

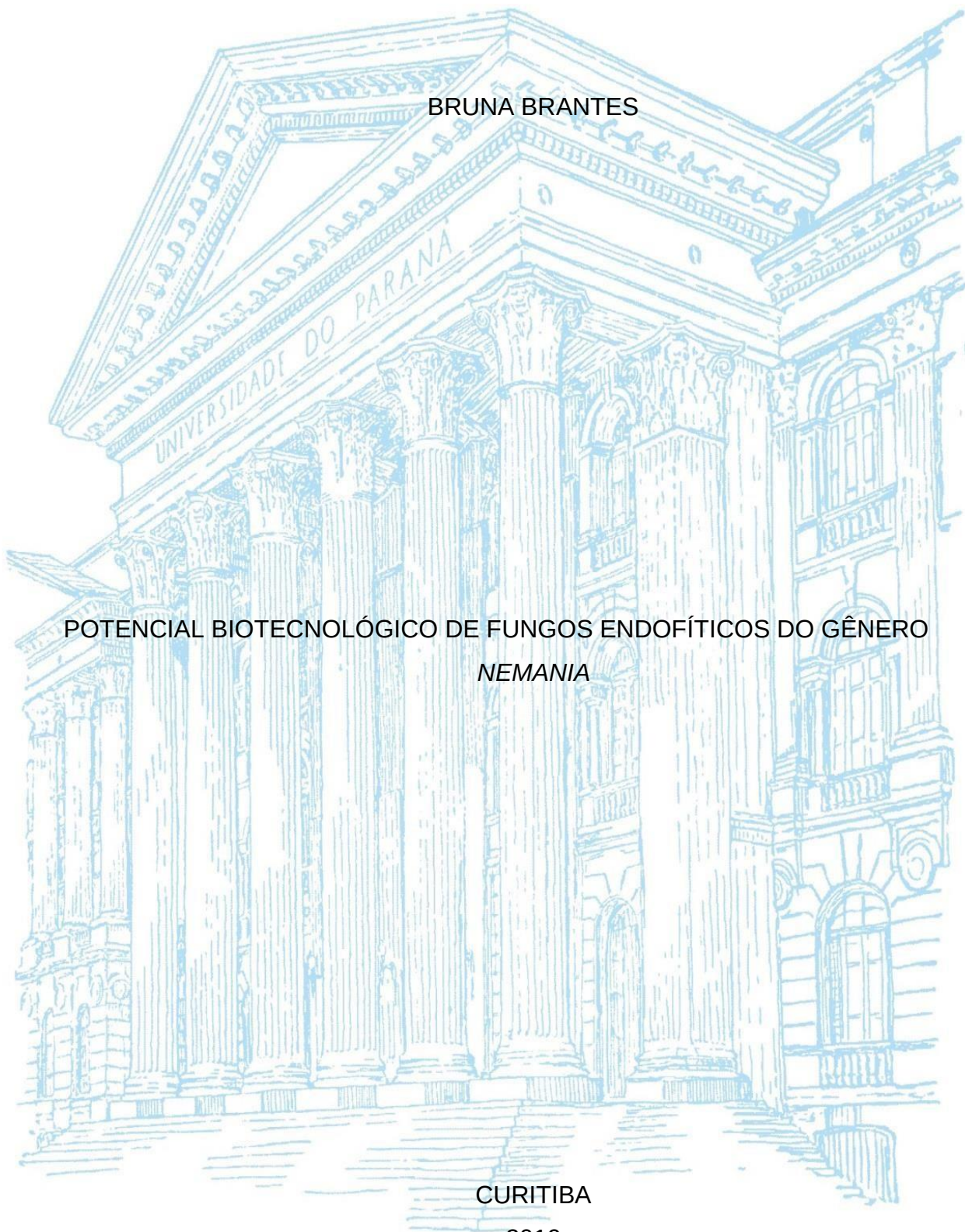
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA BRANTES

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO
NEMANIA

CURITIBA

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA BRANTES

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GÊNERO
NEMANIA

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Merlo Kava

CURITIBA

2019

Dedico a minha amada mãe, a mulher mais guerreira que eu conheço, ao meu irmão, mais novo Aspirante-a-Oficial do Exército Brasileiro e meu orgulho e ao meu namorado, pelo amor e dedicação nesses nossos 8 anos juntos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me dar forças ao longo de toda essa jornada.

À minha mãe Lilian e irmão Vinícius por estarem sempre me apoiando, incentivando e vibrando com todas as minhas conquistas dentro e fora da Universidade.

Ao meu namorado Sami Bark, que está ao meu lado desde o ensino médio, comemorando minhas vitórias e me ajudando a superar as derrotas.

Às minhas avós, avô, madrinha, tios, tias, futura sogra e cunhada que sempre se orgulharam de mim, e me fizeram acreditar que com dedicação tudo é possível.

À minha orientadora Profa. Dra. Vanessa Merlo Kava por ter aceitado me orientar e por todo o conhecimento transmitido dentro e fora do laboratório.

Ao Prof. Dr. Douglas Adamoski Meira e Profa. Dra. Lygia Vitória Galli-Terasawa por aceitarem compor a banca de avaliação deste trabalho, cujas considerações julgo de valor inestimável.

Ao meu amigo e “pseudo-coorientador” Gustavo Henrique Gomes Jungklaus, pelos anos de amizade, auxílio nas práticas laboratoriais e por todos os conselhos dados.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos – LabGeM, pelos bons momentos e risadas dadas durante essa jornada.

Às famílias Clarson e Cobb, que me acolheram durante os 18 meses do meu intercâmbio para os Estados Unidos da América, por me tratarem como filha e por toda a ajuda com o idioma Inglês.

Ao CNPq pela oportunidade de participar de um programa de Iniciação Científica e pela bolsa concedida.

Enfim, é com um imenso carinho e muito amor que agradeço e dedico a todos vocês essa vitória.

“Tudo o que temos de decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado.”
J.R.R. Tolkien

RESUMO

Fungos endofíticos representam uma fonte rica de metabólitos secundários bioativos, possivelmente devido às interações metabólicas com seus hospedeiros. Além da capacidade de produzir a mesma substância sintetizada por seus hospedeiros ou análogos bioativos, esses microrganismos são capazes de sintetizar novas moléculas com atividade antifúngica, anticancerígena, imunossupressora, entre outras. Em adição a todas essas possibilidades, esses microrganismos apresentam um potencial biotecnológico também por produzirem enzimas que degradam material vegetal, incluindo celulasas, podendo, por exemplo, atuar na produção de bioetanol celulósico como biocombustível de segunda geração, uma alternativa aos combustíveis fósseis. Nesse trabalho foram investigados quatro isolados de fungo endofítico do gênero *Nemania*, para a produção de metabólitos secundários com ação antifúngica e produção de enzimas do tipo celulasas. Nos testes de antagonismos contra fungos fitopatogênicos de plantas cítricas, os isolados LGMF1989 e LGMF1990 inibiram, 71,4% e 69,6 % respectivamente, o crescimento de *Penicillium digitatum*, causador do bolor verde em citros, em experimentos *in vitro*. Os isolados 28F1 e 38F4 apresentaram melhores resultados inibindo o patógeno *Colletotrichum abscissum*, causador da queda prematura dos citros, inibindo respectivamente 64,1% e 40,9% *in vitro*. Além dessa inibição, os 4 isolados produziram metabolitos secundários que foram secretados no meio de cultura, e mantiveram a ação de inibição do desenvolvimento do patógeno na área central da placa de Petri por mais de 5 dias. Nos testes para a produção de celulasas, o isolado com melhor resultado foi o 28F1, com uma produção enzimática de 0,587 UI/mL, indicando potencial biotecnológico se comparado a outros gêneros na literatura. Com estes resultados, pode-se dizer que o gênero *Nemania* apresenta potencial para uso em controle biológico e também na produção de enzimas do tipo celulasas.

Palavras-chave: atividade antifúngica, celulasas, biocontrole, metabolitos secundários.

