



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

ANTHONY DIAS CAVALCANTI

DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO IPÊ-AMARELO [*Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos] DA MATA ATLÂNTICA DO NORDESTE BRASILEIRO E PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE

RECIFE

2020

ANTHONY DIAS CAVALCANTI

DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO IPÊ-AMARELO [*Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos] DA MATA ATLÂNTICA DO NORDESTE BRASILEIRO 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: Fungos na Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Oliane Maria Correia Magalhães.

Corientadora: Prof^a Dr^a. Cristina Maria de Souza-Motta.

RECIFE

2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Cavalcanti, Anthony Dias

Diversidade de fungos endofíticos do Ipê-Amarelo [*Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos] da Mata Atlântica do Nordeste brasileiro e produção de L-asparaginase/ Anthony Dias Cavalcanti – 2020.

89 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Oliane Maria Correia Magalhães

Coorientadora: Cristina Maria de Souza-Motta

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

Inclui referências

1. Fungos 2. Biotecnologia 3. Enzimas I. Magalhães, Oliane Maria Correia (orient.) II. Souza-Mota, Cristina Maria de (coorient.) III. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-029

ANTHONY DIAS CAVALCANTI

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO IPÊ-AMARELO [*Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos] DA MATA ATLÂNTICA DO NORDESTE
BRASILEIRO 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: Fungos na Biotecnologia.

Aprovada em: 19 de fevereiro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Oliane Maria Correia Magalhães (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Jadson Diogo Pereira Bezerra - Examinador Externo
Universidade Federal de Goiás

Dr. Renan do Nascimento Barbosa - Examinador Externo
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo que tem feito em minha vida, por suas bênçãos sem fim e por me fortalecer diante dos obstáculos.

Aos meus pais Agamenon Cavalcanti, Cleonice Cavalcanti, José Lindoval e Sandra Cavalcanti pelo amor incondicional, pela imensa dedicação e por nunca medirem esforços em contribuir para a minha formação pessoal e profissional.

À minha esposa Amanda Cavalcanti, por me apoiar em todas as decisões, pelo companheirismo, por todo amor e carinho. Agradeço também por compartilhar comigo todos os momentos e por me incentivar a seguir minha carreira acadêmica.

Aos meus irmãos, José Lindoval Filho, Allyson Cavalcanti e Alan Cavalcanti que assim como meus pais, sempre estiveram ao meu lado me ajudando em tudo.

À Universidade Federal de Pernambuco em especial ao Departamento de Micologia e a Pós-graduação em Biologia de Fungos por todo apoio educacional.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Oliane Magalhães, por ser um exemplo de docente, por acreditar em meu potencial, pelos ensinamentos, pela amizade e por contribuir com a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Cristina Souza-Motta, pelo conhecimento transmitido em sala de aula, por me incentivar a pesquisar, pela confiança e por contribuir para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jadson Bezerra, por me ensinar tudo o que sei sobre fungos endofíticos, pela amizade e companheirismo. Pela cobrança, pelo zelo com os alunos que orienta e por todas suas contribuições nesta pesquisa.

Aos membros da banca examinadora Dr. Renan Barbosa, Dr. Jadson Bezerra, Dr. Rafael Oliveira e a Dr.^a Marília Maciel pelas contribuições para este trabalho.

Aos professores do Departamento de Micologia da UFPE, que tive o prazer de conhecer e conviver. Agradeço por todo conhecimento que foi compartilhado dentro e fora da sala de aula, que auxiliou minha formação acadêmica.

À turma de Mestrado e Doutorado em Biologia de Fungos 2020 por todos os momentos maravilhosos que compartilhamos nestes anos.

Ao Laboratório de Micologia Ambiental em especial ao Prof. Dr. Alexandre Machado e Prof.^a Dr.^a Laura Paiva por todo apoio, ensinamentos e por me permitirem fazer parte do grupo de pesquisa em Micologia Ambiental.

Aos meus colegas de Laboratório Amanda Cupertino, Arthur Vinicius, Elíude Oliveira, Juliana Mello e Tamara Caldas pelo companheirismo, pela amizade e por toda ajuda.

