



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA Prof. Chaves Batista
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

LAYANNE DE OLIVEIRA FERRO

DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Miconia mirabilis* [(Aubl.) L.O. WILLIAMS] DA RESERVA BIOLÓGICA DE PEDRA TALHADA E PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE

Recife
2020

LAYANNE DE OLIVEIRA FERRO

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Miconia mirabilis* [(Aubl.) L.O.
WILLIAMS] DA RESERVA BIOLÓGICA DE PEDRA TALHADA E PRODUÇÃO DE
L-ASPARAGINASE**

Recife

2020

LAYANNE DE OLIVEIRA FERRO

DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Miconia mirabilis* [(Aubl.) L.O. WILLIAMS] DA RESERVA BIOLÓGICA DE PEDRA TALHADA E PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Maria de Souza-Motta

Co-orientador: Prof. Dr. Jadson Diogo Pereira Bezerra

Recife

2020

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-
4/1788

Ferro, Layanne de Oliveira

Diversidade de fungos endofíticos de *Miconia mirabilis* [(Aubl.) L.O. Williams] da reserva biológica de Pedra talhada e produção de Lasparaginase / Layanne de Oliveira Ferro. - 2020.

94 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Maria de Souza-Motta.

Coorientador: Prof. Dr. Jadson Diogo Pereira Bezerra.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Recife, 2020.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Fungos. 2. Enzimas de fungos. 3. Biodiversidade. I. Souza-Motta, Cristina Maria de (orientadora). II. Bezerra, Jadson Diogo Pereira (coorientador). III. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-006

LAYANNE DE OLIVEIRA FERRO

DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Miconia mirabilis* [(Aubl.) L.O. WILLIAMS] DA RESERVA BIOLÓGICA DE PEDRA TALHADA E PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 18/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristina Maria Souza-Motta (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Alexandre Reis Machado (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Rafael José Vilela de Oliveira (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

É chegado a hora de fechar mais um ciclo e eu só posso ser grata por todos os caminhos que Deus me permitiu trilhar para que chegasse até aqui. A Ele, meu maior agradecimento por mais essa conquista. Deus sempre colocou em meu caminho pessoas que refletem seu amor e bondade, entre essas pessoas minha família que é minha sustentação e motivação. Em especial meus pais Luiz de Gonzaga Machado Ferro e Maria Luiza de Oliveira ferro que nunca mediram esforços para que eu realizasse meus sonhos. Minhas irmãs, tias, tios, avós, primos e todo os membros da minha família que sempre me apoiaram e incentivaram nesse caminho. A todos os meus amigos que construí ao longo da vida, sou muito abençoada por tê-los e dividir vários momentos que marcaram minha trajetória. Meus professores durante toda a minha vida escolar e acadêmica por todos os ensinamentos muitas vezes além da sala de aula, em especial meus orientadores, Professora Cristina Souza-Motta e Professor Jadson Diogo Pereira Bezerra, por toda a confiança e suporte durante esses dois anos de mestrado. Agradeço a todo o programa de pós graduação em Biologia de Fungos pelo suporte para desenvolver minha pesquisa, em especial meus amigos do Laboratório de Micologia Ambiental que sempre estiveram dispostos a me ajudar e me acolheram ao me mudar para Recife, aliás, todos que conheci nessa cidade sempre me estenderam a mão e fizeram me sentir em casa, como muitos falam “já sou considerada a alagoana mais pernambucana” que já viram. Ao Laboratório de Micologia ambiental, em nome dos professores Laura Mesquita Paiva e Alexandre Reis Machado, MICOTECA URM e Laboratório de Taxonomia e Biotecnologia de fungos em nome da professora Cristina Souza Motta e o Laboratório de Biologia Molecular em nome da professora Elaine Malosso e todos os componentes de ambos laboratórios pelo suporte, acolhimento, ajuda e disponibilidade. A todos os técnicos e secretários do Departamento de Micologia por sempre estarem dispostos a nos ajudar e resolver as burocracias. A todos os amigos que construí em Recife, vocês foram essenciais para que mantivesse o equilíbrio quando as coisas apertavam e me mostraram que tudo pode ficar melhor quando olhado de maneira mais leve. A FACEPE pela bolsa de estudos concedida durante os dois anos de pesquisa. Ao CNPq em nome da professora Tatiana Baptista Gibbertoni pelo financiamento do projeto Biologia da Conservação de Fungos sensu lato em áreas de Mata Atlântica do Nordeste Brasileiro do qual minha pesquisa fez parte. Ao ICMBIO, os mateiros Seu Timbó e Edvaldo e os amigos de coleta pela ajuda durante a mesma. Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite de contribuir

com a melhoria do trabalho. A todos que contribuíram direta e indiretamente com essa pesquisa:
minha eterna gratidão.

Subi correndo no primeiro bonde, sem esperar que
parasse, sem saber para onde ia. Meu caminho, pensei
confuso, meu caminho não cabe nos trilhos de um
bonde

(Caio Fernando Abreu *in* Morangos Mofados)

RESUMO

Fungos endofíticos podem ser definidos como microrganismos que habitam o interior de vegetais em alguma ou toda parte do seu ciclo de vida sem que prejuízos sejam notados. A complexidade na interação entre endófito e planta ainda é muito questionada, tornando-se necessários estudos que visem compreender a relação. Um bioma importante a ser explorado é a Mata Atlântica, uma das florestas tropicais mais ricas em diversidade e que possui apenas 2% do seu território protegido por Unidades de Conservação (UCs). Entre as UCs da Mata Atlântica, a Reserva Biológica de Pedra Talhada (REBIO de Pedra Talhadada), situada nos estados de Alagoas e Pernambuco, possui grande diversidade vegetal, onde também se encontra a planta *Miconia mirabilis*. Endófitos fúngicos são conhecidos por seu potencial biotecnológico através da produção de metabólitos secundários, como a enzima L-asparaginase, importante nas indústrias farmacêutica e alimentícia. O objetivo desse estudo foi determinar a diversidade de fungos endofíticos de *M. mirabilis* na Reserva Biológica de Pedra Talhada e verificar o potencial dos endófitos na produção da enzima L-asparaginase. O isolamento foi realizado através de coleta de folhas de *M. mirabilis* em área natural e área antropizada da REBIO de Pedra Talhadada. Após a purificação, os isolados foram identificados por taxonomia morfológica e/ou molecular. Índices ecológicos foram utilizados para estimar riqueza e diversidade das áreas estudadas, e árvores filogenéticas utilizando sequências de DNA foram construídas para agrupar os fungos endofíticos estudados. Um total de 270 fungos foram isolados, sendo *Xylaria* o gênero mais frequente, seguido de *Colletotrichum* e *Nemania*. O estudo apresentou uma alta taxa de colonização dos fragmentos foliares (>90%) o que pode estar relacionado ao período de estudo (chuvoso) e a área coletada (floresta tropical úmida). Apesar de um alto número de isolados de fungos endofíticos, a diversidade foi relativamente baixa e não mostrou diferença entre as áreas. A dominância de alguns gêneros pode estar relacionada a uma diversidade menor que outros estudos com fungos endofíticos. Novidades taxonômicas são comuns em estudos de comunidades endofíticas sendo a espécie *Penicillium alagoense* descrita nesse estudo. Alguns fungos foram selecionados e testados quanto a produção da enzima L-asparaginase e o isolado N39 do gênero *Diaporthe* foi o maior produtor (1,59 U/g). Alguns fungos endofíticos já foram relatados como bons produtores de L-asparaginase, sendo os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* bastante citados na literatura. Esse foi o segundo estudo que mostra *Diaporthe* como produtor da enzima. É necessário estudos a respeito da diversidade de fungos endofíticos em plantas ainda não estudadas e nos diversos ecossistemas, ressaltando a importância da conservação desses biomas. A manutenção dos

fungos endofíticos em seu hábitat natural é importante para possíveis estudos que ampliem o conhecimento de sua diversidade e distribuição, bem como a utilização desses microrganismos como potenciais produtores biotecnológicos.

Palavras-chave: Biodiversidade brasileira. Endófitos fúngicos. Enzimas. Riqueza de fungos.

ABSTRACT

Endophytic fungi can be defined as microorganisms that inhabit the interior of plants in some or all of their life cycle without damage being noticed. The complexity of the interaction between endophyte and plant is still very much questioned, making studies that aim to understand the relationship necessary. An important biome to be explored is the Atlantic Forest, one of the tropical forests richest in diversity and which has only 2% of its territory protected by Conservation Units (UCs). Among the UCs of the Atlantic Forest, the Pedra Talhada Biological Reserve (REBIO de Pedra Talhadada), located in the states of Alagoas and Pernambuco, has great plant diversity, where the *Miconia mirabilis* plant is also found. Fungal endophytes are known for their biotechnological potential through the production of secondary metabolites, such as the enzyme L-asparaginase, important in the pharmaceutical and food industries. The aim of this study was to determine the diversity of *M. mirabilis* endophytic fungi in the Pedra Talhada Biological Reserve and to verify the potential of endophytes in the production of the enzyme L-asparaginase. The isolation was accomplished by collecting leaves of *M. mirabilis* in a natural and anthropized area of REBIO in Pedra Talhadada. After purification, the isolates were identified by morphological and/or molecular taxonomy. Ecological indexes were used to estimate the richness and diversity of the studied areas, and phylogenetic trees using DNA sequences were built to group the studied endophytic fungi. A total of 273 fungi were isolated, *Xylaria* being the most frequent genus, followed by *Colletotrichum* and *Nemania*. The study showed a high rate of colonization of leaf fragments (> 90%) which may be related to the study period (rainy) and the area collected (humid tropical forest). Despite a high number of isolates of endophytic fungi, the diversity was relatively low and showed no difference between areas. The dominance of some genera may be related to a lower diversity than other studies with endophytic fungi. Taxonomic novelties are common in studies of endophytic communities and the species *Penicillium alagoense* is described in this study. Some fungi were selected and tested for the production of the L-asparaginase enzyme and the N39 isolate of the genus *Diaporthe* was the largest producer (1.59 U / g). Some endophytic fungi have already been reported as good producers of L-asparaginase, with the genera *Aspergillus* and *Penicillium* being widely cited in the literature. This was the second study showing *Diaporthe* as an enzyme producer. Studies are needed regarding the diversity of endophytic fungi in plants not yet studied and in the different ecosystems, highlighting the importance of the conservation of these biomes. The maintenance of endophytic fungi in their

natural habitat is important for possible studies that expand the knowledge of their diversity and distribution, as well as the use of these microorganisms as potential biotechnological producers.

Keywords: Brazilian biodiversity. Fungal endophytes. Enzymes. Richness of fungi.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Localização da Reserva de Pedra Talhada no Brasil e delimitação das divisas dos três municípios sobre as quais ela se estende.....	32
Figura 2 - Reserva Biológica de Pedra Talhada – Quebrângulo/Alagoas.....	32
Figura 3 - Folhas de <i>Miconia mirabilis</i> presentes na Reserva Biológica de Pedra Talhada.....	34
Figura 4 - Reação catalisada pela enzima L-Asparaginase.....	36
Figura 5 - Esquema ilustrando o processo de reação da enzima L-asparaginase nas células.....	37
Figura 6 - Representação da metodologia de amostragem, com delimitação dos transectos e parcelas onde os fungos sensu lato serão coletados.....	44
Figura 7 - Esquema de isolamento de fungos endofíticos de folhas de <i>Miconia mirabilis</i> da Reserva Biológica de Pedra Talhada (Mata Atlântica).....	46
Figura 8 - Filograma obtido por inferência bayesiana a partir de análises de sequências da região ITS do rDNA demonstrando o posicionamento de 113 fungos endofíticos isolados de <i>Miconia mirabilis</i> em área de Mata Atlântica do nordeste brasileiro. <i>Fuscoporia</i> sp. (Dai 11680, Basidiomycota) foi utilizado como grupo externo. Valores de probabilidade posterior a partir de 0.98 são mostrados perto dos nós. Os isolados destacados com a cor verde representam isolados provenientes da área natural e os com cor azul da área antropizada.....	54
Figura 9 - Filograma obtido através de análise de verossimilhança a partir de análises de sequências da região RPB2 do rDNA mostrando o posicionamento de 55 fungos endofíticos isolados de <i>M. mirabilis</i> em área de Mata Atlântica do nordeste brasileiro pertencentes ao gênero <i>Xylaria</i> sp. <i>Biscogniauxia arima</i> (Basidiomycota WSP 122) foi utilizado como grupo externo. Valores de bootstrap a partir de 70% são mostrados perto dos nós. Os representantes de cor verde representam a área natural e os de cor azul a área antropizada do presente estudo..	57
Figura 10 - Representação gráfica da frequência relativa de fungos endofíticos de <i>Miconia mirabilis</i> nas áreas natural e antropizada da Mata Atlântica da REBIO Pedra Talhada, Brasil.....	59
Figura 11 - Representação gráfica da frequência absoluta de fungos endofíticos de <i>Miconia mirabilis</i> nas áreas natural e antropizada da Mata Atlântica da REBIO Pedra Talhada, Brasil.....	60
Figura 12 - Diagrama de Venn mostrando os gêneros de fungos endofíticos únicos e compartilhados entre áreas natural e antropizada.....	64

Figura 13 - Atividade enzimática da L-asparaginase de fungos endofíticos de *M. mirabilis* - Teste não paramétrico de *Kruskal – Wallis* ($p > 0,05$). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente uma da outra..... 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de trabalhos de fungos endofíticos e seu respectivo hospedeiro.....	24
Tabela 2 - <i>Primers</i> utilizados para obtenção de sequencias de genes específicos para identificação molecular dos fungos endofíticos.....	47
Tabela 3 - Taxa de colonização dos fragmentos foliares por indivíduos dos fungos endofíticos isolados de de <i>Miconia mirabilis</i> nas áreas natural (AN) e antropizada (AA) da Mata Atlântica da REBIO Pedra Talhada, Brasil.....	53
Tabela 4 - Comunidades de fungos endofíticos isolados de <i>Miconia mirabilis</i> na Reserva Biológica de Pedra Talhada, Alagoas, Brasil. fa = frequência absoluta, fr = frequência relativa....	62
Tabela 5 - Atividade de L-asparaginase obtida por fungos endofíticos isolados de folhas de <i>Miconia mirabilis</i> em área de Mata Atlântica.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHA	Ácido L-aspartil-B-Hidroxâmico
ASNase	L-asparaginase
BDA	Ágar Batata Dextrose
CDM	Czapek Dox modificado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HCl	Ácido clorídrico
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
ITS	Internal transcript Spacer
LLA	Leucemia linfoide aguda
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Logaritmo decimal do inverso da atividade de íons de hidrogênio numa solução
RNA	Ácido ribonucleico
Rebio	Reserva Biológica
Rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
U	Unidade de atividade enzimática
U/g ⁻¹	Unidadede atividade enzimática por grama
UFC	Unidade formadora de colônia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
ml	Microlitro
UCs	Unidades de Conservação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS – BREVE HISTÓRICO E CONCEITOS.....	21
2.2 DIVERSIDADE, DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS E RELAÇÃO COM O HOSPEDEIRO.....	23
2.3 MATA ATLÂNTICA.....	30
2.3.1 Reserva Biológica de Pedra Talhada.....	31
2.3.2 Melastomatacea Juss.....	33
2.3.3 <i>Miconia mirabilis</i> L. O. Williams.....	33
2.4 FUNGOS ENDOFÍTICOS PRODUTORES DE ENZIMAS.....	34
2.5 A ENZIMA L-ASPARAGINASE.....	35
2.5.1 Breve histórico sobre a enzima L-asparaginase.....	41
2.5.2 L-asparaginase produzida por fungos endofíticos.....	42
3 METODOLOGIA.....	44
3.1 ÁREA DE COLETA.....	44
3.2. COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	45
3.3 IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	45
3.3.1 Identificação morfológica dos fungos endofíticos.....	46
3.3.2 Identificação molecular dos fungos endofíticos.....	46
3.3.2.1 Extração, amplificação de fragmentos do DNA e sequenciamento.....	46
3.3.2.2 Alinhamento das sequências e análise filogenética.....	48
3.4 ANÁLISES ECOLÓGICAS.....	49
3.5 SELEÇÃO DE FUNGOS QUANTO À PRODUÇÃO DE L- ASPARAGINASE (ASNASE) EM MEIO LÍQUIDO.....	49
3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	51
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA ATIVIDADE DA L-ASPARAGINASE.....	51
4 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS DADOS.....	52
4.1 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>M. mirabilis</i> : ANÁLISES FIOGENÉTICAS E ECOLÓGICAS.....	52
4.2 PRODUÇÃO DA ENZIMA L-ASPARAGINASE.....	64

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
REFERÊNCIAS.....	69
APÊNDICE A – <i>Penicillium alagoense</i> L.O. Ferro, A.D. Cavalcanti, O.M.C. Magalhães, Souza-Motta e J.D.P. Bezerra, <i>sp. nov.</i> (Persoonia 42: 291– 473).....	87
ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DO ICMBIO.....	90

1 INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos são definidos como microrganismos que habitam em todo, ou pelo menos um período de seu ciclo de vida, o interior de vegetais sem causar prejuízos aparentes (Azevedo e Araújo, 2007; Hyde e Soyong, 2008; Suryanarayanan *et al.*, 2005; White Jr. e Bacon, 2012, Hardoim *et al.*, 2015).

É estimado que existam entre 2,2 e 3,8 milhões de espécies de fungos no mundo, entretanto, apenas aproximadamente 120 mil foram descritas até então, menos de 10% da estimativa total (Hawksworth e Lücking, 2017). No que diz respeito a diversidade endofítica, das mais de 300 mil espécies vegetais, apenas uma pequena parcela tem comunidade endofítica já caracterizada (Strobel *et al.*, 2001). Entretanto, endófitos correspondem um considerável número de fungos ainda não descritos (Baucom *et al.*, 2012), reforçando a necessidade de estudos que forneçam informações a respeito da diversidade e distribuição global desses microrganismos (Suryanarayanan, 2013; Vaz *et al.*, 2014).

A interação endófito x hospedeiro é complexa e pouco compreendida (Owen e Hundley, 2004; Compant *et al.*, 2016). Duas hipóteses principais são levantadas: a do equilíbrio antagônico e a da simbiose mutualística (Schluz e Boyle, 2005; Kogel *et al.*, 2006). No entanto, sabe-se que esses microrganismos e suas interações com seus hospedeiros atuam no desenvolvimento das plantas, bem como na defesa a estresse, doenças e insetos (Clay, 1988; Azevedo *et al.*, 2000; Tadych *et al.*, 2012; White Jr. e Bacon, 2012; Santoyo *et al.*, 2016). Além disso, acredita-se que a diversidade da comunidade endofítica está associada com fatores ligados a características do vegetal, do microrganismo e do ambiente onde ocorre a interação (Dudeja e Giri, 2014).

Assim sendo, os biomas brasileiros (hotspots) se sobressaem por abrigarem enorme diversidade (Noriler *et al.*, 2018). Um desses “hotspots” é a Mata Atlântica, uma das áreas mais ricas em diversidade, porém que abriga muitas espécies ameaçadas. A região ocupa cerca de 15% do território brasileiro, abrangendo 17 estados (SOS Mata Atlântica, 2019).

A antropização constante desde a colonização e a exploração excessiva dos recursos naturais vem acarretando fortes perdas de diversidade biológica, resultando em apenas 12,4% de área original de Mata Atlântica atualmente (Veríssimo *et al.*, 2004; SOS Mata Atlântica, 2019).

Com a finalidade de conservar e proteger a diversidade biológica “in situ” foram criadas no Brasil as Unidades de Conservação (UCs), porém menos de 2% do bioma Mata Atlântica possui alguma proteção legal (Braz e Cavalcanti, 2001; Tabarelli et al., 2005). Entre as UCs na Mata Atlântica, encontra-se a reserva Biológica de Pedra Talhada (REBIO de Pedra Talhada), situada nos estados de Alagoas (nos municípios de Chã Preta e Quebrangulo) e Pernambuco (nos municípios de Correntes e Lagoa do Ouro) foi criada em 13 de dezembro de 1989, com o objetivo de proteger a Mata Atlântica. A REBIO está localizada em área de transição entre a Floresta Estacional e a Caatinga e retrata partes de florestas úmidas rodeadas por floresta seca (ICMBio, 2019).

Dentre a diversidade vegetal da REBIO, encontra-se a espécie *Miconia mirabilis* (Aubl.) L.O. Williams (*Melastomataceae*) caracterizada por crescimento muito rápido e valorização na restauração de áreas degradadas (Pessoa et al., 2012). A família Melastomataceae vem sendo promissora devido a pesquisas de investigação biológica e fotoquímica, pois além de apresentarem alto número de espécies, ainda são pouco estudadas (Leite, 2009).

São diversos os estudos que demonstram que os endófitos possuem grande potencial para a produção de metabólitos de interesse biotecnológico, tais como antimicrobianos (Nascimento et al., 2015; Malhadas et al., 2017; Eze et al., 2018), substâncias antitumorais (Chandra, 2012; Cheng et al., 2016; Li et al., 2018) e enzimas, como por exemplo, a L-asparaginase (Bezerra et al., 2012; Silva et al., 2018; Pádua et al., 2018).

Uma das enzimas recentemente estudada para a produção através de endófitos é a L-asparaginase, pois devido a sua ação de hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia (Jain et al., 2012) as células tumorais morrem por apoptose, pois são privadas de um elemento fundamental para síntese de proteínas, além do que, as células saudáveis não são afetadas (Narta et al., 2007). A L-asparaginase vem sendo então, utilizada como forma de tratamento para leucemias (linfoblástica aguda, mielocítica aguda, linfocítica crônica), doença de Hodgkin e alguns tipos de sarcomas, como por exemplo, o linfossarcoma (Devi e Azmi, 2012). Além disso, esta enzima é utilizada na indústria alimentícia para evitar a formação de acrilamida em alimentos processados sob altas temperaturas, tal uso é importante, pois a acrilamida é classificada como neurotoxina potencialmente cancerígena (Mohan Kumar et al., 2012).

A enzima pode ser obtida através de plantas ou algumas espécies de animais, porém existem dificuldades na extração da L-asparaginase por essas fontes. Microrganismos são fontes eficientes e de menor custo na produção desta enzima (El-Bessoumy et al., 2004). A L-asparaginase comercializada atualmente para o uso clínico é derivada de bactérias das espécies *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* (Duval et al., 2002). Porém, o uso prolongado da enzima por fontes procarióticas produz anticorpos no homem, podendo neutralizar o efeito do fármaco ou ainda provocar choques anafiláticos (Amena et al., 2010). Estudos como o de Dange e Peshwe (2015) indicam microrganismos eucarióticos como produtores de L-asparaginase com menores efeitos colaterais. Sendo assim, em razão da importância da L-asparaginase no tratamento oncológico, é fundamental a procura por novas fontes desta enzima com o intuito de reduzir os efeitos colaterais e obter aumento de sua produção e disponibilidade (Lopes et al., 2015).

Os vegetais mostram-se como potencial substrato para o desenvolvimento de microrganismos endofíticos. Contudo, o conhecimento sobre esses endófitos é escasso e, especificamente em *Miconia mirabilis*, na Mata Atlântica do Nordeste brasileiro não há relatos. Devido ao aumento da aplicação de enzimas, é importante o conhecimento a respeito do potencial biotecnológico de fungos endofíticos de plantas ainda não exploradas, podendo também ser descobertos novos táxons. É importante também ressaltar a necessidade de obter novas fontes para a extração de L-asparaginase, pois devido aos seus benefícios citados anteriormente e sua crescente demanda, microrganismos, em especial algumas espécies de fungos, podem ser promissoras quanto à produção da enzima.

O objetivo geral deste trabalho foi determinar a diversidade de fungos endofíticos de *Miconia mirabilis* da Reserva biológica de Pedra Talhada e detectar o potencial quanto a produção da L-asparaginase. Os objetivos específicos foram:

- Isolar e identificar por ferramentas morfológicas e moleculares os fungos endofíticos de *Miconia mirabilis* em áreas naturais e áreas antropizadas;
- Enriquecer as bases de dados genéticos de microorganismos de áreas de Mata Atlântica;
- Apresentar dados ecológicos da estimativa da riqueza, diversidade, abundância relativa e similaridade dos fungos isolados nas duas áreas;
- Selecionar isolados de fungos com potencial para produção de L- asparaginase.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS – BREVE HISTÓRICO E CONCEITOS

Os microrganismos endofíticos são citados desde o início do século XIX, mas somente em 1866, através de Barry, foram delineadas as prováveis diferenças entre endófitos e fitopatógenos (Azevedo, 1998). Na tradução fiel, a palavra endófito é originada do grego (*endhon* + *phytón*) e quer dizer “no interior da planta” (Kobayashi e Palumbo, 2000). O estudo dos microrganismos endofíticos foram definidos por Unterseher et al. (2012) como “endofitologia”.