ABSTRACT

Endophytic fungi represent a rich source of bioactive secondary metabolites, possibly due to metabolic interactions with their hosts. Besides being able to produce the same substance synthesized by their hosts or bioactive analogs, these microorganisms are able to synthesize new molecules with antifungal, anticancer, immunosuppressive activity, among others. In addition to all these possibilities, these microorganisms also have biotechnological potential because they produce enzymes that degrade plant material, including cellulases, and may, for example, act in the production of cellulosic bioethanol as a second generation biofuel, an alternative to fossil fuels. In this research four isolates of endophytic fungus of the genus *Nemania* for the production of secondary metabolites with antifungal action and production of cellulase enzymes were investigated. In the tests against phytopathogenic fungi of citrus plants, the isolates LGMF1989 and LGMF1990 inhibited, 71.4% and 69.6% respectively, the growth of *Penicillium digitatum*, which causes Green Mold in citrus, in *in vitro* experiments. The isolates 8F1 and 38F4 showed better results inhibiting the pathogen *Colletotrichum abscissum*, which causes Postblom Fruit Drop, respectively inhibiting 64.1% and 40.9% *in vitro*. In addition to this inhibition, the 4 isolates produced secondary metabolites that were released into the culture medium and maintained the pathogen development inhibiting action in the central area of the Petri dish for more than 5 days. In the cellulase production tests, the most successful isolate was 28F1, with an enzymatic production of 0.587 IU / mL, indicating biotechnological potential compared to other genera in the literature. With these results it can be said that the genus *Nemania* has potential for use in biological control and also in the production of cellulase enzymes.

Keywords: antifungal activity, cellulases, biocontrol, secondary metabolites.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	10
2.1. OBJETIVO GERAL	10
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	11
3.1. FUNGOS DO GÊNERO <i>Nemania</i>	11
3.2. CONTROLE BIOLÓGICO.....	11
3.3. FUNGOS FITOPATOGÊNICOS	12
3.3.1. <i>Penicillium digitatum</i>	12
3.3.2. <i>Colletotrichum abscissum</i>	12
3.3.3. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	13
3.4. CELULASES	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	14
4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS DO rDNA	14
4.2.1. Extração de DNA.....	14
4.2.2. Amplificação e sequenciamento da região ITS do rDNA.....	15
4.3. TESTES DE ANTAGONISMO	15
4.4. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NÃO-VOLÁTEIS	16
4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA.....	16
4.6. PRODUÇÃO DE CELULASES.....	17
4.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA.....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5.1. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS DO rDNA	17
5.2. TESTES DE ANTAGONISMO	19
5.3. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NÃO-VOLÁTEIS	23
5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA.....	26
5.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA.....	28
6. CONCLUSÃO.....	30
7. REFERENCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Nemania* pertencente à família *Xylariaceae* é conhecido principalmente pela sua atividade saprofítica decompositora em substratos de madeira (OKANE et al. 2008). Algumas espécies também estão associadas a doenças que afligem Angiospermas como, por exemplo, *Nemania diffusa* (BALASURIYA, ADIKARAM, 2002). E esse gênero também já foi descrito como endofítico, nas regiões tropicais e temperadas (CHEN et al., 2013). Os fungos endofíticos passam todo ou parte do seu ciclo de vida colonizando tecidos na forma de hospedeiros, sem causar nenhuma doença a planta, e em alguns casos, agem como mecanismos de defesa e promovem à planta a habilidade de se adaptar ao estresse biótico e abiótico (KOGEL et al., 2006).

No Brasil, devido ao clima tropical úmido e subtropical, o ataque de diversos tipos e formas de pestes agrícolas que causam doenças nos cultivos é bastante danoso. Essas doenças podem reduzir a produção anual de 15% a 20%, e em casos mais graves, as perdas podem atingir a 100% (JULIATTI et al., 2005).

Entre as diversas doenças agrícolas causadas por fungos, pode-se citar o Bolor Verde, doença de pós-colheita que atinge os cultivos de citros, causada pelo fitopatógeno *Penicillium digitatum*. A doença ocorre em diversas regiões do Brasil e do mundo (FRANCO et al., 2000), podendo causar até 90% de perda da safra (MARCET-HOUBEN et al., 2012).

Outra doença que também aflige os cultivos de citros, é causada pelo fungo *Colletotrichum abscissum*, e geralmente compromete o início do período de floração das plantas cítricas, apodrecendo-as, impedindo o amadurecimento das flores e a posterior frutificação da planta. A doença é conhecida como Podridão Floral dos Citros (PFC) (TIMMER et al., 1994).

Já a doença causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, conhecida como Mofo Branco, causa danos em muitas plantas de interesse econômico, entre elas destacam-se a soja, girassol, canola, ervilha, feijão, alfafa, fumo, tomate e batata (LEITE, 2005). É um importante fitopatógeno habitante do solo, sendo responsável por podridão de raízes e do colmo, murcha e tombamento de plântulas (BEDENDO et al., 1995).

O método mais utilizado no Brasil para administrar essas entre outras doenças é através do uso de fungicidas químicos. Porém, além de gerar uma grande poluição ambiental, ser – em sua maioria – danosos a saúde da população, a utilização desses fungicidas podem selecionar patógenos resistentes diminuindo assim a eficiência ao combate da doença.

Com o intuito de minimizar o uso desses agroquímicos, o controle biológico surgiu como uma alternativa extremamente necessária e essencial para a agricultura (GARCIA et al., 2017). A interação entre hospedeiro e patógeno pode ter o potencial de limitar a atividade do patógeno ou de aumentar a resistência do hospedeiro.

Fungos endofíticos de diversos gêneros, incluindo o gênero *Nemania* apresentam potencial para sua utilização no controle biológico devido suas características moleculares.

Além de produção de compostos para possível controle biológico, um grande número de microrganismos, incluindo fungos, é capaz de produzir celulasas. Celulasas são enzimas capazes de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol (CASTRO et al., 2009).

Devido a essas potenciais habilidades de controle biológico e produção de celulasas, quatro isolados de fungos endofíticos do gênero *Nemania* serão testados para a produção de compostos antifúngicos e antibactericidas, e para produção enzimática.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial biotecnológico de fungos endofíticos do gênero *Nemania* na degradação de celulose e no controle biológico de fungos fitopatogênicos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar em nível de espécie os isolados do gênero *Nemania* LGMF1989, LGMF1990, 28F1 e 38F4, através de sequenciamento da região ITS do rDNA.
- Avaliar a atividade antagonista dos isolados do gênero *Nemania* LGMF1989, LGMF1990, 28F1 e 38F4 contra os fitopatógenos *Penicillium digitatum*, *Colletotrichum abscissum* e *Sclerotinia sclerotiorum*, por meio de testes de antagonismo em placa.
- Avaliar a capacidade dos metabólitos produzidos liberados no meio de cultura por isolados do gênero *Nemania* inibir ou retardar o crescimento dos fitopatógenos, através de testes em placa.
- Avaliar atividade celulolítica e produção de celulases dos isolados do gênero *Nemania* LGMF1989, LGMF1990, 28F1 e 38F4, através de testes de formação de halos de hidrolise em placa e método de redução de açúcar.

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1. FUNGOS DO GÊNERO *Nemania*

O gênero *Nemania*, pertencente à família *Xylariaceae*, foi descrito primeiramente por S.F. Gray em 1821, e em seguida reclassificado como gênero *Hypoxylon*, e assim ficou até 2002. Nesse ano Ju e Rogers (2002) distinguiram morfologicamente os gêneros onde a principal diferença é com relação à sua estrutura stroma (Stromata), em troncos de árvores, que se apresentam da coloração marrom mais carbonácea e quando em contato com uma solução de hidróxido de potássio (KOH) a 10% não liberam pigmentos coloridos.

São consideradas características próprias do gênero *Nemania*, a presença de um stroma com peritécios múltiplos, carbonáceos e superficiais e um tecido interno de diferentes colorações e ostíolos papilados. As semelhanças de coloração, com gêneros próximos, assim como o tardio aparecimento das estruturas reprodutivas *in vitro* são fatores que dificultam a identificação morfológica do fungo (FOURNIER et al., 2017).

Trabalhos recentes identificaram vários compostos nos extratos de isolados do gênero *Nemania*, (*Nemania* sp. e *Nemania serpens*) que demonstraram, em testes *in vitro*, ações biológicas como antifúngica e antibacteriana contra diversos patógenos e também atividade citotóxica contra células carcinogênicas humanas. Entre os patógenos que foram inibidos pela ação de extratos do fungo do gênero *Nemania* pode-se citar *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*. (IBRAHIM et al., 2017; KORNSAKULKARN et al., 2017).

