

FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À PLANTA MEDICINAL *Kalanchoe pinnata* (LAM.) PERS.



Revista
Desafios

Artigo Original
Original Article
Artículo Original

Endophytic fungi associated with the medicinal plant Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers.

Hongos endofíticos asociados a la planta medicinal Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers.

Beatriz dos Santos Souza¹, Dinalva Ribeiro de Oliveira², Fabiane Valéria Rêgo da Rocha³, Eveleise Samira Martins Canto⁴, Deyla Paula de Oliveira⁵, Taidés Tavares dos Santos^{*6}

¹Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Pará, Brasil.

²Mestranda do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Amazônia da Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Pará, Brasil.

³Bióloga pela Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas, Santarém, Pará, Brasil.

⁴Docente da Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas, Santarém, Pará, Brasil.

⁵Bióloga pela Universidade Federal do Tocantins, Mestre e Doutora em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

⁶Professor do Curso de Licenciatura em Química, Universidade Federal do Tocantins, Araguaína - TO, Brasil.

*Correspondência: Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Araguaína. Avenida Paraguai, s/nº, BALA 2 – Química Setor Cimba, Araguaína, Tocantins, Brasil. CEP: 77824838. e-mail: taides.tavares@hotmail.com

Artigo recebido em 24/05/2018 aprovado em 19/09/2018 publicado em 30/09/2018.

RESUMO

No presente estudo é relatado pioneiramente o isolamento e a identificação de fungos endofíticos associados às folhas da planta medicinal *Kalanchoe pinnata*. Coletas do material vegetal foram realizadas na Floresta Nacional do Tapajós, no estado do Pará, em período chuvoso e de estiagem. Após desinfecção da superfície, fragmentos (0,25 mm²) das folhas foram inoculados em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) contendo cloranfenicol (0,1 µg/mL⁻¹). Foram obtidos 86 isolados, que puderam ser agrupados em 33 tipos morfológicos (morfotipos). Por meio de taxonomia clássica, foi possível identificar 73,3% dos morfotipos obtidos: *Aspergillus* (26,7%), *Chrysosporium* (12,8%), *Fusarium* (11,6%), *Acremonium* (10,5%), *Aureobasidium* (7,0%), *Cladosporium* (3,5%) e *Penicillium* (1,2%). Esses grupos taxonômicos de fungos são os representantes mais frequentes da comunidade endofítica de *K. pinnata*. Observou-se maior riqueza e diversidade de fungos em período chuvoso em relação ao período de estiagem. Além de contribuir para o conhecimento e preservação da biodiversidade de fungos da Amazônia, os espécimes obtidos neste estudo representam uma valiosa oportunidade para futura prospecção de fungos com atividades biológicas de interesse biotecnológico.

Palavras-chave: Interação fungo-planta; Micro-organismos endofíticos; Simbiose.

ABSTRACT

The present study is the first report on the isolation and identification of endophytic fungi associated with the leaves from medicinal plant Kalanchoe pinnata. For this, plant material was collected in the Floresta Nacional do Tapajós, in the state of Pará, in the rainy season and in the dry season. After disinfection of the surface, fragments (0.25 mm²) of the leaves were inoculated in Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium containing chloramphenicol (0.1 µg.mL⁻¹). A total of 86 different isolates were obtained and grouped into 33 morphological types (morphotypes). By means of classical taxonomy, it was possible to identify 73.3% of the morphotypes

obtained: *Acremonium* (10.5%), *Aureobasidium* (7.0%), *Aspergillus* (26.7%), *Chrysosporium* (12.8%), *Cladosporium* (3.5%), *Fusarium* (11.6%) and *Penicillium* (1.2%). These fungal taxonomic groups are the most frequent representatives of the endophytic community of *K. pinnata*. It was observed a greater richness and diversity of fungi in rainy season in relation to the dry season. In addition to contributing to the knowledge and preservation of biodiversity of Amazonian fungi, the specimens obtained in this study represent a valuable opportunity for future prospecting of fungi with biological activities of biotechnological interest.

Keywords: Fungus-plant interaction; Endophytic micro-organisms; Symbiosis.

RESUMEN

El presente estudio relata pioneramente el aislamiento e identificación de hongos endofíticos asociados a las hojas de la planta medicinal *Kalanchoe pinnata*. Las colectas de material vegetal se realizaron en el Bosque Nacional del Tapajós, en el estado de Pará, en período lluvioso y de sequía. Después de la desinfección de la superficie, fragmentos (0,25 mm²) de las hojas fueron inoculados en medio de cultivo Patata Dextrosa Agar (BDA) conteniendo cloranfenicol (0,1 µg / ml⁻¹). Se obtuvieron 86 aislados, que pudieron agruparse en 33 tipos morfológicos (morfortipos). En la mayoría de los casos, se observó un aumento de la mortalidad por rotavirus en los últimos años, (7,0%), *Cladosporium* (3,5%) y *Penicillium* (1,2%). Estos grupos taxonómicos de hongos son los representantes más frecuentes de la comunidad endofítica de *K. pinnata*. Se observó mayor riqueza y diversidad de hongos en período lluvioso en relación al período de sequía. Además de contribuir al conocimiento y preservación de la biodiversidad de los hongos de la Amazonia, los especímenes obtenidos en este estudio representan una valiosa oportunidad para la futura prospección de hongos con actividades biológicas de interés biotecnológico.

Descriptores: Interacción fungo-planta; Microorganismos endofíticos; Simbiosis.

INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos são aqueles que vivem no interior de plantas, habitando, de modo geral, em partes aéreas como caules e folhas, sem causar, aparentemente, qualquer dano aos seus hospedeiros (AZEVEDO, 1999). Por esses motivos, se diferem dos fungos fitopatogênicos, que causam doenças em plantas, e dos fungos epifíticos, que habitam as superfícies externas das plantas (SOUZA *et al.*, 2004). Em contrapartida ao habitat ofertado por seus hospedeiros, os fungos endofíticos conferem proteção às plantas contra patógenos (GAO *et al.*, 2010) e também contra herbívoros (GANGE *et al.*, 2012). Além disso, podem produzir toxinas, antimicrobianos, fatores de crescimento e muitas outras classes de substâncias relacionadas à interação com seus hospedeiros e que podem possuir aplicação biotecnológica (KAUL *et al.*, 2012; SURYANARAYANAN *et al.*, 2012; KHAN *et al.*, 2015).

