



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA KATISKI DA COSTA STUART

**FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Aristolochia triangularis* (cipó-mil-homens) COM  
POTENCIAL NO CONTROLE BIOLÓGICO DAS DOENÇAS DO MORANGUEIRO**

CURITIBA

2017

ANDRESSA KATISKI DA COSTA STUART

**FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Aristolochia triangularis* (cipó-mil-homens) COM  
POTENCIAL NO CONTROLE BIOLÓGICO DAS DOENÇAS DO MORANGUEIRO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, Patologia e Parasitologia, no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Patologia e Parasitologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Ida Chapaval Pimentel

Co-Orientador: Dr. Rodrigo Makowiecky Stuart

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Stuart, Andressa Katiski da Costa

Fungos endofíticos de *Aristolochia triangularis* (cipó-mil-homens) com potencial no controle biológico das doenças do morangueiro. / Andressa Katiski da Costa Stuart. – Curitiba, 2017.

68 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Ida Chapaval Pimentel

Co-orientador: Rodrigo Makowiecky Stuart

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Endófitos. 2. Metabólitos secundários. 3. Morango. Título II. Pimentel, Ida Chapaval. III. Stuart, Rodrigo Makowiecky. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 576.163



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**“Fungos endofíticos de *Aristolochia triangularis* (cipó-mil-homens) com potencial no controle biológico das doenças do morangueiro”**

por

**Andressa Katiski da Costa Stuart**

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**

  
**Profa. Dra. Ida Chapaval Pimentel – Presidente**

  
**Dr. Celso Garcia Auer**

  
**Dr. Paulo Roberto Dantas Marangoni**

**Curitiba, 22 de fevereiro de 2017.**

Dedico este trabalho à minha mãe, Madalena, que sempre esteve ao meu lado e não mediu esforços para que eu chegasse onde cheguei, e ao meu esposo Rodrigo, que me apoiou incondicionalmente e segurou a barra quando eu mais precisei.

Amo vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ida Chapaval Pimentel pelo acompanhamento, orientação e amizade.

Ao meu co-orientador, Dr. Rodrigo Makowiecky Stuart por todos os ensinamentos, conselhos, pela paciência e dedicação.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Zawadneak, pela colaboração e parceria junto ao projeto do morango.

À querida amiga Arlete e seus tios Manoel e Amélia Back, pela ajuda com as coletas da planta e por compartilhar um pouco de seu conhecimento comigo.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia, que sempre estiveram ao meu lado nesta caminhada, ajudando nos momentos de dúvidas e festejando nos momentos de lazer.

À todos os professores que contribuíram para o meu desenvolvimento durante meu processo de formação acadêmica.

Aos meus familiares, em especial minha mãe, Madalena e minhas tias Izabel e Maria, por todo o apoio, pelas palavras de incentivo e por acreditarem no meu potencial. Esta vitória também é de vocês!

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela oportunidade e a CAPES pela bolsa auxílio.

“Assim como os pés são a base do corpo,  
o conhecimento é a base do ser.”

- Plá

## RESUMO

A cultura do morango é uma das mais importantes ao redor do mundo, tanto por sua relevância econômica como pela geração de empregos. Os frutos desta cultura são muito sensíveis, tornando comum o aparecimento de fungos fitopatogênicos na pré e pós-colheita. Dois dos principais fungos fitopatogênicos que assolam esta cultura são o *Botrytis cinerea* (Pers.), causador do mofo cinzento e o *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.), causador da podridão do *Rhizopus*. Por serem doenças de fácil disseminação e difícil controle, acabam gerando a aplicação indiscriminada de agroquímicos, que causam danos ao bioma onde são aplicados e problemas à saúde do consumidor, tornando necessária a utilização de metodologias alternativas para controle destes patógenos, como o controle biológico. Um dos principais agentes de biocontrole são os fungos endofíticos, que apresentam imenso potencial para produzir metabólitos secundários, similares ou iguais à sua planta hospedeira, e quando isolados de plantas medicinais podem demonstrar diversas aplicações na indústria e medicina. A planta *Aristolochia triangularis* é amplamente utilizada na medicina popular como antiinflamatória, antimicrobiana, antimicobacteriana, dentre outras aplicações. Neste trabalho, buscamos isolar fungos endofíticos de *A. triangularis* e testar o potencial dos isolados em promover o controle biológico de *B. cinerea* e *R. stolonifer* e sua capacidade de produzir metabólitos secundários bioativos. Este é o primeiro relato de fungos endofíticos desta planta, o que torna este trabalho inédito neste contexto. Foram 263 fungos isolados do cipó, caule, fruto, folhas jovens e folhas maduras. A técnica de ARDRA foi realizada buscando um agrupamento molecular dos isolados, para tal foram utilizadas as enzimas de restrição *Mbo I* e *Hae III*. Um total de 26 padrões de haplótipos diferentes foram gerados, demonstrando grande diversidade molecular. 10% dos fungos de cada haplótipo, 50 no total, foram aleatoriamente selecionados e submetidos à sequenciamento do gene ITS. Foi detectada similaridade com os gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Xylaria*, *Trichoderma*, *Nectria*, *Phomopsis*, *Stenocarpella*, *Phylosticta*, *Ascochyta*, *Neurospora*, *Yarrowia*, *Gibberella* e *Botryosphaeria*. O cálculo do índice de Shannon foi baseado no número de gêneros presentes em cada parte da planta. O cipó demonstrou maior diversidade ( $H'$ : 1.4402), seguido pelo fruto ( $H'$ : 1.0035), caule ( $H'$ : 0.7889), folhas maduras ( $H'$ : 0.2378) e folhas jovens ( $H'$ : 0.2074). Após identificação dos gêneros e para avaliar seu potencial no biocontrole de *B. cinerea* e *R. stolonifer*, os 50 fungos sequenciados foram submetidos ao teste de cultura pareada. Destes, 13 isolados, pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Colletotrichum*, *Botryosphaeria*, *Stenocarpella*, *Nectria*, *Phomopsis* e *Gibberella*, controlaram o crescimento de *B. cinerea* e 7 isolados, pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Botryosphaeria*, *Nectria*, *Phomopsis* e *Gibberella*, controlaram o crescimento de *R. stolonifer*. Isto demonstra que os fungos isolados de *A. triangularis* são capazes de promover o antagonismo destes patógenos *in vitro*. Os 263 isolados foram submetidos à PCR para avaliação da presença do gene PKS I, que está intimamente relacionado à produção de metabólitos secundários bioativos em microrganismos. Sessenta e seis apresentaram a presença do gene e destes, seis promoveram o biocontrole *in vitro* de *B. cinerea* e *R. stolonifer*, podendo o biocontrole visualizado estar relacionado à produção de metabólitos secundários.

Palavras-chave: Biocontrole. Endófitos. ARDRA. PKS I. Metabólitos secundários. *Fragaria x ananassa* Duchesne. *Botrytis cinerea*. *Rhizopus stolonifer*.

## ABSTRACT

The strawberry culture is one of the most important cultures around the world. Its fruit is sensitive and susceptible to several pre- and post-harvest fungal diseases. Grey mold, caused by *Botrytis cinerea* (Pers.), and *Rhizopus* rot, caused by *Rhizopus stolonifer* (Ehreb.), are the most important strawberry diseases, due to their easy spread and difficult control. These and other factors lead to indiscriminate agrochemical applications, causing negative environmental impacts and health damage. Thus, alternative methods to control these pathogens are required, as biological control, which is based on using an organism to control the population density of another organism. One of the most representative group of biocontrol agents is the group of endophytic fungi. These organisms are capable to produce several bioactive metabolites and metabolites that are similar to those produced by their hosts. Therefore, the isolation of endophytic fungi from medicinal plants is an excellent strategy to find those fungi that are producers of bioactive metabolites. In this work, we evaluate the presence of endophytic fungi in the medicinal plant *Aristolochia triangularis*. This plant possesses antiinflammatory, antimicrobial, antimycobacterium activities, among others. This is the first report of endophytic fungi isolated from *A. triangularis*. The total of 263 endophytes were isolated from fruit, vine, stem, young and mature leaves. These isolates were submitted to ARDRA technique, using *Mbo I* and *Hae III* restriction enzymes, to form groups based on genotypes differences. A total of 26 haplotypes were identified and 10% of the isolates of each haplotype, 50 in total, were selected for ITS sequencing. We found similarity with *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Xylaria*, *Trichoderma*, *Nectria*, *Phomopsis*, *Stenocarpella*, *Phylosticta*, *Ascochyta*, *Neurospora*, *Yarrowia*, *Gibberella* and *Botryosphaeria* genus. Shannon diversity index was based on sequencing analysis and showed greater diversity on vine ( $H'$ : 1.4402), followed by fruit ( $H'$ : 1.0035), stem ( $H'$ : 0.7889), mature leaves ( $H'$ : 0.2378) and young leaves ( $H'$ : 0.2074). After identification, we proceeded the antagonism test in order to evaluate the capability of those 50 endophytes to promote the biological control of *B. cinerea* and *R. stolonifer*. Thirteen isolates distributed on *Trichoderma*, *Colletotrichum*, *Botryosphaeria*, *Stenocarpella*, *Nectria*, *Phomopsis* and *Gibberella* genus, showed activity against *B. cinerea*. Seven isolates distributed on *Trichoderma*, *Botryosphaeria*, *Nectria*, *Phomopsis* and *Gibgerella* genus showed activity against *R. stolonifer*. These data show that endophytic fungi isolated from *A. triangularis* are capable of promoting the biological control of these strawberry pathogens. All the 263 isolates were tested for the presence of PKS I gene, which is related to the biochemical pathway responsible for producing bioactive compounds in fungi. Of these, 66 showed the presence of PKS I gene, and 6 were related to those that promoted *in vitro* biocontrol of strawberry diseases. The presence of PKS I gene, indicated that these isolates may produce several bioactive compounds that could be related to the biological control observed.

Key-words: Biocontrol. Endophytes. ARDRA. PKS I. Secondary metabolites. *Fragaria x ananassa* Duchesne. *Botrytis cinerea*. *Rhizopus stolonifer*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1	DOENÇAS DO MORANGUEIRO.....	13
2.2	CONTROLE BIOLÓGICO.....	14
2.3	MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO.....	16
2.4	CIPÓ-MIL-HOMENS ( <i>Aristolochia triangularis</i> ) E SUAS APLICAÇÕES NA MEDICINA POPULAR.....	17
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
3.1	OBJETIVO GERAL.....	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	20
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	20
4.1.1	Coleta de amostras de <i>A. triangularis</i> .....	20
4.1.2	Isolamento de fungos fitopatogênicos e postulado de Koch.....	21
4.2	ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	22
4.3	EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO DO GENE ITS1-5.8S-ITS2.....	23
4.4	ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DO DNA RIBOSSOMAL AMPLIFICADO (ARDRA).....	24
4.5	SEQUENCIAMENTO GENÔMICO DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS.....	24
4.6	ÍNDICE DE SHANNON.....	24
4.7	TESTE DE ANTAGONISMO <i>in vitro</i> DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS FRENTE AOS FITOPATÓGENOS DO MORANGO.....	25
4.8	AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE PKS I.....	25
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
4.9.1	Número de isolados de cada parte da planta.....	26
4.9.2	Teste de antagonismo.....	26

4.10	MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES.....	27
4.10.1	Ágar Sabouraud.....	27
4.10.2	Ágar Batata Dextrosado (BDA).....	27
4.10.3	Tampão CTAB.....	27
4.10.4	Clorofórmio Álcool Isoamílico (CIA).....	28
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>28</b>
5.1	ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	28
5.2	ARDRA.....	31
5.3	SEQUENCIAMENTO GENÔMICO DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS.....	34
5.4	TESTE DE ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i> .....	39
5.5	AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE PKS I.....	48
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>
	<b>ANEXO 1.....</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma das mais importantes ao redor do mundo, seu fruto é altamente apreciado por seu sabor e valor nutricional (VANDENDRIESSCHE et al., 2012). Esta cultura possui grande importância econômica e social ao redor do mundo, principalmente nos Estados Unidos e na Europa, com aumento em sua produção na América Latina nas últimas décadas (CAMARGO et al., 2010; MORALES et al., 2012). No Brasil, possui alto valor econômico (CARVALHO et al., 2014), com papel fundamental na geração de empregos, sendo que em determinadas localidades, representa a principal fonte de renda de diversas famílias brasileiras (CARVALHO, 2011). Estima-se que em 2010, a produção nacional de morango foi de 127.691 toneladas, sendo que o estado do Paraná contribuiu com aproximadamente 10% deste total. Dentro da produção estadual de frutas, o morango representou 1% do volume total, correspondendo a 9,5% do Valor Bruto da Produção (VBP), que foi de R\$ 870,4 milhões (CARVALHO et al., 2014). Em 2015 o VBP no Paraná foi de mais de R\$ 164 milhões, ou seja, dobro do VBP de 2010 (PARANÁ. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento, 2015).

Devido a sua sensibilidade, o morango é altamente propenso à contaminação por fungos fitopatogênicos (JIA et al., 2012). Dois dos principais patógenos que envolvem a cultura do morango são o *Botrytis cinerea*, responsável pela doença do mofo cinzento, e o *Rhizopus stolonifer*, responsável pela podridão do *Rhizopus* (ROMANAZZI et al., 2013), os quais assolam culturas ao redor do mundo e são responsáveis por grandes perdas econômicas nacionais (JIA et al., 2012). Para controlar as doenças e pragas da cultura do morangueiro, a primeira alternativa é a aplicação de agroquímicos, entretanto a preocupação com a saúde do consumidor e com o meio ambiente, tem gerado a necessidade de reduzir o uso destes químicos, levando ao desenvolvimento de metodologias alternativas, como o controle biológico (ILHAN e KARABULUT, 2013).

O controle biológico, que tem demonstrado grande eficácia no controle de muitos patógenos de diversas culturas ao redor do mundo. O controle biológico é definido como a utilização de um organismo para reduzir a densidade populacional de outro organismo, podendo-se utilizar, plantas, insetos, animais e microrganismos

(BALE, VAN LENTEREN e BIGLER, 2008). Dos microrganismos utilizados no controle biológico, destacam-se os fungos endofíticos.

Os fungos endófitos colonizam tecidos saudáveis de plantas sem causar sintomas de doença imediatos, desenvolvendo uma relação simbiótica com sua planta hospedeira (SCHULZ e BOYLE, 2006). Eles podem facilitar a defesa da planta contra pragas e fitopatógenos (ABRAHÃO et al., 2013), bem como auxiliar na produção de agentes inseticidas e promover o crescimento da planta através da produção de fitormônios (TAN e ZOU, 2001). Além disso, estes endófitos tem atraído atenção por sua capacidade de produzir metabólitos secundários com diversas atividades biológicas, como compostos antimicrobianos e anticancerígenos (STROBEL et al., 2004), e também possuem a capacidade de sintetizar substâncias biologicamente ativas similares aos metabólitos produzidos por suas plantas hospedeiras (ABRAHÃO et al., 2013). Desta forma, os fungos endofíticos isolados de plantas medicinais constituem uma importante fonte de novos metabólitos com atividade biológica.

A utilização de plantas na medicina popular no Brasil é de vasta distribuição e são muitos os fatores que contribuem para o seu cultivo (BALDAUF et al., 2009). Um destes fatores é a riqueza da flora brasileira. Estima-se que a Mata Atlântica seja responsável por, aproximadamente, oito por cento do total de espécies da fauna e flora mundial. É conhecida como uma das maiores florestas das Américas, entretanto, devido a ocupação humana, acredita-se que apenas 12% da floresta original permanece intacta e, aproximadamente 88% foi perdida, ameaçando a biodiversidade local (RIBEIRO et al, 2009).

O gênero *Aristolochia* possui inúmeras espécies com propriedades medicinais encontradas na Mata Atlântica, uma delas é a *Aristolochia triangularis*, popularmente conhecida como cipó-mil-homens. Esta planta produz diversos compostos bioativos como terpenos, esteroides, taninos, gomas, mucilagens, alcalóides, dentre outros, com diversas aplicações na indústria e medicina (SCALON, 2007). A planta *A. triangularis* é amplamente utilizada na medicina popular, sendo seu cipó, folhas e caule, as partes popularmente utilizadas como antiinflamatórias, antisépticas, emenagogas, antipiréticas, antireumáticas (CORREA e BIASI, 2003), antimicrobianas (SOUZA et al., 2004), dentre outras.

Do ponto de vista etnobotânico, as plantas são uma das mais importantes fontes de metabólitos naturais com valor para a indústria e medicina. Entretanto, o

montante de plantas necessário para a produção de tais metabólitos em escala industrial, torna esta prática insustentável. Desta forma, o conhecimento da comunidade endofítica destas plantas pode ser uma importante alternativa, devido à capacidade destes organismos produzirem produtos bioativos similares ou iguais a seus hospedeiros (ALVIN et al., 2014). Além disso, a detecção de genes como o das policetídeo sintases (PKSs), é muito importante, uma vez que estes genes estão estritamente relacionados à produção de metabólitos bioativos em fungos, e constituem importante estratégia para detectar fungos com potencial para produção destes compostos (MILLER et al., 2012b).

Apesar das diversas aplicações de *A. triangularis*, sua comunidade endofítica continua desconhecida. Desta forma, este trabalho foi pioneiro em isolar e conhecer a diversidade de fungos endofíticos cultiváveis de *A. triangularis* de uma região de Mata Atlântica do Paraná, bem como avaliar a capacidade de tais fungos em promover o controle biológico de fungos fitopatógenos do morango.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DOENÇAS DO MORANGUEIRO

O fruto do morangueiro é extremamente suscetível a danos mecânicos, deterioração fisiológica, suscetível à perda de água e aparecimento de lesões. Devido a esta sensibilidade o morango é altamente propenso à contaminação por patógenos (JIA et al., 2012). Dois dos mais importantes fungos fitopatogênicos de morango são o *Botrytis cinerea* causador do mofo cinzento e *Rhizopus stolonifer* causador da podridão de *Rhizopus* (ROMANAZZI et al., 2013).

A podridão de *Rhizopus*, é uma das mais severas doenças de pós-colheita do morango (JIA et al., 2012) e geralmente se manifesta durante o transporte e o armazenamento do fruto (DIAS et al., 2007). O fitopatógeno penetra nos frutos através de ferimentos, que podem ser causados por diversos fatores e, após sua infecção, os esporos presentes naquele fruto facilmente são disseminados no ambiente (MOREIRA et al., 2014). Diferentes alternativas tem sido elaboradas para o controle deste patógeno na cultura do morango, entretanto pouco sucesso tem sido obtido

A infecção do fruto pelo *B. cinerea*, também conhecido como mofo cinzento, pode ser descrita como a infecção das flores do campo (ROMANAZZI et al., 2013). Quando em temperaturas amenas e condições de alta umidade, o fungo fitopatogênico *B. cinerea* além de infectar frutos, pode causar danos também ao pecíolo, folhas, pedúnculos, botões florais e pétalas (MOREIRA et al., 2014). Este fungo é necrotrófico e responsável por importantes perdas em mais de 200 espécies cultivadas ao redor do mundo, podendo causar perdas de mais de 25% da colheita (ESSGHAIER et al., 2009; VANDENDRIESSCHE et al., 2012). A proteção das flores tem sido descrita como uma estratégia chave para minimizar a incidência do mofo cinzento, pois as flores são importantes portas de entrada para este patógeno (ILHAN e KARABULUT, 2013).

A aplicação de fungicidas sintéticos é o primeiro método utilizado no controle de infecções do morango na pré e pós-colheita, ao redor do mundo. No relatório do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes da Área Vegetal, publicado no Diário Oficial da União em Junho de 2016, que analisa os resíduos de agrotóxicos em alimentos e avalia sua regularidade, o morango foi um dos que apresentou menor índice de conformidade, sendo detectadas substâncias de agroquímicos não permitidos para esta cultura, além de valores acima do limite máximo de resíduos tolerados para esta cultura (BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2016), constituindo um grande problema sanitário envolvendo a saúde do consumidor bem como o meio ambiente.

Desta forma o desenvolvimento de metodologias alternativas tem se tornado importante devido a necessidade de reduzir os resíduos deixados nos frutos e os danos causados por inseticidas, não apenas devido ao aumento do número de cepas resistentes aos fungicidas utilizados, mas também pela preocupação com a saúde humana e a poluição ambiental (ILHAN e KARABULUT, 2013).

