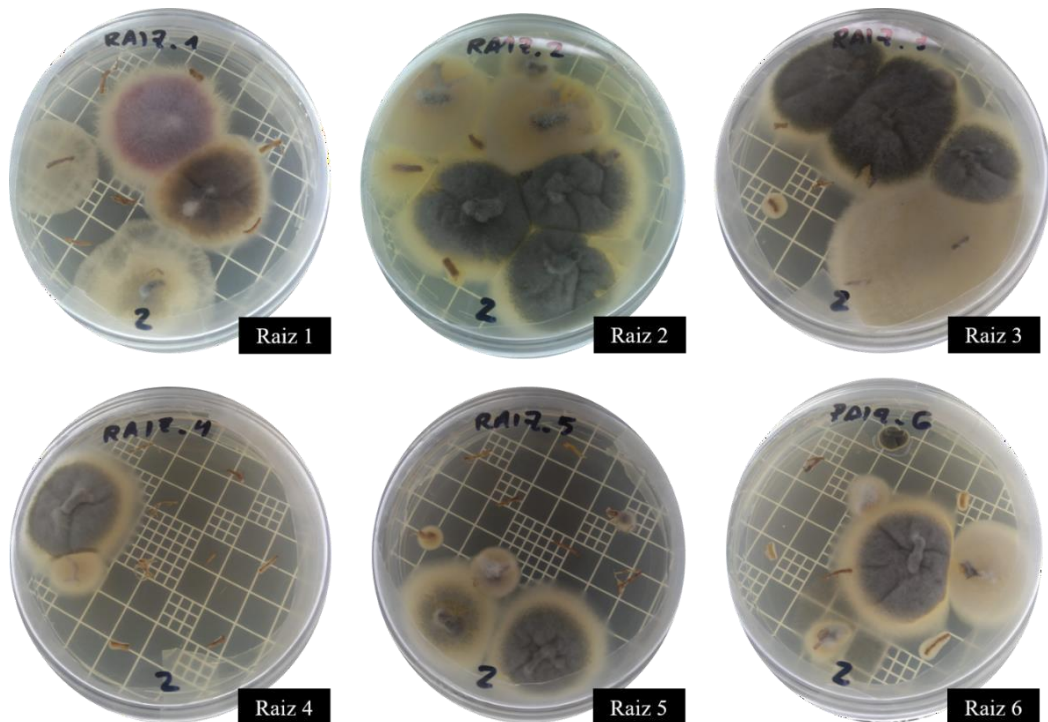
A incubação dos fragmentos do caule e raiz forneceu uma ampla diversidade de organismos, dentre eles fungos filamentosos e leveduras, como pode ser observado nas Figuras 5 e 6. Além disso, como ilustra a Figura 7, a desinfecção dos fragmentos vegetais se mostrou eficaz, uma vez que os controles não apresentaram nenhum crescimento microbiano. Todas as placas provenientes dos fragmentos da raiz (R.1, R.2, R.3, R.4, R.5 e R.6) foram retiradas da estufa após um período de 6 dias de incubação, juntamente com as intituladas Caule.1 (C.1), Caule.3 (C.3) e Caule.4 (C.4). As demais, Caule.2 (C.2), Caule.5 (C.5) e Caule.6 (C.6) foram retiradas após 14 dias de incubação.

Figura 5 - Placas-mãe do caule de *K. daigremontiana*. Placas de Petri contendo meio de cultura BDA suplementado com antibióticos, onde dispôs-se de 7 a 10 fragmentos de mesmo tamanho por placa.



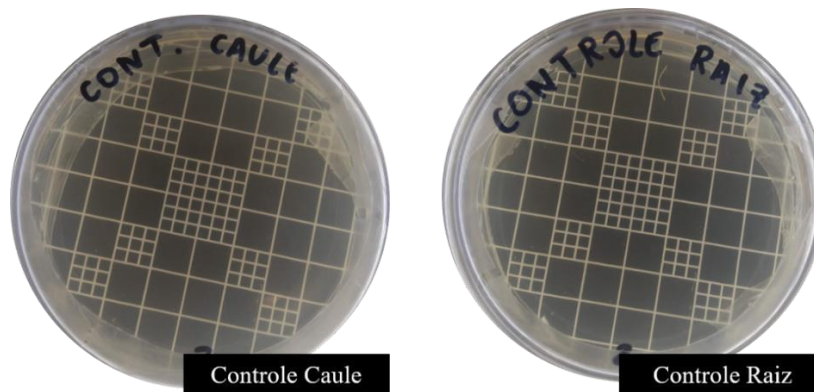
Fonte: Acervo do autor (2021).

Figura 6 - Placas-mãe da raiz de *K. daigremontiana*. Placas de Petri contendo meio de cultura BDA suplementado com antibióticos, onde dispôs-se de 7 a 10 fragmentos de mesmo tamanho por placa.



Fonte: Acervo do autor (2021).

Figura 7 - Placas controle do caule e raiz. Placas de Petri contendo meio de cultura BDA não suplementado com antibióticos e inoculadas com água da última lavagem da desinfecção.



Fonte: Acervo do autor (2021).

A partir destas placas-mãe e após repiques sucessivos, obteve-se, ao final do experimento, 40 isolados microbianos (Tabela 1). A maioria dos isolados teve origem proveniente da raiz de *K. daigremontiana*, assim como consta no trabalho de Sharma et al. (2021), que demonstraram uma frequência de 40,00 % de fungos endofíticos oriundos da raiz, seguido de caule (15,91 %) e folhas (7,14 %).

Tabela 1 - Origem e identificação dos isolados.

Origem	Isolado
C.1	30, 35, 40
C.2	15, 32, 34, 38
C.3	7, 19, 23, 25, 33, 39
C.4	31
C.5	36
R.1	13, 26, 29
R.2	3, 9, 10, 16, 20, 24, 27, 37
R.3	14, 21, 22
R.4	4, 18, 28
R.5	2, 5, 6, 8, 11, 12, 17
R.6	1

Fonte: Acervo do autor (2021).

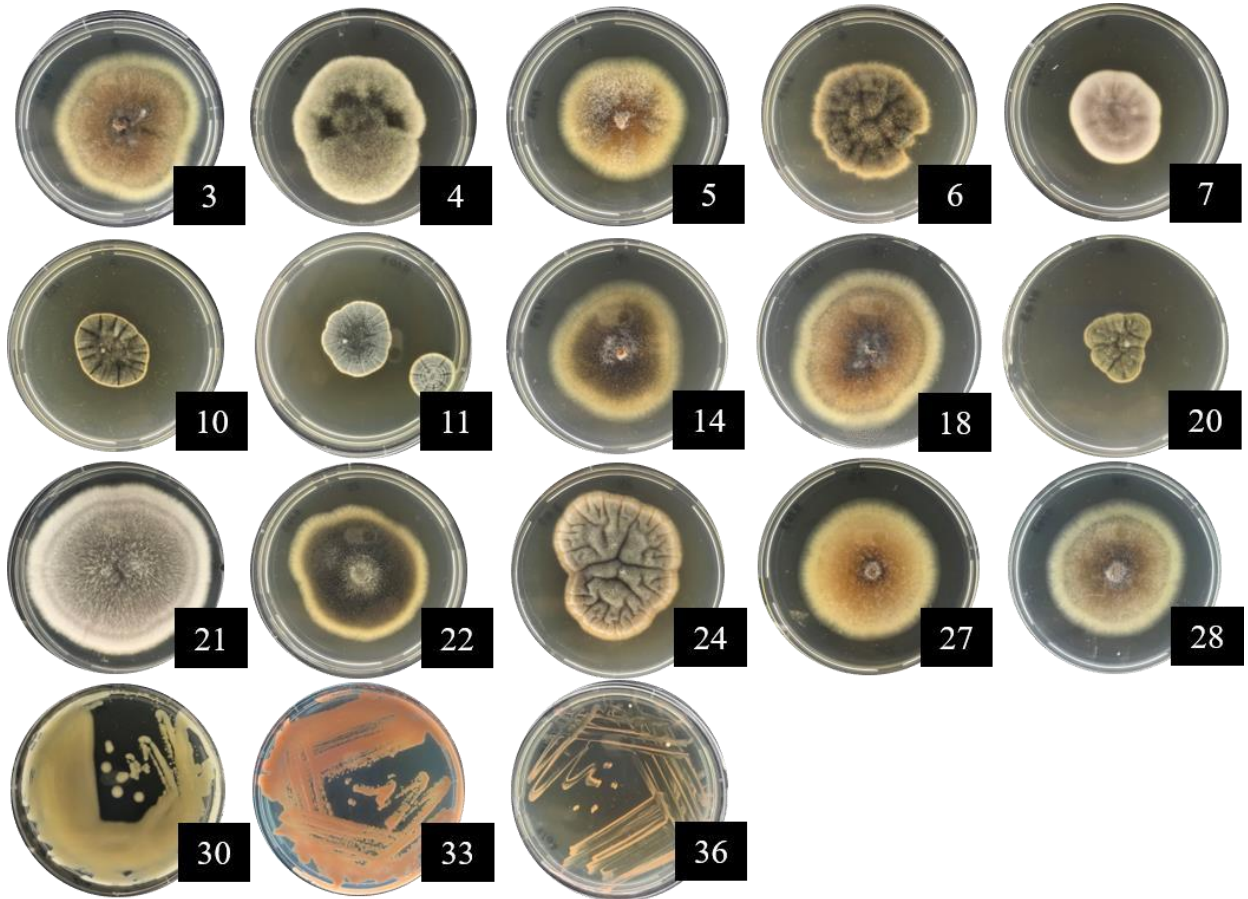
4.2 Reativação dos isolados preservados

Após aproximadamente 12 meses, foi possível a recuperação de 45 % dos isolados (18/40) os quais podem ser visualizados na Figura 8.

A baixa taxa de recuperação pode ser justificada pelo fato de que para a escolha do método de preservação, um dos fatores mais importantes a ser considerado é a espécie, uma vez que algumas técnicas se mostram eficazes para determinados microrganismos, enquanto para outros não, como mostram Iqbal et al. (2017). Tendo em vista que os isolados eram de identidade desconhecida, é possível sugerir que o método de preservação em óleo mineral não foi o ideal para alguns deles, o que acabou afetando a viabilidade de tais microrganismos. Além disso, com base no estudo de Da Silva, Borba e De Oliveira (1994), é plausível levantar a hipótese de que uma parte dos isolados se revelou mais sensível as condições de estresse proporcionadas pelo tipo de preservação, como microaerobiose ou acúmulo de substâncias no

meio, além de prováveis variações de temperatura que possam ter ocorrido ao longo do período de 12 meses.

