

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KARIMAN ASSIS BOCHNIE

BIOPROSPECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA FAMÍLIA
HYPOXYLACEAE ISOLADOS DA PLANTA *Vochysia divergens* Pohl DO PANTANAL
SUL MATOGROSSENSE

CURITIBA

2019

KARIMAN ASSIS BOCHNIE

BIOPROSPECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA FAMÍLIA
HYPOXYLACEAE ISOLADOS DA PLANTA *Vochysia divergens* Pohl DO PANTANAL
SUL MATOGROSSENSE

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Chirlei Glienke
Coorientadora: Dr^a Daiani C. Savi

CURITIBA
2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Bochnie, Kariman Assis

Bioprospecção e identificação de fungos endofíticos da família
Hypoxylaceae isolados da planta *Vochysia divergens Pohl* do pantanal Sul
Matogrossense. / Kariman Assis Bochnie. – Curitiba, 2019.
63 p.: il.

Orientadora: Chirlei Glienke
Coorientadora: Daiani C.Savi

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

1. Bioprospecção 2. Metabólitos secundários 3. Microbiologia 4.
Fungos 5. Plantas medicinais I. Título II. Glienke, Chirlei III. Savi, Daiani
C. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 576



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001015044P0

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 dissertação de Mestrado de **KARIMAN ASSIS BOCHNIE** intitulada: **Bioprospecção e identificação de fungos endofíticos da família Hypoxylaceae isolados da planta *Vochysia divergens* Pohl do pantanal Sul Matogrossense**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre 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 Março de 2019.

CHIRLEI GLIENKE

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

KEITE DA SILVA NOGUEIRA

Avaliador Externo (UFPR)

VANIA APARECIDA VICENTE

Avaliador Interno (UFPR)

Dedico este trabalho ao meu esposo e melhor amigo Jadiel Vinicius, pela paciência, companheirismo e apoio emocional nos momentos difíceis desta jornada e principalmente por ser sempre um exemplo pra mim.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo quero agradecer a Deus, que sempre foi o meu alicerce nesta caminhada as vezes tão árdua, colocando pessoas tão maravilhosas ao meu lado para me apoiar e ajudar a transpor dificuldades que até então pareciam intransponíveis para mim.

À prof^a Dr^a Chirlei Glienke, por aceitar me orientar, pela oportunidade de realizar este trabalho, oferecendo sempre a sua visão otimista de resultados promissores.

À Dr^a Daiani Cristina Savi, por me co-orientar, sendo exemplo de competência e por compartilhar seus conhecimentos, sempre dispondo de orientações práticas e dicas valiosas que auxiliaram e muito no meu trabalho.

À minha banca de acompanhamento, Prof. Vania Vicente, Prof. Dr. Keite Nogueira e Dr. Josiane Figueiredo, pelas sugestões e contribuições oferecidas, cooperando para o desenvolvimento desse trabalho.

À profa Dr^a Lygia Terasawa e a prof^a Dr^a Vanessa Kava-Cordeiro, pela pequena convivência, e por disponibilizar de recursos e espaço no LabGeM.

À minha querida amiga Jucélia lantas, que se tornou uma amiga e irmã, para a vida. Por acompanhar de perto alegrias e momentos difíceis da minha vida pessoal, sempre com o conforto de um olhar verdadeiro e uma amizade pura. Sua amizade foi essencial em toda minha caminhada, me dando forças para continuar.

Aos colegas de laboratório: Francielly Gos pela amizade e companheirismo, por me receber com carinho desde o primeiro dia e por toda sua ajuda e orientação em minhas atividades práticas. Desirrê por dividir seu conhecimento, aos demais colegas Sandrielle, Bruno, Beatriz, Renata e Alicia pela agradável convivência e ótimo relacionamento. E a todos os alunos do LabGeM, que de alguma forma alegraram meus dias com momentos de descontração.

Ao técnico Rodrigo Aluizio pela ajuda valiosa e sempre estar disposto a compartilhar seu conhecimento com todos.

À Dr^a Kelly Justin por suas orientações, amizade e companheirismo.

Aos colegas de turma de Mestrado, por compartilhar conhecimentos e pela agradável convivência nas disciplinas e conversas de corredor.

Aos professores do Departamento de Patologia, por compartilharem conosco um pouco do seu vasto conhecimento e vivência acadêmica e científica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia e à Coordenação do Curso, por permitirem minha formação e a realização deste trabalho.

Aos meus pais Leni Assis e Arnaldo Bochnie por todos os ensinamentos e educação que me deram e às minhas queridas irmãs, Grace Bochnie e Tamy Bochnie, que torcem por mim e vibram junto comigo em cada conquista.

Ao meu marido e fiel companheiro Jadiel Vinicius, o qual permaneceu sempre junto comigo em todos os momentos difíceis, sempre me motivando e me encorajando a continuar esta jornada. Por toda ajuda, compreensão, e pela sua admirável paciência, sobretudo ao apoio e contribuição para a realização deste trabalho. Saiba que esta conquista é nossa!

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

O bioma Pantanal é caracterizado pela inundação sazonal que ocorre periodicamente, gerando um ecossistema específico. Este bioma abriga espécies que tem capacidade para tolerar as mudanças drásticas que ocorrem na concentração de água, durante os períodos de seca e cheia. Entre as espécies de plantas adaptadas a estas condições está a planta medicinal *Vochysia divergens* Pohl. Esta planta é amplamente utilizada na medicina popular, pela produção de substâncias bioativas e tem se apresentado promissora para a prospecção de microrganismos endofíticos. Neste sentido, isolados obtidos da planta medicinal *V. divergens* apresentaram potencial antimicrobiano contra o fungo fitopatogênico *Phyllosticta citricarpa*, em estudo prévio. Estes isolados foram inicialmente identificados como pertencentes à família Xylariaceae, família que passou por revisão taxonômica nos últimos dois anos, e assim vários gêneros pertencentes a essa família foram recentemente realocados para a família Hypoxylaceae. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar morfológica e filogeneticamente isolados endofíticos da planta *V. divergens* presentes na coleção de cultura, anteriormente classificados como pertencendo a família Xylariaceae. E ainda, avaliar o potencial biotecnológico dos mesmos frente a microrganismos de interesse clínico e agrônomo. Com base em análise multigênica, todos os isolados anteriormente classificados como pertencendo a família Xylariaceae foram caracterizados como pertencentes a família Hypoxylaceae. O isolado CMRP686 foi identificado como *Daldinia placentiformis* e os isolados CMRP681, CMRP683, CMRP685 como *Hypoxylon griseobrunneum*. Além dessas espécies, o isolado CMRP688 foi descrito como uma nova espécie, *Hypoxylon vochysiae*, espécie irmã de *H. griseobrunneum*, ambos pertencentes ao clado HY-6, de acordo com revisão taxonômica recente da família. Os extratos produzidos a partir desses isolados apresentaram atividade antimicrobiana inibindo o crescimento de patógenos clínicos e de fungos fitopatogênicos. Resultados promissores foram obtidos com extrato produzido a partir do cultivo da linhagem *D. placentiformis* CMRP686, que inibiu o desenvolvimento da bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*, com halo de inibição de crescimento de 17 mm, e no teste de CIM as menores concentrações foram obtidas por diferentes extratos testados contra *Acinetobacter baumannii*. Já contra os fungos fitopatogênicos, o extrato com maior atividade foi produzido a partir da linhagem CMRP688 (*Hypoxylon vochysiae*), que inibiu o crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa* em 54%. Contudo, todos os isolados apresentaram atividade antimicrobiana, a qual foi dependente da linhagem e do meio de cultura utilizado para a produção dos metabólitos secundários. Desta forma, representando linhagens promissoras para futuros estudos químicos e biológicos, no intuito de otimizar e potencializar o uso de microrganismos endofíticos na indústria agrônoma e farmacêutica.

Palavras chaves: *Vochysia divergens*. Metabólitos secundários. Hypoxylaceae. Atividade antimicrobiana. Fungos endofíticos.

ABSTRACT

The Pantanal biome is characterized by seasonal flooding that occurs periodically, generating a specific ecosystem. This biome is home to species able to tolerate the drastic changes that occur in the concentration of water during periods of drought and flood. Among the species of plants adapted to these conditions is the medicinal plant *Vochysia divergens* Pohl. This plant is widely used in folk medicine for the production of bioactive substances and has been promising for the prospecting of endophytic microorganisms. In this sense, isolates of the medicinal plant *V. divergens* presented antimicrobial potential against the phytopathogenic fungus *Phyllosticta citricarpa*, in a previous study. These isolates were initially identified as belonging to the family Xylariaceae, a family that underwent taxonomic revision in the last two years and, therefore, several genera of this family were recently relocated to the family Hypoxylaceae. The present study aims to characterize morphologically and phylogenetically the endophytic isolates of the *V. divergens* present in the culture collection, previously classified as belonging to the family Xylariaceae. And another to evaluate the biotechnological potential of extracts produced by these isolates in the treatment and control of microorganisms of clinical and agronomic interest. Based on the multigenic analysis, all isolates were identified as belonging to the family Hypoxylaceae. CMRP686 isolate was identified as *Daldinia placentiformis* and isolates CMRP681, CMRP683, CMRP685 as *Hypoxylon griseobrunneum*. In addition to these species, CMRP688 isolate was described as a new species, *Hypoxylon vochysiae*, sister species of *H. griseobrunneum*, both belonging to the HY-6 clade, according to the recent taxonomic review of the family. The extracts produced from these isolates presented antimicrobial activity inhibiting the growth of clinical pathogens and phytopathogenic fungi. The best result was observed with the extract of *D. placentiformis* CMRP686, which inhibited the development of the bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* with the largest inhibition zone (17 mm), and in the CIM test the lowest concentrations were obtained by different extracts tested against *Acinetobacter baumannii*. Regarding the activity against phytopathogenic fungi, the best result was CMRP688 (*Hypoxylon vochysiae*), which inhibited the mycelial growth of *Phyllosticta citricarpa* by 54%. However, all the isolates presented antimicrobial activity, dependent on the strain and the culture medium used for the production of the secondary metabolites. In this way, it represents promising strains for future chemical and biological studies, in order to optimize and potentiate the use of endophytic microorganisms in the agronomic and pharmaceutical industries.

Keywords: *Vochysia divergens*. Secondary metabolites. Hypoxylaceae. Antimicrobial activity. Endophytic fungi.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	BIODIVERSIDADE DO PANTANAL E <i>Vochysia divergens</i> Pohl	12
2.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FILOGENÉTICA DA FAMÍLIA Hypoxylaceae	13
2.3	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS ENDÓFITOS	14
3	OBJETIVOS	16
3.1	OBJETIVO GERAL	16
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO	17
4.1.1	Identificação morfológica	17
4.1.2	Identificação molecular	17
4.1.3	Bioprospecção	22
5	RESULTADOS	26
5.1	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	26
5.1.1	Identificação macromorfológica	26
5.1.2	Identificação micromorfológica	28
5.1.3	Identificação molecular	33
5.2	BIOPROSPECÇÃO	42
5.2.1	Avaliação da atividade antifúngica contra fitopatógenos	42
5.2.2	Avaliação da atividade antimicrobiana contra patógenos clínicos	43
5.2.3	Teste de concentração inibitória mínima (CIM)	44
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Plantas podem servir como reservatório de uma gama de microrganismos, como os endófitos, que habitam diversos órgãos de seus hospedeiros (BACON; WHITE, 2000; STONE et al., 2000). Endófitos normalmente em condições ideais não causam doenças ao hospedeiro (STROBEL, 2002), podendo gerar benefícios na associação endófito-planta, como auxiliar na distribuição de nutrientes, fornecer mecanismos de proteção contra fatores bióticos e abióticos (AZEVEDO et al., 2000; CLAY et al., 2005), tolerância ao estresse e resistência a doenças e herbivoria (WHITE; TORRES, 2010).

Tem sido crescente o interesse no estudo de microrganismos endofíticos devido a capacidade de muitos destes em produzir substâncias biologicamente ativas (STAMFORD et al., 1998), muitas das quais podem estar envolvidas na relação microrganismo-hospedeiro (STROBEL, 2002). Estas substâncias bioativas são conhecidas como metabólitos secundários, e tem apresentado aplicabilidade na indústria farmacêutica, principalmente devido a ação antimicrobiana (SHARMA et al., 2016). Em função do aumento da resistência a antibióticos já existentes no mercado (HWANG; GUMS, 2016) tem se elevado a busca por novos antibióticos. Neste sentido, pesquisas de desenvolvimento de novos antimicrobianos tem levado a seleção de metabólitos secundários provenientes de microrganismos ainda pouco estudados.

Igualmente problemático é o controle de muitas doenças vegetais em pequenas e grandes plantações, acarretando em grandes prejuízos econômicos. Como exemplo, a podridão floral dos citros (PFC) causada pelo fungo *Colletotrichum abscissum* que ocasiona o apodrecimento das pétalas da flor e a não formação do fruto. Outra doença de importância para a produção de citros no Brasil é a mancha preta em citros (MPC), a qual é causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa*, e devido ausência dessa doença na Europa, a mesma é considerada uma doença quarentenária A1 (FUNDECITRUS, 2017), impondo barreiras fitossanitárias para a importação de frutos brasileiros. O controle destas fitopatologias é comumente realizado pela aplicação de fungicidas, no entanto, o uso indiscriminado desses produtos gera efeitos prejudiciais, como o aparecimento de patógenos resistentes e a presença de resíduos dos agroquímicos em frutos. Assim, são necessários métodos alternativos que poderiam ser empregados no manejo integrado,

proporcionando o controle da doença e também causando menores impactos ao ambiente e à saúde humana (AMARAL; BARA, 2005).

Neste sentido, um estudo prévio realizado pelo grupo de pesquisa Genética de Microrganismos da UFPR, visando explorar o potencial antifúngico de isolados obtidos da planta medicinal *Vochysia divergens* Pohl, evidenciou algumas linhagens que apresentaram atividade antifúngica contra o fitopatógeno *P. citricarpa*. Esses foram inicialmente identificados como pertencentes à família Xylariaceae (HOKAMA et al., 2017), e os autores sugeriram que as mesmas poderiam representar novas espécies ou gêneros dentro dessa família.

No entanto, esta família está sob revisão taxonômica, e em estudos recentes vários gêneros pertencentes à família Xylariaceae foram alocados para a família Hypoxylaceae (DARANAGAMA et al., 2018). A segregação de Hypoxylaceae é baseada em caracteres filogenéticos gerados em diversos estudos (DARANAGAMA et al., 2015; DARANAGAMA et al., 2016; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2015; STADLER et al., 2013), sendo condizente com conceitos morfológicos e quimiotaxonômicos (WENDT et al., 2018).

A caracterização de gêneros pertencentes à família Xylariaceae é complexa, pois muitas espécies foram descritas apenas com base em taxonomia morfológica de ascomas, e muitos gêneros não produzem essas estruturas em meios de cultura (BRUNNER; PETRINI, 1992; STADLER, 2011). Técnicas moleculares são comumente usadas para superar estes problemas taxonômicos, ocasionados pela limitação de caracteres morfológicos (TANG et al., 2009). A utilização de diferentes sequências gênicas auxiliam na identificação de isolados, especialmente as sequências intrônicas de genes codificadores de proteínas como *RPB2* e *TUB2* (β -*tubulina*), que tem sido mais informativas ao inferir relações filogenéticas de gêneros dentro da família (DARANAGAMA et al., 2014, 2015, 2016, 2018; HSIEH; JU; ROGERS, 2005; KUHNERT et al., 2014).

Baseado nesses dados, o presente trabalho visou a identificação e descrição dos isolados previamente obtidos por Hokama et al. (2017), por meio de análise multilocos e morfológica. Além disso, determinou o potencial metabólico, avaliando a atividade biológica de extratos frente a microrganismos de interesse clínico e agrônômico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIODIVERSIDADE DO PANTANAL E *Vochysia divergens* Pohl

O Pantanal é um bioma caracterizado pela inundação sazonal que ocorre anualmente (ALHO, 2011). Dessa forma, muitas partes deste bioma periodicamente mudam de habitats terrestres para aquáticos e vice-versa. Estas mudanças ambientais geram diferentes respostas de algumas plantas às condições do habitat, resultando na retração ou aumento de algumas populações (ARIEIRA; CUNHA, 2006). Este clima proporciona um solo rico em nutrientes e alimentos, atraindo assim, uma grande variedade de organismos e microrganismos de locais secos (WILLINK et al., 2000) e selecionando a presença dos adaptados à esta mudança (ALHO, 2008).

A biodiversidade do Pantanal constitui um precioso ecossistema, de importância reconhecida mundialmente. Entretanto, o uso insustentável vem prejudicando a biodiversidade característica deste bioma (ALHO; SILVA, 2012), o que ressalta a importância do estudo de medidas protetivas que visem a conservação do Pantanal, como estudos de bioprospecção, para associar um valor econômico à diversidade presente nessa área (NORILER et al., 2018).

Vochysia divergens Pohl (popularmente conhecida como Cambará) é uma planta medicinal que apresenta variação no crescimento e domínio em função do gradiente de inundação, ou seja, áreas inundáveis do Pantanal (SANCHES et al., 2011; SOARES; OLIVEIRA, 2009). Essa planta é comumente encontrada na América do Sul, onde suas folhas e casca são utilizadas na medicina popular, sendo que pesquisas revelam um grande potencial das mesmas para produção de substâncias bioativas (FOGO et al., 2009).

Extrato etanólico proveniente das cascas de *V. divergens* apresentou atividade bactericida contra o patógeno clínico *Staphylococcus aureus* (BORTALANZA et al., 2002; SAVI et al., 2015). Assim também, em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo, visando a bioprospecção de microrganismos endofíticos, foram isoladas linhagens que produziram compostos com atividade antioxidante, antitumoral, antibacteriana e antifúngica, a partir dos metabólitos secundários produzidos (GOS et al., 2017; HOKAMA et al., 2017; NORILER et al., 2018; SAVI et al., 2015).