À minha amiga Layanne Ferro, “alagoense arretada” e companheira de pesquisa que me auxiliou em toda a pesquisa, por todo apoio e dedicação.

À minha amiga Thays Oliveira pela amizade, por toda ajuda na Biologia Molecular e pelas contribuições neste trabalho.

Às minhas colegas de Laboratório Ana Patrícia Pádua e Letícia Silva por todas as contribuições, pela amizade e por todo auxílio nos experimentos de L-asparaginase.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a execução do meu trabalho.

“Seja a mudança que você quer ver no mundo”.

Mahatma Gandhi

“Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor lembre-se: se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor com ele você conquistará o mundo”.

Albert Einstein

RESUMO

Os fungos endofíticos habitam seus hospedeiros sem lhes causar dano aparente, contribuindo com condições adequadas para estes hospedeiros sobreviverem em condições de estresses ambientais. No interior do hospedeiro esses fungos produzem e liberam metabólitos secundários, que podem contribuir com o aumento da resistência do vegetal a doenças, podem minimizar a predação da planta por insetos, além de aumentar a sua produtividade. O objetivo deste estudo foi analisar a diversidade de fungos da planta *Handroanthus chrysotrichus* (Bignoniaceae) em área de Mata Atlântica e avaliar seu potencial para produção de L asparaginase. Amostras de folhas de *H. chrysotrichus* foram coletadas na Reserva Biológica de Pedra Talhada (09°15'26.8"S, 36°25'53.7"W), localizada em área de Mata Atlântica no nordeste do Brasil, durante a estação chuvosa (julho de 2018). Análises ecológicas de riqueza e diversidade foram realizadas. Para a produção da enzima L-asparaginase foram selecionados 20 fungos endofíticos pertencentes a treze gêneros previamente identificados. Dos 180 fragmentos de folhas analisadas, foram isolados 279 fungos endofíticos. A taxa de colonização total dos fragmentos foliares de *H. chrysotrichus* por fungos endofíticos foi de 89,4%. Com base nas análises filogenéticas utilizando sequências de β -tubulina e ITS foram identificados 21 gêneros, sendo *Diaporthe* o mais frequente. As análises filogenéticas indicaram nove ordens em Ascomycota (Botryosphaerales, Capnodiales, Diaporthales, Eurotiales, Glomerellales, Hypocreales, Ophiostomatales, Pleosporales e Xylariales). A riqueza e a diversidade dos fungos endofíticos de *H. chrysotrichus*, com base no índice de Shannon, foram maiores para em uma das plantas analisadas (indivíduo B), mas não houve diferença significativa de diversidade entre os membros de *H. chrysotrichus* de Mata Atlântica. O melhor produtor de L-asparaginase foi *Cladosporium perangustum* com 0,93 U/g de atividade enzimática. *Handroanthus chrysotrichus* apresenta uma elevada riqueza de fungos endofíticos que apresentam elevado potencial para produção da enzima L-asparaginase.

Palavras-chave: Biotecnologia. Endófitos. Enzimas. Taxonomia.

ABSTRACT

Endophytic fungi inhabit their hosts without causing apparent damage, contributing to adequate conditions for these hosts to survive under conditions of environmental stress.