Na década de 70, a importância dessas relações para o fungo e seu hospedeiro começaram a ter mais relevância e os estudos com fungos endofíticos ganharam destaque passando a ser mais detalhados, tendo como finalidade entender sobre a interação simbiótica entre eles e seus hospedeiros (Carrol et al., 1977), onde todo órgão do hospedeiro pode ser colonizado pelo endófito, no qual, todas as interações endofíticas terão em comum o fornecimento de nutrientes (Bouarab et al. 1999).

Outras definições foram sendo usadas e aceitas, como a proposta por Petrini (1991) definindo fungos endofíticos como organismos que habitam o interior de vegetais sem causar danos evidentes ao seu hospedeiro. Conceitos similares aos conhecidos ao longo da história foram propostos, e alguns autores sugerem que o termo para estudo dos fungos endofíticos pode ser intitulado como “endofitismo” (Suryanarayanan, 2013) e de “micoendófitos” (Rai et al., 2014).

Diferenças entre “endofíticos”, “epifíticos (microrganismos que vivem na superfície de plantas), “oportunistas” e “fitopatógenos” geram dificuldades para que sejam determinados limites entre eles, uma vez que, por exemplo, um microrganismo endofítico pode agir como patógeno, tornando o uso desses termos meramente didático (Azevedo, 2000). Mendes e Azevedo (2007) ainda estendem o conceito e consideram como endófitos todos os microrganismos, cultiváveis ou não, e que não provocam prejuízos aparentes, os dividindo em dois grupos: Grupo 1: não produzem estruturas externas em seu hospedeiro; Grupo 2: produzem estruturas externas em seu hospedeiro.

Schulz e Boyle (2005) dividem, artificialmente, os fungos endofíticos em dois grupos ecológicos: 1) balansiaceous (colonizadores de gramíneas) e 2) não-balansiaceous. Os balansiaceous apresentam grande importância ecológica e por isso, são os mais estudados, além de exibirem estruturas especializadas para absorção de nutrientes

e secretarem diversos metabólitos (White *et al.*, 2000). São compostos por espécies de *Epichloe* e *Balansia* e podem crescer intracelularmente e de forma sistêmica em qualquer órgão das gramíneas onde são transmitidos, por meio de suas sementes, de forma vertical (Bacon e White, 2000).

O grupo dos não-balansiaceos compõe em sua maioria espécies do filo Ascomycota e são obtidos de quase todas as plantas terrestres já estudadas (Petrini, 1991; Stone et al., 2004) e seu crescimento varia entre as formas inter ou intracelular, sistêmica ou localizada (Schulz e Boyle, 2005). Os endófitos podem ser disseminados para o seu hospedeiro de forma horizontal, através de aberturas naturais (estômatos ou crescimentos de raízes) e artificiais (danos ocorridos nas técnicas agrícolas) e de forma vertical, por meio das sementes de seu hospedeiro, sendo que se a transmissão ocorrida for por essa última forma, o fungo endófitico é capaz de permanecer em uma planta por toda sua vida (Aly et al., 2010).

A biologia dos microrganismos endofíticos é uma área em ascensão, com utilização em diversas áreas e que recentemente conquistou o campo agrícola, com importância no controle biológico e no desenvolvimento de compostos naturais (Strobel, 2018). Os avanços a respeito do microbioma humano gerou um enorme interesse no fato da interação do microbioma da planta e de como esses organismos poderiam interferir no crescimento, desenvolvimento e a capacidade de resistência que as plantas adquirem a situações específicas em seus habitats, como por exemplo: doenças, seca, frio etc (Reid e Greene, 2013).

Além do auxílio no crescimento do hospedeiro através da disponibilidade de nutrientes, os fungos endofíticos também produzem vários metabólitos secundários como alcaloides, terpenóides, esteroides, compostos aromáticos, fenóis, quinonas, furandionas, xantonas, etc. (Bae et al., 2008). Um dos metabólitos que pode ser citado como exemplo é o taxol, usado como medicamento oncológico, foi extraído a partir do endófito *Taxomyces andreanae* isolado da planta *Taxus brevifolia* que também tem a capacidade de produzir a substância (Stierle; Strobel; Stierle, 1993). Plantas endêmicas pouco ou ainda não estudadas simbolizam um forte potencial para novos achados de endófitos com potencial de produzirem compostos para atuar nas mais diversas atividades biológicas (González-Mendélez et al., 2018).

2.2 DIVERSIDADE, DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS E RELAÇÃO COM O HOSPEDEIRO

Estima-se que existam entre 2,2 e 3,8 milhões de espécies de fungos no mundo, entretanto, aproximadamente 120 mil foram descritas até então, menos de 10% da estimativa total (Hawksworth e Lücking, 2017). No que diz respeito à diversidade endofítica, esses microrganismos correspondem a uma considerável riqueza negligenciada ainda pouco estudada ou desconhecida (Baucom et al., 2012), reforçando a necessidade de estudos que forneçam informações a respeito dessa micodiversidade e sua distribuição global (Suryanarayanan, 2013; Vaz et al., 2014). Assim sendo, os biomas brasileiros são *hotspots* da diversidade biológica que se sobressaem por suas características específicas (Noriler et al., 2018).

Somente cerca de 1% dos vegetais do mundo foram caracterizados quanto a diversidade endofítica e de forma incompleta, visto que na maioria dos estudos apenas endófitos de folhas são isolados, fato que torna os critérios de abundância e diversidade questionados (Arnold, Maynard e Gilbert, 2001). Além disso, a caracterização do microbioma endofítico por meio de isolamento não é confiável no que diz respeito a diversidade total, porém a metagenômica pode atuar como ferramenta complementar dessa questão e com isso traçar meios para o isolamento de táxons específicos aumentando assim a riqueza da comunidade endofítica (Sapkota et al., 2017; Collinge et al., 2019).

Vários isolados podem ser obtidos através de um mesmo hospedeiro e a relação pode se mostrar específica com espécies que se mostram endêmicas (Siqueira et al., 2011). No que diz respeito a diversidade de endófitos, Frohlich e Hyde (1999) levantaram a hipótese de que cerca de seis espécies de fungos podem habitar uma mesma planta. Estudos posteriores que revelam que endófitos são parte essencial da diversidade microbiana de vegetais demonstram um número aumentando de cerca de 33 espécies por planta (Strobel e Daisy, 2003).

Na tabela 1 podemos verificar alguns estudos mais recentes isolando endófitos das mais diversas plantas.

Tabela 1 – Lista de trabalhos de fungos endofíticos e seu respectivo hospedeiro.

Fungo endofítico	Planta hospedeira	Referências
<i>Achaetomium lippiae</i>	<i>Lippia gracilis</i>	Crous et al., 2017
<i>Acremonium curvulum</i>	<i>Bauhinia forficata</i>	Bezerra et al., 2014
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Artemisia thuscula</i>	Cosoveanu; Sabina; Cabrera, 2018
<i>Alternaria spp.</i>	<i>Opuntia humifusa</i> <i>Verbascum lychnitis</i> <i>Pinus wallichiana</i>	Silva-Hughes et al., 2015 Wezowecz; Rozpadek; Turnou, 2015 Quadri et al., 2014
<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Juniperus procera</i>	Gherbawy; Elhariry, 2014
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Kandelia obobata</i>	Wu et al., 2018a
<i>Aspergillus fumigates</i>	<i>Juniperus procera</i>	Gherbawy; Elhariry, 2014
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Musa spp</i>	Zakaria; Aziz, 2018
<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Bauhinia forficata</i>	Bezerra et al., 2014
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Opuntia humifusa</i>	Silva-Hughes et al., 2015
<i>Bezerromyces brasiliensis</i>	<i>Tacinga inamoena</i>	Bezerra et al., 2017
<i>Bipolaris sp.</i>	<i>Musa spp</i>	Zakaria; Aziz, 2018
<i>Chrysonilia sitophila</i>	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Freire et al., 2015
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		Santos et al., 2015

	<i>Indigofera suffruticosa</i> Miller	Oliveira et al., 2014
	<i>Coffea arabica</i>	
<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Myracrodruon urundeuva</i> <i>Musa</i> spp.	Pádua et al., 2018 Zakari e Aziz, 2018
<i>Diaporthe caatingaensis</i>	<i>Tacinga inamoena</i>	Crous et al., 2016
<i>Diaporthe inconspicua</i>	<i>Poincianella pyramidalis</i>	Bezerra et al., 2018
<i>Diaporthe infecunda</i>	<i>Astragalus membranaceus</i>	Kim et al., 2017
<i>Diaporthe miriciae</i>	<i>Copaifera pubiflora</i>	Carvalho et al., 2018
<i>Diaporthe oncostoma</i>	<i>Astragalus membranaceus</i>	Kim et al., 2017
<i>Diaporthe pseudoinconspicua</i>	<i>Poincianella pyramidalis</i>	Crous et al., 2018
<i>Diaporthe</i> spp.	<i>Myracrodruon urundeuva</i> ; <i>Vochysia divergens</i> ; <i>Stryphnodendron</i> <i>adstringens</i> <i>Rhizophora stylosa</i> <i>R. mucronata</i> <i>Opuntia humifusa</i> <i>Verbascum lychnitis</i>	Pádua et al., 2018 Noriler et al., 2018 Zhou et al., 2018 Silva-Hughes et al., 2015 Wezowecz; Rozpadek; Turnou, 2015
<i>Drechmeria panacis</i>	<i>Panax notoginseng</i>	Yu et al., 2018a
<i>Fusarium solani</i>	<i>Cassia alata</i>	Khan et al., 2018
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Musa</i> spp <i>Camellia oleifera</i>	Zakaria; Aziz, 2018

		Yu et al., 2018b
<i>Gibberella fujikuroi</i>	<i>Bauhinia forficata</i>	Bezerra et al., 2014
<i>Guignardia bidwellii</i>	<i>Calotropis procera</i>	Nascimento et al., 2015
<i>Myrothecium verrucaria</i>	<i>Bauhinia forficata</i>	Bezerra et al., 2014
<i>Mucor</i> sp.	<i>Arabidopsis arenosa</i>	Domka et al., 2018
<i>Neofusicoccum</i> sp.	<i>Artemisia thuscula</i>	Cosoveanu; Sabina; Cabrera, 2018
	<i>Vochysia divergens</i>	Noriler et al., 2018
	<i>Stryphnodendron adstringens</i>	
<i>Nigrospora</i> sp.	<i>Musa</i> spp	Zakaria; Aziz, 2018
<i>Paraconiothyrium lycopodium</i>	<i>Lycopodium annotinum</i>	Pawlowska et al., 2014
<i>Penicillium cataractum</i>	<i>Ginkgo biloba</i> L.	Wu et al., 2018b
<i>Penicillium janthinellum</i>	<i>Panax notoginseng</i>	Xie et al., 2018
<i>Penicillium</i> <i>oxalicum</i>	<i>Juniperus procera</i>	Gherbawy; Elhariry, 2014
<i>Penicillium sclerotiorum</i>	<i>Cassia fistula</i> L.	Kuriakose et al., 2018
<i>Penicillium</i> spp.	<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Pádua et al., 2018
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Musa</i> spp	Zakaria; Aziz, 2018
	<i>Camellia oleifera</i>	Yu et al., 2018b
	<i>Rhizophora stylosa</i>	Zhou et al., 2018

	<i>R. mucronata</i>	Quadri et al., 2014
	<i>Pinus wallichiana</i>	
<i>Peyronellaea</i> sp.	<i>Juniperus procera</i>	Gherbawy; Elhariry, 2014
<i>Pichia</i> spp	<i>Verbascum lychnitis</i>	Wezowecz; Rozpadek; Turnou, 2015
<i>Phaeoramularia calotropidis</i>	<i>Calotropis procera</i>	Nascimento et al., 2015
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	<i>Coffea arabica</i>	Oliveira et al., 2014
<i>Phyllosticta catimbauensis</i>	<i>Mandevilla catimbauensis</i>	Crous et al., 2017
<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Myracrodruon urundeuva</i> ;	Pádua et al., 2018
	<i>Vochysia divergens</i>	Noriler et al., 2018
	<i>Stryphnodendron adstringens</i>	
<i>Phoma brasiliensis</i>	<i>Lycopodium clavatum</i>	Pawlowska et al., 2014
<i>Phoma sorghina</i>	<i>Musa</i> spp	Zakaria; Aziz, 2018
<i>Phoma</i> sp	<i>Schinus terebinthifolius</i>	Silva et al., 2017
<i>Preussia</i> spp.	<i>Artemisia thuscula</i>	Cosoveanu;
	<i>Pinus wallichiana</i>	Sabina; Cabrera, 2018
	<i>Juniperus procera</i>	Quadri et al., 2014
		Gherbawy; Elhariry, 2014
<i>Pseudocochliobolus pallescens</i>	<i>Indigofera suffruticosa</i> Miller	Santos et al., 2015

<i>Pseudophialophora sorghi</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	Crous et al., 2017
<i>Quambalaria fabacearum</i>	<i>Mimosa tenuiflora</i>	Bezerra et al., 2018
<i>Talaromyces</i> sp.	<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Pádua et al., 2018
<i>Toxicocladosporium</i> sp.	<i>Melocactus zehntneri</i>	Bezerra et al., 2017
<i>Toxicocladosporium</i> sp.	<i>Pilosocereus</i> <i>gounellei</i> subsp. <i>gounellei</i>	Bezerra et al., 2017
<i>Trichoderma piluliferum</i>	<i>Bauhinia forficata</i>	Bezerra et al., 2014
<i>Umbelopsis isabellina</i>	<i>Tillandsia catimbauensis</i>	Bezerra et al., 2018
<i>Verruconis panacis</i>	<i>Panax notoginseng</i>	Zhang et al., 2018
<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Kadsura angustifolia</i>	Huang et al., 2015

Fonte: O autor, 2019

Entender a relação entre a planta e o seu hospedeiro ainda é bastante complexo, porém fatores como as características do vegetal, do microrganismo e do ambiente estão relacionadas com essa interação (Owen e Hundley, 2004; Compant et al., 2016). Duas hipóteses principais são abordadas: a da simbiose mutualística e a do equilíbrio antagônico (Schulz e Boyle, 2005; Kogel et al. 2006; Maheshwari, 2006).

Por ser uma interação assintomática, estranha-se o fato relatado em alguns estudos in vitro que revelaram que tanto o fungo quanto a planta liberam substâncias tóxicas para ambos (Peters et al., 1998). Porém, Schulz e Boyle (2005) sugerem que a relação ocorre de forma assintomática como consequência de um balanceamento nessa interação antagônica entre vegetal/endófito. Outra hipótese é a que existe uma leve harmonia entre a virulência do fungo e os mecanismos de defesa da planta, porém caso este equilíbrio seja perturbado, haverá o surgimento da doença (Schulz et al., 2002).

O estilo de vida biotrófico dos endófitos durante a colonização do hospedeiro indica uma importante relação nas interações entre ambos, entretanto a disponibilidade de nutrientes pode ser um dos fatores para resposta da interação ser mutualística ou

antagônica (Eaton et al., 2011; Lahrmann et al., 2013). Outro aspecto a ser considerado é a associação multitrófica entre vários grupos de endófitos e plantas, que por sua vez é considerada aspecto único do endofitismo, onde as interações com os outros organismos endofíticos como vírus e bactérias sob fatores bióticos e abióticos interfere na simbiose entre eles (Kusari et al., 2012)

Tais hipóteses revelam a necessidade de pesquisas que se concentrem na associação multitrófica e nos mecanismos de ação dos endófitos em seus hospedeiros, no qual já existe um esforço para esclarecer tais associações, porém, os dados disponíveis são bastantes limitados (Mathys et al. 2012; Straub et al. 2013). Tal limitação ocorre devido a complexidade dessa interação, porém há também a dificuldade de se recriar as condições de endófitos in vitro ou estudá-las “in planta” (Gundel et al., 2012; Qawasmeh et al., 2012).

Sabe-se que endófitos produzem substâncias químicas como espécies reativas de oxigênio (ROS), fitoalexinas, fitohormônios e substâncias orgânicas voláteis (COV) (Schirmbock et al. 1994; Khan et al. 2012). Waqas et al. (2014) relataram um maior crescimento nas raízes em linhagens vegetais inoculadas com endófitos e tal fato está associado a secreções de algumas dessas substâncias dentro da planta, como por exemplo, os fitohormônios. As espécies reativas de oxigênio por sua vez, agem acarretando a produção de antioxidantes com função de proteção ao hospedeiro do estresse oxidativo (Tanaka et al. 2006; White e Torres 2010). Além disso, alguns endófitos podem alterar o metabolismo do hospedeiro e modificar a absorção de nutrientes (Sherameti et al., 2005; Singh et al., 2013).

Outra resposta de endófitos as plantas hospedeiras é a indução a expressão gênica na defesa das plantas (Mathys et al. 2012), pois sabe-se que a interação ocorrida pode provocar alterações locais ou sistêmicas no hospedeiro (Glazebrook 2005; Ownley et al. 2010). As plantas hospedeiras são capazes de detectar a presença dos endófitos e com isso desencadear um mecanismo de transdução de sinais que levam a resposta de defesa das plantas, fato semelhante à interação com organismos patogênicos da planta, o que altera os estados metabólicos da mesma (Qawasmeh et al., 2012).

Alguns endófitos conseguem induzir respostas imunes às plantas pelo que chamamos de Padrões Moleculares Associados a Microrganismos (PMAPs) que possuem reconhecimento semelhante as respostas produzidas pelos patógenos (Latz et al., 2018). Há também a supressão de imunidade das plantas através de efetores, mecanismo

usado pelos endófitos para evitar a detecção (Rovenich et al., 2014 – cillinge 19) podendo até levar a uma susceptibilidade induzida (Busby, Ridout e Newcombe, 2016).

Entender completamente a ecologia associada ao endofitismo requer um estudo integrado de ferramentas atualizadas, tais como metagenômica, metabolômica ou transcriptômica (Sapkota et al., 2017).

Tecidos fósseis mostraram em estudos que a relação entre o hospedeiro e seu microrganismo evoluiu a cerca de 400 milhões de anos e com isso suportam a teoria que os fungos se transportaram para a terra através das plantas (Krings et al., 2007). E estudos científicos sobre essas associações que remetem a mais de 400 milhões de anos afirmam que a presença desses endófitos de forma simbiótica no interior de seus hospedeiros deve ser considerada como uma regra e não como uma exceção (Albrechtsen et al. 2010; Partida-Martinez e Heil 2011).

Fungos endofíticos podem ser isolados de quase todos os órgãos das plantas (raíz, caule, folha, flor, fruto e semente) também é sugerido que todas as plantas, incluindo as oceânicas e algumas plantas inferiores como as hepáticas, podem ser hospedeiras dos endófitos. A maioria dos gêneros de fungos frequentemente isolados como patogênicos também podem ser isolados como endófitos. Geralmente os gêneros mais comuns isolados compreendem *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Pelatotiopsis* sp., *Phoma* sp *Xylaria* sp., entre outros e pertecem na maioria das vezes ao filo Acomycota Caval. -Sm., porém fungos zigomicetos ou do filo Basidiomycota R.T. Moore podem ser relatados (Newsham, 2011; Hardoim et al., 2015; Strobel, 2018).

2.3 MATA ATLÂNTICA

A mata atlântica está entre as 34 áreas mundiais de “Hotspot de biodiversidade”, ou seja, zonas que por seus estágios avançados de degradação são consideradas prioridade para a conservação da biodiversidade (Mittermeier et al., 2004). No Brasil, a Mata atlântica é um dos dois hotspots da biodiversidade do país (Brandom et al., 2005). Sendo umas das florestas tropicais mais ricas de diversidade de espécies, o bioma abrange cerca de 15% do território total brasileiro, incluindo 17 estados. Atualmente, restam apenas 12,4% de área original da Mata Atlântica, sendo 80% dessa parcela localizado em áreas privadas. Foi o primeiro bioma brasileiro a ser garantido por lei de proteção (Lei da Mata Atlântica 11.428/2006) (SOS Mata Atlântica, 2019). Menos de 2% de sua área é protegida por Unidades de Conservação, além disso, é um bioma que desde a colonização, vem

sofrendo com exploração excessiva dos seus recursos naturais ocasionando perda de sua diversidade (Veríssimo et al., 2004; Tabarelli et al., 2005).

É a segunda maior floresta úmida da América do Sul e que se desenvolveu na região semiárida do Nordeste devido aos efeitos da altitude e correntes atmosféricas oceânicas úmidas (Câmara, 2005). Esses fatores também proporcionam uma permanente umidade com temperatura média anual entre 15°C e 25°C e um bom regime pluviométrico (2.000 a 4.000 mm de chuva por ano), necessário para o suporte de alguns importantes mananciais hídricos do Brasil (Thomas e Barbosa, 2008).

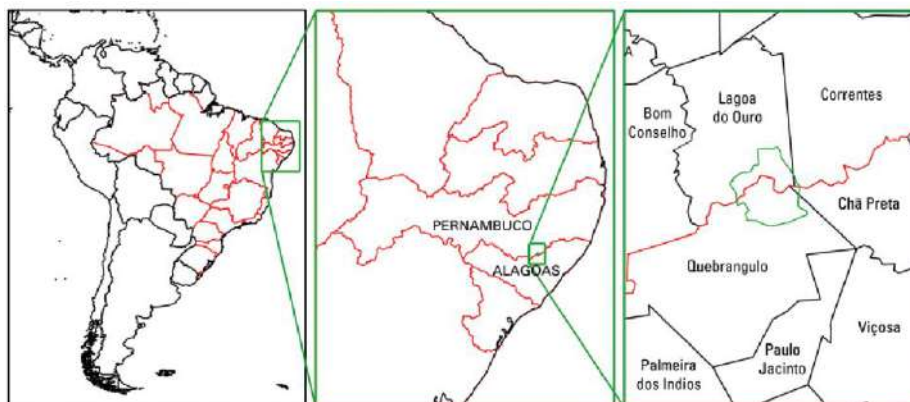
O bioma é formado por diversas formações florestais como florestas ombrófila densa, ombrófila mista, estacional semidecidual, estacional decidual e ombrófila aberta se estendendo por cerca de 1.300.000 km² do território brasileiro (Ministério do Meio Ambiente, 2015). É caracterizada por um grande índice de biodiversidade apresentando alto endemismo de plantas vasculares, em torno de 20.000 espécies e seu grau de endemismo pode chegar até a cerca de 50% em algumas regiões do bioma, tornando a Mata Atlântica uma das áreas do mundo com maiores níveis de endemismo (Stehmann et al., 2009).

2.3.1 Reserva Biológica de Pedra Talhada

Sabe-se que um dos maiores problemas atuais é a não conservação da diversidade biológica levando assim a uma considerável perda da mesma (IUCN, 2016). Com isso, para atenuar este problema é necessário a preservação “*in situ*” dessa diversidade em áreas que recebam proteção (Haddad et al., 2005). Em 18 de julho de 200, pela Lei No 9.985 foram criadas no Brasil as Unidades de Conservação (UCs) com função de conservar e proteger a diversidade biológica, em especial as espécies que se encontrem ameaçadas ou vulneráveis, bem como as endêmicas (Braz e Cavalcanti, 2001).

Uma dessas UCs é a Reserva Biológica de Pedra Talhada (REBIO de Pedra Talhada), criada pelo decreto nº 98.524 de 13 de dezembro de 1989 com intuito de proteger a Mata Atlântica, a REBIO possui área de 4.382,37 hectares e está localizada nos estados de Alagoas (nos municípios de Chã Preta e Quebrangulo) e Pernambuco (Nos municípios de Correntes e Lagoa do Ouro). A reserva encontra-se em área de transição entre a Floresta Estacional e a Caatinga, apresentando florestas úmidas rodeadas por florestas secas (ICMBio, 2019).

Figura 1 – Localização da Reserva de Pedra Talhada no Brasil e delimitação das divisas dos três municípios sobre as quais ela se estende



Fonte: Studer, Nusbaumer e Spichiger, 2015

Figura 2 – Reserva Biológica de Pedra Talhada – Quebrângulo/Alagoas



Fonte: Ferro, L. O.

2.3.2 Melastomataceae Juss.

Pertencente a Ordem Myrtales, se apresenta como grupo monofilético de características morfológicas diversas, tais como condutores com perfurações ornamentadas, estames com conectivos espessados e/ou prolongados entre outros (Cogniaux 1883-1888; Wurdack et al. 1993; Clausen e Renner 2001).