3.2. CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico de doenças e pragas ganhou um enfoque dentro das pesquisas agrícolas por conta da demanda crescente de alimentos sem resíduos de agroquímicos. Os primeiros bioinseticidas utilizados no Brasil, surgiram na década de 50, e o controle por ação antagonista, no início da década de 90 (BETTIOL et al. 2009). Os

fungos entomopatogênicos e os fungos endofíticos se destacam nesse controle biológico (ESPOSITO, AZEVEDO, 2010). O biocontrole por fungos possui diferentes tipos de mecanismos, podendo ser por parasitismo, no qual ele terá o hospedeiro como fonte de nutrientes; por competição, onde um dos fungos cresce mais eficientemente que o outro (MELO; AZEVEDO 1998); e na antibiose, o organismo produz metabólitos que acabam por inibir o desenvolvimento de outro (AMORIM et al. 2010).

3.3. FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

3.3.1. *Penicillium digitatum*

Ascomycota pertencente à família Trichocomaceae. O gênero é historicamente conhecido pela descoberta do antibiótico penicilina, por Alexander Fleming, pelo seu uso na produção de queijo e por ser um importante patógeno de pré e pós-colheita (VISAGIE et al. 2014). *P. digitatum* é o patógeno de pós-colheita de maior importância para citros, pois causa a doença conhecida como bolor verde, podendo danos e perda de safras. Atualmente a doença é prevenida através de fungicidas, entretanto, a seleção de cepas resistentes aos agroquímicos, como também os riscos ambientais e de saúde causado por resíduos desses produtos são uma crescente preocupação (SHARMA et al. 2009).

3.3.2. *Colletotrichum abscissum*

Ascomycota pertencente à família Glomerellaceae. O gênero *Colletotrichum* compreende cerca de 600 espécies de fungos mundialmente reconhecidos como fitopatógenos, podendo causar doenças em até 3200 espécies de plantas (O'CONNELL et al. 2012). Entre as doenças que acometem as plantas de citros, destaca-se a Queda Prematura de Frutos Cítricos (QPFC), também conhecida como Podridão Floral do Citros (PFC), causada pelo fungo *C. abscissum*, que infecta as flores de citros, causando a abscisão de frutos jovens e retenção de cálices florais nos ramos (FEICHTENBERGER et al., 2005). Assim como o *P. digitatum* a doença causa danos imensos a safras e é prevenida por agroquímicos e alguns bioprodutos a base de *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* B246

(BETTIOL et al., 2012).

3.3.3. *Sclerotinia sclerotiorum*

Ascomycota pertencente à família Sclerotiniaceae. É um dos fungos fitopatogênicos de maior relevância no mundo (LEITE, 2005). Causador da doença do Mofo Branco (MF), possui uma distribuição cosmopolita (BOLTON, THOMMA, NELSON, 2006), e acomete cerca de 400 espécies de plantas, divididas em 75 famílias (BOLAND, HALL, 1994). Dentre elas, muitas de grande importância comercial, como a soja (Fabaceae), milho e trigo (Poaceae), Girassol (Asteraceae), algodão (Malvanaceae) e batata (Solanaceae). Seu controle atualmente é realizado de maneira integrada, através do cultivo de cultivares resistentes ao patógeno, aplicação de defensivos agrícolas, rotação de culturas não hospedeiras (CUNHA, 2010) e o controle biológico com *Trichoderma* spp., que consegue parasitar escleródios no solo (SILVA, et al. 2015).

3.4. CELULASES

As celulases possuem um grande potencial biotecnológico, sendo utilizadas nas indústrias alimentícias, de rações animais, têxtil, de detergentes, na reciclagem de papel, e mais atualmente, na sacarificação de resíduos agroindustriais para a produção de etanol. (VILLELA, 2013).

Sua principal aplicação no Brasil, atualmente, é para produção de etanol de segunda geração, uma técnica para aumentar a produção do combustível sem a necessidade de mais matéria prima. Isso é possível através do reaproveitamento dos resíduos dos cultivos de cana utilizados para o etanol de 1º geração, como bagaço e palha da cana. Essa técnica envolve a utilização em grande escala de celulases, para a sacarificação dos resíduos, que serão, posteriormente, fermentados pelas leveduras, dando continuidade ao processo do mesmo modo que ocorre na produção de etanol de 1º geração.

A hidrólise enzimática da celulose, em açúcares redutores, como a glicose, envolve a ação de um complexo enzimático, denominado sistema celulolítico. As enzimas do sistema celulolítico atuam em sinergismo e são classificadas com base no modo de

catálise sobre a fibra de celulose. Nos fungos, esse complexo é dividido em 3 enzimas: As endoglucanases, as exoglucanases e as β -glucosidases (PEREIRA, 2013).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

Os 4 prováveis isolados de *Nemania* sp. (LGMF1989, LGMF1990, 28F1 e 38F4) foram obtidos em trabalhos anteriores por Evelyn Oliveira de Souza pertencente ao grupo de pesquisa do Laboratório de Genética de Microrganismos – LabGeM, no ano de 2016, durante sua monografia para o Curso de Ciências Biológicas.

Os fitopatógenos *Penicillium digitatum*, *Colletotrichum abscissum* e *Sclerotinia sclerotiorum* utilizados, pertencem a coleção microbiológica do LabGeM.

4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS DO rDNA

Foi realizado o sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA dos quatro isolados prováveis do gênero *Nemania* a fim de identificá-los a nível de espécie.

4.2.1. Extração de DNA

Foi realizada conforme protocolo de Raeder e Broda (1985). Foram inoculados 4 fragmentos de micélios em placas de Petri, contendo BDA coberto por celofane em temperatura de 25°C por três dias. Após esse período o crescimento dos micélios foi coletado, macerado com nitrogênio e colocado em microtubos de 2 mL. Foi adicionado 2 mL do tampão de extração, e deixado no vortex por 5 minutos. Depois os microtubos foram encubados em banho maria (20 min), e em gelo (10 min). As próximas etapas foram de centrifugações, transferências de sobrenadante e adições de reagentes, conforme indicado no protocolo seguido. Para finalizar, o microtubo contendo o *pellet* de DNA foi deixado secando *overnight* em temperatura ambiente, e ressuspendido com água

ultrapura no dia seguinte.

4.2.2. Amplificação e sequenciamento da região ITS do rDNA

Foram utilizados primers ITS1 e ITS4 para amplificação do DNA ribossomal. Para amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 foi realizado uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C, seguido de extensão final de 3 minutos a 72°C.

As amostras de DNA foram analisadas em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X, aplicando-se 3 µL da amostra, 1 µL de tampão e 5 µL de marcador de peso molecular Kasvi 1kb (1000bp) em poços no gel e foram submetidas a 200 V/cm por 20 minutos. Após o término da corrida, o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

Para a purificação das PCRs, foram utilizadas as enzimas Exo 1 e Fast AP.

As amostras foram enviadas a empresa Ludwig Biotecnologia para realização do sequenciamento. A edição e o alinhamento das sequências obtidas foram realizados com o programa BioEdit e MEGA. As sequências foram confrontadas com as sequências do banco de dados do GenBank utilizando o programa BLAST.

4.3. TESTES DE ANTAGONISMO

Para o teste de antagonismo foram inoculados em uma das extremidades da placa de Petri, em meio BDA, um micélio de 4mm de diâmetro dos 4 isolados de *Nemania* e incubados a 25°C por 5 dias para o crescimento do fungo. Após esse período houve a inoculação de micélio de 2mm de diâmetro, do fitopatógeno. (*Penicillium digitatum*, *Colletotrichum abscissum* e *Sclerotinia sclerotiorum*), na outra extremidade da placa de Petri.

Houveram placas controle onde somente o patógeno foi inoculado. As placas foram avaliadas a cada 2 dias, por 9 dias. A ação de inibição foi determinada pela medição da diferença de área do crescimento do patógeno das placas contendo a *Nemania* em comparação com as placas controle, com auxílio do programa ImageJ.

4.4. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NÃO-VOLÁTEIS

Os isolados de *Nemania* foram testados contra a produção de compostos não-voláteis que liberam no meio de cultura. Em placas de Petri contendo meio BDA e cobertas por um disco de celofane (membrana semipermeável), foi inoculado um micélio de 12mm de diâmetro dos isolados, bem ao centro da placa. As mesmas foram incubadas por 72 horas a 25°C. Após esse período o disco de celofane juntamente com a colônia foi descartado. Uma solução de esporos do patógeno mais inibido no teste de antagonismo anterior (item 4.3), com uma concentração de $[1 \times 10^6]$ esporos/mL em solução salina (NaCl 0.85%) foi espalhado na placa de Petri (100µL). O controle foi feito com a solução de esporos espalhadas por uma placa de Petri onde não houve o inóculo prévio de *Nemania*.