Figura 8 – Isolados endofíticos de *K. daigremontiana* recuperados após preservação em óleo mineral.

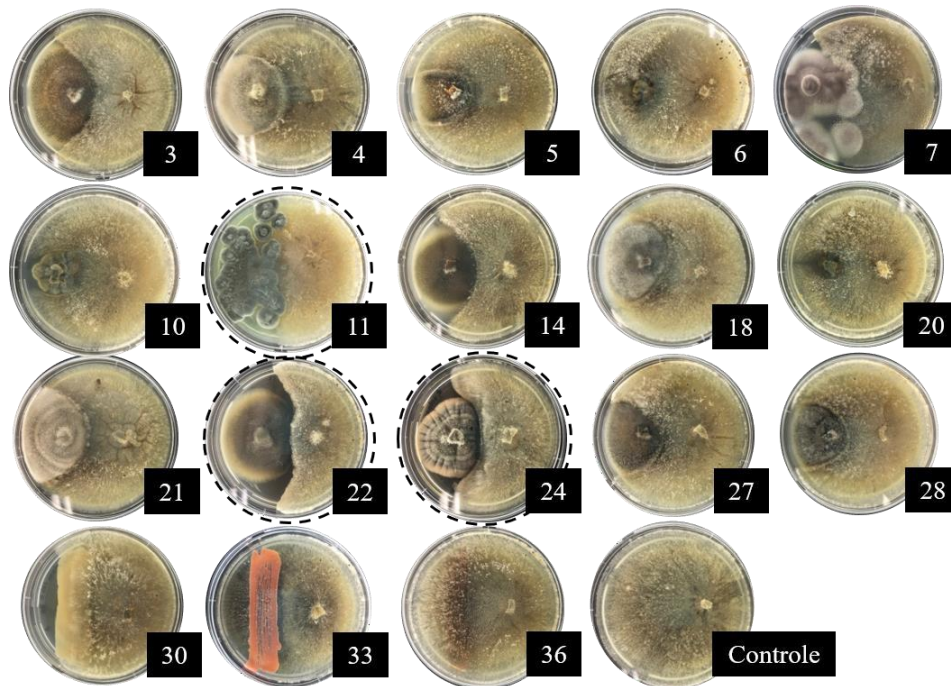


Fonte: Acervo do autor (2021).

4.3 *Screening* preliminar e seleção dos isolados

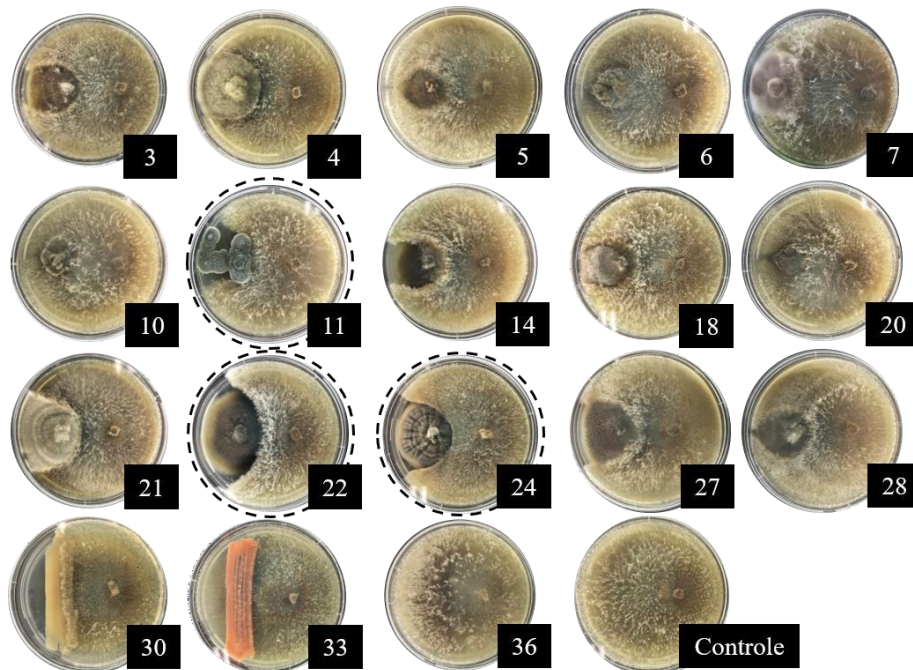
O objetivo do *screening* foi selecionar os isolados que apresentaram capacidades de inibição destacadas, principalmente com indicativo de antagonismo por antibiose, onde geralmente visualiza-se uma zona de inibição característica. Os resultados do ensaio preliminar de antagonismo podem ser visualizados nas Figuras 9, 10 e 11, onde é possível comparar os resultados obtidos entre todos os isolados, bem como visualizar os selecionados (em destaque pelas linhas pontilhadas).

Figura 9 - Antagonismo preliminar dos endófitos provenientes da preservação em óleo mineral contra o fitopatógeno *R. solani* (folha). As placas com bordas tracejadas foram selecionadas para os testes seguintes.



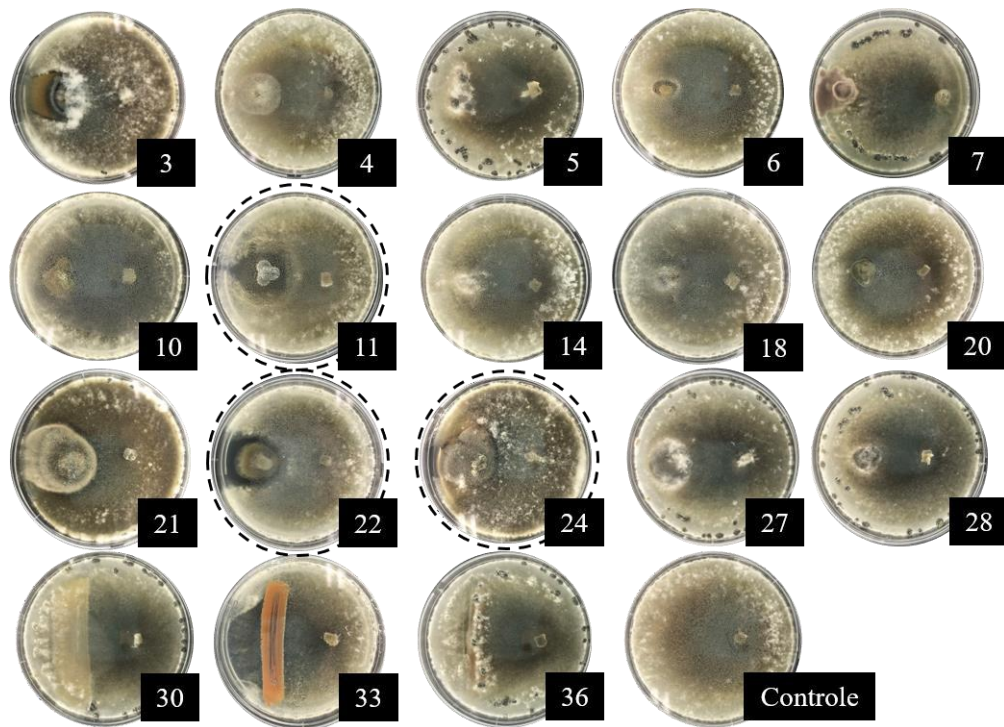
Fonte: Acervo do autor (2021).

Figura 10 - Antagonismo preliminar dos endófitos provenientes da preservação em óleo mineral contra o fitopatógeno *R. solani* (raiz). As placas com bordas tracejadas foram selecionadas para os testes seguintes.



Fonte: Acervo do autor (2021).

Figura 11 - Antagonismo preliminar dos endófitos provenientes da preservação em óleo mineral contra o fitopatógeno *S. sclerotiorum*. As placas com bordas tracejadas foram selecionadas para os testes seguintes.



Fonte: Acervo do autor (2021).

Tanto nos confrontos que constam as cepas de *R. solani* (Figuras 9 e 10) quanto nos associados a *S. sclerotiorum* (Figura 11), a maioria dos endófitos não demonstraram nenhum tipo de atividade antagonista. Os únicos isolados que apresentaram sinal indicativo de antibiose, ainda que branda, foram os intitulados 11, 22 e 24, contra todos os fitopatógenos, com exceção de *S. sclerotiorum* contra o endófito 24. Desta forma, obteve-se um percentual de efeito antagonista do tipo antibiose contra ambas as cepas de *R. solani* de 16,67 %, enquanto para *S. sclerotiorum*, de 11,11 %. Assim, foram selecionados para dar prosseguimento nas demais etapas, apenas os endófitos 11, 22 e 24, os quais demonstraram zonas de inibição características de antibiose para pelo menos um dos fitopatógenos testados.

O resultado obtido corrobora parcialmente com o encontrado por Huang et al. (2020), cujo trabalho demonstra que dentre 1044 fungos endofíticos, 17,8% e 35,5% apresentaram algum efeito antagonista contra *R. solani* e *S. sclerotiorum*, respectivamente. Tais índices discrepantes com relação a *S. sclerotiorum* podem supostamente estar relacionados a baixa temperatura de incubação – 23 °C – a qual possivelmente afetou o crescimento dos endófitos, tendo em vista que a maioria dos fungos filamentosos tem sua temperatura ótima a 25 °C ou acima (BAXTER; ILLSTON, 1980).

4.4 Identificação dos fungos endofíticos selecionados

A identificação genética a nível molecular dos isolados selecionados (11, 22 e 24) revelou três diferentes gêneros: *Penicillium*, *Curvularia* e *Stagonosporopsis*. A Tabela 2 mostra cada um dos isolados e seus prováveis táxons, bem como o nível de identidade encontrado em comparação com sequências depositadas em bancos de dados.

Tabela 2 - Identidade genética dos isolados após sequenciamento da região ITS.

Fungo endofítico	Nível de identidade (%)	Espécie
11	99	<i>Penicillium citrinum</i>
22	99	<i>Curvularia coatesiae/trifolii</i>
24	99	<i>Stagonosporopsis sp</i>

Fonte: Acervo do autor (2021).

O gênero *Penicillium* abriga várias espécies conhecidas e frequentemente encontradas em uma ampla variedade de habitats, como solo, ar, plantas e produtos alimentícios (HOUBRAKEN; FRISVAD; SAMSON, 2010). No que concerne a associação com plantas, já foram relatadas mais de 400 espécies de *Penicillium*, descritas como rizosféricas, filosféricas e endofíticas, dentre as quais *P. citrinum* caracteriza-se como uma das mais predominantes (YADAV et al., 2018). Além disso, a ocorrência de *P. citrinum* como endófito proveniente da raiz já foi reportada anteriormente (KHAN et al., 2008a; POSADA et al., 2007), dando respaldo ao detectado neste trabalho, uma vez que o endófito identificado como *P. citrinum* teve sua origem de um fragmento também da raiz.