## 2.2 CONTROLE BIOLÓGICO

A ampla utilização de agroquímicos vem trazendo sérios problemas às culturas e ao meio ambiente (POPP et al., 2013). Além de afetar a saúde do consumidor e causar sérios e diversos danos ao meio ambiente, um dos principais problemas envolvidos com sua utilização, é que tais substâncias não apenas matam o organismo causador da doença na cultura, mas também afetam diversos outros

organismos presentes naquele bioma, inclusive espécies antagônicas ao patógeno, podendo agravar doenças que antes eram irrelevantes ou fáceis de controlar (BALE, VAN LENTEREN e BIGLER, 2008). Estes e outros problemas têm estimulado investigações em estratégias alternativas para o controle de pragas e patógenos (ZAKER et al., 2014). O controle biológico constitui uma das mais importantes alternativas ao uso de agroquímicos, e é definido como a utilização de um organismo para reduzir a densidade populacional de outro organismo, podendo ser animais, insetos, ervas daninhas e microrganismos (BALE, VAN LENTEREN e BIGLER, 2008).

Quando se trata da utilização de um microrganismo para promover o controle de pragas e patógenos de grandes culturas, este microrganismo, agente de controle biológico, para ser bem sucedido deverá estar equipado com diversos atributos que trabalham em conjunto e são cruciais para controlar o desenvolvimento de doenças (WISNIEWSKI et al., 2007). Estes agentes desenvolvem uma relação antagônica com seus alvos e um bom entendimento desta relação pode ser utilizado para auxiliar a prática do biocontrole, uma vez que um antagonista pode operar com mais de um mecanismo de ação.

São quatro principais formas de atuação: a competição, a antibiose, o parasitismo e a indução dos mecanismos de defesa na planta. A competição é definida por uma sobreposição de dois ou mais organismos, onde eles competem pelo mesmo nicho biológico. A competição por nutrientes (ex. carboidratos, nitrogênio, oxigênio) e espaço é um excelente mecanismo para um sistema de controle biológico, entretanto ambos, patógeno e antagonista, devem demandar os mesmos nutrientes e recursos. A antibiose é definida como a inibição ou destruição de um microrganismo patógeno por substâncias como metabólitos, agentes líticos, ou enzimas que são produzidas por um microrganismo antagonista. O parasitismo, ou predação, ocorre quando o antagonista se alimenta do patógeno ou penetra no mesmo, resultando em uma destruição direta de sua estrutura. Por fim, a indução dos mecanismos de defesa das plantas incluem: a resposta hipersensitiva, síntese de fitoalexinas, lignificação da parede celular, síntese de enzimas líticas, bem como a expressão de uma vasta gama de proteínas relacionadas à proteção contra patógenos (JAMALIZADEH et al., 2011).

Diversos fatores precisam ser levados em conta quando um agente de controle biológico é inserido no meio, uma vez que o mesmo pode alterar todo o

ambiente o qual está sendo inserido (TODD et al., 2014), ainda assim o controle biológico clássico é considerado fundamental para controlar fitopatógenos e reduzir os danos provocados por agroquímicos (FISCHBEIN e CORLEY, 2015). Desta forma, os fungos endofíticos constituem uma importante ferramenta para o controle biológico, uma vez que são capazes de viver em simbiose com a planta hospedeira, além de serem importante fonte de novos metabólitos secundários bioativos (STROBEL, 2003).

### 2.3 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

O termo endofíticos refere-se à microrganismos que colonizam tecidos de plantas saudáveis, sem causar nenhum sintoma de doença imediato, desenvolvendo uma relação simbiótica e benéfica para ambos (ALVIN, MILLER e NEILAN, 2014). Estes microrganismos foram encontrados em todas as plantas estudadas até hoje e acredita-se que todas as plantas existentes são hospedeiras de um ou mais endófitos (JOSEPH e PRIYA, 2011).

Um dos microrganismos mais comumente isolados como endófitos são os fungos (STROBEL e DAISY, 2003) e, por serem saprofiticos, são capazes de colonizar diversas plantas diferentes. Além de auxiliar o crescimento e desenvolvimentom da planta hospedeira, possuem potencial para controlar pragas e doenças, o que os torna comercial e cientificamente importantes (BACKMAN e SIKORA, 2008).

Os fungos endófitos são considerados importante fonte de novos metabólitos que apresentam potencial médico, industrial e para a agricultura (STROBEL et al., 2004). Estudos prévios tem reportado centenas de produtos naturais bioativos produzidos por eles, que incluem alcaloides, terpenóides, flavonoides e esteróis (JOSEPH e PRIYA, 2011), além de antibióticos como como a penicilina, a cefalosporina (MILLER et al., 2012a), drogas anticancerígenas, como o Taxol, dentre outras (STROBEL et al., 2004). Dos metabólitos que vem sendo descritos como produto do metabolismo dos fungos endofíticos, mais da metade não havia sido relatada anteriormente (BACKMAN e SIKORA, 2008). Além disso, o longo tempo de coexistência dos endófitos com seus hospedeiros, resulta em um processo coevolucionário, no qual estes organismos tem adquirido a capacidade de sintetizar

substâncias biologicamente ativas similares aos metabólitos produzidos por suas plantas hospedeiras (ABRAHÃO et al., 2013).

Uma das vias metabólicas utilizadas para a elucidação de como os fungos produzem estes metabólitos secundários, tem sido através da detecção das enzimas policetídeo sintetase (PKS). O gene PKS I é extremamente diverso em estrutura e atividade biológica (AMNUYKANJANASIN et al., 2005) e dão origem à policetídeos, que são produtos do metabolismo secundário, estruturalmente diversos produzidos por muitos fungos, bactérias, plantas e organismos marinhos, e que tem demonstrado ampla aplicação farmacêutica e industrial. Exemplos importantes destes metabólitos incluem os antibióticos rifampicina, eritromicina, penicilina, cefalosporina (MILLER et al., 2012a), leucinostatinas (WANG et al., 2016), lovastatina e a compactina, utilizados para tratar a hipercolesterolemia, da equisetina, um importante inibidor da integrase em HIV I, as citocalasinas, inibidor da divisão celular, dentre outros (CAMPBELL e VEDERAS, 2010). Este gene é dividido em duas subclasses denominadas *WA-type* e *MSAS-type*, ambas são amplamente distribuídas nos fungos filamentosos. A subclasse *WA-type* está envolvida, principalmente, na biosíntese de pigmentos e toxinas, já a subclasse *MSAS-type* está envolvida na biosíntese do antibiótico ácido 6-metilsalicílico (BINGLE, SIMPSON e LAZARUS, 1999).

A detecção dos genes que codificam estas enzimas, tem sido amplamente utilizada para a descoberta dos mecanismos de biossíntese de compostos ativos produzidos por endófitos (MILLER et al., 2012b), e esta via constitui o alvo adequado para uma avaliação baseada em genes funcionais, uma vez que seu envolvimento na biossíntese de diversos metabólitos bioativos já é conhecido (EVANS et al., 2011).

#### 2.4 CIPÓ-MIL-HOMENS (*Aristolochia triangularis*) E SUAS APLICAÇÕES NA MEDICINA POPULAR

A utilização de plantas na medicina popular data de milhares de anos e se difundiu no Brasil através da mistura de conhecimentos indígenas e daqueles trazidos por escravos e imigrantes, que cozinhavam as folhas, o caule e a raiz de algumas plantas para ajudá-los a curar doenças (BALDAUF et al., 2009). Estes

chás, em geral, ajudavam a melhorar a qualidade de vida, reduzindo a dor e o sofrimento das pessoas que os utilizavam (STROBEL e DAISY, 2004).

Além de ajudar a curar doenças, outros fatores contribuem para a utilização de plantas com ação medicinal no Brasil, até os dias de hoje, dentre eles destaca-se a economia frente ao alto custo da terapia alopática, além da dificuldade de acesso à assistência médica. A grande disponibilidade destas plantas também as torna uma alternativa interessante de tratamento, uma vez que muitas delas podem ser cultivadas no quintal de casa e constituem amplos recursos terapêuticos (BALDAUF et al., 2009).

Com o avanço da ciência, os conhecimentos milenares embutidos no emprego das plantas medicinais vem sendo comprovados através de estudos químicos e farmacêuticos, os quais tem demonstrado a efetividade e existência de propriedades medicinais em uma grande variedade de plantas (FRANCO e FONTANA, 2003; OLIVEIRA et al., 2007).

A flora brasileira é extremamente rica e diversa, e dentro dela encontra-se a Mata Atlântica que, estima-se, seja responsável por aproximadamente 8% do total de espécies da fauna e flora mundial (RIBEIRO et al., 2009). Dentre as milhões de plantas encontradas na Mata Atlântica que são utilizadas na medicina popular, está *Aristolochia triangularis*, também conhecida como cipó-mil-homens. A parte desta planta geralmente utilizada e comercializada é o cipó e esporadicamente a raiz (FENNER et al., 2006) que possuem grande diversidade de compostos como terpenos, gomas, esteroides, mucilagens, lignanos, taninos, alcaloides e o ácido aristolóquico (que é encontrado nas raízes). Além disso possui também diversas propriedades medicinais, sendo popularmente utilizada como antiinflamatória, antisséptica, antirreumática, vermífida, sedativa, antipirética, emenagoga (CORREA e BIASI, 2003), antimicrobiana (SCALON, 2007) e antimicobacteriana (LOPES e HUMPFER, 1997; OLIVEIRA et al., 2007). O chá desta planta é tônico, estimulante e depurativo. Tem o poder de aumentar o apetite e combater desde cólicas, gastrites e diarreias, até a depressão, desânimo, stress e a hipocondria. É utilizado também para retirar dores localizadas, dor ciática, reumatismo e neuralgias (FRANCO e FONTANA, 2003).

O Brasil possui uma das mais diversas floras, contando com 30% das florestas tropicais do mundo. Sabe-se que, das milhares de espécies vegetais que compõem a Mata Atlântica, poucas foram estudadas (FRANCO e FONTANA, 2003).

Além disso, é uma das mais ricas em termos de material bioativo (BRANDÃO, GOMES e NASCIMENTO, 2006), trazendo à tona a necessidade de um maior interesse, da ciência e pesquisa, pelo grande laboratório colocado à disposição do homem: a natureza. Além disso, não há estudos relacionando microrganismos endofíticos à *A. triangularis*, o que torna este estudo o primeiro a ser desenvolvido com a planta neste contexto e aumenta a possibilidade de importantes achados.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e identificar fungos endofíticos de *A. triangularis* e testar sua atividade antagonica *in vitro* contra os principais fungos fitopatogênicos do morango e seu potencial para a produção de metabólitos secundários bioativos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar fungos endofíticos de *Aristolochia triangularis*;
- Agrupar os isolados através da caracterização de diferentes haplótipos baseada na análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA);
- Identificar isolados representativos de cada haplótipo através do sequenciamento das regiões ITS1-5.8S-ITS2;
- Promover o teste de antagonismo *in vitro* dos isolados sequenciados, contra os principais fungos fitopatogênicos do morango, *B. cinerea* (causador da doença do mofo cinzento) e *R. stolonifer* (causador da podridão de *Rhizopus*);
- Avaliar a presença do gene PKS I, através de reação em cadeia da polimerase (PCR), para identificar os isolados com potencial para produção de metabólitos secundários bioativos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

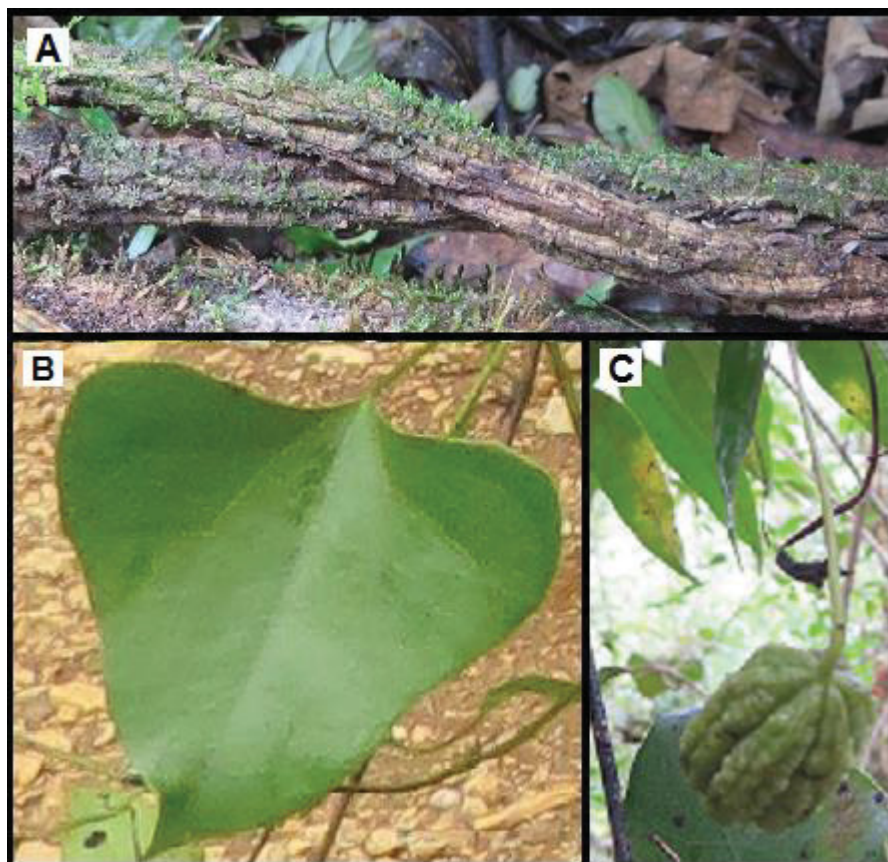
### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

#### 4.1.1 Coleta de amostras de *A. triangularis*

O projeto foi submetido e aprovado pelo SISBIO registro nº: 50166-1 e pelo CGEN registro nº: 010678/2015-8.

As amostras de folhas maduras, folhas jovens, frutos, caules e cipós (FIGURA 1) de *A. triangularis* foram coletadas em propriedade particular em região de Mata Atlântica, na cidade de Almirante Tamandaré, Paraná, Brasil (Lat -25.30498 Long -49.39420). Folhas com até 5 cm de comprimento foram consideradas jovens e as maiores foram consideradas maduras.

FIGURA 1 – DIFERENTES TECIDOS DE CIPÓ-MIL-HOMENS COLETADOS PARA A REALIZAÇÃO DO ISOLAMENTO DE ENDOFÍTICOS. A) CIPÓ. B) FOLHA. C) FRUTO.



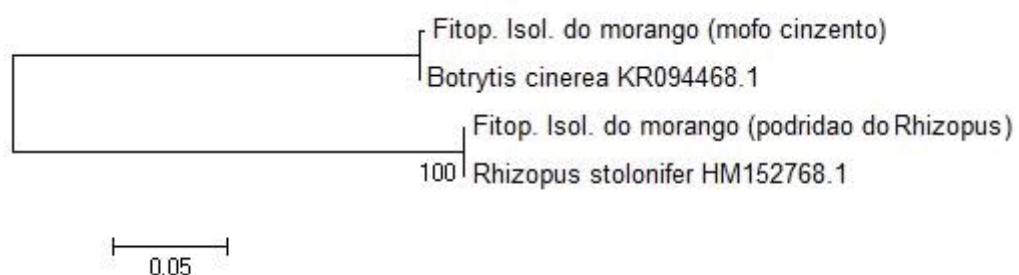
FONTE: O autor (2017)

#### 4.1.2 Isolamento de fungos fitopatogênicos e postulado de Koch

Dos fitopatógenos utilizados nos testes de antagonismo, o fungo *Botrytis cinerea* foi isolado de lesões características da doença do mofo cinzento no fruto do morango, através da inoculação do meio de cultura ágar batata dextrosado (Himedia, Mumbai, Índia – ITEM 4.11.2) com tecido que apresentou a doença, e posterior purificação das colônias. O fitopatógeno isolado do morango, *Rhizopus stolonifer* foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Maria Aparecida Cassilha Zawadneak, do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná.

Após observar os sintomas característicos das doenças envolvendo os fitopatógenos *B. cinerea* e *R. stolonifer*, realizamos os postulados de Koch, isolando os fungos fitopatogênicos em culturas puras e sequenciando-os para confirmar a espécie, conforme metodologia descrita a seguir (ITEM 4.3 e 4.5 – FIGURA 2). Em seguida foram inoculados em frutos sadios e, por fim, após desenvolvimento da doença (FIGURA 3), os fitopatógenos foram reisolados em culturas puras, as quais foram, posteriormente, utilizadas no teste de antagonismo.

FIGURA 2 – ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSTRUIDA ATRAVÉS DO MÉTODO DE NEIGHBOR-JOINING, OBTIDA APÓS ANÁLISE DAS SEQUENCIAS DO GENE ITS DOS FUNGOS FITOPATOGÊNICOS ISOLADOS DO MORANGO.



FONTE: O autor (2017)

FIGURA 3 – APARECIMENTO DAS DOENÇAS NOS FRUTOS. A) *Botrytis cinerea*. B) *Rhizopus stolonifer*. A PONTA DA SETA INDICA O APARECIMENTO DA LESÃO APÓS INOCULAÇÃO DO PATÓGENO.



FONTE: O autor (2017)

#### 4.2 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

O isolamento foi realizado de acordo com KLEINER et al. (2010). Inicialmente 10 unidades sadias de cada parte da planta (folhas maduras, folhas jovens, caule, fruto e cipó) foram lavadas em água corrente para retirar resíduos de poeira e solo presentes em sua superfície. Em seguida o cipó e o caule foram pré-fragmentadas de 8 a 12 cm para facilitar seu manuseio e suas extremidades foram seladas com parafina. Para a desinfecção superficial, todos os pré-fragmentos de caule e cipó e as folhas e frutos foram submergidos por 1 minuto em etanol 70%, hipoclorito de sódio 5% por 4 minutos, etanol 70% por 30 segundos e, por fim, enxaguados duas vezes em água destilada e esterilizada. Este procedimento realizado por completo em ambiente estéril. Após a desinfecção, todas as amostras foram fragmentadas em 0,5 cm<sup>2</sup> e inoculadas em meio de cultura ágar Sabouraud (ITEM 4.11.1) a 28 °C, sob fotoperíodo de 12 horas. Após crescimento, os fungos foram transferidos para meio de cultura BDA (ITEM 4.11.2) e armazenados em geladeira para os testes posteriores.

Para calcular a frequência de isolamento utilizamos a fórmula  $FI = \text{número de fragmentos que apresentaram crescimento fúngico} / \text{número total de fragmentos}$  (KLEINER et al., 2010).

### 4.3 EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO DO GENE ITS1-5.8S-ITS2

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por VICENTE (2001). Aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de micélio foi transferido para microtubos de 1,5 mL contendo 500 µL de tampão CTAB (ITEM 4.11.3) e uma mistura de sílica:celite (2:1). O material foi triturado e incubado em banho-maria a 65 °C por 10 minutos. 500 µL de uma mistura de álcool isoamílico e clorofórmio (CIA – ITEM 4.11.4) foram adicionados ao tubo, a mistura foi homogeneizada e centrifugada por 5 minutos à 14.000 RPM, buscando a separação de fases. A fase aquosa foi coletada e transferida para novos tubos. Em seguida foram acrescentados 800 µL de etanol 90% e deixados por 12 horas em freezer -20 °C para a precipitação do DNA. Passadas as horas, uma nova centrifugação foi realizada (5 minutos a 14.000 RPM). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com etanol 70% gelado e levado à estufa de secagem. O DNA seco, foi ressuspendido em 15 µL de água MilliQ autoclavada. Após total eluição, o DNA foi quantificado no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, Whaltam, MA).

Após a medição da concentração do DNA, foi realizada a amplificação do gene *internal transcribed spacer* (ITS) ITS1-5.8S-ITS2, através de PCR, utilizando os iniciadores V9G (5'TTACGTCCCTGCCCTTTGTA3') e LS266 (5'GCATTCCCAAACAACACTCGACTC3') em termociclador (BIOER, Hangzhou, ZJ), para posterior realização do ARDRA e sequenciamento genômico. Foram utilizados para a reação (concentração final): 0,03 U/µL de Taq Polimerase, 1X Buffer e 2,50 mM de MgCl (Invitrogen), 0,50 mM de cada iniciador, 0,31 mM de dNTP (Invitrogen). As condições da reação e concentração dos iniciadores estão listadas no (QUADRO 1).

QUADRO 1 – INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS DOS FUNGOS.

Iniciador	Concentração	Gene alvo	Condições da reação	Referência
V9G	0,5 mM	ITS1-5.8S-ITS2	94 °C – 2' 94 °C – 35" 50 °C – 15" 72 °C – 1' 72 °C – 7'	White et al., 1990
LS266	0,5 mM			

FONTE: O autor (2017)

#### 4.4 ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DO DNA RIBOSSOMAL AMPLIFICADO (ARDRA)

Após a amplificação do gene ITS, foi realizada uma análise utilizando enzimas de restrição, baseada na técnica descrita por VANEECHOUTTE et al. (1993). As enzimas utilizadas para a digestão do amplicom foram *Mbo I* e *Hae III* (Fermentas Inc, Hanover, MD) e foram aplicadas em 10 µL do produto da PCR, de acordo com especificações do fabricante. Estas enzimas reconhecem e cortam sítios específicos do DNA, gerando fragmentos de diferentes tamanhos. Estes fragmentos foram separados em gel de agarose 2% (p/v), corados com GelRed (Biotium, Hayward, CA) e visualizados sob luz ultravioleta (UV), para a determinação de padrões de haplótipos. O polimorfismo observado foi convertido em uma matriz binária e os dados foram utilizados para gerar um dendrograma, calculado a partir do coeficiente de Jaccard, buscando agrupar os isolados.

