

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDSON JOSÉ MAZAROTTO

TAXONOMIA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTITUMORAL DE ISOLADOS
ENDOFÍTICOS DE *Diaporthe* spp.



CURITIBA

2020

EDSON JOSÉ MAZAROTTO

TAXONOMIA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTITUMORAL DE ISOLADOS
ENDOFÍTICOS DE *Diaporthe* spp.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Microbiologia, Parasitologia e Patologia,

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Ida Chapaval Pimentel.

Coorientador:
Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos.

CURITIBA
2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1408)

Mazarotto, Edson José

Taxonomia, atividade antimicrobiana e antitumoral de isolados endofíticos de *Diaporthe* spp. / Edson José Mazarotto. – Curitiba, 2020. 80 p.: il.

Orientadora: Ida Chapaval Pimentel
Coorientador: Álvaro Figueredo dos Santos

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

1. Fungos. 2. Endófitos. 3. Bioprospeção. 4. Metabólitos secundários. I. Título. II. Pimentel, Ida Chapaval. III. Santos, Álvaro Figueredo dos. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (22. ed.) 579.567



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de EDSON JOSE MAZAROTTO Intitulada: *Taxonomia, atividade antimicrobiana e antitumoral de isolados endofíticos de Diaporthe spp.*, sob orientação da Profa. Dra. IDA CHAPAVAL PIMENTEL, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rto de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Junho de 2020.

Assinatura Eletrônica
02/07/2020 09:31:07.0
IDA CHAPAVAL PIMENTEL
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
01/07/2020 17:33:07.0
WESLEY MAURICIO DE SOUZA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
02/07/2020 11:44:42.0
CAROLINA GRACIA POITEVIN
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
08/07/2020 00:34:00.0
TIAGO MIGUEL JAREK
Avaliador Externo (PONTIFICA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO
PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
01/07/2020 15:33:53.0
CELSO GARCIA AUER
Avaliador Externo (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA
AGROPECUÁRIA)

Aos meus queridos pais,
Rosangela e Edson
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, especialmente:

À Deus, por me dar paciência e sabedoria para seguir em frente nesta jornada e não desanimar com as dificuldades.

Aos meus pais, pela minha formação, apoio, carinho, confiança e incentivo em todos os momentos.

À Prof^a Dr^a. Ida Chapaval Pimentel, pela orientação, confiança, apoio, paciência e conselhos valiosos. Não tenho palavras para expressar meu profundo respeito e gratidão.

Ao Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos, cuja coorientação, apoio, confiança, ensinamentos e amizade, tornaram essa caminhada mais fácil.

À Dr^a Cristiane Vieira Helm, pela disponibilidade, confiança e por abrir vários caminhos que possibilitaram a execução deste trabalho.

Ao Dr. Sandro Bonatto e Suzany da Silva, pelo treinamento no cultivo celular.

Ao Prof. Dr. Breno Castello Branco Beirão, pelo auxílio com o teste de viabilidade celular.

Aos queridos amigos do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas: Tiago Jarek, Flávia Santos, Caroline Bühner, Davi Veiga e Dr. Celso Auer, por toda ajuda e momentos de descontração.

Aos membros do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (LabMicro), pela agradável convivência e contribuições sempre que possível.

À minha noiva Géssica Mylena Santana Rêgo, pelo carinho, companheirismo, compreensão, grande incentivo e todo apoio para a redação deste trabalho.

Ao meu amigo Paulo César Gregório, pela amizade, parceria, descontração e evolução da esteatose hepática nos momentos de dificuldade.

Ao Departamento de Patologia Básica e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná, por todo apoio, incentivo e paciência;

Ao secretário do Programa de Pós-graduação, Alexandre Vieira, por sua disponibilidade em auxiliar em todas as questões administrativas e momentos de descontração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

EPÍGRAFE

“O assunto mais importante do mundo pode ser simplificado até o ponto em que todos possam apreciá-lo e compreendê-lo. Isso é, ou deveria ser a mais elevada forma de arte”.

Charles Chaplin

RESUMO

Os fungos endofíticos representam uma reserva inexplorada de estruturas químicas, geradas por relações coevolutivas entre microrganismo e hospedeiro. Há uma grande chance de encontrar novos metabólitos secundários com atividade biológica nesses fungos. O gênero *Diaporthe* (sin. *Phomopsis*) tem se destacado nesse contexto, pois é geralmente encontrado em associação como endofítico e por sua alta capacidade de sintetizar uma ampla gama de metabólitos secundários incluindo os policetídeos. Tais características fazem do gênero um candidato promissor na produção de substâncias com aplicabilidade na indústria farmacêutica e na agricultura. Os objetivos desta pesquisa foram caracterizar morfológica e molecularmente isolados de *Diaporthe* spp., obtidos em sementes de peroba rosa (*Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg.), visando sua identificação específica, e avaliar a sua atividade antimicrobiana e antitumoral. Os fungos foram selecionados na coleção de fungos e oomicetos florestais, da Embrapa Florestas, e tiveram seu crescimento avaliado nos meios batata dextrose ágar (BDA), extrato de malte ágar (MEA) e aveia ágar (OA) para caracterização morfológica. Em seguida foram sequenciadas cinco regiões, calmodulina (CAL), histona (HIS), beta tubulina (TUB), fator de alongação (TEF1) e região interespaçadora (ITS). Com base na caracterização morfológica e análise filogenética multilocus duas novas espécies endofíticas de *Diaporthe*, isoladas de sementes de peroba rosa são descritas e propostas. Morfologicamente, *Diaporthe* sp. 1 é caracterizado por alfa conídios hialinos, sem septo, lisos, oblongo a elipsóides (7 - 8 × 3 µm) e beta conídios hialinos, sem septo, reto a curvos, 23 - 30 × 2 µm. *Diaporthe* sp. 2 é caracterizada por alfa conídios hialinos, sem septo, fusiforme (8 - 10 × 3 µm) e beta conídios hialinos, sem septo, reto a curvados, 25 - 29 × 2 µm. Nove isolados de *Diaporthe* spp. foram avaliados quanto a produção de metabólitos secundários e atividade antimicrobiana e antitumoral. Para isso, foi verificada a expressão do Domínio Policetídeo Sintase (PKS), sugerida as classes dos compostos produzidos por cromatografia de camada delgada (CCD), e avaliada a atividade biológica frente a linhagens de fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium pseudocircinatum*, *Colletotrichum* spp. e *Phytophthora palmivora*; a levedura *Candida albicans*, as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis*; e linhagens celulares H295R (Carcinoma Adrenocortical) e HEK293T (Embrionária de rim). Foi confirmada a presença de policetídeos não reduzidos (NR-PKS) em todos os isolados, bem como a produção de alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos. Houve inibição dos fungos fitopatogênicos *F. oxysporum*, *F. pseudocircinatum*, *Colletotrichum* spp. e *P. palmivora*. Foi verificada atividade dos extratos inibindo *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e a levedura *C. albicans*. As frações dos extratos avaliados como antitumorais reduziram a viabilidade celular da linhagem H295R em 35.7%. Os resultados desta pesquisa revelam duas novas espécies de *Diaporthe* com potencial para o controle biológico de fungos fitopatogênicos e bactérias e levedura humano patogênicas. Além disso, o estudo sugere ação antitumoral dos extratos e classes de compostos com possível aplicação biotecnológica. No entanto, mais testes precisam ser realizados para otimização da produção de metabólitos secundários, confirmação dos compostos produzidos e isolamento das moléculas de interesse.

Palavras-chave: Diaporthaceae, endófitos, bioprospecção, metabólitos secundários, espécie florestal nativa

ABSTRACT

Endophytic fungi represent an unexplored reserve of chemical structures, generated by coevolutionary relationships between microorganism and host. There is a great chance of finding new secondary metabolites with biological activity in these fungi. The genus *Diaporthe* (syn. *Phomopsis*) has stood out in this context, as it is generally found in association as endophytic and for its high capacity to synthesize a wide range of secondary metabolites including polyketides. Such characteristics make the genus a promising candidate in the production of substances with applicability in the pharmaceutical industry and in agriculture. The objectives of this research were to characterize morphologically and molecularly isolated *Diaporthe* spp., Obtained from “peroba rosa” seeds (*Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg.), aiming at their specific identification, and to evaluate their antimicrobial and antitumor activity. The fungi were selected from the collection of forest fungi and oomycetes, from Embrapa Florestas, and subjected to growth in potato dextrose agar (PDA), malt extract agar (MEA) and oat agar (OA) for morphological characterization. Then five regions were sequenced, calmodulin (CAL), histone (HIS), beta tubulin (TUB), elongation factor (TEF1) and interspace region (ITS). Based on the morphological characterization and multilocus phylogenetic analysis two new species of *Diaporthe*, isolated from “peroba rosa” seeds are described and proposed. Morphologically, *Diaporthe* sp. 1 is characterized by hyaline alpha conidia, without septum, oblong to ellipsoid ($7 - 8 \times 3 \mu\text{m}$) and hyaline beta conidia, without septum, straight to curved, $23 - 30 \times 2 \mu\text{m}$. *Diaporthe* sp. 2 is characterized by hyaline alpha conidia, without septum, fusiform ($8 - 10 \times 3 \mu\text{m}$) and hyaline beta conidia, without septum, straight to curved, $25 - 29 \times 2 \mu\text{m}$. Nine isolates of *Diaporthe* spp. were evaluated for the production of secondary metabolites and antimicrobial and antitumor activity. For this, the expression of the Polyketide Domain Synthase (PKS) was verified, the classes of compounds produced by thin layer chromatography (CCD) were suggested, and the biological activity was evaluated against strains of phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum*, *Fusarium pseudocircinatum*, *Colletotrichum* spp. and *Phytophthora palmivora*; the yeast *Candida albicans*, the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* and *Enterococcus faecalis*; and H295R (Adrenocortical Carcinoma) and HEK293T (Kidney Embryonic) cell lines. The presence of non-reduced polyketides (NR-PKS) was confirmed in all isolates, as well as the production of alkaloids, terpenoids and phenolic compounds. There was activity against phytopathogenic fungi *F. oxysporum*, *F. pseudocircinatum*, *Colletotrichum* spp. and *P. palmivora*. Extract activity was verified, inhibiting *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and the yeast *C. albicans*. The fractions of the extracts evaluated as antitumoral reduced the cell viability of the H295R strain by 35.7%. The results of this research reveal two new species of *Diaporthe* with potential for biological control of phytopathogenic fungi and pathogenic human bacteria and yeast. In addition, the study suggests antitumoral action of extracts and classes of compounds with possible biotechnological application. However, more tests need to be carried out to optimize the production of secondary metabolites, confirmation of the compounds produced and isolation of the molecules of interest.

Keywords: Diaporthaceae, endophytes, bioprospecting, secondary metabolites, native forest species

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1. Interação simbiótica entre microrganismos endofíticos e a planta hospedeira, e bioprospecção dos metabólitos por eles produzidos. 18

CAPÍTULO 2

Figura 1. *Diaporthe* sp. 1 - A. Cultura em BDA; B. Cultura em OA; C. Cultura em MEA; D. Conidiomata esporulando em BDA; E. Corte transversal do conidiomata; F. Alfa e beta conídios — Escala: E = 100 µm, F = 10 µm.36

Figura 2. *Diaporthe* sp. 2 - A. Cultura em BDA; B. Cultura em OA; C. Cultura em MEA; D. Corte transversal do conidiomata; E. Conidiomata esporulando em BDA; F. Célula conidiogênica; G. Alfa e beta conídios. — Escala: D = 100 µm, F,G = 10µm.....377

Figura 3. Árvore de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana de *Diaporthe* spp. baseada em sequências das regiões ITS, CAL, HIS, TEF e TUB. O comprimento dos ramos está indicado pela escala na base da árvore, e os valores de bootstrap (1.000 repetições) estão indicados em porcentagem abaixo dos internos. A árvore teve como raiz *Diaporthella corylina*40

CAPÍTULO 3

Figura 1. Produtos de PCR obtidos do template de gDNA de isolados de *Diaporthe* usando os primers LC1/2c.54

Figura 2. Placas cromatográficas sugerindo classes de compostos químicos presentes no meio fermentado e micélio seco de nove isolados de *Diaporthe* - A. Presença de alcaloides em meio fermentado; B e C. Presença de alcaloides no micélio seco; D e E. Presença de compostos fenólicos no micélio seco; F. Presença de terpenoides no micélio seco.

Figura 3. Viabilidade celular (%) da linhagem tumoral H295R após tratamento com as concentrações 1.000, 200 e 100 µg/mL de extrato acetato de etila de nove isolados endofíticos de *Diaporthe*.59

Figura 4. Viabilidade celular da linhagem H295R após tratamento com as concentrações 100, 200, 400 e 1.000 µg/mL das frações butanólica (A) e etanólica (B), obtidas do isolado endofítico END-69 de *Diaporthe*.59

Figura 5. Inibição celular da linhagem HEK293T após tratamento com as concentrações 100, 200, 400 e 1,000 µg/mL das frações butanólica e etanólica, obtidas do isolado endofítico END-69 de *Diaporthe*.600

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1. Tipo de associação e isolados de *Diaporthe* spp. obtidos em sementes de peroba rosa (*Aspidosperma polyneuron*) coletadas em 10 municípios do estado do Paraná.300
- Tabela 2. Espécies de *Diaporthe* spp. incluídas no estudo para análise filogenética e número de acesso no GenBank.322

CAPÍTULO 3

- Tabela 1. Lista de isolados endofíticos de *Diaporthe* spp. e município do estado do Paraná de coleta das sementes de peroba rosa (*Aspidosperma polyneuron*).488
- Quadro 1. Screening por marcha química em cromatografia de camada delgada (CCD).511
- Tabela 2. Crescimento micelial (mm) de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium pseudocircinatum*, *Colletotrichum* spp. e *Phytophthora palmivora* em cultivo confrontado com nove isolados endofíticos de *Diaporthe* spp.555
- Tabela 3. Inibição (%) do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium pseudocircinatum*, *Colletotrichum* spp. e *Phytophthora palmivora* por efeito de metabólitos voláteis de nove isolados endofíticos de *Diaporthe* spp.566
- Tabela 4. Inibição (%) do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium pseudocircinatum*, *Colletotrichum* spp. e *Phytophthora palmivora* por efeito de metabólitos não voláteis de nove isolados endofíticos de *Diaporthe* spp.566
- Tabela 5. Atividade antimicrobiana mensurada pelo tamanho dos halos (mm) por extratos de acetato de etila de isolados endofíticos de *Diaporthe* spp. em ensaio de disco difusão.588

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|--|
| AcOET | Acetato de etila |
| ANOVA | Análise de variância |
| BD | Caldo batata dextrose |
| BDA | Meio batata dextrose ágar |
| BOD | Demanda bioquímica de oxigênio |
| CAL | Calmodulina |
| CCD | Cromatografia de camada delgada |
| DET | Fungos isolados no teste de epifíticos |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desóxiribonucleico |
| END | Fungos isolados no teste de endofíticos |
| H295R | Linhagem tumoral de carcinoma adrenocortical |
| HEK293T | Linhagem de células embrionárias de rim |
| HIS | Histona |
| ITS | Região interespaçadora |
| MEA | Meio extrato de malte ágar |
| MgCl ₂ | Cloreto de magnésio |
| MTT | Ensaio de redução do tetrazólio |
| NR-PKS | Região não reduzida do domínio dos policetídeos |
| OA | Meio aveia ágar |
| PEG | Polietilenoglicol |
| PKS | Domínio policetídeo sintase |
| PR-PKS | Região parcialmente reduzida do domínio dos policetídeos |
| TEF1 | Fator de alongação alfa |
| TR | Fungos isolados de teste de transmissão |
| TUB | Subunidade beta da tubulina |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 1. REVISÃO DA TESE | 13 |
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 13 |
| 2 OBJETIVOS | 15 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 15 |
| 2.2 Objetivos específicos | 15 |
| 3 REVISÃO DE LITERATURA..... | 16 |
| 3.1 Fungos endofíticos..... | 16 |
| 3.2 Produção de metabólitos secundários | 18 |
| 3.3 O gênero <i>Diaporthe</i> | 21 |
| REFERÊNCIAS | 22 |
| CAPÍTULO 2. FILOGENIA E MORFOLOGIA REVELARAM DUAS NOVAS ESPÉCIES DE <i>Diaporthe</i> EM PEROBA ROSA (<i>Aspidosperma polyneuron</i>) NO BRASIL | 28 |
| RESUMO | 28 |
| 1 INTRODUÇÃO | 28 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 29 |
| 2.1 Isolados fúngicos | 29 |
| 2.2 Caracterização morfológica | 29 |
| 2.3 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento | 30 |
| 2.4 Análise filogenética | 31 |
| 3 RESULTADOS | 35 |
| 3.1 Caracterização morfológica | 35 |
| 3.2 Análise filogenética | 38 |
| 4 DISCUSSÃO | 41 |
| REFERÊNCIAS | 42 |
| CAPÍTULO 3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTITUMORAL DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE <i>Diaporthe</i> spp. | 46 |
| RESUMO | 46 |
| 1 INTRODUÇÃO | 46 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 48 |
| 2.1 Isolados endofíticos de <i>Diaporthe</i> spp..... | 48 |
| 2.2 Extração de DNA | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.1 Amplificação do domínio policetídeo sintase - PKS | 48 |
| 2.3 Microrganismos testados | 49 |
| 2.4 Testes com fitopatógenos..... | 49 |
| 2.4.1 Culturas confrontadas..... | 49 |
| 2.4.2 Metabólitos voláteis | 50 |
| 2.4.3 Metabólitos não voláteis | 50 |
| 2.5 Caldo de fermentação..... | 50 |
| 2.6 Cromatografia de camada delgada (CCD)..... | 51 |
| 2.7 Extração dos metabólitos..... | 52 |
| 2.8 Teste de suscetibilidade antimicrobiana | 52 |
| 2.9 Avaliação da atividade antitumoral | 53 |
| 2.9.1 Ensaio de viabilidade celular (MTT)..... | 53 |
| 2.9.2 Índice de seletividade | 53 |
| 2.10 Análise estatística | 53 |
| 3 RESULTADOS | 54 |
| 3.1 Domínio policetídeo sintase – PKS..... | 54 |
| 3.2 Culturas confrontadas..... | 54 |
| 3.3 Metabólitos voláteis | 55 |
| 3.4 Metabólitos não voláteis | 56 |
| 3.5 Cromatografia de camada delgada (CCD)..... | 57 |
| 3.6 Teste de suscetibilidade antimicrobiana | 57 |
| 3.7 Atividade antitumoral | 58 |
| 3.8 Índice de seletividade | 60 |
| 4 DISCUSSÃO | 60 |
| REFERÊNCIAS | 63 |
| CONCLUSÃO..... | 69 |
| REFERÊNCIAS GERAIS | 70 |

CAPÍTULO 1. REVISÃO DA TESE

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os fungos endofíticos auxiliam as plantas tanto na adaptação às condições do ambiente, como na indução de tolerância a fatores de estresse e resistência a ação de insetos e fungos fitopatogênicos, por meio da produção de metabólitos funcionais (ZHANG, SANG e TAN, 2006). Possivelmente todas as plantas possuem microrganismos endofíticos colonizando seus tecidos, existindo especificidade na interação endófito-hospedeiro. (AZEVEDO, 1998). Assim como as plantas, os fungos possuem a capacidade de biossintetizar diversos compostos naturais, conhecidos como metabólitos secundários (SIDDIQUE, 2012). Estes fungos têm estimulado a comunidade científica, devido à produção de metabólitos secundários bioativos, e representam uma importante fonte genética para aplicações biotecnológicas na indústria alimentícia, agrícola e farmacêutica (STROBEL & DAISY, 2003; ZHAO *et al.*, 2010).

Os metabólitos secundários são compostos extracelulares secretados durante o crescimento de um organismo vivo. Os fungos filamentosos são conhecidos por sintetizar metabólitos secundários em abundância, produzindo até 73% mais do que outras classes de microrganismos (STROBEL *et al.*, 2004). Dentre as substâncias bioativas produzidas pelos fungos, incluem-se as classes dos policetídeos, terpenoides e peptídeos (FOX & HOWLETT, 2008), além de uma ampla variedade de compostos quimicamente distintos e de estruturas ainda desconhecidas (GUNATILAKA, 2006). Os policetídeos, em especial, são conhecidos como uma classe precursora de diversos metabólitos secundários, sendo considerada uma fonte promissora de compostos bioativos (SCHUMANN & HERTWECK, 2006).

Outra característica que desperta interesse por estes microrganismos, é que representam uma fonte de compostos fitoquímicos naturais, mimetizando as substâncias produzidas pelas suas plantas hospedeiras (STROBEL *et al.*, 2004). Além disso, o uso de fungos endofíticos como fonte de compostos bioativos, pode não somente reduzir a necessidade de coletar plantas de crescimento lento e possivelmente raras, mas também auxiliar na preservação da biodiversidade do ambiente natural (STROBEL *et al.*, 2004).

Os fungos do gênero *Diaporthe* (sin. *Phomopsis*) colonizam os tecidos do hospedeiro muito cedo e podem estabelecer relações como endófito, saprófito ou parasita, estando associado às sementes, que são a sua principal forma de dispersão a longas distâncias (GARZONIO & MCGEE, 1983; HERNÁNDEZ *et al.*, 2015). São

conhecidos, principalmente por representar uma fonte rica em metabólitos secundários com potencial biotecnológico e estruturas variadas, como xantonas, éteres diarílicos, citocalasinas, ácido convolvulânico e a micotoxina fomopsina A (HUSSAIN *et al.*, 2009).

Segundo Yang *et al.* (2010) mais de quarenta compostos novos foram obtidos a partir do gênero *Diaporthe* nos últimos anos, dentre eles xantonas, lactonas e mycoepoxidienos. Essas características tornam o gênero um alvo potencial para pesquisa de novos compostos com interesse para indústria, medicina e agricultura (SMITH *et al.*, 2008).

De acordo com Gomes *et al.* (2013) existe mais de 1.000 espécies citadas para o gênero *Phomopsis*, enquanto para *Diaporthe* esse número é próximo de 900 espécies. Ao longo dos anos, a identificação das espécies deste gênero foi baseada principalmente em função das plantas hospedeiras (DIOGO *et al.*, 2010). No entanto, novas metodologias têm sido estabelecidas para organizar o gênero, combinando características morfológicas, moleculares e cultivo em diferentes meios (UDAYANGA *et al.*, 2012).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram identificar isolados de *Diaporthe* spp. endofíticos de sementes de peroba rosa (*Aspidosperma polyneuron*), através de caracterização morfológica, cultivo em diferentes meios e filogenia molecular, baseada nas regiões gênicas ITS, calmodulina, histona, fator de alongação (EF-1 α) e β -tubulina e verificar a produção de metabólitos secundários por estes isolados, indicando a classe das substâncias produzidas e verificando sua eficácia no controle de fitopatógenos, bactérias e levedura humano patogênicas e células tumorais.

Para organizar os diferentes tópicos abordados, esta tese está apresentada em três capítulos, sendo que o capítulo 1 contempla uma revisão da literatura; o capítulo 2 apresenta a caracterização de duas novas espécies do gênero *Diaporthe*; e no capítulo 3 estão as etapas de fermentação e extração de compostos bioativos, cromatografia de camada delgada e avaliação do potencial antimicrobiano e antitumoral.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar morfológica e molecularmente isolados de *Diaporthe* spp. endofíticos de *Aspidosperma polyneuron* visando sua identificação específica e avaliar a sua atividade antimicrobiana e antitumoral.

2.2 Objetivos específicos

- Cultivar os isolados de *Diaporthe* spp. em batata dextrose ágar (BDA), extrato de malte ágar (MEA) e aveia ágar (OA), e avaliar o crescimento e características da cultura;
- Caracterizar e mensurar suas estruturas microscópicas;
- Sequenciar as regiões gênicas ITS, CAL, TUB, HIS e TEF;
- Analisar a filogenia das cinco regiões gênicas para caracterização molecular de novas espécies;
- Verificar a expressão do gene referente à produção de policetídeos;
- Sugerir as classes de substâncias produzidas através da cromatografia de camada delgada;
- Avaliar o potencial *in vitro* de antagonismo, produção de metabólitos voláteis e não voláteis dos isolados de *Diaporthe* spp. contra diferentes linhagens de fungos fitopatogênicos (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium pseudocircinatum*, *Colletotrichum* spp. e *Phytophthora palmivora*);
- Produzir extratos orgânicos a partir do caldo batata dextrose (BD) fermentado;
- Avaliar a ação antimicrobiana dos extratos contra a levedura *Candida albicans* e as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis*, por teste de disco difusão;
- Avaliar a ação antitumoral dos extratos contra a linhagem celular H295R (Carcinoma Adrenocortical) em teste de MTT.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fungos endofíticos

Caracterizam-se como endófitos aqueles microrganismos que pelo menos durante uma fase do seu ciclo de vida, habitam o interior de tecidos de seus hospedeiros, sem demonstrar quaisquer sintomas visíveis e desempenhando relações ecológicas variadas e estreitas (ARAÚJO *et al.*, 2002; SCHULZ & BOYLE, 2006; GOLYNSKA *et al.*, 2015). Lacava, Sebastianes e Azevedo (2010) definem como microrganismos endofíticos, todos aqueles cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar prejuízo ao hospedeiro, e que não desenvolvem estruturas externas visíveis.