Analogamente, espécies pertencentes ao gênero *Curvularia* são comumente isoladas do ar e solo, além de ambientes aquáticos (SAMUELS; SIVANESAN, 1989; TAN et al., 2018). Ademais, estudos já demonstraram a propriedade desses fungos em se manifestar como endofíticos, inclusive de plantas medicinais (KHIRALLA et al., 2015; REDMAN et al., 2002; VENKATACHALAM et al., 2014). Muitas das espécies de *Curvularia* ocorrem como fitopatógenos facultativos (KHIRALLA et al., 2018), como é o caso de *C. trifolii*, popularmente conhecido por causar manchas foliares em uma espécie de trevo (*Trifolium alexandrinum*) e ferrugem das folhas de *Agrostis palustres* (YUAN et al., 2020). No entanto, tanto *C. trifolii* quanto *C. coatesiae* já foram reportados como endófitos, sendo este último isolado da folha do dendezeiro (*Elaeis guineenses*), enquanto *C. trifolii* foi obtido de um líquene (*Usnea sp.*) e da

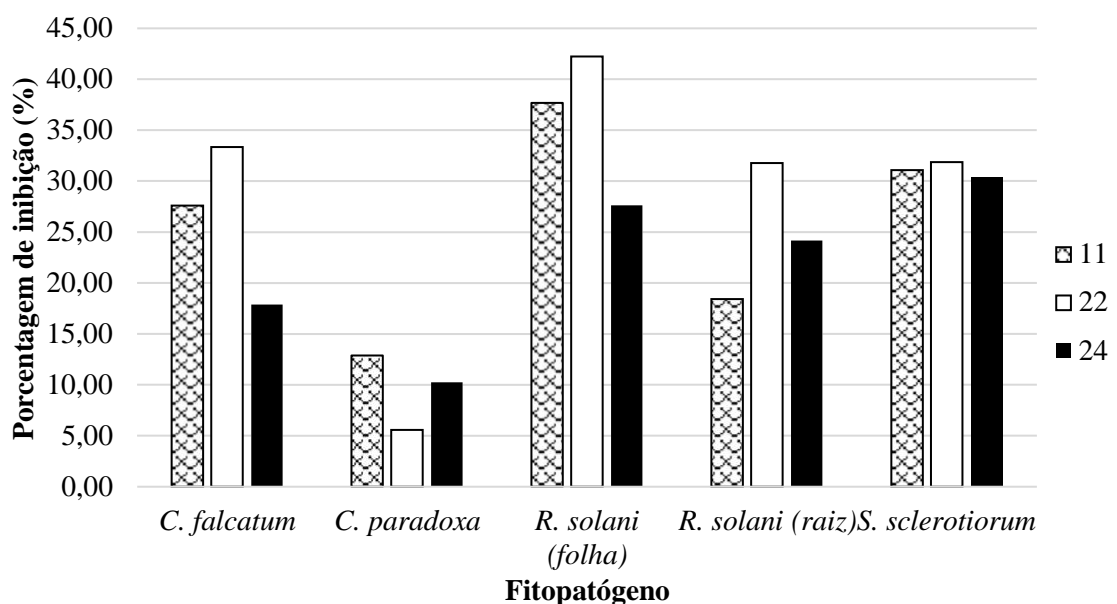
raiz da soja (ROTHEN et al., 2017; WICKRAMARACHCHI; WIJERATNE; PARANAGAMA, 2015; YURNALIZA et al., 2021).

O gênero *Stagonosporopsis* é reconhecido por abrigar diversas espécies fitopatogênicas. Ao mesmo tempo, inúmeras espécies aparecem relacionadas ao gênero diversificado denominado *Phoma*, cujos integrantes apresentam-se, em sua maioria, associados a plantas de alguma forma, inclusive endofiticamente (AVESKAMP; DE GRUYTER; CROUS, 2008; AVESKAMP et al., 2010; CARVALHO et al., 2016). Autores já constataram endófitos pertencentes ao gênero *Stagonosporopsis*, oriundos das folhas de diferentes hospedeiros, como *Bergenia ciliata* e *Rhizophora mucronata* (HAMZAH et al., 2018; PRASAI et al., 2021). Ainda, Arora et al. (2019) isolaram endófitos da raiz, caule e folhas de *Glycyrrhiza glabra* L. e atestaram a presença de um isolado de *Stagonosporopsis*, além de demonstrar a predominância do gênero *Phoma* na colonização das três partes do vegetal.

4.5 Avaliação da atividade antagonista dos isolados selecionados

A análise quantitativa do ensaio é apresentada em um gráfico (Figura 12), onde é possível verificar a capacidade de inibição dos isolados, bem como realizar estudo comparativo das atividades antagonistas relativas a cada endófito selecionado. Os antagonismos realizados podem ser visualizados na Figura 13, que revela o perfil de inibição associado a cada dupla (endófito vs. fitopatógeno).

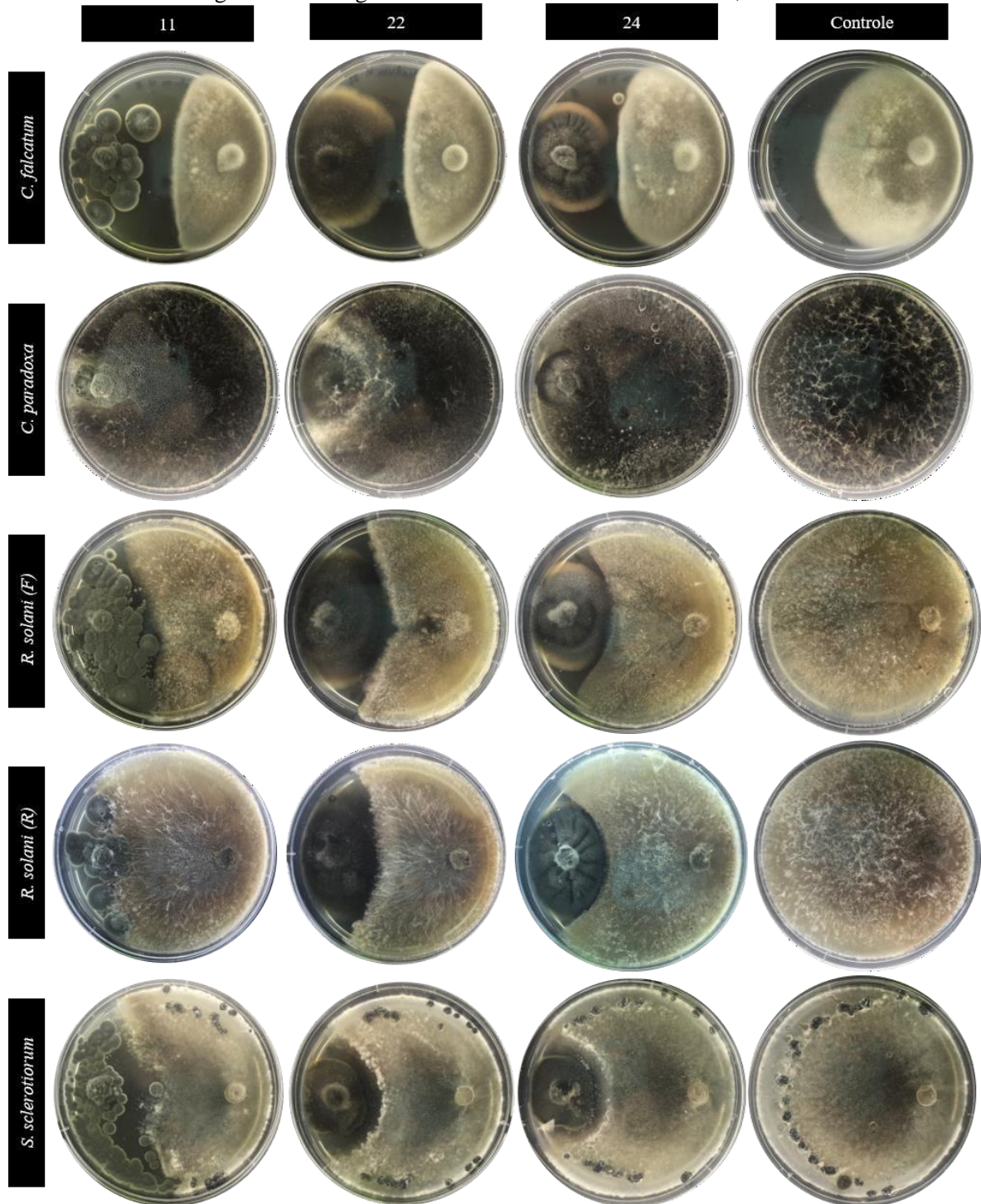
Figura 12 – Gráfico de índice de percentual de atividade antagonista dos endófitos selecionados.



Fonte: Acervo do autor (2021).

Dentre todos os endófitos, o intitulado *C. trifolii* exibiu, no geral, as melhores atividades antagonistas, variando entre 5,56 e 42,24 % de inibição. O isolado *P. citrinum* demonstrou índices de inibição de 12,89 a 37,68 %, enquanto *Stagonosporopsis sp.* apresentou valores na faixa de 10,24 e 30,38 % (Figura 12).

Figura 13 - Antagonismo direto *in vitro* dos isolados 11, 22 e 24.



Fonte: Acervo do autor (2021).

Os antagonismos contra o fitopatógeno de cana-de-açúcar, *C. paradoxa*, apresentaram os menores índices de inibição para todos os endófitos, os quais não se mostraram capazes de ultrapassar índices de inibição acima de 12,89 %. Tal resultado corrobora com o encontrado por Freire et al. (2017), que, ao testarem isolados endofíticos de *Alternaria sp.*, constataram a capacidade de um deles em inibir cerca de 10,00 % de uma cepa de *C. paradoxa*. Além disso, Khanna e Raj (2018) evidenciam a grande predominância de isolados do gênero *Trichoderma* no controle biológico *in vitro* de *C. paradoxa*. As espécies pertencentes a este gênero tem como um dos mecanismos principais o micoparasitismo (OLMEDO MONFIL; CASAS-FLORES, 2014), onde observa-se a capacidade de um organismo de crescer sobre a colônia do outro, resultando na cobertura parcial ou total da colônia (MEJÍA et al., 2008b; SHARMA et al., 2019). Este tipo de antagonismo não foi constatado nos fungos endofíticos testados neste trabalho.