Em termos de diversidade, Melastomataceae é a sétima maior família e uma das mais numerosas da vegetação do Brasil, abrigando aproximadamente 155 gêneros e 4.500 espécies (Renner, 2004; Baumgratz et al., 2010). Seus gêneros mais representativos são *Leandra* Raddi, *Miconia* Ruiz e Pav. e *Tibouchina* Baill (Goldenberg et al. 2009).

É uma família com pouca exploração a respeito do potencial biotecnológico com poucos compostos isolados (Cunha et al., 2003), porém indicam um grupo importante para a parte ambiental, no reflorestamento e recuperação de áreas na Mata Atlântica, pois são espécies pioneiras e que apresentam rápido crescimento (Silva e Tabarelli, 2000).

2.3.3 *Miconia mirabilis*

Miconia mirabilis é uma espécie de Melastomataceae em forma de arbusto ou árvores de tamanho pequeno e de origem nativa. Não é uma planta endêmica do Brasil e está presente nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste nos domínios fitogeográficos pertencentes a Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica (Flora do Brasil, 2019)

Miconia mirabilis Classificação (Ruiz e Pav.)

Divisão: Magnoliophyta (Angiospermae)

Classe: Magnoliopsida (Dicotyledonae)

Ordem: Myrtales

Família: Melastomataceae

Espécie: *Miconia mirabilis* L.O. Williams

Figura 3 – Folhas de *Miconia mirabilis* presentes na Reserva Biológica de Pedra Talhada.



Fonte: Ferro, L. O

Miconia mirabilis pode ser conhecida com nome popular de “Quaresma-do brejo” e é uma planta que possui raízes respiratórias e cresce nas margens de riachos podendo direcionar o crescimento de novas raízes e evitar a anóxia nos períodos de cheia. A espécie vegetal também pode ser encontrada nas margens de afloramentos rochosos e possui estratégia cromática através de suas inflorescências com botões abertos que evidenciam os estames vermelhos que se tornam amarelos quando maduros, ficando bem visíveis (Studer, Nusbaumer e Spichiger, 2015).

2.4 FUNGOS ENDOFÍTICOS PRODUTORES DE ENZIMAS

Enzimas são proteínas capazes de catalisar as mais diversas reações nos sistemas biológicos, sendo assim denominadas de biocatalisadores que participam da degradação e construção de moléculas, fazendo com que a energia química se mantenha ou se modifique a partir de precedentes essenciais (Nelson et al., 2005). A estrutura molecular de cada enzima pode estar relacionada com outras moléculas, por ex.: lipídeos, e fatores como sua estrutura tridimensional, pH, temperatura etc., são dependentes de sua atividade de catalisar as reações, bem como sua estabilidade e especificidade (Lima et al., 2007).

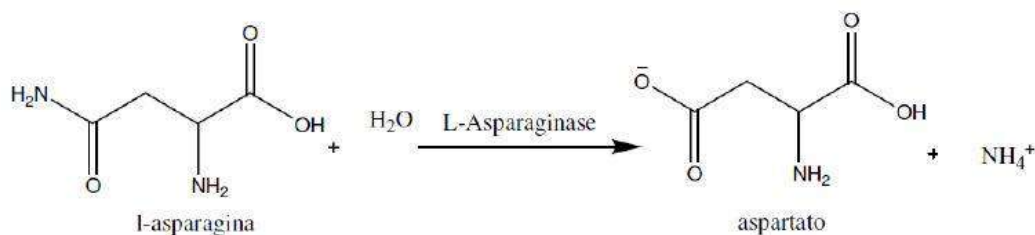
O mercado de enzimas a nível mundial está separado em dois grupos: 1) as enzimas industriais, que respondem a 60% de todo mercado industrial; 2) as enzimas especiais, como as terapêuticas (podendo em sua maioria também fazer parte das industriais), enzimas para diagnósticos e para as pesquisas (Zimmer et al., 2009). As enzimas microbianas ganham preferência por apresentarem tempo de produção menor, especificidade e estabilidade, vantagens na purificação, assim como a facilidade na manipulação genética (Nagarajan, 2012). No meio industrial, todas essas vantagens implicam em um menor custo nas produções (Reinehr et al., 2014). Sendo assim, é necessário a identificação de novas fontes microbianas, em especial que não sejam tóxicas ao ser humano (Alves et al., 2002).

Fungos, em especial os filamentosos, se destacam na produção enzimática devido fácil cultivo, uma vez que conseguem secretar suas próprias enzimas no meio e com isso não há obrigação de liberação por rompimento celular, além de serem fontes importantes de novas biomoléculas comerciais (da Silva et al., 2015). Dentre os fungos filamentosos, pode-se citar os fungos endofíticos que veem sendo estudados devido as aplicações biotecnológicas como a produção enzimática (Pavithra et al., 2012). As plantas que abrigam os endófitos são, na maioria das vezes, fontes importantes de metabólitos secundários bioativos e o microrganismo tende a herdar essa capacidade, representando uma ferramenta valiosa na produção de enzimas importantes na indústria, em especial as indústrias farmacêutica e alimentícia que fazem uso da L-asparaginase (Krishnamurthy et al., 2008).

2.5 A ENZIMA L-ASPARAGINASE

A L-asparaginase (CE 3.5.1.1, L-asparagina amidohidrolase, L-ASNase), abreviada por L-ASNase, é uma enzima capaz de catalisar a reação da hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia (Shrivastava et al., 2015). Esta reação pode ser observada na Figura 1, onde em detalhes a L-asparaginase catalisa a hidrólise do nitrogênio no grupo amina da cadeia lateral do aminoácido e com isso o converte no ácido (Loureiro, 2010).

Figura 4. Reação catalisada pela enzima L-Asparaginase

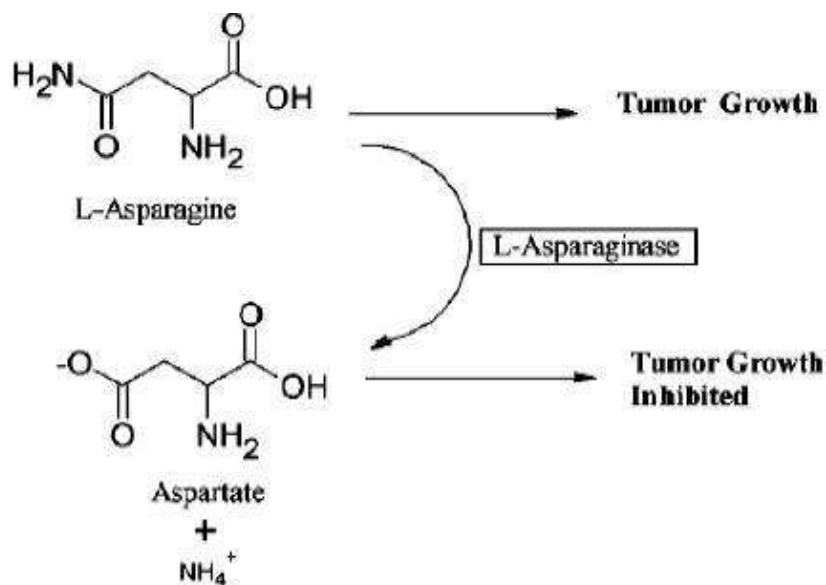


Fonte: Narta; Kanwarazmi, 2007

A reação de hidrólise da L-asparaginase consome rapidamente os níveis celulares do aminoácido (asparagina) que está presente no corpo humano. Algumas células tumorais não têm a capacidade de assegurar o próprio abastecimento de asparagina, diante disso as células necessitam receber extracelularmente esse aminoácido, fazendo com que a resposta ao tratamento com L-asparaginase seja eficaz (Mohan-Kumari, Manonmani, 2012). Essas células tumorais são geralmente linfócitos que necessitam de grande quantidade de asparagina para o rápido crescimento, assim além de usar a asparagina (limitada) sintetizada pela própria célula irão precisar também de asparagina presente no soro sanguíneo, também obtida da dieta e conseqüentemente poder atender sua alta demanda (Narta; Kanwwar; Azmi, 2007).

A falta da apasgarina (extracelular) através da atuação da L-asparaginase interfere na síntese de proteínas em linfoblastos, fazendo com que ocorra a inibição na produção das células cancerígenas por apoptose, inibindo assim o crescimento tumoral, conforme representado na figura 2 (Fernandez et al., 2013; Guilleme et al., 2013).

Figura 5. Esquema ilustrando o processo de reação da enzima L-asparaginase nas células.



Fonte: https://www.researchgate.net/figure/271316401_fig1_Fig-1-Schematic-illustration-of-the-reaction-mechanism-of-L-asparaginase.

A L-asparaginase é usada como medicamento antineoplásico, sendo mais utilizada dentre as drogas recomendadas no tratamento da Leucemia Linfóide Aguda (LLA), sendo um bioproduto de extrema importância, visto que dispõe de um grande espectro de atividade antitumoral (Loureiro, 2010; Saison et al., 2014). Além da LLA, a enzima é utilizada no tratamento de outras neoplasias (Leucemia mielomonocítica aguda, leucemia linfocítica crônica), alguns sarcomas (linfossarcoma, retiossarcoma, melanossarcoma) e ainda na doença de Hodgkin (Duval et al., 2002; Kavitha; Vijayalakshi, 2012).

Leucemias estão agrupadas nas doenças neoplásicas derivadas de expansão clonal de blastos (células imaturas) e as célula-tronco hematopoiéticas são capazes de se diferenciar em duas linhagens: linfóide e mieloide (Schoch et al., 2001). Porém, nas leucemias essas células ficam incapacitadas de se diferenciar, impedindo que células normais, isto é, maduras sejam formadas e com isso geram acúmulo de células imaturas na medula óssea e no sangue periférico (Greaves; Wiemels, 2003).

As leucemias são o tipo de câncer infantil mais comum na maioria das populações, sendo também, no Brasil, a principal causa de morte em crianças de 1 a 19 anos. No Brasil, estimam-se aproximadamente 10 mil casos novos de leucemia para cada ano do biênio 2018-2019 (Inca, 2019).

É estimado a longo prazo, uma melhora pós tratamento com L-asparaginase em cerca de 80% de crianças e entre 38 a 50% em adultos, tendo uma taxa de sobrevida global de 90% (De Bont et al., 2004; Pui e Howard, 2008). Além do uso médico, a L-asparaginase se mostra como forte potencial na indústria alimentícia (Kornbrust et al., 2009) pois consegue evitar a formação de acrilamida em alimentos processados sob altas temperaturas, geralmente em alimentos à base de amido (Pedreschi et al. 2008; Mohan Kumar et al., 2013) e segundo a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1994) a acrilamida é considerada como neurotoxina potencialmente cancerígena.

As células humanas precisam para sua síntese proteica um fornecimento constante do aminoácido Asparagina e a maioria dessas células humanas obtém seus próprios suprimentos de L-asparagina, não precisando consegui-lo a partir da dieta, conseguindo o aminoácido através do uso da enzima asparagina sintetase (Muller; Boss, 1998). Contudo, as células não saudáveis, como é o caso de células de alguns tipos de tumores, não dispõem de um nível suficiente de asparagina sintetase e assim não conseguem regular o gene desta enzima fazendo a síntese deste aminoácido ocorra de forma lenta (Wink, 2009).

Ainda sobre essas células neoplásicas, as mesmas necessitam de grandes quantidades de L-asparagina para um crescimento mais acelerado e com isso, para atender a esta demanda, a asparagina é obtida no meio extracelular. Porém, ao permitir que a L-asparaginase chegue a corrente sanguínea, haverá depleção de L-asparagina e assim as células neoplásicas serão impossibilitadas de conseguir o aminoácido e consequentemente as células tumorais se destruirão devido a incapacidade de realização completa da síntese de proteínas (Talluri et al., 2014).

A L-asparaginase é largamente distribuída na natureza e pode ser obtida em animais, microrganismos e plantas, mas não é encontrada em seres humanos. Nos animais, em especial, os mamíferos e peixes, é obtida através dos tecidos (fígado, pâncreas, cérebro, ovário, testículo, rins, baço e pulmões) Porém, a L-asparaginase encontrada em várias espécies de plantas e animais possuem problemas no processo de extração, tornando dificultosa sua obtenção por essas fontes. Assim, os microrganismos se apresentam como fontes mais fáceis, eficazes e de menor custo para obtenção dessa enzima. As vantagens do uso dos microrganismos também estão associadas ao rápido crescimento e facilidade na otimização enzimática e modificação genética para aumento do rendimento além de apresentarem melhor estabilidade (Thakur et al., 2013).

As vantagens do uso de microrganismos nos bioprocessos atrelada a um baixo conhecimento sobre a diversidade microbiana fazem deles uma forte alternativa para inovação na procura de novas fontes de ASNase com propriedades melhoradas (Lopes et al., 2015). Outra vantagem do uso de enzimas obtidas através de fontes microbianas é a estabilidade da mesma (Balakrishnan, Nair, e Kumar, 2013). Além do mais, apresentam maior facilidade para modificação genética e consequentemente aumento de rendimento (Lopes et al., 2015).

Atualmente, as formas disponíveis comercialmente de L-asparaginase são: 1) L-asparaginase nativa; 2) PEG-asparaginase, ambas obtidas da bactéria *Escherichia coli* e 3) Crisantaspase, a L-asparaginase proveniente da bactéria *Erwinia chrysanthemi*. Todos os três tipos apresentam mecanismo igual, porém são diferentes em relação as propriedades farmacocinéticas (Cortijo-Cacajares; Jiménez-Cerezo; Tejada, 2012; Kawedia; Rytting, 2014).

A grande maioria da enzima ASNase microbiana é de origem intracelular, porém na perspectiva industrial a enzima secretada extracelularmente é considerada mais benéfica, pois é mais fácil de ser produzida em larga escala em condições normais de cultura, além do que a purificação também se torna mais acessível e econômica (Hosamani e Kaliwal, 2011).

Uma das vantagens no tratamento com L-asparaginase está no fato das células normais não serem afetadas, já que são capazes de sintetizar a enzima, porém com um tratamento a longo prazo com L-asparaginase de origem bacteriana, é gerado uma série de reações adversas (Sarquis et al., 2004).

A terapia com L-asparaginase em seres humanos exibiu dois modelos de toxicidade que devem ser observados com atenção devido a sua importância. Um deles é referente a episódios de reações de hipersensibilidade, à custa do fato do organismo está recebendo uma proteína estranha, o segundo está relacionado aos sinais de toxicidade estimulados pelo bloqueio da síntese de proteínas que se deve à baixa dos níveis de L-asparaginase na circulação e também à liberação de produtos após a hidrólise da enzima (Rizzari et al., 2013).

Os efeitos colaterais mais frequentes são as reações de hipersensibilidade, que varia entre 6 a 43% de incidência podendo estar associados a casos de anafilaxia grave em cerca de 10% dos casos (Cortijo-Cacajares; Jiménez-Cerezo; Tejada, 2012). Na administração da enzima obtida por cepas de *E. coli* em sua etapa inicial as reações de

hipersensibilidade chegam a apenas 4%, entretanto, pode subir para 80% em pacientes que utilizaram a enzima mais de uma vez (Kurtzberg et al., 2011).

Junto das reações de hipersensibilidade veem a produção de anticorpos anti-L-Asparaginase, sendo essa a causa fundamental da resistência ao medicamento (Rizzari et al., 2013). Com a diminuição da atividade da enzima a diminuição de L-asparagina no plasma não acontecerá (Avramis et al., 2002) e essa atividade pode até não ser detectada (Kawedia; Rytting, 2014).

Alguns dos sintomas são: urticária, edema, febre, erupção na pele, purido e raramente choque anafilático (Brunton; Lazo; Parker, 2010). O problema é que, com exceção da urticária que pode ser tratada com anti-histamínicos, os outros sintomas precisam da suspensão do tratamento para desaparecerem (Graham, 2003). Todavia, a utilização de anti-histamínicos como medidas preventivas não é recomendada, já que pode camuflar os sintomas da enzima inativada (Narazaki et al., 2012).

Demais efeitos colaterais demonstrados são: alterações na coagulação sanguínea, incluindo níveis séricos reduzidos de antitrombina III e fibrinogênio, vômitos, diarreia, alterações hepáticas, pancreatite, hiperglicemia e supressão da medula óssea (Narazaki et al., 2012; Quintanilla-Flores et al., 2014).

Dos dois tipos de L-asparaginase obtidos por *E. coli*, a nativa pode apresentar reações de hipersensibilidade mais graves e então, a forma conjugada com polietileno glicol (PEG-asparaginase) é a forma mais segura, pois aponta um menor grau de imunogenicidade (Pieters et al., 2011) e também, apresenta maior tempo biológico de meia-vida (Avramis et al., 2002).

Casos de encefalopatia e hepatotoxicidade vistos ao decorrer do tratamento podem estar associados a amônia liberada no sangue a partir da hidrólise da L-asparagina catalisada pela L-asparaginase (Loureiro, 2010).

Na L-asparaginase originada por bactérias além da hidrólise de L-asparagina, a glutamina também pode ser hidrolisada, entretanto com menor afinidade (Van der sluis et al., 2013). Essa hidrólise resulta em produto final glutamato e aspartato, o que pode estrar relacionado com casos de neurotoxicidade que ocorrem em cerca de 25% dos casos. A neurotoxicidade é mais comum em pacientes adultos e seus sintomas incluem: depressão, fadiga, sonolência, confusão, irritabilidade, agitação e tontura (Loureiro, 2010). A ASNase é produzida através de fermentação, geralmente submersa (SF), e embora várias

bactérias estejam relatadas, *E. coli* e *E. chrysanthemi* continuam sendo as principais para produção em proporções industriais (Lopes et al., 2015)

A produção da enzima sofre influência de um conjunto de fatores como: tipo e concentração de fontes de carbono e nitrogênio, pH, temperatura, tempo de fermentação, aeração e principalmente qual o microrganismo utilizado (Basha et al., 2009; Gurunathan e Sahadevan, 2012; Zia et al., 2013). A L-asparaginase é ativada em pH alcalino e temperatura por volta de 37°C (Dange e Peshwe, 2013). A ASNase pode ser produzida geralmente por meio de três tipos: fermentação submersa (SmF), fermentação em estado sólido (SSF) e DNA recombinante (Vimal; Kumar, 2017).

Os efeitos colaterais causados no tratamento com L-asparaginase podem estar relacionados com o uso prolongado da enzima por fontes procarióticas (Amena et al., 2000). Estudos como o de Dange e Peshwe (2015) indicam microorganismos eucarióticos como produtores de L-asparaginase com menos efeitos colaterais. Sendo assim, em razão da importância da L-asparaginase no tratamento oncológico e também na indústria alimentícia, é fundamental a procura por novas fontes desta enzima com o intuito de reduzir os efeitos colaterais e obter aumento de sua produção e disponibilidade (Lopes et al., 2015). Os fungos aparecem então, como fonte para a produção de L-asparaginase representada por fontes eucarióticas (Sarquis et al., 2004) pois apresentam-se evolutivamente mais próximos dos seres humanos e por este fato especula-se que a enzima isolada a partir deles provoca menor imunogenicidade (Shrivastava, et al., 2012).

2.5.1 Breve histórico sobre a enzima L-asparaginase

A evidência da L-asparaginase como droga antitumoral se deu em 1922 através de pesquisas realizadas por Clementi que ao usar soro de mamíferos, percebeu que o de porquinhos-da-índia exibiu uma atividade enzimática (Narta; Kanwar; Azmi, 2007). Em 1953, Kidd descreveu a regressão de linfomas transplantados em camundongos que receberam o soro dessas cobaias. Contudo, apenas os soros de porquinhos-da-índia apresentaram efeito inibidor do crescimento celular e o soro de outros mamíferos não, além do mais, somente alguns tumores eram suscetíveis. Anos mais tarde, Broome compilou os resultados de Clementi e Kidd e observou que o fato dos linfomas transplantados em camundongos terem diminuídos era atribuído à necessidade de

asparagina exógena nas células neoplásicas e concluiu que a atividade antineoplásica presente era resultado da atividade da L-asparaginase (Broome, 1963)

Em 1966 foi possível purificar parcialmente duas isoformas da L-asparaginase obtida do soro de porquinhos-da-índia, porém apenas uma das isoformas apresentou a atividade antitumoral *in vivo* (Yellin; Wriston-Jr, 1966). Com toda dificuldade para extração da enzima a partir do soro das cobaias a pesquisa sobre as ações da L-asparaginase não progrediu, contudo, os pesquisadores buscaram outras fontes, especialmente as provenientes de microrganismos (Narta; Kanwar; Azmi, 2007; Loureiro, 2010).

Mashburn e Wriston em 1964 e Campbell e Mashburn (1969), publicaram trabalhos onde obtiveram a purificação da L-asparaginase através de cepas de *Escherichia coli* com a atividade enzimática antineoplásica equivalente àquela demonstrada no soro das cobaias anteriormente pesquisadas. Dessa forma, esses resultados promoveram um aumento na produção da enzima em proporções maiores e quantidade propícia para ensaios clínicos (Asselin *et al.*, 1993; Narta; Kanwar; Azmi, 2007).

2.5.2 L-asparaginase produzida por fungos endofíticos

Tendo em vista os efeitos colaterais produzidos pela terapêutica com L-asparaginase de origem procariótica, a busca por fontes eucarióticas vem sendo alvo de pesquisas com a ASNase, sendo assim, fungos filamentosos e leveduras veem sendo relatados como potencial produtor desta enzima com menores reações adversas (Shrivastava, Khan, Shrivastav, Jain, e Singhal, 2012).

Estudos propõem que endófitos durante os anos de coevolução e recombinação genética conquistaram a capacidade de biossintetizar com sua planta hospedeira os compostos produzidos pela planta (Huang *et al.*, 2015). A utilização de microrganismos, no caso os fungos endofíticos, é relatada por Peixoto Neto *et al.* (2002) como alternativa para minimizar o uso de plantas e assim diminuir o risco de ameaça de algumas espécies vegetais.

Os tratamentos oncológicos obtidos por produtos naturais advindos de microrganismos veem movimentando os avanços em pesquisas que busquem novas fontes medicamentosas (Costa-Lotufo *et al.*, 2010). Foi através dessa busca que um dos

compostos pioneiros no tratamento de neoplasias, o taxol, foi isolado do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* (Stierle; Strobel; Stierle, 1993).

Os fungos endofíticos veem sendo estudados para a produção de L-asparaginase, entretanto, ainda são poucos os relatos usando endófitos na produção de L-asparaginase.

A literatura mostra que vários estudos já foram realizados com fungos para a produção da enzima L-asparaginase sendo as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, e *Penicilium* frequentemente associadas a uma boa produção da enzima (Pádua et al., 2018; Silva et al., 2018).

3 METODOLOGIA

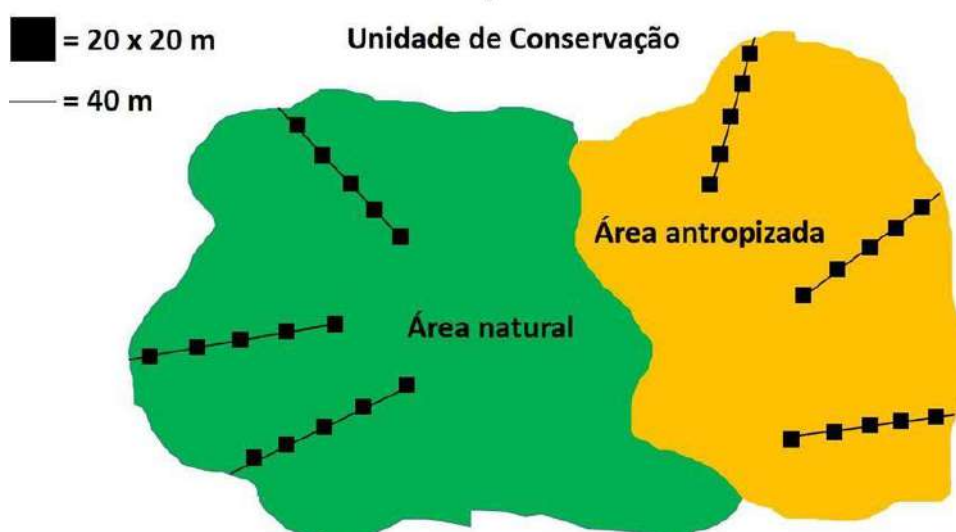
3.1 ÁREA DE COLETA

A coleta do material vegetal ocorreu na Reserva Biológica (REBIO) de Pedra Talhada (36°22' a 36°28' W, 9°11' a 9°16' S). A REBIO de Pedra Talhada foi criada em 13 de dezembro de 1989 por meio do Decreto nº 98.524 com o objetivo de proteger a Mata Atlântica e seus recursos naturais. A REBIO possui área de 4.382,37 hectares distribuídos nos municípios de Lagoa do Ouro e Correntes (Pernambuco) e Quebrangulo e Chã Preta (Alagoas) (ICMBio, 2019).