Acredita-se que todas as plantas possuam microrganismos endofíticos. Existe especificidade na interação endófito-hospedeiro, porém, a mesma planta pode apresentar várias espécies de endófitos associados (AZEVEDO, 1998). Os microrganismos endofíticos provavelmente se estabeleceram pela coevolução com as plantas a milhões de anos, havendo evidências dessa interação pela detecção de microrganismos em folhas e ramos fossilizados (TAYLOR & TAYLOR, 2000; SILVA & BETTIOL, 2009).

Os endófitos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, sendo De Bary (1866), quem delineou a diferença entre eles e os patógenos de plantas. No final da década de 70, os microrganismos endofíticos passaram a adquirir importância científica, pois se descobriu que realizavam interações simbióticas com o hospedeiro, protegendo as plantas do ataque de insetos, de doenças e de herbívoros (AZEVEDO *et al.*, 2002).

Considerando esta íntima associação, geralmente mutualística, surgiu a hipótese de que os endófitos podem exercer efeitos benéficos nos seus hospedeiros (SILVA & BETTIOL, 2009). Enquanto o microrganismo endofítico obtém energia, nutrientes e abrigo, ele protege o hospedeiro contra patógenos, herbívoros e insetos, além de induzir o crescimento da planta e mecanismos de defesa (FIRÁKOVÁ *et al.*, 2007; ALVIN *et al.*, 2014).

Os endófitos podem infectar a espécie vegetal hospedeira horizontalmente por meio de aberturas e injúrias naturais, como estômatos ou crescimento das raízes, e artificiais, como injúrias causadas por práticas agrícolas. Bem como, pode ocorrer a infecção vertical, que se dá pelas sementes do hospedeiro, onde o endófito pode se instalar em uma planta por toda sua vida. A interação gerada pela transmissão vertical é

predominantemente mutualística, enquanto a interação causada pela transmissão horizontal tende a ser antagonista (MELO, 1998; ALY *et al.*, 2011).

A forma como o fungo infecta uma espécie vegetal pode determinar o tipo de interação endófito-hospedeiro. O endófito tende a permanecer em um estado latente por toda sua vida ou por um período prolongado, enquanto as condições ambientais lhe forem favoráveis. Neste caso, o endófito pode assumir uma função patogênica (ALY *et al.*, 2010). A composição de uma comunidade de endófitos e a frequência de infecção pode variar de acordo com a espécie hospedeira, idade do vegetal, características ambientais e vegetação associada (STONE *et al.*, 2004).

O nicho ocupado pelos microrganismos e sua interação com o hospedeiro é o que os diferencia entre endofítico, epifítico e fitopatógeno, não existindo um limite claro que separe estes grupos, mas sim, um gradiente entre eles (STROBEL *et al.*, 2004). Os fungos endofíticos ocupam um nicho semelhante ao ocupado pelos fitopatógenos, possibilitando o seu controle por meio de competição por nutrientes, produção de substâncias antagônicas, parasitando o patógeno, ou mesmo induzindo o desenvolvimento de resistência pela planta (PEIXOTO NETO *et al.*, 2002).

As interações endófito-planta podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas. A interação simbiótica com o hospedeiro se mostra muito importante, pois os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que diminuem a herbivoria e o ataque de insetos, conferem resistência a fitopatógenos e podem aumentar o desenvolvimento vegetal (RODRIGUES & DIAS FILHO, 1996; PEIXOTO NETO *et al.*, 2004; ZHANG, SONG e TAN, 2006; GOLINSKA *et al.*, 2015).

Os microrganismos endofíticos representam uma reserva ainda inexplorada de estruturas químicas únicas, geradas pelas relações coevolutivas entre hospedeiro-endófito (Figura 1). Sendo assim, existe grande possibilidade de encontrar novos metabólitos secundários com atividades biológicas relevantes em microrganismos endofíticos (GUNATILAKA, 2006).

Pesquisadores do mundo todo, tem demonstrado que endofíticos são potenciais produtores de novas moléculas biologicamente ativas (RAJ *et al.*, 2015), tais como compostos alifáticos, alcaloides, flavonoides, peptídeos e esteroides (YU *et al.*, 2010).

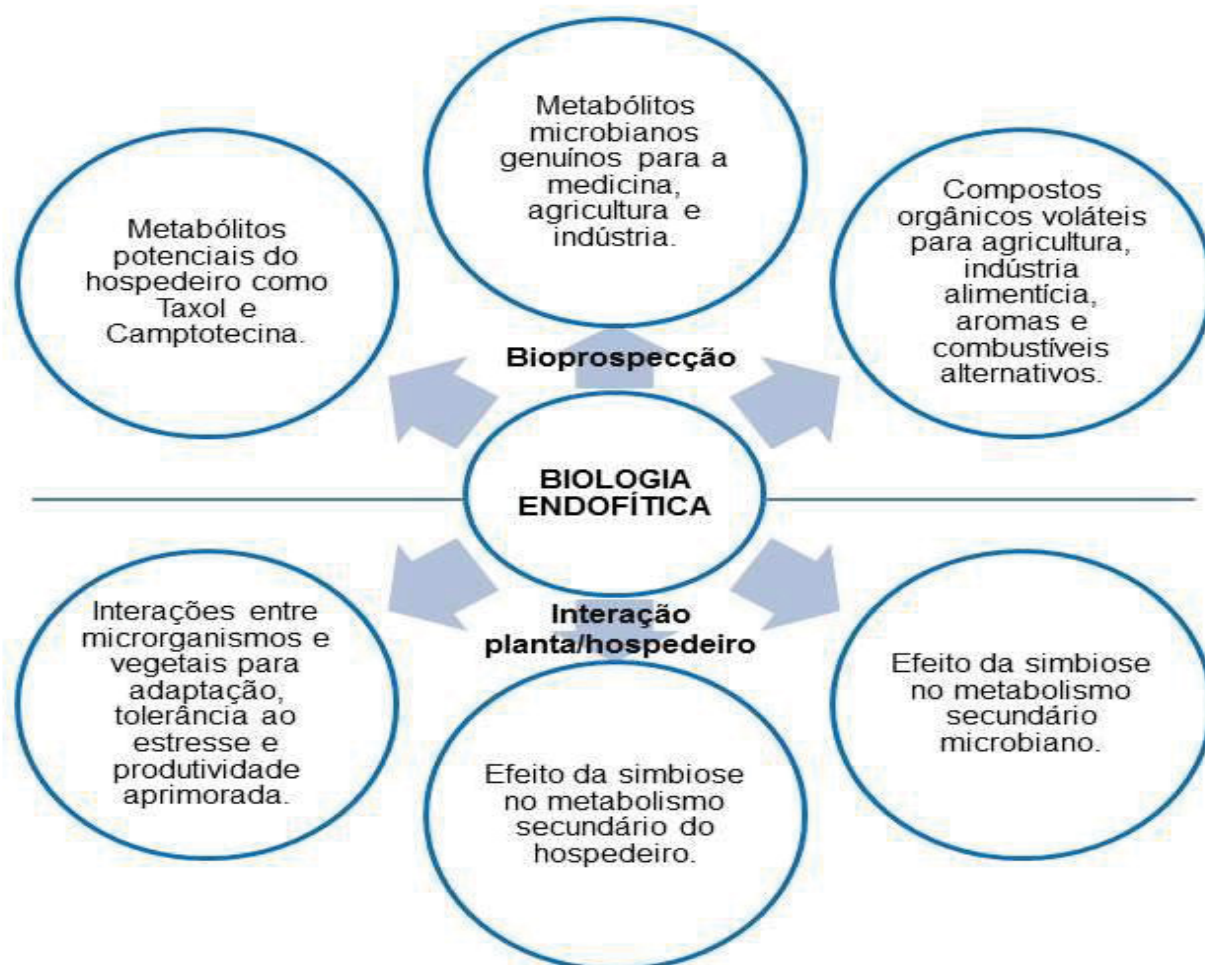


Figura 1. Interação simbiótica entre microrganismos endofíticos e a planta hospedeira, e bioprospecção dos metabólitos por eles produzidos.
 FONTE: Wani *et al.* (2015).

3.2 Produção de metabólitos secundários

Os metabólitos secundários correspondem a substâncias não essenciais, produzidas durante o crescimento e desenvolvimento de microrganismos e plantas, participando dos processos bioquímicos juntamente com os metabólitos primários (CROTEAU *et al.*, 2000). Estes metabólitos são caracterizados como moléculas pequenas, orgânicas e induzidas pela ação de enzimas como policetídeo sintetase (PKS), peptídeo não-ribossomal sintetase (NRPS), dimetiltransferase e preniltransferase (SIDDIQUE, 2012; SCHARF *et al.*, 2014).

Os metabólitos secundários costumam ser produzidos no final do crescimento exponencial do microrganismo ou quando inseridos em substratos com fonte nutricional

limitada (DEACON, 2006). Apesar da produção desses metabólitos não serem essenciais para a sobrevivência do hospedeiro, na relação endófito e planta, se mostram fundamentais na sinalização, regulação e manutenção da simbiose (BHARDWAJ & AGRAWAL, 2014).

Além disso, os fungos endofíticos atuam no controle biológico dos fitopatógenos. Estima-se que 80% desses fungos produzem compostos biologicamente ativos, como antibióticos, fungicidas e herbicidas, que atuam sobre o patógeno, através da indução gerada pelo endófito na planta hospedeira (ARAÚJO *et al.*, 2002; SCHULZ & BOYLE, 2005).

Mais de seis mil e quinhentos fungos endofíticos de espécies vegetais foram isolados em busca de novas substâncias com potencial para utilização na indústria, sugerindo que a associação endófito/hospedeiro induza a produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana e herbicida (ESPÓSITO & AZEVEDO, 2004). Estima-se que mais de trinta mil substâncias oriundas do metabolismo secundário fúngico são conhecidas (KELLER *et al.*, 2005).

Os fungos endofíticos estão recebendo uma maior atenção quanto à produção de novos metabólitos, devido a sua diversidade biológica e compostos estruturalmente incomuns, tornando-os candidatos potenciais a produção de substâncias para o controle de doenças em humanos e plantas (XU *et al.*, 2010). Outra característica desses fungos é que podem produzir até 73% mais metabólitos do que outras classes de microrganismos (STROBEL *et al.*, 2003).

Esses fatores têm estimulado os pesquisadores a buscarem novos compostos em meio a esses fungos, pois podem trazer grandes inovações para a agricultura, medicina, indústria alimentícia e farmacêutica. No entanto, a toxicidade de muitos desses compostos é o fator limitante nos estudos, pois seus efeitos podem ser deletérios a saúde humana, animal e agricultura (JUVVADI *et al.*, 2005).

Alguns critérios foram propostos por Strobel *et al.* (2004) para normatizar a busca por novos microrganismos com potencial para bioprospecção: plantas de biologia incomum que apresentem estratégias de sobrevivência únicas; plantas endêmicas com alta longevidade e pertencentes a florestas antigas; plantas que habitam locais com alto índice de biodiversidade; Plantas com histórico de uso medicinal.

A busca por novas moléculas em microrganismos endofíticos nos últimos anos gerou várias informações sobre substâncias com potencial antimicrobiano, antitumoral e inseticida, pertencentes a diferentes classes químicas como, alcaloides, esteroides,

terpenos, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides, lignanas, ácidos fenólicos e outros (ZHANG, SONG e TAN, 2006).

Rodrigues, Hesse e Werner (2000) avaliaram o efeito de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados de cajá (*Spondias mombin* L.). Os metabólitos de *Guignardia* sp. apresentaram atividade contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum* sp. e *Penicillium canadense*; *Pestalotiopsis guepinii* apresentou atividade contra *S. cerevisiae*; *Phomopsis* sp. obteve resultado contra *Cladosporium elatum*, *Mycotypha* sp. e *S. cerevisiae* (RODRIGUES, HESSE e WERNER, 2000).

Outros relatos de substâncias produzidas por fungos endofíticos com ação antimicrobiana, são descritos por Lu *et al.* (2000) que identificaram três novos metabólitos de *Colletotrichum* sp. isolado de erva-de-são-joão (*Artemisia annua* L.): O ácido coletótrico, produzido por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. & Sacc., isolado de *Artemisia* (*Artemisia mongolica* Fisch. ex Bess.), apresentou atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* Cohn e *S. aureus*; *Sarcina luteae* Cohn apresentou atividade contra o fungo fitopatogênico *Helminthosporium sativum* Pammel (ZOU *et al.*, 2000).

O gênero *Diaporthe*, comumente isolado como endófito numa ampla gama de hospedeiros, destaca-se por representar uma fonte de produção de metabólitos secundários com potencial biotecnológico e estruturas variadas, como xantonas, éteres diarilícos, citocalasinas, ácido convolvulânico e a micotoxina fomopsina A. No entanto, muitos desses compostos apresentam toxicidade elevada, limitando sua aplicação (HUSSAIN *et al.*, 2009). Este gênero representa um importante grupo de fungos com potencial biotecnológico, devido a produção de diversos metabólitos secundários, entre os quais podemos incluir as micotoxinas que afetam o sistema nervoso de vertebrados (BILLS *et al.*, 2002) e alcaloides com capacidade farmacológicas, tais como fomopsinas (DAI *et al.*, 2005). Dois novos policetídeos e cinco novos sequiterpenos da classe dos cadinanos foram isolados de *Phomopsis cassiae* Sacc., apresentando atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* Fresen e *Cladosporium sphaerospermum* Penz., e também atividade citotóxica, *in vitro*, contra linhagem celular de tumor cervical humano (HeLa) (SILVA *et al.*, 2006).

Outros trabalhos avaliando o potencial de isolados endófitos de *Diaporthe* sp., no controle de microrganismos, foram realizados por Chareprasert *et al.* (2006). Estes autores isolaram *Phomopsis* sp. de teca (*Tectona grandis* L.f.) e árvore da chuva (*Samanea saman* Jacq. Merr.) e observaram a inibição de *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* e *Candida albicans* C.P.Robin.

Corrado e Rodrigues (2004) obtiveram isolados endofíticos de *Phomopsis* sp. de folhas de perobinha (*Aspidosperma tomentosum* Mart.) e pecíolos de cajá, constatando que os extratos inibiram o crescimento de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Esses fatores evidenciam a grande importância deste gênero tanto na busca por novos metabólitos bioativos como a aplicabilidade na agricultura e biotecnologia.

3.3 O gênero *Diaporthe*

O gênero *Diaporthe* (Nitschke), na forma teleomórfica, foi descrito em 1870, enquanto seu anamorfo, *Phomopsis* (Sacc. Bubak) foi descrito em 1905. O gênero inclui espécies fitopatogênicas de ocorrência cosmopolita com potencial para infectar uma ampla gama de hospedeiros vegetais gerando prejuízos econômicos (HANLIN & MENEZES, 1996; KRUPPA *et al.*, 2012). Há relatos também de associação saprofítica (PROMPUTTHA *et al.*, 2010), endofítica (CHAPLA *et al.*, 2012) e como precursor de doenças em humanos (GARCIA-REYNE *et al.*, 2011).

A descrição das espécies de *Diaporthe* (sin. *Phomopsis*) foi realizada inicialmente com base no hospedeiro e conta atualmente com mais de 900 espécies indexadas no Index Fungorum para ambos os nomes (GAO *et al.*, 2014). Tal metodologia tem gerado críticas, pois uma mesma espécie de *Diaporthe* pode ocorrer em vários hospedeiros e num mesmo hospedeiro pode ocorrer mais de uma espécie (REHNER & UECKER, 1994; DIOGO *et al.*, 2010).

Uma revisão do gênero *Diaporthe* foi realizada por Wehmeyer em 1933, atribuindo menor importância ao hospedeiro de origem, reduzindo de 650 para 70 espécies reconhecidas, porém, as características do anamorfo não foram consideradas. Apenas 20% das espécies de *Phomopsis* possui descrição do teleomorfo (PHILLIPS, 2006).

Devido à dificuldade na identificação do complexo *Diaporthe*, a classificação de espécies desse gênero tem se baseado em características morfológicas e, principalmente, em filogenia molecular, especialmente as sequências da região ITS do DNAr e sequência parcial do gene que codifica o Fator de Elongação 1 α (EF-1 α) (GOMES *et al.*, 2013).

Há relatos de *Diaporthe* associado como endófito em uma ampla variedade de plantas, entre elas, palmito das bermudas (*Sabal bermudana* L.H. Bailey), palmeira-moinho-de-vento (*Trachycarpus fortunei* Hook.), uva de monte (*Cavendishia pubescens* Kunth), mineirão (*Stylosanthes guianensis* Aub.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e mangueira (*Mangifera indica* L.) (AZEVEDO *et al.*, 2000). Em plantas medicinais, alecrim-

pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) (SIQUEIRA *et al.*, 2011), Cássia (*Cassia spectabilis* Schrad.) (SILVA *et al.*, 2005), açoita-cavalo (*Luehea divaricata* Mart.) (BERNARDI-WENZEL *et al.*, 2010) e, cajá e perobinha (CORRADO & RODRIGUES, 2004).

Além disso, o gênero *Diaporthe* tem se destacado por ser uma fonte rica em produção de metabólitos secundários com potencial biotecnológico (CHAPLA *et al.*, 2011). Há relatos de 18 substâncias produzidas pelo gênero, como a fomoxantona, taxol, enzimas laccas, fomopsinas, fomopsicalasina, dicerandrol entre outras, com ação contra a malária, tuberculose, câncer, fungos e insetos (UDAYANGA *et al.*, 2011).

Há relatos sobre a produção de metabólitos por *Phomopsis* sp. isolados como endofíticos de plantas, entre eles, o antibiótico Phomol, obtido da fermentação do fungo em corticeira (*Erythrina crista-galli* L.) (WEBER *et al.*, 2004). Guo *et al.* (2008) verificaram atividade antibacteriana de *Phomopsis* contra *S. aureus* e *B. subtilis*. Isolados de *Phomopsis* sp. endófitos de *T. grandis* e *S. saman* inibiram *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* (CHAREPRASERT *et al.*, 2006). *Phomopsis* sp. endófitos de *A. tomentosum* e *S. mombin* inibiram o crescimento de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (CORRADO & RODRIGUES, 2004). Isolados de *P. cassiae*, inibiram os fungos fitopatogênicos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* (SILVA *et al.*, 2006).

REFERÊNCIAS

- ALVIN, A.; MILLER, K.I.; NEILAN, B.A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds, **Microbiol. Res.** 169 (2014) 483e495
- ALY, A. H.; DEBBAD, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity.** v.41, n.1, p.1 – 16, 2010.
- ALY, A. H.; DEBBAD, A.; J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant in habitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology.** v.90, p.1829–1845, 2011.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; KUBLINCKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P. T. **Manual: isolamento de microrganismos endofíticos.** Piracicaba: CalQ, 2002. 86 p.
- AZEVEDO, J.L. **Microrganismos endofíticos.** Pp. 117-137. In: MELO, I.S. e AZEVEDO, J.L. (eds.). *Ecologia Microbiana.* Jaguariúna, Embrapa-CNPMA, 1998.
- AZEVEDO, J. L.; JÚNIOR, W. M.; PEREIRA, J. O; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Environmental Biotechnology,** v. 3, n.1, p. 40-65, 2000.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.J.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Microrganismos Endofíticos e seu Papel em Plantas Tropicais. In: AZEVEDO, J. L.; SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria**. Caxias do Sul: Educs, 2002. p.269-294.

BERNARDI-WENZEL, J.; GARCÍA, A.; FILHO, C.J.R.; PRIOLI, A.J.; PAMPHILE, J.A. Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). **Biological Research**.v.43, n.4, pp. 375-384, 2010.

BHARDWAJ, A.; AGRAWAL, P. K. A Review fungal endophytes: as a store house of bioactive compound. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Bulgaria, v. 3, n. 9, p. 228–237, 2014.

BILLS, G.; DOMBROWSKY, A.; PELAEZ, F.; POLISHOOK, J. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. **Tropical mycology: micromycetes**, v. 2, p. 165-194, 2002.

CHAPLA, V.M.; ZANARDI, L.M.; LOPES, M.N.; BOIZANI, V.S.; SILVA, D.H.S.; ARAUJO, A.R. *Phomopsis* sp. um prolífico produtor de metabólitos especiais. **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. 2011.

CHAPLA, V. M. et al. Substâncias acetilênicas produzidas por *Saccharicola* sp., um fungo endofítico de *Eugenia jambolana*. In: 35 REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2012, São Paulo, Águas de Lindóia. **Anais da 35 Reunião Anual Da Sociedade Brasileira de Química** Responsabilidade, Ética e Progresso Social, 2012.

CHAREPRASERT, S.; PIAPUKIEW, J.; THIENHIRUN, S.; WHALLEY, A. J. S.;SIHANONTH, P. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 481-486, 2006.

CORRADO, M.; RODRIGUES, K.F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. **Journal Basic Microbiol**, v.44, p.157-160, 2004.

CROTEAU R.; KUTCHAN, T.M; LEWIS, N.G. Natural products (Secondary metabolites), cap.24. In: Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Buchanan, B; Grissem, W.; Jones, R. American Society of Plant Physiologists, 2000.

DAI, J.; KROHN, K.; FLORKE, U.; GEHLE, D.; AUST, H.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; RHEINHEIMER, J. Novel highly substituted biaryl ethers, Phomosines D–G, isolated from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Adenocarpus foliolosus*. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 23, p. 5100-5105, 2005.

DEACON, J.W. Fungal Biology. 4 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. 371p.

DIOGO, E. L. F.; SANTOS, J. M.; PHILLIPS, A. J. L. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal. **Fungal Diversity**, v. 44, p.107–115, 2010.

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

- FIRÁKOVÁ, S.; ŠTURDÍKOVÁ, M.; MÚČKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants, **Biologia** 62 (2007) 251 e 257
- FOX, E. M.; HOWLETT, B. J. Secondary metabolism: Regulation and role in fungal biology. *Current Opinion Microbiology*, v. 11, p. 481–487, 2008.
- GAO, Y.H.; SUN, W.; SU, Y.Y.; CAI, L. Tree new species of *Phomopsis* in Gutianshan Nature Reserve in China. **Mycological Progress**. v.13, p.111-121, 2014.
- GARCIA-REYNE, A. et al. Cutaneous infection by *Phomopsis longicolla* in a renal transplant recipient from Guinea: first report of human infection by this fungus. **Transplant Infectious Disease**, v. 13, p. 204–207, 2011.
- GARZONIO, D.M. & MCGEE, D.C. Comparison of seeds and crop residues as sources of inoculum for pod and stem blight of soybeans. **Plant disease**. v.67, p.1374-1376, 1983.
- GOLINSKA, P.; WYPIJ, M.; AGARKAR, G.; RATHOD, D.; DAHM, H.; RAI, M. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 108, p. 267–289, 2015.
- GOMES, R.R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, C.I.R.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. Diaporthe: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**. 31: 1–41, 2013.
- GUNATILAKA, L.A.A. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity and Implications of Their Occurrence. **Journal of Natural Products**.v.69, p.509-526, 2006.
- GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.
- HANLIN, R. T.; MENEZES, M. **Gêneros ilustrados de ascomicetos**. UFRPE. Recife-PE. 1996. 274p.
- HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revised. **Mycological Research**, v. 105(12), p.1422-1432. 2001.
- HERNÁNDEZ, F. E.; PIOLLI, R. N.; PERUZZO, A. M.; FORMENTO, A. N.; PRATTA, G. R. Caracterización morfológica y molecular de una colección de aislamientos de *Phomopsis longicolla* de la región templada y subtropical de Argentina. **International Journal of Tropical Biology and Conservation**, v. 63, n. 3, 2015.
- HUSSAIN, H.; AKHTAR, N.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; PESCIPELLI, G.; SALVADORI, P.; ANTUS, S.; KURTAN, T.; KROHN, K. New Biactive 2,3- epoxy cyclohexenesandiso coumarins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Laurus azorica*. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 5, p. 749-756, 2009.
- JUVVADI, P.R; SESHIME, Y; KITAMOTO, K. Genomics reveals traces of fungal phenylpropanoid-flavonoid metabolic pathway in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *The Journal of Microbiology*, v. 43, n.6, p.475-486, 2005.

KELLER, N.P.; TURNER, G.; BENNETT, J.W. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**. p. 937-947, 2005.

KRUPPA, P.C.; FABRI, E. G; RUSSOMANO, O. M. R. ; COUTINHO, L.N.. Ocorrência de *Phomopsis* sp. em Sementes de Urucum. **O Biológico**. São Paulo. v. 74, p. 55-57, 2012.

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**, Oxford, v. 151, n. 1, p. 67-73, 2000.

MELO, I. S. de. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. v.1. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p. 17-60.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: Interação com as plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 62-76, 2002.