Em contraste, as maiores atividades antagonistas foram relativas à cepa de *R. solani* isolada da folha, cujo percentual de inibição chegou ao máximo de 42,24 % seguido de 37,68 %, correspondentes aos endófitos *C. trifolii* e *P. citrinum*, respectivamente. Já o isolado *Stagonosporopsis sp.*, foi capaz de inibir em 27,63 % o crescimento deste fitopatógeno. Os números encontrados são semelhantes com dados da literatura, cujos estudos revelam a habilidade de fungos endofíticos em inibir o crescimento de *R. solani* em ensaios de antagonismo direto *in vitro*, apresentando índices de inibição nas faixas de 28,00, 35,93 até 47,20 % (DOS SANTOS, 2014; LAHLALI; HIJRI, 2010; MILES et al., 2012). Urooj et al. (2018) testaram a atividade antagonista *in vitro* de *P. citrinum* isolado da raiz contra *R. solani* e constataram uma zona de inibição de 4 mm contra o patógeno, evidenciando uma atividade relativamente moderada, tal qual o obtido pelo isolado endofítico *P. citrinum*.

Em relação ao biocontrole de *S. sclerotiorum*, obteve-se índices de inibição muito semelhantes entre os três endófitos, os quais foram de 31,08, 31,88 e 30,38 % para os isolados denominados *P. citrinum*, *C. trifolii* e *Stagonosporopsis sp.*, respectivamente. De encontro com estes resultados, Dos Santos (2014) ao avaliar a atividade antagonista de fungos endofíticos – isolados do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) – contra este mesmo fitopatógeno, constatou inibição micelial de 32,7 %. Ainda, Gama et al. (2018) demonstraram atividade antagonista de 33,9 % para um de seus endófitos testados contra *S. sclerotiorum*. Com relação ao endófito *P. citrinum*, Sharma et al. (2021) encontraram resultados divergentes quando confrontaram uma cepa de *P. citrinum* contra *S. sclerotiorum*, obtendo atividade antagonista superior. Uma das razões que podem justificar a discrepância entre tais resultados é a temperatura de incubação

na qual os cultivos de *S. sclerotiorum* foram submetidos, de 23 °C, fato que provavelmente afetou o crescimento do endófito, o que é evidenciado principalmente na Figura 11 e que tem respaldo na literatura, que aponta 30°C como a temperatura ótima de crescimento de *P. citrinum* (HOUBRAKEN; FRISVAD; SAMSON, 2010; JI et al., 2007).

Sharma et al. (2021) testaram a atividade antagonista de *P. citrinum* – isolado da planta medicinal *Swertia chirayita* – contra vários fitopatógenos, dentre eles *S. sclerotiorum* e constataram zonas de inibição, indicando antagonismo por antibiose, assim como neste trabalho. Huang et al. (2020) isolaram fungos endofíticos de várias plantas cucurbitáceas (e.g. melancia, pepino, abóbora entre outras) e testaram sua capacidade antagonista *in vitro* contra alguns fitopatógenos, dentre eles *R. solani* e *S. sclerotiorum*. Os autores identificaram sete cepas de *Curvularia*, dentre as quais três demonstraram efeito antagonista do tipo competição por substrato contra *R. solani* e duas contra *S. sclerotiorum*, cujos mecanismos se revelaram tanto por antibiose quanto por competição por substrato. Também constataram cinco cepas de *Stagonosporopsis*, que não demonstraram nenhum tipo de efeito antagonista sobre nenhum dos fitopatógenos testados.

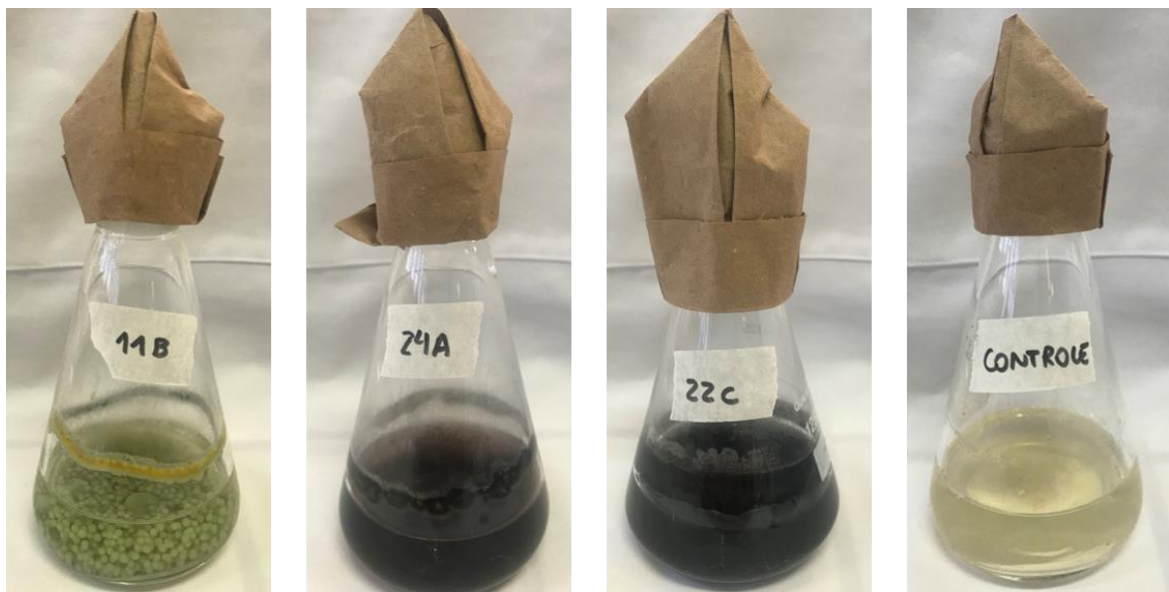
Por fim, no tocante aos resultados encontrados contra *C. falcatum*, verificou-se que o endófito *C. trifolii* apresentou inibição do crescimento de 33,36 %, seguido de 27,60 % por *P. citrinum* e 17,89 %, aliado a *Stagonosporopsis sp.* Ao confrontar *C. falcatum* e *P. citrinum* em ensaios de antagonismo direto *in vitro*, Raja e Prabakaran (2011) detectaram 23,1 % de inibição, valor similar ao apresentado pela cepa 11 (*P. citrinum*).

No geral, foram evidenciadas capacidades de inibição de nível baixo a moderado contra a maioria dos fitopatógenos. Um dos fatores que possivelmente foi determinante sobre as atividades antagonistas foi a diferença na velocidade de crescimento do endófito e fitopatógeno, o qual é favorecido quando o endófito apresenta crescimento lento, como testemunhado previamente por Campanile, Ruscelli e Luisi (2007) . Observou-se tal cenário em todos os ensaios, uma vez que os fitopatógenos utilizados caracterizam-se por uma velocidade de crescimento relativamente rápida, principalmente considerando as circunstâncias de incubação das culturas, onde optou-se por proporcionar condições mais propícias aos fitopatógenos. Essa hipótese se mostra válida sobretudo quando analisados os resultados relacionados a *C. paradoxa*, cujos índices de inibição foram marcadamente inferiores (5,56 a 12,89 %) quando comparados aos demais, ao mesmo tempo que exhibe o crescimento mais acelerado (cerca de 48 h) dentre todos os fitopatógenos testados.

4.6 Produção e extração de metabólitos secundários

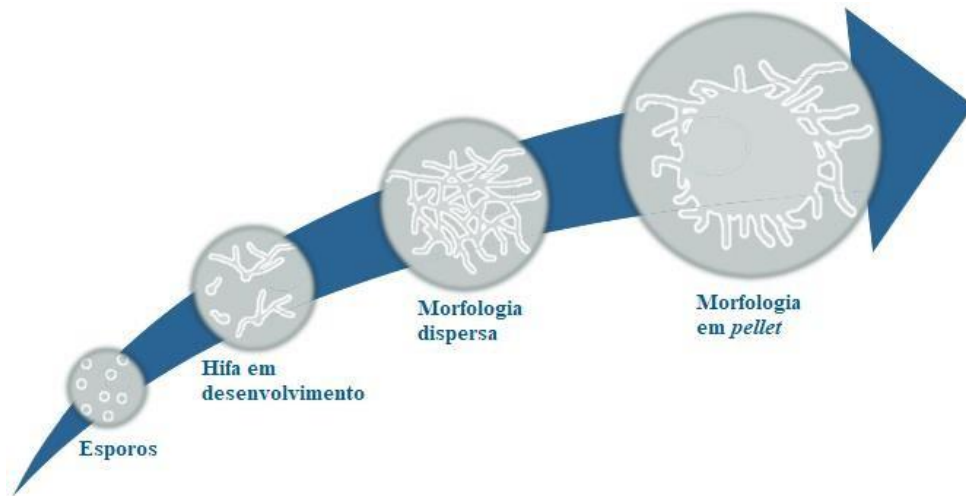
No cultivo líquido dos fungos endófitos selecionados, a característica e morfologia das hifas, bem como a cor do meio líquido, foram particulares para cada um dos isolados. O aspecto dos cultivos pode ser visualizado na Figura 14, onde é possível verificar a coloração amarelo-esverdeada e a morfologia em *pellets* regulares e uniformes do isolado de *P. citrinum* (11) e o tom marrom avermelhado e preto acinzentado dos meios dos isolados de *Stagonosporopsis sp.* (24) e *C. trifolii* (22), respectivamente. A análise da morfologia das hifas destes dois últimos endófitos não é praticável através das imagens, no entanto, é possível afirmar que o isolado intitulado como *Stagonosporopsis sp.*, assim como *P. citrinum*, apresentou hifas com morfologia em *pellets* (Figura 15), contudo irregulares. Em contrapartida, o fungo denominado *C. trifolii* exibiu hifas com morfologia do tipo dispersa, cujo esboço, para melhor entendimento, é retratado na Figura 15.

Figura 14 - Aspecto dos cultivos líquidos dos fungos endófitos 11, 24, 22 e controle, da esquerda para a direita. Cultivo realizado em meio de cultura batata dextrose caldo sob condições de incubação de 28 °C e 150 rpm.



Fonte: Acervo do autor (2021).