4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA

Os isolados de *Nemania* foram testados para a produção de enzimas celulolíticas com base no protocolo de Teather e Wood (1982). Foram inoculados em placas de Petri com Meio Mínimo sem glicose e com adição de 1g/100mL de CMC (Carboximetilcelulose) como fonte de carbono, um inóculo de 4mm de diâmetro de cada isolado. A cultura foi incubada em BOD por 7 dias a 25°C. No sétimo dia, houve medição do crescimento do isolado através do diâmetro do halo da colônia. Após isso, foram adicionados 10 mL de solução corante vermelho Congo 1% em cada placa, que eram agitadas regularmente. Depois de 15 minutos, a solução foi descartada, e as placas foram lavadas com 10 mL de NaCl 1M. Após a lavagem as placas foram fotografadas para medição do halo formado utilizando o programa ImageJ. Foram feitas 5 repetições para cada isolado. Os índices enzimáticos foram calculados a partir da equação:

Índice Enzimático (i.e.) = diâmetro do halo de hidrólise / diâmetro do halo da colônia

Os isolados com o maior halo foram selecionados para a quantificação total de celulasas.

4.6. PRODUÇÃO DE CELULASES

Para induzir a produção de enzimas, 5 plugs (4 mm de diâmetro) de micélio do isolado selecionado foi inoculado em 100 mL de Meio Mínimo sem glicose e com adição de 1g/100mL de farelo de arroz (substrato lignocelulósico) como fonte de carbono. O cultivo ficou a uma temperatura de 24°C sob agitação de 120 rpm por 9 dias. O sobrenadante foi coletado e estocado em solução tampão (citrato de sódio 0,05M, na proporção de 1:4) a 0°C, determinação da atividade celulolítica.

4.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA

A atividade enzimática de celulase total (FPase) foi testada utilizando papel filtro Whatman nº1 como substrato, seguindo a metodologia proposta por Miller (1959). Para essa análise a amostra consistiu em 500 µL de meio de cultura de farelo de arroz onde o fungo estava crescendo anteriormente, com 1 mL de tampão citrato de sódio pH 4.8 em uma tira de papel de filtro (50 mg). A solução foi mantida a 50°C em banho-maria por 1 hora e a reação foi interrompida em banho frio. O teor de açúcares reduzidos liberados na reação enzimática foi quantificado diariamente durante 7 dias pelo método DNS, adicionando 500 µL do reagente à amostra. Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como aquela que libera em µmol o açúcar redutor correspondente por minuto, sob as condições do experimento. A amostra foi fervida durante 5 min e o equipamento foi lido a um comprimento de onda de 540 nm. Para fins comparativos, também foram realizadas leituras da amostra branca (controle), todos os componentes, exceto o meio de crescimento fúngico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS POR SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS DO rDNA

Ao confrontar a sequência de DNA do isolado LGMF1989 com o banco de dados GenBank, obteve-se 99,46% de identidade com *Nemania diffusa*, não apresentando nenhum *gap* entre os 560 pares de nucleotídeos iguais aos da sequência analisada.

O isolado LGMF1990 obteve 97,14% de identidade com *Nemania diffusa*, e também não apresentou nenhum *gap* entre os 559 pares de nucleotídeos idênticos aos da sequência confrontada.

Quando se compara as sequências de nucleotídeos entre uma mesma espécie de *Nemania*, é possível verificar uma variação de 9 a 13 nucleotídeos, e quando a comparação é feita entre espécies relacionadas, a variação fica entre 22 a 47 nucleotídeos (Pena et al. 2018).

Os isolados LGMF1989 e LGMF1990 apresentam apenas 02 nucleotídeos diferentes, o que corrobora para que esses dois isolados sejam a mesma espécie.

Infelizmente não foi possível fazer a identificação dos isolados 28F1 e 38F4, uma vez que o protocolo de extração de DNA seguido não resultou em amostras de DNA suficiente para visualização em gel de agarose 0,7%. Mesmo não sendo possível visualizar a amostra no gel, a reação de PCR foi realizada, porém não foi possível visualizar a amplificação da amostra no gel de agarose 0,7% e nem na quantificação no NanoDrop, o que caracteriza baixa ou nenhuma presença do fragmento de DNA.

Foram feitas 8 tentativas de extração (em duplicata): na presença e ausência de nitrogênio na maceração inicial, com fungos crescidos em celofane e não-crescidos em celofane, com fungos crescidos em meio completo (MC) e em meio BDA e com placas crescidas por 48 horas e placas crescidas por 96 horas. Em nenhuma das tentativas notou-se a presença de DNA nos géis de extração e de PCR.

Devido a essa falha em conseguir extrair material genético de dois isolados, morfologicamente diferentes, o que sugere espécies diferentes, busca-se novas técnicas e otimização das técnicas já conhecidas para conseguir realizar a extração de DNA e posterior identificação desses isolados.

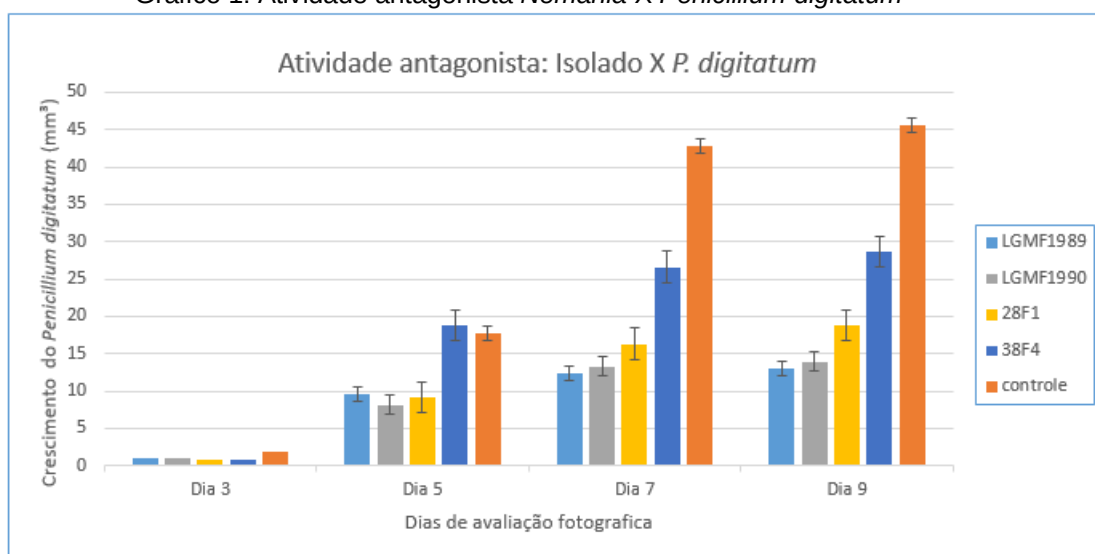
Porém a identificação morfológica através de chaves, possibilita os isolados serem do gênero *Nemania*, apesar de não ter sido observado estruturas reprodutivas durante todo o decorrer desse projeto.

Mesmo com a falta de identificação, os isolados 28F1 e 38F4 seguiram nos testes descritos nesse trabalho.

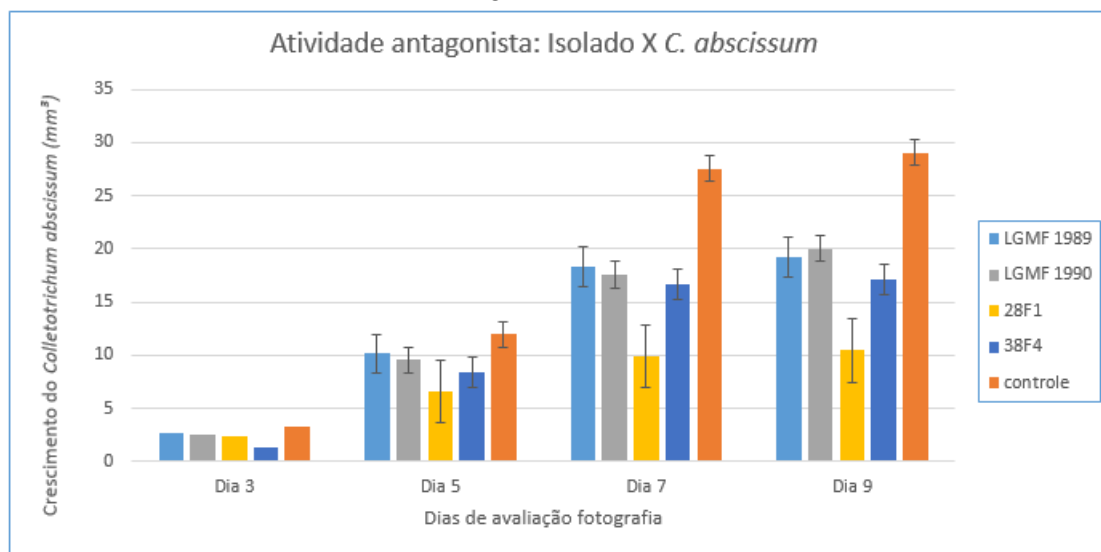
5.2. TESTES DE ANTAGONISMO

Após os 15 dias totais de experimento, os resultados revelaram que houve uma ação antagônica dos 4 isolados de *Nemania* sobre os fitopatógenos *Penicillium digitatum* e *Colletotrichum abscissum* evidenciando a redução do crescimento dos mesmos se comparados ao crescimento do grupo controle (Gráfico 1 e Gráfico 2).