2.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FILOGENÉTICA DA FAMÍLIA HYPOXYLACEAE

Desde meio século atrás, os caracteres morfológicos assexuados produzidos por fungos foram considerados objetos de classificação na família Xylariaceae e este fato resultou na colocação do gênero *Hypoxylon* Bull. junto com outros gêneros que possuíam fase assexuada do tipo nodulisporium, e os demais indivíduos da família Xylariaceae no grupo geniculosporium (GREENHALGH; CHESTERS, 1968). Em 1961, em uma tentativa de organizar esta família, foi sugerido agrupar os gêneros em subfamílias, “Hypoxyloide” e “Xylarioide” respectivamente, incluindo demais gêneros de morfologia assexuada duvidosa em “Thamnomycetideae” (DENNIS, 1961). Em 1996 um novo agrupamento foi proposto, incluindo outros caracteres morfológicos, dividindo a família em dois grandes grupos, gêneros relacionados a *Xylaria* com “anamorfos do tipo geniculosporium” versus a *Hypoxylon* com “anamorfos do tipo nodulisporium”, sem caracterizar como “subfamílias” (JU; ROGERS, 1996). Contudo, apesar de ter sido amplamente utilizado o termo “subfamílias”, tal classificação foi contestada e considerada inválida em 2008 porque a mesma não havia sido realizada de acordo com as regras de nomenclatura da botânica (BITZER et al., 2008).

Em uma definição tradicional, Xylariaceae tem sido caracterizada primariamente a partir de estruturas sexuadas, porém muitos endófitos permanecem estéreis em cultura ou reproduzem apenas estruturas assexuadas (STADLER et al., 2013), dificultando a identificação. Desta forma, a avaliação de estruturas de ramificação do conidióforo e o tipo de proliferação das células conidiogênicas (JU; ROGERS, 1996), bem como características da colônia (PETRINI; PETRINI, 1985) podem auxiliar na identificação dos mesmos. Entretanto caracteres mais robustos, como a filogenia, que utiliza caracteres genéticos compartilhados entre as espécies, sobretudo de uma mesma família, por meio de sequências de DNA (TANG et al., 2009) tem se mostrado uma ferramenta efetiva.

Para gêneros da família Xylariaceae a maioria das sequências disponíveis são do gene que codifica para a subunidade maior do ribossomo (28S ou LSU), nas regiões ITS (gene de rDNA ITS1, 5.8s e ITS2) e parciais (sequências de introns) dos genes que codificam a segunda subunidade maior da RNA polimerase II (*RPB2*) e β -

tubulina (*TUB2*) (DARANAGAMA et al., 2018). A utilização de diferentes sequências, através de análise multilocus, pode fornecer informações mais robustas e diferenciar microrganismos até mesmo muito semelhantes morfológicamente (WENDT et al., 2018).

Baseado em estudos recentes de análise filogenética utilizando sequências multilocus, vários gêneros pertencentes à família Xylariaceae foram alocados para outras famílias (DARANAGAMA et al., 2018) e os isolados anteriormente caracterizados como subfamília “Hypoxyloide” foram inseridos na família Hypoxylaceae. A segregação de Hypoxylaceae é baseada em caracteres filogenéticos gerados em diversos estudos (STADLER et al., 2013; MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2015; DARANAGAMA et al., 2015, 2016;), sendo condizente com conceitos morfológicos e quimiotaxonômicos previamente estabelecidos (WENDT et al., 2018).

A família Hypoxylaceae é classificada como pertencente ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, subclasse Xylariomycetidae, ordem Xylariales (WENDT et al., 2018), e compreende atualmente 14 gêneros reconhecidos pelo mycobank (www.mycobank.org). Neste sentido, trabalhos abrangentes de filogenia multigênica para a família Xylariaceae, juntamente com Hypoxylaceae, tem aumentado constantemente na última década, gerando uma matriz de dados concisa, para uma genealogia multigênica (DARANAGAMA et al., 2018; WENDT et al., 2018).

2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS ENDÓFITOS

Os microrganismos endofíticos residem principalmente na parte interna, mais precisamente, nos tecidos sob as camadas de células epidérmicas da planta (BACON; WHITE, 2000; STONE et al., 2000), e inclui fungos e bactérias, que podem estabelecer relações complexas com seus hospedeiros (WU et al., 2016). Contudo, a relação endófito-hospedeiro envolve interações contínuas, proporcionando a troca de substâncias, conhecidas como metabólitos secundários, que podem gerar respostas biológicas específicas, associadas a proteção da planta hospedeira (OLDFIELD; LIN, 2012).

Metabólitos secundários são moléculas orgânicas, que podem apresentar diferentes atividades biológicas, até mesmo proporcionando vantagem seletiva em alguns ambientes (EKANAYAKE et al., 2017). Alguns metabólitos podem regular o crescimento de plantas, ou atuar frente a bactérias e fungos fitopatogênicos, ou até mesmo apresentar propriedades farmacêuticas (EKANAYAKE et al., 2017). Com isso, muitos endófitos têm despertado interesse pela produção de substâncias bioativas para utilização na formulação de novas drogas (BEZERRA et al., 2015; JALGAONWALA; MOHITE; MAHAJAN, 2010; RADIC; STRUKELJ, 2012). E assim, metabólitos originados de endófitos podem auxiliar na problemática envolvida na resistência de microrganismos às drogas já existentes no mercado, causada pelo uso indiscriminado de medicamentos, ou uso incorreto dos mesmos (SÁNCHEZ, 2006; HWANG; GUMS, 2016).

Na agricultura a necessidade de alternativas para o controle de pragas e fitopatógenos que causam doenças e prejuízos na produção (PIMENTEL et al., 2006), leva a buscar métodos alternativos para controle que causem menor dano ao ambiente e à saúde humana (AMARAL; BARA, 2005). Devido a ampla gama de compostos produzidos por endófitos, estes despertam interesse crescente em pesquisadores, para a bioprospecção de comunidades endofíticas que habitam em plantas de vários ecossistemas (GOLINSKA et al., 2015), para a seleção de linhagens promissoras para o controle biológico de fitopatologias, ou até mesmo a descoberta de novos agroquímicos.

A grande utilidade no controle biológico, de muitos metabólicos secundários de endofíticos, já tem sido relatada em trabalhos anteriores (VIZCAINO et al., 2005; WIDMER, 2014; BAE et al., 2016). Hokama et al. (2017) demonstraram a atividade antimicrobiana de extratos produzidos a partir de isolados pertencentes a família Xylariaceae contra o fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*, demonstrando alto potencial dos mesmos para estudos detalhados quanto a produção de compostos de interesse.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar morfológicamente e filogeneticamente isolados endofíticos previamente reportados como pertencentes a família Xylariaceae, bem como avaliar o potencial antimicrobiano de extratos produzidos por esses isolados frente a microrganismos de interesse clínico e agrônômico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificação baseada em macro e micromorfologia e análise filogenética multigênica utilizando sequências das regiões *ITS* (gene de rRNA ITS1, 5.8S e ITS2), e parciais dos genes *LSU*, *RPB2* e *TUB2*, de cinco fungos endofíticos isolados da planta *Vochysia divergens*, com a descrição de possíveis novas espécies.
- Explorar os metabólitos secundários avaliando a atividade inibitória destes contra patógenos clínicos e fitopatógenos de citros, afim de obter compostos de importância clínica / agrônômica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

As linhagens selecionadas foram isoladas como endófitos de folhas da planta medicinal *V. divergens*, coletadas na Fazenda de Santa Emília, no Pantanal do Rio Negro, por Hokama et al. (2017). Os cinco isolados estão depositados no acervo das Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense (CMRP) da Universidade Federal do Paraná, identificados com os códigos: CMRP681, CMRP683, CMRP685, CMRP686 e CMRP688.

4.1.1 Identificação morfológica

Para a análise da macromorfologia os isolados foram repicados em placas de Petri, contendo meio Aveia, meio comumente utilizado na caracterização de fungos da Xylariaceae e Hypoxilaceae, e incubados a 23 - 25°C por aproximadamente 30 dias ou até a formação de estruturas assexuadas (conidióforos, células conidiogênicas e conídios) (DARANAGAMA et al., 2015). A análise das características macroscópicas avaliadas foram cor do micélio, taxa de crescimento e produção de pigmentos (STADLER et al., 2014).

A análise microscópica foi realizada pela observação de estruturas conidiogênicas em microscópio óptico com aumento de 400 a 1000x, e comparadas com dados da literatura que auxiliaram na classificação taxonômica (JU; ROGERS, 1996).

4.1.2 Identificação molecular

4.1.2.1 Extração do DNA

O DNA foi extraído de micélio cultivado por um período de 2 a 3 dias a 23 - 25°C, em meio BDA (HOKAMA et al, 2012), de acordo com o protocolo de Raeder e Broda (1985) modificado por Glienke (1999).

4.1.2.2 Análise filogenética

Para a análise filogenética foram utilizadas sequências das regiões ITS (ITS1, 5.8S e ITS2), e parciais dos genes 28S (LSU – subunidade maior) do rDNA, *RPB2* e *β -tubulina* (TANG et al., 2009), que foram amplificadas e sequenciadas, respectivamente, utilizando os primers ITS4 (WHITE et al., 1990) e V9G (HOOG, DE et al., 1998), LR0R e LR5 (VILGALYS; HESTER, 1990), RPB2-5F e RPB2-7R (LIU; WHELEN; HALL, 1999) e T1 e T22 (O'DONNELL; CIGELNIK, 1997), de acordo com Daranagama et al. (2015). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, corado em GelRed™, com marcador de peso molecular de 100 pb Ladder (Kasvi), e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta (UV).

A purificação dos produtos de amplificação foi realizada com as enzimas Exo1 e FastAP (ThermoFisher Scientific, USA). O sequenciamento foi realizado utilizando o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados utilizando Sephadex G-50 (GE Healthcare) em Multiscreen Column Loader (Millipore). A leitura das sequências foi feita em sequenciador ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As sequências consenso foram obtidas utilizando o software MEGA versão 7 (KUMAR et al., 2016), as quais foram comparadas com outras disponíveis no NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL, 2005). Em seguida, foi realizado um alinhamento utilizando o programa MAFFT v7.017 (<http://mafft.cbrc.jp/alinhamento/servidor/>) e ajustado manualmente, quando necessário. As sequências das linhagens de referência (Tabela 1) foram obtidas nos bancos de dados MycoBank (<http://www.mycobank.org>) e GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Árvores filogenéticas de inferência bayesiana foram geradas através do software MrBayes v. 3.2.6 (RONQUIST et al., 2012), utilizando o número de permutações necessárias até atingir o número de desvios iguais ou inferiores a 0.01, descartando os primeiros 25% de árvores geradas e incorporando o modelo evolutivo indicado após teste no software MEGA7 (KUMAR et al., 2016). Foram utilizadas quatro cadeias Markov Chain Monte Carlo (MCMC), e a edição de cada árvore foi realizada com o auxílio do software FigTree v. 1.4.

TABELA 1 - CÓDIGOS E REFERÊNCIAS DAS SEQUÊNCIAS UTILIZADAS NO PRESENTE ESTUDO.

Familia	Espécies	Códigos	ITS	LSU	RPB2	β-tubulina	Referências
Diatrypaceae	<i>Diatrype disciformis</i>	CBS 197.49	-	DQ470964			Spatafora et al. (2006)
Graphostomataceae	<i>Biscogniauxia nummularia</i>	MUCL 51395	KY610382	KY610427	KY624236	KX271241	Wendt et al. (2017)
Hypoxyloaceae	<i>Alloanthostomella rubicola</i>	MFLUCC160479	KX533455	KX533456	KX789493	KX789494	Daranagama et al.(2016e)
	<i>Annulohypoxyton annulatum</i>	CBS 140775	KY610418	KY610418	KY624263	KC977276	Kuhnert et al. (2014) TUB2, Wendt et al.(2017)
	<i>Annulohypoxyton atroroseum</i>	ATCC76081	AJ390397	KY610422	KY624233	DQ840083	Kuhnert et al. (2014), Wendt et al.(2017)
	<i>Annulohypoxyton michelianum</i>	CBS 119993	KX376320	KY610423	KY624234	KX271239	Kuhnert et al. (2016), Wendt et al. (2017)
	<i>Annulohypoxyton moriforme</i>	CBS 123579	KX376321	KY610425	KY624289	KX271261	Kuhnert et al. (2016), Wendt et al. (2017)
	<i>Annulohypoxyton nitens</i>	CBS 120705	KJ934991	KJ934992	KJ934994	KU684123	Daranagama et al. (2015a), TUB2(U'Ren,J.M. 2016)
	<i>Annulohypoxyton stygium</i>	MUCL 54601	KY610409	KY610475	KY624292	KX271263	Wendt et al. (2017)
	<i>Annulohypoxyton truncatum</i>	CBS 140778	KY610419	KY610419	KY624277	KX376352	Kuhnert et al. (2016), Wendt et al. (2017)
	<i>Anthocanalis sparti</i>	MFLUCC140557	KP297395	KP340537	KP340523	KP406606	Daranagama et al. (2015a)
	<i>Daldinia andina</i>	CBS 114736	AM749918	KY610430	KY624239	KC977259	Bitzer et al. (2008), Kuhnert et al. (2014)
	<i>Daldinia bambusicola</i>	CBS122872	KY610385	KY610431	KY624241	AY951688	Hsieh et al. (2005), Wendt et al. (2017)
	<i>Daldinia caldariorum</i>	CBS122874	JX658452	KY610433	KY624242	KC977282	Ju et al. (1997), Stadler,M., et al. (2013)
	<i>Daldinia caldariorum</i>	CBS113045	JX658453	-	-	-	Stadler,M., et al. (2013)
	<i>Daldinia caldariorum</i>	MUCL49211	AM749934	-	-	KC977282	Bitzer et al. (2008), Kuhnert et al. (2014) tub2
	<i>Daldinia concentrica</i>	CBS 113277	AY616683	KY610434	KY624243	KC977274	Triebel et al. (2005), Wendt et al. (2017)
	<i>Daldinia dennisii</i>	CBS 122879	JX658441	KY610435	KY624244	KC977262	Stadler et al. (2014a)
	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	MUCL45435	JX658484	KY610437	KY624246	KC977266	Stadler,M., et al. (2013)
	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	KC1690	JX658456	-	-	-	Bitzer et al. (2008)
	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	FL1408	JQ761025	JQ761025	KU684261	KU684179	U'Ren et al. (2016)
	<i>Daldinia placentiformis</i>	CMRP686 (LGMF 1131)	JX559552	MK535100*	MK577654*	MK577659*	Hokama et al. (2017)
	<i>Daldinia loculatoides</i>	CBS 113279	AF176982	KY610438	KY624247	KX271246	Johannesson et al. (2000), Wendt et al. (2017)
	<i>Daldinia macaronesica</i>	CBS 113040	KY610398	KY610477	KY624294	KX271266	Wendt et al. (2017)
	<i>Daldinia petriniae</i>	MUCL 49214	AM749937	KY610439	KY624248	KC977261	Bitzer et al. (2008)
	<i>Daldinia placentiformis</i>	MUCL47603	AM749921	KY610440	KY624249	KC977278	Bitzer et al. (2008)
	<i>Daldinia pyrenaica</i>	MUCL 53969	KY610413	KY610413	KY624274	KY624312	Wendt et al. (2017)
	<i>Daldinia sacchari</i>	CAL 1654	MG954373	-	-	-	Narmani, A., et al (2018)
	<i>Daldinia steglichii</i>	MUCL 43512	KY610399	KY610479	KY624250	KX271269	Wendt et al. (2017)
	<i>Daldinia theissenii</i>	CBS 113044	KY610388	KY610441	KY624251	KX271247	Wendt et al. (2017)
<i>Daldinia vernicosa</i>	CBS 119316	KY610395	KY610442	KY624252	KC977260	Kuhnert et al. (2014a)	
<i>Entonaema liquescens</i>	ATCC 46302	KY610389	KY610443	KY624253	KX271248	Wendt et al. (2017)	
<i>Hypoxyton begae</i>	BCRC 34051	JN660820	-	-	AY951704	Hsieh et al. (2005)	
<i>Hypoxyton carneum</i>	MUCL 54177	KY610400	KY610480	KY624297	AY951706	TUB2 (Hsieh,H.M. 2005) , Wendt et al. (2017)	