A REBIO de Pedra Talhada está situada na Província da Borborema e sua estação pluviométrica mais perto se encontra no município de Quebrangulo com acúmulo anual médio de 1.628 mm, onde os meses com maiores precipitações são maio, junho e julho com mais de 250 mm/mês e a estação mais seca se estendendo de outubro a fevereiro com menos de 50 mm/mês (Studer, Nusbaumer, Spichiger, 2015).

A área é dividida em seis zonas e a pesquisa foi conduzida em duas delas (figura 6): zona primitiva (área natural) e zona de recuperação (área antropizada). A reserva encontra-se em área de transição entre a Floresta Estacional e a Caatinga, apresentando florestas úmidas rodeadas por florestas secas. A coleta do material vegetal ocorreu no período chuvoso no mês de julho de 2018.

Figura 6 - Representação da metodologia de amostragem, com delimitação dos transectos e parcelas onde os fungos sl. serão coletados



Fonte: Projeto CNPQ/ICMBio 421241/2017-9.

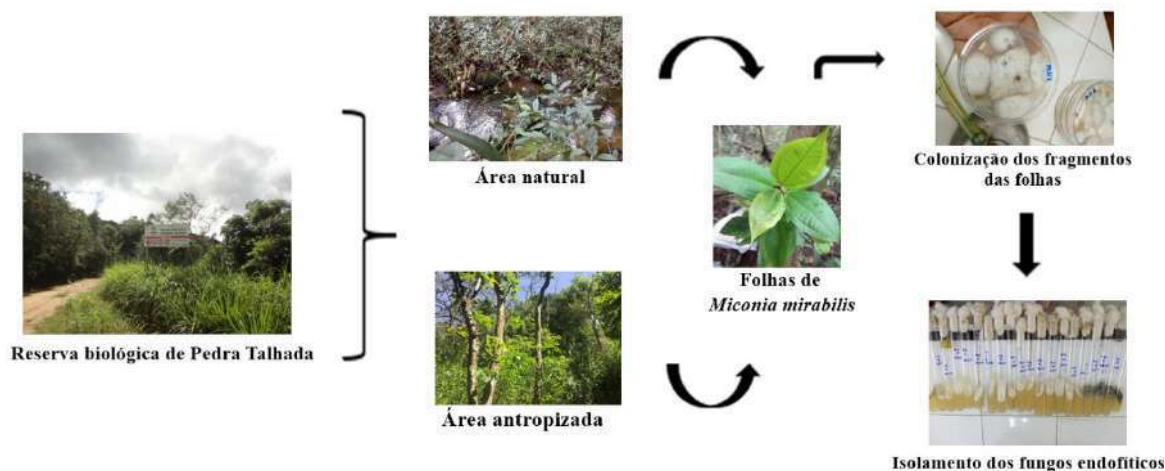
3.2. COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO

Uma visita a campo foi realizada em período chuvoso e três transectos foram percorridos em área natural e outros três em área antropizada (Figura 6). Folhas sadias de dois exemplares de *Miconia mirabilis* em área natural e dois exemplares de em área antropizada foram coletadas, totalizando quatro indivíduos.

O material vegetal foi acondicionado individualmente (3/4 folhas por indivíduo) em sacos de papel e levados ao Laboratório de Micologia Ambiental do Departamento de Micologia (UFPE) e processados em até 48 horas. O material foi processado como descrito por Bezerra et al. (2015), com adaptações. Resumidamente, a assepsia foi feita por uma lavagem inicial das folhas com água e detergente para remoção de impurezas e enxaguadas com água destilada. Na sequência foram mergulhados em álcool 70% (1 min), hipoclorito de sódio 2-2,5% (3 min), álcool 70% (1 min) e por fim as folhas foram lavadas por três vezes (1 minuto cada) em água destilada e esterilizada.

A fragmentação das folhas ocorreu com auxílio de lâmina de bisturi esterilizada e 45 fragmentos com cerca de 1cm² foram utilizados, totalizando 180 fragmentos. Foram distribuídos cinco fragmentos por placa de Petri contendo meio de cultura, totalizando 36 placas (9 por indivíduo). Os fragmentos foram transferidos para meio de cultura batata-dextrose-água (BDA) com clorofenicol (50mg/l) para restringir o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas a 28 ± 2 °C por até 10 dias e o crescimento fúngico foi observado diariamente e toda colônia fúngica encontrada foi isolada e purificada (Figura 7). Após isolamento e purificação, os endófitos foram mantidos em meio de cultura adequado ou preservados em água com glicerol (70%) para posteriores análises morfológicas e/ou moleculares. Para verificar a eficácia da desinfestação, 1 ml de água última de lavagem foi semeada em placas de Petri contendo o mesmo meio, e mantidas sob as mesmas condições de incubação.

Figura 7: Esquema de isolamento de fungos endofíticos de folhas de *Miconia mirabilis* da Reserva Biológica de Pedra Talhada (Mata Atlântica)



Fonte: Pádua, A. P. S. L.

3.3 IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

3.3.1 Identificação morfológica dos fungos endofíticos

A identificação morfológica foi realizada através de observação das características macroscópicas das colônias (cor, aspecto, consistência, presença de pigmento, etc.), características microscópicas (morfologia de estruturas somáticas e reprodutivas), utilizando-se metodologia e literatura específica (Morton e Smith, 1963; Ellis, 1971, 1976; Sutton, 1980; Barnett e Hunter, 1987; Hanlin 1990; Samson e Frisvad, 2004; Domsch et al., 2007; Crous et al., 2007; Bensch et al., 2012; Phillips et al., 2013).

Culturas representativas dos fungos endofíticos isolados e identificados estão depositadas no acervo da Coleção de Culturas – Micoteca URM e as lâminas permanentes no Herbário URM, ambas as coleções na UFPE.

3.3.2 Identificação molecular dos fungos endofíticos

3.3.2.1 Extração, amplificação de fragmentos do DNA e sequenciamento

Para extração do DNA genômico foi utilizado o Kit de extração de DNA genômico da Promega (*Wizard Genomic DNA Purification Kit*) conforme metodologia proposta pelo fabricante. Culturas representativas de cada morfoespécie foram identificadas por meio do sequenciamento da região ITS do rDNA e conforme necessidade outros loci do

DNA foram introduzidos de acordo com cada gênero ou grupo de fungos estudados (Tabela 2). Para amplificação da região ITS do rDNA foram utilizados os *primers* ITS5 e ITS4 (White *et al.*, 1990) ou ITS1 e ITS4 (White *et al.* 1990; O “Donell,1993).

Os produtos das extrações de DNA e das reações de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% corados com *GelRed* (Biotium), e visualizados sob luz UV. Os produtos da amplificação foram purificados e posteriormente encaminhados para sequenciamento na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento e DNA do Centro de Biociências da UFPE.

Tabela 2 – *Primers* utilizados para obtenção de sequencias de genes específicos para identificação molecular dos fungos endofíticos.

Nome	Sequência (5'-3')	Referências	Gêneros estudados
Beta-tubulina			
Bt2a	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	Glass e Donaldson (1995)	<i>Diaporthe, Penicillium</i>
Bt2b	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	Glass e Donaldson (1995)	<i>Diaporthe, Penicillium</i>
Calmodulina			
CDM5	CCG AGT ACA AGG AGG CCT TC	Hong <i>et al.</i> (2006)	<i>Diaporthe, Penicillium</i>
CDM6	CCG ATA GAG GTC ATA ACG TGG	Hong <i>et al.</i> (2006)	<i>Diaporthe, Penicillium</i>
ITS			
ITS 1		O'Donnell,1993	Todos os gêneros listados na tabela 4
ITS 4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White <i>et al.</i> (1990)	Todos os gêneros listados na tabela 4
ITS 5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	White <i>et al.</i> (1990)	Todos os gêneros listados na tabela 4

GAPDH						
GPD1	CAA CGG CTT CGG TCG CAT TG	Berbee <i>et al.</i> (1999)	<i>Colletotrichum</i>			
GPD2	GCC AAG CAG TTG GTT GTG C	Berbee <i>et al.</i> (1999)	<i>Colletotrichum</i>			
RPB2						
RPB2-5F2	GGG GWG AYC AGA AGA AGG C	Sung et al. (2007)	<i>Penicillium, Xylaria</i>			
RPB2-7cR	CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT	Liu et al. (1999)	<i>Penicillium, Xylaria</i>			
TEF1						
EF1-728F	CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG	Carbone e kohn (1999)	<i>Diaporthe</i>			
EF1-986R	TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC	Carbone e kohn (1999)	<i>Diaporthe</i>			

Fonte: O autor, 2020

3.3.2.2. Alinhamento das sequências e análise filogenética

Os cromatogramas do sequenciamento foram analisados para a determinação das sequências consenso utilizando o programa *MEGA* v. 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). Após a edição, todas as sequências foram utilizadas para busca das mais similares depositadas no *GenBank*, utilizando a ferramenta *BLASTn*. As sequências experimentais foram então alinhadas e corrigidas manualmente utilizando o programa *MEGA* v. 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). As novas sequências serão depositadas no *GenBank* do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) e os alinhamentos no banco de dados *TreeBASE* (www.treebase.org/).

As construções das árvores filogenéticas foram feitas através da máxima verossimilhança (ML) ou por Inferência Bayesiana (BI). As sequências foram alinhadas usando O Maft v.7 (Katoh e Standley, 2013) e editadas manualmente usando o programa

MEVA v.7 (Kumar et al., 2016). As análises de ML e de BI foram realizadas com MrBayes on XSEDE e RAXML-HP BlackBox v.8.2.8 (Stamatakis et al., 2008), respectivamente no CIPRES Science Gateway (www.phylo.org/). A construção da árvore por máxima verossimilhança foi realizada usando o modelo de substituição nucleotídica GTR+G+I com 1000 reamostragens de bootstrap. Para a Inferência Bayesiana (BI) foi empregado o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) e o modelo de substituição nucleotídica como sugerido pelo MrModelTest 3.7 (Posada e Crandall, 1998). A análise de BI foi realizada através do programa Mr. Bayes v.3.2.1 (Ronquist e Huelsenbeck, 2012). As árvores filogenéticas foram visualizadas no software FigTree (Rambaut, 2009) e exportadas para edição.

3.4 ANÁLISES ECOLÓGICAS

A taxa de colonização (TC) foi obtida através da razão entre o número de fragmentos colonizados (Nf) e o número total de fragmentos (Nt) isolados do tecido vegetal, multiplicado por 100 ($TC = Nf/Nt \times 100$) (Araujo et al. 2002).

As comunidades dos fungos foram avaliadas em termos quantitativos e qualitativos (frequência de ocorrência absoluta e relativa) e sua estruturação, analisada por meio de índices ecológicos de diversidade. A frequência absoluta foi calculada como número total de isolados endofíticos e a abundância relativa (frequência relativa) de cada espécie foi calculada aplicando-se a fórmula: $D_i = (N_i/N) \times 100$, onde D_i = abundância da espécie i ; N_i = número de UFC da espécie i ; N = número total de UFC (Photita et al., 2001).

Para o cálculo da diversidade foi utilizado o índice de diversidade de Shannon-Wiener na base logarítmica 2: $H' = \sum (p_i) \times (\log_2 p_i)$, onde p_i = abundância relativa de cada espécie. Os diagramas de Venn foram construídos usando a ferramenta *InteractiVenn* disponível on-line em <http://www.interactivenn.net/> (Herbele et al., 2015).

3.5 SELEÇÃO DE FUNGOS QUANTO À PRODUÇÃO DE L- ASPARAGINASE (ASNASE) EM MEIO LÍQUIDO

Foram selecionados, aleatoriamente, 20 fungos endofíticos de *Miconia mirabilis* para a etapa de produção da enzima L-asparaginase, pertencentes a nove gêneros identificados previamente. Fungos selecionados:

➤ Isolados da área natural: J2A – *Nigrospora* sp. ; J8B - *Colletotrichum* sp. (URM 8300); J61 - *Nigrospora* sp. (URM 8313); J70 - *Colletotrichum* sp. (URM 8302); L1A- *Phyllosticta* sp. (URM 8196); L2 - *Xylaria* sp. (URM 8314); L6 – *Hypoxylon* sp.; L30 - *Phyllosticta* sp. (URM 8307); L33 - *Nemania* sp. (URM 8299); L48 - *Colletotrichum* sp. (URM 8301); L59 - *Penicillium* sp. (URM 8317).

➤ Isolados da área antropizada: M46 - *Penicillium* sp. (URM 8318); N18 – *Xylaria* sp.; N23 – *Diaporthe* sp. (URM 8304); N28 – *Xylaria* sp.; N31B - *Penicillium* sp. (URM 8320); N39 - *Diaporthe* sp. (URM 8321); N42A *Talaromyces* sp (URM 8305); N44 – *Nigrospora* sp.; N66 - *Penicillium* sp. (URM 8087).

Para a preparação do inóculo, os isolados selecionados e previamente armazenados em água e glicerol, foram reativados em placas de Petri contendo o meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), incubados por até sete dias. As etapas utilizadas para a produção (Pré-fermentação e Fermentação) da enzima seguiram metodologia de Loureiro et al. (2012) com adaptações de Silva et al. (2018) e Pádua et al. (2018).

A produção da L-asparaginase foi realizada utilizando o meio Czapek Dox's (CDM) modificado pela adição de L-asparagina (Saxena e Sinha, 1981) e modificado por Gulati et al. (1997). O meio é composto por glicose (14,0 g/L), L-asparagina (10,0 g/L), KH_2PO_4 (1,52 g/L), KCl (0,52 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,52 g/L), $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g/L) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2,0 g/L) com pH ajustado para 6,2.

Para a etapa de pré-fermentação, foram utilizados 50 mL do meio CDM contidos em frascos de Erlenmeyer (250 mL), onde cinco discos de 5 mm de micélio das culturas selecionadas foram inoculados e incubados a 30°C, a 120 rpm por 96 horas. Após esse período as culturas foram filtradas utilizando papel de filtro Whatman nº 1 e o micélio utilizado na etapa de fermentação.

Na etapa de fermentação o micélio coletado na pré-fermentação foi inoculado em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL do meio CDM (com ausência de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e redução da glicose para 2,0 g/L) e incubados a 30°C, a 120 rpm por 120 horas. Após esse período, as culturas foram filtradas utilizando papel de filtro Whatman nº 1 e a biomassa foi utilizada para quantificar a atividade enzimática (Loureiro et al.,

2012 modificado por Silva et al., 2018 e Pádua et al., 2018).

3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade da enzima L- asparaginase foi verificada de acordo com Drainas et al. (1977), modificado por Silva et al. (2018) e Pádua et al. (2018) onde a solução para determinação da atividade enzimática foi composta por 1,5 mL Tris-HCl (20 mM, pH 8,6), 0,2 mL de solução de L-asparagina (100 mM), 0,2 mL de solução de hidroxilamina pH 7,0 (1 M) e 0,1 g de biomassa fúngica. O tampão Tris-HCL foi adicionado a biomassa de cada cultura (0,1g) sendo agitada em vórtex. As soluções de L-asparagina e hidroxilamina foram adicionadas e as amostras branco permaneceram apenas com a biomassa fúngica e o Tris-HCL, porém ambas amostras foram incubadas a 37°C, 150 rpm, por 30 minutos. Em seguida foi adicionado à mistura, 0,5 mL de solução de cloreto férrico/TCA/HCl [10% (w/v) de FeCl₃ mais ácido tricloroacético a 5% (w/v) em 0.66 mol·L⁻¹ HCl] em todas as amostras com finalidade de interromper a reação. Posteriormente ambas as amostras foram centrifugadas a 6.000 rpm por 15 minutos. Após centrifugação, os sobrenadantes de todas as amostras foram lidos em espectrofotômetro a 500 nm. Uma unidade de L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de β-hidroxâmico aspártico por minuto a 37°C. Todas as análises foram realizadas em triplicata e comparadas ao branco da amostra. O melhor produtor foi definido como o fungo capaz de produzir a maior quantidade de U/g-1 para a atividade intracelular dentre os endófitos testados neste estudo.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA ATIVIDADE DA L-ASPARAGINASE

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para determinar se houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os resultados da produção de L-asparaginase pelos fungos endofíticos testados. Este teste permite comparar duas ou mais amostras independentes de tamanhos iguais ou diferentes e não assume normalidade para os resíduos correspondentes. Todos os cálculos foram realizados utilizando o software Statistic8.

4 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS DADOS

4.1 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Miconia mirabilis*: ANÁLISES FIOGENÉTICAS E ECOLÓGICAS

Este é o primeiro estudo que relata a diversidade de fungos endofíticos em *M. mirabilis*, porém outros estudos fúngicos e de comunidades endofíticas foram realizados com representantes de mesmo gênero, ordem ou família de *M. mirabilis* (Seixas et al., 2007, Vaz et al., 2014; Piza et al., 2015; Mause-Sitoe et al., 2016; Mishra et al., 2016).

Um total de 285 isolados de fungos endofíticos foram obtidos da planta *M. mirabilis* a partir dos 180 fragmentos das folhas utilizadas, das duas áreas estudadas. Os endófitos foram agrupados de acordo com a morfologia, entretanto, 12 fungos não foram capazes de crescer após reativação, resultando um total de 273 fungos endofíticos, sendo 149 da área natural e 124 da área antropizada. Essa perda no número de isolados pode estar ligada ao que foi mencionado por Strobel (2018) que constatou que fungos de crescimento mais lento, depois de transferidos para meio de cultura, começam a crescer ainda mais lentamente podendo morrer se algum nutriente importante encontrado na natureza esteja faltando nas condições de cultivo. Apenas fungos filamentosos foram isolados e, após purificação, foram identificados por letras (J e L – Área Natural; M e N – Área Antropizada) seguido de números que designam o isolado (Ex.: J1, J2...J80).

A riqueza de fungos endofíticos encontrada neste estudo se assemelha a outros estudos em áreas tropicais onde o número de isolados fúngicos também foi alto (Arnold e Lutzoni, 2007; Nascimento et al., 2015; Lima et al., 2012; Siqueira et al., 2011, Bonfim et al., 2016; Correia et al., 2018). Porém, é importante destacar que na maioria dos estudos citados a quantidade de fragmentos foi superior a utilizada no presente estudo, destacando a alta riqueza encontrada nesse estudo e também, a complexidade da comparação de dados a respeito da microbiota endofítica devido a tipos diferentes de metodologias empregadas, bem como o tipo de tecido vegetal e o esforço amostral (Cannon e Simmins, 2002, Vieira et al., 2011).

Entretanto, é preciso levar em consideração que o número exato de endófitos fúngicos estimado por técnicas dependentes de cultura não corresponde a toda a diversidade da comunidade endofítica, sendo necessário combinar o método tradicional com técnicas independentes de cultura e que analisem o microbioma de todo o vegetal,

como por exemplo, análises metagenômicas (Frohlich e Hyse, 1999; Guo et al., 2001; Zhang et al., 2015; Singh et al., 2017; Sapkota et al., 2017; Collinge et al., 2019).

Outros estudos em florestas tropicais apresentaram um número de isolados menor que nesse estudo (Yuan et al., 2011; Mishra et al., 2016; Hansan, 2019) e essas diferenças encontradas podem ser associadas a vários fatores ambientais (tecido vegetal, mudanças climáticas, relações ecológicas entre fungos, hospedeiros e substratos, etc.), o que vem sendo ressaltado em alguns estudos (Nascimento et al., 2015; Koide et al., 2017).

A média da taxa de colonização dos fragmentos de folha de *M. mirabilis* foi de 93,33% e a taxa de colonização por indivíduo estudado está representada na Tabela 3.

Tabela 3 –Taxa de colonização dos fragmentos foliares por indivíduos dos fungos endofíticos isolados de *Miconia mirabilis* nas áreas natural (AN) e antropizada (AA) da Mata Atlântica da REBIO Pedra Talhada, Brasil.

Indivíduo	Fragmentos foliares com crescimento fúngico	Total de fragmentos foliares	Taxa de Colonização
AN1	45	45	100%
AN2	42	45	93%
AA1	40	45	89%
AA2	41	45	91%

Fonte: Ferro, L. O

A taxa de colonização foi alta em comparação a outros estudos. Embora, endófitos com taxa de colonização acima de 50% tenham sido relatados por outros trabalhos realizados em florestas tropicais (Cannon e Simmons, 2002, Rubin et al., 2005; Luz et al., 2006; Nascimento et al., 2015). Diferentemente, estudos em florestas tropicais secas demonstram uma taxa de colonização muito inferior, muitas vezes não ultrapassando 50% (Sun et al., 2012; Jin et al., 2013). Uma alta colonização endófitica pode estar associada às propriedades das florestas tropicais úmidas quando comparadas a florestas tropicais secas, incluindo o período chuvoso que pode contribuir para um aumento na taxa de fragmentos colonizados (Santos et al., 2015).

Os 273 fungos endofíticos isolados foram agrupados morfollogicamente por características macroscópicas e microscópicas confirmadas por microcultivos em lâminas e/ou análises filogenéticas. Foram totalizados 14 gêneros de fungos endofíticos, todos fungos filamentosos pertencentes ao filo Ascomycota. O predomínio do filo Ascomycota é comum na maioria dos estudos sobre a comunidade endofítica (Bezerra et al., 2012;

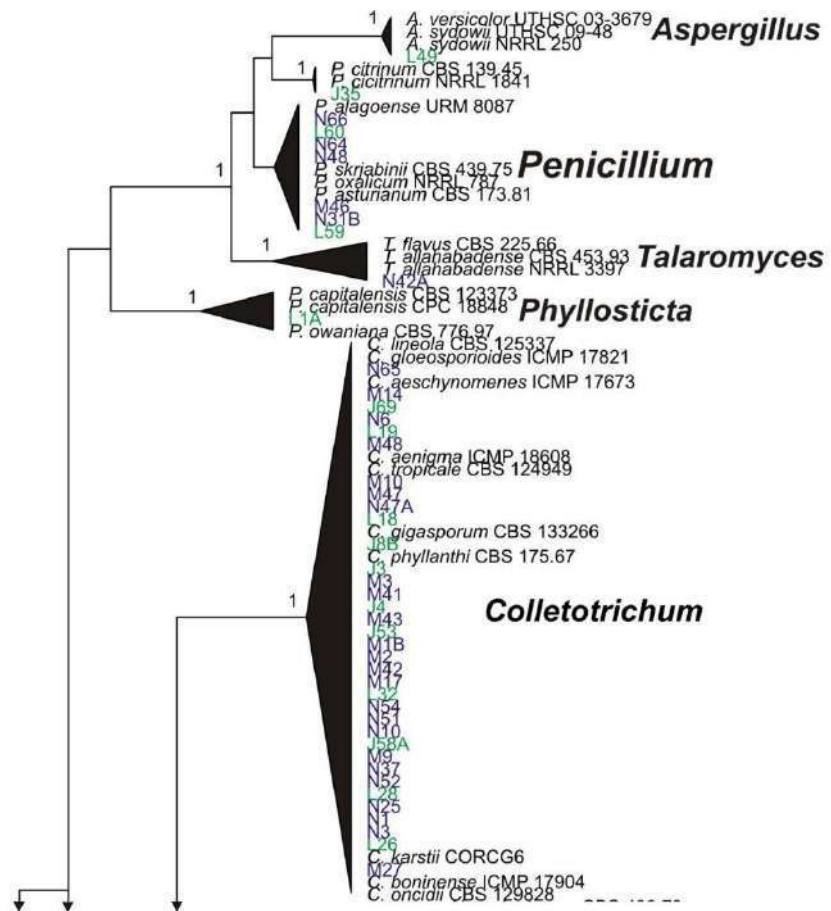
Bullington e Larkin, 2015; Nascimento et al., 2015; Singh et al., 2017, Strobel, 2018), entretanto em alguns trabalhos é possível verificar a presença de fungos Basidiomycota (Fernandes et al., 2015; Mishra et al., 2016; Correia et al., 2017; Pádua et al., 2018) e alguns representantes de fungos do subfilo Mucoromycotina (Bezerra et al.; 2013; 2015; Fernandes et al., 2015; Freire et al., 2015; Mishra et al., 2016). O número baixo de representantes do filo Basidiomycota pode estar relacionado ao tipo de método empregado, já que o crescimento fúngico é dependente de cultura, não isolando por exemplo, fungos biotróficos (Singh et al., 2017).