PHILLIPS, A.J.L. The plant pathogenic genus *Phomopsis* and its teleomorph (*Diaporthe*): Development and application of morphological, biological and phylogenetic species concepts. Disponível em: <http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/personal_web_page.htm> Acesso em Janeiro de 2016.

PROMPUTTHA, I. et al. Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes? **Fungal Diversity**, v.41, p.89–99, 2010.

RAJ, K. G.; MANIKANDAN, R.; ARULVASU, C.; PANDI, M. Anti-proliferative effect of fungal taxol extracted from *Cladosporium oxysporum* against human pathogenic bacteria and human colon câncer cell line HCT 15, Spectrochim, **Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.** 138: 667-674, 2015.

REHNER, S. A., UECKER, F. A. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. **Canadian Journal of Botanic**, v. 72.p.1666-1674, 1994.

RODRIGUES, K. F.; DIAS FILHO, M. B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizanthacv.* Marandu and *B. humidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 31(12): 905-909, 1996

RODRIGUES, K.F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 261-267, 2000.

SCHULZ, B., BOYLE, C. Microbial root endophytes. In: Sieber, T.N (ed) What are endophytes? v.9, Springer, Berlin, p. 1–13, 2006.

SILVA, G. H.; TELES, H. L.; ZANARDI, L. M.; YOUNG, M. C. M.; EBERLIN, M. N.; HADDAD, R.; PFENNING, L. H.; COSTA NETO, C. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R. Cardinanes esquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). **Phytochemistry**, v. 67,p. 1964-1969, 2006.

SIQUEIRA, V. CONTI, R., DE ARAÚJO, J., SOUZA-MOTTA, C. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. And their antimicrobial activity. **Symbiosis**.Vol. 53, n. 2, pp. 89-95, 2011.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, p. 661-686, jun. de 2005.

SIDDIQUE, M. H. Study of the biosynthesis pathway of the geosmin in *Penicillium expansum*. Institut National Polytechnique de Toulouse, Laboratoire de Engenharia Química, França, 2012. Disponível em: <https://oatao.univ-toulouse.fr/8070/>. Acesso em: Abril de 2015.

SCHARF, D. H.; HEINEKAMP, T.; BRAKHAGE, A. A. Human and Plant Fungal Pathogens: The Role of Secondary Metabolites. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 10, n. 1, p. 10–12, 2014.

SCHUMANN, J.; HERTWECK, C. Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes. *Journal of Biotechnology*, v.124, p. 690-703, 2006.

SILVA, G. H.; TELES, H. L.; TREVISAN, H. C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H.; EBERLIN, M. N.; HADDAD, R.; COSTA-NETO, C. M.; ARAÚJO, A.R. New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**.Vol.16, n. 6B, pp. 1463-1466, 2005.

SILVA, G. H.; TELES, H. L.; ZANARDI, L. M.; YOUNG, M. C. M.; EBERLIN, M. N.; HADDAD, R.; PFENNING, L. H.; COSTA NETO, C. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R. Cardinanes esquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). **Phytochemistry**, v. 67,p. 1964-1969, 2006.

SILVA, H. S. A.; BETTIOL, W. Microrganismos Endofíticos como Agentes de Biocontrole da Ferrugem do Cafeeiro e de Promoção de Crescimento. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 1. ed. São Paulo, Jaguariúna, 2009. cap. 18, p. 276 - 287.

SMITH, S. A. et al. Bioactive endophytes warrants intensified exploration and conservation. **PLoS ONE**, v. 3, p. 30–52, 2008.

STONE, J.K.; POLISHOOK, J.D.; WHITE JUNIOR, J.F. Endophytic fungi. In: MUELLER, J.M.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S. **Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods**. San Diego: Elsevier Academic Press, p.241-70, 2004.

STROBEL, G.A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbioly and Molecular Biology Reviews**.v.67, 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.

TAYLOR, T.N.; TAYLOR, E.L. The rhyniechert ecosystem: a model for understanding fungal interactions. In: BACON, C.W.; WHITE, J.F. (Ed.). **Microbial endophytes**. New York: Marcel Decker, 2000.

UDAYANGA, D. et al. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common pathogens. **Fungal Diversity**, v. 50, p. 189–225, 2011.

UDAYANGA, D. et al. A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). **Fungal Diversity**, v. 56, p. 157–171, 2012.

WANI, Z. A.; ASHRAF, N.; MOHIUDDIN, T.; RIYAZ-UL-HASSAN, S. Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 99, n. 7, p. 2955–2965, 2015.

WEBER, D.; STERNER, O.; ANKE, T.; GORZALCZANCY, S.; MARTINO, V.; ACEVEDO, C. Phomol, a New Antiinflammatory Metabolite from an Endophyte of the Medicinal Plant *Erythrina cristagalli*. **The Journal of Antibiotics**, vol.57, p. 559-563, 2004.

XU, J.; EBADA, S.S.; PROKSCH, P. *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. **Fungal Diversity**.v.44, p.15-31, 2010.

YANG, J. et al. Metabolites from the mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. (#zsu-H76). **European Journal of Organic Chemistry**, v.19, p.3692–3695, 2010.

YU, H.; ZHANG, L.; LI, L.; ZHENG, C.; GUO, L.; LI, W. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes, *Microbiol. Res.* 165 (2010) 437e449

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

ZHAO, J.; ZHOU, L.; WANG, J.; SHAN, T.; ZHONG, L.; LIU, X.; GAO, X. Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. In: MENDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**. Badajoz: Formatex Research Center, 2010. p. 567-576. v. 1. (Microbiological bo series, 2).

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

CAPÍTULO 2. FILOGENIA E MORFOLOGIA REVELARAM DUAS NOVAS ESPÉCIES DE *Diaporthe* EM PEROBA ROSA (*Aspidosperma polyneuron*) NO BRASIL

RESUMO

Duas novas espécies de *Diaporthe* isoladas de sementes de peroba rosa (*Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg.), uma espécie florestal brasileira, são descritas e propostas. O reconhecimento de duas novas espécies é suportado pela morfologia e pela análise filogenética. Morfologicamente, *Diaporthe* sp. 1 é caracterizada por alfa conídios hialinos, sem septo, lisos, oblongo a elipsóides ($7 - 8 \times 3 \mu\text{m}$) e beta conídios hialinos, sem septo, reto a curvos, $23 - 30 \times 2 \mu\text{m}$. *Diaporthe* sp. 2 é caracterizada por alfa conídios hialinos, sem septo, fusiforme ($8 - 10 \times 3 \mu\text{m}$) e beta conídios hialinos, sem septo, reto a curvados, $25 - 29 \times 2 \mu\text{m}$. Os dados da análise filogenética usando as regiões interespaçadora (ITS), calmodulina (CAL), histona (HIS), fator de alongação (TEF1) e beta tubulina (TUB) mostraram que os isolados das novas espécies formam dois clados distintos dentro do gênero *Diaporthe*.

Palavras - chave: Diaporthaceae, taxonomia, espécie florestal nativa.

1 INTRODUÇÃO

Fungos do gênero *Diaporthe* (sin. *Phomopsis*) estabelecem relações como endófito, saprófito ou parasita, e colonizam os tecidos jovens do hospedeiro, associando-se às sementes, que são a principal forma de dispersão do patógeno em longas distâncias (GARZONIO & MCGEE, 1983; GOMES *et al.*, 2013; HERNÁNDEZ *et al.*, 2015). Como fitopatógenos, *Diaporthe* spp. são capazes de infectar vários hospedeiros provocando podridão de raízes e frutos, cancrios, manchas foliares e murcha (FAN *et al.*, 2015; LAWRENCE *et al.*, 2015; UDAYANGA *et al.*, 2015; DISSANAYAKE *et al.*, 2017)

A identificação das espécies do gênero *Diaporthe* era feita, inicialmente, baseada na morfologia e no hospedeiro (UECKER, 1988). Em consulta ao MycoBank (2020) pode-se listar mais de 950 espécies no gênero *Phomopsis*, enquanto, *Diaporthe* contém quase 1.000 espécies. Tal metodologia era frágil e gerava muitas dúvidas, pois uma mesma espécie de *Diaporthe* poderia ocorrer em vários hospedeiros e mais de uma espécie poderia ocorrer em um mesmo hospedeiro (REHNER & UECKER, 1994). A análise multilocus tem-se mostrado eficaz para estudos filogenéticos e identificação em nível de espécie para vários gêneros de fungos com dificuldades de elucidação taxonômica, como *Colletotrichum* e *Fusarium* (PRIHASTUTI *et al.*, 2009; MILLER & HUHDORF, 2005; O'DONNELL, 2004).

Mazarotto *et al.*, (2019) relataram a associação de *Phomopsis* anamorfo de *Diaporthe*, com sementes de peroba rosa (*Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg.), espécie florestal nativa do Brasil. Estes autores caracterizaram morfologicamente e identificaram

33 isolados apenas como *Phomopsis* sp., pois o sequenciamento das regiões ITS do rDNA e sequência parcial do fator de alongação 1-alfa não foram suficientes para dar suporte a identificação específica.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi ampliar a caracterização morfológica destes isolados e usar a filogenia molecular baseado nas regiões gênicas ITS, CAL, HIS, TEF1, e TUB como ferramenta para definir a taxonomia destes isolados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados fúngicos

Trinta e três isolados de *Diaporthe* spp. pertencentes à Coleção de Fungos e Oomicetos Florestais, da Embrapa Florestas, Colombo, Paraná, Brasil, foram utilizados nesse estudo. Esses isolados foram obtidos através de testes de isolamento para detecção de fungos em associação endofítica, epifítica e parasítica com sementes de peroba rosa (*A. polyneuron*) (MAZAROTTO *et al.*, 2019) provenientes de 10 municípios do estado do Paraná (Tabela 1).

2.2 Caracterização morfológica

Discos de meio batata dextrose ágar (BDA – Infusão de 200 g de batata, 20 g de dextrose, 20 g de ágar e 1.000 mL de água destilada) de 5 mm de diâmetro com micélio em crescimento ativo foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo BDA, aveia ágar (OA – 30 g de farinha de aveia, 15 g de ágar e 1.000 mL de água destilada) e extrato de malte ágar 2% (MEA – 20 g de extrato de malte, 20 g de dextrose, 1 g de peptona, 15 g de ágar e 1.000 mL de água destilada), e incubados em câmara BOD a 24 °C no escuro (CROUS *et al.*, 2009). As características das culturas em MEA, OA, e BDA (coloração do verso e reverso, pigmentos, bordas, tipo de micélio, estruturas reprodutivas visíveis) foram anotadas após 15 dias e o diâmetro do crescimento foi medido após 7 e 10 dias de incubação. As colorações das culturas foram classificadas de acordo com a carta de cores de Rayner (1970). As culturas foram examinadas periodicamente para averiguar o desenvolvimento de conidiomas. As características dos conídios foram observadas através de lâminas montadas em ácido láctico puro, medindo 50 estruturas com aumento de 1000x para cada isolado utilizando microscópio Zeiss AxioLab.A1.

Tabela 1. Tipo de associação e isolados de *Diaporthe* spp. obtidos em sementes de peroba rosa (*Aspidosperma polyneuron*) coletadas em 10 municípios do estado do Paraná.

| Isolado | Associação | Município | Espécies |
|---------|------------|--------------------------|------------------------|
| END-7 | Endofítica | Telêmaco Borba | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| END-9 | Endofítica | Cruzeiro do Iguaçu | <i>Diaporthe</i> sp. 2 |
| END-24 | Endofítica | Terra Boa | <i>Diaporthe</i> sp. 2 |
| END-41 | Endofítica | Boa Vista da Aparecida | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| END-49 | Endofítica | Cianorte | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| END-54 | Endofítica | São Jorge do Oeste | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| END-57 | Endofítica | São Jorge do Oeste | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| END-58 | Endofítica | Realeza | <i>Diaporthe</i> sp. 2 |
| END-64 | Endofítica | Corbélia | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| END-65 | Endofítica | Corbélia | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| END-67 | Endofítica | Corbélia | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| END-68 | Endofítica | Realeza | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| END-69 | Endofítica | Boa Vista da Aparecida | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| END-72 | Endofítica | Nova Prata do Iguaçu | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| END-74 | Endofítica | Nova Prata do Iguaçu | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| END-75 | Endofítica | Nova Prata do Iguaçu | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| END-78 | Endofítica | Boa Vista da Aparecida | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| DET-1 | Epifítica | Capitão Leonidas Marques | <i>Diaporthe</i> sp. 2 |
| DET-7 | Epifítica | Telêmaco Borba | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| DET-10 | Epifítica | Telêmaco Borba | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| DET-40 | Epifítica | Cianorte | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| DET-57 | Epifítica | Nova Prata do Iguaçu | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| DET-67 | Epifítica | Corbélia | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| DET-71 | Epifítica | Corbélia | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| DET-73 | Epifítica | Corbélia | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| DET-77 | Epifítica | Corbélia | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| TR-31 | Parasítica | Corbélia | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| TR-32 | Parasítica | Cruzeiro do Iguaçu | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| TR-34 | Parasítica | Telêmaco Borba | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| TR-35 | Parasítica | Capitão Leonidas Marques | <i>Diaporthe</i> sp. 2 |
| TR-37 | Parasítica | Cruzeiro do Iguaçu | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| TR-40 | Parasítica | Cianorte | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| TR-58 | Parasítica | Terra Boa | <i>Diaporthe</i> sp. 2 |

Fonte: O autor (2020).

2.3 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Os isolados de *Diaporthe* foram cultivados em BDA por 96 h no escuro a 24 °C para produzir material para extração de DNA, e então aproximadamente 1 cm² da massa micelial foi transferida para microtubos de 1,5 mL. O DNA foi extraído utilizando o método CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) (Gerrits Van Den Ende & de Hoog, 1999).

Os primers ITS5 e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990) foram utilizados para amplificar a região interespaçadora do DNA ribossômico (ITS). Os primers EF1-728F e EF1-986R (CARBONE & KOHN, 1999) foram utilizados para amplificar parcialmente o gene do fator de alongação 1- α (TEF1) e parte do gene calmodulina (CAL) foi sequenciado usando CAL-228F e CAL- 737R (CARBONE & KOHN, 1999). Os primers CYLH3F (CROUS *et al.* 2004b) e H3-1b (GLASS & DONALDSON, 1995) foram utilizados para amplificar parte da histona H3 (HIS), e os primers Bt-2a e Bt-2b (GLASS & DONALDSON, 1995) para amplificar parte do gene β -tubulina (TUB).

As reações de amplificação tiveram um total de 25 μ L, composto por 1xPCR buffer (Invitrogen), 5.6% DMSO (v/v), 20 μ M dNTP, 0,2 μ M de cada primer, 0,25 U de *Taq Platinum* DNA polymerase (Invitrogen), e 10 ng de DNA. As condições da PCR foram as mesmas para todos os loci, exceto a concentração de $MgCl_2$: 2,5 mM para TEF1, 1,5 mM para ITS e CAL, 1,25 mM para TUB e HIS.

As condições das PCR foram: Etapa inicial de 2 min a 94 °C, seguido por 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min na temperatura de anelamento adequada para cada região, e 1 min a 72 °C, seguido por extensão final por 5 min a 72 °C. A temperatura de anelamento variou para cada gene: 62 °C para TUB, 60 °C para HIS e 55 °C para TEF1, ITS e CAL.

Os amplicons foram purificados com solução de Polietileno Glicol (PEG) 20% (v/v) (Sigma-Aldrich) e sequenciados com BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1 (Applied Biosystems). As amostras foram analisadas usando um sequenciador ABI 3500 (Applied Biosystems).

2.4 Análise filogenética

As sequências consenso foram obtidas utilizando o software Staden 1.6 (BONFIELD *et al.*, 2006), alinhadas por meio do MAFFT v.7 (KATO & STANDLEY, 2013) e editadas manualmente com o auxílio do MEGA 7 (KUMAR *et al.*, 2016).

As análises de Máxima Verossimilhança (MLE) e Inferência Bayesiana (BI) foram conduzidas inicialmente de forma individual para cada locus e após foi realizada a análise multilocus para os cinco loci simultaneamente (ITS, CAL, HIS, TEF1, TUB). A máxima verossimilhança foi realizada utilizando o software MEGA 7, com parâmetros obtidos pelo BestModels e bootstrap com 1.000 repetições. A inferência bayesiana foi realizada com MrBayes v.3.2.5 (RONQUIST *et al.*, 2012). O melhor modelo evolutivo para cada partição foi determinado com MrModeltest v. 2.3 (NYLANDER, 2004). Todas as análises foram realizadas através da comparação dos isolados de *Diaporthe* spp. desse estudo com

sequências ex-type do gênero obtidas de estudos recentes (Tabela 2). Como outgroup foram utilizadas as sequências de *Diaporthella corylina* (CBS 121124) (GOMES *et al.* 2013). As árvores foram montadas pelo software FigTree v.1.3.1 (RAMBAUT & DRUMMOND, 2010).

Tabela 2. Espécies de *Diaporthe* spp. incluídas no estudo para análise filogenética e número de acesso no GenBank.

| Espécie | Isolado | Hospedeiro | Local | Número de Acesso GenBank | | | | |
|---------------------------|------------|-------------------------------|---------------|--------------------------|----------|----------|----------|----------|
| | | | | ITS | CAL | HIS | TEF1 | TUB |
| <i>D. acaciigena</i> | CBS 129521 | <i>Acacia retinodes</i> | Austrália | KC343005 | KC343247 | KC343489 | KC343731 | KC343973 |
| <i>D. acerina</i> | CBS 137.27 | <i>Acer saccharum</i> | - | KC343006 | KC343248 | KC343490 | KC343732 | KC343974 |
| <i>D. alleghaniensis</i> | CBS 495.72 | <i>Betula alleghaniensis</i> | Canadá | KC343007 | KC343249 | KC343491 | KC343733 | KC343975 |
| <i>D. alnea</i> | CBS 146.46 | <i>Betulaceae</i> | Países baixos | KC343008 | KC343250 | KC343492 | KC343734 | KC343976 |
| <i>D. ambigua</i> | CBS 114015 | <i>Pyrus communis</i> | África do Sul | KC343010 | KC343252 | KC343494 | KC343736 | KC343978 |
| <i>D. ampelina</i> | CBS 111888 | <i>Vitis vinifera</i> | USA | KC343016 | KC343258 | KC343500 | KC343742 | KC343984 |
| <i>D. amygdali</i> | CBS 126679 | <i>Prunus dulcis</i> | Portugal | KC343022 | KC343264 | KC343506 | KC343748 | KC343990 |
| <i>D. anacardii</i> | CBS 720.97 | <i>Anacardium occidentale</i> | África | KC343024 | KC343266 | KC343508 | KC343750 | KC343992 |
| <i>D. angelicae</i> | CBS 100871 | <i>Foeniculum vulgare</i> | Itália | KC343025 | KC343267 | KC343509 | KC343751 | KC343993 |
| <i>D. arctii</i> | DP 0482 | <i>Arctium</i> sp. | - | KJ590736 | KJ612133 | KJ659218 | KJ590776 | KJ610891 |
| <i>D. arecae</i> | CBS 161.64 | <i>Areca catechu</i> | India | KC343032 | KC343274 | KC343516 | KC343758 | KC344000 |
| <i>D. arengae</i> | CBS 114979 | <i>Arenga engleri</i> | Hong Kong | KC343034 | KC343276 | KC343518 | KC343760 | KC344002 |
| <i>D. aspalathi</i> | CBS 117168 | <i>Aspalathus linearis</i> | África do Sul | KC343035 | KC343277 | KC343519 | KC343761 | KC344003 |
| <i>D. australafricana</i> | CBS 111886 | <i>Vitis vinifera</i> | Austrália | KC343038 | KC343280 | KC343522 | KC343764 | KC344006 |
| <i>D. batatas</i> | CBS 122.21 | <i>Ipomoea batatas</i> | EUA | KC343040 | KC343282 | KC343524 | KC343766 | KC344008 |
| <i>D. beckhausii</i> | CBS 138.27 | <i>Viburnum</i> sp. | - | KC343041 | KC343283 | KC343525 | KC343767 | KC344009 |
| <i>D. betulae</i> | CFCC 50469 | <i>Betula platyphylla</i> | China | KT732950 | KT732997 | KT732999 | KT733016 | KT733020 |
| <i>D. betulicola</i> | CFCC 51128 | <i>Betula albosinensis</i> | China | KX024653 | KX024659 | KX024661 | KX024655 | KX024657 |
| <i>D. bicincta</i> | CBS 121004 | <i>Juglans</i> sp. | EUA | KC343134 | KC343376 | KC343618 | KC343860 | KC344102 |

Continua

Tabela 2. Continuação

| Espécie | Isolado | Hospedeiro | Local | Número de Acesso GenBank | | | | |
|-------------------------|------------|---------------------------------|---------------|--------------------------|----------|----------|----------|----------|
| | | | | ITS | CAL | HIS | TEF1 | TUB |
| <i>D. brasiliensis</i> | CBS 133183 | <i>Aspidosperma tomentosum</i> | Brasil | KC343042 | KC343284 | KC343526 | KC343768 | KC344010 |
| <i>D. carpini</i> | CBS 114437 | <i>Carpinus betulus</i> | Suécia | KC343044 | KC343286 | KC343528 | KC343770 | KC344012 |
| <i>D. caulivora</i> | CBS 127268 | <i>Glycine max</i> | Croácia | KC343045 | KC343287 | KC343529 | KC343771 | KC344013 |
| <i>D. celastrina</i> | CBS 139.27 | <i>Celastrus scandens</i> | - | KC343047 | KC343289 | KC343531 | KC343773 | KC344015 |
| <i>D. chamaeropsis</i> | CBS 454.81 | <i>Chamaerops humilis</i> | Grécia | KC343048 | KC343290 | KC343532 | KC343774 | KC344016 |
| <i>D. cinerascens</i> | CBS 719.96 | <i>Ficus carica</i> | Bulgária | KC343050 | KC343292 | KC343534 | KC343776 | KC344018 |
| <i>D. citri</i> | CBS 230.52 | <i>Citrus sinensis</i> | Suriname | KC343052 | KC343294 | KC343536 | KC343778 | KC344020 |
| <i>D. convolvuli</i> | CBS 124654 | <i>Convolvulus arvensis</i> | Turquia | KC343054 | KC343296 | KC343538 | KC343780 | KC344022 |
| <i>D. crataegi</i> | CBS 114435 | <i>Crataegus oxyacantha</i> | Suecia | KC343055 | KC343297 | KC343539 | KC343781 | KC344023 |
| <i>D. crotalariae</i> | CBS 162.33 | <i>Crotalaria spectabilis</i> | EUA | KC343056 | KC343298 | KC343540 | KC343782 | KC344024 |
| <i>D. cucurbitae</i> | CBS 136.25 | - | - | KC343031 | KC343273 | KC343515 | KC343757 | KC343999 |
| <i>D. cuppatea</i> | CBS 117499 | <i>Aspalathus linearis</i> | África do sul | KC343057 | KC343299 | KC343541 | KC343783 | KC344025 |
| <i>D. cynaroidis</i> | CBS 122676 | <i>Protea cynaroides</i> | África do sul | KC343058 | KC343300 | KC343542 | KC343784 | KC344026 |
| <i>D. decedens</i> | CBS 109772 | <i>Corylus avellana</i> | Austria | KC343059 | KC343301 | KC343543 | KC343785 | KC344027 |
| <i>D. detrusa</i> | CBS 109770 | <i>Berberis vulgaris</i> | Austria | KC343061 | KC343303 | KC343545 | KC343787 | KC344029 |
| <i>D. elaeagni</i> | CBS 504.72 | <i>Elaeagnus</i> sp. | Países baixos | KC343064 | KC343306 | KC343548 | KC343790 | KC344032 |
| <i>D. endophytica</i> | CBS 133811 | <i>Schinus terebinthifolius</i> | Brasil | KC343065 | KC343307 | KC343549 | KC343791 | KC344033 |
| <i>D. eres</i> | CBS 101742 | <i>Fraxinus</i> sp. | Países baixos | KC343073 | KC343315 | KC343557 | KC343799 | KC344041 |
| <i>D. eugeniae</i> | CBS 444.82 | <i>Eugenia aromatica</i> | Sumatra | KC343098 | KC343340 | KC343582 | KC343824 | KC344066 |
| <i>D. fibrosa</i> | CBS 109751 | <i>Rhamnus cathartica</i> | Austria | KC343099 | KC343341 | KC343583 | KC343825 | KC344067 |
| <i>D. foeniculacea</i> | CBS 123208 | <i>Foeniculum vulgare</i> | Portugal | KC343104 | KC343346 | KC343588 | KC343830 | KC344072 |
| <i>D. ganjae</i> | CBS 180.91 | <i>Cannabis sativa</i> | EUA | KC343112 | KC343354 | KC343596 | KC343838 | KC344080 |
| <i>D. gardeniae</i> | CBS 288.56 | <i>Gardenia florida</i> | Itália | KC343113 | KC343355 | KC343597 | KC343839 | KC344081 |
| <i>D. helianthi</i> | CBS 592.81 | <i>Helianthus annuus</i> | Sérvia | KC343115 | KC343357 | KC343599 | KC343841 | KC344083 |
| <i>D. heveae</i> | CBS 852.97 | <i>Hevea brasiliensis</i> | Brasil | KC343116 | KC343358 | KC343600 | KC343842 | KC344084 |
| <i>D. hickoriae</i> | CBS 145.26 | <i>Carya glabra</i> | EUA | KC343118 | KC343360 | KC343602 | KC343844 | KC344086 |
| <i>D. hongkongensis</i> | CBS 115448 | <i>Dichroa febrifuga</i> | China | KC343119 | KC343361 | KC343603 | KC343845 | KC344087 |