<i>Hypoxyylon cercidicola</i>	CBS 119009	KC968908	KY610444	KY624254	KC977263	Kuhnert et al. (2014)
<i>Hypoxyylon crocopeplum</i>	CBS 119004	KC968907	KY610445	KY624255	KC977268	Kuhnert et al. (2014), Wendt et al. (2017)
<i>Hypoxyylon fendleri</i>	MUCL 54792	KF234421	KY610481	KY624298	KF300547	Kuhnert et al. (2014)
<i>Hypoxyylon fragiforme</i>	MUCL 51264	KM186294	KM186295	KM186296	KX271282	Stadler et al. (2013), Daranagama et al. (2015a)
<i>Hypoxyylon fuscum</i>	CBS 113049	KY610401	KY610482	KY624299	KX271271	Wendt et al. (2017)
<i>Hypoxyylon griseobrunneum</i>	CMRP681 (LGMF 1120)	JX559542	MK535097*	MK577651*	MK577656*	Hokama et al. (2017)
<i>Hypoxyylon griseobrunneum</i>	CMRP683 (LGMF 1123)	JX559544	MK535098*	MK577652*	MK577657*	Hokama et al. (2017)
<i>Hypoxyylon griseobrunneum</i>	CMRP685 (LGMF 1126)	JX559547	MK535099*	MK577653*	MK577658*	Hokama et al. (2017)
<i>Hypoxyylon griseobrunneum 1</i>	MUCL 53754	KC968909	–	–	KC977289	Kuhnert et al. (2014)
<i>Hypoxyylon griseobrunneum 2</i>	CBS129346	KC968928	–	–	KC977281	Kuhnert et al. (2014)
<i>Hypoxyylon griseobrunneum 3</i>	BCRC 34050	JN660819	–	–	AY951703	Hsieh et al. (2005), como <i>Hypoxyylon anthochroum</i>
<i>Hypoxyylon griseobrunneum 4</i>	CBS 117742	KC968917	–	–	KC977271	Kuhnert et al. (2014)
<i>Hypoxyylon griseobrunneum T</i>	CBS 33173	KY610402	KY610483	KY624300	KC977303	Kuhnert et al. (2014) TUB2, Wendt et al. (2017)
<i>Hypoxyylon haematostroma</i>	MUCL 53301	KC968911	KY610484	KY624301	KC977291	Kuhnert et al. (2014) ITS, TUB2, Wendt et al. (2017)
<i>Hypoxyylon howeanum</i>	MUCL 47599	AM749928	KY610448	KY624258	KC977277	Bitzer et al. (2008)
<i>Hypoxyylon hypomiltum</i>	MUCL 51845	KY610403	KY610449	KY624302	KX271249	Hsieh et al. (2005)
<i>Hypoxyylon investiens</i>	CBS 118183	KC968925	KY610450	KY624259	KC977270	Kuhnert et al. (2014), Wendt et al. (2017)
<i>Hypoxyylon investiens</i>	CBS 129034	KC477239	–	–	KC977293	Kuhnert et al. (2014)
<i>Hypoxyylon investiens</i>	CBS 118185	KC968924	–	–	KC977269	Kuhnert et al. (2014)
<i>Hypoxyylon lateripigmentum</i>	CBS 129031	KC968933	KY610486	KY624304	KC977290	Kuhnert et al. (2014), Wendt et al. (2017)
<i>Hypoxyylon lenormandii</i>	CBS 119003	KC968943	KY610452	KY624261	KC977273	Kuhnert et al. (2014), Wendt et al. (2017)
<i>Hypoxyylon monticulosum</i>	MUCL 54604	KY610404	KY610487	KY624305	KX271273	Wendt et al. (2017)
<i>Hypoxyylon musceum</i>	MUCL 53765	KC968926	KY610488	KY624306	KC977280	Kuhnert et al. (2014), Wendt et al. (2017)
<i>Hypoxyylon ochraceum</i>	MUCL 54625	KC968937	–	KY624271	KC977300	Kuhnert et al. (2014), Wendt et al. (2017)
<i>Hypoxyylon papillatum</i>	ATCC 58729	KC968919	KY610454	KY624223	KC977258	Kuhnert et al. (2014)
<i>Hypoxyylon perforatum</i>	CBS 115281	KY610391	KY610455	KY624224	KX271250	Wendt et al. (2017)
<i>Hypoxyylon petriniae</i>	CBS 114746	KY610405	KY610491	KY624279	KX271274	Kuhnert et al. (2016), Wendt et al. (2017)
<i>Hypoxyylon pilgerianum</i>	STMA 13455	KY610412	KY610412	KY624308	KY624315	Wendt et al. (2017)
<i>Hypoxyylon porphyreum</i>	CBS 119022	KC968921	KY610456	KY624225	KC977264	Kuhnert et al. (2014)
<i>Hypoxyylon pulicidum</i>	CBS 122622	JX183075	KY610492	KY624280	JX183072	Bills et al. (2012), Wendt et al. (2017)
<i>Hypoxyylon rickii</i>	MUCL 53309	KC968932	KY610416	KY624281	KC977288	Kuhnert et al. (2014)
<i>Hypoxyylon rubiginosum</i>	MUCL 52887	KC477232	KY610469	KY624266	KY624311	Stadler et al. (2013), Wendt et al. (2017)
<i>Hypoxyylon samuelsii</i>	MUCL 51843	KC968916	KY689241	KY624269	KC977286	Kuhnert et al. (2014), Wendt et al. (2017)
<i>Hypoxyylon submonticulosum</i>	CBS 115280	KC968923	KY610457	KY624226	KC977267	Kuhnert et al. (2014), Wendt et al. (2017)
<i>Hypoxyylon ticinense</i>	CBS 115271	JQ009317	KY610471	KY624272	AY951757	Hsieh et al. (2005), Wendt et al. (2017)
<i>Hypoxyylon trugodes 1</i>	MUCL 54794	KF234422	KY610493	KY624282	KF300548	Kuhnert et al. (2014), Wendt et al. (2017)
<i>Hypoxyylon trugodes 2</i>	BCRC 34098	JQ009318	–	–	AY951758	Hsieh et al. (2005)

	<i>Hypoxylon trugodes</i> 3	MUCL 49881	JX658532	–	–	KC977284	Stadler et al. (2014), Kuhnert et al. (2014)_TUB2
	<i>Hypoxylon vinosopulvinatum</i>	BCRC 34101	JQ009321	–	–	AY951761	Hsieh et al. (2005)
	<i>Hypoxylon vochysiae</i>	CMRP688 (LGMF 1134)	JX559555	MK535101*	MK577655*	MK599136*	Hokama et al. (2017)
	<i>Hypoxylon vogesiacum</i>	CBS 115273	KC968920	KY610417	KY624283	KX271275	Kuhnert et al. (2014), Wendt et al. (2017)
	<i>Jackrogersella cohaerens</i>	CBS 119126	KY610396	KY610497	KY624270	KY624314	Wendt et al. (2017)
	<i>Jackrogersella minutella</i>	CBS 119015	KY610381	KY610424	KY624235	KX271240	Kuhnert et al. (2016), Wendt et al. (2017)
	<i>Jackrogersella multififormis</i>	CBS 119016	KC477234	KY610473	KY624290	KX271262	Kuhnert et al. (2014), Wendt et al. (2017)
	<i>Neoanthostomella pseudostromatica</i>	MFLUCC11610	KU940158	KU863146	–	–	Dai et al. (2016)
	<i>Pseudoanthostomella pini-nigrae</i>	MFLUCC 160478	KX533453	KX533454	KX789492	–	Daranagama et al. (2016e)
	<i>Pyrenopolyporus hunteri</i>	MUCL 52673	KY610421	KY610472	KY624309	KU159530	Kuhnert et al. (2016), Wendt et al. (2017)
	<i>Pyrenopolyporus laminosus</i>	MUCL 53305	KC968934	KY610485	KY624303	KC977292	Kuhnert et al. (2014), Wendt et al. (2017)
	<i>Pyrenopolyporus nicaraguensis</i>	CBS117739	AM749922	KY610489	KY624307	KC977272	Bitzer et al (2008) /Kuhnert et al. (2014), Wendt et al. (2017)
	<i>Rhopalostroma angolense</i>	CBS 126414	FN821965	KM186298	KM186297	KX271277	Stadler et al., (2010b) e Daranagama et al. (2015) e TUB2. Wendt et al. (2017)
	<i>Rhopalostroma lekae</i>	MFLUCC 130123	KJ472428	KJ472427	KJ472429	–	Daranagama et al. (2014)
	<i>Rostrohypoxylon terebratum</i>	CBS 119137	DQ631943	DQ840069	DQ631954	DQ840097	Fournier et al. (2010)
	<i>Ruwenzoria pseudoannulata</i>	MUCL 51394	KY610406	KY610494	KY624286	KX271278	Wendt et al. (2017)
	<i>Thamnomycetes camerunensis</i>	CBS 123578	–	KY610467	–	–	Stadler et al. (2010b)
	<i>Thamnomycetes dendroidea</i>	MUCL 51396	FN428831	KY610467	KY624232	KY624313	Stadler et al., (2010b)
Xylariaceae	<i>Anthostomella obesa</i>	MFLUCC 140171	–	KP340546	–	–	Daranagama et al. (2015a)
	<i>Anthostomelloides krabiensis</i>	MFLUCC 15-0678	–	KX305928	–	–	Tibpromma et al. (2016)
	<i>Astrocystis concavispora</i>	MFLUCC 14.0174	–	KP340545	–	–	Daranagama et al. (2015a)
	<i>Brunneiperidium gracilentum</i>	MFLUCC 14–0011	–	KP340542	–	–	Daranagama et al. (2015a)
	<i>Collodiscula japonica</i>	CBS 124266	–	JF440974	–	–	Jakiitsch and Voglmayr (2012), Wendt et al. (2017)
	<i>Kretzschmaria deusta</i>	CBS 163.93	–	KY610458	–	–	Stadler et al. (2013)
	<i>Lunatiannulus irregularis</i>	MFLUCC 14–0014	–	KP340540	–	–	Daranagama et al. (2015a)
	<i>Nemania maritima</i>	DSM104968	–	KY610414	–	–	Wendt et al. (2017)
	<i>Poronia punctata</i>	CBS 65678	–	KY610496	–	–	Wendt et al. (2018)
	<i>Rosellinia aquila</i>	MUCL 51703	–	KY610460	–	–	Wendt et al. (2017)
	<i>Sarcoxydon compunctum</i>	CBS 359.61	–	KY610462	–	–	Senanayake et al. (2015)
	<i>Xylaria hypoxylon</i>	CBS122620	–	KM186301	–	–	Stadler et al. (2014b)/ Daranagama et al. (2015)

NOTA: seqüências marcadas (*) foram obtidas no presente estudo. Seqüência em negrito é de linhagem tipo.

4.1.3 Bioprospecção

4.1.3.1 Produção de extratos

Para a fermentação foram transferidos três discos miceliais (8mm), provenientes de cultivo prévio em meio BDA a 24°C, para frascos de erlenmeyers (500mL) contendo 250mL de cada caldo: BD (batata dextrose), czapek, ME (extrato de malte) e M1D (Extrato de Soja, Sacarose, Tartarato de Amônio, Extrato de Levedura, Ca(NO₃)₂, KNO₃, KCl, MgSO₄, NaH₂PO₄, H₃BO₃, MnSO₄, ZnSO₄, KI, dH₂O). Os frascos foram mantidos sob agitação (180 rpm), em temperatura de 24°C, por 21 dias. Após a fermentação, o micélio foi filtrado utilizando filtro de papel Whatman n°4, e os metabólitos presentes na fração líquida foram extraídos com acetato de etila (3 x v). O solvente foi separado do extrato por rotaevaporação à 45°C, e os metabólitos diluídos em metanol à concentração de 10 mg/mL.

4.1.3.2 Avaliação da atividade antifúngica contra fitopatógenos

A atividade dos extratos foi avaliada contra os fungos fitopatogênicos de citros *Colletotrichum abscissum* (CA142) e *Phyllosticta citricarpa* (LGMF06). Utilizando uma alça de drigalski, foi espalhado 100 µL de extrato sobre a placa de Petri contendo meio BDA, em seguida foi depositado no centro da placa um disco de colônia (8mm) do fitopatógeno. As placas foram incubadas em BOD à 28°C por 8 dias para *C. abscissum* e 21 dias para *P. citricarpa*, respectivamente. Foram utilizados 2 controles: 1) positivo, contendo fungicida (Derosal®), 2) controle negativo, com o solvente usado na diluição do extrato (Metanol). A atividade antifúngica foi determinada pela comparação do diâmetro de crescimento micelial do fitopatógeno com o extrato de cada isolado, com os controles positivo e negativo, subtraindo o diâmetro do disco inicial (HOKAMA et al., 2017; SAVI et al., 2015). O teste foi realizado em triplicata, e analisado estatisticamente pelo teste *t*. A porcentagem de inibição foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$PI = \frac{Cd - Pd}{Cd} \times 100$$

Sendo, PI = Porcentagem de inibição; Cd = diâmetro de crescimento micelial do controle negativo; Pd = diâmetro de crescimento micelial do tratamento;

4.1.3.3 Avaliação da atividade antimicrobiana contra patógenos clínicos

A atividade antimicrobiana foi avaliada contra os patógenos *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* sensível à Meticilina (SASM) (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (SARM), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Enterobacter cloacae* produtor da enzima VIM (Verona integron-encoded metallo-lactamase) (BACHC-VIM), *Stenotrophomonas maltophilia* (BACHC-SMA), *Enterococcus faecalis* vancomicina resistente (BACHC-EFV), *Klebsiella pneumoniae* produtora da enzima (KPC) (BACHC- KPC), *Acinetobacter baumannii* (BACHC- ABA) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Todas as linhagens foram obtidas do Laboratório de Bacteriologia do Hospital das Clínicas da UFPR, em específico as linhagens com o código BACHC provêm do Banco de Cepas utilizadas no controle de qualidade de meios e testes fenotípicos e moleculares.

A avaliação foi realizada por meio do teste de difusão em disco, segundo protocolo estabelecido pelo CLSI (CLSI, 2015). Partindo da inoculação do patógeno em uma placa de LA (Triptona 10g, extrato de levedura 5g, NaCl 10g e 15g de ágar em 1L de água destilada) e posterior incubação a 37°C, por 24 horas. A concentração do inóculo foi padronizada utilizando a escala MacFarland de 0,5, em seguida foi espalhado em placa contendo ágar Mueller – Hinton com swab de algodão. Discos contendo 10 µL de cada extrato foram posicionados sobre as placas, as quais foram incubadas a 37°C por 24 horas (CLSI, 2015).

Para validação do teste, foram realizados controles positivo e negativo, o controle positivo continha o disco com antibiótico específico (Tabela 2), ao qual o microrganismo seja sensível, e o controle negativo continha apenas disco com o solvente do extrato, o metanol. A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pela comparação do diâmetro dos halos do tratamento em relação aos controles positivos e negativos (SAVI et al., 2014).

TABELA 2 – PATÓGENOS CLÍNICOS UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA, ANTIBIÓTICOS E CONCENTRAÇÕES UTILIZADOS COMO CONTROLE POSITIVO, ESPECÍFICO PARA CADA PATÓGENO CLÍNICO.

Patógeno Clínico	Antibiótico	Concentração (µg/disco)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Meropenem	10
<i>Staphylococcus aureus</i> (SASM)	Oxacilina	1
<i>Staphylococcus aureus</i> (SARM)	Oxacilina	1
<i>Enterococcus faecalis</i> Vanco R	Ampicilina	10
<i>Enterobacter cloacae</i> VIM	Meropenem	10
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Meropenem	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC	Meropenem	10
<i>Escherichia coli</i>	Ampicilina	10
<i>Candida albicans</i>	Anfotericina B	5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Vancomicina	10

4.1.3.4 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os extratos dos isolados que apresentaram melhores resultados nos testes de inibição, foram selecionados para o teste de concentração inibitória mínima (CIM). O teste foi realizado contra os fitopatógenos e patógenos clínicos, utilizando microplaca de 96 poços, nos quais foram distribuídos 100 µL de meio ME em cada poço para o teste contra os fitopatógenos, e meio LB para o teste contra patógenos clínicos. Em seguida, foi adicionado à segunda coluna, 50 µL do extrato. Desta forma, uma diluição seriada foi realizada retirando 50 µL da solução e adicionando à coluna seguinte, e assim por diante, até a penúltima coluna. Do primeiro poço até o penúltimo foi inoculado 10 µL de solução de esporos do fitopatógeno, diluídos em salina na concentração de 10^4 conídios/mL, quantificado em câmara de contagem de Neubauer, ou 1 µL do patógeno clínico diluído em solução salina (0,85%) padronizado em 0,5 MacFarland. Para validação do teste, foram realizados controles positivo e negativo, sendo a primeira coluna destinada ao controle positivo, contendo apenas o meio de cultura, e na última coluna o controle negativo contendo o meio com o inóculo. Por fim, a placa foi incubada a 28°C por 3 dias (fitopatógenos), e 36°C por 24h (patógenos clínicos), em shaker a 180rpm. A CIM dos extratos foi definida como a menor concentração em que não foi observado nenhum crescimento micelial ou turbidez no poço, visível a olho nu (TONIAL et al., 2016). A atividade dos extratos será classificada conforme a menor concentração que apresentou ação, sendo considerado: menor que 0,1mg/mL (alta), entre 0,1 a 0,5 mg/mL (moderada) e acima disso (baixa).

4.1.3.5 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o método de análise da variância (ANOVA), através da comparação dos valores da atividade de inibição dos extratos produzidos em diferentes meios de cultura em relação aos controles, para cada patógeno testado. Foi realizado posteriormente o teste de *Post-hoc* usando o Tukey's para determinação da diferença significativa entre os dados analisados, sendo considerados significativos os valores menores ou igual a 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

5.1.1 Identificação macromorfológica

5.1.1.1 Característica macromorfológica do isolado CMRP681

Colônia de crescimento intermediário, com temperatura ótima de crescimento a 24°C, cobrindo a placa de Petri (90 mm) em 2,5 semanas. Colônia inicialmente branca, algodonosa com margens difusas, tornando-se aveludada após aproximadamente 4 semanas. Ao redor do local de repique forma-se uma região rala em micélio, podendo apresentar setorização pela formação de regiões mais volumosas em micélio, que ao amadurecer torna-se branco amarelado, podendo apresentar coloração amarela em regiões de esporulação.

5.1.1.2 Característica macromorfológica do isolado CMRP683

Colônia de crescimento intermediário, com temperatura ótima de crescimento a 24°C, cobrindo a placa de Petri (90 mm) em 2,5 semanas. Colônia inicialmente branca, algodonosa com margens difusas, tornando-se aveludada após aproximadamente 4 semanas. Ao redor do local de repique forma-se uma região rala em micélio, podendo apresentar setorização pela formação de regiões mais volumosas em micélio. Micélio torna-se branco amarelado, podendo formar uma região circular de coloração amarela de super esporulação, na região próxima do centro.

5.1.1.3 Característica macromorfológica do isolado CMRP685

Colônia de crescimento intermediário, com temperatura ótima de crescimento a 24°C, cobrindo a placa de Petri (90 mm) em 2,5 semanas. Colônia inicialmente branca, algodonosa com margens difusas, tornando-se aveludada após aproximadamente 4 semanas. Ao redor do local de repique forma-se uma região rala em micélio, podendo apresentar regiões mais volumosas em micélio. A coloração

torna-se amarelada, alterando sua coloração para marrom quando em super esporulação, após 4 semanas aproximadamente.