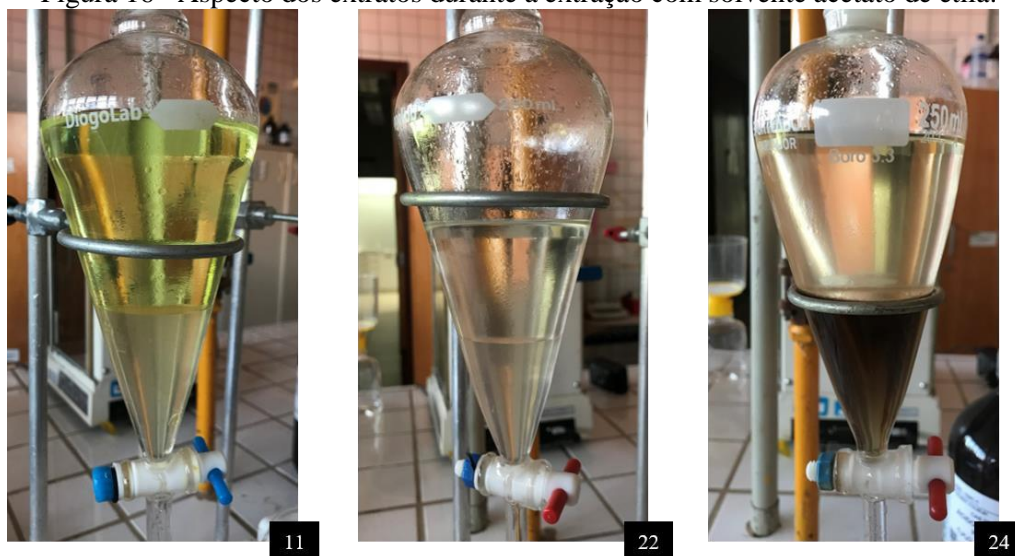
Figura 15 - Ciclo morfológico de fungos filamentosos.



Fonte: Adaptado de Posch, Herwig e Spadiut (2013).

A extração dos metabólitos secundários, através do emprego do solvente acetato de etila, apresentou aparência conforme exposto na Figura 16. A fração orgânica, de interesse, adquiriu uma coloração amarelada suave para o extrato do fungo endófito *C. trifolii* e amarelada dourada para *Stagonosporopsis sp.*, enquanto que para o isolado de *P. citrinum*, o extrato apresentou-se na cor amarelo-esverdeada, semelhante ao reportado na literatura (HOUBRAKEN; FRISVAD; SAMSON, 2010). Ao passo que o solvente foi evaporado, a coloração foi se tornando mais forte. Após a evaporação total do solvente, o rendimento de extrato obtido foi de 152,4, 89,1 e 95,6 mg para os isolados identificados como *P. citrinum*, *C. trifolii* e *Stagonosporopsis sp.*, respectivamente.

Figura 16 - Aspecto dos extratos durante a extração com solvente acetato de etila.



Fonte: Acervo do autor (2021).

4.7 Avaliação da bioatividade dos extratos metabólicos

O perfil antagonista apresentado pelos extratos metabólicos dos três endófitos, ilustrado na Figura 17, se mostrou, em alguns casos, divergente do constatado no antagonismo direto *in vitro*. Acerca do fungo *C. paradoxa*, não se obteve nenhum tipo de inibição pelos extratos, fato já esperado, uma vez que não houve indício de antibiose por nenhum dos fungos endofíticos em ensaios anteriores. Analogamente, reparou-se que os extratos dos três endófitos contra *R. solani* (raiz) exibiram bioatividade semelhante aos resultados anteriores, caracterizando-se como uma inibição de nível moderado a baixo. Da mesma forma, os extratos dos isolados 22 e 24 não se mostraram eficazes contra *C. falcatum* e *S. sclerotiorum*.

Com relação aos extratos metabólicos provenientes do fungo *P. citrinum*, observou-se uma inibição do patógeno *C. falcatum* mais acentuada quando comparado ao confronto direto (Figura 14). É possível notar uma zona de inibição destacada nas concentrações 25 e 50 mg/L, enquanto para o controle (0 mg/L) e 10 mg/L, não é visualizado nenhum tipo de inibição. Contra *R. solani* (folha), constatou-se capacidade branda do extrato em inibir o crescimento do fitopatógeno na concentração de 50 mg/L, além de provocar um crescimento desregular, situação característica de compostos antibióticos, os quais são capazes de provocar mudanças fisiológicas em organismos (ALIZADEH; VASEBI; SAFAIE, 2020). Apesar de não se destacar pela capacidade de inibição contra *S. sclerotiorum*, o extrato metabólico de *P. citrinum* se mostrou eficaz no impedimento da formação de escleródios, o qual pode ser observado na Figura 18, onde constata-se a presença destas estruturas apenas nas concentrações de 0 e 10 mg/L, em maior e menor quantidade, respectivamente. Os escleródios são estruturas de resistência e podem resistir a várias condições adversas e por longos períodos de tempo, sendo a sua sobrevivência um fator chave na ocorrência da doença da “podridão branca”, causada por *S. sclerotiorum* (RAI; SAXENA, 1975; SMOLIŃSKA; KOWALSKA, 2018).

P. citrinum é um fungo comumente conhecido pela produção da micotoxina citrinina (MALMSTROM; CHRISTOPHERSEN; FRISVAD, 2000), composto cuja atividade fungicida já foi previamente demonstrada (SREEVIDYA et al., 2015). Além disso, outros compostos de interesse já foram isolados de cepas endofíticas identificadas como *P. citrinum*, dentre eles alcaloides, policetídeos, (EL-NEKETI et al., 2013), ácido indolacético (IAA), proteases, quitinases, sideróforos (SHARMA et al., 2021) e giberelinas (KHAN et al., 2008a).

Policetídeos são metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, cuja função no organismo produtor é supostamente facilitar competição por nutrientes a fim de reduzir a

capacidade dos competidores e estabelecer comunicação química com organismos ao redor (OLMEDO MONFIL; CASAS-FLORES, 2014). Ainda, tem-se que representam uma classe de metabólitos relacionada ao controle biológico (BROWN; PROCTOR, 2016; EL-BONDKLY, 2014; OLMEDO MONFIL; CASAS-FLORES, 2014), a qual já foi previamente identificada em espécies de *Trichoderma* (EL-BONDKLY, 2014), um gênero com reputação pelo seu potencial no controle biológico (DE OLIVEIRA et al., 2021; RUANGWONG et al., 2021). Alcaloides também são uma classe de metabólitos secundários conhecida por ostentar atividade antimicrobiana (GOYAL, 2013), como mostram diversos trabalhos (GE et al., 2015; THAWABTEH et al., 2019). Adicionalmente, sabe-se que quitinases, proteases e sideróforos são responsáveis por induzir resistência ao hospedeiro vegetal (SHARMA et al., 2021).

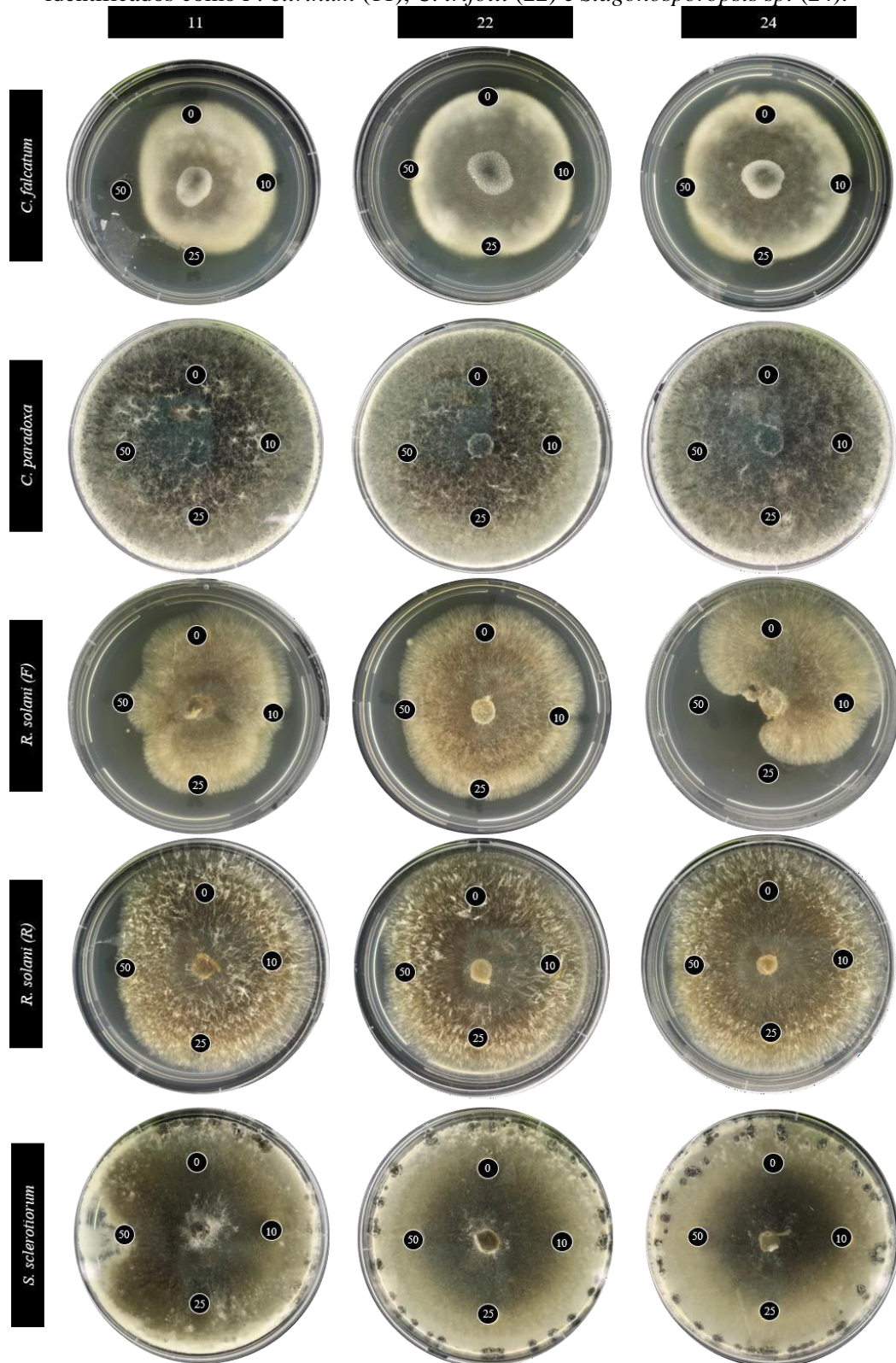
Ainda que tenha sido o endófito com o maior potencial nos ensaios de antagonismo direto, o extrato metabólico do isolado *C. trifolii* não apresentou capacidade semelhante, demonstrando efeito inibitório de caráter ameno apenas na concentração de 50 mg/L para os fitopatógenos *C. falcatum* e *R. solani* (ambas as cepas). Ao realizar metodologia equânime, Moreno-Gavira et al. (2021) obtiveram desfecho similar, onde o endófito *Paecilomyces variotii* exibiu capacidade de inibição em cultura dupla de cerca de 40,0 % e 30,0 % contra *S. sclerotiorum* e *R. solani*, respectivamente, enquanto que seus extratos metabólicos não proporcionaram nenhum efeito inibitório significativo. Isto pode ser em decorrência da propriedade do composto bioativo produzido, o qual supostamente apresenta efeito fungistático ao invés de fungicida para os organismos testados, ou ainda que os metabólitos degradaram ao longo do tempo de incubação, seja em consequência do metabolismo do fitopatógeno ou de causas naturais, não mantendo o efeito antagonista durante as 72 h, tal como sugere Rodrigo et al. (2017). Além disso, no trabalho de Samanthi et al. (2015), os autores isolaram dois novos policetídeos de extratos metabólicos de *C. trifolii*, compostos cuja importância já foi citada anteriormente e que podem ser hipoteticamente responsáveis pela atividade antagonista apresentada pela cepa 22, identificada como *C. trifolii*.