Uma vasta gama de hospedeiros já foi investigada com vistas à prospecção de fungos

endofíticos, o que inclui culturas alimentares (GONZAGA *et al.*, 2014; FERNANDES *et al.*, 2015), plantas tóxicas (SOUZA *et al.*, 2004; CAFÊU *et al.*, 2005) e plantas medicinais (SIQUEIRA *et al.*, 2011; BEZERRA *et al.*, 2015). No que compete especificamente às plantas medicinais, a existência de fungos endofíticos tem sido constatada em inúmeras espécies e, têm sido indicadas complexas relações de síntese, acúmulo e degradação de metabólitos secundários de interesse econômico (PEIXOTO-NETO *et al.*, 2004; CUI *et al.*, 2011). Diante disso, pesquisas relacionadas a fungos endofíticos associados a plantas medicinais podem prover uma estratégia consistente para investigações relacionadas à diversidade e às aplicações biotecnológicas desses micro-organismos, sobretudo em ambientes ainda pouco explorados, como as florestas tropicais.

A Floresta Amazônica é a maior floresta tropical do mundo e, sem dúvida, o ecossistema terrestre mais rico em diversidade de espécies vegetais e animais do planeta, cuja maioria ainda não é conhecida (MOREIRA, 2009). Diante disso, torna-

se evidenciada a importância de se promoverem estudos que visem contribuir para o conhecimento e prospecção de fungos endofíticos associados a espécies vegetais medicinais que ocorrem nesse ecossistema. Nessa perspectiva, focou-se, no presente estudo, na planta medicinal *Kalanchoe pinnata*, pertencente à família botânica Crassulaceae, que é uma espécie vegetal também conhecida popularmente como corama, folha da fortuna, folha da costa, folha grossa, folha santa, erva da costa e escama de pirarucu, sendo originária da África, Índia e ilhas do Oceano Índico (YADAV & DIXIT 2003), com ocorrência também na Floresta Amazônica brasileira e muito utilizada tradicionalmente como planta medicinal por populações ribeirinhas. Assim, os objetivos do presente estudo foram isolar e identificar fungos endofíticos associados às folhas da *K. pinnata*, da Floresta Amazônica brasileira.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem e identificação do material vegetal

As coletas foram realizadas nas proximidades da Comunidade Piquiatuba, localizada na Floresta Nacional (FLONA) do Tapajós (2° 59' 33.2"S; 55° 05' 43.0"W), com a devida anuência do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) por meio do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) (autorização n.º 48924-1).

A FLONA do Tapajós é uma importante unidade de conservação da natureza criada pelo Decreto n.º 73.684, de 19 de fevereiro de 1974. Está localizada na Amazônia brasileira, às margens do rio Tapajós, abrangendo os municípios de Belterra, Aveiro, Rurópolis e Placas, na região oeste do estado do Pará, com acesso pela BR-163 partindo do município de Santarém e pelo rio Tapajós (Figura 1).

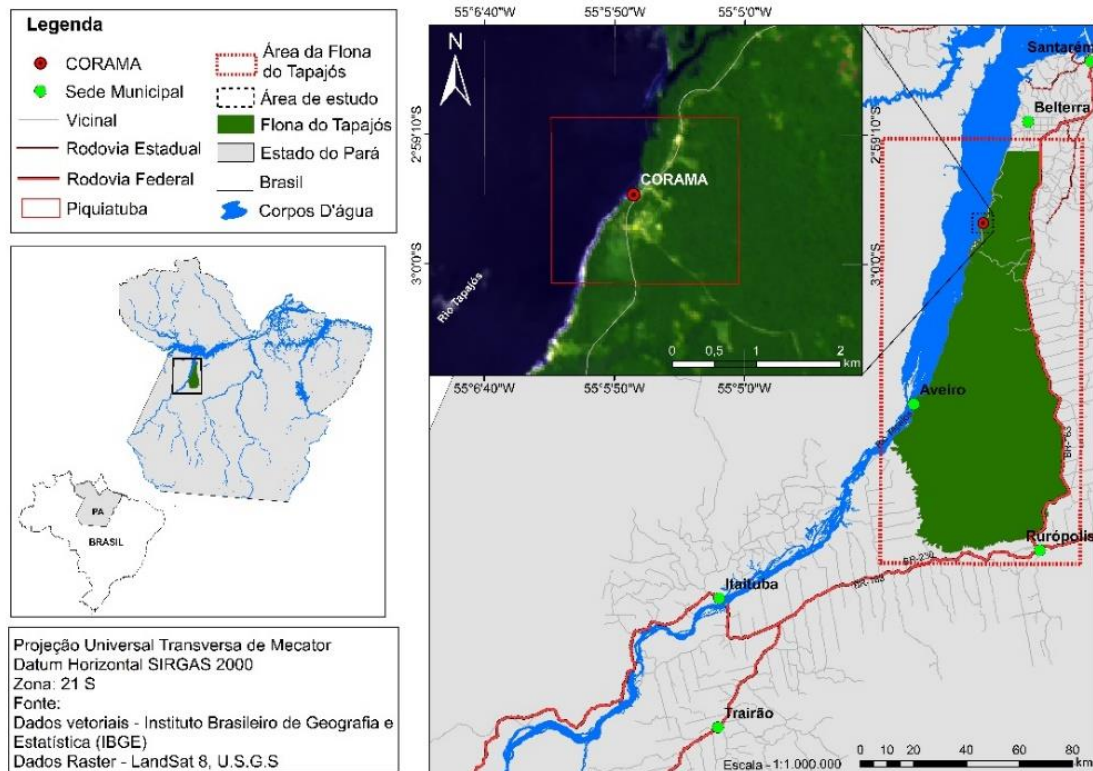


Figura 1. Representação esquemática da área de estudo.

O material vegetal de *K. pinnata* foi identificado a partir de suas folhas com o auxílio de

comunitários residentes na FLONA do Tapajós. Essa identificação foi confirmada por especialistas em

botânica da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA). O material fértil foi depositado no Herbário da UFOPA (HSTM), com o número HSTM 0009327.

Coleta da espécie vegetal estudada

As coletas das folhas de *K. pinnata* foram realizadas no período de estiagem (julho de 2015) e no chuvoso (maio de 2016). O local de coleta apresentava-se sombreado, o que aparentemente favorecia o crescimento de um grande número de

espécimes de *K. pinnata*, com estágios variados de crescimento entre elas. Folhas com aparência saudável e sem sintomas de doença, deficiência nutricional ou deformação, foram destacadas a partir de diferentes indivíduos com ocorrência natural (Figura 2).

Selecionou-se folhas do terço mediano dos indivíduos, evitando-se, assim, as que estivessem muito próximas ao solo e as que estivessem na parte superior da planta. Além disso, folhas com aparência muito jovem ou muito velha não foram selecionadas.



Figura 1. Planta medicinal *K. pinnata* em ocorrência natural na Floresta Nacional do Tapajós.