5.1.1.4 Característica macromorfológica do isolado CMRP686

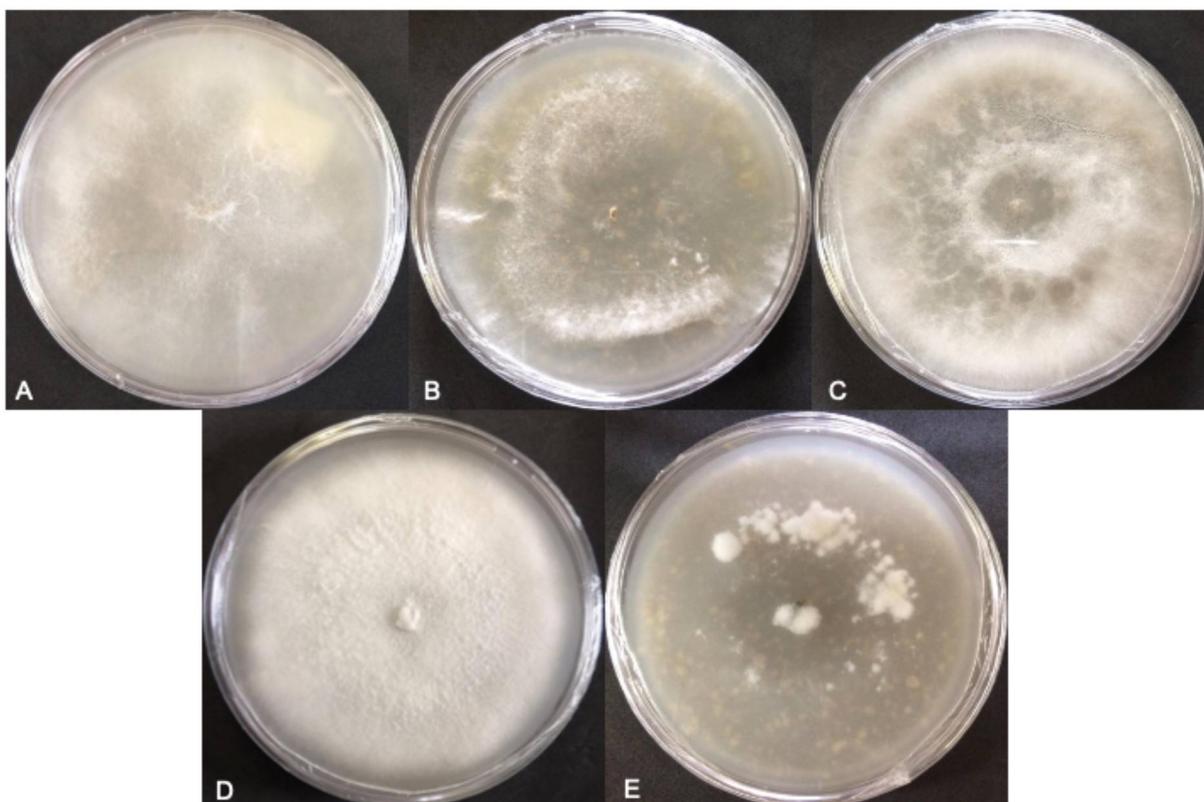
Colônia de crescimento intermediário, com temperatura ótima de crescimento a 24°C, cobrindo a placa de Petri (90 mm) em 2,5 semanas. Inicialmente algodonosa, rala de coloração branca, podendo apresentar grumos distribuídos pela superfície. Após 7 dias, micélio pode se tornar raso de superfície úmida, de coloração olivácea.

5.1.1.5 Característica macromorfológica do isolado CMRP688

Colônia de crescimento intermediário, com temperatura ótima de crescimento a 24°C, apresentando o micélio mais denso entre os demais isolados, porém, seu crescimento foi um pouco mais lento, cobrindo a placa de Petri (90 mm) de 2,5 a 3 semanas. Micélio de aspecto pulveriforme, com coloração branca, que se mantém mesmo em micélio maduro, ou quando em esporulação distribuída pela superfície.

O padrão de crescimento entre os isolados variou entre 2 a 3 dias, com exceção o isolado CMRP688 que apresentou variação de até 5 dias, comparado aos demais (Figura 1).

FIGURA 1 - MACROMORFOLOGIA DOS ISOLADOS CMRP681 (A), CMRP683 (B), CMRP685 (C), CMRP688 (D) E CMRP686 (E) CULTIVADOS EM MEIO AVEIA À 24 °C, 14 DIAS APÓS INOCULAÇÃO.

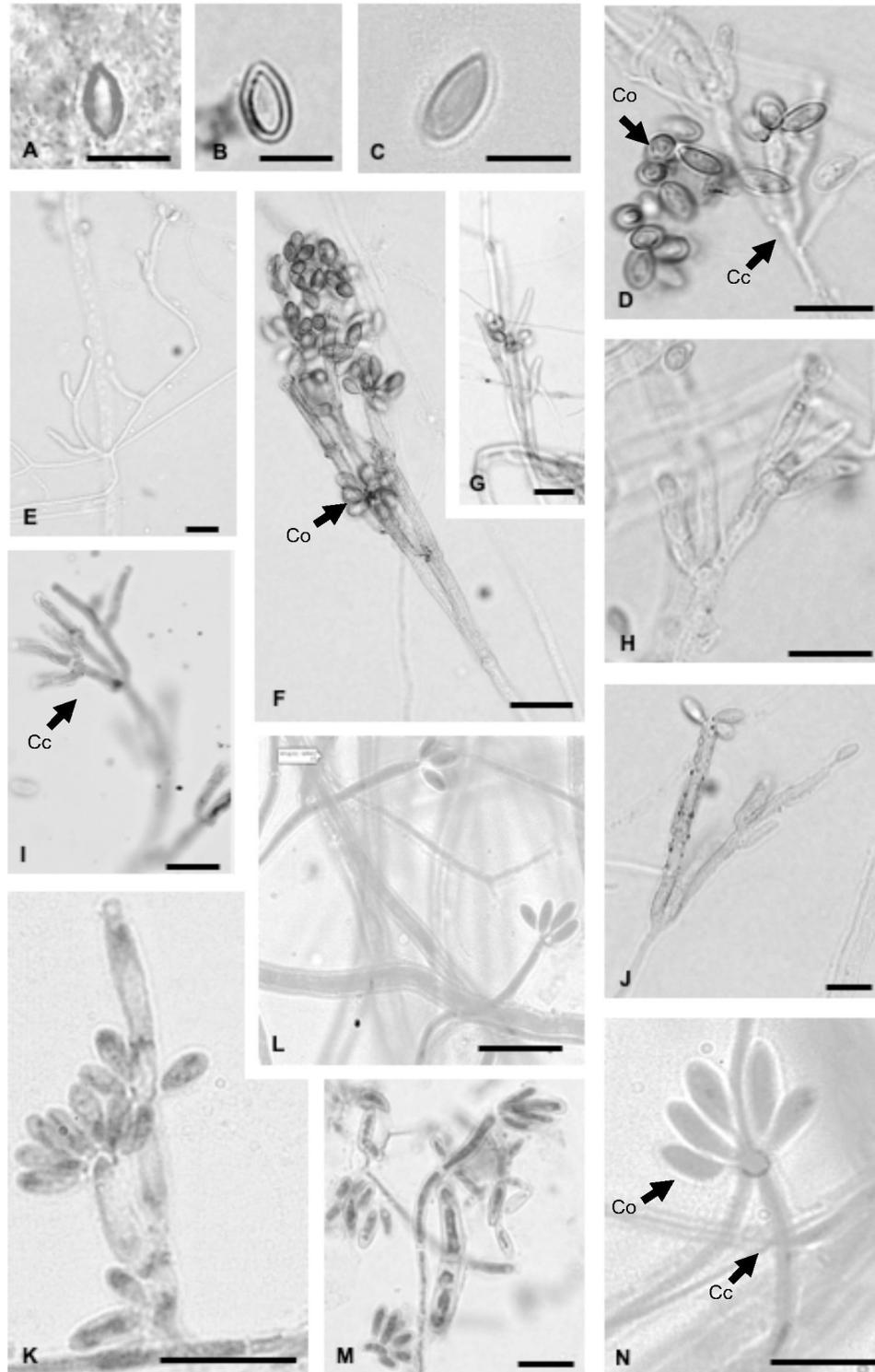


5.1.2 Identificação micromorfológica

5.1.2.1 Característica micromorfológica dos isolados CMRP681, CMRP683 e CMRP685

Para a análise microscópica dos isolados CMRP681, CMRP683 e CMRP685 foram visualizadas hifas hialinas e septadas, juntamente com estruturas assexuadas de conidióforo do tipo nodulisporium (Figura 2). Conidióforos hialinos e finamente rugosos. Células conidiogênicas terminais, hialinas, lisas, medindo aproximadamente $10 - 18 \times 3 - 4 \mu\text{m}$, portando uma secessão de vários conídios poróides com cicatrizes na região apical. Conídios hialinos, lisos e elipsoides, com diâmetro $4,5 - 5 \times 2,5 - 3,5 \mu\text{m}$, produzidos holoblasticamente na sequência simpodial, com achatamento na base, contrário ao ponto de fixação na célula conidiogênica.

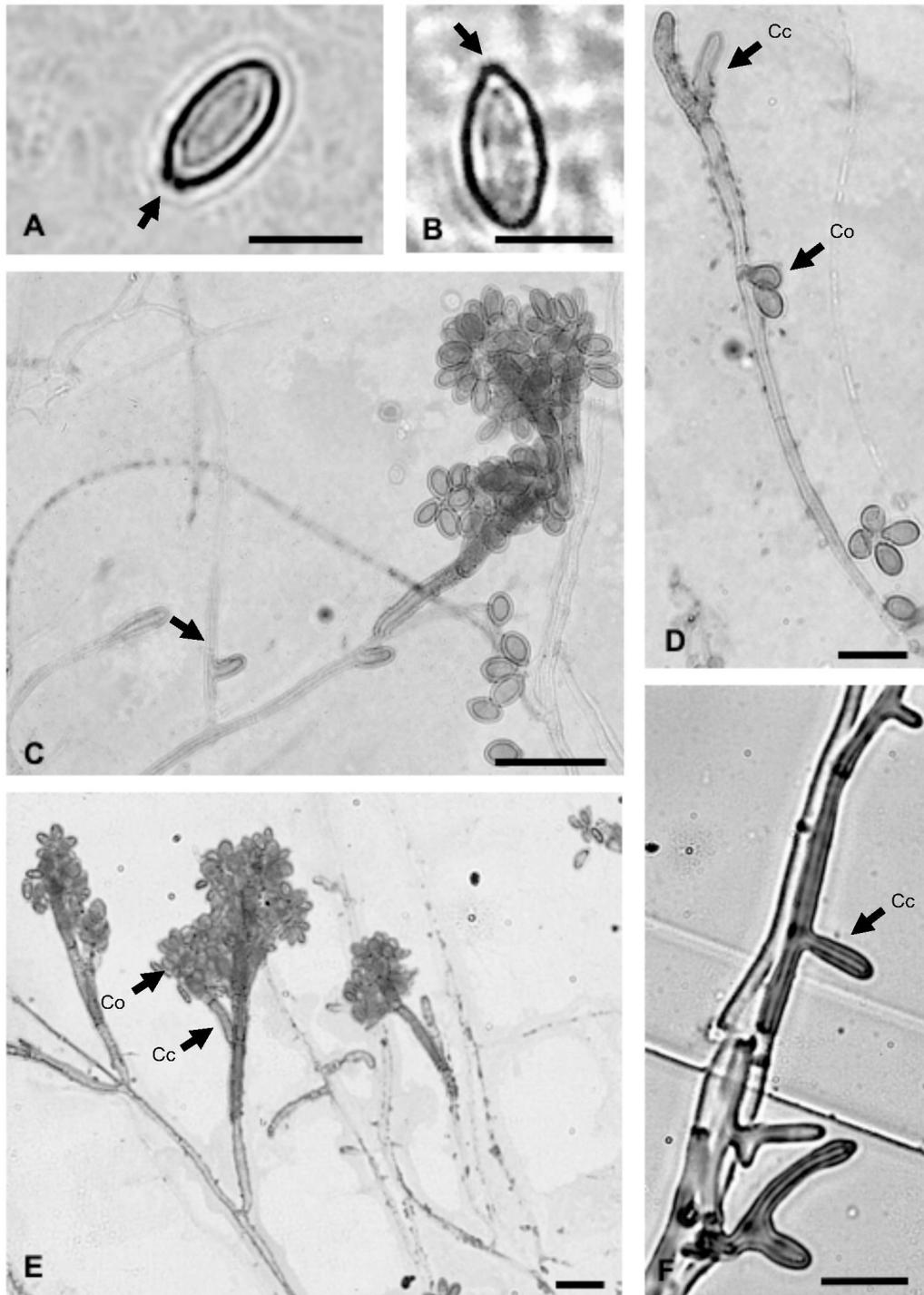
FIGURA 2 - FOTOMICROGRAFIAS DE ESTRUTURAS ASSEXUADAS DOS ISOLADOS CMRP681, CMRP683 E CMRP685 (1000X). **A - C**: CONÍDIOS DOS ISOLADOS RESPECTIVAMENTE, COM FORMA ELIPSÓIDE E MEMBRANA DUPLA. **D - J**: CMRP683, **D**: CONIDIÓFOROS COM CÉLULAS CONIDIOGÊNICAS INTERCALARES E AGLOMERADO DE CONÍDIOS. **E**: CONIDIÓFORO. **F**: CONIDIÓFORO COM CONÍDIOS ADERIDOS NAS CÉLULAS CONIDIOGÊNICAS. **G - J**: CÉLULAS CONIDIOGÊNICAS COM PADRÃO DE RAMIFICAÇÃO TIPO NODULISPORIUM. **K - N**: CMRP685. **K**: CONIDIÓFORO MENOR E INFLADO. **L, M**: CÉLULAS CONIDIOGÊNICAS MAIORES E DELGADAS. **N**: CÉLULA CONIDIOGÊNICA TERMINAL COM CONÍDIOS. (CÉLULA CONIDIOGÊNICA: Cc, CONÍDIO: Co). BARRAS DE ESCALA: **A - C E N** = 5 μ m; **D - M** = 10 μ m



5.1.2.2 Característica micromorfológica do isolado CMRP688

O isolado CMRP688 apresentou hifas hialinas e septadas, juntamente com conidióforo tipo nodulisporium com variação no padrão de ramificação tipo virgariella (Figura 3). Conidióforos hialinos, lisos a finamente rugosos. Células conidiogênicas terminais, hialinas, finamente rugosas, medindo aproximadamente $8 - 18 \times 3 - 4,5$ μm , com secessão de vários conídios com cicatrizes na região apical. Conídios hialinos, lisos e elipsoides, com diâmetro $4,5 - 6,0 \times 3,5 - 4,0$ μm , produzidos holoblasticamente na sequência simpodial, com achatamento na base, contrário ao ponto de fixação na célula conidiogênica.

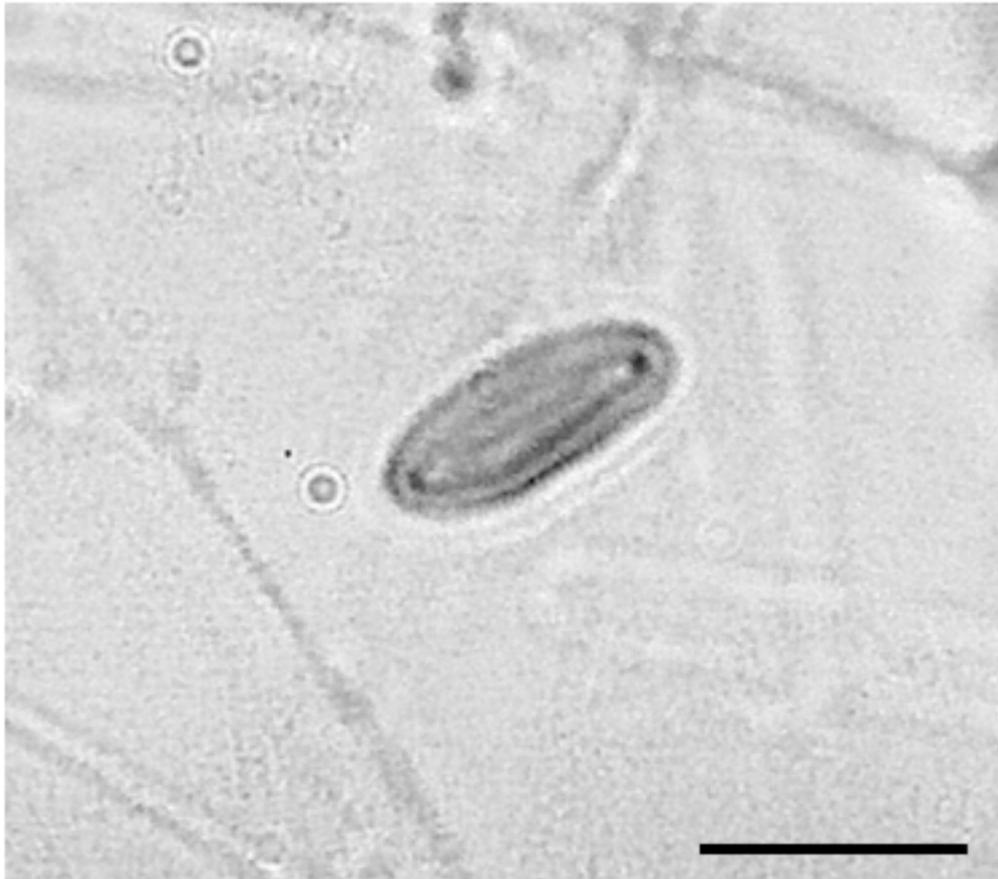
FIGURA 3 - FOTOMICROGRAFIAS DE ESTRUTURAS ASSEXUADAS DO ISOLADO CMRP688 (1000X). **A** e **B**: CONÍDIOS, COM FORMA ELIPSOIDE E MEMBRANA DUPLA, COM CICATRIZ NA REGIÃO APICAL (SETA). **C**: CONIDIÓFOROS COM CÉLULAS CONIDIOGÊNICAS IMATURAS (SETA). **D**: CÉLULAS CONIDIOGÊNICAS COM PADRÃO DE RAMIFICAÇÃO TIPO VIRGARIELLA. **E**: CONIDIÓFORO COM CONÍDIOS ADERIDOS NA REGIÃO TERMINAL (40X). **F**: CONIDIÓFOROS IMATUROS. (CÉLULA CONIDIOGÊNICA: Cc, CONÍDIO: Co) BARRAS DE ESCALA **A** - **B** = 5 μ m; **C** - **F** = 10 μ m.