Continua

Tabela 2. Continuação

| Espécie | Isolado | Hospedeiro | Local | Número de Acesso GenBank | | | | |
|---------------------------------|------------|---------------------------------|----------------------|--------------------------|----------|----------|----------|----------|
| | | | | ITS | CAL | HIS | TEF1 | TUB |
| <i>D. hordei</i> | CBS 481.92 | <i>Hordeum vulgare</i> | Noruega | KC343120 | KC343362 | KC343604 | KC343846 | KC344088 |
| <i>D. impuls</i> | CBS 114434 | <i>Sorbus aucuparia</i> | Suécia | KC343121 | KC343363 | KC343605 | KC343847 | KC344089 |
| <i>D. inconspicua</i> | CBS 133813 | <i>Maytenus ilicifolia</i> | Brasil | KC343123 | KC343365 | KC343607 | KC343849 | KC344091 |
| <i>D. infecunda</i> | CBS 133812 | <i>Schinus terebinthifolius</i> | Brasil | KC343126 | KC343368 | KC343610 | KC343852 | KC344094 |
| <i>D. longicolla</i> | FAU 599 | <i>Glycine max</i> | EUA | KJ590728 | KJ612124 | KJ659188 | KJ590767 | KJ610883 |
| <i>D. longispora</i> | CBS 194.36 | <i>Ribes</i> sp. | Canadá | KC343135 | KC343377 | KC343619 | KC343861 | KC344103 |
| <i>D. lusitanicae</i> | CBS 123212 | <i>Foeniculum vulgare</i> | Portugal | KC343136 | KC343378 | KC343620 | KC343862 | KC344104 |
| <i>D. manihotia</i> | CBS 505.76 | <i>Manihot utilissima</i> | Ruanda | KC343138 | KC343380 | KC343622 | KC343864 | KC344106 |
| <i>D. mayteni</i> | CBS 133185 | <i>Maytenus ilicifolia</i> | Brasil | KC343139 | KC343381 | KC343623 | KC343865 | KC344107 |
| <i>D. megalospora</i> | CBS 143.27 | <i>Sambucus canadensis</i> | - | KC343140 | KC343382 | KC343624 | KC343866 | KC344108 |
| <i>D. melonis</i> | CBS 435.87 | <i>Glycine soja</i> | Indonésia | KC343141 | KC343383 | KC343625 | KC343867 | KC344109 |
| <i>D. musigena</i> | CBS 129519 | <i>Musa</i> sp. | Austrália | KC343143 | KC343385 | KC343627 | KC343869 | KC344111 |
| <i>D. neilliae</i> | CBS 144.27 | <i>Spiraea</i> sp. | - | KC343144 | KC343386 | KC343628 | KC343870 | KC344112 |
| <i>D. neoarctii</i> | CBS 109490 | <i>Ambrosia trifida</i> | EUA | KC343145 | KC343387 | KC343629 | KC343871 | KC344113 |
| <i>D. nobilis</i> | CBS 113470 | <i>Castanea sativa</i> | Coréia | KC343146 | KC343388 | KC343630 | KC343872 | KC344114 |
| <i>D. nomurai</i> | CBS 157.29 | <i>Morus</i> sp. | Japão | KC343154 | KC343396 | KC343638 | KC343880 | KC344122 |
| <i>D. novem</i> | CBS 127269 | <i>Glycine max</i> | Croácia | KC343155 | KC343397 | KC343639 | KC343881 | KC344123 |
| <i>D. oncostoma</i> | CBS 100454 | <i>Robinia pseudoacacia</i> | Alemanha | KC343160 | KC343402 | KC343644 | KC343886 | KC344128 |
| <i>D. oxe</i> | CBS 133186 | <i>Maytenus ilicifolia</i> | Brasil | KC343164 | KC343406 | KC343648 | KC343890 | KC344132 |
| <i>D. padi</i> var. <i>padi</i> | CBS 114649 | <i>Alnus glutinosa</i> | Suécia | KC343170 | KC343412 | KC343654 | KC343896 | KC344138 |
| <i>D. paranensis</i> | CBS 133184 | <i>Maytenus ilicifolia</i> | Brasil | KC343171 | KC343413 | KC343655 | KC343897 | KC344139 |
| <i>D. perijuncta</i> | CBS 109745 | <i>Ulmus glabra</i> | Austria | KC343172 | KC343414 | KC343656 | KC343898 | KC344140 |
| <i>D. perseae</i> | CBS 151.73 | <i>Persea gratissima</i> | Países baixos | KC343173 | KC343415 | KC343657 | KC343899 | KC344141 |
| <i>D. phaseolorum</i> | CBS 116019 | <i>Caperonia palustris</i> | EUA | KC343175 | KC343417 | KC343659 | KC343901 | KC344143 |
| <i>D. pseudomangiferae</i> | CBS 101339 | <i>Mangifera indica</i> | República Dominicana | KC343181 | KC343423 | KC343665 | KC343907 | KC344149 |
| <i>D. pseudophoenicicola</i> | CBS 462.69 | <i>Phoenix dactylifera</i> | Espanha | KC343184 | KC343426 | KC343668 | KC343910 | KC344152 |
| <i>D. pustulata</i> | CBS 109742 | <i>Acer pseudoplatanus</i> | Austria | KC343185 | KC343427 | KC343669 | KC343911 | KC344153 |
| <i>D. raonikayaporum</i> | CBS 133182 | <i>Spondias mombin</i> | Brasil | KC343188 | KC343430 | KC343672 | KC343914 | KC344156 |
| <i>D. rhoina</i> | CBS 146.27 | <i>Rhus toxicodendron</i> | - | KC343189 | KC343431 | KC343673 | KC343915 | KC344157 |
| <i>D. rostrata</i> | CFCC 50062 | <i>Juglans mandshurica</i> | China | KP208847 | KP208849 | KP208851 | KP208853 | KP208855 |
| <i>D. rudis</i> | CBS 100170 | <i>Laburnumanagyroides</i> | | KC343230 | KC343472 | KC343714 | KC343956 | KC344198 |
| <i>D. saccharata</i> | CBS 116311 | <i>Protea repens</i> | África do Sul | KC343190 | KC343432 | KC343674 | KC343916 | KC344158 |

Continua

Tabela 2. Continuação

| Espécie | Isolado | Hospedeiro | Local | Número de Acesso GenBank | | | | |
|------------------------------|------------|---------------------------------|---------------|--------------------------|----------|----------|----------|----------|
| | | | | ITS | CAL | HIS | TEF1 | TUB |
| <i>D. schini</i> | CBS 133181 | <i>Schinus terebinthifolius</i> | Brasil | KC343191 | KC343433 | KC343675 | KC343917 | KC344159 |
| <i>D. sclerotioides</i> | CBS 296.67 | <i>Cucumis sativus</i> | Países baixos | KC343193 | KC343435 | KC343677 | KC343919 | KC344161 |
| <i>D. scobina</i> | CBS 251.38 | <i>Fraxinus excelsior</i> | Inglaterra | KC343195 | KC343437 | KC343679 | KC343921 | KC344163 |
| <i>D. sojajae</i> | CBS 100.87 | <i>Glycine soja</i> | Itália | KC343196 | KC343438 | KC343680 | KC343922 | KC344164 |
| <i>D. stictica</i> | CBS 370.54 | <i>Buxus sempervirens</i> | Itália | KC343212 | KC343454 | KC343696 | KC343938 | KC344180 |
| <i>D. subordinaria</i> | CBS 101711 | <i>Plantago lanceolata</i> | Nova Zelândia | KC343213 | KC343455 | KC343697 | KC343939 | KC344181 |
| <i>D. tecomae</i> | CBS 100547 | <i>Tabebuia</i> sp. | Brasil | KC343215 | KC343457 | KC343699 | KC343941 | KC344183 |
| <i>D. terebinthifolii</i> | CBS 133180 | <i>Schinus terebinthifolius</i> | Brasil | KC343216 | KC343458 | KC343700 | KC343942 | KC344184 |
| <i>D. toxica</i> | CBS 534.93 | <i>Lupinus angustifolius</i> | Austrália | KC343220 | KC343462 | KC343704 | KC343946 | KC344188 |
| <i>D. ueckerae</i> | FAU 656 | <i>Cucumis melo</i> | EUA | KJ590726 | KJ612122 | KJ659215 | KJ590747 | KJ610881 |
| <i>D. vaccinii</i> | CBS 118571 | <i>Vaccinium corymbosum</i> | EUA | KC343223 | KC343465 | KC343707 | KC343949 | KC344191 |
| <i>D. vexans</i> | CBS 127.14 | <i>Solanum melongena</i> | EUA | KC343229 | KC343471 | KC343713 | KC343955 | KC344197 |
| <i>D. woodii</i> | CBS 558.93 | <i>Lupinus</i> sp. | Austrália | KC343244 | KC343486 | KC343728 | KC343970 | KC344212 |
| <i>D. woolworthii</i> | CBS 148.27 | <i>Ulmus americana</i> | - | KC343245 | KC343487 | KC343729 | KC343971 | KC344213 |
| <i>Diaporthella corylina</i> | CBS 121124 | <i>Corylus</i> sp. | China | KC343004 | KC343246 | KC343488 | KC343730 | KC343972 |

Fonte: O Autor (2020).

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização morfológica

Duas espécies novas de *Diaporthe* foram caracterizadas por análises moleculares, juntamente com a morfologia da cultura e com a descrição das estruturas anamórficas.

Diaporthe sp. 1

Hospedeiro/Distribuição: Sementes de *Aspidosperma polyneuron* no Brasil.

Descrição original: Teleomorfia: Indeterminado. Anamorfia: Conidiomata picnidial, globoso a cônico, semi-imerso, ostiolado, marrom a preto, espalhados ou agregados. Massa conidial globosa, branco a creme (Figura 1 - D e E).

Conidióforos e células conidiogênicas hialinas. Alfa conídio hialino, oblongo a elipsóide, ápice arredondado, base obtusa a subtruncado, $(6-7 - 8(-9) \times 3 (-4) \mu\text{m}$. Beta conídio hialino, reto a curvado, $(18-23 - 30(-38) \times 2 (-3) \mu\text{m}$ (Figura 1 – F).

Culturas: Colônias cobriram as placas após 10 dias no escuro a 25 °C, em todos os meios. Crescimento em discos concêntricos com micélio aéreo esparso. Em BDA verso branco com manchas amarelo enxofre, reverso bege a bege vináceo. Em OA verso e reverso branco a bege. Em MEA verso branco com manchas amarelo enxofre reverso âmbar com manchas oliva (Figura 1 – A, B e C).

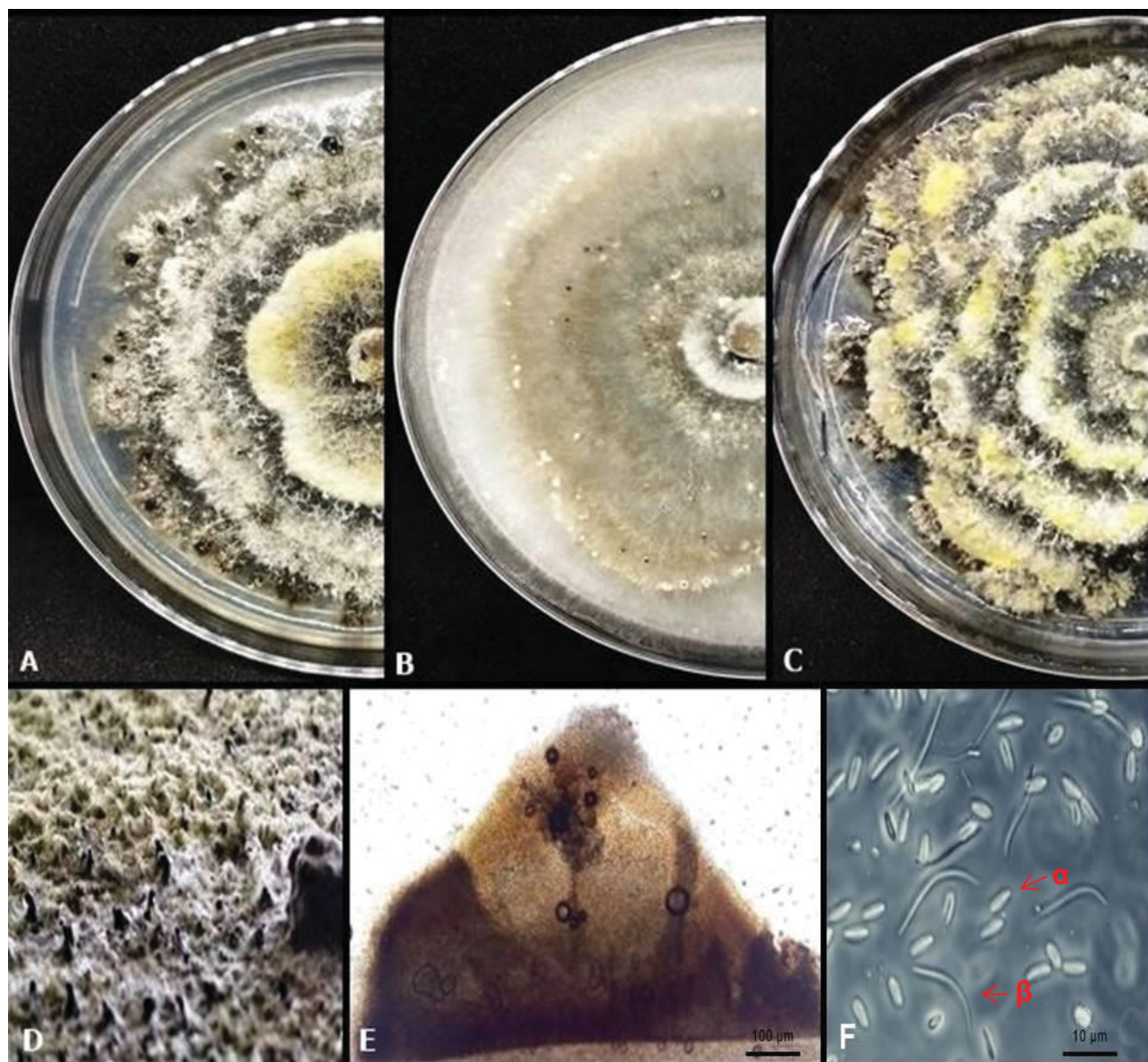


Figura 1. *Diaporthe* sp. 1 - A. Cultura em BDA; B. Cultura em OA; C. Cultura em MEA; D. Conidiomata esporulando em BDA; E. Corte transversal do conidiomata; F. Alfa e beta conídios — Escala: E = 100 μm , F = 10 μm .

Fonte: O Autor (2020).

Diaporthe sp. 2

Hospedeiro/Distribuição: Sementes de *Aspidosperma polyneuron* no Brasil.

Descrição original: Teleomorfia: Indeterminado. Anamorfia: Conidiomata picnidial, elipsóide a cônico, semi-imerso, ostiolado, marrom escuro a preto, espalhado ou agregado. Massa conidial globosa, creme a âmbar (Figura 2 – D e E).

Conidióforos cilíndricos, filiformes e hialinos. Célula conidiogênica cilíndrica, filiforme e hialina. Alfa conídio hialino, fusiforme, afilando nas duas extremidades, $(7-8 - 10(-11) \times (2-3) \mu\text{m}$. Beta conídio hialino, liso e curvado, $(22 - 25 - 29(-32) \times 2 (-3) \mu\text{m}$ (Figura 2 – F e G).

Culturas: Colônias cobriram as placas após 10 dias no escuro a 25 °C, em BDA e MEA. Em OA atingiram 67 mm de diâmetro após 10 dias nas mesmas condições. Em BDA apresentou verso branco a bege, reverso bege com manchas bege vináceo. Em OA verso branco e reverso bege. Em MEA verso bege, reverso bege com manchas bege vináceo (Figura 2 – A, B e C).

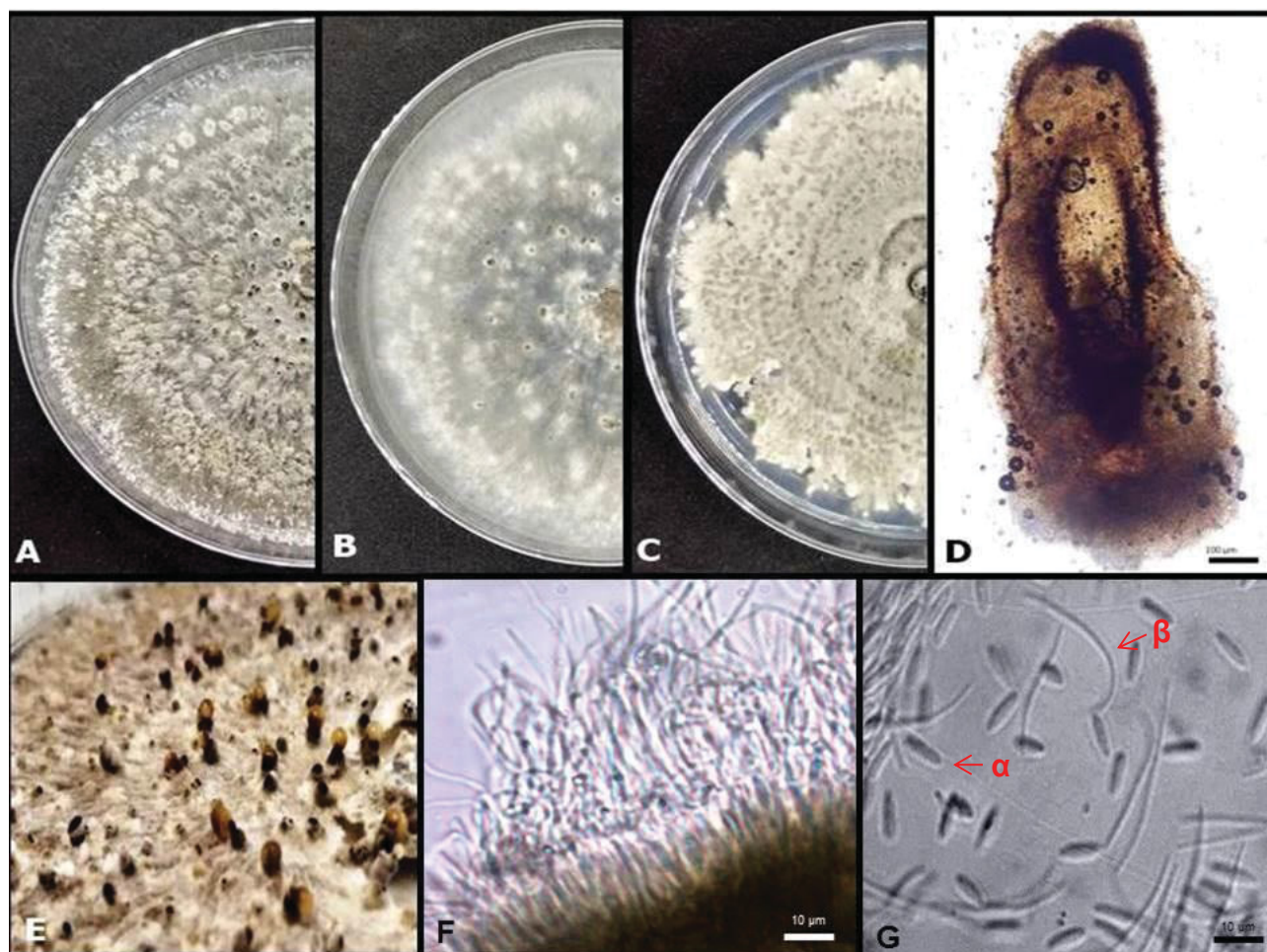
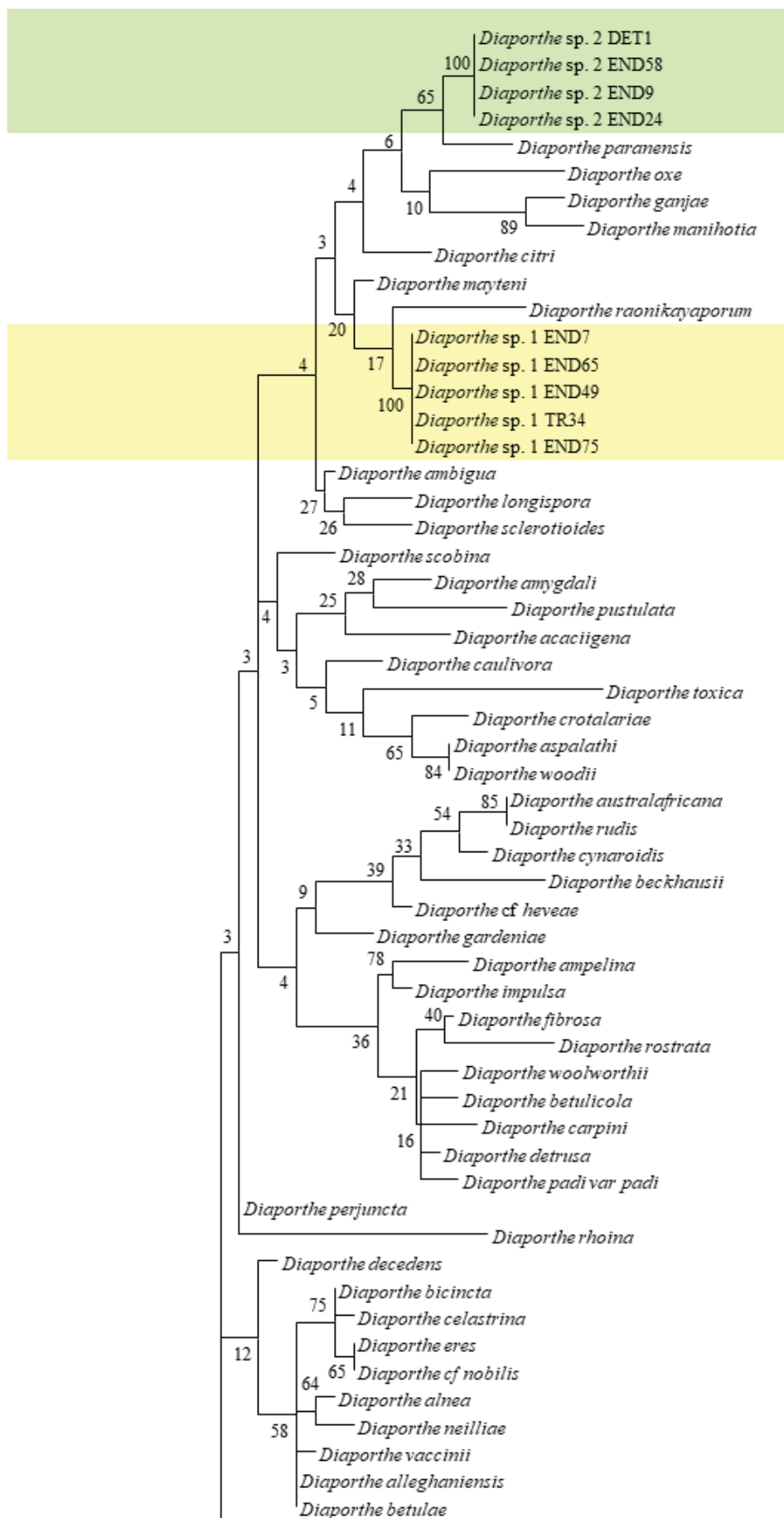


Figura 2. *Diaporthe* sp. 2 - A. Cultura em BDA; B. Cultura em OA; C. Cultura em MEA; D. Corte transversal do conidiomata; E. Conidiomata esporulando em BDA; F. Célula conidiogênica; G. Alfa e beta conídios. — Escala: D = 100 μm , F,G = 10 μm .

Fonte: O Autor (2020).

3.2 Análise filogenética

A análise multilocus com as cinco regiões combinadas resultou em um alinhamento de 3.008 caracteres. A árvore consenso, baseada em máxima verossimilhança e inferência bayesiana está apresentada na figura 3. A análise bayesiana consistiu em dez milhões de gerações, e após o cálculo de probabilidades posterior, foram geradas 15.002 árvores das quais 25% foram eliminadas (burn-in). Tanto verossimilhança quanto bayesiana resultou em árvores com mesma topologia, separando nossos isolados em clados distintos das demais espécies do gênero. Isso indica que nossos isolados de *Diaporthe* correspondem a duas novas espécies, o que também é suportado pelas características morfológicas de taxa de crescimento e coloração da cultura, formas e dimensões do conidioma, conídios e células conidiogênicas.