#### 4.5 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS

Após identificar os diferentes haplótipos, isolados representantes de cada padrão, 50 no total, foram submetidos à sequenciamento do gene ITS pelo método de terminador fluorescente (BigDye, Applied Biosystem) em sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystem, Waltham, MA). Após a obtenção das sequencias, as mesmas foram comparadas com o GenBank, presente no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), através da ferramenta BLAST do software MEGA versão 6.0, e foram alinhadas à sequencias que apresentaram similaridade acima de 98%. Esta análise foi utilizada para a construção de uma árvore filogenética baseada no método de Neighbor-joining, usando o *software* MEGA versão 6.0 (BONGIORNO et al., 2016). A análise de Bootstrap foi realizada com base em 1000 réplicas.

#### 4.6 ÍNDICE DE SHANNON

Para estimar a diversidade genética dos fungos endófitos isolados de *A. triangularis*, foi calculado o índice de Shannon baseado nos gêneros identificados (STUART et al., 2010).

#### 4.7 TESTE DE ANTAGONISMO *in vitro* DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS FRENTE AOS FITOPATÓGENOS DO MORANGO

Após identificar os 50 fungos endofíticos de *A. triangularis* selecionados no teste de ARDRA, através do sequenciamento do gene ITS, nós testamos o potencial *in vitro* destes isolados em promover o controle biológico de dois dos principais fungos fitopatogênicos do morango, *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer*.

Para avaliar a capacidade antagonista dos isolados endofíticos de *A. triangularis*, foi baseado no método de cultura pareada, adaptado de CAMPANILE, RUSCELLI e LUISI (2007). Plugs de 0,6 cm, contendo culturas puras de isolados de *A. triangularis* e fitopatógenos do morangueiro, foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (ITEM 4.12.2), à uma distância de quatro cm entre o patógeno e o antagonista. As placas foram incubadas em câmara BOD à 28 °C sob fotoperíodo de 12 horas. O crescimento radial da colônia foi medido após sete dias e comparado ao diâmetro da placa controle. Para o índice de inibição foi realizado o seguinte cálculo:  $Im\% = 100 - (MT/MC) \times 100$ , onde  $Im\%$  = Índice de inibição em porcentagem do crescimento micelial, MT = Média da área da triplicata aferida para o tratamento em  $cm^2$ , e MC = Média da área da triplicata do controle em  $cm^2$ .

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE PKS I

Com a realização do teste de antagonismo, nós verificamos que alguns dos isolados endofíticos de *A. triangularis*, possuem a capacidade de promover o controle biológico *in vitro* de *B. cinerea* e *R. stolonifer*, dois importantes fungos fitopatogênicos do morango. Sabendo que o gene PKS I está intimamente ligado à produção de metabólitos secundários bioativos, nós avaliamos a presença deste gene em todos os fungos isolados, através de PCR utilizando dois pares de iniciadores degenerados LC1 (5'GAYCCIMGITTYTTYAAAYATG3') e LC2c (5'GTICCI GTICCRTGCATYTC3'), LC3 (5'GCIGARCARATGGAYCCICA3') e LC5c (5'GTIGAIGTICRTGIGCYTC3') descritos por BINGLE, SIMPSON E LAZARUS (1999). O par de iniciadores LC1/LC2c reconhece o PKS I *WA-type*, que está envolvido, principalmente, na biosíntese de pigmentos e toxinas, e o par de iniciadores LC3/LC5c reconhece o PKS I *MSAS-type*, envolvido na biosíntese do antibiótico ácido 6-metilsalicílico. Ambos os iniciadores são capazes de amplificar

genes PKS I envolvidos na produção de diversos metabólitos distintos (BINGLE, SIMPSON e LAZARUS, 1999). Foram utilizados para a reação (concentração final): 0,01 U/ $\mu$ L de Platinum Taq Polimerase, 1X de Buffer e 2 mM de MgCl (Invitrogen), 0,25 mM de dNTP (Invitrogen). Sabe-se que os fungos filamentosos produzem diversos metabólitos policetídeos derivados de genes PKS estruturalmente diferentes. Desta forma a utilização de dois pares de iniciadores distintos aumenta a chance de localizar o gene (BINGLE, SIMPSON E LAZARUS, 1999).

As condições de reação e concentração de iniciadores estão listadas no (QUADRO 2). Os símbolos presentes nas sequências referem-se a: M (aminas - A ou C); R (purinas - A ou G); Y (pirimidinas - C ou T); N (qualquer nucleotídeo) e I (qualquer nucleotídeo), segundo as normas da International *Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC).

QUADRO 2 – INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR O GENE PKS I EM FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *A. triangularis*.

Iniciador	Concentração	Gene alvo	Condições da reação	Referência
LC1	0,05 mM	PKS I	94° C – 3' 94° C – 30" 56° C – 30" 72° C – 1' 72° C – 3'	Miller et al. (2012a)
LC2c	0,008 mM			
LC3	0,024 mM			
LC5c	0,016 mM			

FONTE: O autor (2017)

## 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 4.9.1 Número de isolados de cada parte da planta

Foi realizado o teste multicomparativo de Tukey – ANOVA, que é baseado na comparação de médias duas a duas (CAMATTI-SARTORI et al., 2005)

### 4.9.2 Teste de antagonismo

Foi realizada a análise estatística de Dunnett – ANOVA, pois é baseada na comparação de médias com um controle, utilizando o *software* Graph Pad Prism 6 (WEBER et al., 2004).

## 4.10 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

### 4.10.1 Ágar Sabouraud

Glicose	40 g (Êxodo, São Paulo, Brasil)
Peptona	10 g (HiMedia, Mumbai, India)
Ágar	15 g (HiMedia, Mumbai, India)
Água MilliQ autoclavada	1.000 mL
pH a 25° C	5,6 ± 0,2

Para a correção de pH foram utilizadas as soluções de NaOH 10% e/ou HCl 10% conforme a necessidade. Os meios de cultura foram autoclavados a 120 °C, 1 atm, por 20 minutos.

### 4.10.2 Ágar Batata Dextrosado (BDA)

Ágar Batata Dextrosado em pó	39 g (HiMedia, Mumbai, India)
Água MilliQ autoclavada	1.000 mL
pH à 25 °C	5,6 ± 0,2

Para a correção de pH foram utilizadas as soluções de NaOH 10% e/ou HCl 10% conforme a necessidade. Os meios de cultura foram autoclavados a 120 °C, 1 atm, por 20 minutos.

### 4.10.3 Tampão CTAB

CTAB	2 g
Cloreto de Sódio	8,12 g
EDTA	4 g
Tris	10 mL
PVP	10 g
Água MilliQ autoclavada	100 mL

#### 4.10.4 Clorofórmio Álcool Isoamílico (CIA)

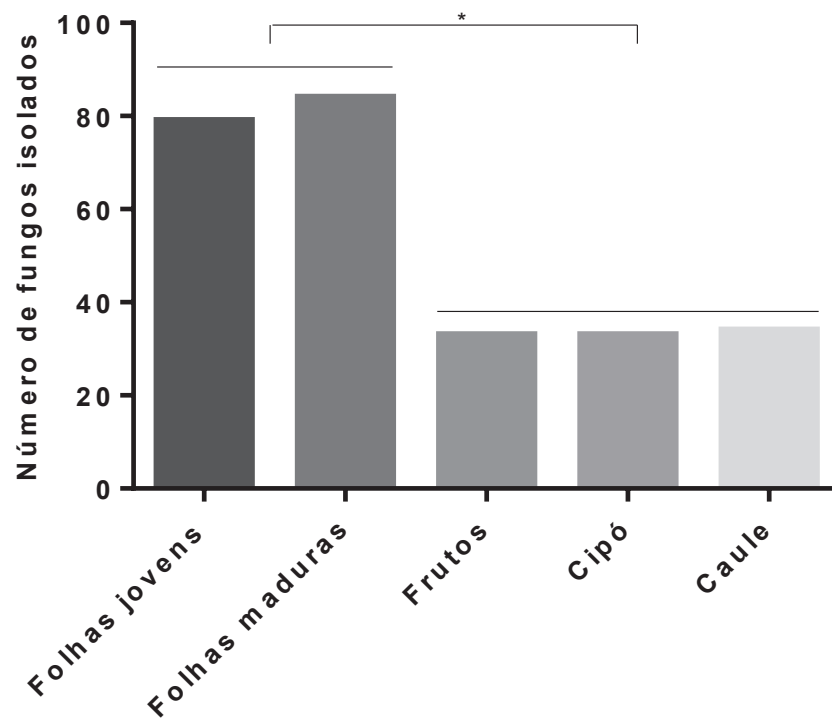
Clorofórmio	96 mL
Álcool Isoamílico	4 mL

## 5 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Ao realizar o isolamento observamos grande diversidade morfológica dos isolados, que apresentaram colônias de diferentes cores, tingimento do meio de cultura e diferente tempo de crescimento da colônia (FIGURA 4). Foram isolados, 79 fungos endofíticos de folhas jovens, 84 de folhas maduras, 33 de frutos, 33 de cipó e 34 de caule, totalizando 263 fungos endofíticos isolados da planta *A. triangularis*. Utilizando o teste multicomparativo de Tukey, nós verificamos que o número de fungos isolados de folhas (jovens e maduras) foi estatisticamente diferente ( $p < 0.001$ ) das demais partes da planta (cipó, caule e frutos), as quais não apresentaram diferença quando comparadas entre si. O número de isolados do cipó, caule e frutos, também não foi estatisticamente diferente quando comparados entre si (GRÁFICO 1). As folhas maduras apresentaram maior frequência de isolamento (100%), seguidas por folhas jovens (97%), frutos (94%), cipó (87%) e caule (65%), ou seja, todos os fragmentos de folhas maduras utilizados para o isolamento apresentaram fungos endofíticos, enquanto apenas 65% dos fragmentos de caule apresentaram isolados.

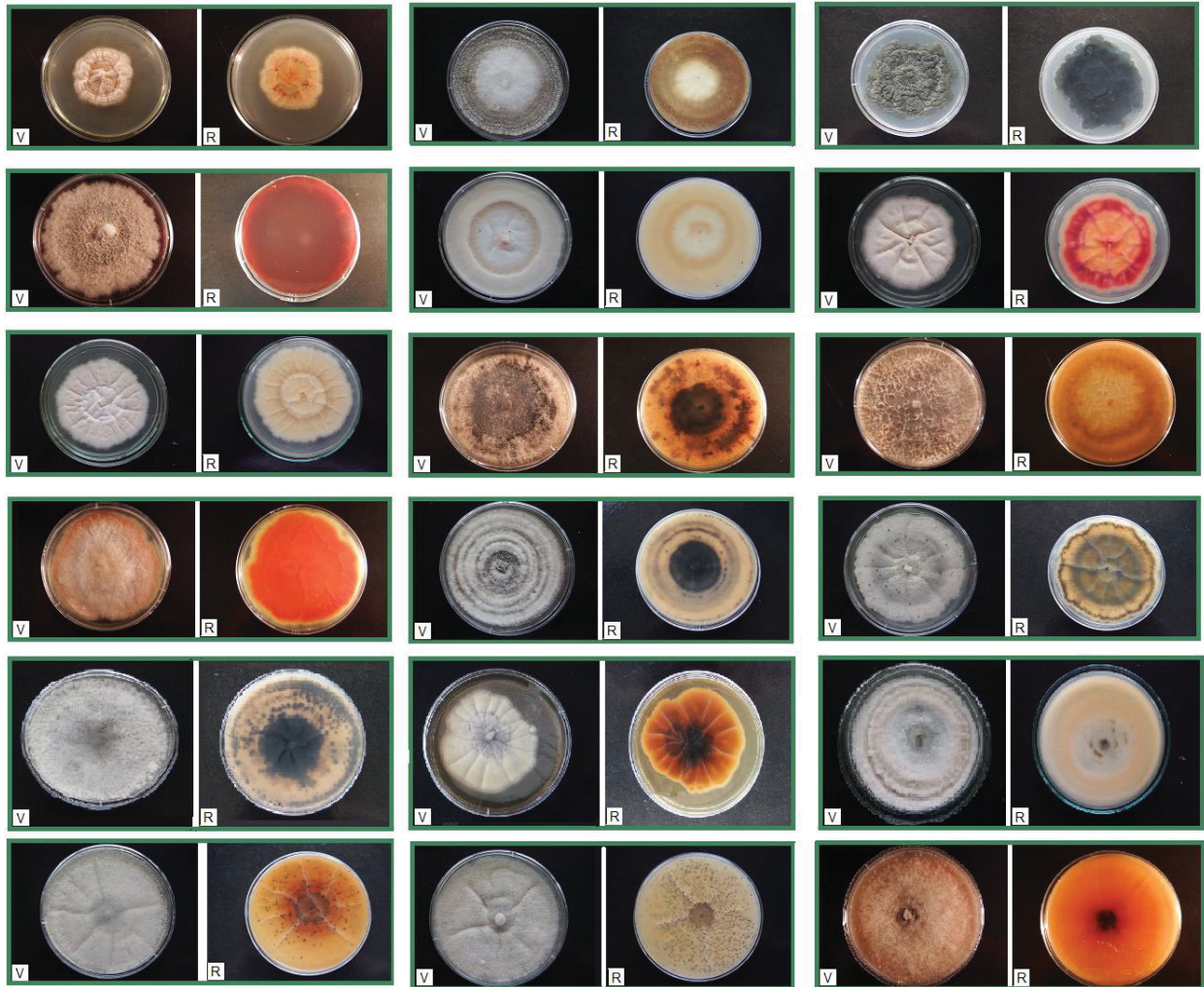
GRÁFICO 1 – NÚMERO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DAS DIFERENTES PARTES DE *A. triangularis*.



FONTE: O autor (2017)  
\* $p < 0.001$

As folhas, tanto jovens quanto maduras, demonstraram maior frequência de isolamento que os demais tecidos da planta, entretanto, quando comparadas frequência de isolamento de folhas jovens e folhas maduras, não foi observada diferença significativa. Diferente do que foi observado em palmeira *Trachycarpus fortunei* (Hook.), onde os pesquisadores descreveram uma frequência de isolamento muito maior em folhas maduras do que em folhas jovens (TAYLOR et al., 1999).

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DA DIVERSIDADE MORFOLÓGICA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Aristolochia triangularis*. V) VERSO DA PLACA. R) REVERSO DA PLACA.



FONTE: O autor (2017)

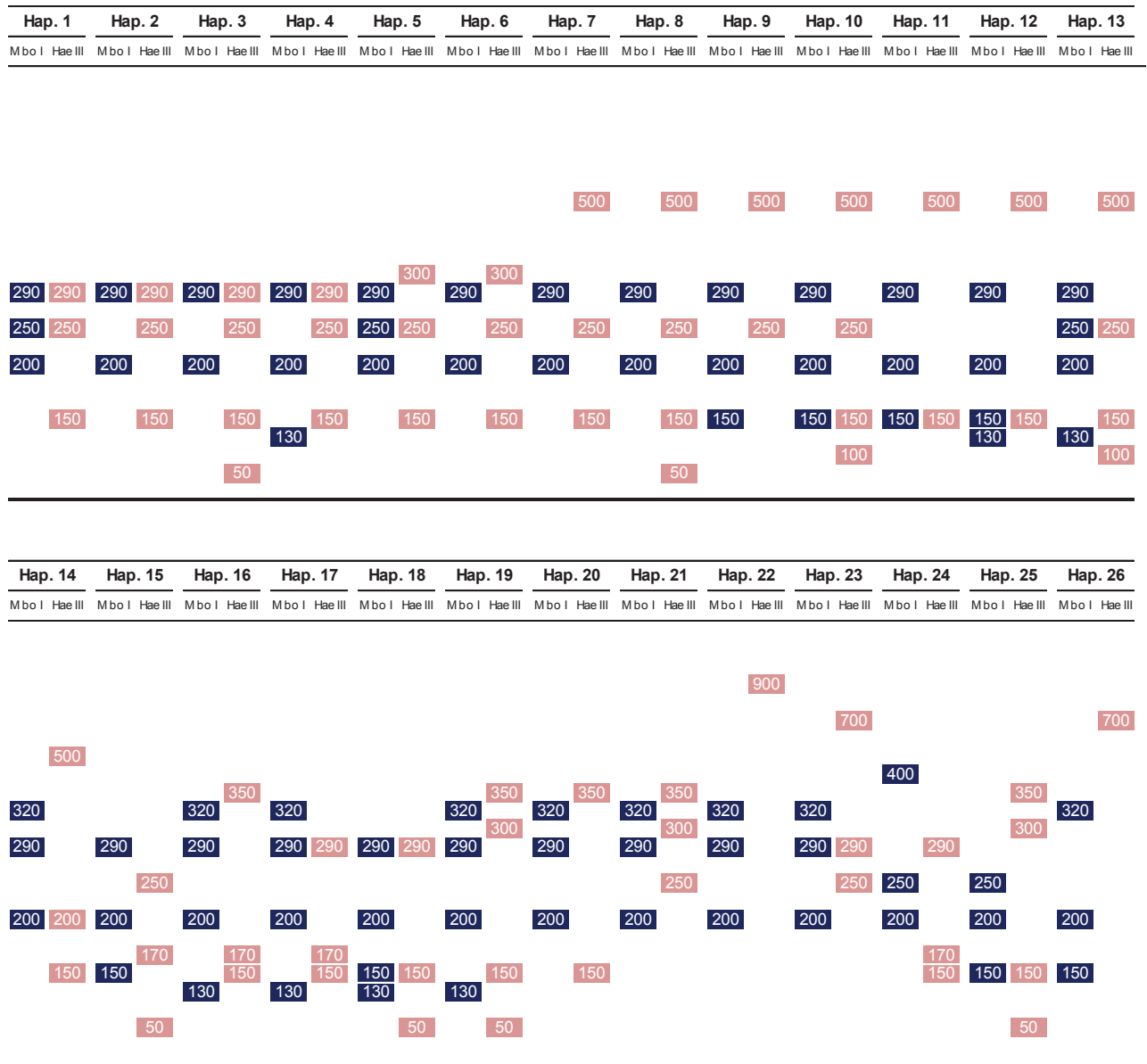
Diferenças na taxa colonização e isolamento de endófitos de *Pinus tabulaeforme* foram também detectadas pelos pesquisadores WANG e GUO (2007), que estudaram estas diferenças na casca e xilema da planta. WEARN et al. (2012), por sua vez, estudaram *Plantago lanceolata* L. e mostraram que houve diferença na colonização de diferentes tecidos da planta. Eles observaram diferença não apenas na abundância de isolados, mas também nas espécies colonizadoras, e estas diferenças foram atribuídas à época do ano em que a planta foi coletada, aos nutrientes presentes em determinados tecidos – o que faz com que algumas espécies colonizem especificamente as folhas, por exemplo –, a presença de micorrizas, dentre outros fatores. A umidade, a química do solo e a temperatura do

local onde a planta cresce, também são determinantes para a riqueza biológica de endófitos (GLYNOU et al., 2015; GIAUQUE e HAWKES., 2016).

## 5.2 ARDRA

Ao verificar tão grande diversidade morfológica dos fungos endofíticos de *A. triangularis* após o isolamento, escolhemos a técnica de ARDRA para realizar um agrupamento molecular dos isolados. Desta forma, após a extração do DNA dos isolados e a amplificação da região ITS do DNA ribossomal, a reação de ARDRA gerou 11 e 19 perfis de restrição diferentes pelas enzimas *Mbo I* e *Hae III*, respectivamente. Cada perfil de restrição, é composto por fragmentos de diferentes tamanhos (pares de bases - pb), visualizados em gel de agarose 2%. Estes perfis foram combinados (ANEXO 1) e demonstraram um total de 26 haplótipos, identificados 1 – 26 (FIGURA 5), demonstrando importante diversidade molecular entre os isolados, o que é significativamente maior que a encontrada por STUART et al. (2010), que descreveram 14 diferentes haplótipos de 300 fungos endofíticos isolados de monocultura de cana de açúcar. Esta diferença pode estar associada não apenas ao tipo de planta e local onde as mesmas foram coletadas, mas também ao fato de ser monocultura, o que influencia na quantidade de diferentes haplótipos encontrados. No nosso caso, a planta foi coletada em região de Mata Atlântica, amplamente conhecida por sua enorme biodiversidade (TABARELLI et al., 2010).