5.1.2.3 Característica micromorfológica do isolado CMRP686

O isolado CMRP686 apresentou hifas hialinas e septadas, juntamente com estrutura assexuada de conídio elipsóide com forma irregular e membrana dupla (Figura 4). Não foi observada estrutura de conidióforo deste isolado.

FIGURA 4 - FOTOMICROGRAFIA DE ESPORO ASSEXUADO DO ISOLADO CMRP686, CONÍDIO COM FORMA ELIPSÓIDE IRREGULAR E MEMBRANA DUPLA. BARRA DE ESCALA = 5 μ m.

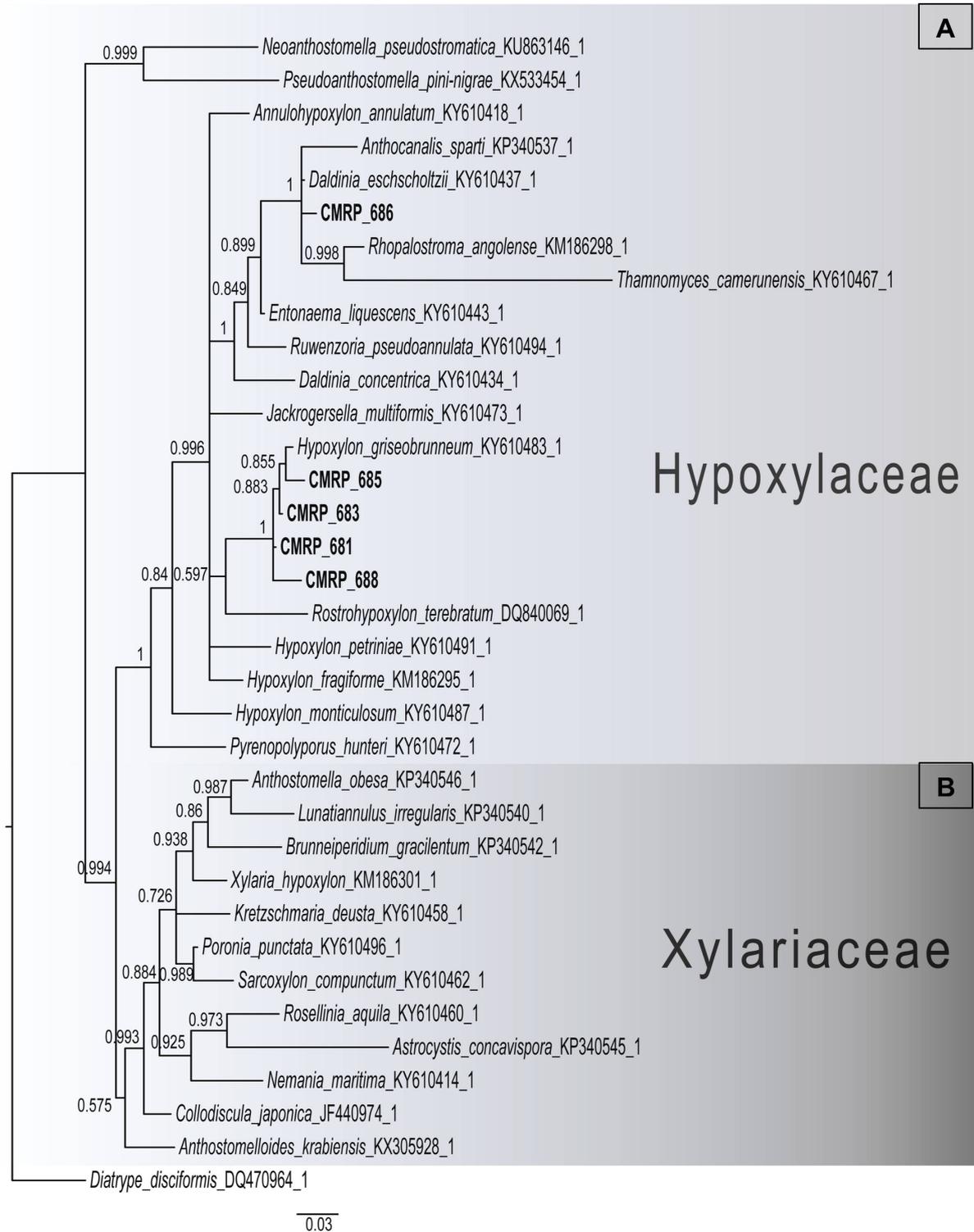


5.1.3 Identificação molecular

5.1.3.1 Identificação dos isolados a nível de família

A identificação inicial da família a que pertencia os isolados foi realizada através de análise filogenética utilizando a sequência parcial do gene *LSU*. Nesta análise foram obtidos dois clados principais, identificados como A e B (Figura 5). O clado (A) englobou os gêneros representantes da família Hypoxylaceae, e o clado (B) os representantes da família Xylariaceae, dados que estão de acordo com a filogenia proposta por Wendt et al. (2018). Assim, os cinco isolados endofíticos anteriormente identificados como pertencentes à família Xylariaceae (HOKAMA et al., 2017), pertencem após a reclassificação filogenética, à família Hypoxylaceae (WENDT et al., 2018). O isolado CMRP686, como já identificado em estudo anterior por análise filogenética (HOKAMA et al., 2017), foi confirmado como pertencente ao gênero *Daldinia*.

FIGURA 5 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, OBTIDA COM SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE *LSU*, COM ESPÉCIES REPRESENTANTES DAS FAMÍLIAS HYPOXYLACEAE E XYLARIACEAE E OS ISOLADOS ENDOFÍTICOS (CMRP681, CMRP683, CMRP685, CMRP686 E CMRP688), COM 10.000.000 REPETIÇÕES. A ÁRVORE ESTÁ ENRAIZADA COM *Diatrype disciformis*.



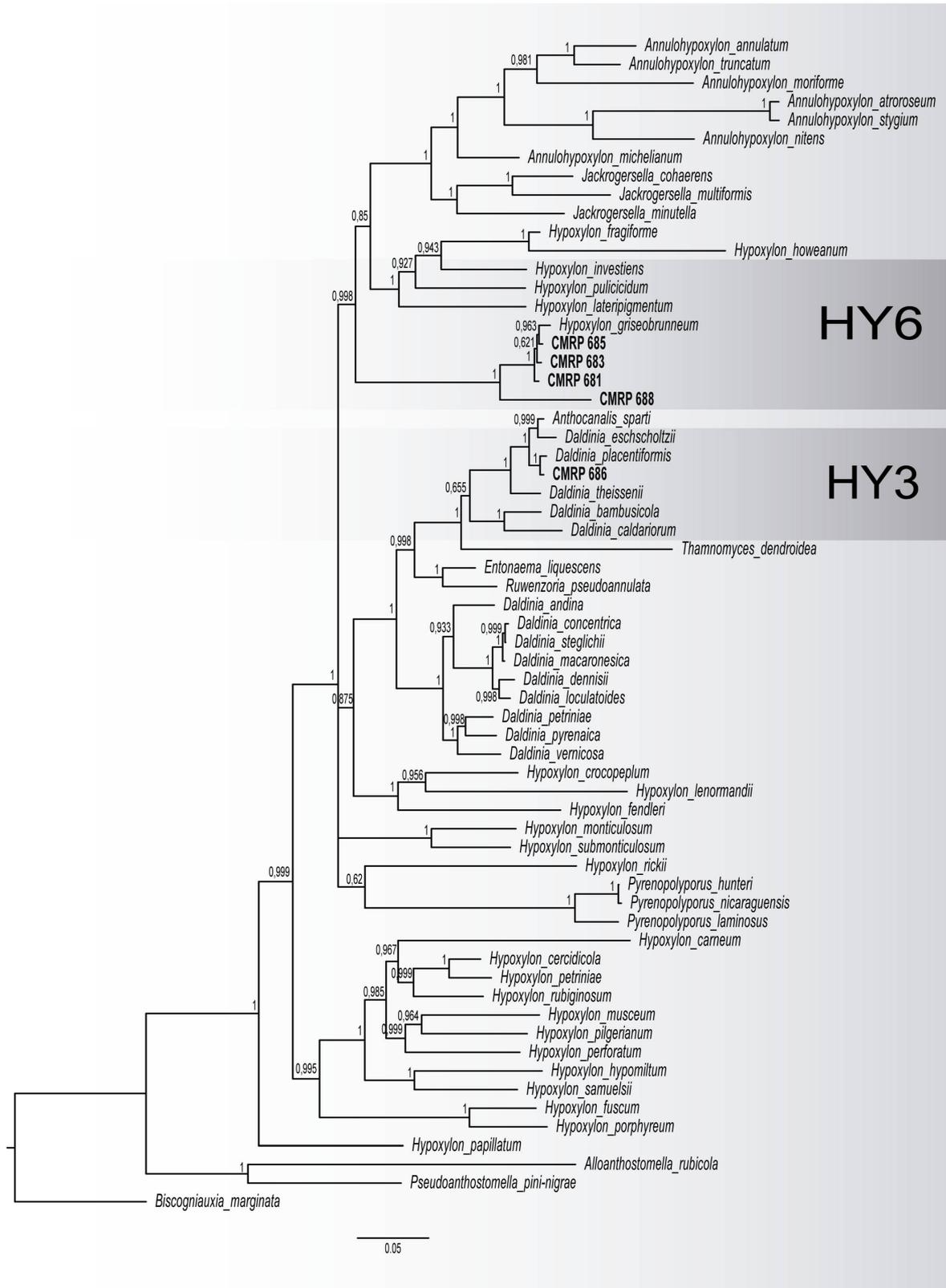
5.1.3.2 Identificação do gênero e espécie dos isolados

Uma vez que todos isolados foram identificados como pertencentes à família Hypoxylaceae, foi realizada uma análise filogenética multigênica utilizando sequências da região *ITS* e dos genes *RPB2* e β - *tubulina* (Figura 6) somente com gêneros pertencentes a essa família. A árvore gerada apresentou topologia condizente com a filogenia proposta para a família Hypoxylaceae (DARANAGAMA et al., 2018), e os clados internos foram nomeados como HY1 a HY6, seguindo estudo realizado por Daranagama et al. (2018). Desta forma, neste trabalho foi considerado tal organização familiar para caracterizar os isolados. Essa organização é importante, uma vez que os gêneros dentro desta família são parafiléticos e necessitam de estudo filogenético detalhado.

Com alto valor de probabilidade a posteriori, os isolados CMRP681, CMRP683 e CMRP685 foram caracterizados como pertencentes ao clado HY-6, e à espécie *Hypoxylon griseobrunneum*. O isolado CMRP688, mesmo ao agrupar-se próximo aos isolados CMRP681, CMRP683 e CMRP685, permaneceu em um ramo separado dos demais, sugerindo ser uma nova espécie próxima de *H. griseobrunneum* (Figura 6).

O isolado CMRP686 na análise filogenética formou um grupo com a espécie *Daldinia eschscholtzii*, pertencente ao clado HY-3 (Figura 6).

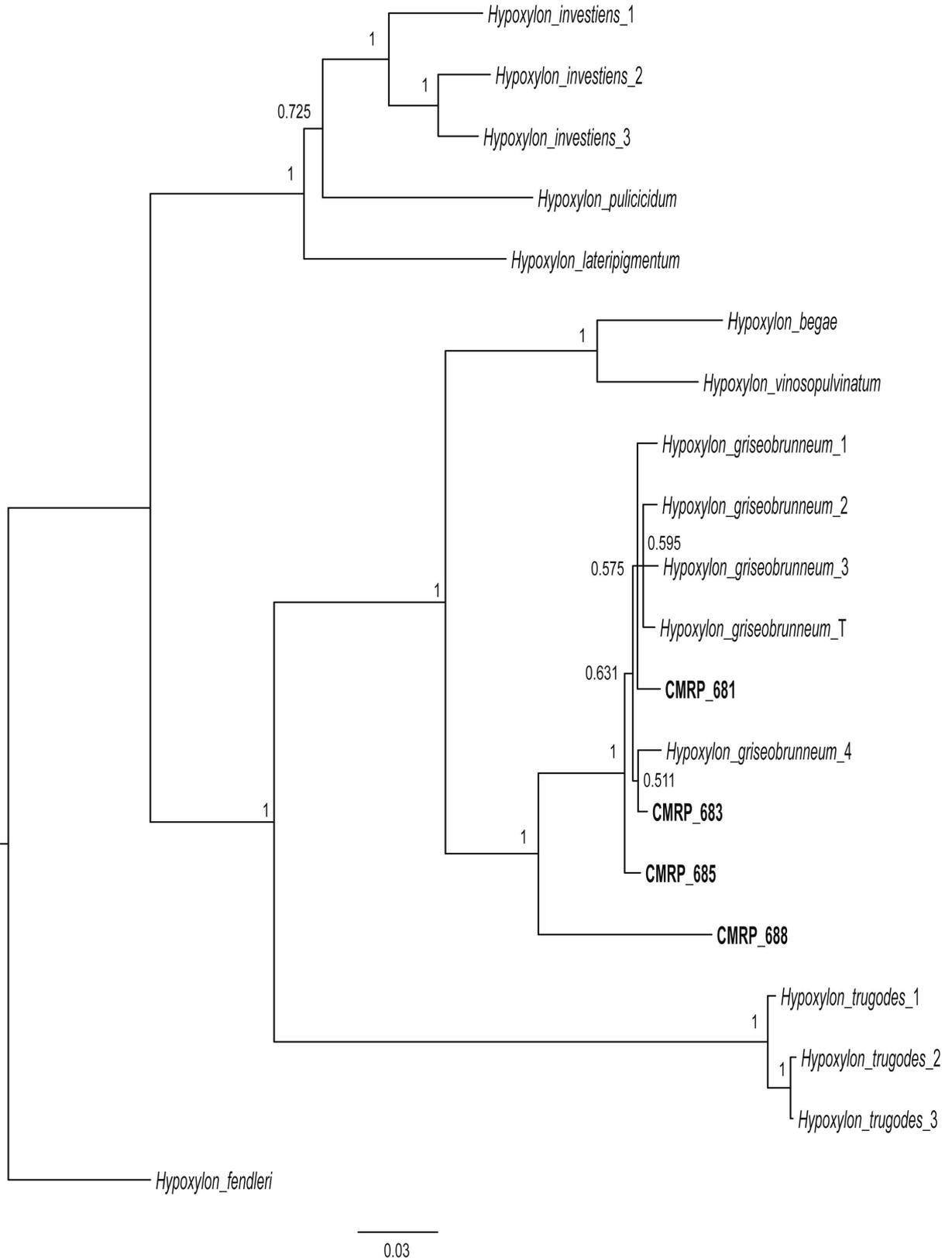
FIGURA 6 - ÁRVORE MULTIGÊNICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, REALIZADA PELA ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS PARCIAIS DOS GENES *ITS*, *RPB2* E β -*TUBULINA*, UTILIZANDO REPRESENTANTES DA FAMÍLIA HYPOXYLACEAE, JUNTAMENTE COM TODAS AS LINHAGENS UTILIZADAS NESTE ESTUDO COM 10.000.000 REPETIÇÕES. A ÁRVORE ESTÁ ENRAIZADA EM *Biscognauxia marginata*.



Anteriormente à análise multigênica, foram geradas árvores individuais de cada sequência gênica, verificando topologia e valores de suporte de probabilidade a posteriori. Verificou-se que, a sequência do gene *tub2* apresentou boa resolução para a delimitação de espécies, enquanto a região *ITS* apresentou baixa resolução entre espécies próximas. Ambas as árvores geradas a partir de sequências de genes ribossomais (*ITS* e *LSU*) e codificadores de proteínas (*RPB2* e β -*tubulina*), foram concordantes, não apresentando nenhuma distorção da topologia, quando comparadas entre si, e também, com as disponíveis na literatura. Dessa forma, a análise combinada dessas regiões gênicas aumentou o suporte e a confiabilidade na identificação dos isolados.

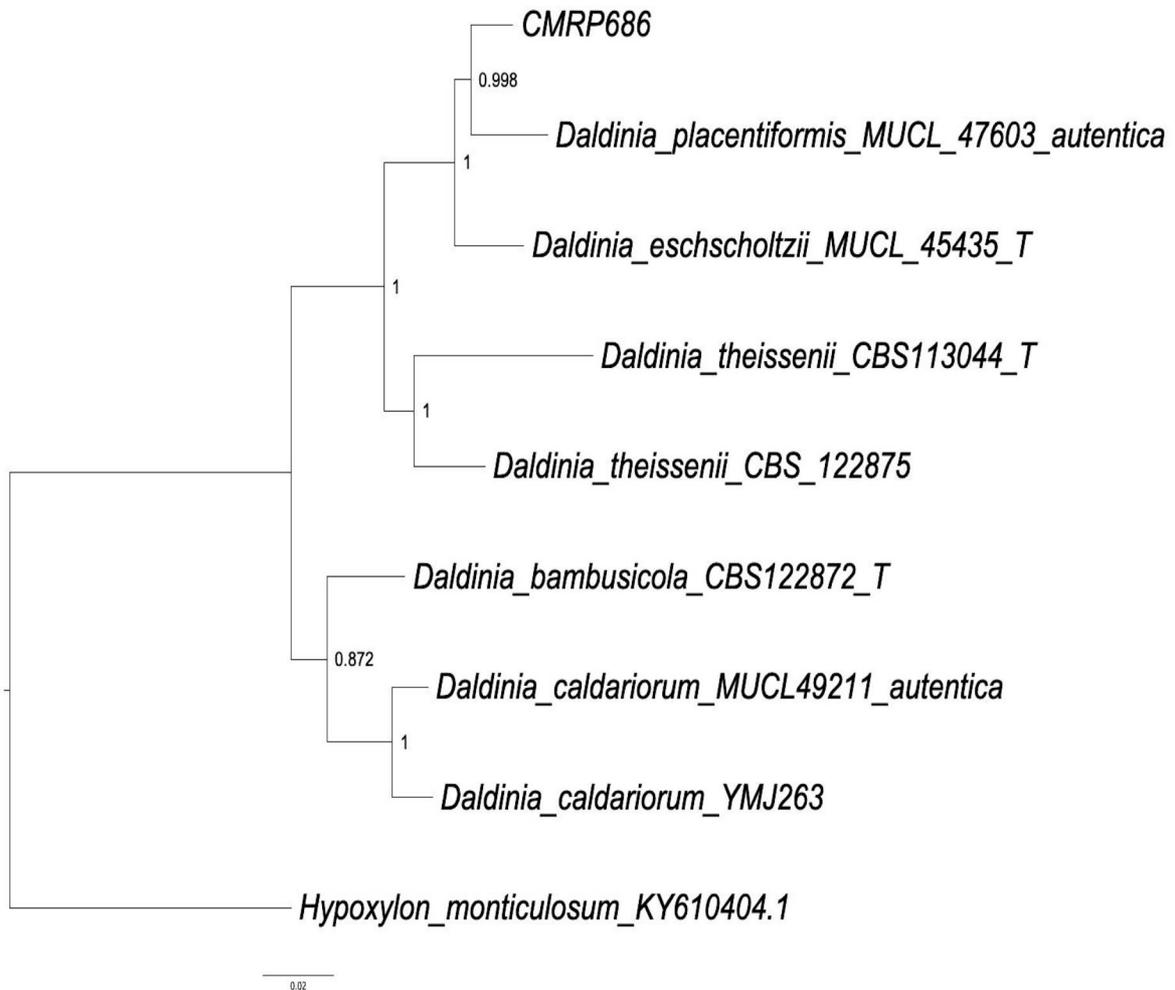
A fim de verificar a variabilidade intraespecífica e assim a resolução de diferenciação entre os isolados pertencentes ao clado HY-6, foi gerada uma árvore com sequências das espécies de referências e linhagens representantes do mesmo clado (DARANAGAMA et. al. 2018), disponíveis em bancos de dados. Nesta nova análise os isolados CMRP681, CMRP683 e CMRP685, permaneceram agrupados com a espécie *H. griseobrunneum*, e o isolado CMRP688 permaneceu em um ramo separado de todos representantes do clado HY-6, suportando a classificação do mesmo como uma nova espécie no clado HY-6 (Figura 7), aqui descrita como *Hypoxylon vochysiae*.