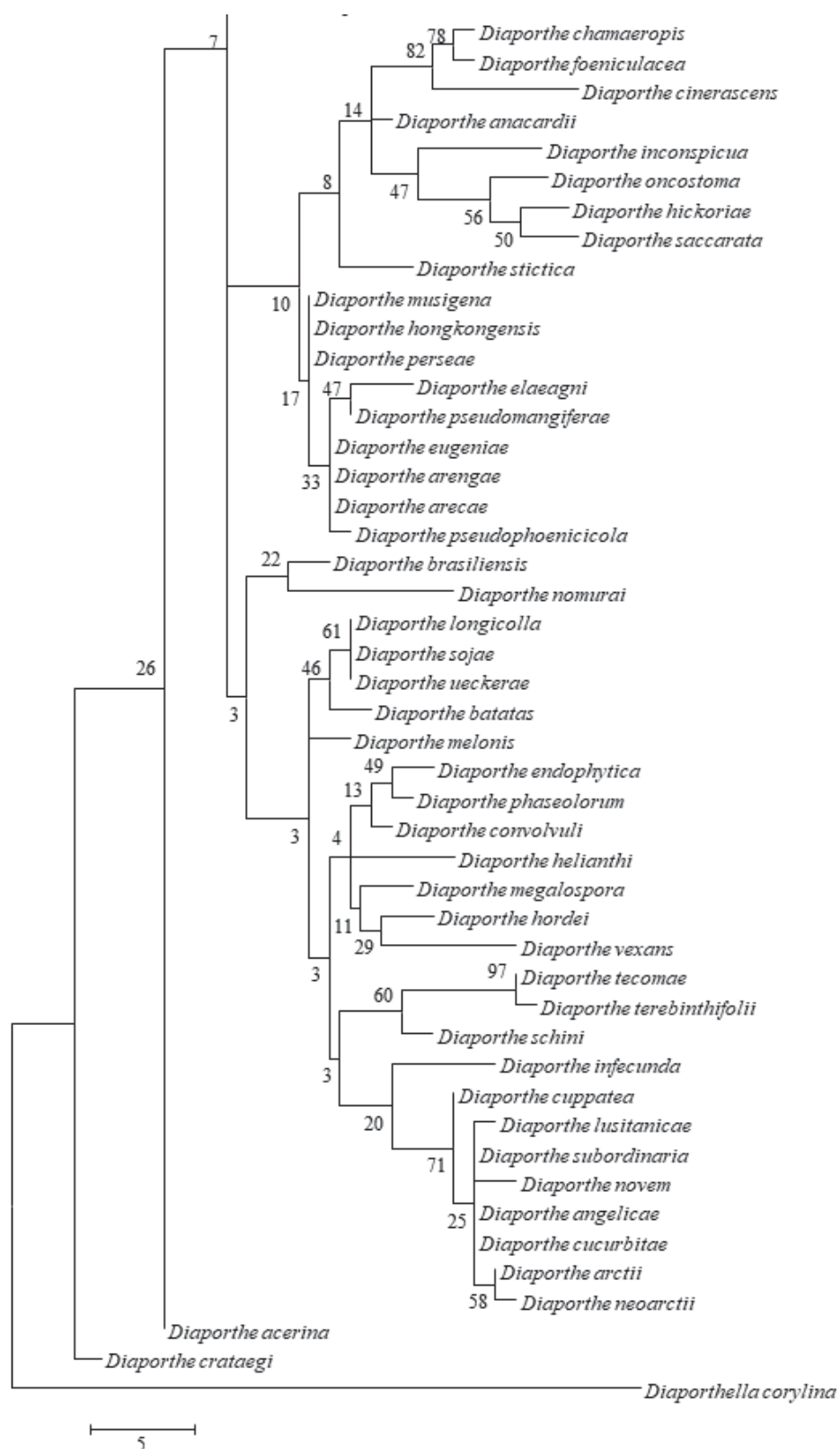


Figura 3. Árvore de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana de *Diaporthe* spp. baseada em sequências das regiões ITS, CAL, HIS, TEF e TUB. O comprimento dos ramos está indicado pela escala na base da árvore, e os valores de bootstrap (1.000 repetições) estão indicados em porcentagem abaixo dos internos. A árvore teve como raiz *Diaporthella corylina*

Fonte: O Autor (2020).

4 DISCUSSÃO

Este estudo propõe que os 33 isolados de *Diaporthe* sejam agrupados em duas novas espécies. As características de *Diaporthe* sp. 1 incluem o crescimento rápido, tomando as placas em meios distintos em 10 dias e a coloração da cultura branca com manchas amarelo enxofre. Os conidiomata variaram de globoso a cônico, alfa conídios de oblongo a elipsoide e beta conídios de reto a curvo. Já *Diaporthe* sp. 2 apresentou crescimento rápido apenas em BDA e MEA com coloração da cultura de branco a bege. Conidiomata com formato elipsoide a cônico, alfa conídios fusiforme e beta conídios curvado. Quanto à filogenia, a análise multilocus agrupou *Diaporthe* sp. 1 no clado de *D. raonikayaporum* com bootstrap de 17%, enquanto *Diaporthe* sp. 2 agrupou ao clado com *D. paranensis* com bootstrap de 65%. A mesma topologia foi observada para os genes individualmente em máxima verossimilhança e inferência bayesiana.

Uma revisão do gênero *Diaporthe* realizada por Wehmeyer em 1933, atribuiu menor importância ao hospedeiro de origem e, com isso reduziu o número de espécies de 650 para 70 espécies reconhecidas, porém, as características do anamorfo não foram consideradas. Apenas 20% das espécies de *Phomopsis* têm uma descrição do teleomorfo (PHILLIPS, 2006).

O gênero *Phomopsis* é caracterizado pela formação de picnídios escuros, com ostíolo geralmente em forma de pera, conidióforos simples, alfa conídios caracterizados como predominantemente elipsoides, sem septos, unicelulares de forma ovoide, hialinos e com gotas nas extremidades. Além disso, formam-se beta conídios caracterizados como hialinos, sem gotas e septos, filiformes e mais curvos em uma extremidade (HANLIN & MENEZES, 1996).

Com o fim da dupla nomenclatura para fungos, os nomes genéricos *Diaporthe* e *Phomopsis* não são mais usados para distinguir diferentes formas desse gênero. Rossman *et al.* (2015) propuseram que o gênero *Diaporthe* deveria ter prioridade, pois foi introduzido primeiro e representa a maioria das espécies.

As características morfológicas descritas neste trabalho isoladamente não foram suficientes para reconhecer as duas novas espécies de *Diaporthe*. Assim, foram consideradas as características morfológicas associadas com filogenias moleculares, principalmente as sequências da região ITS do rDNA e a sequência parcial do gene que codifica fator de alongação 1-alfa (TEF) (GOMES *et al.*, 2013).

A análise multilocus mostrou-se eficaz para estudos filogenéticos e identificação em nível de espécie para outros gêneros com dificuldades de elucidação taxonômica,

como *Colletotrichum* e *Fusarium* (PRIHASTUTI *et al.*, 2009; MILLER & HUHNDORF, 2005; O'DONNELL, 2004). Assim, embora ainda não estejam disponíveis sequências do genoma completo de *Diaporthe*, a identificação de espécies e a reconstrução filogenética no gênero já são amplamente dependentes de sequências moleculares (SANTOS, CORREIA & PHILLIPS, 2010).

Em estudos recentes, o número máximo de loci usado para criar uma filogenia multilocus foi de sete (TEF, TUB, HIS, CAL, ACT, APN2 e FG1093), sequenciados simultaneamente em aproximadamente 80 isolados de 9 espécies de *Diaporthe* (UDAYANGA *et al.*, 2014). No entanto, as cinco regiões utilizadas neste trabalho (ITS, CAL, HIS, TEF, TUB) são suficientes para resolver clados e inferir novas espécies (GOMES *et al.*, 2013; DISSANAYAKE *et al.*, 2015; DU *et al.*, 2016; DISSANAYAKE *et al.*, 2017; GUARNACCIA *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2018).

Com base na morfologia e filogenia molecular robusta, o presente estudo confirma o estabelecimento de duas novas espécies associadas à *Aspidosperma polyneuron*. Este é o primeiro relato dessas novas espécies.

REFERÊNCIAS

- BONFIELD, J; BEAL, K; JORDAN, M; CHEN, Y; STADEN, R. **The Staden Package Manual**, Cambridge, UK, 2006.
- CARBONE, I.; KOHN, L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**. 91: 553–556, 1999.
- CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; RISEDE, J-M; HYWEL-JONES, N.L. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. **Studies in Mycology**. 50: 415–430, 2004.
- CROUS P.W.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z. Fungal Biodiversity. [CBS Laboratory Manual Series 1]. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands, 2009.
- DISSANAYAKE, A.J.; LIU, M.; ZHANG, W.; CHEN, Z.; UDAYANGA, D.; CHUKEATIROTE, E.; LI, X.; YAN, J.; HYDE, K.D. Morphological and molecular characterisation of *Diaporthe* species associated with grapevine trunk disease in China. **Fungal Biology**. 119: 283-294, 2014.
- DISSANAYAKE, A.J.; CAMPORESI, E.; HYDE, K.D.; WEI, Z.; YAN, J.Y.; LI, X.H. Molecular phylogenetic analysis reveals seven new *Diaporthe* species from Italy. **Mycosphere**. 8: 853–877, 2017.
- DU, Z.; FAN, X. L.; HYDE, K. D.; YANG, Q.; LIANG, Y. M.; TIAN, C. M. Phylogeny and morphology reveal two new species of *Diaporthe* from *Betula* spp. in China. **Phytotaxa**. 269: 90–102, 2016.

FAN, X.L.; HYDE, K.D.; UDAYANGA, D.; WU, X.Y.; TIAN, C.M. *Diaporthe rostrata*, a novel ascomycete from *Juglans mandshurica* associated with walnut dieback. **Mycological Progress**. 14: 1–8, 2015.

GARZONIO, D.M.; MCGEE, D.C. Comparison of seeds and crop residues as sources of inoculum for pod and stem blight of soybeans. **Plant disease**. 67: 1374-1376, 1983.

GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; de Hoog, G. S. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. **Studies in Mycology**. 43: 151-162, 1999.

GLASS, N.L.; DONALDSON, G. Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**. 61: 1323–1330, 1995.

GOMES, R.R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, C.I.R.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**. 31: 1–41, 2013.

GUARNACCIA, V.; GROENEWALD, J.Z.; WOODHALL, J. et al. *Diaporthe* diversity and pathogenicity revealed from a broad survey of grapevine diseases in Europe **Persoonia**. 40: 135-153, 2018.

HANLIN, R. T.; MENEZES, M. **Gêneros ilustrados de ascomicetos**. UFRPE.Recife-PE. 1996. 274p.

HERNÁNDEZ, F. E.; PIOLLI, R. N.; PERUZZO, A. M.; FORMENTO, A. N.; PRATTA, G. R. Caracterización morfológica y molecular de una colección de aislamientos de *Phomopsis longicolla* de la región templada y subtropical de Argentina. **International Journal of Tropical Biology and Conservation**. 63: 871-884, 2015.

KATO, K.; STANDLEY, D.M. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**. 30: 772–780, 2013.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**. 33: 1870–1874, 2016.

LAWRENCE, D.P.; TRAVADON, R.; BAUMGARTNER, K. Diversity of *Diaporthe* species associated with wood cankers of fruit and nut crops in northern California. **Mycologia**. 107: 926–940, 2015.

MAZAROTTO, E. J.; PIMENTEL, I. C.; ABREU, D. C. A.; dos SANTOS, A. F. Association of *Fusarium* and *Phomopsis* with peroba rosa seeds. **Floresta e Ambiente**. 26, 1-7, 2019.

MILLER, A.N.; HUHNENDORF, S.M. Multi-gene phylogenies indicate ascomal wall morphology is a better predictor of phylogenetic relationships than ascospore morphology in the *Sordariales* (Ascomycota, Fungi). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 35: 60–75, 2005.

NYLANDER, J.A.A. **MrModeltest v.2**. Program distributed by the author. Uppsala, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004.

O'DONNELL, K.; NIRENBERG, H.I.; AOKI, T.; CIGELNIK, E. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**. 41: 61–78, 2000.

O'DONNELL, K.; WARD, T.J.; GEISER, D.M.; CORBY KISTLER, H.; AOKI, T. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. **Fungal Genetics and Biology**. 41: 600–623, 2004.

PHILLIPS, A.J.L. The plant pathogenic genus *Phomopsis* and its teleomorph (*Diaporthe*): Development and application of morphological, biological and phylogenetic species concepts. Disponível em: <http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/personal_web_page.htm> Acesso em Janeiro de 2016.

PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E.H.C.; HYDE, K.D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fungal Diversity**. 39: 89–109, 2009.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. **FigTree v.1.3.1**. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, UK, 2010.

RAYNER, R.W. A mycological colour chart. **Commonwealth Mycological Institute**, Kew, UK, 1970.

REHNER, S. A.; UECKER, F. A. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. **Canadian Journal of Botanic**. 72: 1666-1674, 1994.

RIZZINI, C. T. Árvores e madeiras úteis do Brasil. **Manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda. 1990. 304p.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P. et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**. 61: 539–542, 2012.

ROSSMAN, A.Y.; ADAMS, G.C.; CANNON, P.F. et al. Recommendations of generic names in Diaporthales competing for protection or use. **IMA Fungus**. 6: 145–154, 2015.

UDAYANGA, D.; CASTLEBURY, L.A.; ROSSMAN, A.Y.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K.D. The *Diaporthe sojae* species complex: phylogenetic reassessment of pathogens associated with soybean, cucurbits and other field crops. **Fungal Biology**. 119: 383–407, 2015.

UECKER, F. A. A world list os *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. **Mycologia Memoir**, 13: 1-213, 1988.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D. H.;

SHINSKY, J. J.; WHITE, T.J. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, San Diego, 1990, p. 315–322.

YANG, Q.; DU, Z.; TIAN, C.M. Phylogeny and morphology reveal two new species of *Diaporthe* from Traditional Chinese Medicine in Northeast China. **Phytotaxa**. 336: 159–170, 2018.

CAPÍTULO 3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTITUMORAL DE ISOLADOS ENDOFÍTICOS DE *Diaporthe* spp.

RESUMO

Os fungos endofíticos do gênero *Diaporthe* têm recebido atenção devido à grande variedade de metabólitos secundários que produzem, o que os caracteriza como agentes promissores na produção de substâncias para aplicação nas indústrias farmacêutica, alimentícia e agricultura. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana e antitumoral de isolados endofíticos de *Diaporthe* spp. Para isso, foi verificada a expressão do Domínio Policetídeo Sintase (PKS), sugerida as classes dos compostos produzidos por cromatografia de camada delgada (CCD), e avaliada a atividade biológica dos extratos fúngicos frente a linhagens de fungos fitopatogênicos, levedura, bactérias gram negativas e gram positivas humano patogênicas, e linhagens celulares H295R (Carcinoma Adrenocortical) e HEK293T (Embrionária de rim). Foi verificada a presença de NR-PKS em todos os isolados, bem como a produção de alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos, observados por CCD. Houve inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium pseudocircinatum*, *Colletotrichum* spp. e *Phytophthora palmivora* nos testes de cultura pareada, metabólitos voláteis e metabólitos não voláteis. Foi verificada atividade dos extratos inibindo *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e a levedura *Candida albicans*. As frações dos extratos avaliados como antitumorais reduziram a viabilidade celular da linhagem H295R em 35.7%, mas não apresentaram seletividade.

Palavras - chave: Endófitos, metabólitos secundários, controle biológico, bioprospecção

1 INTRODUÇÃO

Todas as plantas possuem microrganismos endofíticos associados aos seus tecidos, com especificidade na interação endófito-hospedeiro. No entanto, as plantas podem apresentar mais de uma espécie de endófito associada (AZEVEDO, 1998). Os endófitos podem infectar as espécies de plantas hospedeiras horizontalmente através de aberturas e injúrias naturais, como estômatos ou região de crescimento de raízes, e artificialmente, como injúrias causadas por práticas agrícolas. A infecção vertical pode ocorrer através das sementes do hospedeiro, onde o endófito pode se estabelecer em uma planta durante toda a sua vida (MELO, 1998; ALY *et al.*, 2011).

Vários autores já demonstraram que os fungos endofíticos são potenciais produtores de substâncias novas e biologicamente ativas (RAJ *et al.*, 2015), tais como compostos alifáticos, alcaloides, flavonoides, peptídeos e esteroides (YU *et al.*, 2010). Esses microrganismos representam uma reserva ainda inexplorada de estruturas químicas únicas geradas por relações coevolutivas entre endófitos e hospedeiros. Dessa

forma, existe uma grande possibilidade de encontrar novos metabólitos secundários com atividades biológicas relevantes nos fungos endofíticos (GUNATILAKA, 2006).

Os metabólitos secundários podem ser agrupados em classes distintas, como alcaloides, esteroides, terpenoides, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides, lignanas, ácidos fenólicos, compostos alifáticos, policetídeos e peptídeos (ZHANG, SONG e TAN, 2006; MOUSA & RAIZADA, 2013). No entanto, os policetídeos e terpenoides são os metabólitos encontrados com maior frequência em fungos (MOUSA & RAIZADA, 2013). A classe dos policetídeos atua como precursora de uma vasta gama de metabólitos secundários, constituindo uma das mais diversas fontes estruturais de substâncias bioativas, tornando-a uma fonte promissora de pesquisas (SCHUMANN & HERTWECK, 2006).

O gênero *Diaporthe* (sin. *Phomopsis*) tem se destacado por ser uma fonte rica na produção de metabólitos secundários com potencial biotecnológico (ISAKA *et al.*, 2001; DAI *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2005; KUMARAN & HUR, 2009; CHAPLA *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2016). Este gênero tem grande potencial biotecnológico devido à produção de vários metabólitos secundários, dos quais podemos incluir as micotoxinas que atuam no sistema nervoso dos vertebrados (BILLS *et al.*, 2002) e alcaloides com habilidades farmacológicas, como as fomopsinas (DAI *et al.*, 2005).

Há relatos do gênero *Diaporthe* associado como endófito em uma grande variedade de plantas, e apresentando potencial no controle de fungos e bactérias (BOTELLA & DIEZ, 2011; MURALI *et al.*, 2006). Corrado e Rodrigues (2004) isolaram *Phomopsis* sp. de folhas de *Aspidosperma tomentosum* e pecíolos da planta medicinal *Spondias mombin*, e o extrato fúngico inibiu o crescimento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Bernardi-Wenzel *et al.* (2010) isolaram *Diaporthe helianthi* da planta *Luehea divaricata* e os metabólitos obtidos do isolado foram capazes de inibir *in vitro* o crescimento do fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa*. Guo *et al.* (2008) encontraram atividade antibacteriana de *Phomopsis* contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Os isolados de *Phomopsis* endófitos de *Tectona grandis* e *Samanea saman* inibiram *B. subtilis*, *S. aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (CHAREPRASERT *et al.*, 2006).

Em sementes de peroba rosa (*Aspidosperma polyneuron*) Mazarotto *et al.* (2019) relataram a associação endofítica de *Diaporthe* spp. O presente estudo teve o objetivo de avaliar a produção de metabólitos secundários por estes isolados endofíticos de *Diaporthe* obtidos de sementes de peroba rosa, e avaliar o seu potencial antimicrobiano e antitumoral.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados endofíticos de *Diaporthe* spp.

Nove isolados endofíticos de *Diaporthe* spp. (END-7, END-9, END-49, END-52, END-54, END-65, END-68, END-69, END-75) oriundos de sementes de peroba rosa (*Aspidosperma polyneuron*) (MAZAROTTO *et al.*, 2019) foram usados neste estudo (Tabela 1). Os isolados estão preservados pelo método castellani e foram depositados na coleção de fungos e oomicetos florestais, da Embrapa Florestas, Colombo, Paraná, Brasil.

Tabela 1. Lista de isolados endofíticos de *Diaporthe* spp. e município do estado do Paraná de coleta das sementes de peroba rosa (*Aspidosperma polyneuron*).

| Isolado | Município | Espécies |
|---------|------------------------|------------------------|
| END-7 | Telêmaco Borba | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| END-9 | Cruzeiro do Iguaçu | <i>Diaporthe</i> sp. 2 |
| END-49 | Cianorte | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| END-52 | Terra Boa | <i>Diaporthe</i> sp. 2 |
| END-54 | São Jorge do Oeste | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| END-65 | Corbélia | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| END-68 | Realeza | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| END-69 | Boa Vista da Aparecida | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |
| END-75 | Nova Prata do Iguaçu | <i>Diaporthe</i> sp. 1 |

Fonte: O Autor (2020).

2.2 Extração de DNA

Os isolados de *Diaporthe* foram cultivados em meio batata dextrose ágar (BDA) por 96 h a 24 °C em câmara BOD, para produzir material para extração de DNA e, em seguida, aproximadamente 1 cm² de massa micelial foi transferida para microtubos de 1,5 mL. O DNA foi extraído usando o método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), conforme descrito por Gerrits Van Den Ende & de Hoog (1999).

2.2.1 Amplificação do domínio policetídeo sintase - PKS

Dois pares de primers específicos foram utilizados para amplificar o domínio PKS, o primeiro para a porção não reduzida (NR-PKS) LC1 e LC2c e o segundo para a porção

parcialmente reduzida (PR-PKS) LC3 e LC5c (BINGLE *et al.*, 1999). As reações (21 µL) continham 1 µL DNA genômico, 2 µL 1×PCR buffer, 1 µL MgCl₂, 2,5 µL dNTP, 1 µL de cada primer, 0,1 µL de Taq Platinum (Invitrogen) e 12,4 µL de água ultra purificada. As condições de PCR foram: 3 min a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 56 °C, 1 min a 72 °C e extensão final de 3 min a 72 °C (MILLER *et al.*, 2012).

2.3 Microrganismos testados

Foram utilizadas linhagens comerciais (Newprov.®) de microrganismos humano patogênicos para os testes de suscetibilidade, sendo as bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (NEWP 0023), *Streptococcus pyogenes* (NEWP 0015) e *Enterococcus faecalis* (NEWP 0012), bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (NEWP 0022), *Klebsiella pneumoniae* (NEWP 0083) e *Pseudomonas aeruginosa* (NEWP 0053) e a levedura *Candida albicans* (NEWP 0031).

Para os testes com fungos fitopatogênicos, foram selecionadas linhagens da coleção de fungos e oomicetos florestais, da Embrapa Florestas, *Fusarium oxysporum* (DET-25), *Fusarium pseudocircinatum* (DET-46), *Colletotrichum* sp. (Col-1, Col-2) e o oomiceto *Phytophthora palmivora* (SA-16).

2.4 Testes com fitopatógenos

2.4.1 Culturas confrontadas

Para avaliar o antagonismo dos isolados, foi utilizada a técnica de pareamento de culturas (MARIANO, 1993). Discos contendo micélio de isolados endofíticos e patógenos (*F. oxysporum*, *F. pseudocircinatum*, *Colletotrichum* spp. e *P. palmivora*) foram obtidos de colônias cultivadas em BDA por 7 dias a 24 °C. Os discos de 5 mm foram removidos da borda das colônias e posicionados em extremidades opostas, a 2 cm da borda da placa de Petri contendo BDA. O material foi incubado em B.O.D por um período de 7 dias a 24 °C. O experimento foi realizado em triplicatas e a avaliação foi realizada após 7 dias de incubação, comparando o diâmetro de crescimento do patógeno com o controle.

2.4.2 Metabólitos voláteis

A avaliação do efeito da produção de metabólitos voláteis foi verificada pelo método de Mariano (1993). Os fungos fitopatogênicos (*F. oxysporum*, *F. pseudocircinatum*, *Colletotrichum* spp. e *P. palmivora*) foram cultivados em placas de Petri com BDA e incubados em câmara BOD a 24 °C por 7 dias, no escuro. Os isolados de *Diaporthe* foram cultivados nas mesmas condições. Discos de micélio de 5 mm de diâmetro do patógeno e endófito foram inoculados separadamente no centro das placas de Petri contendo BDA. Após 24 h, as placas contendo o fitopatógeno foram sobrepostas às as placas com o endófito, e ambas foram unidas por Parafilm® para evitar a saída de metabólitos voláteis. O controle recebeu discos miceliais apenas dos patógenos, na parte superior e inferior da placa de Petri. As placas foram incubadas em B.O.D a 24 °C por 7 dias. A avaliação foi realizada pela medida dos diâmetros das colônias do patógeno, comparando-os com o controle.

2.4.3 Metabólitos não voláteis

Discos esterilizados de celofane com 9 cm de diâmetro, foram colocados na superfície de placas de Petri contendo BDA. Sobre o celofane, foi inoculado um disco de 5 mm de ágar contendo micélio do endófito em crescimento ativo. As placas foram incubadas em câmara BOD por 4 dias a 24 °C, no escuro. Após esse período, o celofane com o endófito foi removido e um disco de micélio do fitopatógeno (*F. oxysporum*, *F. pseudocircinatum*, *Colletotrichum* spp. e *P. palmivora*) foi inoculado no centro da mesma placa. As placas foram novamente incubadas por 14 dias a 24 °C. As placas controle receberam apenas discos contendo micélio do fitopatógeno e foram incubadas a 24 °C. As avaliações ocorreram após 7 e 14 dias, e o diâmetro de crescimento das colônias foi avaliado e comparado ao controle (DENNIS & WEBSTER, 1971).