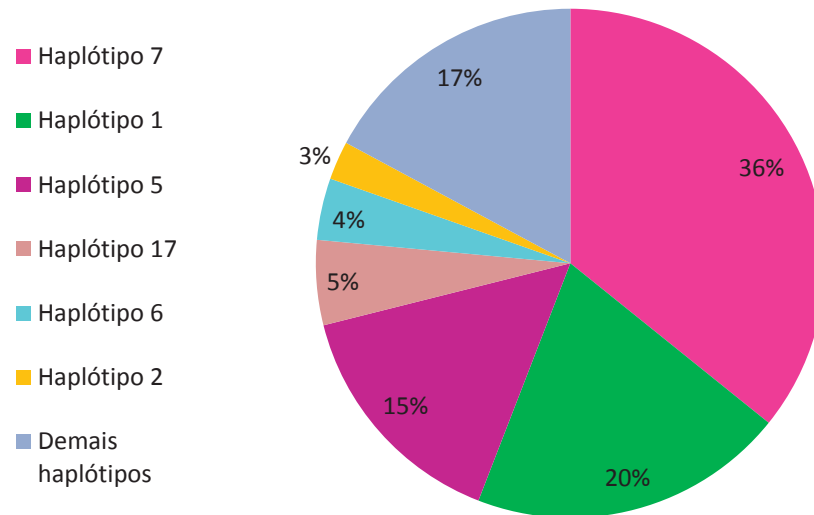
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DOS 26 DIFERENTES HAPLÓTIPOS E O TAMANHO DOS FRAGMENTOS, EM PARES DE BASE (pb), DE CADA HAPLÓTIPO, GERADOS APÓS DIGESTÃO DO AMPLICOM DA REGIÃO ITS COM AS ENZIMAS *MBO I* E *HAE III*.



FONTE: O autor (2017)

Dentre os haplótipos encontrados, os mais representativos foram o 7, ao qual estão inseridos 36% dos isolados, o haplótipo 1, que correspondeu a 20%, o 5 com 15%, 17 com 5%, 6 com 4 % e o haplótipo 2 com 3%. Os demais haplótipos, juntos (são eles: 3, 4, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 e 26) correspondem à 17% dos isolados (GRÁFICO 2).

GRÁFICO 2 – REPRESENTATIVIDADE DE HAPLÓTIPOS FRENTE AO NÚMERO DE ISOLADOS. OS DEMAIS HAPLÓTIPOS CORRESPONDEM, INDIVIDUALMENTE POR 0 – 2% DO TOTAL DE ISOLADOS.



FONTE: O autor (2017)

A técnica de ARDRA é amplamente utilizada para realizar agrupamento molecular de microrganismos pois é um método prático, simples e barato se comparado à outros métodos moleculares, como o sequenciamento direto, por exemplo (LV et al., 2015). REDECKER et al. (1997) demonstraram que utilizar a análise de restrição da região ITS foi uma alternativa valiosa para agrupar e caracterizar, fungos micorrizicos arbusculares baseando-se apenas em bibliotecas de padrões de restrição. Isto mostra que, este tipo de análise, pode nos fornecer importantes informações sobre comunidades microbianas, facilitando o agrupamento de organismos.

A variedade microbiana de diversas fontes, bem como outros organismos podem ser avaliados pelo método de ARDRA. Alguns exemplos foram as bactérias associadas à zonas agroecológicas, estudadas por VERMA et al. (2016). O grupo identificou de 19 - 27 diferentes padrões de haplótipos, de acordo com a zona de isolamento. Destes padrões, diferentes gêneros e espécies foram encontrados. SHINDE, PRASHANTI e KRISHNARAJ (2016), por sua vez, conseguiram distinguir dois gêneros de actinobactérias utilizando apenas uma enzima de restrição, e destacaram que a utilização da técnica de ARDRA foi capaz de distinguir espécies dentro de um gênero. VENKATACHALAM et al., (2016) avaliaram a diversidade de

cianobactérias presentes em diferentes filosferas de arroz e encontraram 25 padrões diferentes, que corresponderam à ao menos 23 diferentes espécies de cianobactérias. Bactérias entomopatogênicas também já foram avaliadas por esta técnica por SANGEETHA et al. (2016). Dos 18 isolados que o grupo avaliou, foram gerados 15 padrões diferentes correspondendo a 9 diferentes espécies.

Desta maneira verificamos que esta técnica é aplicável à diversos organismos diferentes, além de ser uma importante ferramenta de agrupamento molecular de isolados.

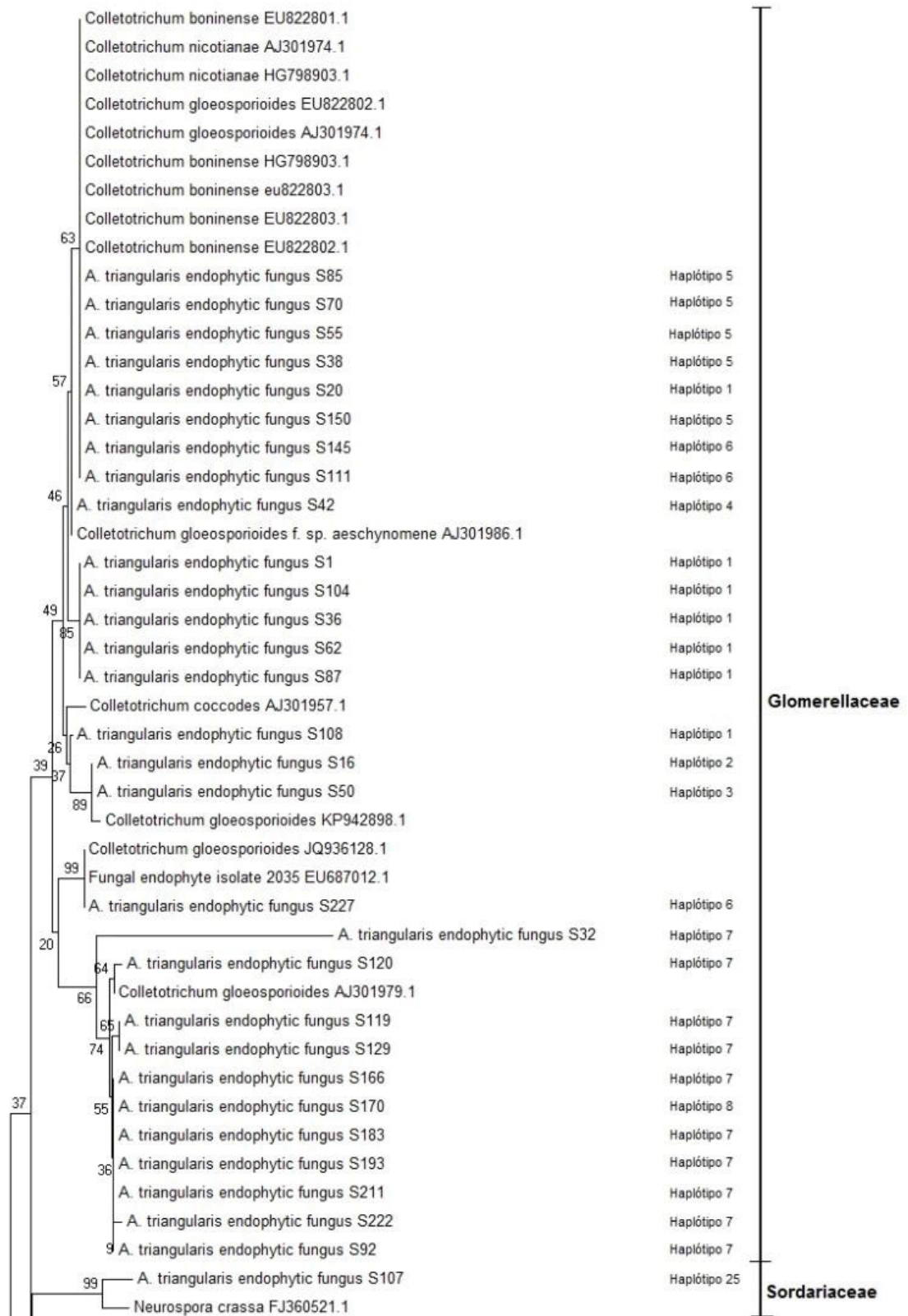
### 5.3 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS

Na análise de ARDRA foram encontrados 26 diferentes padrões de haplótipos dos fungos endofíticos de *A. triangularis*. 10% dos isolados de cada padrão (50 isolados no total) foram selecionados para o sequenciamento da região ITS. A comunidade endofítica é um grupo de organismos facilmente adaptáveis a diversos ecossistemas e, devido a isso, podemos observar os mesmo gêneros e espécies em diversas plantas e ecossistemas. Desta forma, para obter o completo conhecimento sobre tal, faz-se necessário a utilização de técnicas tradicionais e moleculares (SUN e GUO, 2012).

Dos isolados sequenciados, pudemos identificar alta similaridade genética com os gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Xylaria*, *Trichoderma*, *Nectria*, *Phomopsis*, *Stenocarpella*, *Phylosticta*, *Ascochyta*, *Neurospora*, *Gibberella*, *Yarrowia* e *Botryosphaeria* (FIGURA 6). Gêneros como *Colletotrichum* e *Botryosphaeria* já foram descritos como endófitos isolados do louro (*Laurus nobilis*), na Turquia por GÖRE e BUCAK (2007). Endófitos dos gêneros *Colletotrichum* e *Trichoderma* foram isolados de plantações orgânicas de café (*Coffea arabica*) (BONGIORNO et al., 2016) e da flor *Arabidopsis thaliana* por GARCÍA et al., (2013), *Fusarium* sp. de milho (*Zea mays*) (PIMENTEL et al., 2016) e *Xylaria* de café (SAUCEDO-GARCIA et al., 2014).

FIGURA 6 – ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSTRUIDA ATRAVÉS DO MÉTODO DE NEIGHBOR-JOINING, OBTIDA APÓS ANÁLISE DAS SEQUENCIAS DO GENE ITS DOS 50 ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *A. triangularis*.

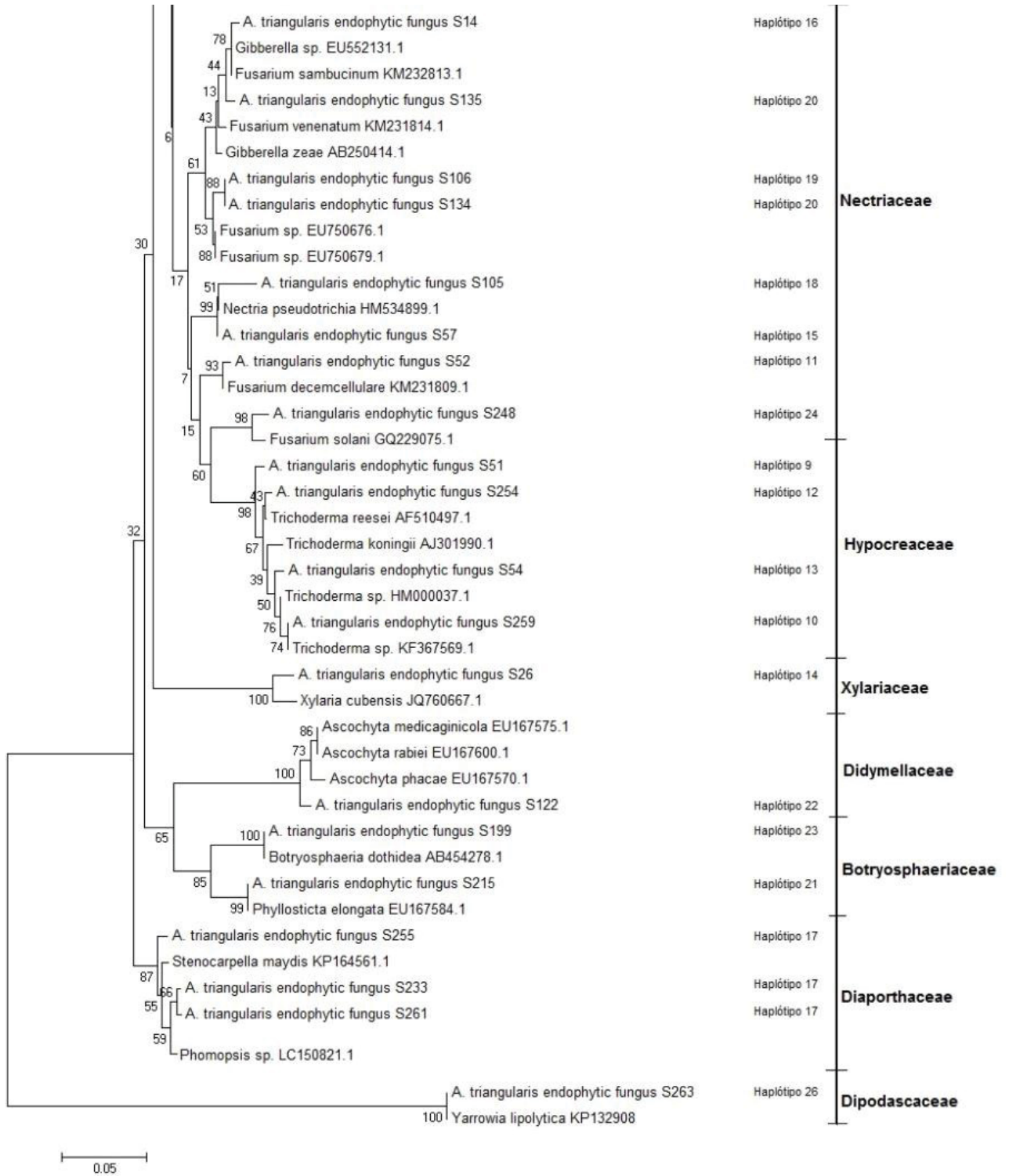
Continua



FONTE: O autor (2017)

FIGURA 6 – ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSTRUIDA ATRAVÉS DO MÉTODO DE NEIGHBOR-JOINING, OBTIDA APÓS ANÁLISE DAS SEQUENCIAS DO GENE ITS DOS 50 ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *A. triangularis*.

Conclusão



FONTE: O autor (2017)

Podemos observar (FIGURA 6) que o gênero que demonstrou maior abundância foi *Colletotrichum* (58% dos isolados). Este gênero já foi associado à diversas atividades biológicas importantes como por exemplo, atividade antimicrobiana, descrita por WANG et al., (2016a), eles detectaram a produção de tres novos compostos por um fungo endofítico *Colletotrichum* sp. BS4, isolado de *Bruxus sinica* (planta utilizada na medicina tradicional chinesa para tratamento de doenças como sífilis e malária). Estes compostos, denominados colletotricona A, B e C, demonstraram ação inibitória contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. SHANKAR et al. (2003), descreveram a utilização de um fungo endofítico do gênero *Colletotrichum*, isolado do gerânio (*Pelargonium graveolens*), flor ornamental e medicinal, para produção de nanopartículas. Neste caso, os pesquisadores observaram que ambos planta e endófito são capazes de reduzir íons de cloroaurato em nanopartículas de ouro. Outro endófito do gênero *Colletotrichum*, isolado da planta conhecida popularmente como abre-caminho (*Justicia gendarussa*), foi descrito produzindo a substância anticâncerígena Taxol, além de seus metabólitos demonstrarem atividade apoptótica *in vitro* contra linhagens celulares de câncer humano (GANGADEVI e MUTHUMARY, 2008). Nos achados de MONGGOOT et al. (2017), o isolado endofítico do gênero *Colletotrichum* foi capaz de produzir diversos compostos bioativos voláteis com aplicação na perfumaria e cosmética. A atividade biológica do gênero *Colletotrichum* vai além.

HIRUMA et al. (2016) descreveram a capacidade de um fungo endofítico *Colletotrichum* sp., isolado da flor *Arabidopsis thaliana*, promover o crescimento da planta. Estudos como estes chamam nossa atenção, uma vez que obtivemos diversos isolados deste gênero, e podemos observar quão ampla é sua capacidade de produzir importantes achados.

O segundo gênero mais expressivo foi *Fusarium* (14% dos isolados) o qual também possui ampla atividade biológica descrita. Em (2006) VU, HAUSCHILD e SIKORA demonstraram que isolados endofíticos do gênero *Fusarium* possuíam a capacidade de diminuir a penetração do nematóide *Radopholus similis*, nas folhas de banana (planta hospedeira), através da indução de resistência sistêmica. SHEN et al. (2016) isolaram os compostos de extratos fermentados de uma estirpe de *Fusarium*, endófito da planta ornamental e medicinal *Chlorantus multistachys*, e detectaram atividade antagonista contra diversas espécies de fungos fitopatogênicos

como *Alternaria brassicae* (patógeno de couve e brócolis), *Penicillium digitatum* (importante patógeno de citrus) e *Verticillium albo-atrum* (patógeno de diversas plantas).

Além da atividade antagonista, o gênero *Fusarium*, também possui isolados produtores de camptotecina, importante droga anticancerígena (SHWETA et al., 2010), podophyllotoxina, um lignano utilizado como precursor na síntese química de etoposídeo, droga utilizada também no tratamento do câncer (KOUR et al., 2008), javanicina, um policetídeo que foi capaz de produzir atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium phlei* (ALVIN et al., 2016), dentre outros.

Desta forma, observamos que os dois gêneros mais abundantes que encontramos neste trabalho possuem atividade antagonista contra diversos patógenos de humanos e plantas, são capazes de produzir metabólitos bioativos que favorecem o crescimento da planta, metabólitos anticancerígenos, dentre outros que podem ser aplicados em áreas que vão da cosmética à medicina.

A análise filogenética (FIGURA 6) demonstrou a presença de 9 famílias distintas, são elas: Glomerellaceae, Sordariaceae, Nectriaceae, Hypocreaceae, Xylariaceae, Didymelaceae, Botryosphaeriaceae, Diaporthaceae e Dipodascaceae. Pudemos observar que em cada família, há presença de isolados de diferentes haplótipos, entretanto o oposto não ocorre, ou seja, cada haplótipo está concentrado dentro de apenas uma família. O que reforça a importância do agrupamento gerado pela técnica de ARDRA (ANEXO 1). Podemos afirmar então, que esta técnica, quando aplicada aos fungos endofíticos de *A. triangularis* foi capaz de separar famílias distintas. Quando trata-se de gênero e espécie, observamos que o mesmo gênero e, em alguns casos, a mesma espécie, foram agrupados em haplótipos diferentes. STROYKE, EGGER e CURRAH (1992) explicam que podem ocorrer fragmentos de tamanhos diferentes em organismos da mesma espécie, devido a presença de íntrons, além disso, a enzima de restrição pode reconhecer seu sítio de clivagem em locais muito variáveis do gene. Entretanto, alguns autores afirmam que este polimorfismo é muito maior entre espécies do dentro de uma mesma espécie (EGGER et al., 1991).