Within the host these fungi produce and release secondary metabolites, which can contribute to increasing the plant's resistance to diseases, can minimize plant predation by insects, in addition to increasing its productivity. The objective of this study was to analyze the diversity of fungi from the *Handroanthus chrysotrichus* (Bignoniaceae) plant in an Atlantic Forest area and to evaluate its potential for the production of L-asparaginase. Samples of *H. chrysotrichus* leaves were collected at the Pedra Talhada Biological Reserve (09°15'26.8"S, 36°25'53.7"W), located in the Atlantic Forest area in northeastern Brazil, during the season rainy (July 2018). Ecological analyzes of wealth and diversity were carried out. For the production of the enzyme L-asparaginase, 20 endophytic fungi belonging to thirteen previously identified genera were selected. Of the 180 leaf fragments analyzed, 279 endophytic fungi were isolated. The total colonization rate of leaf fragments of *H. chrysotrichus* by endophytic fungi was 89.4%. Based on phylogenetic analyzes using sequences of β -tubulin and ITS, 21 genera were identified, *Diaporthe* being the most frequent. Phylogenetic analyzes indicated nine orders in Ascomycota (Botryosphaerales, Capnodiales, Diaporthales, Eurotiales, Glomerellales, Hypocreales, Ophiostomatales, Pleosporales and Xylariales). The richness and diversity of the endophytic fungi of *H. chrysotrichus*, based on the Shannon index, were higher for one of the analyzed plants (individual B), but there was no significant difference in diversity between the members of *H. chrysotrichus* from Atlantic Forest. The best producer of L-asparaginase was *Cladosporium perangustum* with 0.93 U/g of enzymatic activity. *Handroanthus chrysotrichus* has a high richness of endophytic fungi that have a high potential for the production of the enzyme L-asparaginase.

Keywords: Biotechnology. Endophytes. Enzymes. Taxonomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Hipótese do equilíbrio antagônico entre a defesa do hospedeiro vegetal e a virulência fúngica. Adaptado de SCHULZ et al. (2002).	21
Figura 2 –	Estrutura química do Taxol (Strobel, 2018).....	32
Figura 3 –	Ilustração esquemática do mecanismo de ação da L-asparaginase. Adaptada de SCHULZ et al. (2002)	34
Figura 4 –	Distribuição da Mata Atlântica brasileira (INPE, 2009).....	42
Figura 5 –	Exemplar de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Ipê-amarelo)	44
Figura 6 –	Ilustração de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> (Ipê-amarelo).....	45
Figura 7 –	Percentual de fungos endofíticos isolados de folhas de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> de área de Mata Atlântica	53
Figura 8 –	Árvore de máxima verossimilhança (ML) obtida de sequências de β -tubulina dos principais gêneros de fungos endofíticos isolados dos folíolos da planta <i>H. chrysotrichus</i> de área de Mata Atlântica. Os valores de suporte do ML bootstrap foram acima de 50%.....	56
Figura 9 –	Árvore filogenética bayesiana realizada utilizando sequências de <i>RPB2</i> , <i>TEF1</i> e <i>TUB2</i> de membros representativos membro do FLSC.	58
Figura 10 –	Árvore filogenética bayesiana realizada utilizando sequências de <i>RPB2</i> , <i>TEF1</i> e <i>TUB2</i> de membros representativos membro do subclado africano do FFSC	59
Figura 11 –	<i>Fusarium</i> sp. 1 a e b Colônia em BDA após 7 dias. c Detalhe do esporodóquio. d–g Células conidiogênicas e conídios. Escalas em barra: c–m = 10 μ m	60
Figura 12 –	<i>Fusarium</i> sp. 2 a e b Colônia em BDA após 7 dias. c Detalhe do esporodóquio. d–g Células conidiogênicas e conídios. Escalas em barra: c–m = 10 μ m	61
Figura 13 –	Árvore de filogenética de Máxima Verossimilhança realizada utilizando seqüências de <i>TUB2</i> de membros representativos membro de <i>Diaporthe</i> . <i>Diaporthella corylina</i> (CBS 121124) foi utilizado como grupo externo. Os valores de suporte do ML bootstrap foram acima de 50%	62
Figura 14 –	Perfis de diversidade dos fungos endofíticos de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Gêneros de fungo endofíticos comumente isolados de diferentes plantas. Adaptado de NAIR e PADMAVATHY (2014)	18
Tabela 2 –	Fungo endofíticos produtores de substâncias bioativas com aplicação biotecnológica	29
Tabela 3 –	Principais gêneros de fungo endofíticos descritos como produtores de L-Asparaginase	37
Tabela 4 –	Distribuição de fungos endofíticos isolados de folhas de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> de área de Mata Atlântica	50
Tabela 5 –	Frequência absoluta e relativa de fungos endofíticos isolados de folhas de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> de área de Mata Atlântica	67
Tabela 6 –	Riqueza e diversidade de fungos endofíticos isolados de folhas de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> de área de Mata Atlântica	68
Tabela 7 –	Atividade de L-asparaginase obtida por fungos endofíticos isolados de <i>Handroanthus chrysotrichus</i> em Área de Mata Atlântica	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASNase	L-asparaginase
BDA	Ágar Batata Dextrose
CDM	Czapek Dox modificado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ITS	Internal transcript Spacer
LLA	Leucemia linfoide aguda
µL	Microlitro
MMA	Ministério do Meio Ambiente
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
Rpm	Rotações por minuto
U	Unidade de atividade enzimática
U/g	Unidadede atividade enzimática por grama
U/mg ⁻¹	Unidadede atividade enzimática por miligrama
U/mL	Unidadede atividade enzimática por mililitro
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1 Fungos Endofíticos: Definição e Características Gerais	17
3.2 Interação entre Fungos Endofíticos e Plantas	20
3.2.1 Colonização de Tecidos Vegetais por Fungos Endofíticos	22
3.2.2 Diversidade e Especificidade dos Fungos Endofíticos	24
3.3 Importância Econômica dos Fungos Endofíticos	26
3.3.1 Fungos Endofíticos na Agricultura	26
3.3.2 Compostos Bioativos Sintetizados por Fungos Endofíticos	28
3.4 L-asparaginase	33
3.5 Fungos Endofíticos Produtores de L-asparaginase	36
3.6 Mata Atlântica	42
3.7 Ipê-amarelo	43
4 METODOLOGIA	46
4.1 Área de Coleta	46
4.2 Material Vegetal	46
4.2.1 Isolamento de Fungos Endofíticos a partir das Folhas	47
4.3 Identificação Morfológica dos Fungos Endofíticos	47
4.4 Identificação Molecular dos Fungos Endofíticos	47
4.4.1 Extração, amplificação de fragmentos do DNA e Sequenciamento	47
4.4.2 Alinhamento das Sequências e Análise Filogenética	48
4.5 Análises Estatísticas e Ecológicas	48
4.6 Seleção dos Fungos Endofíticos Quanto à Produção de L-asparaginase (ASNase)	49
4.7 Determinação da Atividade da Enzima L-asparaginase	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50