Após sua coleta, as folhas foram armazenadas em sacos de plástico e acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Ensino Multidisciplinar em Biologia Aplicada (LABIO) da UFOPA para condução dos procedimentos subsequentes.

Isolamento, purificação e conservação de fungos endofíticos

As folhas coletadas tiveram a superfície desinfetada, conforme descrito por GONZAGA et al. (2014), com modificações. O material vegetal foi lavado com água corrente e em seguida, sob condições assépticas, as folhas foram lavadas com

água destilada esterilizada. Em seguida foram sequencialmente submersas em etanol a 70 % com tween (2 gotas de tween para cada 100 mL de etanol) por 1 minuto, em hipoclorito de sódio contendo (2-2,5 % de cloro ativo) por 3 minutos, em etanol a 70 % com tween por 30 segundos e, por último, foram lavadas com água destilada esterilizada abundantemente. Esse procedimento foi realizado com 40 folhas de *K. pinnata*.

Após a desinfecção superficial, com auxílio de bisturi esterilizado, foram obtidos fragmentos com aproximadamente 0,25 mm² a partir de 37 das folhas. Esses fragmentos foram inoculados na superfície de placas de Petri, de 90 mm de diâmetro, contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) (extrato

de batata: 4,0g; dextrose: 20,0g; ágar: 15,0g) suplementado com cloranfenicol a 0,1 µg/mL-1, para evitar crescimento bacteriano. Foram realizados dois controles de desinfecção da superfície foliar, sendo que o primeiro consistiu em *imprinting* de duas folhas desinfetadas na superfície de placas de Petri contendo o meio de cultura supramencionado, e o segundo, na inoculação de 100 µL da água da última lavagem de umas das folhas na superfície de uma placa de Petri contendo o mesmo meio de cultura. As placas foram incubadas a 25 ± 2°C e monitoradas por até 12 dias para o acompanhamento e repicagem dos fungos à medida que estes foram crescendo na superfície do meio de cultura.

A purificação dos fungos ocorreu por meio de repiques sucessivos em BDA, até que se obtivessem os fungos devidamente isolados e separados, sendo um por placa. Uma vez purificados, os isolados foram preservados pelo método Castellani (CASTELLANI, 1939) e sob refrigeração a 4°C.

Caracterização morfológica e identificação

Os isolados purificados foram caracterizados morfológicamente por meio da verificação de caracteres macroscópicos (coloração do micélio no verso e reverso do meio, a forma da borda da colônia, a presença de esporos e o efeito do fungo no meio de cultura) como microscópicos visualizados por meio da técnica de microcultivo (RIDDELL, 1950), que se fundamenta no cultivo do fungo em pequenos pedaços de meio de cultura, entre lâmina e lamínula, onde o crescimento do fungo se expande e fixa na porção inferior da lamínula, que quando retirada com cuidado mantém intactas as estruturas importantes para a taxonomia, possibilitando sua visualização.

Por meio da comparação entre as características morfológicas com a literatura micológica taxonômica disponível (BARNETT & HUNTER 1972; LARONE, 1993; MENEZES &

OLIVEIRA, 1993), realizou-se a identificação dos fungos ao menor nível taxonômico possível.

Análises estatísticas e índices de diversidade

Foram realizadas análises estatísticas de frequência de ocorrência utilizando o programa Excel versão 2013 (Microsoft®). Para quantificar a diversidade e riqueza das espécies fúngicas detectadas nos períodos de estiagem e chuvoso, calculou-se os índices de Simpson (1-D), Shannon (H) e Margalef (DMg) (HAMMER et al., 2001). Todos esses índices foram calculados utilizando o programa PAST versão 1.90 (HAMMER et al., 2001).

RESULTADOS

No presente estudo, foram obtidos 86 isolados de fungos endofíticos a partir dos 222 fragmentos de folhas de *K. pinatta*. Por meio de caracterização morfológica macro e microscópica dos isolados, foi possível agrupá-los em 33 grupos morfológicos (morfotipos).

Do total de morfotipos, 73,3% correspondem a fungos do filo Ascomycota e 26,7% não apresentaram características morfológicas suficientemente distinguíveis, isto é, são fungos *mycelia sterilia* que pertencem à ordem Agonomycetales, formada por fungos imperfeitos, nos quais aparentemente não há estrutura reprodutiva especializada como esporos produzidos sexualmente ou conídios e se reproduzem apenas pela fragmentação do micélio.

Com relação ao total de fungos identificados, as espécies *Acremonium* spp., *Aureobasidium* spp., *Aspergillus* spp., *Chrysosporium* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* sp. foram as mais frequentes. A frequência de ocorrência desses grupos taxonômicos encontra-se descrita na Tabela 1, enquanto que na Figura 3, podem ser vistos detalhes da macro e micromorfologia desses grupos

taxonômicos. Na Tabela 2, é apresentada a caracterização macromorfológica dos morfotipos fúngicos obtidos no presente estudo e a relação de espécimes correspondentes.

Tabela 1. Total de unidade formadora de colônias (UFCs), frequência e percentagem de isolamento de espécies fúngicas endofíticas associadas às folhas de *K. pinnata*.

Espécies ou Morfoespécies	Quantidade de UFCs	Frequência	%
<i>Acremonium</i> spp.	09	0,105	10,5
<i>Aureobasidium</i> spp.	06	0,070	7,0
<i>Aspergillus</i> spp.	23	0,267	26,7
<i>Chrysosporium</i> spp.	11	0,128	12,8
<i>Cladosporium</i> spp.	03	0,035	3,5
<i>Fusarium</i> spp.	10	0,116	11,6
<i>Penicillium</i> sp.	01	0,012	1,2
Morfoespécie 1	03	0,035	3,5
Morfoespécie 2	01	0,012	1,2
Morfoespécie 3	05	0,058	5,8
Morfoespécie 4	02	0,023	2,3
Morfoespécie 5	04	0,047	4,7
Morfoespécie 6	04	0,047	4,7
Morfoespécie 7	02	0,023	2,3
Morfoespécie 8	02	0,023	2,3
TOTAL	86	1	100,0