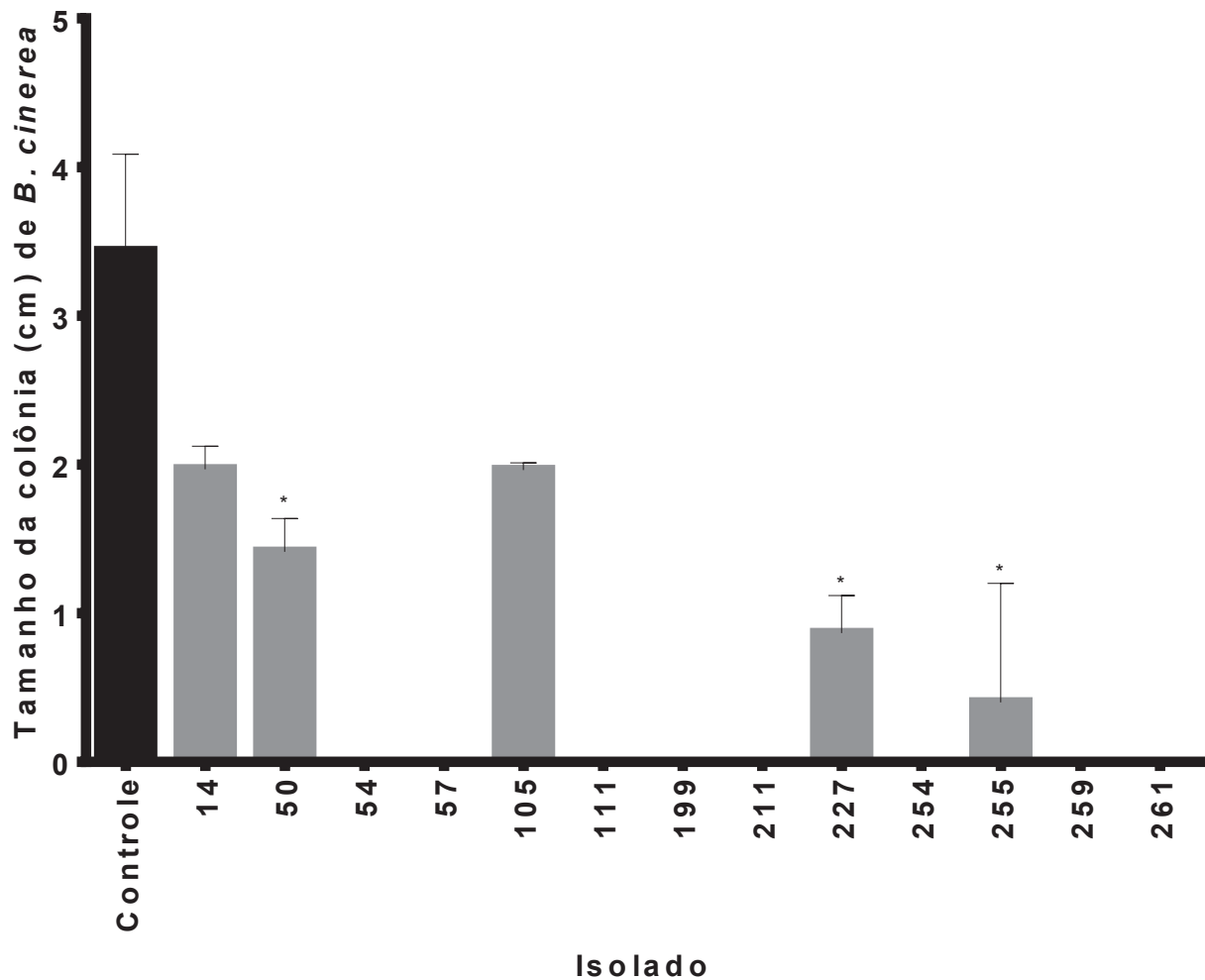
O índice de Shannon ( $H'$ ) calculado com base nos gêneros isolados, agrupados por ARDRA e sequenciados, correspondentes a cada parte da planta, demonstrou maior diversidade no cipó ( $H'$  : 1.4402), seguido pelo fruto ( $H'$ : 1.0035), caule ( $H'$  : 0.7889), folhas maduras ( $H'$  : 0.2378), e, por fim, as folhas jovens ( $H'$ :

0.2074). Isto ocorre pois, apesar de o cipó ter apresentado menor frequência de isolamento que as folhas maduras, por exemplo (cipó - 87%, folhas maduras - 100%), os isolados estão distribuídos em um maior número de gêneros e haplótipos, indicando uma diversidade molecular maior. Esta diferença também foi observada por OONO et al. (2015), eles compararam a frequência de isolamento e diversidade de fungos endofíticos em mudas e plantas maduras de *Pinus taeda* e verificaram que, apesar de as mudas possuírem uma menor frequência de isolamento, a diversidade foi maior do que o encontrado em plantas maduras.

#### 5.4 TESTE DE ANTAGONISMO *IN VITRO*

Treze isolados foram capazes de controlar o desenvolvimento do fitopatógeno *B. cinerea* apresentando diferença estatística quando comparados com o controle ( $p < 0,0001$ ) (GRÁFICO 3 – FIGURA 7), foram eles: 14, 50, 54, 57, 105, 111, 199, 211, 227, 254, 255, 259 e 261, pertencentes aos gêneros *Trichoderma* (isolados 54, 254 e 259), *Colletotrichum* (isolados 50, 111, 211 e 227), *Botryosphaeria* (isolado 199), *Stenocarpella* (isolado 255), *Nectria* (isolados 57 e 105), *Phomopsis* (isolado 261) e *Gibberella* (isolado 14). Podemos observar que os isolados 14 e 105, foram capazes de inibir o crescimento do patógeno em até 30%. Os isolados 50, 227 e 255 reduziram o crescimento do patógeno em mais de 50% e os demais isolados (54, 57, 111, 199, 211, 254, 259 e 261) foram capazes de inibir completamente seu desenvolvimento, sendo a maioria destes, do gênero *Trichoderma*.

GRÁFICO 3 – ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *A. triangularis* QUE APRESENTARAM AÇÃO ANTAGONISTA CONTRA *B. cinerea*.



FONTE: O autor (2017)

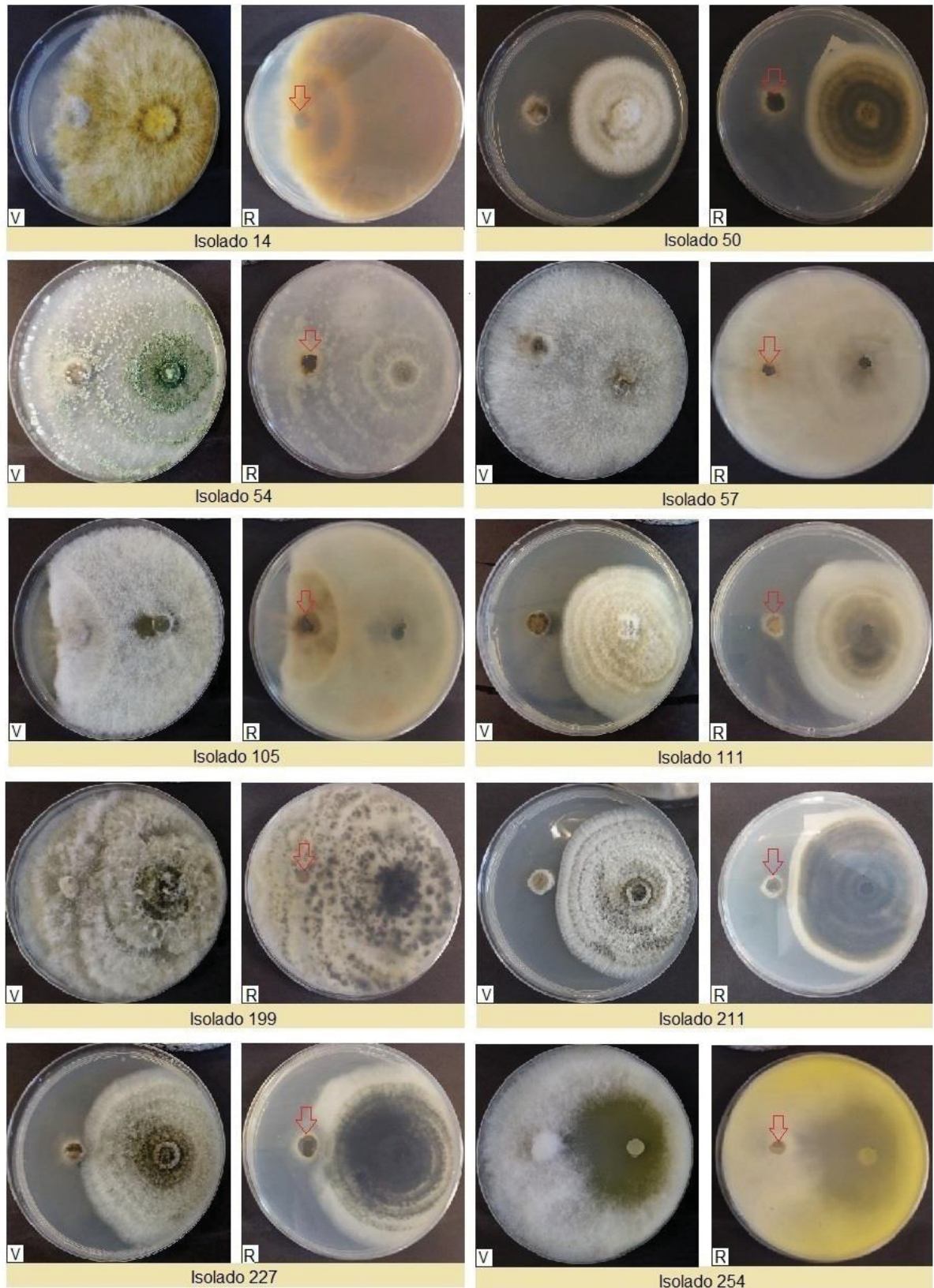
\*Inibição maior de 50%

A inibição observada pode estar ocorrendo através da competição por nutrientes, parasitismo direto e pela produção de metabólitos secundários. (JAMALIZADEH et al., 2011).

O gênero *Trichoderma* é amplamente conhecido por seu potencial no controle biológico, por produzir diversas enzimas líticas extracelulares degradadoras de parede celular e metabólitos secundários bioativos.

FIGURA 7 – ISOLADOS QUE PROMOVERAM O CONTROLE DO FUNGO FITOPATOGÊNICO *B. cinerea* APÓS SETE DIAS DE CULTIVO EM ÁGAR BDA À 28°C, EM CULTURA PAREADA. ÂNGULO DE OBSERVAÇÃO DA PLACA: V) VERSO, R) REVERSO. A SETA VERMELHA INDICA O FITOPATÓGENO.

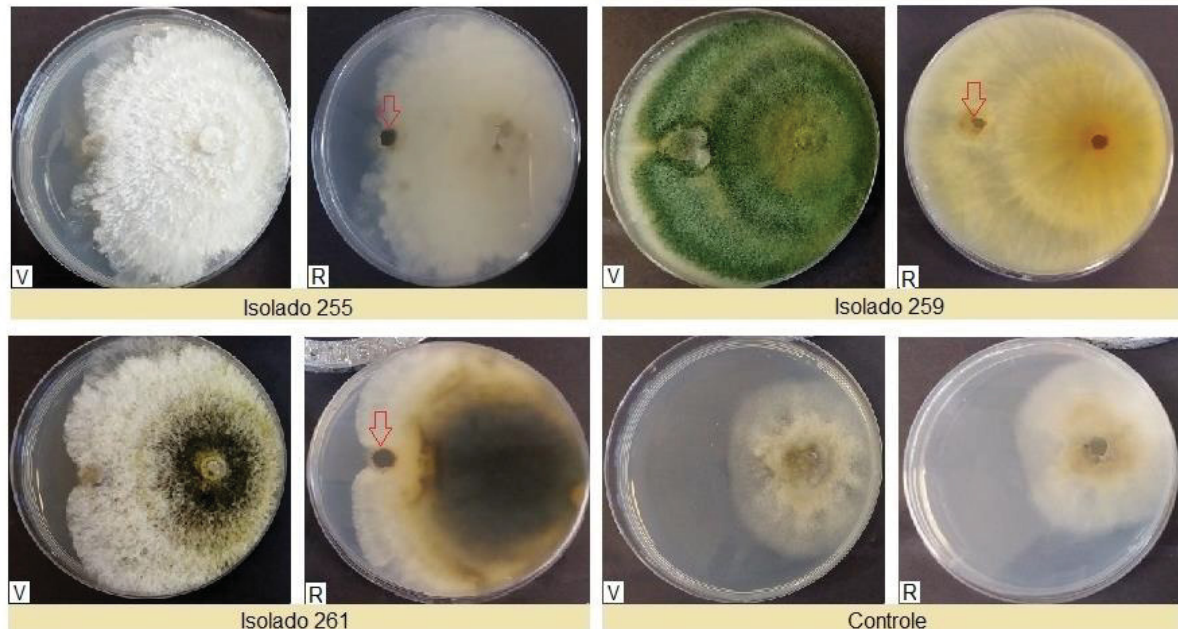
Continua



FONTE: O autor (2017)

FIGURA 7 – ISOLADOS QUE PROMOVERAM O CONTROLE DO FUNGO FITOPATOGÊNICO *B. cinerea* APÓS SETE DIAS DE CULTIVO EM ÁGAR BDA À 28°C, EM CULTURA PAREADA. ÂNGULO DE OBSERVAÇÃO DA PLACA: V) VERSO, R) REVERSO. A SETA VERMELHA INDICA O FITOPATÓGENO.

Continuação



FONTE: O autor (2017)

A parede celular de muitos fungos é composta por  $\beta$ -(1-3) glucana e quitina, e a produção de enzimas líticas, faz com que estes polissacarídeos sejam hidrolizados, facilitando o micoparasitismo e a ação de outros metabólitos secundários eventualmente produzidos pelo fungo antagonista (MELO, 2000). SARAVANAKUMAR et al. (2016) estudaram 100 fungos do gênero *Trichoderma* isolados de solo em sua capacidade de promover o controle biológico de uma linhagem fitopatogênica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (FOC), patógeno de pepino (*Cucumis sativus*) *in vitro* e *in vivo*, e também a capacidade de produzir enzimas degradadoras de parede celular como a quitinase, protease e  $\beta$ -(1-3) glucanase. Dos isolados testados apenas 10 apresentaram potencial inibitório *in vitro* acima de 85% e apenas um isolado foi capaz de controlar a doença causada por FOC *in vivo*. Este mesmo isolado demonstrou melhor resultado no teste de produção de enzimas, apresentando 87% de atividade da enzima quitinase, 53% da enzima protease, 85% da celulase e 60% da  $\beta$ -(1-3) glucanase. Na visão dos autores, a produção destas enzimas pode desenvolver um importante papel no controle biológico apresentado, pois são capazes de degradar ou hidrolizar a parede

celular de fungos fitopatogênicos inibindo seu crescimento. ALAMRI et al., (2016), otimizaram a produção de quitinase, glucanase e protease em um isolado de *Trichoderma*, e associaram a produção destas enzimas ao sucesso em promover o controle biológico de fitopatógenos. Tal produção foi otimizada alterando fontes de carbono e nitrogênio, bem como o pH e o tempo de incubação.

Além de sua capacidade de produzir diversas enzimas importantes para o biocontrole, o gênero *Trichoderma* também é capaz de produzir metabólitos secundários, muitos dos quais estão envolvidos no controle biológico de fungos fitopatogênicos. Na revisão realizada por REINO et al. (2008), estão contidas as principais moléculas bioativas produzidas pelo gênero: antraquinonas, sesquiterpenos, pironas, konigininas, trichodermamidas, viridinas, viridiofunginas, componentes de nitrogênio heterocíclico, trichodenonas, azafilona, dicetopiperazinas, estatinas, dentre diversas outras. Todas estas moléculas possuem importantes funções metabólicas e, algumas delas, estão envolvidas no controle biológico de fungos fitopatogênicos.

O gênero *Trichoderma* é um dos mais estudados em termos de controle biológico e o mecanismo de ação do biocontrole realizado pelos fungos deste gênero são muito amplos, podendo ocorrer através do micoparasitismo, da competição por nutrientes e da antibiose, sendo que todas estas formas de controle, envolvendo o gênero, estão bem elucidadas (VERMA et al., 2007).

Podemos observar que nas placas dos isolados 111 e 211 (FIGURA 7), pertencentes ao gênero *Colletotrichum*, o fitopatógeno *B. cinerea* ao crescer sobre o plug e atingir o meio de cultura não foi capaz de continuar crescendo, sugerindo a produção de metabólitos secundários bioativos (por parte dos isolados), que se difundem ao meio de cultura e impedem o desenvolvimento do patógeno. Diversas vezes os metabólitos isolados do gênero *Colletotrichum* demonstraram atividade antagonista contra patógenos. ZOU et al., (2000), descreveram o metabólito antimicrobiano ácido colletotrico, capaz de inibir o crescimento de bactérias patogênicas como *Bacillus subtilis* na concentração de 25 µg/mL, *Staphylococcus aureus* (50 µg/mL) e *Sarcina lutea* (50 µg/mL), e também o fungo fitopatogênico *Helminthosporium sativum* (50 µg/mL). LU et al. (2000) isolaram fungos endofíticos do gênero *Colletotrichum*, de losna (*Artemisia annua*), e testaram sua atividade antimicrobiana contra alguns patógenos. Eles verificaram que os metabólitos produzidos pelos isolados possuíam atividade antifúngica contra *Candida albicans* e

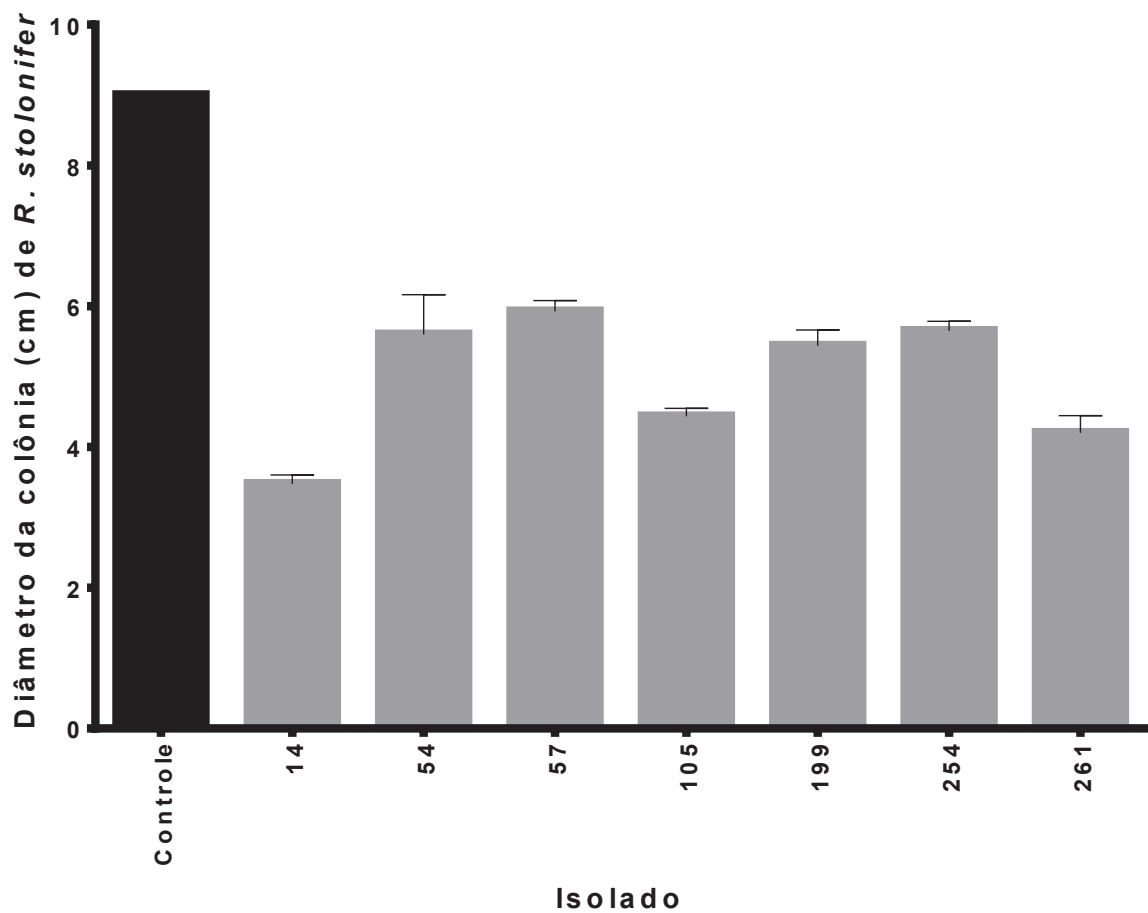
*Aspergillus niger*, e atividade fungistática contra os fungos fitopatogênicos *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia cereales* e *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Mais recentemente CHAPLA et al. (2014) identificaram um novo metabólito secundário de um *Colletotrichum* sp. isolado como endofítico de *Michelia champaca*, e este metabólito demonstrou atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*. Além da produção de metabólitos bioativos, a produção de enzimas degradadoras de parede celular, como a quitinase, também já foi descrita (SOUZA et al., 2004), demonstrando a ampla aplicação do gênero *Colletotrichum* no controle de fitopatógenos.

Outro gênero que apresentou atividade antagônica contra os fungos fitopatogênicos *B. cinerea* e *R. stolonifer* foi *Botryosphaeria*. Isolados deste gênero demonstraram ser capazes de produzir enzimas degradadoras de parede celular, como lacase, pectinase e  $\beta$ -1,3-glucanase (SALDANHA et al., 2007). Além disso, em um estudo conduzido por ABDON et al. (2010), foram isolados deste gênero quatro compostos bioativos, denominados Botriorhodine A – D. Os compostos Botriorhodine A e B, demonstraram atividade antifúngica contra os fungos patogênicos *Aspergillus terreus* e *Fusarium oxysporum*.

Os demais gêneros dos isolados de *A. triangularis*, capazes de promover ação inibitória nos fitopatógenos do morango, já foram descritos como produtores de metabólitos secundários com ação fungicida. WICKLOW et al. (2011), descreveram a produção de chaetoglobosina K em *Stenocarpella* sp., o qual demonstrou atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*. O agente antimicrobiano Phomopsichalasin, isolado de um fungo endofítico do gênero *Phomopsis*, demonstrou ação inibitória contra *Candida tropicalis* (HORN et al., 1995). Outras citocalasinas isoladas de *Phomopsis* sp. demonstraram ação contra fungos fitopatogênicos como *Rhizoctonia cereales*, *Bipolaris sorokiniana* e *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (FU et al., 2011). O gênero *Gibberella* demonstrou potencial inibitório contra o fungo patógeno de humanos *Candida albicans*, e contra os fungos fitopatogênicos *Aspergillus flavus*, *Geotrichum candidum*, *Ceratocystis fimbria* e *Rhizoctonia solani* (QADRI et al., 2013). E por fim, o gênero *Nectria* foi descrito promovendo ação antagonista contra *Candida albicans* e *Penicillium avellaneum*, além de inibir as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (BANHOS et al., 2014).