2.5 Caldo de fermentação

Para obter o caldo fermentado dos isolados endofíticos, três discos de 5 mm com micélio fúngico, foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de caldo batata-dextrose (BD – Infusão de 200 g de batata, 20 g de dextrose e 1.000 mL de água destilada) (SOUZA *et al.*, 2004). Os frascos foram incubados sob agitação de 140 rpm, a 28 °C por 14 dias, com fotoperíodo de 12 h. Após o cultivo, o caldo fermentado foi

filtrado a vácuo em funil de Büchner para a separação do micélio e depois filtrado novamente em membrana Millipore de 0,22 µm.

2.6 Cromatografia de camada delgada (CCD)

Para identificar as possíveis classes de compostos químicos presentes na massa fúngica e no caldo fermentado, estes foram analisados por cromatografia de camada delgada (CCD). Uma alíquota de 100 mL do caldo de cada isolado foi mantida em estufa a 40 °C para secagem. O material concentrado foi ressuspensão em 2 mL de metanol e 5 µL de cada amostra foi aplicado em cromatoplaças de sílica gel 60-UV254 (Whatman®), com o auxílio de tubo capilar (SANTIAGO & STROBEL, 2013). As cromatoplaças com as amostras impregnadas foram colocadas em cuba de vidro com a fase móvel específica para cada classe química. A avaliação se deu utilizando o revelador para cada classe e verificando se o resultado obtido era compatível com o esperado (Quadro 1).

Quadro 1. Screening por marcha química em cromatografia de camada delgada (CCD).

| CLASSES | FASE MÓVEL | REVELADOR | RESULTADO ESPERADO |
|---------------------------------|---|---|---|
| ALCALOIDES | Clorofórmio - 95 ml Metanol - 5 ml Universo amônia em tubo de ensaio | Dragendorff Carbonato de bismuto - 5 g Iodeto de potássio - 25 g Ácido clorídrico - 12 ml Água destilada - 100ml | Coloração alaranjada forte na presença de alcaloides (VALENTE <i>et al.</i> , 2006). |
| CUMARINAS | Diclorometano - 10 ml Acetona - 10 ml | Hidróxido de Potássio 1% Hidróxido de potássio - 1 g Etanol - 100 ml | Coloração azul ou verde quando expostas a luz UV (MIGUEL, 2003). |
| ESTEROIDES E TRITERPENOS | Tolueno - 93 ml Acetato de etila - 7 ml | Vanilina Sulfúrica Vanilina 1% - 10 ml Ácido sulfúrico 5 -10% - 10 ml | Desenvolvimento de coloração azul ou violácea após carbonização em chapa quente (WAGNER <i>et al.</i> , 1996). |
| COMPOSTOS FENÓLICOS | Acetato de etila - 100 ml Ácido fórmico - 11 ml Ácido acético glacial - 11 ml Água destilada - 26 ml | NEU 2 – Aminoethyl diphenylborinate – 1 g Metanol – 100 ml | Desenvolvimento de coloração amarela em luz UV (WAGNER <i>et al.</i> , 1996). |
| TANINOS | Acetato de etila - 100 ml Ácido fórmico - 11 ml Ácido acético glacial - 11 ml Água destilada - 26 ml | Cloreto Férrico 2% Cloreto férrico - 2 g Metanol ou água- 100 ml | Coloração verde para taninos condensados. Coloração azul para taninos hidrolisáveis. Coloração marrom para presença de compostos fenólicos (WAGNER <i>et al.</i> , 1996). |

Fonte: O Autor (2020).

2.7 Extração dos metabólitos

A extração dos metabólitos se deu conforme metodologia adaptada de Buatong *et al.* (2011). Foram obtidas três frações de extratos por partição seriada com os solventes: acetato de etila puro (acOEt), solução contendo n-Butanol 75% e acetato de etila 25%, e etanol absoluto. A proporção utilizada para extração foi de uma parte de solvente para duas partes de caldo fermentado, agitados por 15 min em agitador magnético e deixado em repouso por 15 min em refrigerador a 4 °C. Após a formação de duas fases, a fase orgânica (inferior) foi transferida para outro recipiente com auxílio de funil de separação e a fase aquosa (superior) submetida a mais duas extrações. Para a fração etanólica, não houve separação em fases, no entanto, formou-se um precipitado de macromoléculas que foi filtrado. Depois disso, os extratos foram secos em evaporador rotativo (Fisatom) a 60 °C, para análises posteriores.

2.8 Teste de suscetibilidade antimicrobiana

Para avaliar o potencial antimicrobiano, foi utilizado o ensaio de disco difusão (SADRATI *et al.*, 2013). Discos de papel filtro estéreis (5 mm) foram impregnados com 20 µL de extrato (1.000 µg/mL) obtido na fração acetato de etila e secos em fluxo laminar. As culturas bacterianas (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*) e a levedura (*C. albicans*) foram cultivadas em caldo nutritivo (BHI – Infusão Cérebro Coração - HiMedia®) e caldo Sabouraud dextrose, respectivamente, e incubadas a 37 °C em estufa bacteriológica até turvação do meio, e posteriormente ajustados até obter turbidez de 0,5 na escala McFarland. Os inóculos foram semeados em placas de Petri (150 mm) contendo Mueller Hinton ágar (MH - HiMedia®), com auxílio de um swab. Os discos impregnados com extrato e os controles negativo e positivo foram dispostos sobre as placas semeadas. O controle negativo consistiu em um disco com 20 µg de acetato de etila e como controle positivo utilizamos discos de Gentamicina (10µg) e Anfotericina B (100 µg). As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C e o diâmetro dos halos de inibição formados pelos extratos foram medidos com paquímetro e comparados ao controle.

2.9 Avaliação da atividade antitumoral

2.9.1 Ensaio de viabilidade celular (MTT)

A determinação da atividade antitumoral foi baseada no ensaio de MTT (Brometo de [3-(4,5-dimetil-tiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio], descrito pela primeira vez por Mosmann (1983) que quantifica a atividade da desidrogenase mitocondrial. Os extratos na fração acOEt, com concentração inicial de 100 mg/mL, foram avaliados contra a linhagem tumoral H295R (Carcinoma Adrenocortical). O ensaio foi realizado em quadruplicatas em placas de 96 poços, com concentrações 1.000, 200 e 100 µg/mL. As placas foram mantidas em estufa de cultivo com CO₂ a 37 °C por 72 h e após esse período, foi adicionado 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL) em cada poço e incubado novamente por mais 3 h. Na sequência o conteúdo das placas foi aspirado e adicionado 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) aos poços, para quantificar a absorbância em espectrofotômetro de microplacas com comprimento de onda de 570 nm.

Este experimento foi repetido nas mesmas condições citadas com as frações butanólica e etanólica do isolado END-69. Foram avaliadas quatro concentrações dos extratos (1.000, 400, 200 e 100 µg/mL) quanto a viabilidade celular de H295R e a linhagem não tumoral HEK293T (Embrionária de rim).

2.9.2 Índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) foi calculado para indicar a seletividade do extrato entre células tumorais e não tumorais. Para isso, o índice foi obtido através da razão entre a CC₅₀ (Concentração Citotóxica 50%) das células não tumorais e CI₅₀ (Concentração Inibitória 50%) das células tumorais (SUFFNES & PEZZUTO, 1991). Valores de IS maiores ou iguais a 2,0 foram considerados significativos, indicando 100% mais seletividade contra células tumorais.

2.10 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando SISVAR versão 5.6 build 86 (FERREIRA, 2011). One-way ANOVA (análise de variância) no valor $p < 0.001$ seguido pelo teste de Tukey como Post Hoc com $p < 0.05$. Os valores foram expressos com a média mais erro padrão da média.

3 RESULTADOS

3.1 Domínio policetídeo sintase – PKS

Todos os isolados de *Diaporthe* apresentaram a expressão de NR-PKS, amplificando um fragmento de aproximadamente 750 pb (Figura 1). No entanto, não houve amplificação para a região referente a PR-PKS nos isolados.



Figura 1. Produtos de PCR obtidos do template de gDNA de isolados de *Diaporthe* usando os primers LC1/2c.

Fonte: O Autor (2020).

3.2 Culturas confrontadas

Os fitopatógenos tiveram seu crescimento micelial reduzido por todos os isolados (Tabela 2). O isolado END-52 obteve os melhores resultados de inibição (8 mm) para *F. oxysporum* e *F. pseudocircinatum*, demonstrando uma diferença estatística significativa ($p \leq 0.01$). O isolado de *Colletotrichum* sp. 1 apresentou menor crescimento na presença de END-49, não diferindo dos pareamentos com END-52 e END-54. *Colletotrichum* sp.2 foi inibido pelo isolado END-69, diferindo estatisticamente apenas dos isolados END-9 e END-75. Quanto ao oomiceto *P. palmivora*, houve inibição do crescimento por todos os isolados. No entanto, não houve diferença estatística significativa entre os endófitos confrontados.

Tabela 2. Crescimento micelial (mm) de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium pseudocircinatum*, *Colletotrichum* spp. e *Phytophthora palmivora* em cultivo confrontado com nove isolados endofíticos de *Diaporthe* spp.

| Isolados de <i>Diaporthe</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>Fusarium pseudocircinatum</i> | <i>Colletotrichum</i> sp. 1 | <i>Colletotrichum</i> sp. 2 | <i>Phytophthora palmivora</i> |
|------------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Testemunha | 52,4a | 54,4a | 46,6a | 44,2a | 67,6a |
| END-7 | 46cde | 43,9bc | 37,3def | 36,4cd | 42,2b |
| END-9 | 51,6ab | 48,7ab | 43,8ab | 42ab | 40,9b |
| END-49 | 45,3de | 41,6c | 32,8g | 36,6cd | 41,4b |
| END-52 | 44,3e | 40,4c | 34,6fg | 35,8cd | 42,8b |
| END-54 | 45,5de | 44,5bc | 35efg | 36,1cd | 39,4b |
| END-65 | 47,8bcde | 41,1c | 38cde | 37,8bcd | 39,6b |
| END-68 | 48,6bcd | 47,9b | 40,6bc | 37,8bcd | 39,6b |
| END-69 | 47,1cde | 45,2bc | 38,4cd | 33,8d | 39,4b |
| END-75 | 49,5abc | 45,6bc | 38,8cd | 38,5bc | 40,6b |
| CV% | 2,7 | 4,4 | 2,8 | 4,1 | 5,7 |

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Fonte: O Autor (2020).

3.3 Metabólitos voláteis

Quanto à inibição dos fitopatógenos pela produção de metabólitos voláteis não houve diferença significativa de crescimento entre a testemunha de *F. oxysporum* e os tratamentos com os endófitos (Tabela 3). No entanto, houve redução de crescimento dos demais patógenos de até 14,5% em *F. pseudocircinatum*, 21,9% em *Colletotrichum* sp.1, 23,6% em *Colletotrichum* sp.2 e 26,4% em *P. palmivora*, o que indica a produção de metabólitos voláteis pelos endófitos.

Tabela 3. Inibição (%) do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium pseudocircinatum*, *Colletotrichum* spp. e *Phytophthora palmivora* por efeito de metabólitos voláteis de nove isolados endofíticos de *Diaporthe* spp.

| Isolados de <i>Diaporthe</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> ^{ns} | <i>Fusarium pseudocircinatum</i> | <i>Colletotrichum</i> sp. 1 | <i>Colletotrichum</i> sp. 2 | <i>Phytophthora palmivora</i> |
|------------------------------|---|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| END-7 | -1,5a | 8,1abc | 8,8bc | 0,8abc | 6,9ab |
| END-9 | -0,1a | 7,5abc | 4,9bc | 14,9abc | 16bc |
| END-49 | -1,1a | 14,5c | 15,7bc | 20,5bc | -0,7a |
| END-52 | -2,7a | 4,2abc | -3,7ab | 9,6abc | 26,4c |
| END-54 | -1,6a | 4,7abc | 10,5bc | 15abc | 9,5ab |
| END-65 | -1,8a | -0,9a | 11,9bc | 14,9abc | 10,5ab |
| END-68 | 7,7a | 2,3ab | -16,3a | -3,3ab | 7,1ab |
| END-69 | 2,8a | 12,7bc | 21,9c | 23,6c | 17,8bc |
| END-75 | 4,5a | 3,4abc | -0,9ab | -6,1a | 10,8ab |

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Valores negativos representam indução de crescimento. ^{ns}Médias não significativas.

Fonte: O Autor (2020).

3.4 Metabólitos não voláteis

Com relação à produção de metabólitos não voláteis, os resultados não foram significativos para *F. pseudocircinatum*. Todos os isolados inibiram *F. oxysporum* e *P. palmivora*, reduzindo até 12% e 15,8%, respectivamente. No entanto, para os dois isolados de *Colletotrichum* sp., ao invés de inibição, notou-se um aumento no crescimento dos patógenos (Tabela 4).

Tabela 4. Inibição (%) do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium pseudocircinatum*, *Colletotrichum* spp. e *Phytophthora palmivora* por efeito de metabólitos não voláteis de nove isolados endofíticos de *Diaporthe* spp.

| Isolados de <i>Diaporthe</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>Fusarium pseudocircinatum</i> ^{ns} | <i>Colletotrichum</i> sp. 1 | <i>Colletotrichum</i> sp. 2 | <i>Phytophthora palmivora</i> |
|------------------------------|---------------------------|--|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| END-7 | 9,3bc | -5,4a | -22,5a | -17,7ab | 9,9bcd |
| END-9 | 9,8bc | -4a | -12,9abc | -25a | 5,9abc |
| END-49 | 10,1bc | -0,6a | -13,7abc | -21,4ab | 15,3d |
| END-52 | 5,3ab | -0,4a | -16,9ab | -13,2ab | 12,9cd |
| END-54 | 12bc | -3,8a | -15,4ab | -23,3a | 15,3d |
| END-65 | 7,6ab | -8,4a | -19,8ab | -19,9ab | 15,8d |
| END-68 | 10,6bc | -8,5a | -10,5abc | -19,7ab | 12,7cd |
| END-69 | 9,5bc | -6,2a | -19,7ab | -13,5ab | 9bcd |
| END-75 | 16,5c | -9a | -6,6bc | -26,2a | 2,4ab |

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Valores negativos representam indução de crescimento. ^{ns}Médias não significativas.

Fonte: O Autor (2020).

3.5 Cromatografia de camada delgada (CCD)

A CCD revelou a presença de algumas classes de compostos no caldo fermentado e na massa fúngica dos isolados endofíticos de *Diaporthe* (Figura 2). Verificou-se a presença de alcaloides, triterpenos e compostos fenólicos no micélio seco de todos os isolados. No caldo fermentado, foram verificados alcaloides apenas no isolado END-69, enquanto os compostos fenólicos foram observados em END-69, END-7, END-49 e END-52. Os demais isolados não apresentaram os resultados esperados para as classes químicas testadas.

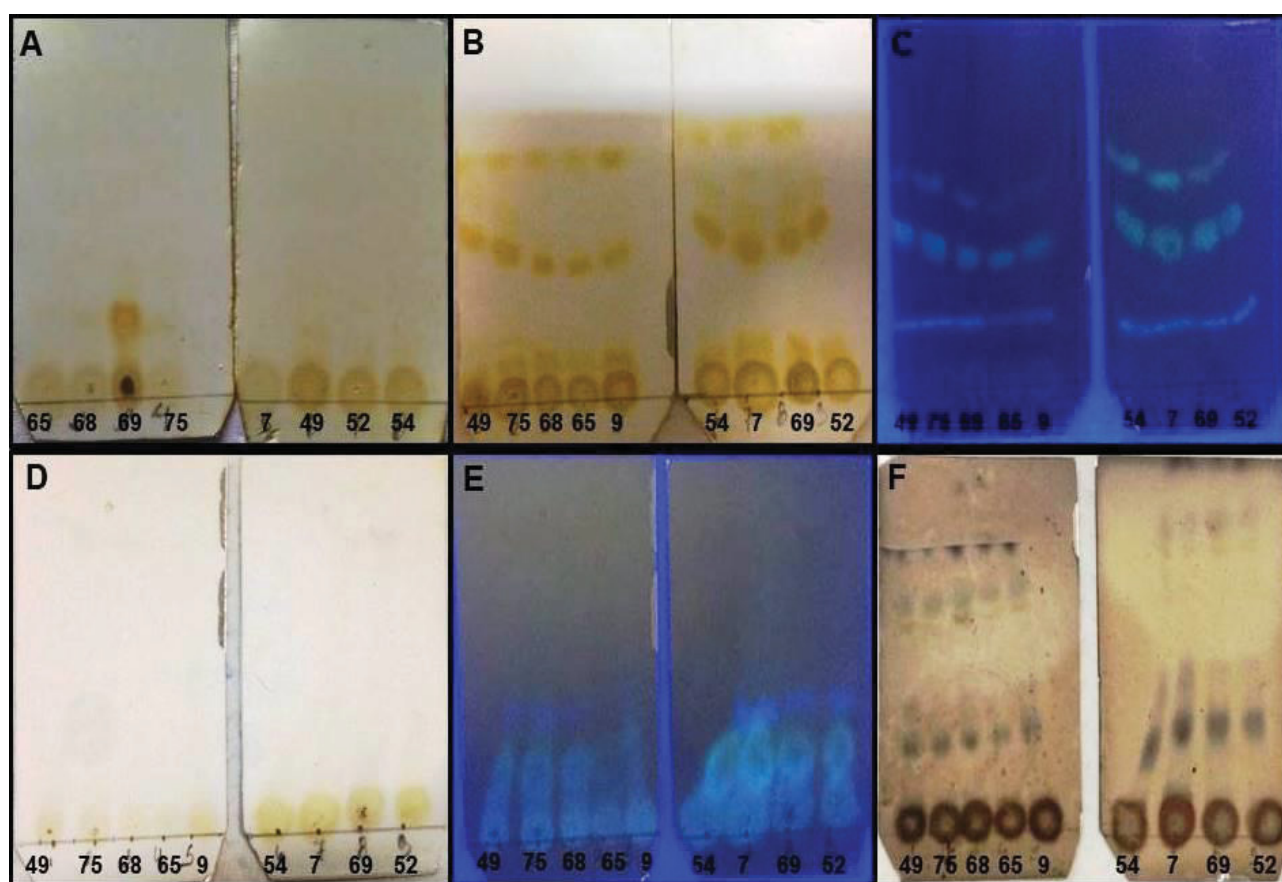


Figura 2. Placas cromatográficas sugerindo classes de compostos químicos presentes no meio fermentado e micélio seco de nove isolados de *Diaporthe* - A. Presença de alcaloides em meio fermentado; B e C. Presença de alcaloides no micélio seco; D e E. Presença de compostos fenólicos no micélio seco; F. Presença de terpenoides no micélio seco.

Fonte: O Autor (2020).

3.6 Teste de suscetibilidade antimicrobiana

Os extratos demonstraram atividade contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *C. albicans*. Não houve inibição contra *S. pyogenes* e *E. coli*. Os extratos produzidos por END-54, END-68 e END-69 apresentaram valores de inibição estatisticamente iguais ao controle positivo para *E. faecalis*, com halos de 40 mm, 38 mm e 39 mm, respectivamente (Tabela 5). O mesmo efeito foi encontrado para END-7 contra *K. pneumoniae* com 16 mm e END-9, END-49, END-52 e END-75 que obtiveram atividade superior entre 60 e 100% ao controle contra *C. albicans*.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana mensurada pelo tamanho dos halos (mm) por extratos de acetato de etila de isolados endofíticos de *Diaporthe* spp. em ensaio de disco difusão.

| ISOLADOS | <i>S. aureus</i> | <i>S. pyogenes</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>C. albicans</i> |
|----------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
| Gentamicina | 41a | 22,6 ^{ns} | 40,5a | 21,6 ^{ns} | 33,5a | 20a | - |
| Anfotericina B | - | - | - | - | - | - | 11b |
| END-7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14.5b | 16ab | 12b |
| END-9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13b | 23a |
| END-49 | 14b | 0 | 13b | 0 | 0 | 12b | 17a |
| END-52 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17.5a |
| END-54 | 0 | 0 | 40a | 0 | 0 | 0 | 11b |
| END-68 | 14b | 0 | 38a | 0 | 0 | 0 | 12b |
| END-69 | 0 | 0 | 39a | 0 | 0 | 0 | 13b |
| END-75 | 0 | 0 | 14b | 0 | 18b | 0 | 20a |

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 1%. ^{ns}Médias não significativas.

Fonte: O Autor (2020).

3.7 Atividade antitumoral

Entre os extratos em acOEt dos isolados endofíticos de *Diaporthe*, apenas END-69 na concentração 100 µg/mL apresentou resultado estatisticamente significativo, inibindo o crescimento da linhagem tumoral H295R em 20,6% (Figura 3). Como apresentou melhor resultado, este isolado foi submetido a um novo ensaio, com as frações butanólica e etanólica nas concentrações 1.000, 400, 200 e 100 µg/mL.

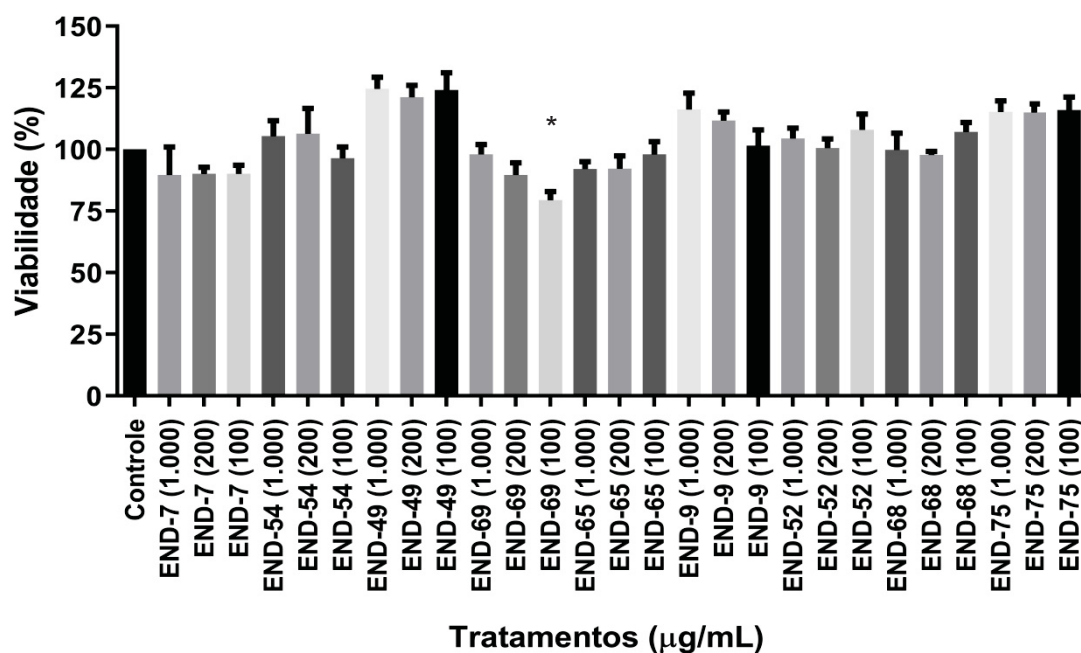


Figura 3. Viabilidade celular (%) da linhagem tumoral H295R após tratamento com as concentrações 1.000, 200 e 100 µg/mL de extrato acetato de etila de nove isolados endofíticos de *Diaporthe*.

Fonte: O Autor (2020).

As frações butanólica e etanólica do isolado END-69, apresentaram redução estatisticamente significativa da viabilidade celular da linhagem H295R em todas as concentrações. Foi observada redução de 35,7% nas células tratadas com a fração butanólica a 100 µg/mL e 33,4% com a fração etanólica 1.000 µg/mL (Figura 4).

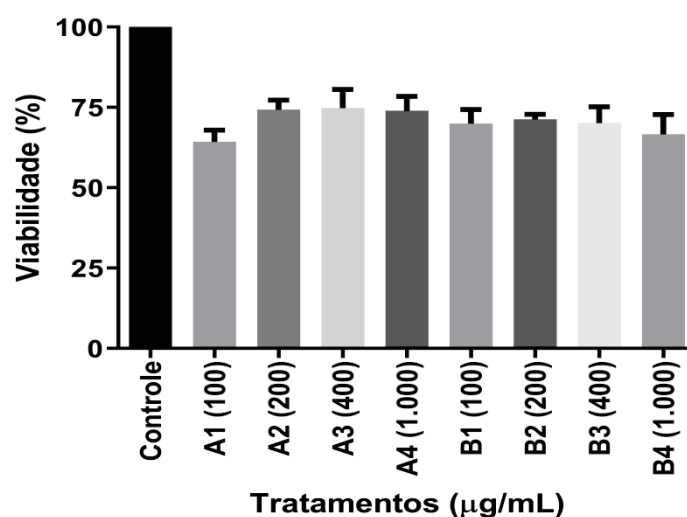


Figura 4. Viabilidade celular da linhagem H295R após tratamento com as concentrações 100, 200, 400 e 1.000 µg/mL das frações butanólica (A) e etanólica (B), obtidas do isolado endofítico END-69 de *Diaporthe*.