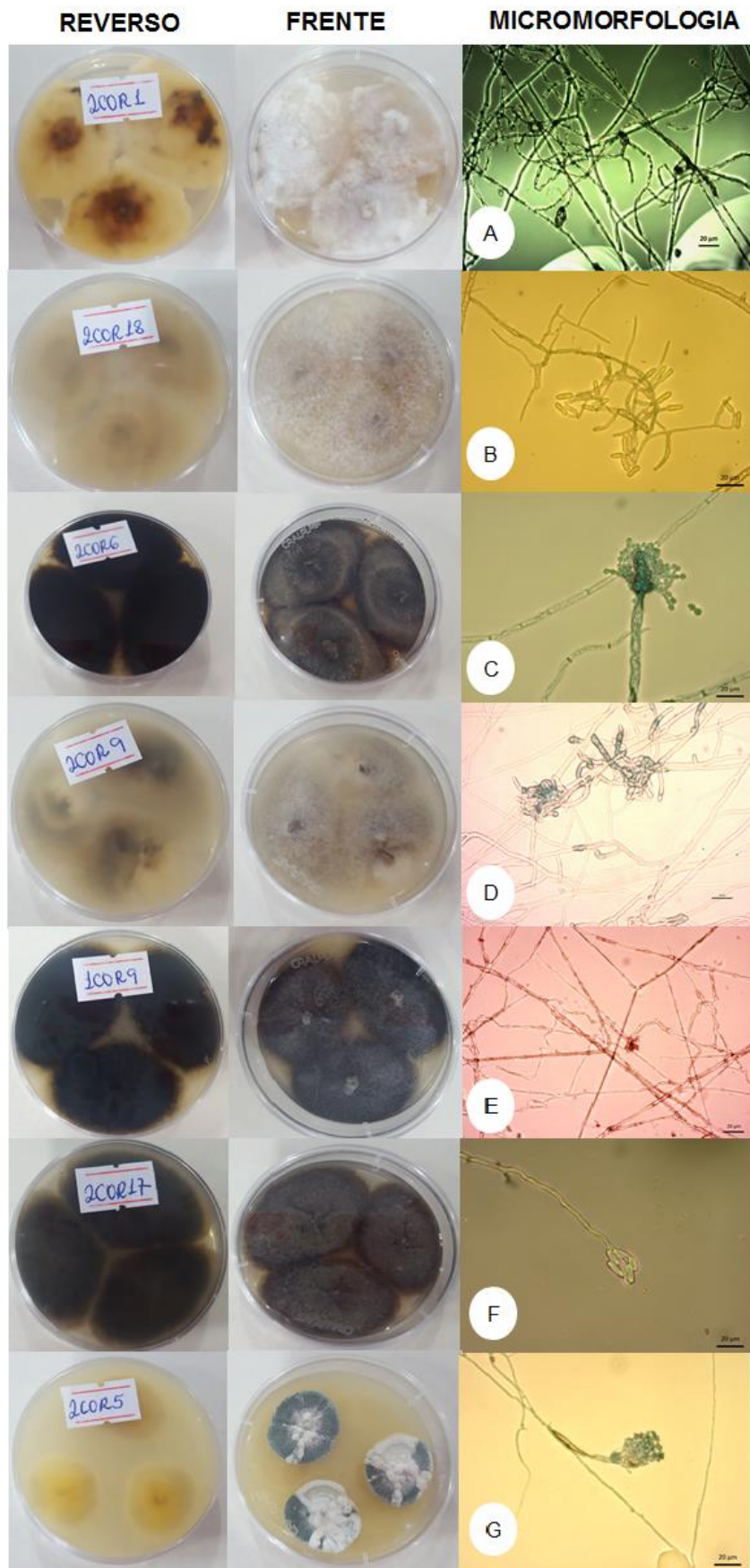


Figura 3. Caracterização macro (frente e verso) e micromorfológica das espécies identificadas (A: *Acremonium* sp., B: *Aureobasidium* sp., C: *Aspergillus* sp., D: *Chrysosporium* sp., E: *Cladosporium* sp., F: *Fusarium* sp., G: *Penicillium* sp.). Todas as fotomicrografias estão reproduzidas com escala de 20 μm .

Tabela 2. Caracterização macromorfológica dos morfotipos fúngicos obtidos no presente estudo e a relação de espécimes correspondentes.

Morfotipo	Caracterização macromorfológica	Espécimes correspondentes
	Cor da frente / cor do reverso / aspecto da borda / outras informações relevantes	
1COR 1	BRANCO / BRANCO /IRREGULAR /MÉDIO /CENTRO DO FUNGO AMARELO	<i>Aspergillus</i> sp.
1COR 2	BRANCO / AMARELO CLARO /IRREGULAR /MÉDIO	Morfoespécie 1
1COR 3	PRETO / PRETO /IRREGULAR /PEQUENO	<i>Aspergillus</i> sp.
1COR 4	CINZA / CINZA /IRREGULAR /GRANDE	morfoespécie 2
1COR 5	VERDE ESCURO / VERDE ESCURO /IRREGULAR /MÉDIO	<i>Aspergillus</i> sp.
1COR 6	AMARELO / AMARELO /REGULAR /PEQUENO /PIGMENTOU O MEIO DE CULTURA	<i>Aspergillus</i> sp.
1COR 7	CINZA CLARO / CINZA CLARO /IRREGULAR /GRANDE	<i>Fusarium</i> sp.
1COR 8	BRANCO - CREME / BRANCO - CREME /IRREGULAR /GRANDE	<i>Aureobasidium</i> sp.
1COR 9	VERDE / VERDE /IRREGULAR /GRANDE /BORDA BRANCA	<i>Cladosporium</i> sp.
1COR 10	CINZA / CINZA /IRREGULAR /GRANDE /CENTRO DO FUNGO ESVERDEADO	<i>Chrysosporium</i> sp.
1COR 14	BRANCO / BRANCO /IRREGULAR /MÉDIO	<i>Acremonium</i> sp.
1COR 16	BRANCO / AMARELO CLARO /IRREGULAR /MÉDIO	Morfoespécie 1
2COR 1	AMARELO CLARO/ BRANCO /REGULAR /MÉDIO	<i>Acremonium</i> sp.
2COR 2	VERDE ESCURO / VERDE ESCURO /IRREGULAR /MÉDIO	<i>Aureobasidium</i> sp.
2COR 3	CINZA / VERDE /IRREGULAR /MÉDIO /BORDA BRANCA	Morfoespécie 3
2COR 4	AMARELO CLARO / AMARELO CLARO /IRREGULAR /MÉDIO /CENTRO DO FUNGO LARANJA	<i>Aspergillus</i> sp.
2COR 5	BRANCO / AMARELO /REGULAR /PEQUENO /PIGMENTOU O MEIO DE CULTURA	<i>Penicillium</i> sp.
2COR 6	VERDE CLARO / VERDE CLARO /IRREGULAR /MÉDIO	<i>Aspergillus</i> sp.