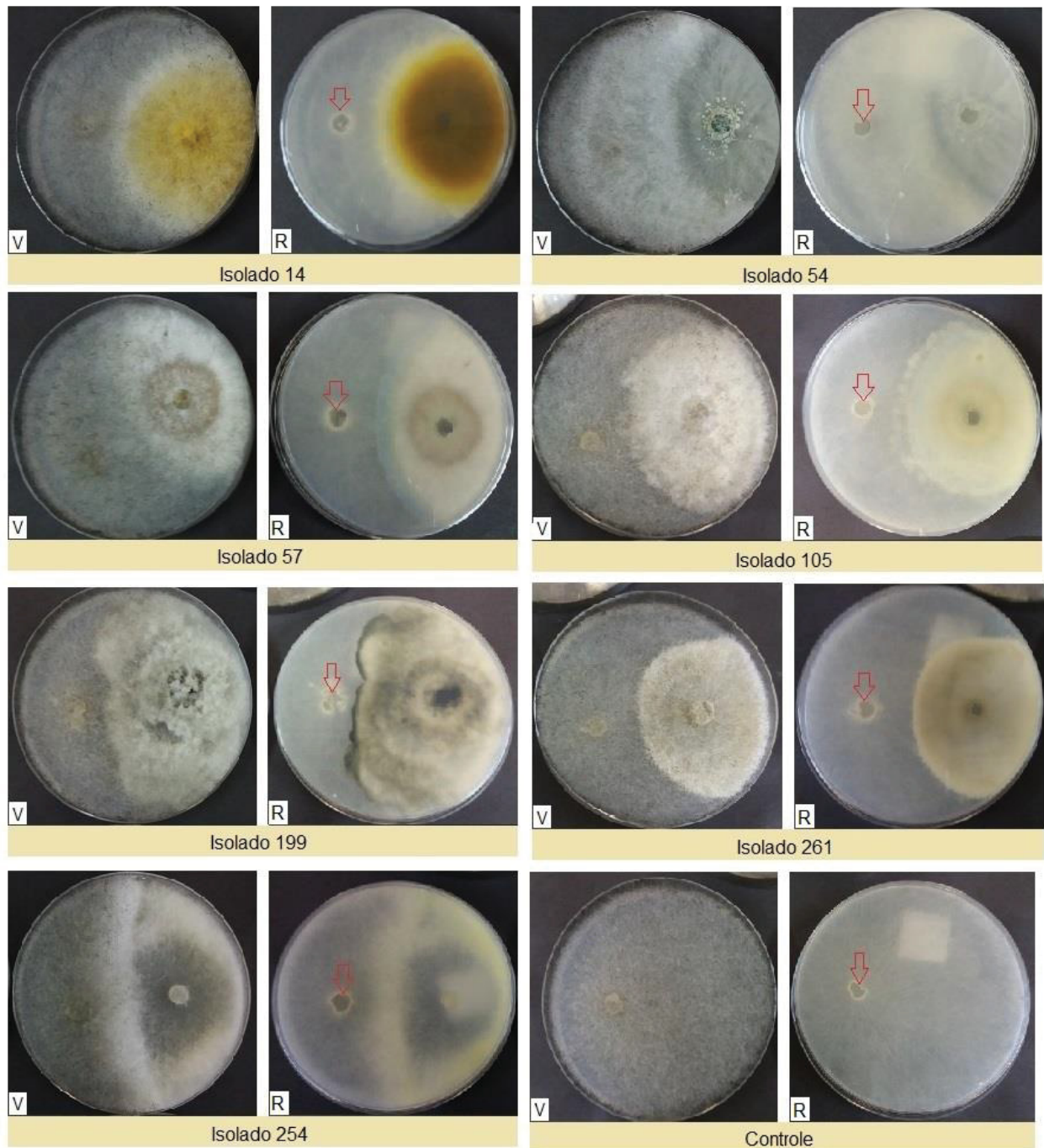
Sete isolados foram capazes de promover atividade antagonista contra o fungo fitopatogênico *R. stolonifer* (GRÁFICO 4 – FIGURA 8) apresentando diferença estatística quando comparados com o controle ( $p < 0,0001$ ), identificados como: 14, 54, 57, 105, 199, 254 e 261. Todos haviam demonstrado ação antagonista anteriormente contra o fungo fitopatogênico *B. cinerea*.

GRÁFICO 4 – ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *A. triangularis* QUE APRESENTARAM AÇÃO ANTAGONISTA CONTRA *R. stolonifer*.



FONTE: O autor (2017)

FIGURA 8 – ISOLADOS QUE PROMOVERAM O CONTROLE DO FUNGO FITOPATOGÊNICO *R. stolonifer* APÓS SETE DIAS DE CULTIVO EM CULTURA PAREADA. ÂNGULO DE OBSERVAÇÃO DA PLACA: V) VERSO, R) REVERSO. A SETA VERMELHA INDICA O FITOPATÓGENO.



FONTE: O autor (2017)

A podridão de *Rhizopus*, causada pelo fungo fitopatogênico *R. stolonifer*, e o mofo cinzento, causado por *B. cinerea*, são duas das principais doenças de pós colheita da cultura do morango, facilmente disseminadas pelo ar ou por insetos, e muito difíceis de controlar (JARVIS, 1962; TANAKA, BETTI e KIMATI, 1997).

Inicialmente acreditava-se que estes fungos apenas poderiam penetrar através de lesões nos frutos, entretanto, alguns estudos vem mostrando que eles são capazes de produzir diversas enzimas como amilases, pectinases e celulases (TANG et al., 2012; ABUQAMAR, MOUSTAFA e TAN, 2017), que são capazes de danificar a parede celular do fruto permitindo a penetração do patógeno.

NGUYEN-THE E CHAMEL (1991) avaliaram o potencial do patógeno *Rhizopus stolonifer*, degradar a membrana cuticular (*in vitro*) e a da epiderme (*in vivo*) de nectarinas. Neste estudo o fungo não foi capaz de aumentar a permeabilidade cuticular, entretanto, causou deterioração na epiderme do fruto, que foi atribuída à produção de enzimas pectinolíticas. Nos experimentos conduzidos por BAGGIO et al., (2016), *R. stolonifer* se mostrou capaz de penetrar no fruto sem lesões quando os esporos eram germinados em uma fonte nutritiva externa. Ou seja, quando os esporos inoculados foram germinados em água destilada, o fungo não foi capaz de penetrar nos frutos, entretanto quando os esporos haviam sido germinados em solução nutritiva, tais esporos foram capazes de penetrar no fruto sem que houvesse um ferimento inicial. Além disso, eles descreveram a produção de esterases, principalmente a cutinase, a qual estava diretamente ligada à penetração do esporo em frutos não lesionados, uma vez que ao inibir estas esterases, o fungo teve sua capacidade de penetração inibida.

O fungo fitopatogênico *B. cinerea*, por sua vez, possui diversos mecanismos de penetração no hospedeiro, dentre os quais estão incluídos a secreção de metabólitos fitotóxicos, como o botrydial que mata as células do hospedeiro; uma explosão oxidativa que ocorre durante a penetração na cutícula do hospedeiro o que faz com que a planta acumule mais espécies reativas de oxigênio (ROS), facilitando a penetração do patógeno; a secreção de enzimas que degradam a parede celular das plantas, como a celulase e a produção de ácido oxálico, que está envolvido na acidificação da membrana, aumentando a atividade enzimática (VAN KAN, 2006). Desta forma, voltamos a salientar a importância da produção de proteases por parte dos isolados, como no caso do *Trichoderma* sp., por exemplo (SARAVANAKUMAR et al., 2016), uma vez que estas enzimas potencialmente degradam amilases, pectinases e celulases - enzimas utilizadas pelo patógeno, para penetrar no hospedeiro -, podendo diminuir ou até impedir o desenvolvimento da doença no campo.

Com base nos resultados obtidos podemos afirmar que os fungos endofíticos isolados de *A. triangularis* são capazes de reduzir e até inibir o crescimento dos fungos fitopatogênicos do morango *B. cinerea* e *R. stolonifer*. Alguns dos isolados apresentaram inibição total do patógeno (GRÁFICO 3), indicando a presença de metabólitos secundários no meio de cultura, secretados pelos isolados endófitos. Os fungos isolados de *A. triangularis* são capazes de promover o controle biológico destas doenças, entretanto o tipo de controle envolvido neste processo ainda precisa ser entendido.

### 5.5 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE PKS I

Dos 263 isolados testados para a presença do gene PKS, houve amplificação do gene utilizando os iniciadores LC1/LC2c em 65 isolados. Para os iniciadores LC3/LC5c apenas 8 isolados apresentaram a presença de banda na amplificação por PCR (TABELA 1).

TABELA 1 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE PKS NOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *A. triangularis*. AMPLIFICAÇÃO COM LC1/2c) DESTACADO EM AMARELO, LC3/5c) DESTACADO EM AZUL.

Continua											
Isol.	LC1/2c	LC3/5c	Isol.	LC1/2c	LC3/5c	Isol.	LC1/2c	LC3/5c	Isol.	LC1/2c	LC3/5c
1	-	-	67	-	-	133	-	-	199	+	-
2	+	-	68	-	-	134	-	-	200	-	-
3	+	-	69	+	-	135	-	-	201	-	-
4	+	-	70	+	-	136	-	-	202	-	-
5	+	-	71	+	-	137	-	-	203	-	-
6	+	-	72	+	-	138	-	-	204	-	-
7	+	-	73	+	-	139	-	-	205	-	-
8	+	-	74	+	+	140	-	-	206	-	-
9	+	-	75	+	-	141	-	-	207	-	-
10	+	-	76	+	+	142	-	-	208	-	-
11	+	-	77	+	-	143	-	-	209	-	-
12	-	-	78	+	-	144	-	-	210	-	-
13	-	-	79	+	-	145	-	-	211	-	-
14	+	-	80	-	-	146	-	-	212	-	-
15	+	-	81	-	-	147	-	-	213	-	-
16	+	-	82	+	+	148	-	-	214	-	-
17	+	-	83	-	-	149	-	-	215	-	-
18	-	-	84	+	-	150	-	-	216	-	-
19	-	-	85	+	-	151	-	-	217	-	-
20	+	-	86	-	-	152	-	-	218	-	-
21	+	-	87	-	-	153	-	-	219	-	-
22	+	-	88	-	-	154	-	-	220	-	-
23	-	-	89	-	-	155	-	-	221	-	-
24	-	-	90	+	-	156	-	-	222	-	-
25	+	-	91	-	-	157	-	-	223	-	-

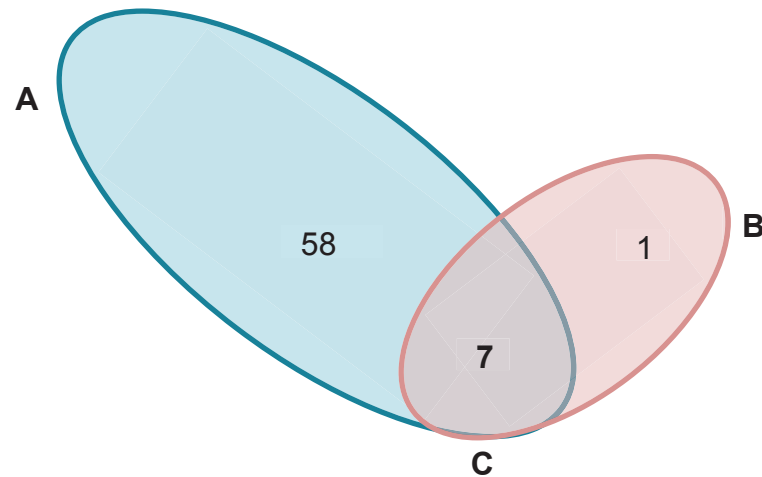
TABELA 1 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE PKS NOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *A. triangularis*.  
AMPLIFICAÇÃO COM LC1/2c) DESTACADO EM AMARELO, LC3/5c) DESTACADO EM AZUL.

											Conclusão	
Isol.	LC1/2c	LC3/5c	Isol.	LC1/2c	LC3/5c	Isol.	LC1/2c	LC3/5c	Isol.	LC1/2c	LC3/5c	
28	-	-	94	-	-	160	-	-	226	-	-	
29	-	-	95	-	-	161	-	-	227	-	-	
30	+	-	96	+	+	162	-	-	228	-	-	
31	-	-	97	+	-	163	-	-	229	-	-	
32	+	-	98	+	-	164	-	-	230	-	-	
33	+	-	99	+	-	165	-	-	231	-	-	
34	+	-	100	+	-	166	-	-	232	-	-	
35	+	-	101	+	-	167	-	-	233	+	-	
36	-	-	102	+	-	168	-	-	234	-	-	
37	-	-	103	+	-	169	-	-	235	-	-	
38	-	-	104	-	-	170	-	-	236	-	-	
39	-	-	105	-	+	171	-	-	237	-	-	
40	-	-	106	-	-	172	-	-	238	-	-	
41	-	-	107	-	-	173	-	-	239	-	-	
42	-	-	108	+	-	174	-	-	240	-	-	
43	-	-	109	+	+	175	-	-	241	-	-	
44	-	-	110	+	-	176	-	-	242	-	-	
45	+	-	111	-	-	177	-	-	243	-	-	
46	-	-	112	+	-	178	-	-	244	-	-	
47	-	-	113	-	-	179	-	-	245	-	-	
48	-	-	114	-	-	180	-	-	246	-	-	
49	-	-	115	-	-	181	-	-	247	-	-	
50	+	-	116	-	-	182	-	-	248	-	-	
51	-	-	117	-	-	183	-	-	249	+	-	
52	-	-	118	-	-	184	-	-	250	-	-	
53	-	-	119	-	-	185	-	-	251	+	-	
54	-	-	120	-	-	186	-	-	252	+	-	
55	-	-	121	-	-	187	-	-	253	-	-	
56	-	-	122	-	-	188	-	-	254	-	-	
57	-	-	123	-	-	189	-	-	255	+	-	
58	+	-	124	-	-	190	-	-	256	+	-	
59	+	-	125	+	-	191	-	-	257	-	-	
60	-	-	126	-	-	192	-	-	258	-	-	
61	+	-	127	+	-	193	-	-	259	-	-	
62	-	-	128	-	-	194	-	-	260	+	-	
63	-	-	129	-	-	195	-	-	261	+	-	
64	+	-	130	+	-	196	-	-	262	-	-	
65	-	-	131	-	-	197	-	-	263	-	-	
66	+	-	132	-	-	198	-	-				

FONTE: O autor (2017)

Podemos verificar que dos 66 isolados que demonstraram presença do gene PKS I, 58 amplificaram apenas com os iniciadores LC1/2c, 1 amplificou apenas com os iniciadores LC3/5c e 7 apresentaram amplificação com os dois pares de iniciadores (FIGURA 9).

FIGURA 9 – DIAGRAMA DE VENN DEMONSTRANDO O NÚMERO DE ISOLADOS QUE AMPLIFICARAM O GENE PKS I COM OS INICIADORES A) LC1/2C. B) LC3/5C. C) AMBOS LC1/2C E LC3/5C



FONTE: O autor (2017)

Grande maioria dos isolados demonstrou presença do PKS I *WA-type*. Esta subclasse está relacionada à produção de micotoxinas e pigmento nos fungos, entretantando muito há para se entender sobre tais vias metabólicas. ATANASOVA et al. (2013), demonstraram que um gene PKS (chamado *pk4*), envolvido com a produção de pigmento em conídios de *Trichoderma reesei*, está também intimamente relacionado à sua defesa, estabilidade mecânica e resistência ao stress. Ao produzir uma cepa *knockout* para o gene *pk4*, eles observaram que o fungo, que antes possuía a capacidade de controlar o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Alternaria alternata*, teve esta capacidade reduzida em 37%, 13% e 40%, respectivamente, na cepa *knockout*. Além disso, eles demonstraram que o gene *pk4* está diretamente relacionado à expressão de outros genes PKS, envolvidos na produção de metabólitos secundários bioativos, quando em presença do fitopatógeno *A. alternata*.

Em uma análise filogenética, WANG et al. (2016b) demonstraram que dois genes PKS de *Purpureocillium lilacinum* envolvidos na produção de leucinostatinas - metabólitos secundários com diversas atividades biológicas como antibiótico, antiviral, antimalárico, antifúngico e antitumoral -, estão fortemente relacionados ao gene *Fum1p* fumonisina sintase, que dá origem á micotoxina fumonisina. Desta forma concluímos que muito ainda precisa ser estudado para a total compreensão

do funcionamento dos genes envolvidos na produção de metabólitos secundários, o que podemos afirmar é que, mesmo os genes PKS I *WA-type* e *MSAS-type* estando agrupados de maneiras diferentes, eles estão estritamente relacionados e, em muitos casos, dependem um do outro para produzir ações como o micoparasitismo e biocontrole.

A presença do gene PKS I em microrganismos endofíticos de plantas medicinais, já foi avaliada anteriormente. SAUER et al. (2002) estudaram o potencial de 23 fungos endofíticos da fruta *cranberry* (*Vaccinium macrocarpon*) em produzir metabólitos policetídeos. Utilizando iniciadores específicos, eles encontraram 12 genes PKS em 11 dos 23 endófitos. Na análise filogenética todas as sequências foram correlacionadas à metabólitos importantes, como moléculas com função antitumoral e o antibiótico ácido 6-metilsalicílico. MILLER et al. (2012a) fizeram um screening genético aplicando iniciadores diretamente no DNA total de 30 plantas utilizadas na medicina tradicional chinesa e detectaram a presença de 4 fragmentos de PKSs bacterianos. Estes genes foram associados à biosíntese do antifúngico nistatina e ao composto antibiótico geldanamicina. Em outro estudo de MILLER et al. (2012b) eles avaliaram a presença do gene PKS I em fungos endofíticos isolados de 8 plantas medicinais. Além disso, avaliaram o potencial destes fungos em produzir metabólitos com ação antibacteriana, antifúngica e anticancerígena. Dos fungos endofíticos isolados, 18 apresentaram a presença do gene PKS I. Destes, 9 demonstraram ação antiproliferativa em células de mieloma humano, 2 foram capazes de inibir o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*, 12 inibiram o crescimento de *Escherichia coli* e 11 isolados demonstraram ação antifúngica contra o fungo patogênico oportunista *Candida albida*. Estudos como estes demonstram que, além de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais possuírem importantes atividades biológicas, é importante a utilização do gene PKS como um *screening* para a detecção de isolados capazes de produzir metabólitos com atividade antibacteriana, antifúngica e anticancerígena.

Dos 13 isolados endofíticos de *A. triangularis* que demonstraram ação antagonista contra ao menos um dos fitopatógenos do morango, 6 apresentaram a presença do gene PKS I (TABELA 2), sugerindo a produção de metabólitos secundários policetídeos, por parte destes isolados.

TABELA 2 – PRESENÇA DO GENE PKS I NOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *A. triangularis* COM AÇÃO ANTAGONISTA CONTRA OS FUNGOS FITOPATÓGENOS DO MORANGO *B. cinerea* E *R. stolonifer*. OS ISOLADOS QUE APRESENTARAM O GENE ESTÃO DESTACADOS EM AZUL.

Isolados	Gêneros	Ação antagonista		PKS I
		<i>B. cinerea</i>	<i>R. stolonifer</i>	
14	<i>Gibberella</i> sp.	+	+	+
50	<i>Colletotrichum</i> sp.	+	-	+
54	<i>Trichoderma</i> sp.	+	+	-
57	<i>Nectria</i> sp.	+	+	-
105	<i>Nectria</i> sp.	+	+	+
111	<i>Colletotrichum</i> sp.	+	-	-
199	<i>Botryosphaeria</i> sp.	+	+	+
211	<i>Colletotrichum</i> sp.	+	-	-
227	<i>Colletotrichum</i> sp.	+	-	-
254	<i>Trichoderma</i> sp.	+	+	-
255	<i>Stenocarpella</i> sp.	+	-	+
259	<i>Trichoderma</i> sp.	+	-	-
261	<i>Phomopsis</i> sp.	+	+	+

FONTE: O autor (2017)

A atuação do gene PKS I no controle biológico ainda não está bem elucidada e diversos estudos tem sido realizados buscando correlacionar a presença do gene e o biocontrole. Recentemente, YAO et al., (2016) encontraram diferenças na expressão dos genes *pksT-1* e *pksT-2*, em *Trichoderma harzianum 88*, em resposta a presença dos fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotia sclerotium* e *Fusarium oxysporum*, sugerindo que estes genes estão envolvidos na resposta antagonista de *T. harzianum 88* à estes fungos. WANG et al. (2016b), por sua vez, identificaram um *cluster* contendo 20 genes, vários deles sendo PKSs, envolvidos na biosíntese das leucinostatinas A e B, em *Purpureocillium lilacinum*. *P. lilacinum* é amplamente conhecido como agente de biocontrole, bem como produtor de leucinostatinas, as quais possuem diversas atividades biológicas, como antimalárica, antiviral, antibacteriana, antifúngica e antitumoral. Neste estudo, além de provar o envolvimento dos genes PKS na produção deste metabólito, os pesquisadores também evidenciaram atividade inibitória contra *Phytophthora* sp., em cultura pareada com *P. lilacinum*.