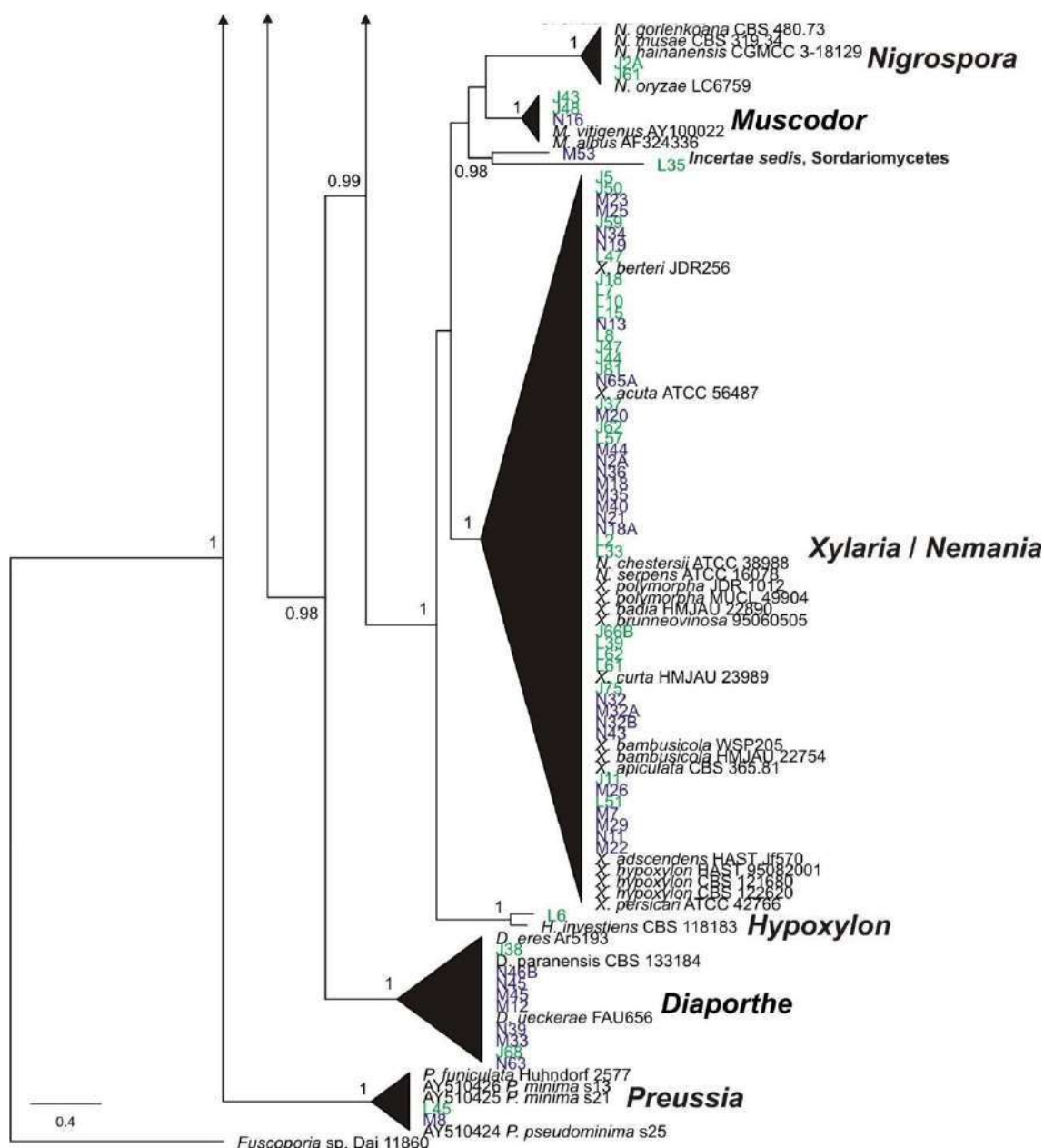
A identificação de fungos endofíticos apenas com base na taxonomia morfológica é complexa, pois a maioria dos endófitos não produz estruturas de reprodução em meio de cultura (Chen et al., 2013). Entre os marcadores de DNA, a região mais comumente usada para fungos é a ITS, considerada como o *barcode*, ou seja, um código de barras capaz de identificar com sucesso diversos grupos fúngicos (Chen et al., 2013). Posteriormente, a utilização de sequências de ITS não possibilitou a separação entre espécies e/ou grupos fúngicos muito relacionados, necessitando-se da utilização de outros genes para a identificação dos fungos, conformes listados na tabela 2.

Os fungos endofíticos isolados de *M. mirabilis* foram identificados por taxonomia molecular com base nas sequências de ITS do rDNA; porém, apenas 113 isolados tiveram a região ITS amplificada e sequenciada, e posteriormente foram agrupados por análise filogenética (Figura 8).

Os representantes com sequências de parte da região ITS do rDNA representam **sete** ordens em Ascomycota, sendo a ordem Xylariales a mais comum e representada por quatro gêneros, seguidos por Eurotiales com três gêneros e as demais ordens com apenas um gênero cada (Pleosporales, Botryosphaeriales, Glomerellales, Diaporthales e Trichosphaeriales). Outros dois representantes não conseguiram ser definidos por sequenciamento de ITS e também se encontram como *incertae sedis* em Sordariomycetes.

Figura 8 - Filograma obtido por inferência bayesiana a partir de análises de sequências da região ITS do rDNA demonstrando o posicionamento de 113 fungos endofíticos isolados de *Miconia mirabilis* em área de Mata Atlântica do nordeste brasileiro. *Fuscoporia* sp. (Dai 11680, Basidiomycota) foi utilizado como grupo externo. Valores de probabilidade posterior a partir de 0.98 são mostrados perto dos nós. Os isolados destacados com a cor verde representam isolados provenientes da área natural e os com cor azul da área antropizada.



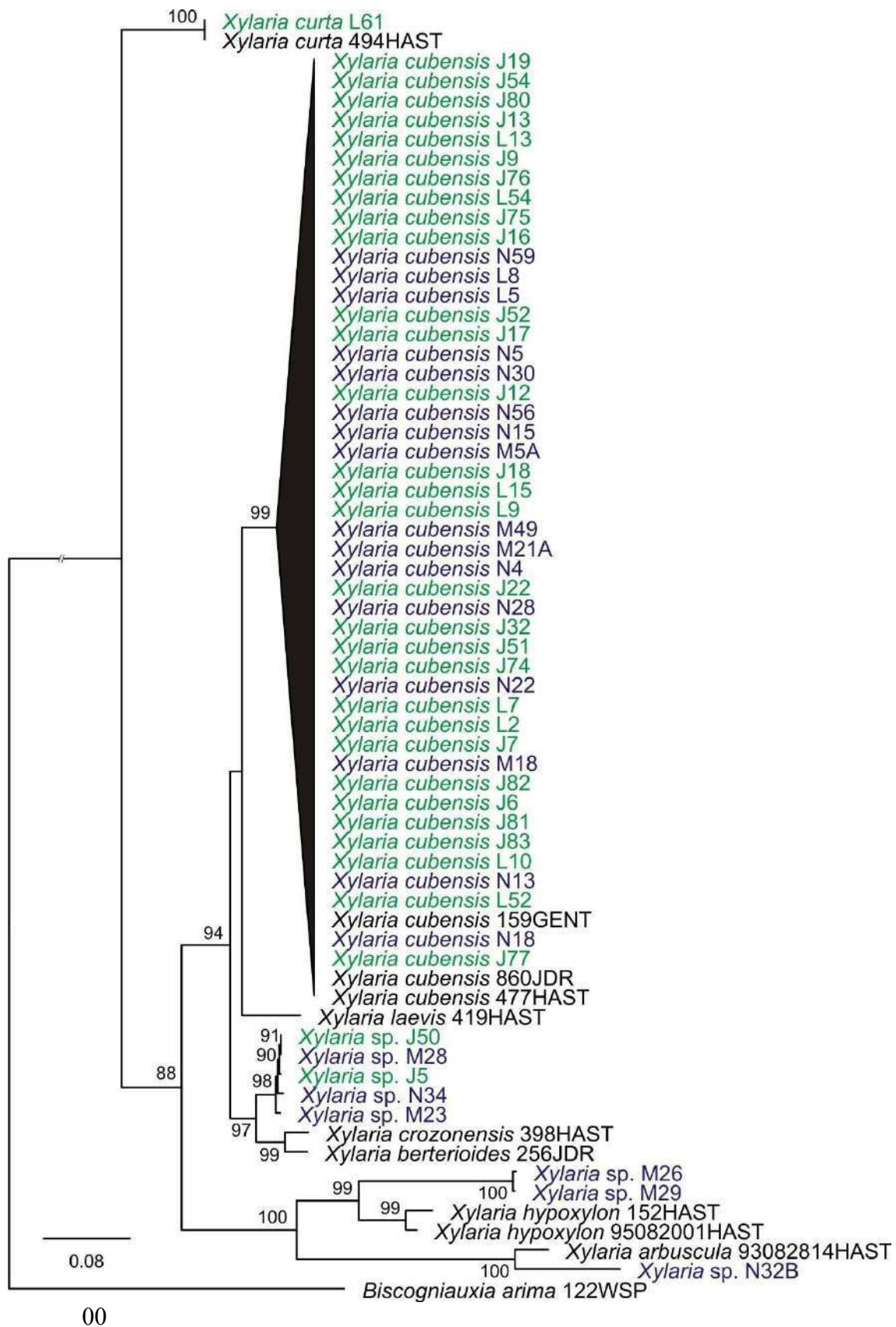


Embora a região ITS seja o marcador mais utilizado na identificação de fungos, há relatos de insuficiência de suas sequências para delimitar grupos fúngicos, principalmente quando envolve complexos de espécies (Gruning et al., 2004; Chen et al., 2012, Harder et al., 2013; Singh et al., 2017). A família Xylariaceae é um dos grupos que a região ITS não é adequada para resolver as relações filogenéticas e um dos motivos pode ser a alta variabilidade presente no gene (Hiesh et al., 2010; Chen et al., 2013). Alguns estudos tentam combinar outras regiões gênicas, entre elas sequências de α -actina, β -tubulina e RPB2 (Hiesh et al., 2010; Li et al., 2017; Wendt et al., 2017), para melhor delimitar as espécies de *Xylaria* (Hsieh et al., 2005; 2010; Tang et al., 2009; Pažoutová et

al., 2010).

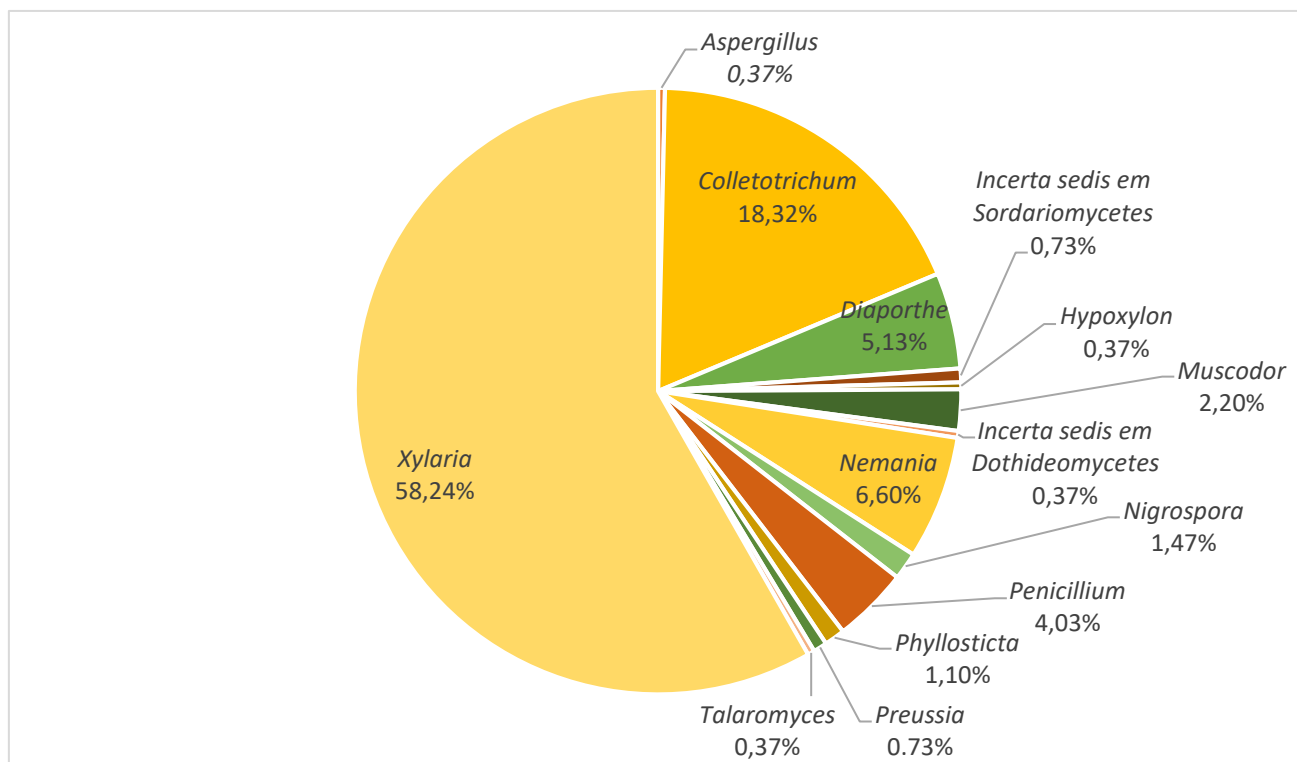
Foi construído um filograma através de análise de verossimilhança (MV) com sequências de RPB2 (Figura 9). Porém, é necessário ainda abordar outros genes na tentativa de delimitar os táxons de *Xylaria* no presente estudo.

Figura 9 - Filograma obtido através de análise de verossimilhança a partir de análises de sequências da região RPB2 do rDNA mostrando o posicionamento de 54 fungos endofíticos isolados de *M. mirabilis* em área de Mata Atlântica do nordeste brasileiro pertencentes ao gênero *Xylaria* sp. *Biscogniauxia arima* (Basidiomycota WSP 122) foi utilizado como grupo externo. Valores de bootstrap a partir de 70% são mostrados perto dos nós. Os representantes de cor verde representam a área natural e os de cor azul a área antropizada do presente estudo.



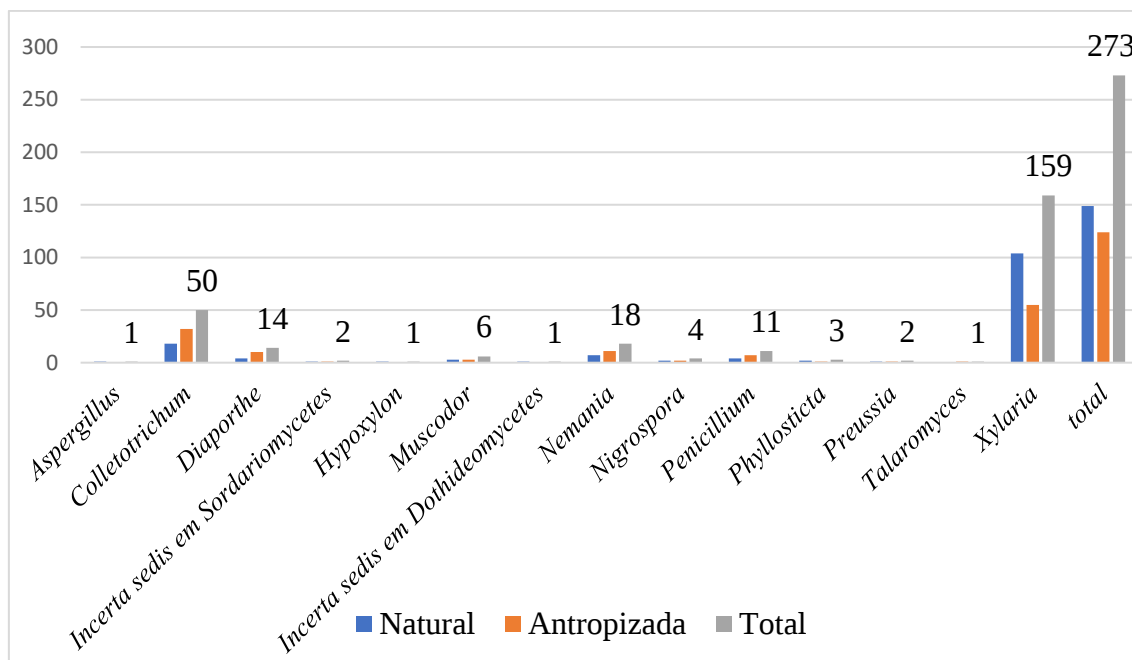
Dos 14 gêneros verificados, *Xylaria* foi o mais frequente (58,24%) com 159 isolados pertencentes a 10 morfo-espécie, representando mais da metade dos isolados, seguido por *Colletotrichum* (18,32%) com 50 isolados pertencentes a quatro morfo-espécies, *Nemania* (6,60%) com 18 isolados pertencentes a seis morfo-espécies, *Diaporthe* (5,13%) com 14 isolados pertencentes a cinco morfo-espécies, *Penicillium* (4,03%) com 11 isolados pertencentes a quatro morfo-espécies, *Muscodor* (2,20%) com seis isolados pertencentes a três morfo-espécies, *Nigrospora* (1,47%) com quatro isolados pertencentes a duas morfo-espécies, *Phyllosticta* (1,10%) com três isolados pertencentes a duas s morfo-espécies, *Preussia* (0,73%) com dois isolados pertencentes a uma morfo-espécie, *Incertae sedis* em Sordariomycetes (0,73%) com dois isolados pertencentes a uma morfo-espécie, e, *Aspergillus* (0,37%), *Hypoxyton* (0,37%), *Incertae sedis* em Dothideomycetes. (0,37%) e *Talaromyces* (0,37%) os quais foram isolados apenas uma vez (Figuras 10 e 11).

Figura 10. Representação gráfica da frequência relativa de fungos endofíticos de *Miconia mirabilis* nas áreas natural e antropizada da Mata Atlântica da REBIO Pedra Talhada, Brasil.



Fonte: Ferro, L. O. Elaborado no excel, 2019

Figura 11. Representação gráfica da frequência absoluta de fungo endofíticos de folhas de *Miconia mirabilis* nas áreas natural e antropizada da Mata Atlântica da REBIO Pedra Talhada, Brasil.



Fonte: Ferro, L. O. Elaborado no excel, 2019

Xylaria é o gênero com o maior número de espécies da família Xylariaceae (Xylariales). Entretanto, o número exato de espécies é incerto devido ao reduzido número de trabalhos taxonômicos desse gênero (Hsieh et al., 2010). Espécies de *Xylaria* são frequentemente isoladas como endófito em vários estudos em florestas tropicais (Davis et al., 2003; Costa et al., 2012; Chen et al., 2013; Santos et al., 2015; Correia et al., 2017). A identificação de amostras de *Xylaria* a nível taxonômico específico é difícil devido à falta ou demora de produção de estruturas sexuais em meio de cultura (Davis et al., 2003; Chen et al., 2013; Singh et al., 2017).

Embora haja uma alta frequência de espécies de *Xylaria* isoladas como endófitos, há dificuldade na formação de estruturas sexuais e as características de muitas espécies em cultura são semelhantes e sem grandes variações, sendo os endófitos únicos e sem material disponível em bancos de sequências de genes para comparação (Roger, 2000).

O gênero *Colletotrichum* foi o segundo mais frequente no estudo, sendo o maior número de isolados na área antropizada. *Colletotrichum* é um gênero encontrado em diversas espécies vegetais (Mussi-Dias et al., 2012; Senthil et al. 2011; Siqueira et al. 2011; Chow e Ting, 2015) e, por exemplo, foi abundante em um estudo com espécies de begônia em área de Mata Atlântica no Brasil, correspondendo a 51,6% dos isolados

(Correia et al., 2018) e o segundo mais frequente em plantas medicinais (Mussi-Dias et al. 2012).

Alguns gêneros de fungos causadores de doenças em plantas podem também serem isolados como endófitos e sem causar sintomas de doença no vegetal, entre eles podem ser citados os gêneros *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Phoma*, *Diaporthe* e *Xylaria* (Strobel, 2018), corroborando com as definições para fungos endofíticos, que abordam o endofitismo como um estágio do ciclo de vida fúngico dependente das condições entre as interações planta x fungo (Azevedo e Araújo, 2007; Hyde e Soyong, 2008; Suryanarayanan et al., 2005; White Jr. e Bacon, 2012, Hardoim et al., 2015).

Além de *Colletotrichum*, os gêneros *Diaporthe* e *Phyllosticta* também foram relatados no estudo, corroborando com diversos estudos de endófitos onde os três gêneros aparecem com maior frequência na diversidade endofítica (Singh et al., 2017; Bezerra et al., 2018, Pádua et al., 2018) e são importantes economicamente devido as doenças que podem causar principalmente em plantas frutíferas (Dissanayake et al. 2017; Guarnaccia et al. 2017). Singh et al. (2017), ao estudar uma espécie da família Verbenaceae em área de floresta tropical na Índia, também relataram o gênero *Colletotrichum* como o segundo mais frequente, sendo *Diaporthe* o gênero mais comumente isolado.

O gênero *Penicillium* também já foi reportado como endófito em diversas plantas (Sun et al., 2012; Bezerra et al., 2015, Silva et al., 2018). Por exemplo, Kusari et al. (2013) ao estudar a planta medicinal *Cannabis sativa* na Holanda encontraram alta riqueza de isolados do gênero correspondendo a mais de 90% dos endófitos. No estudo uma espécie de *Penicillium* (*P. alagoense*) foi descrita como nova para ciência e pode ser consultada no apêndice A. (Crous et al., 2018). O gênero *Nigrospora* foi relatado por Bonfim et al. (2016) como endófito em um estudo realizado com plantas nativas em área de floresta tropical no estado de Sergipe.

Outos isolados tiveram apenas um ou dois representantes para cada táxon, sendo considerados isolados incidentais e/ou raros, são eles: *Preussia*, *Incerta sedis* em Sordariomycetes, *Aspergillus*, *Hypoxylon*, *Incerta sedis* em Dothideomycetes e *Talaromyces*. Taxóons raros são constantemente encontrados em estudos com endófitos e esse número reduzido de isolados pode estar associado com o predomínio de algum gênero como os mais frequentes na comunidade endofítica (Siqueira et al., 2011, Santos et al., 2015).

O presente estudo apresentou alta frequência (> 60%) de fungos endofíticos pertencentes à ordem Xylariales (*Xylaria*, *Nemania*, *Muscodor* e *Hypoxylon*), sendo a maioria da família Xylareaceae e apenas *Hypoxylon* foi recentemente separado e está na própria família Hypoxylaceae (Wendt et al., 2018). Contudo, apenas um isolado nesse estudo é representando por esse gênero, sendo a família Xylareaceae a mais marcante (Tabela 4).

Tabela 4 – Comunidades de fungos endofíticos isolados de *Miconia mirabilis* na Reserva Biológica de

Gênero de fungos endofíticos	Área al	Área Antropizada	fa	fr (%)
<i>Aspergillus</i>	1	0	1	0,37
<i>Colletotrichum</i>	18	32	50	18,32
<i>Diaporthe</i>	4	10	14	5,13
<i>Hypoxylon</i>	1	0	1	0,37
<i>Incerta sedis</i> (Sordariomycetes)	1	1	2	0,73
<i>Incerta sedis</i> (Dothideomycetes)	1	0	1	0,37
<i>Muscodor</i>	3	3	6	2,20
<i>Nemania</i>	7	11	18	6,60
<i>Nigrospora</i>	2	2	4	1,47
<i>Penicillium</i>	4	7	11	4,03
<i>Phyllosticta</i>	2	1	3	1,10
<i>Preussia</i>	1	1	2	0,73
<i>Talaromyces</i>	0	1	1	0,37
<i>Xylaria</i>	104	55	159	58,24
Total	149	124	273	100

Pedra Talhada, Alagoas, Brasil. fa = frequência absoluta, fr = frequência relativa.

Fonte: Ferro, L. O

Xylareaceae é considerada uma das maiores famílias de Xylariales e compreende aproximadamente 85 gêneros e mais de 1300 espécies (Kirk et al., 2008). Os membros dessa família são em sua maioria sapróbios, sendo importantes decompositores de materiais vegetais, outros também são isolados como patógenos ou endófitos (Petrini e Petrini 1985; Rogers et al. 2005).