Gráfico 1: Atividade antagonista *Nemania* X *Penicillium digitatum*



(Fonte: Autora, 2019)

Gráfico 2: Atividade antagonista *Nemania* X *Colletotrichum abscissum*

(Fonte: Autora, 2019)

Na Tabela 1 é possível ver as porcentagens de inibição de crescimento realizada por cada um dos isolados de *Nemania* para cada um dos 3 fitopatógenos testados.

Pode-se observar que os isolados LGMF1989 e LGMF1990 apresentaram uma ação inibitória maior contra o fitopatógeno *Penicillium digitatum*, 71,45% e 69,6% respectivamente.

Já com os isolados 28F1 e 38F4, essa inibição de crescimento foi maior contra o fitopatógeno *Colletotrichum abscissum*, 64,1% e 40,9% respectivamente. Nenhum dos 4 isolados de *Nemania* testados, foi capaz de inibir o crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* após o terceiro dia de avaliação (Tabela 1), devido a isso, o fitopatógeno *S. sclerotiorum* foi eliminado do teste de produção de compostos não-voláteis.

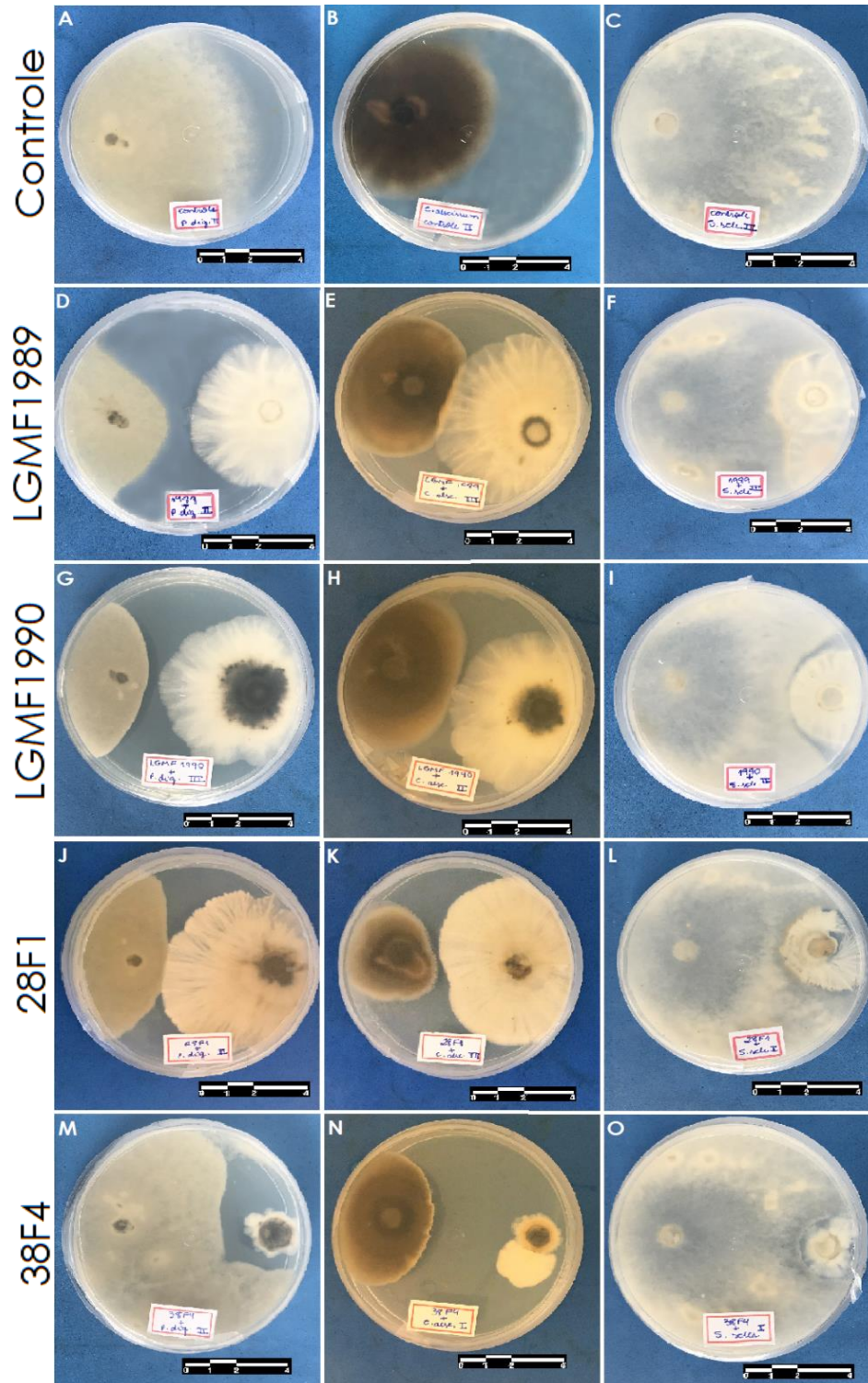
Tabela 1: Porcentagens de inibição *Nemania* X patógenos

<i>Penicillium digitatum</i>					
Isolados	Dia 3	Dia 5	Dia 7	Dia 9	Desvio Padrão
LGMF 1989	44,1%	46,1%	71,45%	71,45%	± 0,963
LGMF 1990	43,3%	54,3%	69%	69,6%	± 1,308
28F1	52,3%	48,6%	61,9%	58,7%	± 2,079
38F4	57%	41,8%	37,8%	37,2%	± 2,071
<i>Colletotrichum abscissum</i>					
Isolados	Dia 3	Dia 5	Dia 7	Dia 9	Desvio Padrão
LGMF 1989	17,9%	14,7%	33,4%	34%	± 1,853
LGMF 1990	23,2%	20,2%	29%	31,2%	± 1,230
28F1	27,9%	44,8%	64,1%	64,1%	± 2,962
38F4	60,2%	49,5%	43,7%	40,9%	± 1,419
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>					
Isolados	Dia 3	Dia 5	Dia 7	Dia 9	Desvio Padrão
LGMF 1989	22,5%	1,7%	-	-	-
LGMF 1990	37,1%	4,3%	-	-	-
28F1	16,2%	-	-	-	-
38F4	10,4%	-	-	-	-

(Fonte: Autora, 2019)

Esse retardo no crescimento dos fitopatógenos pode ser explicado através dos mecanismos de ação dos fungos endofíticos: antibiose, competição por espaço e nutrientes, e produção de metabólitos que impedem a germinação dos conídios, inibindo o crescimento do fitopatógeno (Benitez et al., 2004).

Figura 1: Teste de antagonismo em placa.



A: controle *P. digitatum*; ; B: controle *C. abscissum*; C: controle *S. sclerotiorum*;
D: *P. digitatum* X LGMF1989; E: *C. abscissum* X LGMF1989; F: *S. sclerotiorum* X LGMF1989;
G: *P. digitatum* X LGMF1990; H: *C. abscissum* X LGMF1990; I: *S. sclerotiorum* X LGMF 1990;
J: *P. digitatum* X 28F1; K: *C. abscissum* X 28F1; L: *S. sclerotiorum* X 28F1; M: *P. digitatum* X 38F4
N: *C. abscissum* X 38F4; O: *S. sclerotiorum* X 38F4; (Escala: 4cm)
(Fonte: Autora, 2019)

Esses resultados parecem promissores, mas uma vez que não há outros trabalhos testando *Nemania* contra esses mesmos fitopatógenos usados aqui, não é possível uma comparação para seleção da espécie com maior eficiência para atuar nesses biocontrole.

Kupper et al. (2013) testaram isolados de *Bacillus subtilis* e isolados de *Saccharomyces cerevisiae* contra o fitopatógeno *P. digitatum*. Obtiveram resultados de inibição de crescimento variando entre 17,8% e 31,7% nos testes com as bactérias, e 42% a 47% nos testes com os isolados de leveduras.