2COR 7	PRETO / PRETO /IRREGULAR /MÉDIO /BORDA BRANCA	Morfoespécie 4
2COR 8	CINZA / MARROM CLARO /IRREGULAR /GRANDE	Morfoespécie 5
2COR 9	CINZA / VERDE /IRREGULAR /GRANDE /CENTRO DO FUNGO VERDE ESCURO	<i>Chrysosporium</i> sp.
2COR 10	BRANCO - CREME / BRANCO - CREME /IRREGULAR /PEQUENO	<i>Cladosporium</i> sp.
2COR 11	CINZA / CINZA /IRREGULAR /GRANDE	<i>Chrysosporium</i> sp.
2COR 12	BRANCO / BRANCO /IRREGULAR /MÉDIO	<i>Aspergillus</i> sp.
2COR 14	ROSA CLARO / ROSA CLARO /IRREGULAR /GRANDE	Morfoespécie 6
2COR 15	VERDE ESCURO / VERDE ESCURO /IRREGULAR /MÉDIO	<i>Chrysosporium</i> sp.
2COR 16	VERDE ESCURO / VERDE ESCURO /IRREGULAR /GRANDE	<i>Aspergillus</i> sp.
2COR 17	VERDE ESCURO / PRETO /IRREGULAR /GRANDE	<i>Fusarium</i> sp.
2COR 18	ROSA CLARO / BRANCO /IRREGULAR /GRANDE	<i>Aureobasidium</i> sp.
2COR 19	AMARELO ESCURO / BRANCO/IRREGULAR /MÉDIO	Morfoespécie 7
2COR 20	AMARELO ESCURO / AMARELO ESCURO /IRREGULAR /GRANDE	<i>Aspergillus</i> sp.
2COR 23	BRANCO GELO / BRANCO GELO /IRREGULAR /MÉDIO	<i>Fusarium</i> sp.
2COR 24	VERDE / VERDE /IRREGULAR /PEQUENO /BORDA AMARELO ESCURO	Morfoespécie 8

Dos 33 morfotipos obtidos, 63,6% (21) foram isolados de folhas coletadas no período chuvoso, enquanto que 36,4% (12) são correspondentes ao período de estiagem. Entre os morfotipos que ocorreram no período chuvoso, 71,4% foram

identificados por meio de sua morfologia, correspondendo a sete espécies de fungos endofíticos diferentes. Entre os morfotipos do período de estiagem, 75% foram identificados, correspondendo a seis espécies (Tabela 3).

Tabela 3. Espécies de fungos endofíticos isolados de folhas da *K. pinnata* nos períodos de estiagem e chuvoso.

Período	Quantidade de Morfotipo	Espécies detectadas	Frequência	%
Estiagem	01	<i>Aureobasidium</i> sp.	0,083	8,3
	01	<i>Acremonium</i> sp.	0,083	8,3
	04	<i>Aspergillus</i> spp.	0,333	33,3
	01	<i>Fusarium</i> sp	0,083	8,3
	01	<i>Cladosporium</i> sp.	0,083	8,3
	01	<i>Chrysosporium</i> sp.	0,083	8,3

	03	Não identificadas	0,250	25,0
Subtotal 1	12		1,000	100,0
Chuvoso	02	<i>Aureobasidium</i> spp.	0,095	9,5
	01	<i>Acremonium</i> sp.	0,048	4,8
	05	<i>Aspergillus</i> spp.	0,238	23,8
	01	<i>Cladosporium</i> sp.	0,048	4,8
	03	<i>Chrysosporium</i> spp.	0,143	14,3
	02	<i>Fusarium</i> spp.	0,095	9,5
	01	<i>Penicillium</i> sp.	0,048	4,8
	06	Não identificadas	0,286	28,6
Subtotal 2	21		1,000	100,0
TOTAL (1 + 2)	33			

O grupo taxonômico *Aspergillus* foi o que ocorreu com maior frequência em ambos os períodos amostrados (Tabela 3).

Conforme observado na Tabela 4, a diversidade, riqueza e uniformidade das espécies fúngicas foi maior no período chuvoso.

Tabela 4. Índices de diversidade alfa para os fungos endofíticos obtidos das folhas de *K. pinnata* nos períodos de estiagem e chuvoso.

Índices	Período Estiagem	Período Chuvoso
Simpson (1-D)	0,875	0,9112
Shannon (H)	2,079	2,458
Margalef (DMg)	3,366	4,289

DISCUSSÃO

Estudos com fungos endofíticos são relevantes por fornecerem informações fundamentais para a avaliação da diversidade e distribuição fúngica global, além de, potencialmente, revelarem novos táxons e novas ocorrências para as espécies existentes (STONE *et al.*, 2004). Há relatos de populações tradicionais sobre as propriedades terapêuticas das folhas de *K. pinnata*, que são utilizadas em furúnculo e para o alívio da dor de cabeça, na forma de cataplasma, colocando-se a folha aquecida sobre a região afetada; bem como no tratamento de gastrite e úlcera através do consumo do suco da folha, sendo ingerido entre as refeições (ALMEIDA *et al.*, 2000). Diante disso e, com o intuito de contribuir para o conhecimento e conservação da biodiversidade fúngica da Amazônia, a espécie vegetal *K. pinnata*

foi escolhida como objeto de estudo. Focou-se no uso de folhas ao invés de outras partes da planta para obtenção de fungos endofíticos, pois este é o órgão vegetal mais utilizado na medicina popular e em estudos de atividade biológica (MOREIRA *et al.*, 2012).

Diferentes metodologias têm sido propostas para a obtenção de fungos endofíticos a partir de folhas (LEITE *et al.*, 2013; SEBASTIANES *et al.*, 2013; GONZAGA *et al.*, 2014). Apesar das diferenças, um critério comum e de grande relevância em relação a todos as metodologias propostas diz respeito aos controles de assepsias nos procedimentos metodológicos de isolamento de fungos endofíticos, que são indispensáveis para comprovar que a desinfecção da superfície das folhas ocorreu de forma indubitável, conforme foi observado no presente

estudo, em que não houve crescimento de fungos nos controles de assepsia empregados, assegurando, dessa forma, que os fungos obtidos são verdadeiramente endofíticos.

Com base nos métodos de identificações utilizados no presente estudo, foi possível identificar sete espécies (73,3 %, n= 63/86) de fungos endofíticos dos gêneros *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Penicillium*, associados às folhas de *K. pinnata*. No entanto, oito morfoespécies (26,7%, n= 23/86) não foram identificadas por meio dos métodos morfológicos empregados. Em esforços taxonômicos futuros, abordagens baseadas em taxonomia molecular (GONZAGA et al., 2014; SANTOS et al., 2016) devem ser utilizadas para corroborar as identificações preliminares realizadas neste estudo pela taxonomia clássica.