5.1 Isolamento e identificação de Fungos Endofíticos a partir das Folhas de <i>Handroanthus chrysotrichus</i>	50
5.2 Análises Filogenéticas	55
5.3 Análises Ecológicas	66
5.4 Produção da enzima L-Asparaginase	68
6 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72

1. INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos são aqueles que vivem no interior dos vegetais, habitando folhas, caules e raízes, sem causar dano aparente aos seus hospedeiros, diferentemente dos fitopatogênicos, que provocam doenças em plantas e dos epifíticos que são encontrados na superfície vegetal (AZEVEDO, 2002).

Estudos realizados sobre a simbiose entre os fungos e plantas, apresentam dados importantes sobre o potencial desses endofíticos na produção de enzimas (BEZERRA et al., 2012) e outros metabólitos de interesse econômico (SOUZA et al., 2004). Na simbiose os fungos endofíticos produzem e liberam metabólitos secundários, que dentre outras funções contribuem com o aumento da resistência do vegetal a doenças e a estresses ambientais, além de diminuir a predação da planta por insetos e aumentar a sua produtividade (PEIXOTO-NETO et al., 2002; SOUZA et al., 2004). Estudos mostram que entre os metabólitos produzidos por fungos endofíticos está a L-asparaginase (THEANTANA et al., 2009).

A enzima L-asparaginase amino-hidrolase ou apenas L-asparaginase (EC 3.5.1.1) possui ação antineoplásica, atuando como um catalisador na decomposição da asparagina em ácido aspártico e amônia (THEANTANA et al., 2007; LOPES et al., 2017) sendo utilizada no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (APPEL, 2007) e de linfomas malignos (DUVAL et al., 2002). Além disso, estudos mostram que a enzima possui propriedades que impedem a formação de acrilamida em alimentos que são submetidos a altas temperaturas (DIAS et al., 2016), o que é importante devido as propriedades genotóxicas, neurotóxicas e carcinogênicas da acrilamida (ARISSETO e TOLEDO, 2006). Diante da importância da L-asparaginase, pesquisas devem ser realizadas em variados biomas na busca por espécies de fungos que sintetizem a enzima.