Em contrapartida, o extrato metabólico do isolado *Stagonosporopsis* sp. exibiu forte atividade inibitória nas concentrações de 50 e 25 mg/L no crescimento de *R. solani* (folha), resultado superior ao encontrado nos ensaios prévios de antagonismo direto *in vitro*. A composição química do gênero *Stagonosporopsis* se encontra ainda pouco elucidada, sendo complexo associar a atividade antagonista dos extratos do endófito 24 a algum composto bioativo específico. No entanto, estudos prévios já demonstraram o potencial de espécies de *Stagonosporopsis* na agricultura, principalmente em ensaios *in vivo*, na promoção do

crescimento vegetal por meio do aumento de metabólitos secundários na planta, como flavonoides e fenóis (ARORA et al., 2019) ou ainda no controle biológico da doença da podridão da raiz, causada por *R. solani* (HUANG et al., 2020). Tais estudos são indicativos do potencial de espécies pertencentes a este grupo ainda pouco explorado no campo da agricultura.

Diante dos resultados, dentre os três fungos endofíticos avaliados, destaca-se como detentores dos maiores potenciais os isolados intitulados 11 e 24, identificados como *P. citrinum* e *Stagonosporopsis sp.*, respectivamente. Devem ser aplicados novos esforços voltados para a caracterização química dos extratos destes endófitos, sobretudo dos compostos que detenham atividade antimicrobiana. Além disso, é imprescindível enfatizar a relevância do estudo mais aprofundado dessas moléculas, as quais podem servir como modelos para o desenvolvimento de novos produtos passíveis de aplicações nas mais diversas áreas, destacando-se a agroindústria.

Figura 17 - Bioatividade dos extratos de acetato de etila de metabólitos secundários dos endófitos identificados como *P. citrinum* (11), *C. trifolii* (22) e *Stagonosporopsis* sp. (24).



Fonte: Acervo do autor (2021).

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que a espécie vegetal *Kalanchoe daigremontiana* abriga uma ampla biodiversidade endofítica fúngica cultivável, a qual deve ser ainda mais explorada, investigando-se partes cuja microbiota endofítica permanece desconhecida, ou ainda focalizar na pesquisa acerca de bactérias endofíticas abrigadas neste mesmo hospedeiro.

A preservação dos isolados, bem como o método escolhido se mostraram um entrave, uma vez que não foi possível a recuperação de algumas espécies endofíticas após o tempo de estoque, impossibilitando o conhecimento a respeito do seu potencial.

Por fim, ressalta-se a constatação do potencial relacionado aos fungos endofíticos, não somente no controle biológico, onde se deu o foco deste trabalho, mas também em outras áreas pertencentes ao setor agrícola, bem como o farmacêutico e industrial. Desta forma, destaca-se a importância da exploração de microrganismos endofíticos, cuja diversidade, características e aplicabilidade ainda se mostram pouco conhecidas.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, R. A. BEN; JABNOUN-KHIAREDDINE, H.; DAAMI-REMADI, M. Exploring the Beneficial Endophytic Microorganisms for Plant Growth Promotion and Crop Protection: Elucidation of Some Bioactive Secondary Metabolites Involved in Both Effects. In: **Secondary Metabolites of Plant Promoting Rhizomicroorganisms**. [s.l.: s.n.]. p. 319–352.
- AJAYI-OYETUNDE, O. O.; BRADLEY, C. A. *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. **Plant Pathology Journal**, v. 67, p. 3–17, 2018.
- ALBUQUERQUE, U. P.; PATIL, U.; MÁTHÉ, Á. (Eds.). **Medicinal and Aromatic Plants of South America: Brazil**. [S.l.]: Springer, 2018.
- ALIZADEH, M.; VASEBI, Y.; SAFAIE, N. Microbial antagonists against plant pathogens in Iran: A review. **Open Agriculture**, v. 5, n. 1, p. 404–440, 1 jan. 2020.
- AL-RASHDI, F. K. H. et al. Endophytic fungi from the medicinal plant *Aloe dhufarensis* Lavranos exhibit antagonistic potential against phytopathogenic fungi. **South African Journal of Botany**, p. 1–8, 14 jun. 2020.
- ANAMIKA, J. S. et al. Fungal Endophytes and Their Secondary Metabolites: Role in Sustainable Agriculture. In: **Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspective**. [s.l.: s.n.]. p. 121–146.
- ARORA, P. et al. Community structure, spatial distribution, diversity and functional characterization of culturable endophytic fungi associated with *Glycyrrhiza glabra* L. **Fungal Biology**, v. 123, p. 373–383, 2019.
- ATIPHASAWORN, P. et al. Antibacterial and Antioxidant Constituents of Extracts of Endophytic Fungi Isolated from *Ocimum basilicum* var. *thyriflora* Leaves. **Current Microbiology**, v. 74, p. 1185–193, July 2017.
- AVESKAMP, M. M. et al. Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. **Studies in Micology**, v. 65, p. 1–60, 2010.
- AVESKAMP, M.; DE GRUYTER, M.; CROUS, J. W. Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. **Fungal Diversity**, v. 31, p. 1–18, 2008.
- AYALA-ZERME, M. A. et al. Viability, purity, and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods. **Fungal Biology**, p. 920–928, 2017.
- BAAZEEM, A. et al. In Vitro Antibacterial, Antifungal, Nematocidal and Growth Promoting Activities of *Trichoderma hamatum* FB10 and Its Secondary Metabolites. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 331, p. 1–13, 2021.
- BACON, C. W.; WHITE, J. (Eds.). **Microbial Endophytes**. Nova York: Marcel Dekker, Inc, 2000.
- BAXTER, M.; ILLSTON, G. M. TEMPERATURE RELATIONSHIPS OF FUNGI ISOLATED AT LOW TEMPERATURES FROM SOILS AND OTHER SUBSTRATES. **Mycopathologia**, v. 72, p. 21–25, 1980.

- BENNETT, J. W.; CHUNG, K. T. Alexander Fleming and the discovery of penicillin. **Advances in Applied Microbiology**, p. 163-184, 2001.
- BEZERRA, J. D. P. et al. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, Recife, v. 1, p. 49-57, June 2015.
- BOULOS, L. Flora of Egypt. Vol. 1 (Azollaceae-Oxalidaceae). **Nordic Journal of Botany**, p. 328-328, 1999.
- BROWN, D. W.; PROCTOR, R. H. Insights into natural products biosynthesis from analysis of 490 polyketide syn-thases from *Fusarium*. **Fungal Genetics and Biology**, 2016.
- CAMPANILE, G.; RUSCELLI, A.; LUISI, N. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in planta tests. **European Journal of Plant Pathology**, v. 117, p. 237–246, 2007.
- CANUTO, K. M. et al. **Fungos Endofíticos: Perspectiva de Descoberta e Aplicação de Compostos Bioativos na Agricultura Embrapa Agroindústria Tropical**. Fortaleza. Embrapa. 2012.
- CARVALHO, C. R. et al. Molecular Phylogeny, Diversity, and Bioprospecting of Endophytic Fungi Associated with wild Ethnomedicinal North American Plant *Echinacea purpurea* (Asteraceae). **Chem. Biodiversity**, v. 13, p. 918–930, 2016.
- CLAY, K.; SCHARDL, C. Evolutionary Origins and Ecological Consequences of Endophyte Symbiosis with Grasses. **The American Naturalist**, Chicago, v. 160, p. 99-127, Outubro 2002.
- DA SILVA, A. M. M.; BORBA, C. M.; DE OLIVEIRA, P. C. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time: Überlebensfähigkeit und morphologische Veränderungen von *Paracoccidioides brasiliensis*-Stämmen bei Langzeit-Mineralölkon. **Mycoses**, v. 37, n. 5–6, p. 165–169, 1994.
- DE OLIVEIRA, C. M. et al. Biological control of *Pratylenchus brachyurus* with isolates of *Trichoderma* spp. on soybean. **Biological Control**, v. 152, p. 104425, 1 jan. 2021.
- DE SILVA, N. I. et al. Use of endophytes as biocontrol agents. **Fungal Biology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 133–148, 1 mar. 2019.
- DOS SANTOS, T. T. **FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Phaseolus vulgaris* EXIBEM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E POTENCIAL PARA CONTROLE DE FITOPATÓGENOS**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2014.
- EL-BONDKLY, A. M. Sequence Analysis of Industrially Important Genes from *Trichoderma*. In: **Biotechnology and Biology of Trichoderma**. [s.l: s.n.]. p. 377–392.
- EL-NEKETI, M. et al. Alkaloids and Polyketides from *Penicillium citrinum*, an Endophyte Isolated from the Moroccan Plant *Ceratonia siliqua*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1099–1104, 2013.
- FÁVARO, L. C. DE L.; SEBASTIANES, F. L. D. S.; ARAÚJO, W. L. *Epicoecum nigrum* P16, a Sugarcane Endophyte, Produces Antifungal Compounds and Induces Root Growth. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. 1–10, 2012.
- FERNANDO, K. et al. Novel Antifungal Activity of *Lolium*-Associated *Epichloë* Endophytes. **Microorganisms**, v. 8, n. 955, p. 1–18, 2020.