Em um trabalho utilizando 13 actinobactérias endofíticas de *Citrus reticulata*, os autores avaliaram a presença do gene PKS I, através de PCR, e a capacidade em promover atividade inibitória contra *Candida albicans*. 87% dos isolados

demonstraram a presença do gene *e*, dos 13 isolados testados, quatro deles foram promissores no controle do crescimento de *C. albicans*. A análise de *clusters* gerada a partir dos genes PKS amplificados das actinobactérias, demonstrou que estes podem estar associados à produção dos metabólitos candidicina e bafilomicina CRUZ et al. (2015).

Baseado nestes estudos, pudemos evidenciar que a presença do gene PKS I está, de diversas maneiras, relacionada à produção de metabólitos bioativos além de ser uma importante ferramenta para a seleção de microrganismos com potencial para o controle biológico.

Muitos dos isolados que apresentaram a presença do gene não foram testados em cultura pareada com os fungos fitopatogênicos do morango, podendo ser realizado em trabalhos futuros. O resultado dos isolados que apresentaram atividade no controle dos fungos *B. cinerea* e *R. stolonifer*, mas que não apresentaram a presença do gene, pode estar relacionado tanto à ausência, de fato, do gene PKS I, como à imensa diversidade estrutural destes genes e aos iniciadores utilizados para amplificar o gene PKS neste trabalho (LC1/2c e LC3/5c), que não são capazes de amplificar todos os genes PKS existentes nos fungos (MILLER et al., 2012a), ou a inexistência do mesmo, uma vez que estes genes não são obrigatórios.

A positividade para a presença do gene em 6 dos isolados envolvidos no controle biológico, demonstra que estes isolados podem estar produzindo metabólitos que estão controlando o crescimento dos patógenos, tornando necessária a avaliação da atividade do gene e a identificação dos metabólitos secretados.

## 6 CONCLUSÃO

Inicialmente, pudemos concluir que a planta medicinal *A. triangularis* possui fungos endofíticos, sendo este trabalho o pioneiro em acessar sua diversidade biológica.

Foram isolados e identificados como endófitos de *A. triangularis*, os gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Xylaria*, *Trichoderma*, *Nectria*, *Phomopsis*, *Stenocarpella*, *Phylosticta*, *Ascochyta*, *Neurospora*, *Yarrowia*, *Gibberella* e *Botryosphaeria*.

Treze isolados, pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Colletotrichum*, *Botryosphaeria*, *Stenocarpella*, *Nectria*, *Phomopsis* e *Gibberella*, foram capazes de controlar o crescimento do fungo fitopatogênico do morango *B. cinerea* e 7 isolados, pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Botryosphaeria*, *Nectria*, *Phomopsis* e *Gibberella*, controlaram o crescimento de *R. stolonifer*.

De todos os fungos endofíticos isolados de *A. triangularis*, 66 apresentaram a presença do gene PKS I. Destes, 6 isolados promoveram o biocontrole das doenças do morangueiro.

## 7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho gerou diversos dados importantes e muitas oportunidades de trabalhos futuros. O primeiro passo deverá ser estudar o mecanismo de antagonismo utilizado pelos isolados que promoveram o controle biológico dos patógenos do morango. O entendimento desta etapa pode contribuir para a otimização do processo de biocontrole, bem como para avaliar a aplicação de testes de campo. Pode-se também avaliar a secreção de metabólitos, se está ocorrendo, quais metabólitos estão sendo secretados por cada um dos isolados e qual sua função junto ao fitopatógeno. Além disso, avaliar a ligação do gene PKS I com o potencial antagonista, verificar a atividade do gene, qual o metabólito produzido e se está de fato envolvido no biocontrole visualizado.

Apesar da necessidade de novos estudos buscando elucidar o controle biológico promovido pelos fungos endofíticos de *A. triangularis*, os dados gerados por este trabalho mostram *A. triangularis* possui uma microbiota endofítica muito diversa e com imenso potencial biológico.

## REFERÊNCIAS

- ABDOU R.; SCHERLACH K.; DAHSE H. M.; SATTLER I.; HERTWECK C. Botryorhodines A-D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*. **Phytochemistry**. v. 71, p. 110-116, 2010.
- ABRAHÃO M. R. E.; MOLINA G.; PASTORE G. M. Endophytes: Recent developments in biotechnology and the potential for flavor production. **Food Research International**. v. 52, p. 367-372, 2013.
- ABUQAMAR S.; MOUSTAFA K.; TRAN L. S. P. Mechanisms and strategies of plant defense against *Botrytis cinerea*. **Critical Reviews in Biotechnology**. V. 37, n. 2, p. 262-274, 2017.
- ALAMRI S.; MOSTAFA Y. S.; HASHEM M.; ALRUMMAN S. Enhancing the biocontrol efficiency of *Trichoderma harzianum* JF419706 through cell wall degrading enzyme production. **International Journal of Agriculture and Biology**. v. 18, n. 4, p. 765-772, 2016.
- ALVIN A.; KALAITZIS J. A.; SASIA B.; NEILAN B. A. Combined genetic and bioactivity-based prioritization leads to the isolation of an endophyte-derived antimycobacterial compound. **Journal of Applied Microbiology**. v. 120, p. 1229-1239, 2016.
- ALVIN A.; MILLER K. I.; NEILAN B. A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. **Microbiological Research**. v. 169, p. 483-495, 2014.
- AMNUAYKANJANASIN A.; PUNYA J.; PAUNGMOUNG P.; RUNGROD A.; TACHALEAT A.; PONGPATTANAKITSHOTE S.; CHEEVADHANARAK S.; TANTICHAROEN M. Diversity type I polyketide synthase genes in the wood-decay fungus *Xylaria* sp. BCC1067. **FEMS Microbiology Letters**. v. 251, p. 125-136, 2005.
- ATANASOVA L.; KNOX B. P.; KUBICEK C. P.; DRUZHININA I. S.; BAKER S. E. The polyketide synthase gene *pk4* of *Trichoderma reesei* provides pigmentation and stress resistance. **Eukaryotic cell**. V. 12, n. 11, p. 1499-1508, 2013.
- BACKMAN P. A.; SIKORA R. A. Endophytes: An emerging tool for biological control. **Biological Control**. v. 46, p. 1-3, 2008.
- BAGGIO J. S.; GONÇALVES F. P. LOURENÇO S. A.; TANAKA F. A. O.; PASCHOLATI S. F.; AMORIM L. Direct penetration of *Rhizopus stolonifer* into stone fruits causing *Rhizopus* rot. **Plant Pathology**. v. 65, p. 633-642, 2016.
- BALDAUF C.; KUBO R. R.; SILVA F.; IRGANG B. E. “Ferveu, queimou o ser da erva”: conhecimentos de especialistas locais sobre plantas medicinais na região sul do Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v. 11, n. 3, p. 282-291, 2009.

BALE J. S.; VAN LENTEREN J. C.; BIGLER F. Biological control and sustainable food production. **Philosophical Transaction of The Royal Society B**. v. 363, p. 761-776, 2008.

BANHOS E. F.; SOUZA A. Q. L.; ANDRADE J. C.; SOUZA A. D. L.; KOOLEN H. H. F.; ALBUQUERQUE P. M. Endophytic fungi from *Myrcia guianensis* at the Brazilian Amazon: Distribution and bioactivity. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 45, n. 1, p. 153-161, 2014.

BINGLE L. E. H.; SIMPSON T. J.; LAZARUS C. M. Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. **Fungal Genetics and Biology**. v. 26, p. 209-223, 1999.

BONGIORNO V. A.; RHODEN S. A.; GARCIA A.; POLONIO J. C.; AZEVEDO J. L.; PEREIRA J. O.; PAMPHILE J. A. Genetic diversity of endophytic fungi from *Coffea arabica* cv. IAPAR-59 in organic crops. **Annals Microbiology**. v. 68, p. 855-865, 2016.

BRANDÃO M. G. L.; GOMES C. G.; NASCIMENTO A. M. Plantas nativas da medicina tradicional brasileira: uso atual e necessidade de proteção. **Revista Fitos**. v. 2, n. 3, p. 24-29, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes da Área Vegetal**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/noticias/2016/06/mapa-publica-resultados-do-programa-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes-da-area-vegetal>>. Acesso em: 15 dez 2016.

CAMARGO, L. K. P.; RESENDE, J. T. V.; GALVÃO, A. G.; CAMARGO, C. K.; BAIER, J. E. Desempenho produtivo e massa média de frutos de morangueiro obtidos de diferentes sistemas de cultivo. **Revista Ambiência**. v. 6, n. 2, 2010.

CAMATTI-SARTORI V.; SILVA-RIBEIRO R. T.; VALDEBENITO-SANHUEZA R. M.; PAGNOCCA F. C.; ECHEVERRIGARAY S.; AZEVEDO J. L. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated and organic cultivation. **Journal of Basic Microbiology**. v. 45, n. 5, p. 397-402, 2005.

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.

CAMPBELL C. D.; VEDERAS J. C. Biosynthesis of lovastatin and related metabolites formed by fungal iterative PKS enzymes. **Biopolymers**. v. 93, n. 9, p. 755-763, 2010.

CARVALHO S. P. Histórico e evolução da cultura do morangueiro no Brasil nos últimos 50 anos. **Horticultura Brasileira**. v. 29, n. 2, 2011.

CARVALHO S. P.; ZAWADNEAK M. A. C.; ANDRADE P. F. S.; ZANDONÁ J. C. O cultivo do Morangueiro no Brasil. In ZAWADNEAK M. A. C.; SCHUBER J. M.; MÓGOR A. F. (Orgs.). **Como produzir morangos**. Curitiba – PR, Ed. UFPR, 2014.

CHAPLA V. M.; ZERAIK M. L.; LEPTOKARYDIS I. H.; SILVA G. H.; BOLZANI V. S.; YOUNG M. C. M.; PFENNING L. H. ARAÚJO A. R. Antifungal compounds produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus from *Michelia champaca*. **Molecules**. V. 19, p. 19243-19252, 2014.

CORREA C. F.; BIASI L. A. Área foliar e tipo de substrato na propagação por estaquia de cipó-mil-homens (*Aristolochia triangularis* CHAM. ET SCHL.). **Revista Brasileira de Agrociências**. v. 9, n. 3, p. 233-235, 2003.

CRUZ P. L. R.; GIAROLA L. R.; MORAES S. S.; SILVA D. E. S. G.; MARCON J.; AZEVEDO J. L.; ARAÚJO W. L.; OLIVEIRA L. G. Triagem metabólica por PKS e NRPS em actinobactérias endofíticas de *Citrus reticulata*. **Química Nova**. v. 38, n. 3, p. 333-341, 2015.

DIAS M. S. C.; COSTA H.; CANUTO R. S. Manejo de doenças do morangueiro. Morango: conquistando novas fronteiras. **Informe Agropecuário**. v. 28, n. 236, p. 64-77, 2007.

EGGER K. N.; DANIELSON R. M.; FORTIN J. A. Taxonomy and population structure of E-statin mycorrhizal fungi inferred from ribosomal and mitochondrial DNA polymorphism. **Mycological Research**. v. 95, p. 866-872, 1991.

ESSGHAIER B.; FARDEAU M. L.; CAYOL J. L.; HAJLAOUI M. R.; BOUDABOUS A.; JIJAKLI H.; SADFI-ZOUAOU N. Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. v. 106, n. 3, p. 833-846, 2009.

EVANS B. S.; ROBINSON S. J.; KELLEHER N. L. Surveys of non-ribosomal peptide and polyketide assembly lines in fungi and prospects for their analysis in vitro and in vivo. **Fungal Genetics and Biology**. v. 48, p. 49-61, 2011.

FENNER R.; BETTI A. H.; MENTZ L. A.; RATES S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.

FISCHBEIN D. & CORLEY J. C. Classical biological control of an invasive forest pest: a world perspective of the management of *Sirex noctilio* using the parasitoid *Ibaliia leucospoides* (Hymenoptera: Ibaliidae). **Bulletin of Entomological Research**. v. 105, p. 1-12, 2015.

FRANCO I. J.; FONTANA V. L. **Ervas & Plantas: A medicina dos simples**. 8ed., Erexim – RS, Ed. Edelbra, 2003.

FU J.; ZHOU Y.; LI H. F.; YE Y. H.; GOU J. H. Antifungal metabolites from *Phomopsis* sp. By254, an endophytic fungus in *Gossypium hirsutum*. **African Journal of Microbiology Research**. V. 5, n. 10, p. 1231-1236, 2011.

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

GARCÍA E.; ALONSO A.; PLATAS G.; SACRISTÁN S. The endohpytic microbiota of *Arabidopsis thaliana*. **Fungal Diversity**. v. 60, p. 71-89, 2013.

GIAUQUE H.; HAWKES C. V. Historical and current climate drive spacial and temporal patterns in fungal endophyte diversity. **Fungal Ecology**. v. 20, p. 108-114.

GLYNOU K.; ALI T.; BUCH A. K.; KIA S. H.; PLOCH S.; XIA X.; ÇELIK A.; THINES M.; MACIÁ-VICENTE J. G. The local environment determines the assembly of root endophytic fungi at a continental scale. **Environmental Mocrobiology**. v. 18, p. 2418-2434, 2015.

GÖRE M. E.; BUCAK C. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Laurus nobilis*. **Forest Pathology**. v. 37, p. 281-288, 2007.

HIRUMA K.; GERLACH N.; SACRISTÁN S.; NAKANO R. T.; HACQUARD S.; KRACHER B.; NEUMANN U.; RAMÍREZ D.; BUCHER M.; O'CONNELL R. J.; SCHULZE-LEFERT P. Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status dependent. **Cell**. v. 165, p. 1-11, 2016.

HORN W. S.; SIMMONDS M. S. J.; SCHWARTZ R. E.; BRANEY W. M. Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from endophytic *Phomopsis* sp. **Tetrahedron**. v. 51, n. 14, p. 3969-3978, 1995.

ILHAN K. & KARABULUT O. A. Efficacy and population monitoring of bacterial antagonists for gray mould (*Botrytis cinerea* Pers. ex. Fr.) infecting strawberries. **Biological Control**. v. 58, p. 457-470, 2013.

JAMALIZADEH M.; ETEBARIAN H. R.; AMINIAN H.; ALIZADEH A. A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. **Journal Compilation**. v. 41, p. 65-71, 2011.

VAN KAN J. A. L. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. **Trends in Plant Science**. V. 11, n. 5, p. 247-253, 2006.

JARVIS W. R. The infection of strawberry and raspberry fruits by *Botrytis cinerea* Fr. **Annals of Applied Biology**. v. 50, p. 569-575, 1962.

JIA N.; XIE Y.; ZHANG H.; LIU H.; FENG J.; ZHU L.; ZHOU X. Effect of bacteriocin treatment on storage and quality of postharvest strawberry fruit. **Advanced Materials Research**. v. 554-556, p. 1547-1552, 2012.

JOSEPH B.; PRIYA R. M. Bioactive Compounds from Endophytes and their Potential in Pharmaceutical Effect: A Review. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. v. 1, n. 3, p. 291-309, 2011.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia médica – Texto e Atlas**. 2ed, São Paulo, Ed. Editorial Premier, 1999.

KOUR A.; SHAWL A. S.; REHMAN S.; SULTAN P.; QAZI P. H.; SUDEN P.; KHAJURIA R. K.; VERMA V. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. **World Journal of Microbiology biotechnology**. v. 24, p. 1115-1121, 2008.

LOPES L. M. X.; HUMPFER E. 8-Benzylberbina ans N-Oxide Alkaloids from *Aristolochia gigantes*. **Phytochemistry**. v. 45, n. 2, p. 431-435, 1997.

LU H.; ZOU W. X.; MENG J. C.; HU J.; TAN R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**. V. 151, p. 67-73, 2000.

LV S. C.; CHEN Z. C.; JIA R. B.; LIU Z. B.; ZHANG W.; CHEN S. J.; RAO P. F.; NI L. Microbial community structure and dynamics during the traditional brewing of *Fuzhou* Hong Qu glutinous rice wine as determined by culture-dependent and culture-independent techniques. **Food Control**. v. 57, p. 216-224, 2015.

MELO, I. S. Agentes Microbianos de Controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO I. S., AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. V1, Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 17-67, 2000.

MILLER K. I.; QING C.; SZE D M. –Y.; NEILAN B. A. Investigation of the Biosynthetic Potential of Endophytes in Traditional Chinese Anticancer Herbs. **Plos One**. v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012a.

MILLER K. I.; QING C.; SZE D M. –Y.; ROUFOGALIS B. D.; NEILAN B. A. Culturable Endophytes of Medicinal Plants and the Genetic Basis for Their Bioactivity. **Plant Microbe Interactions**. p. 1-19, 2012b.

MONGGOOT S.; POPLUECHAI S.; GENTEKAKI E.; PRIPIDEVEECH P. Fungal endophytes: an alternative source for production of volatile compounds from agarwood oil of *Aquilaria subintegra*. **Microbial Ecology**. p. 1-8, 2017.

MORALES, R. G. F.; FARIA, M. V.; RESENDE, J. T. V.; RISSINI, A. L. L.; CARMINATTI, R.; FARIA, C. M. D. R. Produtividade do morangueiro em função da adubação orgânica complementar em cultivo protegido. **Revista Ambiência**. v. 8, n. 1, 2012.

MOREIRA L. M.; COSTA H.; RUARO L.; MAY-DE MIO L. L. Doenças do Morangueiro in ZAWADNEAK M. A. C.; SCHUBER J. M.; MÓGOR A. F. (Orgs.). **Como produzir morangos**. Curitiba – PR, Ed. UFPR, 2014.

NGUYEN-THE C.; CHAMEL A. Enzymatic degradation of isolated plant cuticles and nectarine fruit epidermis by culture filtrates of phytopathogenic fungi. **Agronomie**. v. 11, p. 101-108, 1991.

OLIVEIRA D. G.; PRINCE K. A.; HIGUCHI C. T.; SANTOS A. C. B.; LOPES L. M. X.; SIMÕES M. J. S.; LEITE C. Q. F. Antimycobacterial activity of some Brazilian indigenous medical drinks. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**. V. 28, n. 2, p. 165-169, 2007.

OONO R.; LEFÈVRE E.; SIMHA A.; LUTZONI F. A comparison of the community diversity of foliar fungal endophytes between seedling and adult loblolly pines (). **Fungal Biology**. v. 119, p. 917-928, 2015.

PARANÁ. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento (SEAB). **Valor Bruto da Produção Rural Paranaense 2015**. Disponível em: <[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/VBP\\_2015\\_AnaliseCompletaVD.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/VBP_2015_AnaliseCompletaVD.pdf)>. Acesso em: 21 jan 2017.

KLEINER A. A. P.; FERREIRA A.; LIMA A. O. S.; ANDREOTE F. D.; ANDREOTE F. D.; PIMENTEL I. C.; AZEVEDO J. L.; MARCON J.; SOBRAL J. K.; QUECINE M. C.; MARTINS M. K.; LACAVALA P. T.; ROSSETO P. B.; STUART R. M.; ARAUJO W. L. **Guia prático: Isolamento e Caracterização de Microrganismos Endofíticos**. Piracicaba-SP, Calo, 2010.

PIMENTEL I. C.; JUAREZ G.; POITEVIN C. G.; STUART A. K. C.; AZEVEDO J. L. Incidence of endophytic fungi and occurrence of *Beauveria* and *Paecilomyces* on maize (*Zea mays* L.) under field and greenhouse conditions. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental sciences**. v. 18, n. 1, p. 47-53, 2016.

POPP J.; PETO K.; NAGY J. Pesticide productivity and food security. A review. **Agronomy Sustainable Development**. v. 33, p. 243-255, 2013.

QADRI M.; JOHRI S.; SHAH B. A.; KHAJURIA A.; SIDIQ T.; LATTOO S. K.; ABDIN M. Z.; HASSAN S. R. U. Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the western Himalayas. **Springer Plus**. p. 2-8, 2013.

REDECKER D.; THIERFELDER H.; WALKER C.; WERNER D. Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order Glomales. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 63, n. 5, p. 1756-1761, 1997.

REINO J. L.; GUERRERO R. F.; HERNÁNDEZ-GALÁN R.; COLLADO I. G. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry Reviews**. v. 7, p. 89-123, 2008.