Torres (2018), isolou fungos de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hill.) e os testou contra alguns patógenos, incluindo o gênero *Colletotrichum*, e obteve que o índice de antagonismo dos 5 isolados testados para esse gênero variou de 37,66% a 52%.

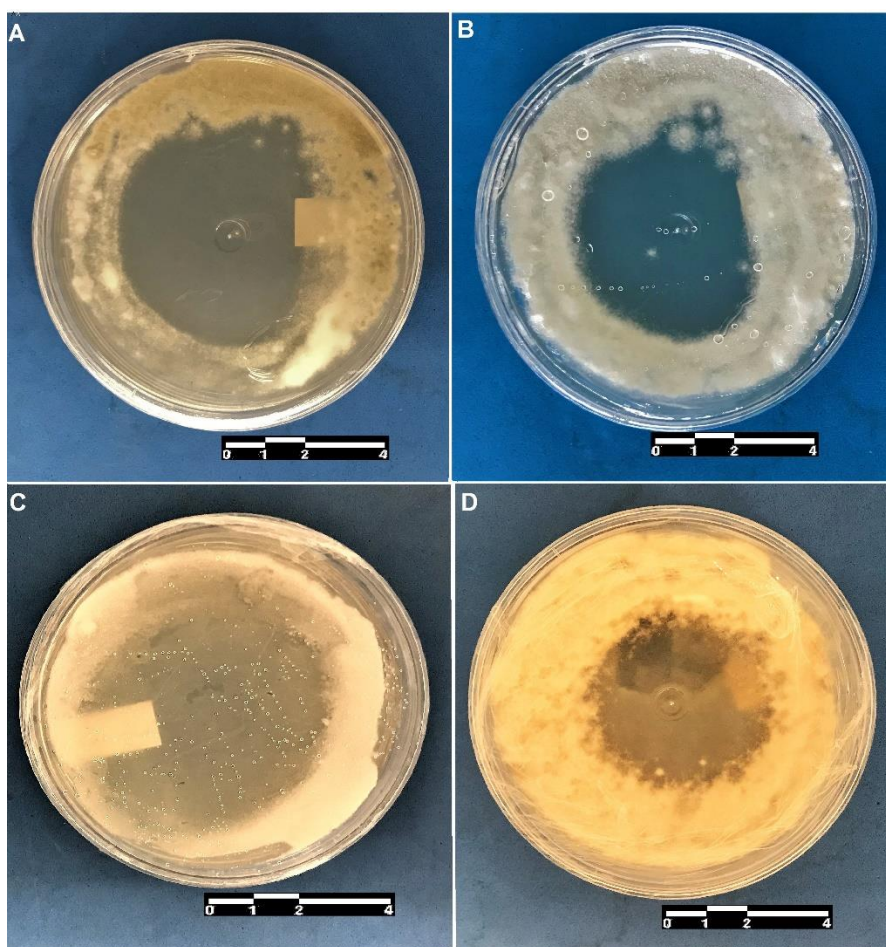
Como apresentaram porcentagens de inibição maiores do que outros gêneros de fungos, e algumas espécies de bactérias e leveduras, quando testados contra o mesmo fitopatógeno, o isolado LGMF 1989 por inibir 71,4% de um fungo que causa perdas imensas na produção de citrus, como o *P. digitatum*, assim como o isolado 28F1 por inibir 64,1% do causador da doença Podridão Floral do Citrus, podem ser potenciais agentes endofíticos para o biocontrole desses patógenos.

5.3. PRODUÇÃO DE COMPOSTOS NÃO-VOLÁTEIS

Nesse teste, os isolados foram testados especificamente contra o fitopatógeno que mais inibiram no teste anterior, ou seja, os isolados LGMF1989 e LGMF1990 foram testados contra o *P. digitatum* e os isolados 28F1 e 38F4 contra o patógeno *C. abscissum*.

Em todos os ensaios dos grupos tratamentos notou-se o crescimento do fitopatógeno apenas nas bordas da placa de Petri, não havendo crescimento no centro da mesma (FIGURA 2). Durante os 5 dias de análises fotográficas, não houve crescimento no centro, mesmo havendo produção de esporos do fitopatógeno nas áreas laterais da placa.

Figura 2: Teste de liberação de compostos orgânicos não-voláteis



(Fonte: Autora, 2019)

No quinto dia de avaliação, o isolado LGMF1989 apresentou um centro de inibição de crescimento do *P. digitatum* na placa de Petri de 25,15 cm², ou seja, 47,2% de inibição se comparado com o controle. O isolado LGMF1990 inibiu 18,74 cm², alcançando 35,1% de inibição.

Já o isolado 28F1 testado contra o *C. abscissum* apresentou uma área de 29,45 cm² de inibição, com porcentagem de 42,4% de inibição comparando com o grupo controle e o isolado 38F4 inibiu uma área de 16,31 cm², ou seja, 23,4% comparado ao controle.

Esses resultados indicaram que houve produção de compostos não voláteis pelos isolados, e que esses compostos foram liberados no meio de cultura, mesmo os isolados tendo sido incubados apenas por 72 horas e sobre papel celofane, além disso,

os resultados indicaram que a inibição causada no teste de antagonismo em placa foi devido ao antagonismo do tipo antibiose.

Antibiose é o antagonismo entre dois organismos no qual um ou mais metabolitos são produzidos por um dos organismos envolvidos com efeito negativo sobre o outro, inibindo atividades celulares vitais (GUERRERO, 2004).

As diferentes porcentagens de inibição entre os 4 isolados, podem estar relacionadas com as concentrações que são produzidas desses compostos por cada isolado, além da variabilidade química dos compostos.

Ramasamy et al. (2010) afirmou que um único endófito pode ser capaz de produzir uma variedade de metabólitos bioativos.

Segundo Schulz e Boyle (2005), aproximadamente 80% dos fungos endofíticos produzem esses compostos biologicamente ativos (antibacterianos, fungicidas e herbicidas). E por isso apresentam potencial econômico na medicina, agricultura, indústria alimentícia e farmacêutica (GAMBOAGAITAN, 2006).

Devido a todo esse potencial, esses compostos metabólicos produzidos por endófitos estão sendo bastante estudados.

Li et al. (2012) isolaram 39 metabolitos de *Aspergillus fumigatus*, deste, 16 compostos apresentaram atividade antifúngica contra os fitopatógenos: *B. cinerea*, *Alternaria alternata*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* e *Gibberella saubinetii*. Quatro metabolitos mostraram efeitos comparáveis aos fungicidas comerciais carbendazim e himexazol.

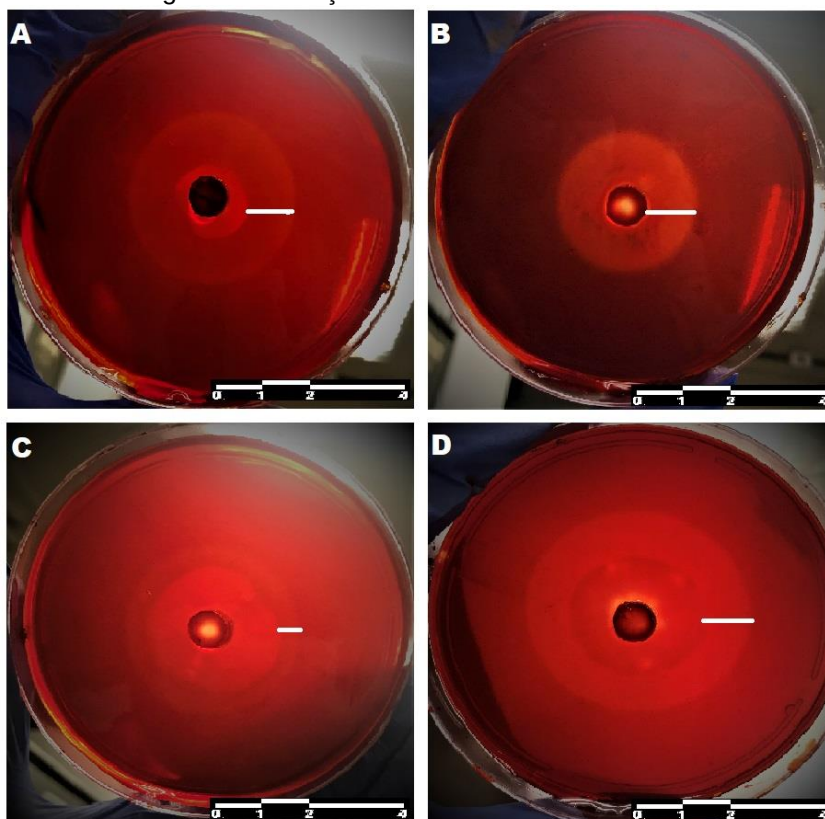
Polonio et al. (2016) obtiveram o extrato bruto do fungo endofítico *Diaporthe citri* isolado do guaco, e testaram contra *Escherichia coli* e *S. aureus*, obtendo resultados promissores com *S. aureus*. Esse extrato foi analisado quimicamente e revelou a presença do ácido 3-nitropropiónico, composto que segundo os pesquisadores pode estar envolvido em sistemas de defesa e nutrição de endófitos e plantas hospedeiras, e pode também participar do ciclo biogeoquímico do nitrogênio.