- FREIRE, M. DAS G. M. et al. Survey of endophytic *Alternaria* species isolated from plants in the Brazilian restinga biome. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 12, n. 2, p. 84–94, 2017.
- GAMA, D. D. S. et al. Endophytic fungi from *Brachiaria* grasses in Brazil and preliminary screening of. **Sci. Agric.**, v. 77, n. 3, p. 1–6, 2018.
- GARRAWAY, M.; EVANS, R. **Fungal nutrition and physiology secondary metabolites**. New York: Wiley & Sons, 1984. 336-366 p.
- GAUTAM, A. K.; AVASTHI, S. **Fungal endophytes: potential biocontrol agents in agriculture. In: Role of Plant Growth Promoting Microorganisms in Sustainable Agriculture and Nanotechnology**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 241–283.
- GE, Y. et al. Insecticidal constituents and activity of alkaloids from *Cynanchum mongolicum*. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 17483–17492, 2015.
- GOUDA, S. et al. Endophytes: A treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-8, September 2016.
- GOYAL, S. Ecological Role of Alkaloids. In: **Natural Products**. [s.l.: s.n.]. p. 149–171.
- HAMZAH, T. N. T. et al. Diversity and Characterization of Endophytic Fungi Isolated From the Tropical Mangrove Species, *Rhizophora mucronata*, and Identification of Potential Antagonists Against the Soil-Borne Fungus, *Fusarium solani*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUL, p. 1707, 25 jul. 2018.
- HARDOIM, P. R. et al. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, p. 293-320, July 2015.
- HERRERA, I.; NASSAR, J. M. Reproductive and recruitment traits as indicators of the invasive potential of *Kalanchoe daigremontiana* (Crassulaceae) and *Stapelia gigantea* (Apocynaceae) in a Neotropical arid zone. **Journal of Arid Environments**, Miranda, v. 73, p. 978-986, May 2009.
- HOUBRAKEN, J. A. M. P.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. **Fungal Diversity**, v. 44, p. 117–133, out. 2010.
- HUANG, L. Q. et al. The potential of endophytic fungi isolated from cucurbit plants for biocontrol of soilborne fungal diseases of cucumber. **Microbiological Research**, v. 231, 1 jan. 2020.
- HUANG, W. Y. et al. A potential antioxidant resource: Endophytic fungi from medicinal plants. **Economic Botany**, v. 61, n. 1, p. 14–30, 2007.
- HUANG, W. Y. et al. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 33, p. 61-75, 2008.
- HUANG, W.-Y. et al. Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1253-1263, February 2007.
- HWANG, J.-S. et al. Effects of Endophytic Fungal Secondary Metabolites on the Growth and Physiological Response of *Carex kobomugi* Ohwi. Source: **Journal of Coastal Research**, v. 27, n. 3, p. 544–548, 2011.

- HYDE, K. D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, v. 33, p. 163-173, Novembro 2008.
- IQBAL, S. et al. Isolation, preservation and revival of *Trichoderma Viride* in culture media. ~ 1640 ~ **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 5, n. 3, p. 1640–1646, 2017.
- Jl, Y. et al. Effect of water activity and temperature on growth of *Penicillium citreoviride* and *Penicillium citrinum* on MiGao (rice cake). **Can. J. Microbiol.**, v. 53, p. 231–236, 2007.
- JIA, M. et al. A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review. **Frontiers in Microbiology**, Liverpool, v. 7, n. 906, p. 1-14, Junho 2016.
- KADDES, A. et al. Endophytic fungal volatile compounds as solution for sustainable agriculture. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1–16, 2019.
- KAUL, S. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, p. 487- 505, 21 november 2012.
- KHAN, S. A. et al. Isolation of Endophytic Fungi Capable of Plant Growth Promotion from Monocots Inhabited in the Coastal Sand Dunes of Korea. **Journal of Life Science**, v. 18, n. 10, p. 1355–1359, 30 out. 2008b.
- KHAN, S. A. et al. Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 231, 2008a.
- KHANNA, A.; RAJ, K. Management of Pineapple Disease of Sugarcane, Incited by *Ceratocystis paradoxa* [De Seynes] Moreau. In: NARESH, D. R. K. (Ed.). . **Research Trends in Agriculture Sciences**. New Delhi: AkiNik Publications, 2018. p. 83–96.
- KHARWAR, R. et al. The endophytic fungal complex of *Cathanthus roseus* (L.) G. Don. **Curr Sci**, v. 2, p. 228-233, 2008.
- KHIRALLA, A. et al. A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some Sudanese medicinal plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 9, p. 701–704, 2015.
- KHIRALLA, A. et al. Diversity of natural products of the genera *Curvularia* and *Bipolaris*. **Fungal Biology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 1–22, 1 mar. 2018.
- KOBERL, M. et al. The microbiome of medicinal plants: diversity and importance for plant growth, quality and health. **Frontiers In Microbiology**, v. 4, p. 1-9, 2013.
- KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, J. et al. Antioxidant efficacy of *Kalanchoe daigremontiana* bufadienolide-rich fraction in blood plasma in vitro. **Pharmaceutical Biology**, p. 1-7, 2016.
- KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, J. et al. Bufadienolides from *Kalanchoe daigremontiana* as thrombin inhibitors – in vitro and in silico study. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1-29, February 2017.
- KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, J.; STOCHMAL, A. Bufadienolides of *Kalanchoe* species: an overview of chemical structure, biological activity and prospects for pharmacological use. **Phytochemical Reviews**, v. 16, p. 1155-1171, July 2017.
- KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Natural Products Reports**, v. 28, p. 1203-1207, 2011.

- LAHLALI, R.; HIJRI, M. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. **FEMS Microbiology Letters**, v. 311, p. 152–159, 2010.
- LE COCQ, K. et al. Microreview Exploitation of endophytes for sustainable agricultural intensification. **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 3, p. 469–473, 2017.
- LEE, H.-S. et al. Statistical Optimization of Growth Medium for the Production of the Entomopathogenic and Phytotoxic Cyclic Depsipeptide Beauvericin from *Fusarium oxysporum* KFCC 11363P. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 138–144, 2008.
- LEWIS, G. C. Effects of biotic and abiotic stress on the growth of three genotypes of *Lolium perenne* with and without infection by the fungal endophyte *Neotyphodium lolii*. **Ann. appl. Biol.**, v. 144, p. 53–63, 2004.
- LEYLAIE, S.; ZAFARI, D. Antiproliferative and antimicrobial activities of secondary metabolites and phylogenetic study of endophytic *Trichoderma* Species From *Vinca* Plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUL, p. 1484, 11 jul. 2018.
- LI, X. et al. Recent Advances in Mechanisms of Plant Defense to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–14, 2019.
- LI, X. J. et al. Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus associated with *Melia azedarach*, and their antifungal, antifeedant, and toxic activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 13, p. 3424–3431, 4 abr. 2012.
- LIU, X.; DOU, G.; MA, Y. Potential of endophytes from medicinal plants for biocontrol and plant growth promotion. **Journal of General Plant Pathology**, v. 82, p. 165–173, 2016.
- LU, H. et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v. 151, p. 67–73, 2000.
- LUDWIG-MÜLLER, J. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? **Biotechnology Letters**, v. 37, p. 1325–1334, March 2015.
- LV, Y.-L. et al. Diversity and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi Associated with the Alpine Plant *Saussurea involucreta*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Beijing, v. 33, p. 1300-1306, Maio 2010.
- MAHESHWARI, D. K. (Ed.). **Endophytes: Biology and Biotechnology**. Haridwar: Springer, v. 1, 2017.
- MAHESHWARI, R. et al. Endophytic Fungi as Novel Resources of natural therapeutics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, p. 1-26, Dezembro 2017.
- MALMSTROM, J.; CHRISTOPHERSEN, C.; FRISVAD, J. C. Secondary metabolites characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. **Phytochemistry**, p. 301–309, 2000.
- MANGANYIA, M. C. et al. Phylogenetic analysis and diversity of novel endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sceletium tortuosum*. **Phytochemistry Letters**, v. 27, p. 36-43, Outubro 2018.
- MEJÍA, L. C. et al. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control**, v. 46, p. 4–14, 2008.

- MEJÍA, M. A. P.; GALLEGO, J. T.; ARANGO, V. *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet. & H. y su potencial uso como fuente de antioxidantes y colorantes naturales. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Medellín, v. 19, p. 61-68, 2014.
- MILES, L. A. et al. Exploring the biocontrol potential of fungal endophytes from an Andean Colombian Paramo ecosystem. **Biocontrol**, v. 57, p. 697–710, 2012.
- MONIUSZKO-SZAJWAJ, B. et al. New Bufadienolides Isolated from the Roots of *Kalanchoe daigremontiana* (Crassulaceae). **Molecules**, Pulawy, v. 21, p. 1-13, February 2016.
- MORENO-GAVÍRA, A. et al. Biocontrol Effects of *Paecilomyces variotii* against Fungal Plant Diseases. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 415, p. 1–18, 2021.
- MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Fungal endophytes in Mediterranean oak forests: a lesson from *Discula quersina*. **Phytopatology**, v. 98, p. 380-386, 2008.
- OLMEDO MONFIL, V.; CASAS-FLORES, S. Molecular Mechanisms of Biocontrol in *Trichoderma* spp. and Their Applications in Agriculture. In: **Biotechnology and Biology of Trichoderma**. [s.l: s.n.]. p. 429–454.
- ORTEGA, H. E.; TORRES-MENDOZA, D.; CUBILLA-RIOS, L. Patents on endophytic fungi for agriculture and bio-and phytoremediation applications. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1–26, 2020.
- PETRINI, O. **Fungal Endophytes of Tree Leaves**. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. *Microbial Ecology of Tree Leaves*. [S.l.]: Springer-Verlag New York Inc. , 1991. p. 179-197.
- PIRTTILÄ, A. M.; FRANK, A. C. (Eds.). **Endophytes of Forest Trees**. 2^a. ed. [S.l.]: Springer, 2018.
- POLONIO, J. C. et al. Biotechnological prospecting of foliar endophytic fungi of guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) with antibacterial and antagonistic activity against phytopathogens. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 7297–7309, 2015.
- POSADA, F. et al. Inoculation of coffee plants with the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). **Mycological research**, v. 111, n. Pt 6, p. 748–757, jun. 2007.
- POSCH, A. E.; HERWIG, C.; SPADIUT, O. Science-based bioprocess design for filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 1, 2013.
- PRASAI, J. R. et al. View of Morphological and Molecular Characterization of Endophytic Fungi isolated from the leaves of *Bergenia ciliata*. **Annals of R. S. C. B.**, v. 25, n. 4, p. 2239–2257, 2021.
- RABHA, A. J. et al. In Vitro Evaluation of Antagonism of Endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* Against Potent Fungal Pathogens of *Camellia sinensis*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 302-309, February 2014.
- RAI, J. N.; SAXENA, V. C. Sclerotial mycoflora and its role in natural biological control of “white-rot” disease. **Plant and Soil**, v. 43, n. 1, p. 509–513, ago. 1975.
- RAI, M. et al. Review: Mycoendophytes in medicinal plants: Diversity and bioactivities. **Nusantara Bioscience**, Noida, v. 4, p. 86-96, Julho 2012.