Fonte: O Autor (2020).

3.8 Índice de seletividade

A fração butanólica do extrato END-69 apresentou alta citotoxicidade contra as células da linhagem HEK293T nas concentrações acima de 200 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a fração etanólica apresentou baixa citotoxicidade até na concentração mais alta de 1.000 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 5). A CC_{50} foi determinada em 160 $\mu\text{g/mL}$ para a fração butanólica e maior do que 1.000 $\mu\text{g/mL}$ para a etanólica. Para a linhagem tumoral H295R, a CI_{50} foi determinada em mais de 1.000 $\mu\text{g/mL}$ em ambas as frações. Esses valores indicam que os compostos são citotóxicos, no entanto, não apresentam seletividade para a linhagem tumoral avaliada.

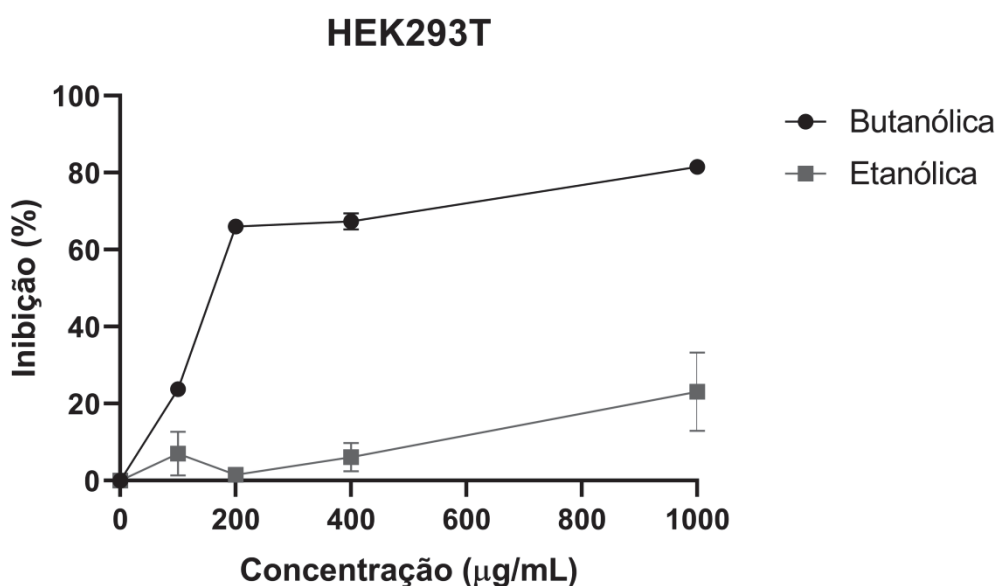


Figura 5. Inibição celular da linhagem HEK293T após tratamento com as concentrações 100, 200, 400 e 1,000 $\mu\text{g/mL}$ das frações butanólica e etanólica, obtidas do isolado endofítico END-69 de *Diaporthe*.

Fonte: O Autor (2020).

4 DISCUSSÃO

Este estudo contribuiu em demonstrar o potencial de nove isolados endofíticos de *Diaporthe* spp. para produção de compostos bioativos, pois expressaram o domínio PKS em seu DNA, bem como, produziram substâncias como alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos. Além disso, houve antagonismo destes isolados contra os fungos fitopatogênicos *F. oxysporum*, *F. pseudocircinatum*, *Colletotrichum* sp. e *P. palmivora*. Os extratos mostraram atividade contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *C. albicans*. Houve também ação antitumoral contra a linhagem H295R.

o gênero *Diaporthe* tem se destacado pelo potencial biotecnológico de várias descobertas importantes, incluindo novos metabólitos estruturalmente significativos e fisiologicamente ativos (UDAYANGA *et al.*, 2011). Sabe-se que este gênero representa uma fonte rica em metabólitos secundários com potencial biotecnológico e estruturas variadas, como xantonas, éteres diarílicos, citocalasinas, ácido convolvulânico e micotoxina fomopsina A. No entanto, devido à sua alta toxicidade, muitos desses compostos ainda estão sem utilidade como fármacos (HUSSAIN *et al.*, 2009).

A capacidade dos endófitos na produção *in vitro* de substâncias que inibem o crescimento de outras espécies de microrganismos estimulou as pesquisas em relação à bioprospecção de fungos endofíticos e ao controle biológico (ARNOLD, 2008). Além disso, por ser uma fonte rica em produtos químicos naturais e compostos estruturalmente distintos, são candidatos potenciais à produção de novos medicamentos. (XU *et al.*, 2010).

Entre as vias metabólicas utilizadas como marcador para produção de metabólitos secundários, está a do policetídeo sintase (PKS). A detecção dos genes que codificam essas enzimas, tem se mostrado eficaz na elucidação dos mecanismos de biossíntese de moléculas bioativas, já que sua relação com a produção de diversas classes de compostos é conhecida (MILLER *et al.*, 2012; EVANS *et al.*, 2011).

Como demonstrado neste trabalho, avaliamos a expressão do gene PKS para os grupos NR-PKS e PR-PKS com os isolados endofíticos de *Diaporthe* e através da PCR constatamos a presença de NR-PKS em todos os nossos isolados. A presença deste gene em nossos isolados demonstra que podem estar produzindo substâncias relevantes com potencial para o controle de microrganismos, entre outras finalidades.

De acordo com Yu *et al.*, (2010) entre as principais substâncias que os fungos endofíticos produzem estão alcaloides, compostos fenólicos e esteroides. Em nossos isolados endofíticos de *Diaporthe*, conseguimos verificar a produção de alcaloides, compostos fenólicos e terpenoides, por meio de análise em cromatografia de camada delgada. A produção dessas substâncias pode explicar a ação antimicrobiana e antitumoral observada neste estudo.

A expressão do gene PKS pode estar relacionada com as classes de compostos sugeridas por CCD, pois os policetídeos representam um grande grupo de metabólitos secundários estruturalmente diversos, exibindo uma ampla gama de atividades farmacologicamente importantes (NICHOLSON *et al.*, 2001). Os NR-PKS são responsáveis pela síntese de vários metabólitos importantes, incluindo micotoxinas

(CRAWFORD *et al.*, 2008), precursores de pigmentos THN (1,3,6,8-tetrahidroxilnaftaleno), compostos com propriedades antibióticas (Viridicatumtoxina) e antitumorais (Bicaverina).

Outros autores apresentam produtos derivados dos NR-PKS, que podem corroborar com a ação observada em nossos achados, como a griseofulvina, potente antifúngico (FINKELSTEIN *et al.*, 1996) e arteriol com propriedade fitotóxicas (DEMUNER *et al.*, 2013). Para o gênero *Diaporthe*, alguns policetídeos conhecidos e com propriedades bioativas são relatados: citosquirinas, que provocam danos ao DNA bacteriano de *E. coli* e bactérias gram-positivas (BRADY *et al.*, 2000; AGUSTA *et al.*, 2006); diaportemina A e B com ação contra *Streptococcus pneumoniae* Meticilina-Resistente (OLA *et al.*, 2004); diaporinas inibindo a diferenciação de macrófagos (WU *et al.*, 2014); dicerandrol A, B e C obtidos de *Phomopsis longicolla* endófitos de *Dicerandra frutescens*, com propriedades antibióticas e citotóxicas (LIM *et al.*, 2010; DING *et al.*, 2013).

Assim como verificamos a inibição de fitopatógenos, bactérias humano patogênicas e linhagem celular de carcinoma adrenocortical por nossos isolados endófitos de *Diaporthe in vitro*, vários são os relatos que corroboram com o potencial do gênero frente a esse estudo. No entanto, novas linhagens celulares precisam ser avaliadas para confirmar a efetividade como antitumoral.

Rakshith *et al.*, (2013) verificaram a presença de NR-PKS no isolado endofítico de *Phomopsis*, mostrando inibição de *B. subtilis*, *S. aureus*, *Salmonella typhi* e *Microsporium* spp. Lin *et al.*, (2010) verificaram que a presença do domínio PKS amplificado por LC1-LC2c é mais recorrente, sendo encontrada na maioria dos isolados avaliados. Além disso, verificou-se que os isolados de *Diaporthe* apresentaram atividade antitumoral contra Raji (linfoma de Burkitt) e Hep-G2 (carcinoma hepatocelular) e antimicrobiana para *C. albicans*, *S. aureus* e *B. subtilis*.

Isolado endófito de *Phomopsis* sp. obtido em *Erythrina cristagalli*, produziu diversas substâncias, entre elas o antibiótico Phomol (WEBER *et al.*, 2004). Dois novos policetídeos e cinco novos sesquiterpenos da classe cadinana foram isolados de *Phomopsis cassiae*, mostrando atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*, além de atividade citotóxica contra a linhagem celular de tumor cervical humano (HeLa) (SILVA *et al.*, 2006).

Em estudos recentes, os Diaportóis A e B promoveram atividades antimigratória em células de câncer de mama MDA-MB-231 induzidas por TGF- β 1 (NAKASHIMA *et al.*, 2018). Alcalóides obtidos de *Diaporthe phaseolorum* mostraram citotoxicidade contra as linhagens de células cancerígenas MDA-MB-435 e NCI-H460 (CUI *et al.*, 2017). Duas

isocumarinas isoladas de *Diaporthe terebinthifolii* mostraram uma atividade significativa contra a bactéria *S. aureus* Meticilina-Resistente (MEDEIROS *et al.*, 2018).

Outro relato de substâncias produzidas por fungos endofíticos é descrito por Lu *et al.* (2000), que isolaram o ácido coletótrico, produzido por *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de *Artemisia mongolica*, com atividade antimicrobiana contra *B. subtilis*, *S. aureus*; *Sarcina luteae* e contra o fungo fitopatogênico *Helminthosporium sativum* (ZOU *et al.*, 2001).

Como exposto neste estudo, os extratos obtidos de isolados endofíticos de *Diaporthe* spp. apresentam potencial biotecnológico que permitirá ampliar e continuar os estudos com novas frações e modelos toxicológicos, bem como isolar e identificar as moléculas produzidas pelo metabolismo secundário desses organismos.

REFERÊNCIAS

AGUSTA, A.; OHASHI, K.; SHIBUYA, H. Bisanthraquinone metabolites produced by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. **Chem. Pharm. Bull.** 54:579–582, 2006.

ALY, A. H.; DEBBAD, A.; J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 90: 1829–1845, 2011.

ARNOLD, A. E. Endophytic fungi: hidden components of tropical community ecology. In: CARSON, W. P.; SCHNITZER, S. A (Eds.). **Tropical Forest Community Ecology.** Hoboken: Wiley-Blackwell, 2008.

AZEVEDO, J.L. **Microrganismos endofíticos.** In: MELO, I.S. e AZEVEDO, J.L. (eds.). Ecologia Microbiana. Jaguariúna, Embrapa-CNPMA, 117-137, 1998.

AZEVEDO, J. L.; JÚNIOR, W. M.; PEREIRA, J. O; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Environmental Biotechnology.** 3: 40-65, 2000.

BERNARDI-WENZEL, J.; GARCÍA, A.; FILHO, C.J.R.; PRIOLI, A.J.; PAMPHILE, J.A. Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). **Biological Research.** 43: 375-384, 2010.

BILLS, G.; DOMBROWSKY, A.; PELAEZ, F.; POLISHOOK, J. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. **Tropical mycology: micromycetes.** 2: 165-194, 2002.

BINGLE, L.E.; SIMPSON, T.J.; LAZARUS, C.M. Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. **Fungal Genet Biol.** 26: 209–223, 1999.

BOTELLA, L.; DIEZ, J.J. Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. **Fungal Diversity.** 47: 9–18, 2011.

BRADY, S. F.; SINGH, M. P.; JANSO, J. E.; CLARDY, J. Cytoskyrins A and B, new BIA active bisanthraquinones isolated from an endophytic fungus. **Org. Lett.** 2: 4047–4049, 2000.

BUATONG, J.; PHONGPAICHIT, S.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SAKAYAROJ, J. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 27: 3005–3008, 2011.

CHAPLA, V.M.; ZANARDI, L.M.; LOPES, M.N.; BOIZANI, V.S.; SILVA, D.H.S.; ARAUJO, A.R. *Phomopsis* sp. um prolífico produtor de metabólitos especiais. **34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.** 2011.

CHAREPRASERT, S.; PIAPUKIEW, J.; THIENHIRUN, S.; WHALLEY, A. J. S.; SIHANONTH, P. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. **Journal of Microbiology & Biotechnology.** 22: 481-486, 2006.

CORRADO, M.; RODRIGUES, K.F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. **Journal Basic Microbiol.** 44: 157-160, 2004.

CRAWFORD, J.M; THOMAS, P. M.; SCHEERER, J. R.; VAGSTAD, A. L.; KELLEHER, N. L.; TOWNSEND, C. A. Deconstruction of Iterative Multidomain Polyketide Synthase Function. **Science.** 320: 243-246, 2008.

CRAWFORD, J. M.; DANCY, B. C.; HILL, E. A.; UDWARY, D. W.; TOWNSEND, C. A. Identification of a starter unit acyl-carrier protein transacylase domain in an iterative type I polyketide synthase. **Proc Natl Acad Sci.** 103: 16728-16733, 2006.

CUI, H.; YU, J.; CHEN, S.; DING, M.; HUANG, X.; J. YUAN, J.; SHE, Z. Alkaloids from the mangrove endophytic fungus *Diaporthe phaseolorum* SKS019, Bioorg. **Med. Chem. Lett.** 27: 803–807, 2017.

DAI, J.; KROHN, K.; FLORKE, U.; GEHLE, D.; AUST, H.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; RHEINHEIMER, J. Novel highly substituted biaryl ethers, Phomosines D–G, isolated from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Adenocarpus foliolosus*. **European Journal of Organic Chemistry.** 23: 5100-5105, 2005.

DEMUNER, A. J.; ALMEIDA BARBOSA, L. C.; MENDES MIRANDA, A. C.; GERALDO, G. C.; DA SILVA, C. M.; GIBERTI, S.; BERTAZZINI, M.; FORLANI, G. The fungal phytotoxin alternariol 9-methyl ether and some of its synthetic analogues inhibit the photosynthetic electron transport chain. **J. Nat. Prod.** 76: 2234–2245, 2013.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. 1- Production of non-volatile metabolites. **Transactions of the British Mycological Society,** London, 57: 25-39, 1971.

DING, B.; YUAN, J.; HUANG, X.; WEN, W.; ZHU, X.; LIU, Y.; LI, H.; LU, Y.; HE, L.; TAN, H.; SHE, Z. New dimeric members of the phomoxanthone family: phomolactonexanthones A, B and deacetylphomoxanthone C isolated from the fungus *Phomopsis* sp. **Mar Drugs.** 11: 4961–4972, 2013.

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.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, 35: 1039-1042, 2011.

FINKELSTEIN, E.; AMICHAÏ, B.; GRUNWALD, M.H. Griseofulvin and its uses. **Int. J. Antimicrob. Agents**. 6: 189–194, 1996.

GAO, Y.H.; SUN, W.; SU, Y.Y.; CAI, L. Tree new species of *Phomopsis* in Gutianshan Nature Reserve in China. **Mycological Progress**. 13: 111-121, 2014.

GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G., & de Hoog, G. S. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. **Studies in Mycology**. 43, 151-162, 1999.

GOMES, R.R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, C.I.R.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**. 31: 1–41, 2013.

GUNATILAKA, L.A.A. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity and Implications of Their Occurrence. **Journal of Natural Products**. 69: 509-526, 2006.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**. 44: 136-142, 2008.

HUSSAIN, H.; AKHTAR, N.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; PESCIPELLI, G.; SALVADORI, P.; ANTUS, S.; KURTAN, T.; KROHN, K. New Biactive 2,3- epoxy cyclohexenesandiso coumarins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Laurus azorica*. **European Journal of Organic Chemistry**. 5: 749-756, 2009.

KUMARAN, R.S.; HUR, B. Screening of species of the endophytic fungus *Phomopsis* for the production of the anticancer drug taxol. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 54: 21-30, 2009.

ISAKA, M.; JATURAPAT, A.; RUKSEREE, K.; DANWISETKANJANA, K.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Phomoxanthonones A and B, novel xanthone dimmers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. **Journal Natural Products**. 64: 1015-1018, 2001.

LIM, C.; KIM, J.; CHOI, J. N.; PONNUSAMY, K.; JEON, Y.; KIM, SU.; KIM, J. G.; LEE, C. Identification, fermentation, and bioactivity against *Xanthomonas oryzae* of antimicrobial metabolites isolated from *Phomopsis longicolla* S1B4. **J. Microbiol. Biotechnol.** 20: 494–500, 2010.

LIN, X.; HUANG, Y.; FANG, M.; WANG, J.; ZHENG, Z.; SU, W. Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungi, *Diaporthe* spp. **FEMS Microbiology Letters**. 251: 53-58, 2005.

- LIN, X.; HUANG, Y.J.; ZHENG, Z.H.; SU, W.J.; QIAN, X.M.; SHEN, Y.M. Endophytes from the pharmaceutical plant, *Annona squamosa*: isolation, bioactivity, identification and diversity of its polyketide synthase gene. **Fungal Diversity**. 41: 41–51, 2010.
- 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**. 151: 67–73, 2000.
- MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. 1: 369–409, 1993.
- MAZAROTTO, E. J., PIMENTEL, I. C., ABREU, D. C. A., SANTOS, A. F. Association of *Fusarium* and *Phomopsis* with peroba rosa seeds. **Floresta e Ambiente**. 26: 1–7, 2019.
- MEDEIROS, A.G. et al. Bioprospecting of *Diaporthe terebinthifolii* LGMF907 for antimicrobial compounds. **Folia Microbiol (Praha)**. 63: 499–505, 2018.
- MELO, I. S. de. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. v.1. Jaguariúna: Embrapa, 17–60, 1998.
- MIGUEL, O. G. Ensaio sistemático de análise em fitoquímica. **Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR**, Curitiba, 2003.
- 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**. 1–19, 2012.
- MOSMANN, T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **J. Immunol. Methods**. 65: 55–63, 1983.
- MOUSA, W. K., RAIZADA, M.N. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. **Frontiers in Microbiology**. 4: 1–18, 2013.
- MURALI, T.S.; SURYANARAYANAN, T.S.; GEETA, R. Endophytic *Phomopsis* species: host range and implications for diversity estimates. **Canadian Journal of Microbiology**. 52: 673–680, 2006.
- NAKASHIMA, K.I.; TOMIDA, J.; KAMIYA, T.; HIRAI, T.; MORITA, Y.; HARA, H.; KAWAMURA, Y.; ADACHI, T.; INOUE, M. Diaporthols A and B: bioactive diphenyl ether derivatives from an endophytic fungus *Diaporthe* sp. **Tetrahedron Lett**. 59: 1212–1215, 2018.
- NICHOLSON, T.P.; RUDD, B.A.; DAWSON, M.; LAZARUS, C.M.; SIMPSON, T.J.; COX, R.J. Design and utility of oligo nucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. **Chem. Biol**. 8: 157–178, 2001.
- OLA, A. R. B.; DEBBAB, A.; KURTÁN, T.; BRÖTZ-OESTERHELT, H.; AMAL, H. Dihydroanthracenone metabolites from the endophytic fungus *Diaporthe melonis* isolated from *Annona squamosa* L. **Tetrahedron Lett**. 55: 3147–3150, 2014.

RAJ, K. G.; MANIKANDAN, R.; ARULVASU, C.; PANDI, M. Anti-proliferative effect of fungal taxol extracted from *Cladosporium oxysporum* against human pathogenic bacteria and human colon cancer cell line HCT 15, Spectrochim, **Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.** 138: 667-674, 2015.

RAKSHITH, D.; SANTOSH, P.; SATISH, S. Isolation and characterization of antimicrobial metabolite producing endophytic *Phomopsis* sp. from *Ficus pumila* Linn. (Moraceae). **Inter. J. Chem. Anal. Sci.** 4: 156–160, 2013.

REHNER, S. A., UECKER, F. A. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. **Canadian Journal of Botanic.** 72: 1666-1674, 1994.

SADRATI, N.; DAOUD, H.; ZERROUG, A.; DAHAMNA, S.; BOUHARATI, S. Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (*Triticum durum*). **J. Plant. Prot. Res.** 53:128–136, 2013.

SANTOS, P.J.C.; SAVI, D.C.; GOMES, R.R. et al. *Diaporthe endophytica* and *D. terebinthifolii* from medicinal plants for biological control of *Phyllosticta citricarpa*. **Microbiological Research.** 186–187: 153–160, 2016.

SANTIAGO, M; STROBEL, S. Thin layer chromatography. **Meth. Enzymol.** 533: 303–324, 2013.

SCHUMANN, J.; HERTWECK, C. Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes. **Journal of Biotechnology.** 124: 690-703, 2006.

SIQUEIRA, V. CONTI, R., DE ARAÚJO, J., SOUZA-MOTTA, C. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. And their antimicrobial activity. **Symbiosis.** 53: 89-95, 2011.

SILVA, G. H.; TELES, H. L.; TREVISAN, H. C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H.; EBERLIN, M. N.; HADDAD, R.; COSTA-NETO, C. M.; ARAÚJO, A.R. New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society.** 16: 1463-1466, 2005.

SILVA, G. H.; TELES, H. L.; ZANARDI, L. M.; YOUNG, M. C. M.; EBERLIN, M. N.; HADDAD, R.; PFENNING, L. H.; COSTA NETO, C. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R. Cardinanes esquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). **Phytochemistry.** 67: 1964-1969, 2006.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; FILHO, A. S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica.** 34: 185-195, 2004.

SUFFNESS, M; PEZZUTO, J.M. Assay related to cancer drug discovery. In: **Methods in Plant Biochemistry.** London Academic Press. 71-133, 1991.

UDAYANGA, D.; XINGZHONG, L.; MCKENZIE, E.H.C.; CHUKEATIROTE, E.; BAHKALI, A.H.A.; HYDE, K.D. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common pathogens. **Fungal Diversity**. 50: 189–225, 2011.

UDAYANGA, D.; CASTLEBURY, L.A.; ROSSMAN, A.Y.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K.D. Insights into the genus *Diaporthe*: phylogenetic species delimitation in the *D. eres* species complex. **Fungal Diversity**. 67: 203–229, 2014.

VALENTE, L. M. M et al. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcaloides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 16: 216-223, 2006.

WAGNER, H.M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. **Plant drug analysis**. New York: Springer-Verlag, 1996.

WEBER, D.; STERNER, O.; ANKE, T.; GORZALCZANCY, S.; MARTINO, V.; ACEVEDO, C. Phomol, a New Antiinflammatory Metabolite from an Endophyte of the Medicinal Plant *Erythrina cristagalli*. **The Journal of Antibiotics**. 57: 559-563, 2004.

WU, Q.; GUO, Y.; GUO, Z. K.; CHU, Y. L.; WANG, T.; TAN, R. X. Two new cytosporones from the culture of endophytic *Phomopsis* sp. **Chem. Nat. Compd**. 48: 938–941, 2013.

XU, J.; EBADA, S.S.; PROKSCH, P. *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. **Fungal Diversity**. 44: 15-31, 2010.

YU, H.; ZHANG, L.; LI, L.; ZHENG, C.; GUO, L.; LI, W. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes, **Microbiol. Res**. 165: 437-449, 2010.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural products reports**. 23: 753-771, 2006.

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

CONCLUSÃO

Com este estudo foi possível identificar duas novas espécies de *Diaporthe*, isoladas como endófitos em sementes de peroba rosa (*Aspidosperma polyneuron*). Essa caracterização foi baseada em critérios morfológicos a partir de estruturas microscópicas e características culturais, bem como, uma análise filogenética robusta utilizando cinco genes em análise multilocus (ITS, Calmodulina, Histona, Beta Tubulina e Fator de Elongação). Os nomes atribuídos para as novas espécies ficarão em sigilo até a publicação do manuscrito em periódico especializado, seguindo as recomendações internacionais.

Os isolados de *Diaporthe* avaliados quanto ao potencial de produção de metabólitos secundários se mostraram muito promissores. Foi verificada a expressão do domínio PKS nos genes dos isolados avaliados, em especial do grupo NR-PKS, que constitui uma ampla gama de precursores antimicrobianos. Consegue-se inferir através da CCD as classes de compostos produzidos pelas espécies novas de *Diaporthe*, biossintetizando alcaloides, terpenoides e compostos fenólicos.

Houve inibição de *F. oxysporum*, *F. pseudocircinatum*, *Colletotrichum* sp. e *P. palmivora* nos testes realizados. Observou-se ação antimicrobiana dos extratos contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *C. albicans*. Houve também ação antitumoral dos extratos contra a linhagem H295R de Carcinoma Adrenocortical.