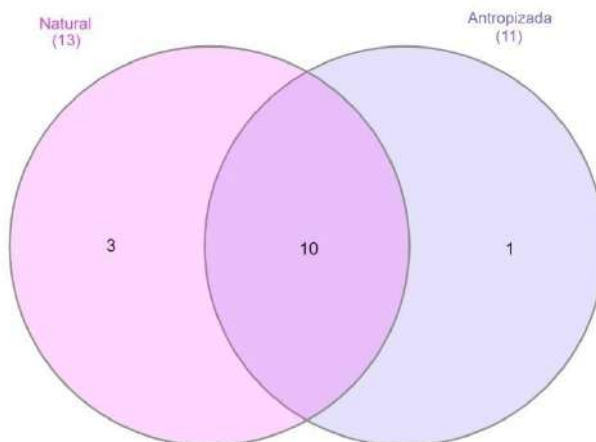
Diversos estudos buscam explicar o surgimento de fungos Xylareaceae como endófitos, por exemplo, Petrini et al. (1995) observaram que o papel desses fungos como endófitos poderia estar ligado a decomposição de celulose e lignina quando a planta começa a senescer, entretanto há evidências que tais fungos podem ser isolados apenas como endófitos (Rogers, 2000).

Embora a diversidade de fungos endofíticos na área antropizada ($H' = 1.60$) tenha sido superior a área natural ($H' = 1.21$) não há diferença estatística em relação à diversidade entre as áreas estudadas (X-squared = 0.055846; p-value = 0,8132). A diversidade total de gêneros foi igual a $H' = 1,43$ como estimado pelo índice de diversidade utilizado.

Apesar do número alto de táxons isolados, os valores de diversidade de Shannon-Wiener não foram maiores devido à dominância de alguns gêneros, sendo *Xylaria* o que teve números maiores na área natural e *Colletotrichum* com maior frequência na área antropizada, fazendo a diversidade nessa área ser maior. A dominância de alguns representantes de fungos endofíticos é comum em estudos sobre a comunidade endofítica (Huang et al., 2008; Nascimento et al., 2015).

As comunidades de fungos endofíticos das duas áreas compartilham 10 gêneros (Figura 14): *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *incertae sedis* dentro de Sordariomycetes, *Muscodor*, *Nemania*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Phyllosticta*, *Preussia* e *Xylaria*, enquanto *Aspergillus*, *Hypoxylon* e *incerta sedis* em Dothideomycetes foram táxons encontrados apenas na área natural e *Talaromyces* apenas na área antropizada. O compartilhamento de gêneros sugere que a comunidade de fungos endofíticos tende a ser mais homogênea entre as áreas de estudo.

Figura 12 - Diagrama de Venn mostrando os gêneros de fungos endofíticos únicos e compartilhados entre áreas natural e antropizada.



Fonte: Ferro, L. O

Conhecer a diversidade de fungos endofíticos e suas relações com os hospedeiros ainda é complexo e regiões de florestas tropicais no Brasil vem sofrendo reduções em suas áreas, acarretando a perda da micodiversidade associada e podendo resultar na extinção de muitos fungos que poderiam ser potenciais produtores biotecnológicos (Azevedo, 2014). Com isso, são necessárias investigações a respeito da composição de fungos endofíticos dos diversos ecossistemas, reforçando a importância de se conhecer a diversidade microbiana e suas interações, bem como ampliar o conhecimento da diversidade e distribuição desses microrganismos.

4.2 PRODUÇÃO DA ENZIMA L-ASPARAGINASE

Dos 20 fungos endofíticos selecionados para verificação do potencial de produção de L-asparaginase, 17 apresentaram biomassa suficiente para o teste de produção da enzima, e destes, oito apresentaram potencial para produção (Tabela 5).

Após inoculação em meio de pré-fermentação CDM modificado, os fungos aumentaram sua biomassa possibilitando a filtragem e posterior transferência para o meio de fermentação, onde foi realizada nova filtragem e pesagem da biomassa final. Porém, em três isolados o aumento da biomassa foi insuficiente, foram eles: L6 (*Hypoxylon* sp.), N18 (*Xylaria* sp.) e N44 (*Nigrospora* sp.), não sendo possível dar continuidade ao teste com essas amostras e avaliar a atividade enzimática.

O melhor produtor foi o isolado do gênero *Diaporthe* com uma atividade de 1,16 U/g. Outros isolados produtores da enzima são pertencentes aos gêneros *Colletotrichum* – J8B (0,65 U/g), *Phyllosticta* – L30 e L1A (0,64 U/g e 0,58 U/g, respectivamente), *Penicillium* – N66 (0,58 U/g), *Nigrospora* – J61 (0,57 U/g), *Talaromyces* – N42A (0,57 U/g) e *Xylaria* – L2 (0,57 U/g). Este é o primeiro relato da produção de L-asparaginase por fungos dos gêneros *Nigrospora* e *Xylaria*.

Tabela 5. Atividade de L-asparaginase obtida por fungos endofíticos isolados de folhas de *Miconia mirabilis* em área de Mata Atlântica.

Código	Gênero	Área	Atividade (U/g)
J2A	<i>Nigrospora</i> sp	AN	0,00
J8B	<i>Colletotrichum</i> sp	AN	0,65
J61	<i>Nigrospora</i> sp	AN	0,57
J70	<i>Colletotrichum</i> sp	AN	0,00
L1A	<i>Phyllosticta</i> sp	AN	0,58
L2	<i>Xylaria</i> sp	AN	0,57
L30	<i>Phyllosticta</i> sp	AN	0,64
L33	<i>Nemania</i> sp	AN	0,00
L48	<i>Colletotrichum</i> sp	AN	0,00
L59	<i>Penicillium</i> sp	AN	0,00
M46	<i>Penicillium</i> sp	AA	0,00
N23	<i>Diaporthe</i> sp	AA	0,00
N28	<i>Xylaria</i> sp	AA	0,00
N31B	<i>Penicillium</i> sp	AA	0,00
N39	<i>Diaporthe</i> sp	AA	1,16
N42A	<i>Talaromyces</i> sp	AA	0,57
N66	<i>Penicillium</i> sp	AA	0,58

Legenda: AN: Área Natural; AA: Área antropizada

Fonte: Ferro, L. O

Estudos relatam a capacidade de fungos endofíticos de produzir a enzima L-asparaginase (Theatana et al., 2007, 2009; Santos et al., 2015; Krishnapura e Belur, 2016; Chow e Ting, 2017; Pádua et al., 2018; Silva et al., 2018) sendo os gêneros *Aspergillus* e

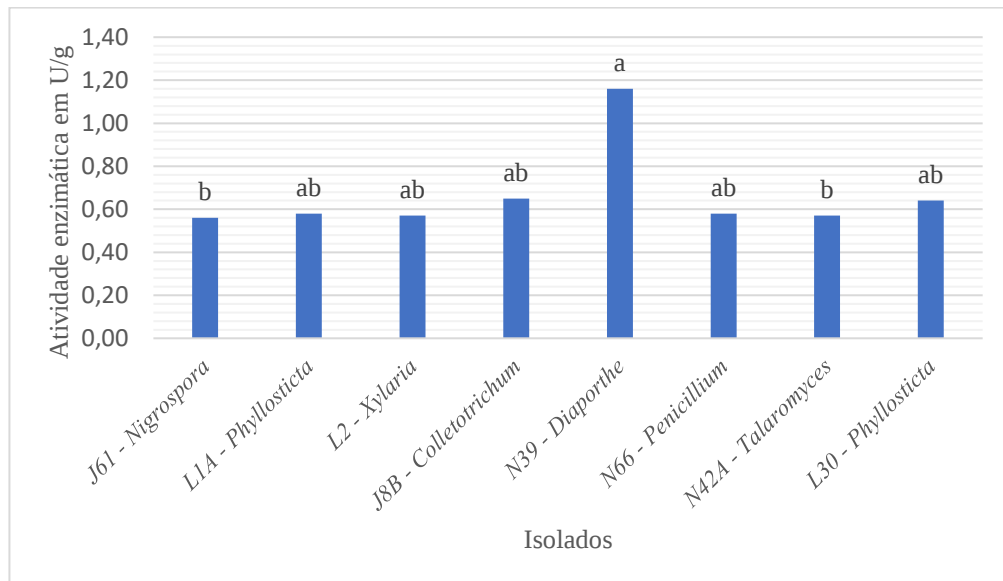
Penicillium os mais frequentemente testados e que tem apresentado bons resultados (Santos et al., 2015; Silva et al., 2018). Porém apenas os estudos de Pádua et al (2018) e Sila et al. (2018) utilizaram mesma metodologia do presente estudo podendo assim serem comparados aos resultados aqui relatados.

Espécies de *Talaromyces* e *Penicillium* são relatadas em vários estudos acerca do potencial biotecnológico. Por exemplo, Silva et al. (2018) quantificou a atividade de L-asparaginase de endófitos isolados de uma espécie de bromélia em área de Caatinga e o melhor produtor foi o isolado *Talaromyces* cf. *cecidicola* (URM 7826) com atividade de 2,30 U/g, e segundo melhor produtor foi *Penicillium* sp. (URM 7827) com atividade de 1,28 U/g.

O gênero *Diaporthe* é relatado em outros estudos acerca do seu potencial biotecnológico, sendo apontado como produtor de várias substâncias antitumorais, citotóxicas e antimalárica (Silva et al., 2005; Kumaran, 2009; Hemtasin et al., 2011 e Udayanga et al., 2011; Abreu et al., 2012). Entretanto, a produção de L-asparaginase foi verificada no estudo de Pádua et al. (2018) que foi o primeiro a relatar isolados de *Diaporthe* como produtores e com atividade média entre 2,41 e 1,47 U/g. Nesse mesmo estudo os gêneros *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Phyllosticta* e *Talaromyces* também apresentaram atividade enzimática.

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis mostrou que há diferença estatisticamente significativa entre a produção de L-asparaginase por endófitos de *M. mirabilis* ($p > 0,05$) (Figura 15). Comparando a produção entre os isolados, pode-se observar que *Diaporthe* sp. (N39), apesar de ter maior produção, só apresentou diferença significativa entre a produção dos isolados *Phyllosticta* sp. (J61) e *Talaromyces* sp. (N42).

Figura 13 – Atividade enzimática da L-asparaginase de fungos endofíticos de *M. mirabilis*. - Teste não paramétrico de *Kruskal – Wallis* ($p > 0,05$). As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente uma da outra.



Fonte: Ferro, L. O.

Os resultados obtidos no presente estudo são satisfatórios, uma vez que outros estudos já apresentarem menor produção enzimática. Almeida (2015) testando diferentes cepas fúngicas obtiveram uma atividade variando entre 0,019 e 0,610 U/ml. Theathana et al. (2007) apresentaram níveis parecidos com o do estudo relatando uma produção de L-asparaginase entre 0,019 a 1,530 U/ml.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do estudo da comunidade fúngica de *M. mirabilis* em área de mata atlântica sugerem que esta planta possui relevante diversidade de fungos endofíticos.

O bioma Mata Atlântica possui alta riqueza de fungos endofíticos o que pode estar atribuído as condições climáticas do local, contribuindo também para uma boa colonização endofítica.

O gênero *Xylaria* foi o mais frequente no estudo e parece ter relação ecológica com o ambiente e a planta estudados, além disso um representante deste gênero foi dos melhores produtores de L-asparaginase, reforçando o papel dos endófitos como produtores de metabólitos.

O estudo de fungos endofíticos contribui para melhor entendimento nas relações existentes entre fungos e plantas e aumentam o conhecimento e a diversidade conhecida dos endófitos, além do registro de novos táxons.

Penicillium alagoense foi descrito como espécie nova para a ciência aumentando o número de espécies conhecidas no Reino Fungi.

Biomassas como a Mata Atlântica são áreas propícias para a descoberta de fungos com potenciais para produção de moléculas bioativas, como a enzima L-asparaginase tendo o gênero *Diaporthe* destaque na produção da enzima neste estudo. Estes fungos são promissores para processos de otimização enzimática para o uso industrial.

REFERÊNCIAS

- ABREU, Lucas M. et al. Chemical and molecular characterization of Phomopsis and Cytospora-like endophytes from different host plants in Brazil. **Fungal Biology**, v. 116, n. 2, p. 249-260, 2012.
- ALBRECHTSEN, Benedicte R. et al. Endophytic fungi in European aspen (*Populus tremula*) leaves—diversity, detection, and a suggested correlation with herbivory resistance. **Fungal Diversity**, v. 41, n. 1, p. 17-28, 2010.
- ALVES, Maria Helena et al. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 325-330, 2002.
- ALY, Amal H. et al. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal diversity**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 2010.
- AMENA, S. et al. Production, purification and characterization of L-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. **Brazilian journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 173-178, 2010.
- ARAÚJO, Welington L. et al. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.
- ARNOLD, A. Elizabeth et al. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. **Mycologia**, v. 99, n. 2, p. 185-206, 2007.
- ARNOLD, A. Elizabeth; MAYNARD, Zuleyka; GILBERT, Gregory S. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1502-1507, 2001.
- ASSELIN, Barbara L. et al. Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. **Journal of Clinical Oncology**, v. 11, n. 9, p. 1780-1786, 1993.
- AVRAMIS, Vassilios I. et al. A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. **Blood**, v. 99, n. 6, p. 1986-1994, 2002.
- AZEVEDO, João Lúcio et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 15-16, 2000.
- AZEVEDO, João Lúcio. Microrganismos endofíticos. **Ecologia microbiana**, p. 117-137, 1998.
- AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi

isolated from tropical plants. **Fungi: multifaceted microbes**, v. 1, p. 189-207, 2007.

BACON, Charles W.; WHITE, J. F. Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. **Microbial endophytes**, p. 237-261, 2000.

BAE, H. et al. The beneficial endophyte, *Trichoderma hamatum*, delays the onset of drought stress in *Theobroma cacao*. **Biological Control**, v. 46, p. 24-35, 2008.

BALAKRISHNAN, Kesavapillai; NAIR, Aiswarya; KUMAR, Rahul. Screening of microbial isolates for the fermentative production of L-asparaginase in submerged fermentation. **Research and Review Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 2, p. 95-100, 2013.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. 218pp, Macmillan Publ. Co., New York, 1987.

BASHA, N. Saleem et al. Production of extracellular anti-leukaemic enzyme lasparaginase from marine actinomycetes by solidstate and submerged fermentation: Purification and characterisation. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 4, 2009.

BAUCOM, Deana L. et al. Two new species of *Undifilum*, fungal endophytes of *Astragalus* (locoweeds) in the United States. **Botany**, v. 90, n. 9, p. 866-875, 2012.

BAUMGRATZ, José Fernando A.; TAVARES, Rafael dos Anjos M. Notas nomenclaturais em *Beruria* (Melastomataceae-Merianieae). **Rodriguésia**, v. 61, n. 1, p. 147-151, 2010.

BENSCH, Konstanze et al. The genus *cladosporium*. **Studies in mycology**, v. 72, p. 1-401, 2012.

BERBEE, M. L.; PIRSEYEDI, Mona; HUBBARD, S. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. **Mycologia**, v. 91, n. 6, p. 964-977, 1999.

BEZERRA, Jadson DP et al. *Bezerromycetales* and *Wiesneriomycetales* ord. nov.(class *Dothideomycetes*), with two novel genera to accommodate endophytic fungi from Brazilian cactus. **Mycological Progress**, v. 16, n. 4, p. 297-309, 2017.

BEZERRA, Jadson Diogo Pereira et al. Mycological diversity description I. **Acta Botanica Brasilica**, v. 32, n. 4, p. 656-666, 2018.

BEZERRA, Jadson DP et al. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 49-57, 2015.

BEZERRA, J. D. P. et al. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill.(Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 1989-1995, 2012.

BONFIM, Joice Andrade et al. Dark septate endophytic fungi of native plants along an altitudinal gradient in the Brazilian Atlantic forest. **Fungal Ecology**, v. 20, p. 202-210, 2016.

BOUARAB, Kamal et al. Sulfated oligosaccharides mediate the interaction between a marine red alga and its green algal pathogenic endophyte. **The Plant Cell**, v. 11, n. 9, p. 1635-1650, 1999.

BRANDON, Katrina et al. Conservação brasileira: desafios e oportunidades. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 7-13, 2005.

BRAZ, Vívian S.; CAVALCANTI, Roberto B. A representatividade de áreas protegidas do Distrito Federal na conservação da avifauna do Cerrado. **Ararajuba**, v. 9, n. 1, p. 61-69, 2001.

BROOME, J. D. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects: I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. **The Journal of experimental medicine**, v. 118, n. 1, p. 99, 1963.

BRUNTON, Laurence L.; LAZO, John S.; PARKER, Keith L. Goodman & Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill Suteramericana do Brasil, 2006.

BULLINGTON, Lorinda S.; LARKIN, Beau G. Using direct amplification and next-generation sequencing technology to explore foliar endophyte communities in experimentally inoculated western white pines. **Fungal Ecology**, v. 17, p. 170-178, 2015.

BUSBY, Posy E.; RIDOUT, Mary; NEWCOMBE, George. Fungal endophytes: modifiers of plant disease. **Plant molecular biology**, v. 90, n. 6, p. 645-655, 2016.

CÂMARA, Ibsen de Gusmão. Breve história da conservação da Mata Atlântica. **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**, p. 31-42, 2005.

CANNON, Paul F.; SIMMONS, Coralie M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, v. 94, n. 2, p. 210-220, 2002.

CARBONE, Ignazio; KOHN, Linda M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553-556, 1999.

CARROLL, F. E.; MULLER, E.; SUTTON, B. C. Preliminary studies on the incidence of needle endophytes in some European conifers. **Sydowia**, v. 29, n. 87, p. 103, 1977.

CARVALHO, CR de et al. Antifungal activities of cytochalasins produced by *Diaporthe miriciae*, an endophytic fungus associated with tropical medicinal plants. **Canadian journal of microbiology**, v. 64, n. 11, p. 835-843, 2018.

CHANDRA, Sheela. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead

molecules. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 47-59, 2012.

CHEN, Juan et al. Diversity and taxonomy of endophytic xylariaceous fungi from medicinal plants of Dendrobium (Orchidaceae). **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e58268, 2013.

SCHOCH, Conrad L. et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

CHEN, Ling et al. Endophytic fungi with antitumor activities: Their occurrence and anticancer compounds. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 3, p. 454-473, 2016.

CHOW, Yiing Yng; TING, Adeline Su Yien. Influence of glucose and L-asparagine concentrations on L-asparaginase production by endophytic fungi. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2020, p. 186-189, 2020.

CHOW, YiingYng; TING, Adeline SY. Endophytic L-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. **Journal of advanced research**, v. 6, n. 6, p. 869-876, 2015.

CLAUSING, G.; RENNER, Susanne S. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 3, p. 486-498, 2001.

CLAY, Keith; HARDY, Tad N.; HAMMOND, Abner M. Fungal endophytes of grasses and their effects on an insect herbivore. **Oecologia**, v. 66, n. 1, p. 1-5, 1985.

CLOBERT, Jean et al. (Ed.). **Dispersal ecology and evolution**. Oxford University Press, 2012.

CORRÊA, André Luis; SCUDELLER, Veridiana Vizoni; GOLDENBERG, Renato. Melastomataceae in the Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Tupé, Amazonas, Brazil. **Phytotaxa**, v. 323, n. 2, p. 101-127, 2017.

COLLINGE, David B. et al. Searching for novel fungal biological control agents for plant disease control among endophytes. **Endophytes for a Growing World**, p. 25-51, 2019.

COMPANT, Stéphane et al. Editorial special issue: soil, plants and endophytes. 2016.

CORREIA, Ana ML et al. Fungal endophyte communities in Begonia species from the Brazilian Atlantic rainforest. **Current microbiology**, v. 75, n. 4, p. 441-449, 2018.

CORTIJO-CASCAJARES, S.; JIMÉNEZ-CEREZO, M. J.; DE TEJADA, A. Herreros. Revisión de las reacciones de hipersensibilidad a antineoplásicos. **Farmacia Hospitalaria**, v. 36, n. 3, p. 148-158, 2012.

COSTA-LOTUFO, Leticia V. et al. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n.

1, p. 47-58, 2010.

CROUS, P. W. et al. Delimiting Cladosporium from morphologically similar genera. **Studies in Mycology**, v. 58, p. 33-56, 2007.

CROUS, P. W. et al. Fungal Planet description sheets: 107–127. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 28, p. 138, 2012.

CROUS, Pedro Willem et al. Fungal Planet description sheets: 716–784. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 40, p. 240, 2018.

CROUS, Pedro W. et al. Fungal Planet description sheets: 868–950. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 42, p. 291, 2019.

DA SILVA, Erica Benjamim et al. Screening of filamentous fungi from Brazilian rainforests for enzyme production. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 5, p. 332-342, 2015.

DANGE, V. U.; PESHWE, S. A. Screening and characterization of actinomycetes for production of anti-leukemic L-asparaginase. **Indian Journal of Applied Research**, v. 3, p. 543-545, 2013.

DANGE, Vaishali; PESHWE, Swati. Purification and biochemical characterization of L-asparaginase from *Aspergillus niger* and evaluation of its antineoplastic activity. **Int J Sci Res**, v. 4, n. 2, p. 564-569, 2015.

DAVIS, E. Christine et al. Endophytic Xylaria (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms: phylogenetics, distribution, and symbiosis. **American Journal of Botany**, v. 90, n. 11, p. 1661-1667, 2003.

DAVIS, E. Christine et al. Endophytic Xylaria (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms: phylogenetics, distribution, and symbiosis. **American Journal of Botany**, v. 90, n. 11, p. 1661-1667, 2003.

DE BONT, J. M. et al. Significant difference in outcome for adolescents with acute lymphoblastic leukemia treated on pediatric vs adult protocols in the Netherlands. **Leukemia**, v. 18, n. 12, p. 2032-2035, 2004.

DE SIQUEIRA, Virginia Medeiros et al. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis**, v. 53, n. 2, p. 89-95, 2011.

DEVI, SARITA; AZMI, WAMIK. One step purification of glutaminase free l-asparaginase from *Erwinia carotovora* with anti-cancerous activity. **Int. J. Life Sci. Pharm. Res.**, v. 2, p. 56-61, 2012.

DISSANAYAKE, A. J. et al. The current status of species in Diaporthe. **Mycosphere**, v. 8, n. 5, p. 1106-1156, 2017.

DOMKA, Agnieszka et al. *Mucor* sp.—An endophyte of Brassicaceae capable of

surviving in toxic metal-rich sites. **Journal of basic microbiology**, v. 59, n. 1, p. 24-37, 2019.

DOMSCH, Klaus Heinz et al. **Compendium of soil fungi. Volume 1**. Academic Press (London) Ltd., 1980.

DOS SANTOS, Irailton Prazeres et al. Endophytic mycobiota from leaves of *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae): The relationship between seasonal change in Atlantic Coastal Forest and tropical dry forest (Caatinga), Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 18, p. 1227-1235, 2015.

DUDEJA, Surjit Singh; GIRI, Rupa. Beneficial properties, colonization, establishment and molecular diversity of endophytic bacteria in legumes and non legumes. **African journal of microbiology research**, v. 8, n. 15, p. 1562-1572, 2014.

DUVAL, Michel et al. Comparison of *Escherichia coli*–asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer—Children's Leukemia Group phase 3 trial. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 99, n. 8, p. 2734-2739, 2002.

EATON, Carla J.; COX, Murray P.; SCOTT, Barry. What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism?. **Plant Science**, v. 180, n. 2, p. 190-195, 2011.

EL-BESSOUMY, Ashraf A. et al. Production, isolation, and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 4, p. 387-393, 2004.

ELLIS, Martin Beazor et al. Dematiaceous hyphomycetes. **Dematiaceous hyphomycetes.**, 1971.

ELLIS, Martin Beazor. **More dematiaceous hyphomycetes**. Commonwealth Mycological Institute, 1976.

EZE, P. M. et al. Antimicrobial activity of metabolites of an endophytic fungus isolated from the leaves of *Citrus jambhiri* (Rutaceae). **Trop J Nat Prod Res**, v. 2, n. 3, p. 145-149, 2018.

FENCHEL, T. O. M.; FINLAY, Bland J. The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. **Bioscience**, v. 54, n. 8, p. 777-784, 2004.

FERNANDEZ, Christian A. et al. High-throughput asparaginase activity assay in serum of children with leukemia. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 6, n. 7, p. 478, 2013.

FREIRE, K. T. L. S. et al. Fungos endofíticos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.(Cactaceae) sadia e infestada por *Dactylopius opuntiae* (Cockerell, 1896)(Hemiptera: Dactylopiidae). **Gaia scientia**, v. 9, n. 2, p. 104-11, 2015.