RAJA, A.; PRABAKARAN, P. ANTAGONISTIC POTENTIALITY OF SOME SOIL MYCOFLORA AGAINST *Colletotrichum falcatum*. **World Journal of Science and Technology**, v. 1, n. 4, p. 39–42, 2011.

RANDALL, R. **Global Compendium of Weeds**, 2002. Disponível em: <<http://www.hear.org/gcw>>.

RAUH, W. Über die Zonierung und Differenzierung der Vegetation Madagaskars. **Akad Wiss Mainz**, 1973.

REDMAN, R. S. et al. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. **Science**, v. 298, n. 5598, p. 1581, 22 nov. 2002.

RODRIGO, S. et al. Antagonism between *Byssochlamys spectabilis* (anamorph *Paecilomyces variotii*) and plant pathogens: Involvement of the bioactive compounds produced by the endophyte. **Annals of Applied Biology**, v. 171, p. 464–476, 2017.

ROTHEN, C. et al. **Characterization of dark septate endophyte fungi associated with cultivated soybean at two growth stages**. 2017.

RUANGWONG, O. U. et al. Biological control activity of *Trichoderma asperelloides* PSU-P1 against gummy stem blight in muskmelon (*Cucumis melo*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 115, p. 101663, 1 ago. 2021.

RUBINI, M. R. et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, Caxias do Sul, v. 1, p. 24-33, Fevereiro 2005.

SALLAM, N. et al. Endophytic fungi associated with soybean plants and their antagonistic activity against *Rhizoctonia solani*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 1, 2021.

SAMANTHI, K. A. U. et al. Two new bioactive polyketides from *Curvularia trifolii*, an endolichenic fungus isolated from *Usnea* sp., in Sri Lanka. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 43, n. 3, p. 217–224, 2015.

SAMUELS, G. J.; SIVANESAN, A. Graminicolous Species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and Their Teleomorphs. **Mycologia**, v. 81, n. 1, p. 170, jan. 1989.

SCHULZ, B. et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, p. 996-1004, 2002.

SELIM, K. et al. Biology of Endophytic Fungi. **Current Research in Environmental & Applied Microbiology**, Cairo, v. 1, p. 31-82, 2012.

SHARMA, D.; PRAMANIK, A.; AGRAWAL, P. K. Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosa* D. Don. **3 Biotech**, v. 6, n. 210, p. 1–14, 2016.

SHARMA, H. et al. Bioactivities of *Penicillium citrinum* isolated from a medicinal plant *Swertia chirayita*. **Archives of Microbiology**, v. 1, p. 3, 2021.

SIMIONATO, A. S. et al. The Effect of Phenazine-1-Carboxylic Acid on Mycelial Growth of *Botrytis cinerea* Produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV Strain. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1102, 2017.

SINGH, B. P. (Ed.). **Advances in Endophytic Fungi Research**. Mizoram: Springer, 2019.

- SMOLIŃSKA, U.; KOWALSKA, B. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* — a review. **Journal of Plant Pathology**, v. 100, p. 1–12, 2018.
- SREEVIDYA, M. et al. Biological control of *Botrytis cinerea* and plant growth promotion potential by *Penicillium citrinum* in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Biocontrol Science and Technology**, v. 25, n. 7, p. 739–755, 3 jul. 2015.
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. **Science**, v. 260, p. 214-216, Abril 1993.
- STONE, J.; WHITE, J.; POLISHOOK, J. Endophytic Fungi. In: AL, M. E. **Measuring and Monitoring Biodiversity of Fungi**. Boston: Elsevier Academic Press, 2004. p. 241-270.
- STRACQUADANIO, C. et al. Antifungal Activity of Bioactive Metabolites Produced by *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma atroviride* in Liquid Medium. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 263, p. 1–18, 2020.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Montana, v. 67, p. 491-502, Dezembro 2003.
- SURONO; NARISAWA, K. The dark septate endophytic fungus *Phialocephala fortinii* is a potential decomposer of soil organic compounds and a promoter of *Asparagus officinalis* growth. **Fungal Ecology**, v. 28, p. 1–10, 1 ago. 2017.
- TAKAHAMA, U. Redox state of ascorbic acid in the apoplast of stems of *Kalanchoe daigremontiana*. **Physiologia Plantarum**, v. 89, p. 791-798, 1993.
- TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional **metabolites**. **Natural Product Reports**, Nanjing, v. 18, p. 448-459, Junho 2001.
- TAN, Y. P. et al. Cryptic species of *Curvularia* in the culture collection Cryptic species of *Curvularia* in the culture collection of the Queensland Plant Pathology Herbarium. / **MycoKeys**, v. 35, p. 1–25, 2018.
- TCHAMENI, S. N. et al. Involvement of lytic enzymes and secondary metabolites produced by *Trichoderma* spp. in the biological control of *Pythium myriotylum*. **International Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 179–188, 1 maio 2020.
- THAMBUGALA, K. M. et al. Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2020.
- THAWABTEH, A. et al. The Biological Activity of Natural Alkaloids against Herbivores, Cancerous Cells and Pathogens. **Toxins**, v. 11, n. 656, p. 1–28, 2019.
- THEANTANA, T.; HYDE, K. D.; LUMYONG, S. Asparaginase production by endophytic fungi from Thai medicinal plants: Cytotoxicity properties. **International Journal of Integrative Biology**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2009.
- TURNER, W. **The filamentous fungi polyketides and related metabolites**. New York: [s.n.], v. 2, 1976.
- ÜRMÉNYI, F. G. G. . S. G. D. N. . C. L. M. . M. A. D. S. . D. M. C. L. M. . R. M. T. V. . & C. S. S. Anti-HSV-1 and HSV-2 flavonoids and a new kaempferol triglycoside from the medicinal plant *Kalanchoe daigremontiana*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, p. 1707-1714, 2016.

UROOJ, F. et al. ROLE OF ENDOPHYTIC PENICILLIUM SPECIES IN SUPPRESSING THE ROOT ROTTING FUNGI OF SUNFLOWER. **Pak. J. Bot**, v. 50, n. 4, p. 1621–1628, 2018.

VENKATACHALAM, A. et al. **Distribution and diversity of endophytes in seagrasses**. 2014.

VERMAA, V. C.; KHARWARA, R. N.; STROBEL, G. A. Chemical and Functional Diversity of Natural Products from Plant Associated Endophytic Fungi. **Natural Product Communications**, v. 4, p. 1511-1532, 2009.

VINALE, F. et al. Natural Product Research Formerly Natural Product Letters Secondary metabolites from the endophytic fungus *Talaromyces pinophilus* View supplementary material Secondary metabolites from the endophytic fungus *Talaromyces pinophilus*. **Natural Product research**, v. 31, n. 15, p. 1778–1785, 2017.

VYAS, P.; BANSAL, A. **Fungal endophytes: Role in sustainable agriculture. In: Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspective**. [s.l.] Springer Nature Singapore, 2018. p. 107–120.

WANG, L. et al. A novel gene of *Kalanchoe daigremontiana* confers plant drought resistance. **Nature**, v. 8, p. 1-13, January 2018.

WANG, Y.; DAI, C.-C. Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. **Annals of Microbiology**, v. 61, p. 207-215, 2011.

WICKRAMARACHCHI, S.; WIJERATNE, K.; PARANAGAMA, P. Two new bioactive polyketides from *Curvularia trifolii*, an endolichenic fungus isolated from *Usnea* sp., in Sri Lanka. **Article in Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, 2015.

WINTER, K.; GARCIA, M.; HOLTUM, J. A. On the nature of facultative and constitutive CAM: environmental and developmental control of CAM expression during early growth of *Clusia*, *Kalanchoe* and *Opuntia*. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 1829-1840, 2008.

WIYAKRUTTA, S. et al. Endophytic Fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities from Thai medicinal plants. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 20, p. 265-272, 2004.

YADAV, A. Exploring the Potential of Endophytes in Agriculture: A Minireview. **Advances in Plants & Agriculture Research**, v. 6, n. 4, p. 1–5, 2017.

YADAV, A. N. et al. **Biodiversity of the Genus *Penicillium* in Different Habitats**. In: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. [s.l.: s.n.]. p. 3–18.

YASHAVANTHA RAO, H. C.; CHANDRA MOHANA, N.; SATISH, S. Biocommercial aspects of microbial endophytes for sustainable agriculture. In: **Microbial Endophytes**. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. p. 323–347.

YUAN, X.-L. et al. Characterization of Nuclear and Mitochondrial Genomes of Two Tobacco Endophytic Fungi *Leptosphaerulina chartarum* and *Curvularia trifolii* and Their Contributions to Phylogenetic Implications in the Pleosporales. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, 2020.

YUN, H.-G. et al. Entomopathogenic Fungi as Dual Control Agents against Both the Pest *Myzus persicae* and Phytopathogen *Botrytis cinerea*. **Mycobiology**, v. 45, n. 3, p. 192–198, 2018.

YURNALIZA, Y. et al. View of Screening of endophytic fungi from oil palm (*Elaeis guineensis*) in producing exopolysaccharides. **Biodiversitas**, v. 22, n. 3, p. 1467–1473, 2021.

YUVARAJ, M.; RAMASAMY, M. **Role of Fungi in Agriculture**. In: *Biostimulants in Plant Science*. [s.l.] IntechOpen, 2020.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 23, p. 753-771, Agosto 2006.

ZHAO, J. E. A. Plant-Derived Bioactive Compounds Produced by Endophytic Fungi. **Mini-reviews In Medicinal Chemistry**, Beijing, v. 11, p. 159-168, fevereiro 2011.

ZHAO, J. et al. Antimicrobial Metabolites from the Endophytic Fungus *Pichia guilliermondii* Isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. **Molecules**, Beijing, v. 15, p. 7961-7970, November 2010.

ZHAO, J. et al. Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. **FORMATEX**, p. 567-576, 2010.

ZHAO, J. et al. Endophytic Fungi from Pigeon Pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] Produce Antioxidant Cajaninstilbene Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Harbin, v. 60, p. 4314-4319, 2012.

ZHONG, T. et al. Analysis of gene expression in *Kalanchoe daigremontiana* leaves during plantlet formation under drought stress. **Electronic Journal of Biotechnology**, Beijing, p. 1-9, November 2013.