FIGURA 7 - ÁRVORE MULTIGÊNICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, OBTIDA COM SEQUÊNCIA PARCIAL DOS GENES *ITS* E β -*TUBULINA*, UTILIZANDO ESPÉCIES REPRESENTANTES DO CLADO **HY-6**, DA FAMÍLIA HYPOXYLACEAE, JUNTAMENTE COM AS LINHAGENS CMRP681, CMRP683, CMRP685 e CMRP688 (NEGRITO) COM 5.000.000 DE REPETIÇÕES. ENRAIZADA COM O OUTGROUP *Hypoxylon fendleri*.



A identificação do isolado CMRP686 foi realizada através de análise filogenética utilizando os genes *ITS* e *β -tubulina* das espécies e linhagens representantes do clado HY-3, o qual confirmou o isolado como pertencente a espécie *Daldinia placentiformis* (Figura 8). Anteriormente, este isolado tinha sido classificado apenas como *Daldinia sp.* por Hokama et al., (2017), devido à falta de dados moleculares. Esta espécie permanece agrupada com outras diferentes espécies em um mesmo clado em estudo recente, no qual foi chamado de complexo “*eschscholtzii*” (NARMANI et al., 2018).

FIGURA 8 - ÁRVORE MULTIGÊNICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA, OBTIDA COM SEQUÊNCIA PARCIAL DOS GENES *ITS* E β -*TUBULINA*, UTILIZANDO ESPÉCIES REPRESENTANTES DO CLADO **HY-3**, DA FAMÍLIA HYPOXYLACEAE, JUNTAMENTE COM A LINHAGEM CMRP686 (NEGRITO), COM 5.000.000 DE REPETIÇÕES. ENRAIZADA COM O OUTGROUP *Hypoxylon monticulosum*.



Descrição taxonômica

Hypoxylon vochysiae Bochnie, Savi & Glienke, **sp. nov.**

MycoBank No.: 829968

Acesso GenBank No.: *ITS*: JX559555; *LSU*: MK535101; *RPB2*: MK577655; *TUB2*: MK599136

Etimologia: Nome referente a planta da qual foi isolado, *Vochysia divergens*.

Fungo endofítico associado a planta *Vochysia divergens*. Pertencente a família Hypoxylaceae, a qual inclui gêneros com estruturas assexuadas do tipo nodulisporium. A colônia de *Hypoxylon vochysiae* em meio aveia apresentou com diâmetro médio de 4,5 cm, a 24°C, 8 dias após a inoculação. Cobrindo a placa de Petri de 9 cm, em 2,5 a 3 semanas. Em análise microscópica revelou hifas hialinas, septadas, juntamente com conidióforo tipo nodulisporium com variação no padrão de ramificação tipo virgariella. Conidióforos hialinos, lisos a finamente rugosos. Células conidiogênicas terminais, hialinas, finamente rugosas, medindo aproximadamente 8 - 18 × 3 - 4,5 µm, com secessão de vários conídios com cicatrizes na região apical. Conídios hialinos, lisos e elipsóides, com diâmetro 4,5 - 6 × 3,5 - 4 µm, produzidos holoblasticamente na sequência simpodial, com achatamento na base, contrário ao ponto de fixação na célula conidiogênica.

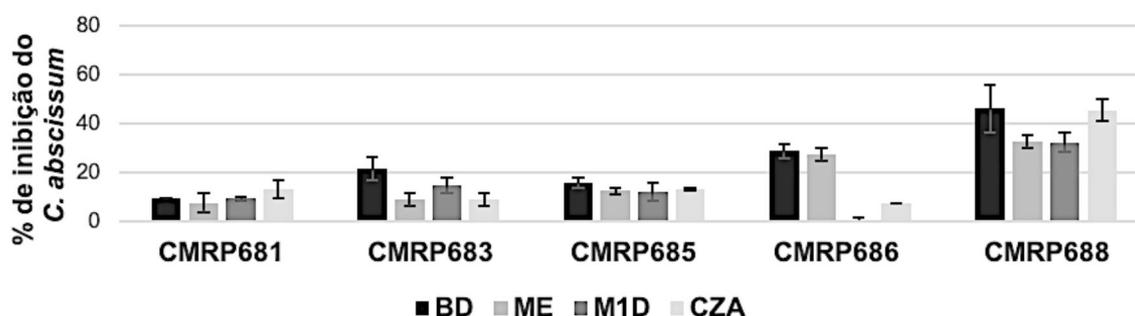
Amostra examinada: Brasil, Pantanal Sul Matogrossense, 19.501944°S/55.601389°W. *Hypoxylon vochysiae* é um fungo endofítico de tecido interno de folhas de *Vochysia divergens* Pohl (Cambará). Foi primeiramente isolado em 2008 por Hokama (ex-type: CMRP688).

5.2 BIOPROSPECÇÃO

5.2.1 Avaliação da atividade antifúngica contra fitopatógenos

Os extratos produzidos pelo cultivo do isolado CMRP688 (*Hypoxylon vochysiae*) nos caldos Batata Dextrose e Czapeck apresentaram os maiores valores de inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *C. abscissum*, inibindo em até 46% do desenvolvimento do fitopatógeno (Gráfico 1).

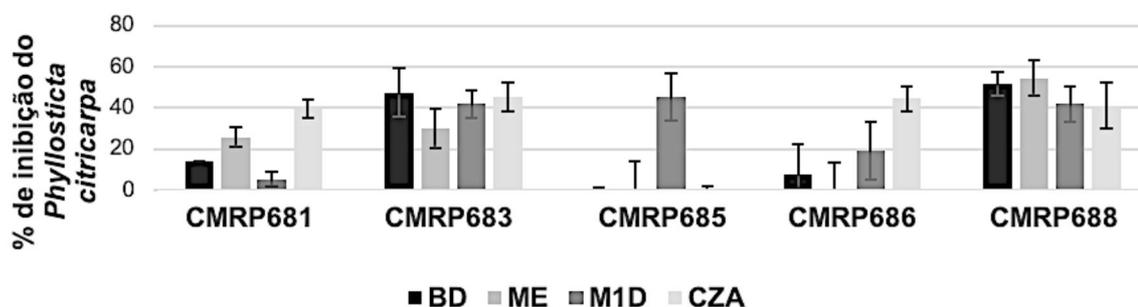
GRÁFICO 1 - INIBIÇÃO (EM %) DO CRESCIMENTO MICELIAL DO FITOPATÓGENO *Colletotrichum abscissum* APÓS 8 DIAS DE CULTIVO NA PRESENÇA DOS EXTRATOS NA CONCENTRAÇÃO DE 10mg/mL, PRODUZIDOS ATRAVÉS DOS CULTIVO DAS LINHAGENS ENDOFÍTICAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.



NOTA: BD: Batata Dextrose; ME: Extrato de Malte; M1D: meio M1D; CZA: Czapek.

Todos os isolados analisados continham metabólitos capazes de inibir o crescimento micelial do fitopatógeno *P. citricarpa*. As melhores porcentagens de inibição foram obtidas pela exposição aos metabólitos produzidos pelo isolado CMRP688 (*Hypoxylon vochysiae*) em caldo BD e em meio ME, inibindo o crescimento do fitopatógeno em 54% (Gráfico 2).

GRÁFICO 2 - INIBIÇÃO (EM %) DO CRESCIMENTO MICELIAL DO FITOPATÓGENO *Phyllosticta citricarpa* APÓS 21 DIAS DE CULTIVO NA PRESENÇA DOS EXTRATOS NA CONCENTRAÇÃO DE 10mg/mL, PRODUZIDOS ATRAVÉS DO CULTIVO DAS LINHAGENS ENDOFÍTICAS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.



NOTA: BD: Batata Dextrose; ME: Extrato de Malte; M1D: meio M1D; CZA: Czapek.

5.2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana contra patógenos clínicos

Todos extratos testados apresentaram atividade inibitória contra pelo menos um dos patógenos clínicos avaliados, produzindo halos de inibição entre 9mm a 17mm (Tabela 4). Os maiores halos de inibição foram observados contra *S. maltophilia* (BACHC-SMA), contra o qual todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana. Com destaque para os metabólitos produzidos em caldo BD e ME pelo isolado CMRP686, que originaram halos de inibição de aproximadamente 17 mm.

Todos os extratos produzidos apresentaram valores estatisticamente diferentes de acordo com o meio no qual foi produzido (Tabela 3).

TABELA 3 – HALO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE PATÓGENOS CLÍNICOS EM (mm). NA PRESENÇA DOS EXTRATOS NA CONCENTRAÇÃO DE 10mg/mL, PRODUZIDOS A PARTIR DO CULTIVO DE LINHAGENS ENDOFÍTICAS, SENDO DESTACADOS (NEGRITO) OS VALORES QUE OBTIVERAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA EM RELAÇÃO AO CONTROLE NEGATIVO (METANOL).

Patógenos	Isolado	BD	ME	M1D	CZA
<i>Staphylococcus aureus</i> (SASM)	CMRP 681	10,80	11,20	10,00	10,30
	CMRP 683	10,70	11,20	10,00	10,70
	CMRP 685	5,00	10,80	10,50	10,00
	CMRP 686	10,50	11,20	11,00	10,20
	CMRP 688	10,30	10,30	10,00	10,70
<i>Staphylococcus aureus</i> (SARM)	CMRP 681	8,30	9,20	9,70	8,50
	CMRP 683	10,30	10,20	9,50	9,80
	CMRP 685	11,20	9,70	9,30	9,00
	CMRP 686	9,70	10,20	9,50	8,50

	CMRP 688	9,80	8,30	9,50	7,00
	CMRP 681	9,20	9,30	8,30	9,00
	CMRP 683	10,50	10,00	9,30	10,50
<i>Enterococcus faecalis</i> Vanco R	CMRP 685	9,50	10,30	10,20	9,30
	CMRP 686	8,30	9,20	9,30	9,80
	CMRP 688	10,70	9,70	8,50	9,20
	CMRP 681	7,30	9,30	10,70	10,00
	CMRP 683	10,20	9,70	10,20	11,00
<i>Enterobacter cloacae</i> VIM	CMRP 685	9,20	9,80	10,20	12,30
	CMRP 686	11,20	12,00	10,20	11,80
	CMRP 688	9,00	9,20	9,30	13,70
	CMRP 681	13,80	13,80	13,30	12,30
	CMRP 683	14,80	16,30	14,50	13,30
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	CMRP 685	14,20	15,50	12,70	13,80
	CMRP 686	16,70	17,00	14,80	13,00
	CMRP 688	15,70	14,30	14,70	12,30
	CMRP 681	12,30	11,80	12,20	12,20
	CMRP 683	11,50	11,80	12,50	13,20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC	CMRP 685	11,50	13,20	10,80	13,50
	CMRP 686	12,50	15,00	12,00	11,80
	CMRP 688	9,80	12,00	12,50	12,00
	CMRP 681	10,30	11,30	9,70	11,20
	CMRP 683	11,00	11,20	10,80	11,70
<i>Escherichia coli</i>	CMRP 685	11,20	12,50	10,50	12,30
	CMRP 686	12,00	11,50	10,80	10,70
	CMRP 688	10,80	11,20	11,80	11,80
	CMRP 681	8,80	7,00	11,20	9,20
	CMRP 683	10,00	10,50	11,20	9,00
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CMRP 685	10,80	10,70	10,80	10,50
	CMRP 686	10,30	12,00	10,50	10,70
	CMRP 688	12,00	11,00	11,70	11,20

5.2.3 Teste de concentração inibitória mínima (CIM)

Em função dos melhores resultados obtidos nos ensaios anteriores, os extratos produzidos pelo cultivo do isolado CMRP688 *Hypoxylon vochysiae* nos quatro meios de cultura, foram selecionados para a avaliação da CIM (concentração inibitória mínima), contra os fitopatógenos.

A CIM dos extratos produzidos pela linhagem CMRP688 contra o fitopatógeno *C. abscissum* foi de (1,1 mg/mL), classificada como baixa atividade, independente da condição de cultivo. Entretanto, nos testes contra o fitopatógeno *P. citricarpa*, os extratos produzidos em meio BD e M1D apresentaram atividade moderada, com os

menores valores de CIM, sendo 0,36 mg/mL. Os extratos produzidos a partir do cultivo nos demais meios tiveram baixa atividade (1,1 mg/mL).

Os extratos que apresentaram valores de inibição estatisticamente significativos contra os patógenos clínicos na avaliação da atividade antimicrobiana através do método de difusão em disco, foram selecionados para a determinação de CIM. Os valores de CIM obtidos para cada extrato selecionado, são apresentados na Tabela (4), os mesmos variaram de 3,3 mg/mL (contra *E. coli*) a 0,04 mg/mL (contra *A. baumannii*).

TABELA 4 - VALORES DE CIM DOS EXTRATOS TESTADOS CONTRA PATÓGENOS CLÍNICOS QUE OBTIVERAM VALORES SIGNIFICATIVOS EM RELAÇÃO AO CONTROLE NEGATIVO (METANOL). SENDO DESTACADOS (NEGRITO) OS VALORES CONSIDERADOS DE ATIVIDADE ALTA.

Patógenos	Isolado	BD	ME	M1D	CZA
<i>Staphylococcus aureus</i> (SASM)	CMRP 681	-	1,11mg/mL	-	-
	CMRP 683	-	1,11mg/mL	-	1,11mg/mL
	CMRP 685	-	1,11mg/mL	1,11mg/mL	-
	CMRP 688	-	-	-	0,37mg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> (SARM)	CMRP 681	1,11mg/mL	1,11mg/mL	1,11mg/mL	0,37mg/mL
	CMRP 683	0,37mg/mL	1,11mg/mL	1,11mg/mL	0,37mg/mL
	CMRP 685	0,37mg/mL	0,37mg/mL	1,11mg/mL	1,11mg/mL
	CMRP 686	0,37mg/mL	0,37mg/mL	0,37mg/mL	0,37mg/mL
	CMRP 688	0,37mg/mL	1,11mg/mL	0,37mg/mL	0,37mg/mL
<i>Enterococcus faecalis</i> Vanco R	CMRP 681	1,11mg/mL	-	-	0,37mg/mL
	CMRP 683	1,11mg/mL	-	1,11mg/mL	0,37mg/mL
	CMRP 685	0,37mg/mL	0,37mg/mL	1,11mg/mL	1,11mg/mL
	CMRP 686	-	-	0,37mg/mL	1,11mg/mL
	CMRP 688	0,37mg/mL	-	-	0,37mg/mL
<i>Enterobacter cloacae</i> VIM	CMRP 681	-	-	0,37mg/mL	-
	CMRP 685	-	-	-	0,37mg/mL
	CMRP 686	-	-	-	1,11mg/mL
	CMRP 688	-	-	-	1,11mg/mL
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	CMRP 681	-	1,11mg/mL	-	-
	CMRP 683	1,11mg/mL	1,11mg/mL	0,37mg/mL	-
	CMRP 685	1,11mg/mL	0,37mg/mL	-	-
	CMRP 686	1,11mg/mL	0,37mg/mL	-	-
	CMRP 688	1,11mg/mL	0,37mg/mL	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC	CMRP 686	-	0,37mg/mL	-	-
	CMRP 688	0,37mg/mL	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	CMRP 681	1,11mg/mL	3,33mg/mL	3,33mg/mL	-
	CMRP 683	3,33mg/mL	3,33mg/mL	3,33mg/mL	-
	CMRP 685	1,11mg/mL	3,33mg/mL	3,33mg/mL	3,33mg/mL
	CMRP 686	1,11mg/mL	1,11mg/mL	3,33mg/mL	3,33mg/mL
	CMRP 688	1,11mg/mL	1,11mg/mL	-	3,33mg/mL
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CMRP 681	1,11mg/mL	-	1,11mg/mL	-
	CMRP 683	-	0,04mg/mL	0,37mg/mL	-
	CMRP 685	0,04mg/mL	0,12mg/mL	0,12mg/mL	0,12mg/mL
	CMRP 686	-	0,04mg/mL	0,12mg/mL	1,11mg/mL
	CMRP 688	0,12mg/mL	0,12mg/mL	0,04mg/mL	1,11mg/mL

6 DISCUSSÃO

Os gêneros pertencentes a família Hypoxylaceae têm sido caracterizados principalmente a partir de estruturas sexuadas, porém muitos endófitos permanecem estéreis em cultura laboratorial ou reproduzem apenas estruturas assexuadas em meios comerciais, dificultando a sua identificação (Stadler et al. 2013). Em trabalho recente, Wendt et al. (2018) introduziram formalmente Hypoxylaceae como uma família diferente de Xylariaceae, baseado em estudo filogenético e morfológico. Wendt et al. (2018) consideraram o conceito dos grupos Hypoxyloide e Xylarioide, da família Xylariaceae, os quais eram baseados na morfologia assexuada, para a separação de gêneros portadores de estruturas assexuadas do tipo nodulisporium e suas variações na família Hypoxylaceae, e em Xylariaceae permaneceram os gêneros com formas assexuadas caracterizadas como geniculosporium. Desde então, tais estruturas têm sido amplamente consideradas nos estudos taxonômicos destas famílias (LAMBERT et al., 2018). Com base nestes dados, podemos considerar que mesmo não obtendo estruturas sexuadas, a caracterização dos isolados do presente estudo, pode ser suportada em caracteres morfológicos gerais de cultura e estruturas reprodutivas assexuadas, associadas com análises filogenéticas.