Observou-se que os integrantes mais frequentes da comunidade fúngica endofítica de *K. pinnata* foram os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Chrysosporium* e *Fusarium* (Tabela 1), o que corrobora com o trabalho de BASTOS et al. (2004), que verificaram os gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* entre as oito espécies endofíticas associados à casca do caule de plátano (*Platanus orientalis* L.). *Aspergillus* spp. têm distribuição mundial, com a particularidade de se reproduzirem por intermédio de grandes quantidades de pequenos esporos (DEL PALACIO et al., 2003). Fungos desse gênero já foram detectados como endofíticos em outras espécies vegetais medicinais, tais como *Gloriosa superba* Linn. (BUDHIRAJA et al., 2013) e *Meyna spinosa* Roxb. (BHATTACHARYYA et al., 2017).

Fungos do gênero *Fusarium*, por sua vez, foram detectados como endofíticos em associação com o alecrim-primenta (*Lippia sidoides* Cham.) por SIQUEIRA et al., (2011) e com o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) por KUMAR & KAUSHIK

(2013). Este gênero pertence à classe Sordariomycetes, que em geral agrupa espécies que formam anamorfos filamentosos que produzem manchas brancas, rentes ao substrato. Podem ainda colonizar ramos, folhas, inflorescências e frutos através de seus conídios que são dispersos pelo ar ou pela água (MILANESI, 2009).

Outro gênero encontrado no presente estudo, *Chrysosporium* sp., possui potencial para a promoção de crescimento de plantas por meio de sua capacidade de produção de giberelinas, conforme relatado por HAMAYUN et al. (2009). Esse gênero tem sido relacionada ainda em associação com doenças do tipo rinosinusite, uma doença rara e invasiva em hospedeiro imunocomprometido, além de ser um gênero pouco conhecido, termotolerante e queratinófilo (KAMATH et al., 2015).

Fungos dos gêneros *Penicillium* (1,2%), *Cladosporium* (3,5%) e *Aureobasidium* (6,7%) foram detectados em menor frequência (Tabela 1). É válido destacar que *Penicillium* sp. é amplamente distribuído pelo mundo, sendo encontrado em solos, no ar e na vegetação em deterioração. Além disso, muitas espécies desse gênero são reconhecidas por produzirem metabólitos tóxicos como as micotoxinas mais importantes encontradas em alimentos, como a ocratoxina A, patulina, critinina e citreoviridina (PITT, 2002). Assim como verificado em nosso estudo, LIU et al. (2016) detectaram *Penicillium* spp. como endofíticas de uma planta medicinal (*Cephalotaxus hainanensis* Li).

O gênero *Cladosporium* sp. também foi detectado em associação com a planta medicinal barbatimão (*Stryphnodendrin adstringens* Mart.). São cosmopolitas na distribuição e comumente encontradas em muitos tipos de plantas e em outros substratos, sendo frequentemente isolados do solo, alimentos, tintas e outras matérias orgânicas ou como invasores secundários em lesões foliares causados por

fungos patogênicos (BROWN et al., 1998, ELMORSY, 2000, NASCIMENTO et al., 2015). Integram o filo Ascomycota, sendo a coloração escura uma de suas características principais (FREIRE, 2015).

O gênero *Aureobasidium* sp. também foi detectado, porém, com baixa frequência. Esse grupo de fungos é descrito como cosmopolita, ocorrendo em solos florestais, água doce, porção aérea de plantas, frutos, sedimentos de estuários marinhos, madeira (QUERALES, 2010). NAYAK (2015) também isolaram *Aureobasidium* sp. a partir da folha de *Pongamia pinnata* L.

A presença do gênero *Acremonium* sp., que nesse estudo foi frequente em apenas 10,5% das folhas de *K. pinnata*, encontra-se em desacordo com o estudo de BEZERRA et al., (2015) que relataram que o gênero foi o mais frequente dos isolados da planta medicinal pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link). No entanto, cabe mencionar que no estudo de BEZERRA et al., (2015), os fungos endofíticos foram isolados de folhas, sépalas, hastes e sementes. No estudo de SILVA et al. (2006), houve associação entre o crescimento vegetal de graviola (*Annona* spp.) a vários gêneros de fungos, inclusive ao *Acremonium*. Além disso, esses autores isolaram e caracterizaram fungos e suas enzimas responsáveis pelo crescimento de mudas de pinha (*Annona squamosa* L.).

O gênero *Acremonium*, que é cosmopolita, também foi investigado por VIEIRA (2010), devido à sua habilidade em produzir proteases em meio basal. A atividade proteolítica destes isolados tem sua importância quando se aponta que as proteases estão correlacionadas com o processo de penetração do fungo em seu hospedeiro (ST LEGER et al., 1987; BIDOCHKA & KHACHATOURIANS, 1994).

Os gêneros *Aspergillus* e *Chrysosporium*, encontrados no presente estudo, despertaram atenção, já que existem evidências de que algumas das

espécies dos dois gêneros produzem micotoxinas. Ainda, devido a algumas particularidades de *Aspergillus*, espécies a ele pertencentes, são capazes de se reproduzir o ano todo, sendo, portanto, uma possível explicação para o encontro de gênero com maior frequência tanto no período de estiagem como no chuvoso.

Conforme mencionado anteriormente, no período de estiagem as espécies *Aureobasidium* sp., *Acremonium* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp. e *Chrysosporium* sp. apresentaram frequência equivalente, o que sugere menor estabilidade a condições extremas. Já no período chuvoso, as espécies menos frequentes foram *Acremonium* sp., *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp.

KUMARESAN & SURYANARAYNAN (2001) relataram que alguns fatores físicos e climáticos podem influenciar a frequência de infecção dos fungos endofíticos, tais como a altitude, umidade, densidade da copa do hospedeiro, precipitação e o próprio hospedeiro. Sendo assim, alguns desses parâmetros podem estar relacionados com a baixa frequência das espécies detectadas em nosso estudo, os quais podem não apresentar estratégias efetivas que garantam o desempenho adaptativo e/ou reprodutivo destes gêneros de fungos em certos períodos sazonais.

Corroborando esses dados, a espécie *Penicillium* sp. foi encontrada apenas no período chuvoso, resultado similar se verifica no estudo de SEBASTIANES (2010), em que houve maior incidência de espécies desse gênero de fungos no período chuvoso, em relação ao período de estiagem, como endofítico em vegetais do manguezal do estado de São Paulo.

Ainda, no presente estudo, a colonização dos fungos endofíticos aumentou com a predominância do período chuvoso em relação ao período de estiagem, o que significa que a ocorrência de maior

número de endófitos esteja relacionada com o fator sazonalidade. ASSUNÇÃO (2010) também obteve maior incidência de fungos endofíticos no período chuvoso em relação a estiagem em isolados de folhas de bananeira (*Musa spp.*).