Os resultados desse ensaio, apesar de exigir mais testes sobre esses metabolitos liberados pelos isolados, apresentou valores que os sugerem como potenciais fungos para a produção de produtos agrícolas visando o controle biológico.

5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA

A medida dos diâmetros dos halos de hidrólise observados com o corante vermelho Congo representa uma informação diretamente relacionada à região de atuação das enzimas celulolíticas, visto que o corante vermelho Congo permanece ligado apenas às regiões onde há ligações β -1,4 glicídicas (CASTRO, 2006). A formação do halo em placas de ágar com CMC resulta da clivagem do CMC em fragmentos menores, os quais o corante vermelho Congo não consegue se fixar. Além disso, halos podem resultar da clivagem do CMC em fragmentos suficientemente pequenos para serem lavados das placas durante o processo de coloração. A zona mais clara ao redor das colônias (Figura 3), correspondente ao halo indicador da degradação do CMC, que foi observado em todas as placas analisadas, porém variando o tamanho e a descoloração entre os isolados.

Figura 3: Avaliação da atividade celulolítica



Placas coradas com vermelho Congo. A: isolado 28F1; B: isolado 38F4; C: isolado LGMF1989; D: isolado LGMF1990; A linha branca serve para facilitar a visualização dos halos formados. (Fonte: Autora, 2019)

Kasana et al. (2008) observaram a formação do halo de hidrólise em bactérias e fungos. Para a linhagem fúngica *Aspergillus niger*, a região clara ao redor da colônia pode ser observada facilmente, porém para a linhagem *Penicillium chrysogenum* o halo de hidrólise foi observado com pouca clareza. A visualização do halo depende de vários fatores, além da composição do meio de cultura. Algumas substâncias químicas podem interferir no corante proporcionando falso-positivos, ou ainda provocar sua precipitação ou inibir a ligação deste aos polissacarídeos (CASTRO, 2006).

A Tabela 2 apresenta os resultados das medidas dos halos e cálculo dos índices enzimáticos, obtidos após o cultivo dos fungos em meio mínimo contendo CMC como única fonte de carbono, após 7 dias de incubação à 25°C em estufa BOD. Os valores apresentados correspondem à média de medidas das repetições para cada isolado.

Tabela 2: Resultados visualizados após o uso do corante vermelho Congo

Isolado de <i>Nemania</i>	Média do diâmetro da colônia (cm)	Média do diâmetro do halo formado (cm)	Índice enzimático (i.e.)
28F1	1,756	12,073	6,874
38F4	1,481	9,853	6,652
LGMF1989	6,111	11,277	1,845
LGMF1990	5,591	18,972	3,393

(Fonte: Autora, 2019)

O isolado 28F1 e 38F4 apresentaram maior halo de hidrólise, com um índice enzimático entre 6,6 e 6,9, valores superiores aos dos isolados LGMF1989 e LGMF1990.

De acordo com Ten et al. (2004) o diâmetro do halo de hidrólise é útil como um auxiliar para selecionar linhagens com altos níveis de atividade de degradação de polissacarídeos. Além disso, o índice enzimático pode ser utilizado como uma medida simples e rápida para selecionar linhagens com potencial para a produção de enzimas celulolíticas tanto de um grupo dentro da mesma espécie quanto de espécies diferentes.

O isolado 28F1 e o isolado 38F4 por apresentarem o melhor i.e. foram os isolados selecionado para o teste de produção de celulasas totais. Os demais isolados, não seguiram nos ensaios celulolíticos.

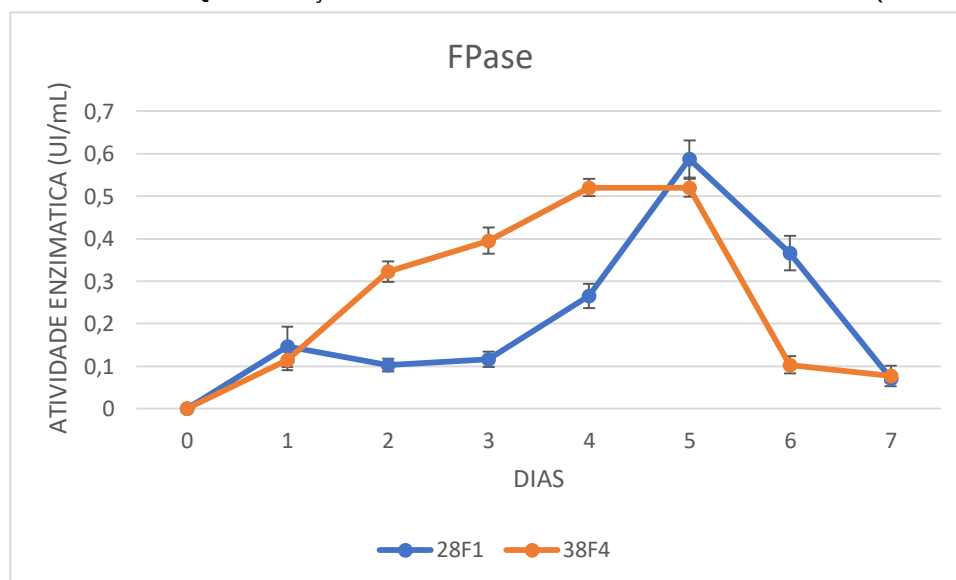
5.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CELULOLÍTICA

O isolado 28F1 e o 38F4 crescidos previamente conforme descrição no item 4.6, foram testados durante 7 dias para a avaliação e quantificação da celulase total (FPase).

Usando o método de redução de açúcar com o papel filtro como substrato foi observado que o isolado 28F1 apresentou a maior produção enzimática média de 0,587 UI/mL no quinto dia, com um desvio padrão de 0,043 e o isolado 38F4 apresentou a maior produção enzimática média de 0,520 UI/mL por dois dias seguidos, no quarto e quinto dia com desvio padrão de 0,021 no quarto dia, e 0,027 no quinto dia.

Após esse ápice de produção enzimática, ambos os isolados tiveram sua atividade reduzida chegando próxima a zero no sétimo dia conforme o observado no gráfico 3.

Gráfico 3: Quantificação da atividade enzimática de celulasas totais (FPase)



(Fonte: Autora, 2019)

Florencio (2011) testou 10 isolados para a quantificação de FPase em tubos de ensaios com papel filtro, o isolado *T. reesei* RUT C30 apresentou o melhor resultado: 0,039 UI/mL.

Castro (2006) também realizou o mesmo teste, e obteve com seu isolado uma produção enzimática de 0,040 UI/mL.

Em 1991, Cochet apresentou quatro linhagens mutantes de *Tricoderma reesei* cultivadas em meios de cultura diferentes com resultados variando de 0,39 a 1,63 UI/mL.

Observando então que a atividade das celulases não depende somente da linhagem, mas também das técnicas utilizadas para a análise enzimática.

Comparando os valores de produção enzimática dos microrganismos encontrados na literatura que utilizaram as mesmas técnicas utilizadas nesse trabalho, o isolado 28F1 e 38F4 obtiveram resultados superiores, indicativo de bons organismos para produção de celulase totais, com potencial biotecnológico.

6. CONCLUSÃO

As aplicações e estudos de fungos endofíticos estão aumentando e se intensificando com o objetivo de comprovar a eficácia dos mesmos. Esses micro-organismos tem comprovadamente um elevado potencial na produção de substâncias economicamente importantes principalmente para as indústrias farmacêutica, química e agrícola. Por estas vantagens, a utilização de fungos endofíticos em várias práticas é uma alternativa viável e sustentável.