Os estudos terão continuidade com uma ampliação dos solventes utilizados na extração de metabólitos, visando obter novas classes de compostos. Além disso, o fracionamento dos extratos e isolamento de moléculas poderão nos revelar a presença de substâncias estruturalmente ainda desconhecidas. Outros testes poderão ser realizados visando ampliar o espectro de ação dos extratos, como antiparasitário, antiviral, antioxidante e outras propriedades de interesse farmacológico.

REFERÊNCIAS GERAIS

- AGUSTA, A.; OHASHI, K.; SHIBUYA, H. Bisanthraquinone metabolites produced by the endophytic fungus *Diaporthe* sp. **Chem. Pharm. Bull.** 54:579–582, 2006.
- ALVIN, A.; MILLER, K.I.; NEILAN, B.A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds, **Microbiol. Res.** 169 (2014) 483e495
- ALY, A. H.; DEBBAD, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**. v.41, n.1, p.1 – 16, 2010.
- ALY, A. H.; DEBBAD, A.; J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant in habitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology.** 90: 1829–1845, 2011.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; KUBLINCKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P. T. **Manual: isolamento de microrganismos endofíticos.** Piracicaba: CalQ, 2002. 86 p.
- ARNOLD, A. E. Endophytic fungi: hidden components of tropical community ecology. In: CARSON, W. P.; SCHNITZER, S. A (Eds.). **Tropical Forest Community Ecology.** Hoboken: Wiley-Blackwell, 2008.
- AZEVEDO, J.L. **Microrganismos endofíticos.** In: MELO, I.S. e AZEVEDO, J.L. (eds.). *Ecologia Microbiana.* Jaguariúna, Embrapa-CNPMA, 117-137, 1998.
- AZEVEDO, J. L.; JÚNIOR, W. M.; PEREIRA, J. O; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recente advances on tropical plants. **Environmental Biotechnology.** 3: 40-65, 2000.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.J.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Microrganismos Endofíticos e seu Papel em Plantas Tropicais. In: AZEVEDO, J. L.; SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. **Biotechnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria.** Caxias do Sul: Educs, 2002. p.269-294.
- BERNARDI-WENZEL, J.; GARCÍA, A.; FILHO, C.J.R.; PRIOLI, A.J.; PAMPHILE, J.A. Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). **Biological Research.** 43: 375-384, 2010.
- BHARDWAJ, A.; AGRAWAL, P. K. A Review fungal endophytes: as a store house of bioactive compound. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,** Bulgaria, v. 3, n. 9, p. 228–237, 2014.
- BILLS, G.; DOMBROWSKY, A.; PELAEZ, F.; POLISHOOK, J. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. **Tropical mycology: micromycetes.** 2: 165-194, 2002.
- BINGLE, L.E.; SIMPSON, T.J.; LAZARUS, C.M. Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. **Fungal Genet Biol.** 26: 209–223, 1999.

BONFIELD, J; BEAL, K; JORDAN, M; CHEN, Y; STADEN, R. **The Staden Package Manual**, Cambridge, UK, 2006.

BOTELLA, L.; DIEZ, J.J. Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. **Fungal Diversity**. 47: 9–18, 2011.

BRADY, S. F.; SINGH, M. P.; JANSO, J. E.; CLARDY, J. Cytoskyrins A and B, new BIA active bisanthraquinones isolated from an endophytic fungus. **Org. Lett.** 2: 4047–4049, 2000.

BUATONG, J.; PHONGPAICHIT, S.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SAKAYAROJ, J. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 27: 3005–3008, 2011.

CARBONE, I.; KOHN, L.M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**. 91: 553–556, 1999.

CARVALHO, P. E. R. Peroba-Rosa - *Aspidosperma polyneuron*. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 12 p.(Circular Técnica, 96).

CHAPLA, V.M.; ZANARDI, L.M.; LOPES, M.N.; BOIZANI, V.S.; SILVA, D.H.S.; ARAUJO, A.R. *Phomopsis* sp. um prolífico produtor de metabólitos especiais. **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. 2011.

CHAPLA, V. M. et al. Substâncias acetilênicas produzidas por *Saccharicola* sp., um fungo endofítico de *Eugenia jambolana*. In: 35 REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2012, São Paulo, Águas de Lindóia. **Anais da 35 Reunião Anual Da Sociedade Brasileira de Química** Responsabilidade, Ética e Progresso Social, 2012.

CHAREPRASERT, S.; PIAPUKIEW, J.; THIENHIRUN, S.; WHALLEY, A. J. S.;SIHANONTH, P. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. **Journal of Microbiology & Biotechnology**. 22: 481-486, 2006.

CORRADO, M.; RODRIGUES, K.F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. **Journal Basic Microbiol.** 44: 157-160, 2004.

CRAWFORD, J.M; THOMAS, P. M.; SCHEERER, J. R.; VAGSTAD, A. L.; KELLEHER, N. L.; TOWNSEND, C. A. Deconstruction of Iterative Multidomain Polyketide Synthase Function. **Science**. 320: 243-246, 2008.

CRAWFORD, J. M.; DANCY, B. C.; HILL, E. A.; UDWARY, D. W.; TOWNSEND, C. A. Identification of a starter unit acyl-carrier protein transacylase domain in an iterative type I polyketide synthase. **Proc Natl Acad Sci**. 103: 16728-16733, 2006.

CROTEAU R.; KUTCHAN, T.M; LEWIS, N.G. Natural products (Secondary metabolites), cap.24. In: Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Buchanan, B; Grisseem, W.; Jones, R. American Society of Plant Physiologists, 2000.

CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; RISEDE, J-M; HYWEL-JONES, N.L. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. **Studies in Mycology**. 50: 415–430, 2004.

CUI, H.; YU, J.; CHEN, S.; DING, M.; HUANG, X.; J. YUAN, J.; SHE, Z. Alkaloids from the mangrove endophytic fungus *Diaporthe phaseolorum* SKS019, Bioorg. **Med. Chem. Lett.** 27: 803–807, 2017.

DAI, J.; KROHN, K.; FLORKE, U.; GEHLE, D.; AUST, H.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; RHEINHEIMER, J. Novel highly substituted biaryl ethers, Phomosines D–G, isolated from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Adenocarpus foliolosus*. **European Journal of Organic Chemistry.** 23: 5100–5105, 2005.

DEACON, J.W. **Fungal Biology.** 4 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. 371p.

DEMUNER, A. J.; ALMEIDA BARBOSA, L. C.; MENDES MIRANDA, A. C.; GERALDO, G. C.; DA SILVA, C. M.; GIBERTI, S.; BERTAZZINI, M.; FORLANI, G. The fungal phytotoxin alternariol 9-methyl ether and some of its synthetic analogues inhibit the photosynthetic electron transport chain. **J. Nat. Prod.** 76: 2234–2245, 2013.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. 1- Production of non-volatile metabolites. **Transactions of the British Mycological Society**, London, 57: 25–39, 1971.

DING, B.; YUAN, J.; HUANG, X.; WEN, W.; ZHU, X.; LIU, Y.; LI, H.; LU, Y.; HE, L.; TAN, H.; SHE, Z. New dimeric members of the phomoxanthone family: phomolactonexanthones A, B and deacetylphomoxanthone C isolated from the fungus *Phomopsis* sp. **Mar Drugs.** 11: 4961–4972, 2013.

DIOGO, E. L. F.; SANTOS, J. M.; PHILLIPS, A. J. L. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal. **Fungal Diversity**, v. 44, p.107–115, 2010.

DISSANAYAKE, A.J.; LIU, M.; ZHANG, W.; CHEN, Z.; UDAYANGA, D.; CHUKEATIROTE, E.; LI, X.; YAN, J.; HYDE, K.D. Morphological and molecular characterisation of *Diaporthe* species associated with grapevine trunk disease in China. **Fungal Biology.** 119: 283–294, 2014.

DISSANAYAKE, A.J.; CAMPORESI, E.; HYDE, K.D.; WEI, Z.; YAN, J.Y.; LI, X.H. Molecular phylogenetic analysis reveals seven new *Diaporthe* species from Italy. **Mycosphere.** 8: 853–877, 2017.

DU, Z.; FAN, X. L.; HYDE, K. D.; YANG, Q.; LIANG, Y. M.; TIAN, C. M. Phylogeny and morphology reveal two new species of *Diaporthe* from *Betula* spp. in China. **Phytotaxa.** 269: 90–102, 2016.

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

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.

FAN, X.L.; HYDE, K.D.; UDAYANGA, D.; WU, X.Y.; TIAN, C.M. *Diaporthe rostrata*, a novel ascomycete from *Juglans mandshurica* associated with walnut dieback. **Mycological Progress.** 14: 1–8, 2015.

- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, 35: 1039-1042, 2011.
- FINKELSTEIN, E.; AMICHAÏ, B.; GRUNWALD, M.H. Griseofulvin and its uses. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 6: 189–194, 1996.
- FIRÁKOVÁ, S.; ŠTURDÍKOVÁ, M.; MÚČKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants, *Biologia* 62 (2007) 251 e 257
- FOX, E. M.; HOWLETT, B. J. Secondary metabolism: Regulation and role in fungal biology. *Current Opinion Microbiology*, v. 11, p. 481–487, 2008.
- GAO, Y.H.; SUN, W.; SU, Y.Y.; CAI, L. Tree new species of *Phomopsis* in Gutianshan Nature Reserve in China. *Mycological Progress*. 13: 111-121, 2014.
- GARCIA-REYNE, A. et al. Cutaneous infection by *Phomopsis longicolla* in a renal transplant recipient from Guinea: first report of human infection by this fungus. *Transplant Infectious Disease*, v. 13, p. 204–207, 2011.
- GARZONIO, D.M. & MCGEE, D.C. Comparison of seeds and crop residues as sources of inoculum for pod and stem blight of soybeans. *Plant disease*. v.67, p.1374-1376, 1983.
- GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G., & de Hoog, G. S. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. *Studies in Mycology*. 43, 151-162, 1999.
- GLASS, N.L.; DONALDSON, G. Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 1323–1330, 1995.
- GOLINSKA, P.; WYPIJ, M.; AGARKAR, G.; RATHOD, D.; DAHM, H.; RAI, M. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 108, p. 267–289, 2015.
- GOMES, R.R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, C.I.R.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*. 31: 1–41, 2013.
- GUARNACCIA, V.; GROENEWALD, J.Z.; WOODHALL, J. et al. *Diaporthe* diversity and pathogenicity revealed from a broad survey of grapevine diseases in Europe *Persoonia*. 40: 135-153, 2018.
- GUNATILAKA, L.A.A. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity and Implications of Their Occurrence. *Journal of Natural Products*. 69: 509-526, 2006.
- GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 44: 136-142, 2008.
- HANLIN, R. T.; MENEZES, M. *Gêneros ilustrados de ascomicetos*. UFRPE. Recife-PE. 1996. 274p.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revised. **Mycological Research**, v. 105(12), p.1422-1432. 2001.

HERNÁNDEZ, F. E.; PIOLLI, R. N.; PERUZZO, A. M.; FORMENTO, A. N.; PRATTA, G. R. Caracterización morfológica y molecular de una colección de aislamientos de *Phomopsis longicolla* de la región templada y subtropical de Argentina. **International Journal of Tropical Biology and Conservation**, v. 63, n. 3, 2015.

HUSSAIN, H.; AKHTAR, N.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; PESCIPELLI, G.; SALVADORI, P.; ANTUS, S.; KURTAN, T.; KROHN, K. New Biactive 2,3- epoxy cyclohexenesandiso coumarins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Laurus azorica*. **European Journal of Organic Chemistry**. 5: 749-756, 2009.

ISAKA, M.; JATURAPAT, A.; RUKSEREE, K.; DANWISSETKANJANA, K.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Phomoxanthonones A and B, novel xanthone dimmers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. **Journal Natural Products**. 64: 1015-1018, 2001.

JUVVADI, P.R; SESHIME, Y; KITAMOTO, K. Genomics reveals traces of fungal phenylpropanoid-flavonoid metabolic pathway in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *The Journal of Microbiology*, v. 43, n.6, p.475-486, 2005.

KATOH, K.; STANDLEY, D.M. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**. 30: 772–780, 2013.

KELLER, N.P.; TURNER, G.; BENNETT, J.W. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**. p. 937-947, 2005.

KRUPPA, P.C.; FABRI, E. G; RUSSOMANO, O. M. R. ; COUTINHO, L.N.. Ocorrência de *Phomopsis* sp. em Sementes de Urucum. **O Biológico**. São Paulo. v. 74, p. 55-57, 2012.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**. 33: 1870–1874, 2016.

KUMARAN, R.S.; HUR, B. Screening of species of the endophytic fungus *Phomopsis* for the production of the anticancer drug taxol. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 54: 21-30, 2009.

LAWRENCE, D.P.; TRAVADON, R.; BAUMGARTNER, K. Diversity of *Diaporthe* species associated with wood cankers of fruit and nut crops in northern California. **Mycologia**. 107: 926–940, 2015.

LIM, C.; KIM, J.; CHOI, J. N.; PONNUSAMY, K.; JEON, Y.; KIM, SU.; KIM, J. G.; LEE, C. Identification, fermentation, and bioactivity against *Xanthomonas oryzae* of antimicrobial metabolites isolated from *Phomopsis longicolla* S1B4. **J. Microbiol. Biotechnol.** 20: 494–500, 2010.

LIN, X.; HUANG, Y.; FANG, M.; WANG, J.; ZHENG, Z.; SU, W. Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungi, *Diaporthe* spp. **FEMS Microbiology Letters**. 251: 53-58, 2005.

- LIN, X.; HUANG, Y.J.; ZHENG, Z.H.; SU, W.J.; QIAN, X.M.; SHEN, Y.M. Endophytes from the pharmaceutical plant, *Annona squamosa*: isolation, bioactivity, identification and diversity of its polyketide synthase gene. **Fungal Diversity**. 41: 41–51, 2010.
- 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**. 151: 67-73, 2000.
- MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. 1: 369-409, 1993.
- MAZAROTTO, E. J., PIMENTEL, I. C., ABREU, D. C. A., SANTOS, A. F. Association of *Fusarium* and *Phomopsis* with peroba rosa seeds. **Floresta e Ambiente**. 26: 1-7, 2019.
- MEDEIROS, A.G. et al. Bioprospecting of *Diaporthe terebinthifolii* LGMF907 for antimicrobial compounds. **Folia Microbiol (Praha)**. 63: 499–505, 2018.
- MELO, I. S. de. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. v.1. Jaguariúna: Embrapa, 17-60, 1998.
- MIGUEL, O. G. Ensaio sistemático de análise em fitoquímica. **Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR**, Curitiba, 2003.
- MILLER, A.N.; HUHDORF, S.M. Multi-gene phylogenies indicate ascomal wall morphology is a better predictor of phylogenetic relationships than ascospore morphology in the *Sordariales* (*Ascomycota*, Fungi). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 35: 60–75, 2005.
- 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**. 1-19, 2012.
- MOSMANN, T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **J. Immunol. Methods**. 65: 55–63, 1983.
- MOUSA, W. K., RAIZADA, M.N. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. **Frontiers in Microbiology**. 4: 1-18, 2013.
- MURALI, T.S.; SURYANARAYANAN, T.S.; GEETA, R. Endophytic *Phomopsis* species: host range and implications for diversity estimates. **Canadian Journal of Microbiology**. 52: 673–680, 2006.
- NAKASHIMA, K.I.; TOMIDA, J.; KAMIYA, T.; HIRAI, T.; MORITA, Y.; HARA, H.; KAWAMURA, Y.; ADACHI, T.; INOUE, M. Diaporthols A and B: bioactive diphenyl ether derivatives from an endophytic fungus *Diaporthe* sp. **Tetrahedron Lett**. 59: 1212–1215, 2018.
- NICHOLSON, T.P.; RUDD, B.A.; DAWSON, M.; LAZARUS, C.M.; SIMPSON, T.J.; COX, R.J. Design and utility of oligo nucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. **Chem. Biol**. 8: 157–178, 2001.

NYLANDER, J.A.A. **MrModeltest v.2**. Program distributed by the author. Uppsala, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004.

O'DONNELL, K.; NIRENBERG, H.I.; AOKI, T.; CIGELNIK, E. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**. 41: 61–78, 2000.

O'DONNELL, K.; WARD, T.J.; GEISER, D.M.; CORBY KISTLER, H.; AOKI, T. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. **Fungal Genetics and Biology**. 41: 600–623, 2004.

OLA, A. R. B.; DEBBAB, A.; KURTÁN, T.; BRÖTZ-OESTERHELT, H.; AMAL, H. Dihydroanthracenone metabolites from the endophytic fungus *Diaporthe melonis* isolated from *Annona squamosa* L. **Tetrahedron Lett**. 55: 3147–3150, 2014.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: Interação com as plantas e potencial biotecnológico. **Biociência, Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 62-76, 2002.

PHILLIPS, A.J.L. The plant pathogenic genus *Phomopsis* and its teleomorph (*Diaporthe*): Development and application of morphological, biological and phylogenetic species concepts. Disponível em: <http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/personal_web_page.htm> Acesso em Janeiro de 2016.

PRIHASTUTI, H.; CAI, L.; CHEN, H.; MCKENZIE, E.H.C.; HYDE, K.D. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fungal Diversity**. 39: 89–109, 2009.

PROMPUTTHA, I. et al. Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes? **Fungal Diversity**, v.41, p.89–99, 2010.

RAJ, K. G.; MANIKANDAN, R.; ARULVASU, C.; PANDI, M. Anti-proliferative effect of fungal taxol extracted from *Cladosporium oxysporum* against human pathogenic bacteria and human colon cancer cell line HCT 15, Spectrochim, **Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.** 138: 667-674, 2015.

RAKSHITH, D.; SANTOSH, P.; SATISH, S. Isolation and characterization of antimicrobial metabolite producing endophytic *Phomopsis* sp. from *Ficus pumila* Linn. (Moraceae). **Inter. J. Chem. Anal. Sci.** 4: 156–160, 2013.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. **FigTree v.1.3.1**. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, UK, 2010.

RAYNER, R.W. A mycological colour chart. **Commonwealth Mycological Institute**, Kew, UK, 1970.

REHNER, S. A., UECKER, F. A. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. **Canadian Journal of Botanic**. 72: 1666-1674, 1994.

- RIZZINI, C. T. Árvores e madeiras úteis do Brasil. **Manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda. 1990. 304p.
- RODRIGUES, K. F.; DIAS FILHO, M. B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizanthacv.* Marandu and *B. humidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 31(12): 905-909, 1996
- RODRIGUES, K.F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 261-267, 2000.
- RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P. et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**. 61: 539–542, 2012.
- ROSSMAN, A.Y.; ADAMS, G.C.; CANNON, P.F. et al. Recommendations of generic names in Diaporthales competing for protection or use. **IMA Fungus**. 6: 145–154, 2015.
- SADRATI, N.; DAOUD, H.; ZERROUG, A.; DAHAMNA, S.; BOUHARATI, S. Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (*Triticum durum*). **J. Plant. Prot. Res.** 53:128–136, 2013.
- SANTOS, P.J.C.; SAVI, D.C.; GOMES, R.R. et al. *Diaporthe endophytica* and *D. terebinthifolii* from medicinal plants for biological control of *Phyllosticta citricarpa*. **Microbiological Research**. 186–187: 153–160, 2016.
- SANTIAGO, M; STROBEL, S. Thin layer chromatography. **Meth. Enzymol.** 533: 303–324, 2013.
- SCHARF, D. H.; HEINEKAMP, T.; BRAKHAGE, A. A. Human and Plant Fungal Pathogens: The Role of Secondary Metabolites. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 10, n. 1, p. 10–12, 2014.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, p. 661-686, jun. de 2005.
- SCHULZ, B., BOYLE, C. Microbial root endophytes. In: Sieber, T.N (ed) What are endophytes? v.9, Springer, Berlin, p. 1–13, 2006.
- SCHUMANN, J.; HERTWECK, C. Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes. **Journal of Biotechnology**. 124: 690-703, 2006.
- SIDDIQUE, M. H. Study of the biosynthesis pathway of the geosmin in *Penicillium expansum*. Institut National Polytechnique de Toulouse, Laboratoire de Engenharia Química, França, 2012. Disponível em: <https://oatao.univ-toulouse.fr/8070/>. Acesso em: Abril de 2020.
- SILVA, G. H.; TELES, H. L.; TREVISAN, H. C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H.; EBERLIN, M. N.; HADDAD, R.; COSTA-NETO, C. M.; ARAÚJO, A.R. New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 16: 1463-1466, 2005.

SILVA, G. H.; TELES, H. L.; ZANARDI, L. M.; YOUNG, M. C. M.; EBERLIN, M. N.; HADDAD, R.; PFENNING, L. H.; COSTA NETO, C. M.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; ARAUJO, A. R. Cardinanes esquiterpenoids of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (Leguminosae). **Phytochemistry**. 67: 1964-1969, 2006.

SIQUEIRA, V. CONTI, R., DE ARAÚJO, J., SOUZA-MOTTA, C. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. And their antimicrobial activity. **Symbiosis**. 53: 89-95, 2011.

SMITH, S. A. et al. Bioactive endophytes warrants intensified exploration and conservation. **PLoS ONE**, v. 3, p. 30–52, 2008.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; FILHO, A. S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**. 34: 185-195, 2004.

STONE, J.K.; POLISHOOK, J.D.; WHITE JUNIOR, J.F. Endophytic fungi. In: MUELLER, J.M.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S. **Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods**. San Diego: Elsevier Academic Press, p.241-70, 2004.

STROBEL, G.A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol and Molecular Biology Reviews**.v.67, 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.

SUFFNESS, M; PEZZUTO, J.M. Assay related to cancer drug discovery. In: **Methods in Plant Biochemistry**. London Academic Press. 71-133, 1991.

TAYLOR, T.N.; TAYLOR, E.L. The rhyniechert ecosystem: a model for understanding fungal interactions. In: BACON, C.W.; WHITE, J.F. (Ed.). **Microbial endophytes**. New York: Marcel Decker, 2000.

UDAYANGA, D.; XINGZHONG, L.; MCKENZIE, E.H.C.; CHUKEATIROTE, E.; BAHKALI, A.H.A.; HYDE, K.D. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common pathogens. **Fungal Diversity**. 50: 189–225, 2011.

UDAYANGA, D. et al. A multi-locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe* (*Phomopsis*). **Fungal Diversity**, v. 56, p. 157–171, 2012.

UDAYANGA, D.; CASTLEBURY, L.A.; ROSSMAN, A.Y.; CHUKEATIROTE.; E, HYDE K.D. Insights into the genus *Diaporthe*: phylogenetic species delimitation in the *D. eres* species complex. **Fungal Diversity**. 67: 203–229, 2014.

UDAYANGA, D.; CASTLEBURY, L.A.; ROSSMAN, A.Y.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K.D. The *Diaporthe sojae* species complex: phylogenetic reassessment of pathogens associated with soybean, cucurbits and other field crops. **Fungal Biology**. 119: 383–407, 2015.

- VALENTE, L. M. M et al. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcaloides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 16: 216-223, 2006.
- VELOSO, H.P.; RANGEL FILHO, A.L.R.; LIMA, J.C.A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1991. 123p.
- WAGNER, H.M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. **Plant drug analysis**. New York: Springer-Verlag, 1996.
- WANI, Z. A.; ASHRAF, N.; MOHIUDDIN, T.; RIYAZ-UL-HASSAN, S. Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 99, n. 7, p. 2955–2965, 2015.
- WEBER, D.; STERNER, O.; ANKE, T.; GORZALCZANCY, S.; MARTINO, V.; ACEVEDO, C. Phomol, a New Antiinflammatory Metabolite from an Endophyte of the Medicinal Plant *Erythrina cristagalli*. **The Journal of Antibiotics**. 57: 559-563, 2004.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D. H.; SHINSKY, J. J.; WHITE, T.J. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, San Diego, 1990, p. 315–322.
- WU, Q.; GUO, Y.; GUO, Z. K.; CHU, Y. L.; WANG, T.; TAN, R. X. Two new cytosporones from the culture of endophytic *Phomopsis* sp. **Chem. Nat. Compd**. 48: 938–941, 2013.
- XU, J.; EBADA, S.S.; PROKSCH, P. *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. **Fungal Diversity**. 44: 15-31, 2010.
- YANG, J. et al. Metabolites from the mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. (#zsu-H76). **European Journal of Organic Chemistry**, v.19, p.3692–3695, 2010.
- YANG, Q.; DU, Z.; TIAN, C.M. Phylogeny and morphology reveal two new species of *Diaporthe* from Traditional Chinese Medicine in Northeast China. **Phytotaxa**. 336: 159–170, 2018.
- YU, H.; ZHANG, L.; LI, L.; ZHENG, C.; GUO, L.; LI, W. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes, **Microbiol. Res**. 165: 437-449, 2010.
- ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural products reports**. 23: 753-771, 2006.
- ZHAO, J.; ZHOU, L.; WANG, J.; SHAN, T.; ZHONG, L.; LIU, X.; GAO, X. Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. In: MENDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**. Badajoz: Formatex Research Center, 2010. p. 567-576. v. 1. (Microbiological bo series, 2).

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

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