RIBEIRO M. C.; METZGER J. P.; MARTENSEN A. C.; PONZONI F. J.; HIROTA M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**. v. 142, p. 1141-1153, 2009.

ROMANAZZI G.; FELIZIANI E.; SANTINI M.; LANDI L. Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**. v. 75, p. 24-27, 2013.

SALDANHA R. L.; GARCIA J. E.; DEKKER R. F. H.; VILAS-BOAS L. A.; BARBOSA A. M. Genetic diversity among Botryosphaeria isolates and their correlation with wall-lytic enzymes production. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 259-264, 2007.

SANGEETHA B. G.; JAYAPRAKAS C. A.; SIJI J. V.; RAJITHA M.; SHYNI B.; MOHANDAS C. Molecular characterization and amplified molecular ribosomal DNA restriction analysis of entomopathogenic bacteria associated with *Rhabditis (Oscheius)* spp. **3 Biotech**. v. 6, n. 32, p. 1-13, 2016.

SARAVANAKUMAR K.; YU C.; DOU K.; WANG M.; LI Y.; CHEN J. Sinergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *coemerinum*. **Biological Control**. v. 94, p. 37-46, 2016.

SAUCEDO-GARCIA A.; ANAYA A. L.; ESPINOSA-GARCÍA F. J.; GONZÁLEZ M. C. Diversity and Communities of Foliar Endophytic Fungi from Different Agroecosystems of *Coffea arabica* L. In Two Regions of Veracruz, Mexico. **Plos one**. v. 9, n. 6, p. 1-11, 2014.

SAUER M.; LU P.; SANGARI R.; KENNEDY S.; POLISHOOK J.; BILLS G.; AN Z. Estimating polyketide metabolic potential among non-sporulating fungal endophytes of *Vaccinium macrocarpon*. **Mycological Research**. V. 106, n. 4, p. 460-470, 2002.

SCALON S. P. Q.; SENE P. A. L.; ZATTI D. A.; MUSSURY R. M.; SCALON FILHO H. Temperatura, luz e substrato na germinação de sementes de cipó-mil-homens (*Aristolochia triangularis* Cham. Et Schl.). **Revista brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 9, n. 4, p. 32-38, 2007.

SCHULZ B. J. E.; BOYLE C. J. C. What are endophytes? In: SCHULZ B. J. E.; BOYLE C. J. C.; SIEBER T. N. **Microbial Root Endophytes**. Verlag - Berlin, Ed. Springer, 2006.

SHANKAR S. S.; AHMAD A.; PASRICHA R.; SASTRY M. Bioreduction of chloroaurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes. **Journal of Materials Chemistry**. v. 13, p. 1822-1826, 2003.

SHEN W. Y.; BAI R.; WANG A. R.; HE J. Y.; WANG H.; ZHANG Y.; ZHAO X. F.; DONG J. Y. Two new polyhydroxysterols produced by *Fusarium solani*, an endophytic fungus from *Chloranthus multistachys*. **Natural Product Research**. v. 30, n. 19, p. 2173-2182, 2016.

SHINDE S. J.; PRASHANTI S. K.; KRISHNARAJ P. U. Molecular characterization and biocontrol potentiality of actinomycete against rice sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani*. **Environment & Ecology**. V. 34, n. 1, p. 165-172, 2016.

SHWETA S.; ZUEHLKE S.; RAMESHA B. T.; PRITI V.; KUMAR P. M.; RAVIKANTH G.; SPITELLER M.; VASUDEVA R.; SHAANKER R. U. Endophytic fungal strains of

*Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin.

**Phytochemistry**. v. 71, p. 117-122, 2010.

SOUZA G. C.; HAAS A. P. S.; VON POSER G. L.; SCHAPOVAL E. E. S.; ELISABETSKY E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 90, p. 135-143, 2004.

STOYKE G.; EGGER K. N.; CURRAH R. S. Characterization of sterile fungi from mycorrhizae of subalpine plants. **Canadian Journal of Botany**. v. 70, p. 2009-2016, 1992.

STROBEL G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**. v. 5, p. 535-544, 2003.

STROBEL G.; DAISY B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

STROBEL G.; DAISY B.; CASTILLO U.; HARPER J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**. v. 67, p. 257-268, 2004.

STUART R. M.; ROMÃO A. S.; PIZZIRANI-KLEINER A. A.; AZEVEDO J. L.; ARAUJO W. L. Culturable endophytic filamentous fungi from leaves of transgenic imidazolinone-tolerant sugarcane and its non-transgenic isolines. **Archives Microbiology**. v. 192, p. 307-313, 2010.

SUN X.; GUO L. D. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. **Micology**. v. 3, n. 1, p. 65-76, 2012.

TABARELLI M.; AGUIAR A. V.; RIBEIRO M. C.; METZGER J. P.; PERES C. A. Prospects for biodiversity conservation in the Atlantic Forest: Lessons from aging human-modified landscape. **Biological Conservation**. v. 143, p. 2328-2340, 2010.

TAN R. X.; ZOU W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**. v. 18, p. 448-459, 2001.

TANAKA M. A. S.; BETTI J. A.; KIMATI H., Doenças Do morangueiro . In: KIMATI H.; AMORIM L.; BERGAMIN FILHO A.; CAMARGO L. E. A.; REZENDE J. A. M. **Manual de Fitopatologia Volume 2: Doenças de plantas cultivadas**. São Paulo, Brasil: Ceres, 526-529, 1997.

TANG B.; PAN H. TANG W.; ZHANG Q.; DING L.; ZHANG F. Fermentation and purification of cellulase from a novel strain *Rhizopus stolonifer* var. *reflexus* TP-02. **Biomass and Bioenergy**. v. 36, p. 366-372, 2012.

TAYLOR J. E.; HYDE K. D.; JONES E. B. G. Endophytic fungi associated with temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. **New Pathology**. v. 142, p. 335-346, 1999.

- TODD J. H.; BARATT B. I. P.; TOOMAN L.; BEGGS J. R.; MALONE L. A. Selecting non-target species for risk assessment of entomophagous biological control agents: Evaluation of the PRONTI decision-support tool. **Biological Control**. v. 80, p. 77-88, 2014.
- VANDENDRIESSCHE T.; KEULEMANS J.; GEERAERD A.; NICOLAI B. M.; HERTOOG M. L. A. T. M. Evaluation of fast volatile analysis for detection of *Botrytis cinerea* infections in strawberry. **Food Microbiology**. v. 36, n. 1, p. 406-414, 2012.
- VANEECHOUTTE M.; BEENHOUWER H.; CLAEYS G.; VERSCHRAEGEN G.; DE ROUCK A.; PAEPE N.; ELAICHOUNI A.; PORTAELS F. Identification of *Mycobacterium* Species by Using Amplified Ribosomal DNA Restriction **Analysis**. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 31, n. 8, p. 2061-2065, 1993.
- VENKATACHALAM S.; RANJAN K.; PRASANNA R.; RAMAKRISHNAN B.; TRAPA S.; KANCHAN A. Diversity and functional traits of culturable microbe members, including cyanobacteria in the rice phyllosphere. **Plant Biology**. v. 18, p. 627-637, 2016.
- VERMA M.; BRAR S. K.; TYAGI R. D.; SURAMPALLI R. Y.; VALÉRO J. R. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**. V. 37, p. 1-20, 2007.
- VERMA P.; YADAV A. N.; KHANNAM K. S.; KUMAR S.; SAXENA A. K.; SUMAN A. Molecular diversity and multifactorious plant growth promoting attributes of Bacilli associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere from six diverse agro-ecological zones of India. **Journal of Basic Microbiology**. v. 56, p. 44-58, 2016.
- VICENTE V. A.; FREITAS F.; KLEINER A. P.; ANGELIS D. S. A. TELLES, F. Q. Caracterização de fungos dematiáceos da família Herpotrichiellaceos isolados do ambiente de diferentes regiões do estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 4, n. 1, p. 34, 2001.
- VU T.; HAUSCHILD R.; SIKORA R. A. *Fusarium oxysporum* endophytes induced systemic resistance against *Radopholus similis* on banana. **Nematology**. V. 8, n. 6, p. 847-852, 2006.
- WANG Y.; GUO L. D. A comparative study of endophytic fungi in needles, bark, and xylem of *Pinus tabulaeformis*. **Canadian Journal of Botany**. v. 85, p. 911-917, 2007.
- WANG W. X.; KUSARI S.; LAATSCH H.; GOLZ C.; KUSARI P.; STROHMANN C.; KAYSER O.; SPITELLER M. Antibacterial Azaphilones from endophytic fungus, *Colletotrichum* sp. BS4. **Journal of Natural Products**. v. 79, p. 704-710, 2016a.
- WANG G.; LIU Z.; LIN R.; LI E.; MAO Z.; LING J.; YANG Y.; YIN W. B.; XIE B. Biosynthesis of antibiotic leucinostatins in bio-control fungus *Purpureocillium lilacinum* and their inhibition of *Phytophthora* revealed by genome mining. **Plos Pathogens**. v. 12, n. 7, p. 1-30, 2016b.

WEARN J. A.; SUTTON B. C.; MORLEY N. J.; GANGE A. C. Species and organ specificity of fungal endophytes in herbaceous grassland plants. **Journal of Ecology**. v. 5, p. 1085-1092, 2012.

WEBER D.; STERNER O.; ANKE T.; GORZALKZANCY S.; MARTINO V.; ACEVEDO C. Phomol, a new anti-inflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. **The Journal of Antibiotics**. v. 57, n. 9, p. 559-563, 2004.

WHITE T. J.; BRUNS T.; LEE S.; TAYLOR J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS M. A.; GELFAND D. H.; SNINSKY J. J.; WHITE T. J. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego - California, Ed. Academic Press, 1990.

WICKLOW D.; ROGERS K. D.; DOWD P. F.; GLOER J. B. Bioactive metabolites from *Stenocarpella maydis*, a stalk and ear rot pathogen of maize. **Fungal Biology**. v. 115, p. 133-142, 2011.

WISNIEWSKI M.; WILSON C.; DROBY S.; CHALUTZ E.; EL GRAOUTH A.; STEVENS C. Postharvest biocontrol: new concepts and applications. **Biological control: a global perspective**. p. 262-273, 2007.

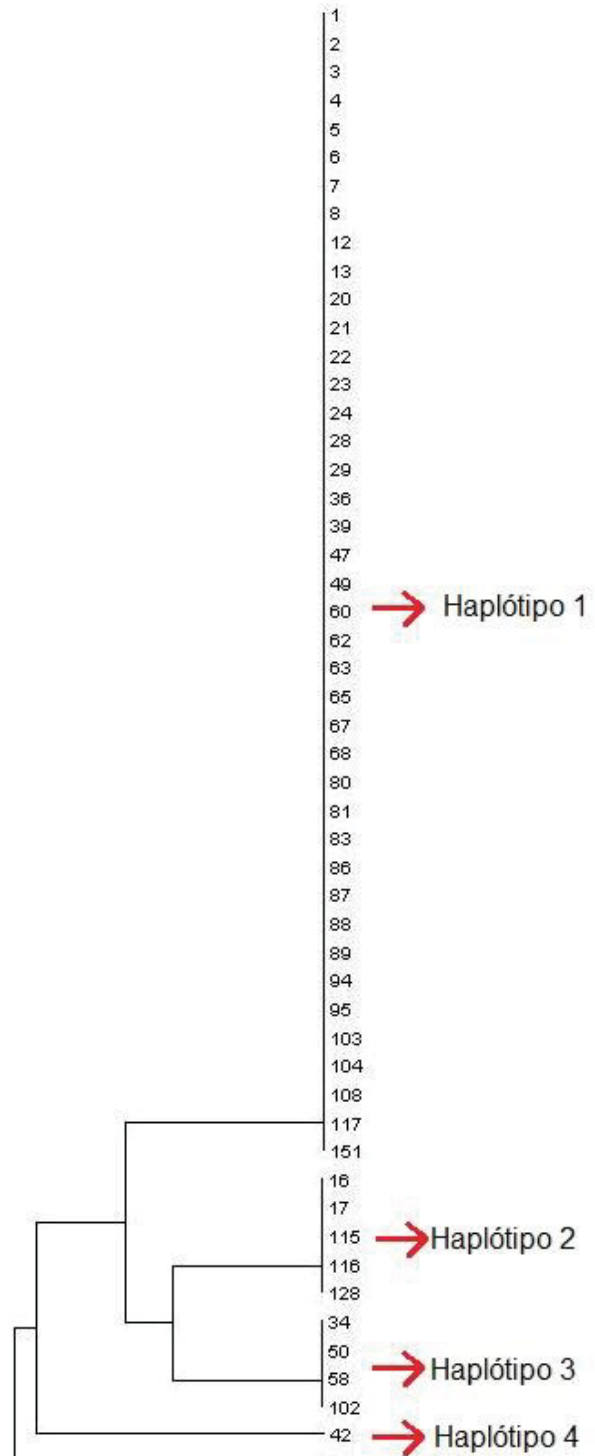
YAO L.; TAN C.; SONG J.; YANG Q.; YU L.; LI X. Isolation and expression of two polyketide synthase genes from *Trichoderma harzianum* 88 during mycoparasitism. **Brazilian Journal of microbiology**. v. 47, p. 468-479, 2016.

ZAKER M. Antifungal evaluation of some plant extracts in controlling *Fusarium solani*, the casual agent of potato dry rot *in vitro* and *in vivo*. **International Journal of Agriculture and Biosciences**. v. 3, n. 4, p. 190-195, 2014.

ZOU W. X.; MENG J. C.; LU H.; CHEN G. X.; SHI G. X.; ZHANG T. Y.; TAN R. X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**. V. 63, p. 1529-1530, 2000.

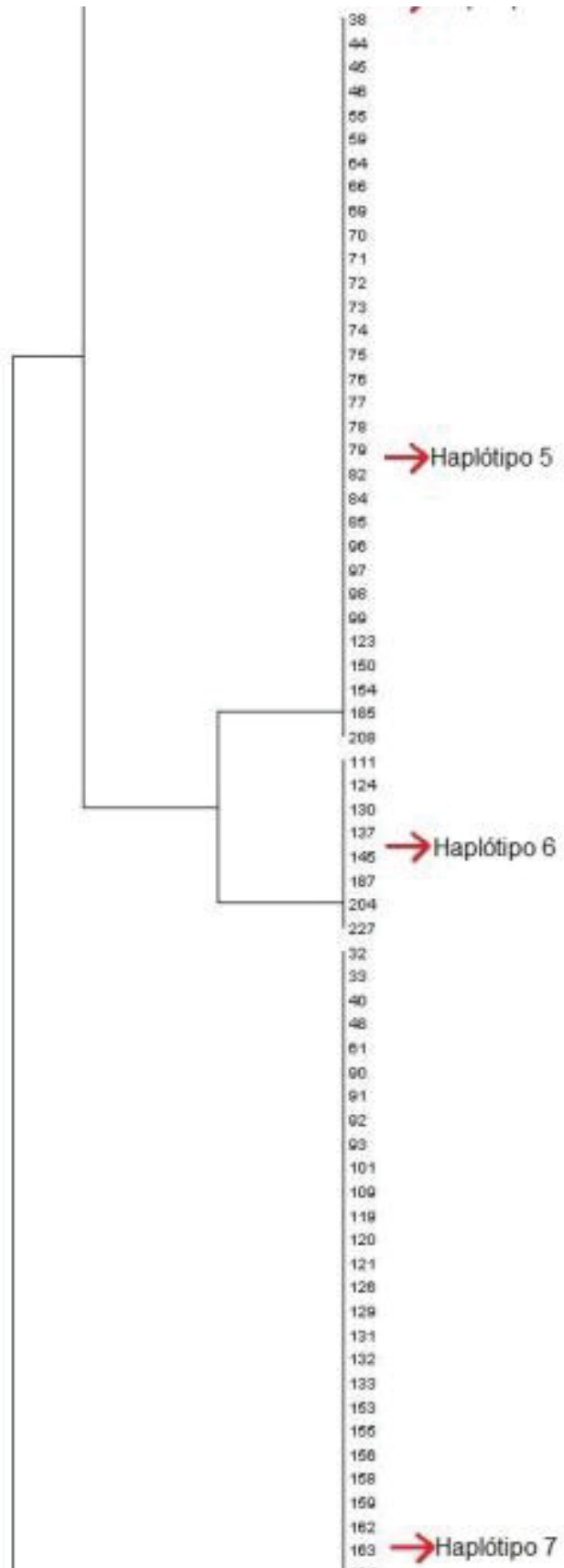
# ANEXO 1 – DENDROGRAMA COMPLETO DA ANÁLISE DE ARDRA

Continua



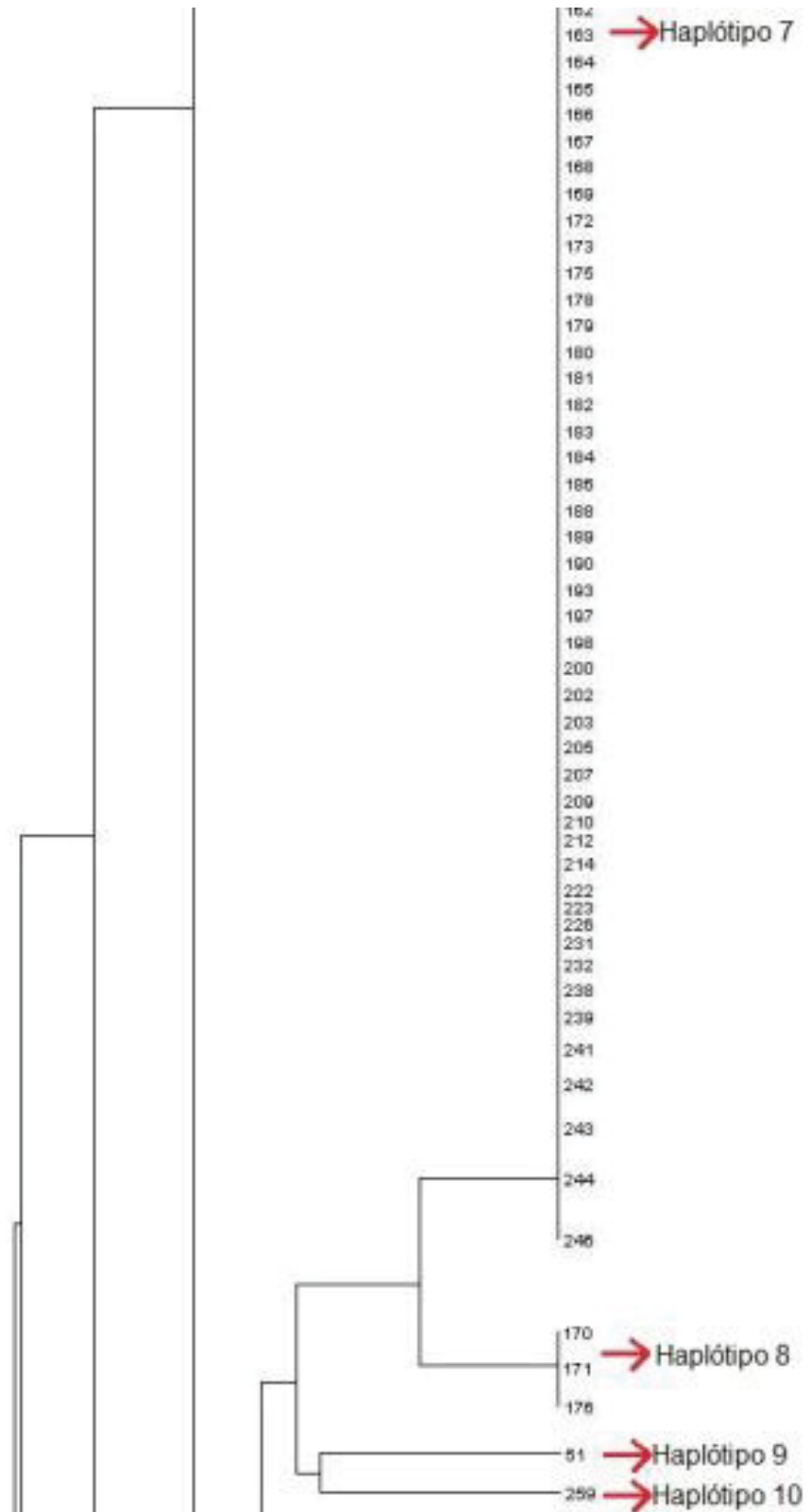
**ANEXO 1 – DENDROGRAMA COMPLETO DA ANÁLISE DE ARDRA**

Continuação



## ANEXO 1 – DENDROGRAMA COMPLETO DA ANÁLISE DE ARDRA

Continuação



**ANEXO 1 – DENDROGRAMA COMPLETO DA ANÁLISE DE ARDRA**

Conclusão