FRÖHLICH, Jane; HYDE, Kevin D. Biodiversity of palm fungi in the tropics: are global fungal diversity estimates realistic?. **Biodiversity & Conservation**, v. 8, n. 7, p. 977-1004, 1999.

GALANTE, Tera E.; HORTON, Thomas R.; SWANEY, Dennis P. 95% of basidiospores fall within 1 m of the cap: a field-and modeling-based study. **Mycologia**, v. 103, n. 6, p. 1175-1183, 2011.

GHERBAWY, Y. A.; ELHARIRY, H. M. Endophytic fungi associated with high-altitude Juniperus trees and their antimicrobial activities. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 150, n. 1, p. 131-140, 2016.

GLASS, N. Louise; DONALDSON, Gary C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995.

GLAZEBROOK, Jane. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 43, p. 205-227, 2005.

GONZÁLEZ-MENÉNDEZ, Victor et al. Fungal endophytes from arid areas of Andalusia: high potential sources for antifungal and antitumoral agents. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

GRAHAM, Michael L. Pegaspargase: a review of clinical studies. **Advanced drug delivery reviews**, v. 55, n. 10, p. 1293-1302, 2003.

GREAVES, Mel F.; WIEMELS, Joe. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 9, p. 639-649, 2003.

GRÜNIG, Christoph R. et al. Evidence for subdivision of the root-endophyte Phialocephala fortinii into cryptic species and recombination within species. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 7, p. 676-687, 2004.

GUARNACCIA, V. et al. First report of Phyllosticta citricarpa and description of two new species, P. paracapitalensis and P. paracitricarpa, from citrus in Europe. **Studies in mycology**, v. 87, p. 161-185, 2017.

GUILLEME, C. Moscardó et al. Actualización del tratamiento con L-asparaginasa en Pediatría. In: **Anales de Pediatría**. Elsevier Doyma, 2013. p. 329. e1-329. e11.

GUNDEL, Pedro E. et al. Mutualism effectiveness and vertical transmission of symbiotic fungal endophytes in response to host genetic background. **Evolutionary Applications**, v. 5, n. 8, p. 838-849, 2012.

GUO, Liang Dong; HYDE, Kevin D.; LIEW, Edward CY. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of Livistona chinensis based on rDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2001.

BASKAR, Gurunathan; SAHADEVAN, Renganathan. Optimization of culture conditions and bench-scale production of LAsparaginase by submerged fermentation of

Aspergillus terreus MTCC 1782. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 923-929, 2012.

HANLIN, Richard T. et al. **Illustrated genera of Ascomycetes**. Aps Press, 1990.

HANSON, China A. et al. Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 7, p. 497-506, 2012.

HARDER, Christoffer B. et al. A three-gene phylogeny of the *Mycena pura* complex reveals 11 phylogenetic species and shows ITS to be unreliable for species identification. **Fungal biology**, v. 117, n. 11-12, p. 764-775, 2013.

HARDOIM, Pablo R. et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

HASAN, NORAISHAH BINTI. Diversity and Antifungal activity of endophytic fungi associated with *Melastoma malabathricum* L. **Journal of Applied Biological Sciences**, v. 13, n. 3, p. 154-159, 2019.

HAWKSWORTH, David L.; ROSSMAN, Amy Y. Where are all the undescribed fungi?. **Phytopathology**, v. 87, n. 9, p. 888-891, 1997.

HAWKSWORTH, David L.; LÜCKING, Robert. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **The fungal kingdom**, p. 79-95, 2017.

HEMTASIN, Chulida et al. Cytotoxic pentacyclic and tetracyclic aromatic sesquiterpenes from *Phomopsis archeri*. **Journal of natural products**, v. 74, n. 4, p. 609-613, 2011.

HONG, Seung-Beom et al. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 477-486, 2006.

HOSAMANI, R.; KALIWAL, B. B. L-asparaginase an anti-tumor agent production by *Fusarium equiseti* using solid state fermentation. **Int J Drug Discov**, v. 3, n. 2, p. 88-99, 2011.

HSIEH, Huei-Mei; JU, Yu-Ming; ROGERS, Jack D. Molecular phylogeny of *Hypoxyton* and closely related genera. **Mycologia**, v. 97, n. 4, p. 844-865, 2005.

HSIEH, Huei-Mei et al. Phylogenetic status of *Xylaria* subgenus *Pseudoxylaria* among taxa of the subfamily *Xylarioideae* (*Xylariaceae*) and phylogeny of the taxa involved in the subfamily. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, n. 3, p. 957-969, 2010.

HUANG, Qian et al. Diversity and biotransformative potential of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Kadsura angustifolia*. **Research in microbiology**, v. 166, n. 1, p. 45-55, 2015.

HUANG, W. Y. et al. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. **Fungal diversity**, 2008.

HUGHES, Jennifer B. et al. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 2, 2006.

HYDE, K. D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Divers**, v. 33, n. 163, p. e173, 2008.

JAIN, Richa et al. L-asparaginase: A promising enzyme for treatment of acute lymphoblastic leukemia. **People's J Sci Res**, v. 5, n. 1, p. 29-35, 2012.

JIN, Hui et al. Diversity and dynamics of fungal endophytes in leaves, stems and roots of *Stellera chamaejasme* L. in northwestern China. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 6, p. 949-963, 2013.

JONES, EB Gareth; STANLEY, Susan J.; PINRUAN, Umpava. Marine endophyte sources of new chemical natural products: a review. **Botanica marina**, v. 51, n. 3, p. 163-170, 2008.

KAVITHA, Alapati; VIJAYALAKSHMI, Muvva. A study on L-asparaginase of *Nocardia levis* MK-VL_113. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

KAWEDIA, Jitesh D.; RYTTING, Michael E. Asparaginase in acute lymphoblastic leukemia. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 14, p. S14-S17, 2014.

KHAN, Abdul Latif et al. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. **BMC microbiology**, v. 12, n. 1, p. 3, 2012.

KHAN, Nasima et al. Endophytic *Fusarium solani*: A rich source of cytotoxic and antimicrobial naphthaquinone and aza-anthraquinone derivatives. **Toxicology reports**, v. 5, p. 970-976, 2018.

KIM, Jin-Hee et al. Two Endophytic Diaporthe Species Isolated from the Leaves of *Astragalus membranaceus* in Korea. **Mycobiology**, v. 45, n. 4, p. 430-433, 2017.

KIRK, Paul M. et al. Dictionary of the fungi 10th edition. **CAB International, Wallingford, UK**, 2008.

KOGEL, Karl-Heinz; FRANKEN, Philipp; HÜCKELHOVEN, Ralph. Endophyte or parasite—what decides?. **Current opinion in plant biology**, v. 9, n. 4, p. 358-363, 2006.

KOIDE, Roger T.; RICKS, Kevin D.; DAVIS, Emily R. Climate and dispersal influence the structure of leaf fungal endophyte communities of *Quercus gambelii* in the eastern Great Basin, USA. **Fungal Ecology**, v. 30, p. 19-28, 2017.

KORNBRUST, Beate A. et al. Asparaginase—an enzyme for acrylamide reduction in food products. **Enzymes in food technology**, v. 2, p. 59-87, 2010.

KRINGS, Michael et al. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. **New Phytologist**, v. 174, n. 3, p. 648-

657, 2007.

KRISHNAPURA, Prajna Rao; BELUR, Prasanna D. Partial purification and characterization of L-asparaginase from an endophytic *Talaromyces pinophilus* isolated from the rhizomes of *Curcuma amada*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 124, p. 83-91, 2016.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; TAMURA, Koichiro. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

KUMARAN, Rangarajulu Senthil; HUR, Byung-Ki. Screening of species of the endophytic fungus *Phomopsis* for the production of the anticancer drug taxol. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 54, n. 1, p. 21-30, 2009.

KURIAKOSE, Gini C. et al. Extract of *Penicillium sclerotiorum* an endophytic fungus isolated from *Cassia fistula* L. induces cell cycle arrest leading to apoptosis through mitochondrial membrane depolarization in human cervical cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 1062-1071, 2018.

KURTZBERG, Joanne et al. Polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase versus native L-asparaginase in combination with standard agents for children with acute lymphoblastic leukemia in second bone marrow relapse: a Children's Oncology Group Study (POG 8866). **Journal of pediatric hematology/oncology**, v. 33, n. 8, p. 610, 2011.

KUSARI, Souvik; SPITELLER, Michael. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes?. **Natural product reports**, v. 28, n. 7, p. 1203-1207, 2011.

KUSARI, Parijat et al. Endophytic fungi harbored in *Cannabis sativa* L.: diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens. **Fungal diversity**, v. 60, n. 1, p. 137-151, 2013.

LAHRMANN, Urs et al. Host-related metabolic cues affect colonization strategies of a root endophyte. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 34, p. 13965-13970, 2013.

LATZ, Meike AC et al. Endophytic fungi as biocontrol agents: elucidating mechanisms in disease suppression. **Plant Ecology & Diversity**, v. 11, n. 5-6, p. 555-567, 2018.

LI, Shou-Jie et al. Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 156, p. 316-343, 2018.

LIMA, J. S. et al. Genetic diversity of *Colletotrichum* spp. an endophytic fungi in a medicinal plant, Brazilian pepper tree. **ISRN microbiology**, v. 2012, 2012.

LIMA, U. A. et al. Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos. 2. reimpr. **São Paulo: E. Blücher**, v. 3, 2007.

LIU, Yajuan J.; WHELEN, Sally; HALL, Benjamin D. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. **Molecular biology and evolution**, v. 16, n. 12, p. 1799-1808, 1999.

LOPES, André Moreni et al. Therapeutic l-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 82-99, 2017.

LOPES, André Moreni et al. Therapeutic l-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 82-99, 2017.

LOUREIRO, Cláudio Battiston. **Purificação, conjugação e avaliação in vitro da atividade antineoplásica da L-asparaginase produzida por Aspergillus terreus (cepa PC-1.7. A)**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MAHESHWARI, Ramesh. What is an endophytic fungus?. **Current science**, v. 90, n. 10, p. 1309-1309, 2006.

MALHADAS, Cynthia et al. Antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree leaves. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 46, 2017.

MATHYS, Janick et al. Genome-wide characterization of ISR induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma hamatum* T382 against *Botrytis cinerea* infection. **Frontiers in plant science**, v. 3, p. 108, 2012.

MAUSSE-SITOE, Silvia ND et al. Endophytic Cryphonectriaceae on native Myrtales: Possible origin of *Chrysosporium* canker on plantation-grown *Eucalyptus*. **Fungal biology**, v. 120, n. 6-7, p. 827-835, 2016.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. **Micologia: avanços no conhecimento. Sociedade Brasileira de Micologia, Recife, Brasil**, p. 129-140, 2007.

MISHRA, Vineet Kumar et al. Distribution and antimicrobial potential of endophytic fungi associated with ethnomedicinal plant *Melastoma malabathricum* L. **Journal of environmental biology**, v. 37, n. 2, p. 229, 2016.

MITTERMEIER, R. A. et al. Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions. **Mexico City**, 2004.

MOHAN KUMAR, N. S.; MANONMANI, H. K. Survey on acrylamide in some of the food samples in and around Mysore city: India. **Asian J Microb Biotechnol Environ Sci**, v. 14, n. 1, p. 149-155, 2012.

MORTON, Francis John et al. The genera *Scopulariopsis* Bainier, *Microascus* Zukal, and *Doratomyces* Corda. **Mycological papers**, v. 86, 1963.

MÜLLER, H. J.; BOOS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 28, n. 2, p. 97-113, 1998.

MUSSI-DIAS, V. et al. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, p. 261-266, 2012.

NAGARAJAN, Saisubramanian. New tools for exploring “old friends—microbial lipases”. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 168, n. 5, p. 1163-1196, 2012.
NARTA, Umesh K.; KANWAR, Shamsher S.; AZMI, Wamik. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 61, n. 3, p. 208-221, 2007.

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.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger principles of Biochemistry. Macmillan worth Publishers. 2005.

NEWSHAM, Kevin K. A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. **New Phytologist**, v. 190, n. 3, p. 783-793, 2011.

NORILER, Sandriele A. et al. Bioprospecting and structure of fungal endophyte communities found in the Brazilian biomes, Pantanal, and Cerrado. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1526, 2018.

O'DONNELL, Kerry; CIGELNIK, Elizabeth. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 7, n. 1, p. 103-116, 1997.

OWEN, Noel L.; HUNDLEY, Nicholas. Endophytes—the chemical synthesizers inside plants. **Science progress**, v. 87, n. 2, p. 79-99, 2004.

OWNLEY, Bonnie H.; GWINN, Kimberly D.; VEGA, Fernando E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. **BioControl**, v. 55, n. 1, p. 113-128, 2010.

PÁDUA, Ana Patrícia Sousa Lopes de et al. Fungal endophyte diversity in the leaves of the medicinal plant *Myracrodruon urundeuva* in a Brazilian dry tropical forest and their capacity to produce L-asparaginase. **Acta Botanica Brasilica**, v. 33, n. 1, p. 39-49, 2019.

PARTIDA-MARTINEZ, Laila P. Pamela; HEIL, Martin. The microbe-free plant: fact or artifact?. **Frontiers in plant science**, v. 2, p. 100, 2011.

PAŽOUTOVÁ, Sylvie et al. Diversity of xylariaceous symbionts in *Xiphydria* woodwasps: role of vector and a host tree. **fungal ecology**, v. 3, n. 4, p. 392-401, 2010.

PEAY, Kabir G. et al. Measuring ectomycorrhizal fungal dispersal: macroecological patterns driven by microscopic propagules. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 16, p. 4122-4136, 2012.

PEDRESCHI, Franco; KAACK, Karl; GRANBY, Kit. The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. **Food chemistry**, v. 109, n. 2, p. 386-392, 2008.

PEIXOTO NETO, PA de S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, WL de. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-77, 2002.

PESSOA, Michael de Souza et al. Reproductive phenology of *Miconia mirabilis* (Melastomataceae) within three distinct physiognomies of Atlantic Forest, Bahia, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 12, n. 2, p. 49-56, 2012.

PETERS, Sabine et al. Interactions in dual cultures of endophytic fungi with host and nonhost plant calli. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 360-367, 1998.

PETRINI, Orlando. Fungal endophytes of tree leaves. In: **Microbial ecology of leaves**. Springer, New York, NY, 1991. p. 179-197.

PETRINI, O. Xylariaceous endophytes: an exercise in biodiversity. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, p. 531-539, 1995.

PHILLIPS, Alan JL et al. (Ed.). **Plant pathogenic and endophytic Botryosphaeriales known from culture**. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2013.

PHOTITA, W. et al. Fungi on *Musa acuminata* in Hong Kong. **Fungal Diversity**, 2001.

TONG, Wing H. et al. Should we use a desensitization protocol in acute lymphoblastic leukemia patients with silent inactivation of PEGasparaginase?. **Haematologica**, v. 99, n. 1, p. 1-32, 2014.

PIZA, Ana Candida Martins Toledo; HOKKA, Carlos Osamu; DE SOUSA, Cristina Paiva. Endophytic actinomycetes from *Miconia albicans* (Sw.) triana (Melastomataceae) and evaluation of its antimicrobial activity. **Journal of Scientific Research and Reports**, p. 281-291, 2015.

POSADA, David; CRANDALL, Keith A.. . Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.

PUI, Ching-Hon; EVANS, William E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 2, p. 166-178, 2006.

QAWASMEH, Abdelqader et al. Influence of fungal endophyte infection on phenolic content and antioxidant activity in grasses: interaction between *Lolium perenne* and different strains of *Neotyphodium lolii*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 13, p. 3381-3388, 2012.

QUINTANILLA-FLORES, Dania Lizet et al. Acute pancreatitis and diabetic ketoacidosis following L-asparaginase/prednisone therapy in acute lymphoblastic leukemia. **Case reports in oncological medicine**, v. 2014, 2014.

RAI, Mahendra et al. Fungal growth promotor endophytes: a pragmatic approach towards sustainable food and agriculture. **Symbiosis**, v. 62, n. 2, p. 63-79, 2014.

REID, A.; GREENE, S. E. How microbes can help feed the world. **Issues** 105: 31. 2013.

REINEHR, Christian Oliveira et al. Production of lipases with *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus* through solid state fermentation. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 454-460, 2014.

RENNER, Susanne S. Bayesian analysis of combined chloroplast loci, using multiple calibrations, supports the recent arrival of Melastomataceae in Africa and Madagascar. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 9, p. 1427-1435, 2004.

RIZZARI, Carmelo et al. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Current opinion in oncology**, v. 25, p. S1-S9, 2013.

ROGERS, Jack D. Thoughts and musings on tropical Xylariaceae. **Mycological Research**, v. 104, n. 12, p. 1412-1420, 2000.

RONQUIST, Fredrik et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic biology**, v. 61, n. 3, p. 539-542, 2012.

SAISON, Julien et al. Hepatomegaly and fever at the time of neutrophil recovery revealing L-asparaginase toxicity in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **The American Journal of Case Reports**, v. 15, p. 13, 2014.

SANTOS, MG da S. et al. Screening of endophytic fungi from cactus of the Brazilian tropical dry forest according to their L-asparaginase activity. **Sydowia**, v. 67, p. 147-156, 2015.

SANTOYO, Gustavo et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological research**, v. 183, p. 92-99, 2016.

SAPKOTA, Rumakanta; JØRGENSEN, Lise N.; NICOLAISEN, Mogens. Spatiotemporal variation and networks in the mycobiome of the wheat canopy. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1357, 2017.

SARQUIS, Maria Inez de Moura et al. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 489-492, 2004.

SCHIRMBÖCK, M. et al. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4364-4370, 1994.

SCHOCH, Claudia et al. Patients with de novo acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients. **British journal of haematology**, v. 112, n. 1, p. 118-126, 2001.

SCHULZ, Barbara; BOYLE, Christine. The endophytic continuum. **Mycological research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SCHULZ, Barbara et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SEIXAS, Claudine DS; BARRETO, Robert W.; KILLGORE, Eloise. Fungal pathogens of *Miconia calvescens* (Melastomataceae) from Brazil, with reference to classical biological control. **Mycologia**, v. 99, n. 1, p. 99-111, 2007.

SHERAMETI, Irena et al. The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco and *Arabidopsis* roots through a homeodomain transcription factor that binds to a conserved motif in their promoters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 28, p. 26241-26247, 2005.

SHRIVASTAVA, Abhinav et al. Kinetic studies of L-asparaginase from *Penicillium digitatum*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, n. 6, p. 574-581, 2012.

SILVA, Geraldo H. et al. New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1463-1466, 2005.

SILVA, Leticia F. et al. *Penicillium* and *Talaromyces* endophytes from *Tillandsia catimbauensis*, a bromeliad endemic in the Brazilian tropical dry forest, and their potential for L-asparaginase production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 162, 2018.

SILVA-HUGHES, Alice F. et al. Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. **Microbiological research**, v. 175, p. 67-77, 2015.

SINGH, Ramesh K.; MALIK, Namrata; SINGH, Surendra. Improved nutrient use efficiency increases plant growth of rice with the use of IAA-overproducing strains of endophytic *Burkholderia cepacia* strain RRE25. **Microbial ecology**, v. 66, n. 2, p. 375-384, 2013.

SINGH, Dheeraj K. et al. Diversity of endophytic mycobiota of tropical tree *Tectona grandis* Linn. f.: Spatiotemporal and tissue type effects. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.

SIQUEIRA, Virginia Medeiros et al. Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis**, v. 53, n. 2, p. 89-95, 2011.

STIERLE, Andrea; STROBEL, Gary; STIERLE, Donald. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.

STONE, Jeffrey K. et al. Endophytic fungi. **Biodiversity of Fungi. Elsevier Academic Press, Burlington**, p. 241-270, 2004.

STRAUB, Daniel et al. The genome of the endophytic bacterium *H. frisingense* GSF30T identifies diverse strategies in the *Herbaspirillum* genus to interact with plants. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 168, 2013.

STROBEL, Gary. The emergence of endophytic microbes and their biological promise. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 57, 2018.

STROBEL, Gary. *Stegoderium kukenani* gen. et sp. nov., an endophytic taxol producing fungus from the Roraima and Kukenan tepuis of Venezuela. **Mycotaxon**, v. 78, p. 353-361, 2001.

STROBEL, Gary; DAISY, Bryn. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

STUDER, Anita; NUSBAUMER, Louis; SPICHIGER, Rodolphe. Biodiversidade da Reserva Biológica de Pedra Talhada Alagoas, Pernambuco-Brasil. **Boissiera: mémoires des Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève**, n. 68, p. 1-818, 2015.

SUN, X. et al. Community structure and preference of endophytic fungi of three woody plants in a mixed forest. **Fungal Ecology**, v. 5, n. 5, p. 624-632, 2012.

SUNG, Gi-Ho et al. A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 44, n. 3, p. 1204-1223, 2007.

SURYANARAYANAN, Trichur S. Endophyte research: going beyond isolation and metabolite documentation. **Fungal ecology**, v. 6, n. 6, p. 561-568, 2013.

SURYANARAYANAN, Trichur S.; WITTLINGER, Sally K.; FAETH, Stanley H. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. **Mycological Research**, v. 109, n. 5, p. 635-639, 2005.

SUTTON, Brian C. et al. **The coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata**. Commonwealth Mycological Institute., 1980.

TABARELLI, Marcelo et al. Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 695-700, 2005.

TADYCH, Mariusz et al. Endophytic and pathogenic fungi of developing cranberry ovaries from flower to mature fruit: diversity and succession. **Fungal Diversity**, v. 54, n. 1, p. 101-116, 2012.

PRASAD TALLURI, V. S. S. L. et al. L-asparaginase: An ultimate anti-neoplastic enzyme. **International Letters of Natural Sciences**, v. 10, 2014.

TANAKA, Aiko et al. Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus–perennial ryegrass mutualistic interaction. **The Plant Cell**, v. 18, n. 4, p. 1052-1066, 2006.

TANG, A. M. C. et al. A re-evaluation of the evolutionary relationships within the Xylariaceae based on ribosomal and protein-coding gene sequences. **Fungal Diversity**, v. 34, p. 127, 2009.

THAKUR, M.. et al. Isolation, Purification and Characterization of Fungal Extracellular L-Asparaginase from *Mucor Hiemalis*. *J Biocatal Biotransformation* 2: 2. **of**, v. 9, p. 12-14, 2013.

THEANTANA, Teerayut et al. Asparaginase production by endophytic fungi from Thai medicinal plants: cytotoxicity properties. **International Journal of Integrative Biology**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2009.

UDAYANGA, Dhanushka et al. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. **Fungal diversity**, v. 50, n. 1, p. 189, 2011.

UNTERSEHER, Martin; PETZOLD, Anne; SCHNITTLER, Martin. Xerotolerant foliar endophytic fungi of *Populus euphratica* from the Tarim River basin, Central China are conspecific to endophytic ITS phylotypes of *Populus tremula* from temperate Europe. **Fungal Diversity**, v. 54, n. 1, p. 133-142, 2012.

VAN DER SLUIS, Inge et al. Efficacy and safety of recombinant *E. coli*-asparaginase in infants (less than one year of age) with acute lymphoblastic leukemia. **haematologica**, 2013.

VAZ, Aline BM et al. Fungal endophyte β -diversity associated with Myrtaceae species in an Andean Patagonian forest (Argentina) and an Atlantic forest (Brazil). **Fungal Ecology**, v. 8, p. 28-36, 2014.

VERÍSSIMO, Adalberto et al. Biodiversity in the Brazilian Amazon: assessment and priority actions for conservation, sustainable use and benefit sharing. **Estação Liberdade**. 535p, 2004.

VIEIRA, Paula Danielle de Souza et al. Endophytic fungi associated with transgenic and non-transgenic cotton. **Mycology**, v. 2, n. 2, p. 91-97, 2011.

WENDT, Lucile et al. Resurrection and emendation of the Hypoxylaceae, recognised from a multigene phylogeny of the Xylariales. **Mycological Progress**, v. 17, n. 1-2, p. 115-154, 2018.

WHITE, Thomas J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

WU, Ying-Ying et al. An endophytic Fungi of *Ginkgo biloba* L. produces antimicrobial metabolites as potential inhibitors of FtsZ of *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapia**, v. 128, p. 265-271, 2018.

XIE, Jun et al. New antimicrobial compounds produced by endophytic *Penicillium janthinellum* isolated from *Panax notoginseng* as potential inhibitors of FtsZ. **Fitoterapia**, v. 131, p. 35-43, 2018.