As linhagens CMRP681, CMRP683 e CMRP685 apresentaram caracteres macro morfológicos com variações na tonalidade da coloração, muitas vezes ocasionadas por regiões de esporulação. O isolado CMRP685 apresentou maior semelhança na morfologia do micélio com a espécie *H. griseobrunneum*, com coloração amarronzada em cultivos mais antigos (aproximadamente 4 semanas). Entretanto, já foi observado que linhagens pertencentes a espécie *H. griseobrunneum*, apresentaram variabilidade morfológica, principalmente na análise de estroma, na qual foi descrito certo grau de variabilidade morfológica entre vários espécimes (KUHNER et al., 2014), corroborando com os dados do presente trabalho. Assim, para a identificação dos isolados a nível de espécie é necessário a utilização de outros caracteres de identificação, como análise combinada da micromorfologia e filogenética (KUHNER et al., 2014; SIR et al., 2016).

Na análise micro morfológica, os isolados CMRP681, CMRP683, CMRP685 e CMRP688 apresentaram estruturas assexuadas de conidióforos com padrão de ramificação tipo nodulisporium, sendo condizente com as estruturas descritas na

literatura para a identificação de gêneros da família Hypoxylaceae (WENDT et al., 2018). As estruturas visualizadas para as linhagens CMRP681, CMRP683 e CMRP685 foram conidióforos nodulisporium, células conidiogênicas e conídios elipsoides, as quais são semelhantes às estruturas descritas para a espécie *H. griseobrunneum* (KUHNER et al., 2014).

Hypoxylon é o maior gênero de Hypoxylaceae, apresenta alta diversidade em climas mais quentes, sendo frequentemente isolado em regiões tropicais e neotropicais, embora mostre uma distribuição quase cosmopolita (KUHNER et al., 2014). Desta forma, a espécie *H. griseobrunneum* tem distribuição conhecida na América Central e do Sul, incluindo Caribe e Índia, já sendo relatado o isolamento no Brasil (CRUZ; CORTEZ, 2015). Ju e Rogers (1996) enfatizaram que a maioria das espécies deste gênero produzem estroma em madeira, vivendo como saprófitas ou como parasitas facultativos em hospedeiros em condições desfavoráveis. Sendo mais frequentemente encontrados como endófitos seus estados vegetativos (KUHNER et al., 2014).

Já linhagens da espécie *Daldinia placentiformis* são frequentemente descritas como endofíticas, que habitam em madeira ou até mesmo como saprófitas, decompondo madeira morta, sendo a espécie amplamente difundida em clima tropical quente (Stadler et al., 2014). Crescendo preferencialmente em substratos de madeiras em decomposição, é comumente isolado de plantas lenhosas mortas, como plantas de culturas dicotiledôneas, e ocasionalmente em algas marinhas (KARNCHANATAT et al., 2007; TARMAN et al., 2012; ZHANG et al., 2007, 2008).

Para a família Hypoxylaceae, incluindo os gêneros *Hypoxylon* e *Daldinia*, o uso de sequências gênicas ribossomais com sequências codificadoras de proteínas como β -*tubulina*, α -*actina* (HSIEH et al., 2005) e *RPB2* possibilitou uma melhor resolução de gênero e espécies (DARANAGAMA et al., 2018; LAMBERT et al. 2018; WENDT et al., 2018). Neste sentido, a árvore multigênica gerada, utilizando a sequência parcial dos genes *ITS*, *RPB2* e β -*tubulina* foi informativa para a identificação dos isolados. Assim também, quando comparados com mais representantes da espécie, com a qual as linhagens de estudo foram agrupadas, possibilitou a análise da variabilidade intraespecífica do grupo e forneceu mais robustez para a classificação dos isolados. Entretanto, como a identificação de muitas linhagens tem sido realizada utilizando apenas a sequência parcial dos genes

ITS e β -*tubulina*, o banco de dados disponível destas linhagens é limitado (SIR et al., 2016).

Muitos fungos da família Hypoxylaceae, até então pertencentes à família Xylariaceae, foram e ainda permanecem sendo extensivamente estudados a partir de seus metabólitos secundários, que além de úteis para a taxonomia (WHALLEY; EDWARDS, 1995; STADLER; HELLWIG, 2005; SIR et al., 2016), têm se mostrado promissores tanto para a indústria farmacêutica como agrônômica, devido às atividades de inibição contra diversos patógenos (BILLS et al., 2012; STADLER, 2011). Vários estudos relatam uma ampla gama de metabólitos secundários obtidos a partir do cultivo de linhagens da espécie *Daldinia eschscholtzii*, como citocalasinas, concentricóis e helicascolida C (STADLER et al., 2001a; STADLER et al., 2001b; ZHANG et al., 2008; ZHANG et al., 2011; FANG et al., 2012; TARMAN et al., 2012; CHAN et al., 2015). Alguns são descritos até como precursores de compostos medicinais biologicamente ativos. Como a helicascolida C, que apresentou atividade antifúngica contra o fitopatógeno *Cladosporium cucumerinum* (TARMAN et al., 2012).

Em estudo anterior, resultados obtidos demonstraram potencial biológico de isolado da espécie *Hypoxylon fragiforme*, que ao ser testado seus extratos produzidos em meio ME, apresentaram atividade antagônica à bactéria *Staphylococcus aureus*, com CIM de 0,256mg/mL. Na mesma concentração inibiu o crescimento da bactéria *Escherichia coli*, quando os extratos foram produzidos em meio BD (YUYAMA et al., 2017), valores estes observados com metabólitos purificados. Com resultado ainda mais promissor, metabólitos purificados de isolado da espécie *Daldinia sacchari*, também apresentaram atividade contra *S. aureus*, com CIM de 3,33 μ g/mL (NARMANI et al., 2018), valores estes semelhantes aos obtidos neste trabalho, no qual foi utilizado apenas extratos brutos, demonstrando assim o grande potencial de gêneros da família Hypoxylaceae diante de patógenos clínicos.

Mediante os resultados obtidos nos testes de avaliação da atividade antifúngica, a linhagem CMRP688 se destacou entre as demais, apresentando resultados significativos de inibição dos fitopatógenos, assim como, já relatado em trabalhos anteriores do grupo (HOKAMA et al., 2017). O extrato da linhagem CMRP688 apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 0,36mg/mL contra o fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa*, podendo representar o alto potencial de uso desta linhagem no controle biológico.

A inibição observada contra fitopatógenos neste estudo é promissora, visto que são dois fitopatógenos de grande importância econômica, pois ambos causam prejuízos relevantes para a citricultura no Brasil e no mundo. O *Colletotrichum abscissum*, fungo causador da podridão floral dos citros (PFC) que ocasiona o apodrecimento das pétalas da flor e a não formação do fruto; e do *Phyllosticta citricarpa*, causador da mancha preta em citros (MPC), doença considerada quarentenária A1 (FUNDECITRUS, 2017) que impõe barreiras fitossanitárias para a importação de frutos brasileiros. O controle das doenças no campo é comumente realizado através de fungicidas, mas o uso indiscriminado desses produtos gera efeitos prejudiciais, tanto ao meio ambiente, como também o aparecimento de patógenos resistentes (POSSIEDE et al., 2009).

Assim, novos métodos alternativos são necessários, como o uso de metabólitos secundários na forma de princípios ativos em novos produtos, o que poderia ser empregado no manejo integrado de pragas. A bioprospecção de fungos endofíticos, inclusive os isolados de plantas medicinais, é promissor neste cenário, devido à produção de diversos metabólitos secundários com aplicação biotecnológica (GOS et. al., 2017; VENIERAKI; DIMOU; KATINAKIS, 2017; NORILER et. al., 2018).

Nos testes de avaliação da atividade biológica os extratos brutos de cada um dos 5 isolados, produzidos em 4 diferentes meios de cultura, foram capazes de inibir o crescimento das bactérias *E. coli* e *S. aureus* resistente a metilina (SARM). Entretanto, quando considerado o tamanho de inibição, os extratos apresentaram maior atividade contra *S. maltophilia*, sendo o maior halo o obtido no teste utilizando o extrato produzido pelo isolado CMRP686 (diâmetro de 17 mm). Esse valor é semelhante ao obtido em estudo de Noriler et. al. (2018), que relataram que extratos de linhagens endofíticas do gênero *Diaporthe* causaram halo de inibição de 16 mm contra esse mesmo patógeno. No entanto, nos testes de CIM, as menores concentrações foram obtidas contra a bactéria *Acinetobacter baumannii*, com valor de 0,04mg/mL. Resultados esses semelhantes aos encontrados em outros trabalhos, como relatado por Gos et. al. (2017), no qual o melhor extrato avaliado apresentou CIM de 0,31mg/mL contra a bactéria *A. baumannii*.

Foi observado que o meio ME foi capaz de induzir a produção de metabólitos ativos em frequência maior do que os demais meios, uma vez que os maiores halos de inibição contra a bactéria *S. maltophilia* foram obtidos através do cultivo nesse

meio. Neste caso, a composição pode ter influenciado na produção do metabólito bioativo, ou seja, a fonte de carbono do meio pode interferir na atividade biológica dos extratos (SANCHEZ; DEMAIN, 2002). Assim também, a complexidade do meio pode ter fornecido diferentes substâncias que podem influenciar na ação do composto. Portanto, a seleção de meios de cultura é fundamental durante o processo de produção de extratos.

Dentre os patógenos clínicos utilizados neste estudo, muitos tem representado um grande problema para a saúde pública no Brasil, pois apresentam resistência intrínseca a antibióticos disponíveis, como exemplo as bactérias gram negativas *S. maltophilia* e *A. baumannii* (BROKE, 2012; BONOMO et al., 2016). Neste sentido, os resultados aqui obtidos demonstram o potencial de futuros testes para a aplicabilidade destes extratos como princípios ativos na formulação de novos antibióticos.

A partir deste estudo sugere-se, pesquisas posteriores de caracterização e purificação dos compostos, para elucidação dos metabólitos produzidos por estes isolados, afim de identificar os compostos associados a atividade biológica e a possibilidade de aplicação dos mesmos contra outros patógenos.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho conclui-se que:

- Os 5 isolados analisados no presente trabalho foram reclassificados como pertencentes à família Hypoxylaceae;
- O isolado CMRP686 pertence a espécie *Daldinia placentiformis*, presente no clado HY-3 proposto por Daranagama et al. (2018);
- Os isolados CMRP681, CMRP683 e CMRP685 pertencem a espécie *Hypoxylon griseobrunneum*, presente no clado HY-6 de Daranagama et al. (2018);
- O isolado CMRP688 pertence a uma nova espécie descrita aqui como *Hypoxylon vochysiae*;
- Todos os extratos avaliados apresentaram atividade contra os fitopatógenos e patógenos clínicos, evidenciando a importância dos estudos químicos e biológicos realizados com microrganismos endofíticos no intuito de otimizar e potencializar o seu uso na indústria;
- Os metabólitos secundários produzidos pelo isolado CMRP688 *Hypoxylon vochysiae* apresentaram elevada atividade antimicrobiana contra os fitopatógenos *C. abscissum* e *P. citricarpa*.
- Os metabólitos secundários produzidos pelo isolado CMRP686 *Daldinia placentiformis*, apresentou elevada atividade contra os patógenos clínicos avaliados, principalmente contra a bactéria *S. maltophilia*.
- Metabólitos secundários produzidos pelos isolados, cultivados em diferentes meios de cultura, apresentaram elevada atividade de inibição contra a bactéria *Acinetobacter baumannii*.

REFERÊNCIAS

- ALHO; C. J. R. **Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation**. Braz. J. Biol. São Carlos, v. 68, n. 4, supl. p. 957-966, nov, 2008.
- ALHO, C. J. R. **Concluding remarks: overall impacts on biodiversity and future perspectives for conservation in the Pantanal biome**. Brazilian journal of biology - Revista brasileira de biologia, v. 71, n. 1 Suppl 1, p. 337–341, 2011.
- ALHO, C. J. R.; SILVA, J. S. V. **Effects of Severe Floods and Droughts on Wildlife of the Pantanal Wetland (Brazil)-A Review**. Animals: an open access journal from MDPI. vol. 2,4 591-610. 15 out, 2012.
- ALTSCHUL, S. F. **BLAST Algorithm**. Encyclopedia of Life Sciences, 2005.
- AMARAL, M.; BARA, M. T. **Avaliação de Atividade Antifúngica de Extratos de Plantas sobre o Crescimento de Fitopatógenos**. Revista Eletrônica de Farmácia, v. 2, n. 2, p. 5–8, 2005.
- ARIEIRA, J.; CUNHA, C. N. DA. **Fitossociologia de uma floresta inundável monodominante de *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae), no Pantanal Norte, MT, Brasil**. Acta Botanica Brasilica, v. 20, n. 3, p. 569–580, 2006.
- ARNOLD, A. E. **Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers**. Fungal Biology Reviews, 2007.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. DE. **Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants**. Electronic Journal of Biotechnology, 2000.
- BACON, C. W.; WHITE, J. F. **Microbial Endophytes**. Marcel Dekker Inc., New York, p. 4–5, 2000.
- BAE, S. J.; MOHANTA, T. K.; CHUNG, J. Y.; et al. ***Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora pathogens***. Biological Control, v. 92, p. 128–138, 2016.
- BEZERRA, J. D. P. et al. **Endophytic Fungi from Medicinal Plant *Bauhinia Forficata*: Diversity and Biotechnological Potential**. Brazilian Journal of Microbiology, 2015.
- BILLS, G. F. et al. ***Hypoxylon Pulicicidum* Sp. Nov. (Ascomycota, Xylariales), a Pantropical Insecticide-Producing Endophyte**. PLoS ONE, 2012.
- BITZER, J. et al. **Affinities of Phylacia and the Daldinoid Xylariaceae, Inferred from Chemotypes of Cultures and Ribosomal DNA Sequences**. Mycological Research, 2008.

BONOMO, R.A.; DORA, S; **Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa***. CDI 2006:43. 2016

BORTALANZA, L. B.; FERREIRA, J.; HESS, S. C.; et al. **Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice**. European Journal of Pharmacology, v. 453, n. 2–3, p. 203–208, 2002.

BROOKE, J. S.; **Stenotrophomonas maltophilia: an Emerging Global Opportunistic Pathogen**. Clinical Microbiology Reviews. v.25, n.1 p. 2– 41, 2012.

BRUNNER, F.; PETRINI, O. **Taxonomy of some *Xylaria* species and xylariaceous endophytes by isozyme electrophoresis**. Mycological Research, v. 96, n. 9, p. 723–733, 1992.

CHAN, C. L.; YEW, S. M.; NGEOW, Y. F.; NA, S. L.; LEE, K. W.; HOH, C. C.; YEE, W. Y.; NG, K. P. **Genome analysis of *Daldinia eschscholtzii* strains UM 1400 and UM 1020, wood-decaying fungi isolated from human hosts**. BMC Genomics 16: 966, 2015.

CLAY, K.; HOLAH, J.; RUDGERS, J. A. **Herbivores casue a rapid increase in hereditary symbiosis and alter plant comunity composition**. Proceedings of the National Academy of Science, v. 102, p. 12465–12470, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). M100-S25. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Twenty-Fifth Informational Supplement, 2015.

CRUZ, K. S.; CORTEZ, V. G. ***Hypoxylon* (Xylariaceae, Ascomycota) from Western Paraná, Brazil**. Brazilian Journal of Botany, v. 38, Issue 4, pp 889–901, 2015.

CUNHA, C. N. DA; JUNK, W. J. **The Impact of Flooding on Distribution of Woody Plant Communities in the Pantanal of Poconé, Mato Grosso, Brazil**. German-Brazilian Workshop on Neotropical Ecosystems, p. 557–560, 2000.

CUNHA, C. N. DA; JUNK, W. J. **Year-to-year changes in water level drive the invasion of *Vochysia divergens* in Pantanal grasslands**. Applied Vegetation Science, v. 7, n. Adámoli 1982, p. 103–110, 2004.

DAI, D. Q.; PHOOKAMSAK, R; WIJAYAWARDENE, N. N.; LI, W. J. et al. **Bambusicolous fungi**. Fungal Divers 82:1–105, 2016.

DARANAGAMA, D. A.; LIU, X.; CHAMYUANG S.; STADLER M.; HYDE K. D. **A Multiple Gene Genealogy Reveals Phylogenetic Placement of *Rhopalostroma Lekae***. Phytotaxa, 2014.

DARANAGAMA, D. A. et al. ***Anthostomella* Is Polyphyletic Comprising Several Genera in Xylariaceae**. Fungal Diversity, 2015.

DARANAGAMA, D. A. et al. ***Rhopalostroma brevistipitatum* Sp. Nov. From Thailand with an Extended Generic Description for *Rhopalostroma***. Phytotaxa 227(3):229–42, 2015.