Os quatro isolados utilizados neste trabalho inibiram o crescimento dos fitopatógenos testados, por meio da antibiose, tendo os isolados LGMF1989 e LGMF1990 apresentado uma inibição maior contra *P. digitatum* e os isolados 28F1 e 38F4 contra o *C. abscissum*. Esses dois últimos isolados, também apresentaram uma maior atividade enzimática, sendo o 28F1 o isolado que apresentou a maior quantificação de celulases totais (FPase).

Pelos dados apresentados, destaca-se a importância dos resultados obtidos como pesquisa básica, uma vez que não são relatados na literatura estudos de ação antagonica entre *Nemania* e os patógenos testados, bem como os quantitativos da produção de celulases. A utilização deste fungo endofítico para esses fins, representam uma opção vantajosa, econômica, ecológica e sustentável para as indústrias.

7. REFERENCIAS

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda. v. 1. p. 704, 2010.

BALASURIYA, A; ADIKARAM N. K. B. Extent of bush damage and resultant yield losses of a tea clone, susceptible to stem blight caused by *Nemania Diffusa*. *S.L.J. Tea Sci.* 21-31. 2002.

BEDENDO, I. P; BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. São Paulo: Agronômica Ceres. p. 820-828. 1995.

BENITEZ, T.; RINCON, A.M.; LIMON, M.C.; CODON, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma strains*. *International Microbiology* 7: 249-260. 2004.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; JÚNIOR, P.; CORREA, E. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. de C. do B.; Bezerra, J. L. Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. Embrapa Meio Ambiente- Documentos (INFOTECA-E), 2012.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; PAULA JUNIOR, T. J.; CORREA, E. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L. Bioprotetores comerciais para o controle de doenças de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, v. 17, p. 111-147, 2009.

BOLAND, G.J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v.16, 93–108. 1994.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology*, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2006.

CASTRO, A. M.; PEREIRA, J. R. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quím. Nova*, v.33, n.1.181-188. 2010.

CASTRO, A.M. Produção e propriedades de celulases de fungos filamentosos, obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

CHEN J, ZHANG LC, XING YM, WANG YQ, XING XK, ZHANG DW, LIANG HQ, GUO SX. Diversity and taxonomy of endophytic xylariaceous fungi from medicinal plants of *Dendrobium* (Orchidaceae). 2013.

COCHET, N. Cellulases of *Trichoderma reesei*: influence of culture conditions upon the enzymatic profile. *Enzyme and Microbial Technology*. v.13, p. 104-109, 1991.

CUNHA, W. G. Resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de soja geneticamente modificadas para expressar o gene da oxalato descarboxilase de *Flammulina velutipes*. Tese de Doutorado em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO J. L. Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia. 2^{ed}. Revisada e ampliada: Educs. 2010.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE Jr., J. Doenças dos citros. Manual de Fitopatologia. v.2. Editora Ceres, São Paulo. p. 239-269. 2005.

FLORENCIO, C. Microrganismos produtores de celulases: seleção de isolados de *Trichoderma spp*. 2011.

FOURNIER, J.; LECHAT, C.; COURTECUISSÉ, R.; MOREAU, P. A. The genus *Rosellinia* (Xylariaceae) in Guadeloupe and Martinique (French West Indies). Ascomycete.org, 171–208. 2017.

FRANCO, D. A. S.; BETTIOL, W. Controle de bolor verde em pós-colheita de citros com produtos alternativos. Embrapa Meio Ambiente. 2000.

GAMBOAGAITAN, M. A. Hongos endófitos tropicales: conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana* 11: 10-12. 2006.

GARCIA-ALCEGA, S.; NASIR, Z. A.; FERGUSON, R.; WHITBY, C.; DUMBRELL, A. J.; COLBECK, I.; GOMES, D.; TYRREL, S.; COULON, F. Fingerprinting outdoor air environment using microbial volatile organic compounds (MVOCs) –A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*: 75-83. 2017.

GUERRERO, V. M. *Algunas notas sobre el control biológico de enfermedades con microorganismos*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Cuauhtémoc, Chihuahua, México. 2004.

IBRAHIM, A.; SORENSEN, D.; JENKINS, H. A.; EJIM, L.; CAPRETTA, A.; SUMARAH, M. W. Epoxynemanione A, nemanifuranones A–F, and nemanilactones A–C, from *Nemania serpens*, an endophytic fungus isolated from Riesling grapevines. *Phytochemistry*. 16-2. 2017.

JU, YU-MING; ROGERS, J. D. The genus *Nemania* (Xylariaceae). *Nova Hedwigia*, v. 74, n. 1-2, p. 75-120, 2002.

JULIATTI, F. C.; POLIZEL, A. C.; BALARDIN, R. S.; VALE, F. X. R. Ferrugem da soja – Epidemiologia e manejo para uma doença reemergente. *Revisão anual de patologia de plantas, Passo Fundo*, 351-395. 2005.

KASANA, R.C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A rapid and easy method for detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Current Microbiology*. v. 57, p. 503–507, 2008.

KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite-what decides? *Curr Opin Plant Biol*. 358-363. 2006.

KORNSAKULKARN, J.; SAEPUA, S.; SUVANNAKAD, R.; SUPOTHINA, S.; BOONYUEN, N.; ISAKA, M.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P.; THONGPANCHANG, C. Cytotoxic tropolones from the fungus *Nemania* sp. BCC 30850. *Tetrahedron*. 3505-3512. 2017.

LEITE, R. M. V. B. de C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* em girassol e soja. Embrapa Soja, 76. 2005.

MARCET-HOUBEN, M.; BALLESTER, A.; FUENTE, B. de la; HARRIES, E.; MARCOS, J. F.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L.; GABALDÓN, T. Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus. *BMC Genomics* 13:646, 2012.

MILLER L. Use of dinitrisalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem*. 426-428. 1959.

O'CONNELL, R.; THON, M.; HACQUARD, S. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat Genet* 1060–1065. 2012.

OKANE, I.; TOYAMA, K.; NAKAGIRI, A.; SUZUKI, K. I.; SRIKITIKULCHAI, P.; SIVICHAI, S.; HYWEL-JONES, N.; NAKAGIRI, A.; POTACHAROEN, W.; SUZUKI, K. Study of endophytic *Xylariaceae* in Thailand: diversity and taxonomy inferred from rDNA sequence analyses with saprobes forming fruit bodies in the field. *Mycoscience*. 359-372. 2008.

PENA, L. C., JUNGKLAUS, G. H.; SAVI, D. C.; FERREIRA-MABA, L.; SERVIENSKI, A.; DE SOUZA MAIA, B. H. L. DE N. S.; ANNIES, V.; GALLI-TERASAWA, L. V.; GLIENKE, C.; KAVA, V. *Muscodor brasiliensis* sp. nov- isolated from *Schinus terebinthifolius* and its inhibitory action against *Penicillium digitatum*, the green mold agent in citrus, 2018.

PEREIRA, D. E. P. Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do bioma cerrado. 2013.

POLONIO, J. C. Seleção de fungos endofíticos de Guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) com atividade antimicrobiana e produção de ácido 3-nitropropiónico, com ênfase em *Diaphorte citri*. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Ambiental – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2016.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*. 17-20. 1985.

RAMASAMY, K. Antimicrobial and cytotoxic activities of Malaysian endophytes. *Phytotherapy Research*, v.24, n.5, p.640-643, 2010.

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

SHARMA, R. R.; SINGH, D.; SINGH, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biologica Control*, n. 50, p. 205-221, 2009.

SILVA, G. B. P.; HECKLER, L. I.; SANTOS, R. F.; DURIGON, M. R.; BLUME, E. Identificação e utilização de *Trichoderma* spp. armazenados e nativos no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Revista Caatinga*, Mossoró, v.28, n.4, p. 33-42, 2015.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 777-780. 1982.

TEN, L.N.; IM, W.T.; KIM, M.K.; KANG, M.S.; LEE, S.T. Development of a plate technique for screening polysaccharide-degrading microorganisms by using of insoluble chromogenic substrates. *Journal of Microbiological Methods*. v.56, p.375-382. 2004.

TIMMER, L. W.; AGOSTINI, J. P.; ZITKO, S. E.; ZULFIQAR, M. Post bloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. *Plant Disease*. 329- 334. 1994.

VILLELA, D. S. Análise da produção de celulasas e beta glicosidase produzidas por *Streptomyces* sp. Universidade Federal de Goiás, 2013.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S.-B.; KLAASSEN, C.H.W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K.A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R.A. Identification and nomenclature of the Genus *Penicillium*. *Studies in Mycology* 78, p. 343-371, 2014.