Observou-se também que no período de estiagem, as plantas apresentavam aspecto diferente daquele visto no chuvoso, isto é, folhas pequenas, número de indivíduos em pequena quantidade e indivíduos menores, o que dificultou a seleção de folhas com características ideais. De acordo com DE SANTO et al. (1976), altas temperaturas reduzem o número de conídios viáveis e sua atividade varia devido a mudanças na temperatura e disponibilidade de água.

Estudos como o aqui descrito precisam ser incentivados, sobretudo em ecossistemas ainda pobremente explorados, como a Floresta Amazônica, a fim de contribuir para o descobrimento e aprofundamento do conhecimento acerca das ações desses micro-organismos, bem como decifrar suas estratégias de sobrevivência, defesa, reprodução e adaptação, além de contribuírem para potenciais aplicações biotecnológicas.

CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho ficou evidenciado que os isolados obtidos são verdadeiramente endofíticos, já que os controles de assepsia utilizados funcionaram de forma efetiva. Observou-se diferença na frequência em que ocorreram alguns gêneros de fungos, bem como na diversidade, entre o período de estiagem e o chuvoso. Grande parte desses isolados pertence a grupos taxonômicos de fungos com potencial de aplicação biotecnológica. Diante disso, os espécimes obtidos representam uma oportunidade de prospecção biotecnológica em projetos futuros, visando a possibilidade para descobertas de novas moléculas

com atividade biológica e potencial de aplicação nas áreas da saúde, de alimentos, química, ambiental, dentre outras áreas.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à coordenação do curso de Ciências Biológicas do Instituto de Ciências e Tecnologia das Águas da UFOPA, pelo apoio logístico fornecido para as coletas de material vegetal na FLONA do Tapajós, ao Herbário da UFOPA (HSTM), pelo auxílio na identificação do material vegetal e, aos pesquisadores Me. Marcos Diones Ferreira Santana (UFOPA) e Dra. Ana Cláudia Alves Cortez (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA), que colaboraram na identificação dos espécimes fúngicos deste estudo.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.P.; SILVA, S.A.G.; SOUZA, M.L.M.; LIMA, L.M.T.R.; ROSSIBERGMANN, B.; MORAES, V.L.G.; COSTA, S.S. Isolation and chemical analysis of a fatty acid fraction of *Kalanchoe pinnata* with a potent lymphocyte suppressive activity. **Planta Medica**, v.66, p.134-137, 2000
- ASSUNÇÃO, M. M. C. **Fungos endofíticos isolados de folhas de bananeira (*Musa spp.*) e seleção de antagonistas a fitopatógenos dessa cultura**. 173f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2010.
- AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasil. Botânica** v.22, n. 2, p. 225-229, 1999.
- BARNETT, H. L; HUNTER, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. **New York: MacMillan**, v. 3, p. 241, 1972.
- BASTOS, D. Z. L.; PIMENTEL, I. C.; DYKSTRA, C.; KANIA, C. E.; GABARDO, J. OLIVEIRA, B. H. Fungos Associados à casca do caule de *Platanus orientalis* L. **Revista Estudos de Biologia**, v. 26, n. 54, p. 37-41, 2004.

- BEZERRA, J. D. P.; NASCIMENTO, C. C. F.; BARBOSA, R. N.; SILVA, D. C. V.; SVEDESE, V. M.; NOGUEIRA, E. B. S.; GOMES, B. S.; PAIVA, L. M.; MOTTA, C. M. S. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forticata*: Diversity and biotechnological potential. **Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 49-57, 2015.
- BHATTACHARYYA, L. H.; BORAH, G.; PARKASH, V.; BHATTACHARYYA, P. N. Fungal endophytes associated with the ethnomedicinal plant *Meyna spinosa* Roxb. **Current Life Sciences**, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2017.
- BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Basic proteases of entomopathogenic fungi differ in their adsorption properties to insect cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 64, n. 1, p. 26-32, 1994.
- BROWN, K.B.; HYDE, K.D.; GUEST, D.I. Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia. **Fungal Diversity**, v. 1, p. 27-51, 1998.
- BUDHIRAJA, A.; NEPALI, K.; SAPRA, S.; GUPTA, S.; KUMAR, S.; DHAR, K.L. Bioactive metabolites from an endophytic fungus of *Aspergillus* species isolated from seeds of *Gloriosa superba* Linn. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 1, p. 323-329, 2013.
- CAFÊU, M. C.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; BOLZANI, V. S.; ARAÚJO, A. R. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.
- CARVALHO, C. R.; GONÇALVES, V. N.; PEREIRA, C. B.; JOHANN, S.; GALLIZA, I. V.; ALVES, T. M. A.; RABELLO, A.; SOBRAL, M. E. G.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Conville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. **Symbiosis**, v. 57, p. 95-107, 2012.
- CARVALHO, L. I. C. **Aspergillus e Aspergilose – Desafios no Combate da Doença**. 2013. 56f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa. Porto. 2013.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v.24, p. 270-276, 1939.
- CUI, J. L.; GUO, S. X.; XIAO, P. G. Antitumor and antimicrobial activities of endophytic fungi from medicinal parts of *Aquilaria sinensis*. **Journal of Zhejiang University**, v. 12, n. 5, p. 385-392, 2011.
- DE SANTO, A. V.; ALFANI, A.; SAPIO, A. Soil metabolism in beech Forest of Monte Taburno (Campânia Apennines). **Oikos**, v. 27, n. 1, p. 144-152, 1976.
- DEL PALACIO, A.; CUETARA, M. S.; PONTON, J. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 20, n. 3, p. 90-98, 2003.
- EL-MORSY, E. M. Fungi isolated from the endorhizosphere of halophytic plants from the Red Sea Coast of Egypt. **Fungal Diversity**, v. 5, p. 43-54, 2000.
- FERNANDES, E. G.; PEREIRA, O. L.; SILVA, C. C.; BENTO, C. B. P.; QUEIROZ, M. V. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. **Microbiological Research**, v. 181, p. 84-92, 2015.
- FREIRE, K. T. L. S. **Caracterização Taxonômica de espécies do Complexo Cladosporium Cladosporioides depositadas na Micoteca Urm da Universidade Federal de Pernambuco**. 2015. 59f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2015.
- GANGE, A. C.; ESCHEN, R.; WEARN, J. A.; THAWER, A.; SUTTON, B. C. Differential effects of foliar endophytic fungi on insect herbivores attacking a herbaceous plant. **Oecologia**, v. 168, n. 4, p. 1023-1031, 2012.
- GAO, F.; DAI, C.; LIU, X. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 13, p. 1346-1351, 2010.
- GONZAGA, L. L.; COSTA, L. E. O.; SANTOS, T. T.; ARAÚJO, E. F.; QUEIROZ, M. V. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 2, p. 485-496, 2014.
- HAMAYUN, M.; KHAN, S.; AHMAD, N.; TANG, D. S.; KANG, S.M.; NA, C. I.; SOHN, E. Y.; HWANG, Y. H. *Cladosporium sphaerospermum* as

new plant growthpromoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.) Merr. **World Journal Microbiology Biotechnologic**, v. 25, n. 4, p. 627–632, 2009.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Pacote de software de estatística paleontológica para educação e análise de dados. **Paleontol Electron**, v. 4, p. 1-9, 2001.