DARANAGAMA, D. A. et al. **Taxonomic Rearrangement of *Anthostomella* (Xylariaceae) Based on a Multigene Phylogeny and Morphology**. Cryptogamie, Mycologie, 2016.

DARANAGAMA, D. A. et al. **Towards a Natural Classification and Backbone Tree for Graphostromataceae, Hypoxylaceae, Lopadostomataceae and Xylariaceae**. Fungal Diversity, 2018.

DENNIS, R. W. G. **Xylarioideae and Thamnomycetoideae of Congo**. Bulletin, Source Jun, Fasc 31(May):109–54, 1961.

EKANAYAKE, P. N.; KAUR, J.; TIAN, P. et al. **Genomic and metabolic characterisation of alkaloid biosynthesis by asexual *Epichloë* fungal endophytes of tall fescue pasture grasses**. Genome, v. 14, n. January, p. 1–42, 2017.

FANG, W.; JI, S.; JIANG, N.; WANG, W.; ZHAO, G. Y.; ZHANG, S.; GE, H. M.; XU, Q.; ZHANG, A. H.; ZHANG, Y. L.; SONG, Y. C.; ZHANG, J.; TAN, R. X. **Naphthol radical couplings determine structural features and enantiomeric excess of dalesconols in *Daldinia eschscholzii***. Nature Communications 3 Article 1039, 2012.

FOGO, A. S.; ANTONIOLI, E.; CALIXTO, J. B.; CAMPOS, A. H. **Tormentic acid reduces vascular smooth muscle cell proliferation and survival**. European Journal of Pharmacology, v. 615, n. 1–3, p. 50–54, 2009.

FOURNIER, J.; STADLER, M.; HYDE, K. D.; DUONG, M. L. **The new genus *Rostrohypoxylon* and two new *Annulohypoxylon* taxa from Northern Thailand**. Fungal Divers 40:23–36, 2010.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). **Reestimativa da safra de laranja 2016/17 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo / Sudoeste Mineiro – Fechamento em Abril/2017**, 2017.

GALLO, M. B. C.; PUPO, M. T.; BASTOS, J. K.; NUNES, A. S.; COELHO, B. et al. **Atividade Citotóxica de Extratos de Fungos Endofíticos Isolados de *Smallanthus sonchifolius***. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 402-404, jul. 2007.

GLIENKE, C. ***Guignardiicitricarpa kiely*: Análise Genética, Cariotípica e Interação com o Hospedeiro**, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.

GOLINSKA, P.; WYPIJ, M.; AGARKAR, G. et al. **Endophytic actinobacteria of medicinal plants: Diversity and bioactivity**. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology, 2015.

GOMES, R. R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, S. I. R. et al. ***Diaporthe*: A genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi**. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 31, p. 1–41, 2013.

GOS, F. M. W. R.; SAVI, D. C.; SHAABAN, K. A.; THORSON, J. S.; ALUIZIO, R.; POSSIEDE, Y. M. et al. **Antibacterial activity of endophytic actinomycetes isolated from the medicinal plant *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil)**. *Front. Microbiol.* 8:1642, 2017.

GREENHALGH, G. N.; CHESTERS, C. G. C. **Conidiophore Morphology in Some British Members of the Xylariaceae**. *Transactions of the British Mycological Society* 51(1):57-IN6, 1968.

HALL, T. A. **BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p. 95–98, 1999.

HOKAMA, Y. M. **Identificação Molecular de Fungos Endofíticos de *Vochysia divergens* Pohl (Vochysiaceae) do Pantanal Sul-Mato-Grossense e Controle Biológico de *Phyllosticta citricarpa***. Dissertação. Universidade Federal Do Paraná, 2012.

HOKAMA, Y. M.; SAVI, D. C.; ASSAD, B.; ALUIZIO, R.; GOMES-FIGUEIREDO, J. A.; ADAMOSKI, D. M.; POSSIEDE, Y. M.; GLIENKE, C. **Endophytic Fungi Diversity, characterization and biocontrol**. *Microbiology Research Advances*, 2017.

HSIEH, H-M; JU, Y-M; ROGERS, J. D. **Molecular Phylogeny of *Hypoxylon* and Closely Related Genera**. *Mycologia*, 2005.

HOOG, G. S. DE; BOWMAN, B.; GRASER, Y. et al. **Molecular phylogeny and taxonomy of medically important fungi**. *Medical Mycology.*, v. 36 Suppl 1, n. 1369–3786 (Print), p. 52–56, 1998.

HWANG, A. Y.; GUMS, J. G. **The emergence and evolution of antimicrobial resistance: Impact on a global scale**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 24, n.24, p. 6440–6445, 2016.

JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAN, R. T. **Evaluation of Endophytes for Their Antimicrobial Activity from Indigenous Medicinal Plants Belonging to North Maharashtra Region India**. *International Journal on Pharmaceutical and Biomedical Research*, 2010.

JOHANNESSON, H; LAESSØE, T; STENLID, J. **Molecular and morphological investigation of the genus *Daldinia* in Northern Europe**. *Mycological Research* 104: 275–280, 2000.

JU, Y-M; ROGERS, J. D. **A Revision of the Genus *Hypoxylon***. *Mycologia Memoir* 20:365, 1996.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia Médica – Texto e atlas**, 2a ed. São Paulo: Editora Premier, 1999.

KUHNERT, E.; FOURNIER, J.; PERŠOH, D.; LUANGSA-ARD, J. J. D.; STADLER, M. **New *Hypoxylon* species from Martinique and new evidence on the molecular phylogeny of *Hypoxylon* based on ITS rDNA and β -tubulin data**. Fungal Diversity, v. 64, n. 1, p. 181–203, 2014.

KUHNERT, E.; SIR, E. B.; LAMBERT, C.; HYDE, K. D.; HLADKI, A. I.; ROMERO, A. I.; STADLER, M. **Phylogenetic and chemotaxonomic resolution of the genus *Annulohypoxylon* (Xylariaceae) including four new species**. Fungal Divers 85:1–43, 2017.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. **MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets**. Molecular Biology and Evolution, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

LAMBERT, C.; WENDT L.; HLADKI, A. I.; STADLER M.; SIR, E. B. ***Hypomontagnella* (Hypoxylaceae): A New Genus Segregated from *Hypoxylon* by a Polyphasic Taxonomic Approach**. Mycological Progress, 2018.

LIU, Y. J.; WHELEN S.; HALL, B. D. **Phylogenetic Relationships among Ascomycetes: Evidence from an RNA Polymerase II Subunit**. Molecular Biology and Evolution, 1999.

LUMBSCH, H. T.; HUHNDORF, S. M. **Myconet Volume 14. Part One. Outline of Ascomycota—2009. Part Two. Notes on Ascomycete Systematics. Nos. 4751–5113**. Fieldiana. Life and Earth Sciences, v. 1, n. 1, p. 1–64, 2010.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. **Towards a Natural Classification and Backbone Tree for Sordariomycetes**. Fungal Diversity 72(1):199–301, 2015.

MORAKOTKARN, D.; KAWASAKI, H.; SEKI, T. **Molecular diversity of bamboo-associated fungi isolated from Japan**. FEMS Microbiology Letters, v. 266, n. 1, p. 10–19, 2007.

NALINI, M. S.; SUNAYANA, N.; PRAKASH, H. S. **Endophytic Fungal Diversity in Medicinal Plants of Western Ghats, India**. International Journal of Biodiversity, v. 2014, p. 1–9, 2014.

NARMANI, A. et al. ***Daldinia sacchari* (Hypoxylaceae) from India Produces the New Cytochalasins Saccalasins A and B and Belongs to the *D. eschscholtzii* Species Complex**. Mycological Progress, 2018.

NORILER, S. A.; SAVI, D. C.; ALUIZIO, R; PALÁCIO-CORTES; A. M.; POSSIEDE, Y. M.; GLIENKE, C. **Bioprospecting and Structure of Fungal Endophyte Communities Found in the Brazilian Biomes, Pantanal, and Cerrado**. Front. Microbiol. 9:1526, 2018.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK E. **Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types**

within a Monophyletic Lineage of the Fungus Fusarium Are Nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1997.

OLDFIELD, E.; LIN, F. Y. **Terpene biosynthesis: Modularity rules.** *Angewandte Chemie - International Edition*, 2012.

PETRINI, L., PETRINI, O., **Xylariaceous fungi as endophytes.** *Sydowia* 38, 216–234, 1985.

PIMENTEL, I. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; GABARDO, J.; STUART, R. M.; AZEVEDO, J. L. **Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions.** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 49, n. 5, p. 705–711, 2006.

POSSIEDE, Y. M. et al. **Fungicide Resistance and Genetic Variability in Plant Pathogenic Strains of *Guignardia citricarpa*.** *Brazilian Journal of Microbiology*, 2009.

RADIC, N.; STRUKELJ, B. **Endophytic Fungi - The Treasure Chest of Antibacterial Substances.** *Phytomedicine*, 2012.

RAEDER, U.; BRODA, P. **Rapid Preparation of DNA from Filamentous Fungi.** *Letters in Applied Microbiology* 1(1):17–20, 1985.

ROGERS, J. D. **Molecular phylogeny of *Hypoxyton* and closely related genera.** *Mycological Society of America*. v. 82, n. 4, p. 501–505, 2015.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; MARK, P. VAN DER; et al. **Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space.** *Systematic Biology*, v. 61, n. 3, p. 539–542, 2012.

SANCHES, L.; VOULRLITIS, G. L.; ALVES, M. C.; PINTO JUNIOR, O. B.; NOGUEIRA, J. S. **Seasonal patterns of evapotranspiration for a *Vochysia divergens* forest in the Brazilian Pantanal.** *Wetlands*, v.31, p.1215-1225, 2011.

SANCHEZ, S.; DEMAIN A. L. **Metabolic Regulation of Fermentation Processes.** *Enzyme and Microbial Technology*, 2002.

SÁNCHEZ, J. S. **Resistencia a antibióticos.** *Revista Latinoamericana de Microbiología*, v. 48, n. 2, p. 105–106, 2006.

SAVI, D. C. **Biodiversidade E Bioprospecção De Actinomicetos Da Planta *Vochysia divergens* (Cambará).** *Dissertação. Universidade Federal Do Paraná*, 2011.

SAVI, D. C.; SHAABAN, K. A.; VARGAS, N.; et al. ***Microbispora* sp. LGMB259 endophytic actinomycete isolated from *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil) producing β -carboline and indoles with biological activity.** *Current Microbiology*, v. 70, n. 3, p. 345–354, 2014.

SAVI, D. C. et al. **Antitumor, Antioxidant and Antibacterial Activities of Secondary Metabolites Extracted by Endophytic Actinomycetes Isolated from *Vochysia Divergens***. International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences 5(1):347–56, 2015.

SAVI, D. C.; HAMINIUK, C. W. I.; SORA, G.; et al. **Antitumor, Antioxidant and Antibacterial Activities of Secondary Metabolites Extracted by Endophytic Actinomycetes Isolated from *Vochysia divergens***. International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences, v. 5, n. 1, p. 347–356, 2015.

SHARMA, D.; PRAMANIK, A.; AGRAWAL, P. K. **Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosa* D. Don.** 3 Biotech, v. 6, n. 2, 2016.

SIR, E.B. et al. **New Species and Reports of *Hypoxylon* from Argentina Recognized by a Polyphasic Approach**. Mycological Progress, 2016.

SOARES, J. J.; OLIVEIRA, A. K. M. DE. O paratidal do Pantanal de Miranda, Corumbá-MS, Brasil. **Revista Árvore**, v. 33, n. 2, p. 339–347, 2009.

STADLER, M.; BAUMGARTNER, M.; GROTHE, T.; MÜHLBAUER, A.; SEIP, S.; WOLLWEBER, H. **Concentricol, a taxonomically significant triterpenoid from *Daldinia concentrica***. *Phytochemistry* 56:787-793, 2001a.

STADLER, M.; WOLLWEBER, H.; MU, A.; HASHIMOTO, T.; ROGERS, J. D.; JU, Y.; WETZSTEIN, H.; TICHY, H. **Molecular chemotaxonomy of *Daldinia* and other *Xylariaceae***. *Mycological Research* 105:1191-1205, 2001b.

STADLER, M.; HELLWIG V. **Chemotaxonomy of the Xylariaceae and Remarkable Bioactive Compounds from Xylariales and Their Associated Asexual Stages**. Recent Research Developments in Phytochemistry, 2005.

STADLER, M. **Importance of secondary metabolites in the Xylariaceae as parameters for assessment of their taxonomy, phylogeny, and functional biodiversity**. Current Research in Environmental & Applied Mycology, v. 1, n. 2, p. 75–133, 2011.

STADLER, M; KUHNERT E.; PERŠOH D.; FOURNIER J. **The Xylariaceae as Model Example for a Unified Nomenclature Following the ‘One Fungus-One Name’ (1F1N) Concept**. *Mycology: An International Journal on Fungal Biology* 4(1):5–21, 2013.

STADLER, M. et al. **A Polyphasic Taxonomy of *Daldinia* (Xylariaceae)**. *Studies in Mycology* 77:1–143, 2014.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. **Atividade Enzimática de Microrganismos Isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban)**. Campinas: Ciênc. Tecnol. Aliment. vol. 18 n. 4, 1998.

STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE, J. F. **An overview of endophytic microbes: endophytism defined.** *Microbial Endophytes*, n. January 2000, p. 3–29, 2000.

STROBEL, G. A. **Rainforest endophytes and bioactive products.** *Critical reviews in biotechnology*, v. 22, n. 4, p. 315–333, 2002.

SURUP, F.; KUHNERT, E.; LISCINSKIJ, E.; STADLER, M. **Silphiperfolene-Type Terpenoids and Other Metabolites from Cultures of the Tropical Ascomycete *Hypoxyton rickii* (Xylariaceae).** *Natural Products and Bioprospecting*, v. 5, n. 3, p. 167–173, 2015.

TANG, A. M. C.; JEEWON, R.; HYDE, K. D. **A re-evaluation of the evolutionary relationships within the Xylariaceae based on ribosomal and protein-coding gene sequences.** *Fungal Divers.*, v. 34, p. 127, 2009.

TARMAN, K.; PALM, G. J.; PORZEL, A.; MERZWEILER, K.; ARNOLD, N.; WESSJOHANN, L. A.; UNTERSEHER, M.; LINDEQUIST, U. **Helicascolide C, a new lactone from an Indonesian marine algicolous strain of *Daldinia eschscholzii* (Xylariaceae, Ascomycota)** *Phytochemistry Letters* 5:83-86, 2012.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: **Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Research*, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

TONIAL, F. et al. **Influence of Culturing Conditions on Bioprospecting and the Antimicrobial Potential of Endophytic Fungi from *Schinus Terebinthifolius*.** *Current Microbiology*, 2016.

TRIEBEL, D; PERŠOH, D; WOLLWEBER, H; STADLER, M. **Phylogenetic relationships among *Daldinia*, *entonaema* and *Hypoxyton* as inferred from ITS nrDNA sequences.** *Nova Hedwigia* 80, 25–43, 2005.

U'REN, J. M.; MIADLIKOWSKA, J.; ZIMMERMAN, N. B.; et al. **Contributions of North American endophytes to the phylogeny, ecology, and taxonomy of Xylariaceae (Sordariomycetes, Ascomycota).** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 98, p. 210–232, 2016.

VENIERAKI, A.; DIMOU, M; KATINAKIS, P. **Endophytic Fungi Residing in Medicinal Plants Have the Ability to Produce the Same or Similar Pharmacologically Active Secondary Metabolites as Their Hosts.** *Hellenic Plant Protection Journal*, 2017.

VILGALYS, R; HESTER, M. **Rapid Genetic Identification and Mapping of Enzymatically Amplified Ribosomal DNA from Several *Cryptococcus* Species.** *Journal of Bacteriology*, 1990.

VIZCAINO, J. A.; SANZ, L.; BASILIO, A.; et al. **Screening of antimicrobial activities in *Trichoderma* isolates representing three *Trichoderma* sections.** *Mycological Research*, v. 109, n. 2005, p. 1397–1406, 2005.

WENDT, L. et al. **Resurrection and Emendation of the Hypoxylaceae,**

Recognised from a Multigene Phylogeny of the Xylariales. Mycological Progress, 2018.

WHALLEY, A. J. S.; EDWARDS, R. L. **Secondary Metabolites and Systematic Arrangement within the Xylariaceae.** Canadian Journal of Botany 73(S1):802–10, 1995.

WHALLEY, A. J. S. **The xylariaceous way of life.** Mycological Research, v. 100, n.8, p. 897–922, 1996.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics.** PCR Protocols, 1990.

WHITE, J. F.; TORRES, M. S. **Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection?** Physiologia Plantarum, 2010.

WIDMER, T. L. **Screening *Trichoderma* species for biological control activity against *Phytophthora ramorum* in soil.** Biological Control, v. 79, p. 43–48, 2014.

WILLINK, P. W.; CHERNOFF, B.; ALONSO, L. E.; MON TAMBAULT, J. R.; LOURIVAL, R. **A biological assessment of the aquatic ecosystems of the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil,** 2000.

WU, W.; TRAN, W.; TAATJES, C. A.; et al. **Rapid discovery and functional characterization of terpene synthases from four endophytic xylariaceae.** PLOS ONE, v. 11, n. 2, 2016.

YUYAMA, K. T. et al. **Bioactive Compounds Produced by *Hypoxylon fragiforme* against *Staphylococcus Aureus* Biofilms.** Microorganisms 5(4):80, 2017.

ZHANG, Y. L.; GE, H. M.; ZHAO, W.; DONG, H.; XU, Q.; LI, S. H.; LI, J.; ZHANG, J.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. **Unprecedented immunosuppressive polyketides from *Daldinia eschscholzii*, a mantis-associated fungus.** Angewandte Chemie International Edition in English 47:5823-5826, 2008.

ZHANG, Y. L.; ZHANG, J.; JIANG, N.; LU, Y. H.; WANG, L.; XU, S. H.; WANG, W.; ZHANG, G. F.; XU, Q.; GE, H. M.; MA, J.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. **Immunosuppressive polyketides from mantis-associated *Daldinia eschscholzii*.** Journal of the American Chemical Society 133:5931-5940, 2011.