YU, J. et al. Diversity and antifungal activity of endophytic fungi associated with

Camellia oleifera. Mycobiology 46: 85–91. 2018.

YUAN, Zhi-lin et al. Distinctive endophytic fungal assemblage in stems of wild rice (*Oryza granulata*) in China with special reference to two species of Muscodor (Xylariaceae). **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 15-23, 2011.

ZAKARIA, Latiffah; AZIZ, Wan Nuraini Wan. Molecular identification of endophytic fungi from banana leaves (*Musa* spp.). **Tropical life sciences research**, v. 29, n. 2, p. 201, 2018.

ZHANG, Tao; YAO, Yi-Feng. Endophytic fungal communities associated with vascular plants in the high arctic zone are highly diverse and host-plant specific. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0130051, 2015.

ZHOU, Jing et al. Phylogenetic diversity and antioxidant activities of culturable fungal endophytes associated with the mangrove species *Rhizophora stylosa* and *R. mucronata* in the South China Sea. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0197359, 2018.

APÊNDICE A – *Penicillium alagoense* L.O. Ferro, A.D. Cavalcanti, O.M.C. Magalhães, Souza-Motta e J.D.P. Bezerra, *sp. nov.* (Persoonia 42: 291– 473)

Persoonia 42, 2019: 291– 473
www.ingentaconnect.com/content/ohn/pimj

RESEARCH ARTICLE

ISSN (Online) 1878-9080
https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.42.11



Fungal Planet description sheets: 868–950

P.W. Crous^{1,2}, A.J. Carnegie³, M.J. Wingfield², R. Sharma⁴, G. Mughini⁵, M.E. Noordeloos⁶, A. Santini⁷, Y.S. Shouche⁴, J.D.P. Bezerra⁸, B. Dima⁹, V. Guarnaccia¹⁰, I. Imrefi⁹, Ž. Jurjević¹¹, D.G. Knapp⁹, G.M. Kovács⁹, D. Magistà¹², G. Perrone¹², T. Rämä¹³, Y.A. Rebriev¹⁴, R.G. Shivas¹⁵, S.M. Singh^{16,17}, C.M. Souza-Motta⁸, R. Thangavel¹⁸, N.N. Adhasure¹⁹, A.V. Alexandrova^{20,21}, A.C. Alfenas²², R.F. Alfenas²³, P. Alvarado²⁴, A.L. Alves⁸, D.A. Andrade²⁵, J.P. Andrade²⁶, R.N. Barbosa⁸, A. Barili²⁷, C.W. Barnes²⁷, I.G. Baseia²⁸, J.-M. Bellanger²⁹, C. Berlanas³⁰, A.E. Bessette³¹, A.R. Bessette³¹, A.Yu. Biketova³², F.S. Bomfim⁸, T.E. Brandrud³³, K. Bransgrove³⁴, A.C.Q. Brito⁶, J.F. Cano-Lira³⁵, T. Cantillo³⁶, A.D. Cavalcanti⁸, R. Cheewangkoon³⁷, R.S. Chikowski⁸, C. Conforto³⁸, T.R.L. Cordeiro⁸, J.D. Craine³⁹, R. Cruz⁸, U. Damm⁴⁰, R.J.V. de Oliveira⁴², J.T. de Souza⁴³, H.G. de Souza⁴⁴, J.D.W. Dearnailey¹⁵, R.A. Dimitrov⁴⁵, F. Dovana⁴⁶, A. Erhard¹¹, F. Esteve-Raventós⁴⁷, C.R. Félix²⁵, G. Ferisin⁴⁸, R.A. Fernandes⁴⁹, R.J. Ferreira⁸, L.O. Ferro⁸, C.N. Figueiredo⁴⁴, J.L. Frank⁵⁰, K.T.L.S. Freire⁸, D. García³⁵, J. Gené³⁵, A. Gęsiorowska⁵¹, T.B. Gibertoni⁸, R.A.G. Gondra⁵², D.E. Gouliamova⁵³, D. Gramaje³⁰, F. Guard⁵⁴, L.F.P. Gusmão³⁶, S. Haitook³⁷, Y. Hirooka⁵⁵, J. Houbraken¹, V. Hubka^{56,57}, A. Inamdar¹⁹, T. Iturriaga^{58,59}, I. Iturrieta-González³⁵, M. Jadan⁶⁰, N. Jiang⁶¹, A. Justo⁶², A.V. Kachalkin^{63,64}, V.I. Kapitonov⁶⁵, M. Karadelev⁶⁶, J. Karakehian⁶⁷, T. Kasuya⁶⁸, I. Kautmanová⁶⁹, J. Kruse¹⁶, I. Kušan⁶⁰, T.A. Kuznetsova⁷⁰, M.F. Landell²⁵, K.-H. Larsson⁷¹, H.B. Lee⁷², D.X. Lima⁸, C.R.S. Lira⁸, A.R. Machado⁸, H. Madrid⁷³, O.M.C. Magalhães⁸, H. Majerova⁷⁴, E.F. Malysheva⁷⁵, R.R. Mapperson¹⁵, P.A.S. Marbach⁴⁴, M.P. Martin⁷⁶, A. Martín-Sanz⁷⁷, N. Matočec⁶⁰, A.R. McTaggart⁷⁸, J.F. Mello⁸, R.F.R. Melo⁸, A. Mešić⁶⁰, S.J. Michereff⁷⁹, A.N. Miller⁶⁰, A. Minoshima⁵⁵, L. Molinero-Ruiz⁸⁰, O.V. Morozova⁷⁵, D. Mosch⁴, M. Nabe⁶¹, R. Naik¹⁶, K. Nara⁸², S.S. Nascimento⁸, R.P. Neves⁸, I. Olariaga³³, R.L. Oliveira⁴¹, T.G.L. Oliveira⁸, T. Ono⁸⁴, M.E. Ordoñez²⁷, A. de M. Ottoni⁸, L.M. Paiva⁸, F. Pancorbo⁸⁵, B. Pant⁹⁰, J. Pawłowska⁵¹, S.W. Peterson⁸⁶, D.B. Raudabaugh⁵⁸, E. Rodríguez-Andrade³⁵, E. Rubio⁸⁷, K. Rusevska⁶⁵, A.L.C.M.A. Santiago⁸, A.C.S. Santos⁸, C. Santos⁸⁸, N.A. Sazanova⁸⁹, S. Shah⁹⁰, J. Sharma⁹¹, B.D.B. Silva⁹², J.L. Siquier⁹³, M.S. Sonawane⁴, A.M. Stchigel¹³⁵, T. Svetasheva⁹⁴, N. Tamakeaw³⁷, M.T. Telleria⁷⁶, P.V. Tiago⁸, C.M. Tian⁶¹, Z. Tkáčec⁶⁰, M.A. Tomashevskaya⁶⁴, H.H. Truong⁵⁵, M.V. Vecherskii⁷⁰, C.M. Visagie^{2,95}, A. Vizzini⁴⁶, N. Yilmaz², I.V. Zmitrovich⁷⁵, E.A. Zvyagina⁶⁶, T. Boekhout^{1,97}, T. Kehlet⁹⁶, T. Læssøe⁹⁸, J.Z. Groenewald¹

Key words

ITS nrDNA barcodes
LSU
new taxa
systematics

Abstract Novel species of fungi described in this study include those from various countries as follows: **Australia**, *Chaetomella pseudocircinosa* and *Coniella pseudodiospyri* on *Eucalyptus microcorys* leaves, *Cladophialophora eucalypti*, *Teratosphaeria dunnii* and *Vermiculariopsis dunnii* on *Eucalyptus dunnii* leaves, *Cylindrium grande* and *Hypochocha eucalyptorum* on *Eucalyptus grandis* leaves, *Elsinoe salignae* on *Eucalyptus saligna* leaves, *Marasmius lebellae* on litter of regenerating subtropical rainforest, *Phialoseptomonium eucalypti* (incl. *Phialoseptomonium* gen. nov.) on *Eucalyptus grandis* × *camaldulensis* leaves, *Phlogicylindrium pavipawense* on *Eucalyptus tereticornis* leaves, *Phyllosticta longicauda* as an endophyte from healthy *Eustrephus latifolius* leaves, *Pseudosydowia eucalyptorum* on *Eucalyptus* sp. leaves, *Saitozyma wailum* on *Banksia aemula* leaves, *Teratosphaeria henryi* on *Corymbia henryi* leaves, **Brazil**, *Aspergillus bezerra*, *Backusella azygospore*, *Mariannaea terricola* and *Talaromyces pernambuccensis* from soil, *Calonectria matogrossensis* on *Eucalyptus urophylla* leaves, *Calvatia brasiliensis* on soil, *Carcinomyces nordestinensis* on *Bromelia antecantha* leaves, *Dendryphiella stromaticola* on small branches of an unidentified plant, *Nigrospora brasiliensis* on *Nopalea cochenillifera* leaves, *Penicillium alagoense* as a leaf endophyte on a *Miconia* sp., *Podosordaria nigrobrunnea* on dung, *Spegezzinia bromeliacearum* as a leaf endophyte on *Tillandsia catimbauensis*, *Xylobolus brasiliensis* on decaying wood, **Bulgaria**, *Kazachstania mopis* from the gut of the beetle *Molops piceus*, **Croatia**, *Mollisia endocristallina* from a fallen decorticated *Picea abies* tree trunk, **Ecuador**, *Hygrocybe rododaculata* on soil, **Hungary**, *Alfoldia vorosii* (incl. *Alfoldia* gen. nov.) from *Juniperus communis* roots, *Kiskunsagia ubrizsyi* (incl. *Kiskunsagia* gen. nov.) from *Fumana procumbens* roots, **India**, *Aureobasidium tremulum* as laboratory contaminant, *Leucosporidium himalayensis* and *Naganishia indica* from windblown dust on glaciers, **Italy**, *Neodevriesia cycadicola* on *Cycas* sp. leaves, *Pseudocercospora pseudomyrticola* on *Myrtus communis*

© 2019. Natura is Biodiversity Center & Westerdijk Fungal Biodiversity Institute

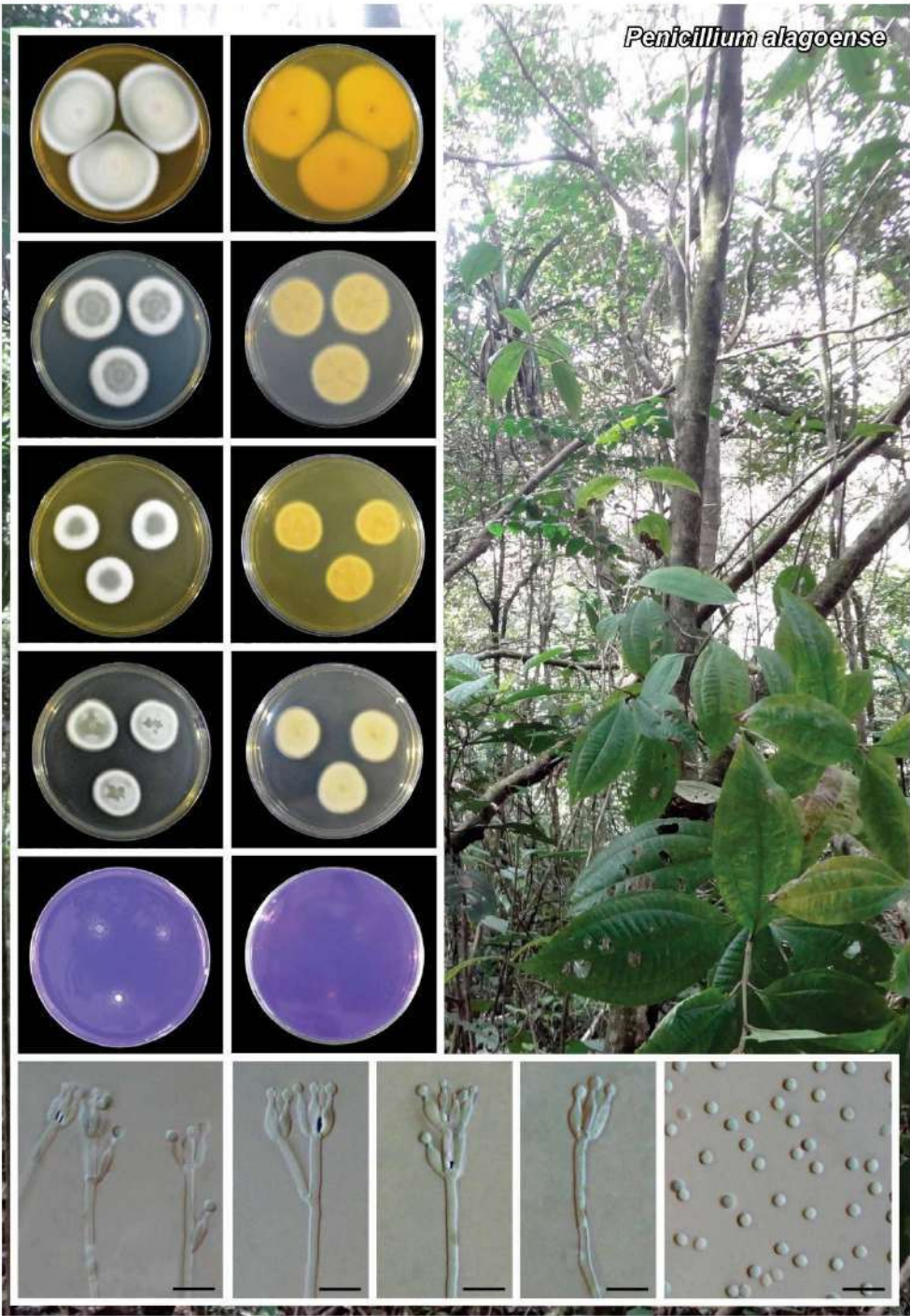
You are free to share – to copy, distribute and transmit the work, under the following conditions:

Attribution: You must attribute the work in the manner specified by the author or licensor (but not in any way that suggests that they endorse you or your use of the work).

Non-commercial: You may not use this work for commercial purposes.

No derivative works: You may not alter, transform, or build upon this work.

For any reuse or distribution, you must make clear to others the license terms of this work, which can be found at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/pt-br/>. Any of the above conditions can be waived if you get permission from the copyright holder. Nothing in this license impairs or restricts the author's moral rights.



Fungal Planet 939 – 19 July 2019

***Penicillium alagoense* L.O. Ferro, A.D. Cavalcanti, O.M.C. Magalhães, Souza-Motta & J.D.P. Bezerra, sp. nov.**

Etymology. The name refers to the Brazilian state, Alagoas, where this fungus was found.

Classification — Aspergillaceae, Eurotiales, Eurotiomycetes.

On malt extract agar (MEA), *conidiophores* varying in length, erect not ramified, 70–300 × 2–2.5 µm; *stipes* septate with wall echinulate and apice enlarged (4 µm); asymmetric *penicilli*, monoverticillate, occasionally with *branch*, biverticillate, lightly echinulate, spatulate, 10.5–15.5 × 2–2.5 µm; *phialides* ampulliform, 3–4(–5) phialides per metulae, 7.5–10 × 2–2.5 µm; *conidia* smooth to echinulate, globose, greenish, 2–3.5 µm.

Culture characteristics (25 °C, 7 d, darkness) — On Czapek Yeast extract Agar (CYA): colonies slightly raised, texture velvety, radially sulcate, slow sporulation, centrally purplish grey, hyaline mycelium with whitish margin, exudate and pigment absent; reverse cream. On MEA: colonies low, plane, texture velvety, light sporulation, greyish green to greenish glaucous, hyaline mycelium with whitish margin, exudate and pigment absent; reverse brownish to umber. On Yeast Extract Sucrose agar (YES): colonies slightly raised, texture velvety radially sulcate, slow sporulation, centrally purplish grey, hyaline mycelium with whitish margin, exudate and pigment absent; reverse cream to brownish. On oatmeal agar (OA): colonies low, plane, texture velvety, greenish olivaceous, hyaline mycelium with whitish margin, aerial mycelium centrally observed, exudate and pigment absent; reverse whitish. On Dichloran 18 % Glycerol agar (DG18): colonies low, plane, texture velvety, greyish to centrally greenish olivaceous, hyaline mycelium with whitish margin, exudate and pigment absent; reverse cream to yellowish. On *Creatine sucrose agar* (CREA): weak growth and very weak or no acid production. Colony diam. in mm, after 7 d, darkness — CYA: 15 °C 13–15, 25 °C 26–28, 30 °C 19, 37 °C no growth; MEA: 15 °C 18, 25 °C 35–43, 30 °C 31, 37 °C no growth; YES: 15 °C 13–14, 25 °C 19–21, 30 °C 18–19, 37 °C no growth; AO: 15 °C 13–14, 25 °C 32–37, 30 °C 35–38, 37 °C no growth; DG18: 15 °C 5, 25 °C 23–24, 30 °C 19–29, 37 °C no growth; CREA: 15 °C 8, 25 °C 5–7, 30 °C 3, 37 °C no growth.

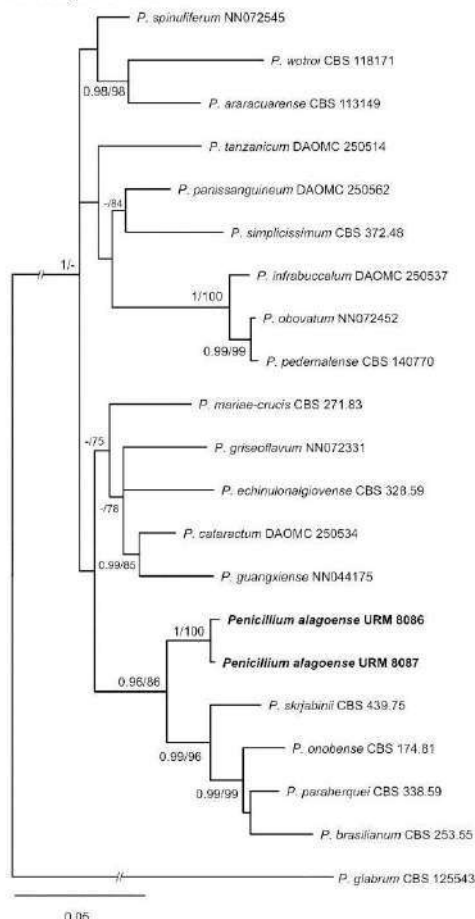
Typus. BRAZIL, Alagoas state, Quebrangulo, Pedra Talhada Biological Reserve, S09°15'26.8" W38°25'53.7", as endophyte from leaves of *Miconia* sp. (*Melastomataceae*), July 2018, L.O. Ferro (holotype URM 93058, culture ex-type URM 8086, ITS, *BenA*, *CaM* and *RPB2* sequences GenBank MK804503, MK802333, MK802336 and MK802338, MycoBank MB830760).

Additional materials examined. BRAZIL, Alagoas state, Quebrangulo, Pedra Talhada Biological Reserve, S09°14'47.0" W36°25'15.0", as endophyte from leaves of *Miconia* sp., July 2018, L.O. Ferro, URM 8087, ITS, *BenA*, *CaM* and *RPB2* sequences GenBank MK804502, MK802332, MK802335 and MK802337; Alagoas state, Quebrangulo, Pedra Talhada Biological Reserve, S09°14'47.0" W36°25'15.0", as endophyte from leaves of *Handroanthus albus* (*Bignoniaceae*), July 2018, A.D. Cavalcanti, B17B, *BenA* sequence GenBank MK802334.

Notes — *Penicillium alagoense* exhibits phylogenetic and morphological similarities to *P. skirjabinii*. *Penicillium alagoense* differs from *P. skirjabinii* by the numbers and size of phialides

Colour illustrations. Atlantic Forest area in Pedra Talhada Biological Reserve. Cultures on MEA, CYA, YES, DG18 and CREA after 7 d at 25 °C; *conidiophores*, *phialides*, *metulae* and *conidia*. Scale bars = 10 µm.

(6–8 per metulae, 7.7–10.5 × 2.3–3 µm), metulae (26.4–32 × 2.4–3 µm) and by the production of conidia that are ellipsoidal, globose or subglobose (3.5–5 × 1.8–2.4 µm) (Ramírez 1982). In addition, *P. alagoense* differs from *P. skirjabinii* by macroscopic characteristics presenting lower growth in the colonies and no growth at 37 °C.



Layanne O. Ferro, Anthony D. Cavalcanti, Olane M.C. Magalhães, Cristina M. Souza-Motta & Jádson D.P. Bezerra, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil; e-mail: layanne.ferro93@hotmail.com, anthonycavalcanti@yahoo.com.br, olimicomede@gmail.com, souzamotta@yahoo.com.br & jadsondp@gmail.com

ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DO ICMBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 62887-4	Data da Emissão: 09/05/2018 18:21
Dados do titular	
Nome: Layanne de Oliveira Ferro	CPF: 095.277.194-29

SISBIO

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas à autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, possessor ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena, III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1987 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
9	Esse documento não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; II) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; III) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; IV) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; V) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.

Taxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	ESPÉCIE	<i>Handroanthus impetiginosus</i> , <i>Miconia mirabilis</i>



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 63010-1	Data da Emissão: 21/05/2018 15:36	Data para Revalidação*: 20/06/2019
* De acordo com o art. 26 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Layanne de Oliveira Ferro	CPF: 095.277.194-29
Título do Projeto: Produção de L-asparaginase por fungos endofíticos de <i>Miconia mirabilis</i> e <i>Handroanthus impetiginosus</i> da Reserva Biológica de Pedra Talhada (Mata Atlântica)	
Nome da Instituição: UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	CNPJ: 24.134.488/0001-08

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de espécie vegetal	08/2018	12/2018
2	revisão de literatura	08/2018	12/2019
3	isolamento de fungos endofíticos	09/2018	01/2019
4	identificação dos isolados	02/2019	09/2019
5	Teste para produção da enzima L-asparaginase	05/2019	10/2019
6	Análises estatísticas e ecológicas	05/2019	10/2019
7	Deposito dos fungos na Micoteca URM	12/2019	02/2020
8	Defesa da dissertação	02/2020	03/2020

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador da área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição <i>in situ</i> .
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/ogen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Anthony Dias Cavalcanti	mestrando	063.534.334-76	6683160 SDS-PE	Brasileira
2	JADSON DIOGO PEREIRA BEZERRA	Co orientador	064.808.044-73	7083645 SDS-PE	Brasileira
3	CRISTINA MARIA DE SOUZA MOTTA	Orientadora	463.204.744-91	2890312 SSP-PE	Brasileira
4	OLIANE MARIA CORREIA MAGALHÃES	Orientadora	550.404.974-15	2893718 SDS-PE	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 55412112



Página 1/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 63010-1	Data da Emissão: 21/05/2018 15:36	Data para Revalidação*: 20/06/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Layanne de Oliveira Ferro	CPF: 095.277.194-29
Título do Projeto: Produção de L-asparaginase por fungos endofíticos de <i>Miconia mirabilis</i> e <i>Handroanthus impetiginosus</i> da Reserva Biológica de Pedra Talhada (Mata Atlântica)	
Nome da Instituição: UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	CNPJ: 24.134.488/0001-08

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		AL	RESERVA BIOLÓGICA DE PEDRA TALHADA	UC Federal
2		PE	RESERVA BIOLÓGICA DE PEDRA TALHADA	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de material botânico, fungico ou microbiológico	Fungi

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Fungos)	Outras amostras biológicas (Folhas de <i>Miconia mirabilis</i> e <i>Handroanthus impetiginosus</i>)
2	Método de captura/coleta (Fungos)	Coleta manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 55412112



Página 2/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 63010-1	Data da Emissão: 21/05/2018 15:36	Data para Revalidação*: 20/06/2019
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Layanne de Oliveira Ferro	CPF: 095.277.194-29
Título do Projeto: Produção de L-asparaginase por fungos endofíticos de <i>Miconia mirabilis</i> e <i>Handroanthus impertiginosus</i> da Reserva Biológica de Pedra Talhada (Mata Atlântica)	
Nome da Instituição : UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	CNPJ: 24.134.488/0001-08

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2014, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 55412112



Página 3/4



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 63010-1	Data da Emissão: 21/05/2018 15:36	Data para Revalidação*: 20/06/2019
* De acordo com o art. 26 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Layanne de Oliveira Ferro	CPF: 095.277.194-29
Título do Projeto: Produção de L-asparaginase por fungos endofíticos de <i>Miconia mirabilis</i> e <i>Handroanthus impertiginosus</i> da Reserva Biológica de Pedra Talhada (Mata Atlântica)	
Nome da Instituição: UFPE - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	CNPJ: 24.134.488/0001-08

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 55412112



Página 4/4