KAMATH, P. M.; PRASAD, V.; SHENOY, V.S.; MUKUNDAN, A.; SHENOY, S. *Chrysosporium*: Na Uncommon Fungus in Chronic Rhinosinusitis. **Journal of Clinical & Diagnostic Research**, v. 9, n. 3, p. MD01-MD02, 2015.

KAUL, S.; GUPTA, S.; AHMED, M.; DHAR, M. K. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 487-505, 2012.

KHAN, A. R.; ULLAH, I.; WAQAS, M.; SHAHZAD, R.; HONG, S. J.; PARK, G. S.; JUNG, B. K.; LEE, I. J.; SHIN, J. H. Plant growth-promoting potential of endophytic fungi isolated from *Solanum nigrum* leaves. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 1461–1466, 2015.

KUMAR, S.; KAUSHIK, N. Endophytic Fungi Isolated from Oil-Seed Crop *Jatropha curcas* Produces Oil and Exhibit Antifungal Activity. **Plos One**, v. 8, n. 2, p. 1-8, 2013.

KUMARESAN, V.; SURYANARYANAN, T. S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. **Mycology Research**, v. 105, n. 11, p. 1388-1391, 2001.

LARONE, D. H. Medically important fungi; a guide to identification. Washington: **American Society for Microbiology**, v. 230, 1993.

LEITE, T.S.; CNOSSEN-FASSONI, A.; PEREIRA, O.L.; MIZUBUTI, E.S.G.; ARAÚJO, E.F.; QUEIROZ, M.V. Novel and Highly Diverse Fungal Endophytes in Soybean Revealed by the Consortium of Two Different Techniques. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 56–69, 2013.

LIU, Y. H.; HU, X. P.; LI, W.; CAO, X. Y.; YANG, H. R.; LIN, S. T.; XU, C. B.; LIU, S. X.; LI, C. F. Antimicrobial and antitumor activity and diversity of endophytic fungi from traditional Chinese medicinal plant *Cephalotaxus hainanensis* Li. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, 2016.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos Fitopatogênicos**. 1993. 350f. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1993.

MERCADO-SIERRA, A.; HOLUBOVÁ-JECHOVÁ, V.; MENA-PORTALES, J.; FRAGINALS GONZÁLES, G. Hongos imperfectos de Pinar Del Rio, Cuba: El ambiente y la taxonomía de hifomicetes demaciáceos hallados. **Acta Botanica Cubana**, v. 22, p. 1-10, 1987.

MILANESI, P. M. **Caracterização, toxicidade e Fusarium spp. Em genótipos de soja em sistema de plantio direto**. 2009.57f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

MOREIRA, H. M. **A importância da Amazônia na definição da posição brasileira no regime internacional de mudanças climáticas**. 2009. 21f. Tese (Pós-Graduação em Relações Internacionais “San Tiago Dantas”). São Paulo, 2009.

MOREIRA, T. F. **Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (Reissek) M. C. Johnst. (Rhamnaceae)**. 2012. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Curitiba, 2012.

NASCIMENTO, T. L. *et al.* Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. **Fungal Ecology**, v. 14, p. 79-86, 2015.

NAYAK, B. K. Studies on endophytic fungal diversity from different leaf samples of *Pongamia pinnata*. **International Journal of MediPharm Research**, v. 01, n. 02, p. 134-138, 2015.

PEIXOTO-NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microrganismos Endofíticos em Plantas: Status atual e Perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. 2002. 197f. Australia: Food Science Australia a Joint Venture of CSIRO and AFISCI, 2002.

QUERALES, P. J. **Caracterização morfológica e genética de *Fusarium* spp. isolados de sementes e associados à podridão do colmo de milho (*Zea mays* L.)**. 2010. 87f. Tese de Doutorado defendida

pela Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, p. 265–270, 1950.

SANTOS, T. T.; LEITE, T. S.; QUEIROZ, C. B.; ARAÚJO, E. F.; PEREIRA, O. L.; QUEIROZ, M. V. High genetic variability in endophytic fungi from the genus *Diaporthe* isolated from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 2, p. 388–401, 2016.

SEBASTIANES, F. L. S. **Diversidade genética e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de manguezais do estado de São Paulo**. 2010. 151f. Tese (Doutorado em Ciências: Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade de São Paulo, 2010.

SEBASTIANES, F. L. S.; DUMARESQ, A. S. R.; LACAVA, P. T.; HARAKAVA, R.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S.; KLEINER, A. A. P. Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. **Current Genetics**, v. 59, n. 3, p. 153-166, 2013.

SILVA, R. L. O.; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M.T. Fungos endofíticos em *Annona* spp. isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 649–655, 2006.

SIQUEIRA, V. M.; CONTI, R.; ARAÚJO, J. M.; MOTTA, C. M. S. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis**, v. 53, n. 2, p. 89-95, 2011.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; FILHO, S.A.; PINHEIRO, B.M.L.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

ST. LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Distribution of chymoelastases and trypsin-like enzymes in five species of entomopathogenic deuteromycetes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 258, p. 123-131, 1987.

STONE, J. K.; POLISHOOK, J. D.; WHITE, J. R. J. Endophytic fungi. In: Mueller, G.; Bills, G. F.; Foster, M. S. (eds) **Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods**. Elsevier. Burlington, p. 241–270, 2004.

SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M. B.; GOLAPAN, V. Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. **Fungal Diversity**, v. 54, n. 1, p. 19-30, 2012.

SURYANARAYANAN, T.S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M.B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; T. S. MURALI, T.S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal biology reviews**, v. 23, n. 1-2, p. 9-19, 2009.

VIEIRA, P. D. S. **Fungos endofíticos associados a algodoeiros transgênico e não-transgênico**. 2010. 95f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos). Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

YADAV, N. P. DIXIT, V. K. 2003. Atividade Hepatoprotetora de folhas de *Kalanchoe pinnata* Pers. **Journal Ethnopharmacology**, v. 86, n. 2, p. 197-202, 2003.