A Reserva Biológica de Pedra Talhada foi criada em 13 de dezembro de 1989, com objetivo de proteger o fragmento de Mata Atlântica e seus recursos naturais. A Reserva Biológica apresenta uma área de 4.469 hectares distribuídas entre os estados de Alagoas e Pernambuco (ICMBIO, 2017). Dentre as espécies presentes na reserva, encontra-se *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos (CAMILLO e SALOMÃO, 2016), espécie arbórea pertencente à família Bignoniaceae, conhecida como ipê-amarelo, antes pertencente ao gênero *Tabebuia*. A espécie é facilmente encontrada em áreas de vegetação nativa do Nordeste e Sudeste brasileiros, possuindo madeira pesada, durável e

muito utilizada na arborização urbana e em programas de reflorestamento, essas características atribuem ao Ipê-amarelo um alto valor econômico (FONSECA et al., 2005). Devido a intensa exploração de plantas do gênero *Handroanthus*, poucas árvores estão presentes nas regiões de ocorrência natural (GEMAQUE et al., 2002).

Apesar de existirem estudos de prospecção de fungos em diversos substratos na Mata Atlântica, os dados sobre o isolamento e identificação na Mata Atlântica do Nordeste brasileiro ainda são insipientes. Diante da diversidade vegetal existente na Mata Atlântica, atrelada à escassez de informações, o estudo sobre esses fungos se faz cada vez mais necessário, com a provável descoberta de novas espécies, especialmente os endofíticos associados a *H. chrysotrichus*.

A procura por novos microrganismos produtores de compostos bioativos, como a L-asparaginase e o interesse das indústrias farmacêuticas e alimentícias por formas mais econômicas de produção em larga escala desses compostos, aumentam ainda mais a necessidade de estudos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a diversidade e a capacidade de produção da L-Asparaginase por fungos endofíticos isolados de folhas de Ipê-amarelo (*Handroanthus chrysotrichus*) na Reserva Biológica de Pedra Talhada (AL/PE).

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar e purificar fungos endofíticos de folhas de *H. chrysotrichus*;
- Identificar através de análise morfológica e molecular os fungos endofíticos isolados;
- Estimar a diversidade de fungos endofíticos associados com folhas de *H. chrysotrichus*;
- Avaliar a capacidade de produção de L-Asparaginase pelos fungos endofíticos isolados de *H. chrysotrichus*.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Fungos Endofíticos: Definição e Características Gerais

O termo endofítico foi criado por De Barry, em 1866 e atualmente vem sendo utilizado na literatura para designar os microrganismos que vivem no interior dos vegetais sem causarem lesões ao hospedeiro (AZEVEDO et al., 2000; HYDE e SOYTONG, 2008).

Em 1988, CARROLL usou o termo endofítico para organismos endosimbiontes que causam infecções assintomáticas nos vegetais, retirando dessa designação os fungos micorrízicos, porém em 1991 PETRINI incluiu a essa definição os microrganismos que em algum período de seu ciclo de vida colonizam os tecidos das plantas sem causar prejuízos aparentes ao hospedeiro, acomodando assim à definição os microrganismos simbiotes, neutros, mutualistas e patógenos latentes (PETRINI, 1991; SELOSSE et al., 2004). Uma definição mais atual afirma que os endófitos são microrganismos que colonizam os tecidos e órgãos vegetais assintomaticamente sem causar danos ao hospedeiro, que não produzem estruturas externas emergentes e que podem ou não crescer em meio de cultura (AZEVEDO, 2007).

Os endófitos constituem um grupo de microrganismos composto principalmente por bactérias e fungos, que podem estar presentes simultaneamente na planta (BANDARA et al., 2006), sendo potenciais fontes de estudos e pesquisas em todo o mundo. Grande parte das plantas vasculares são relatadas abrigando microrganismos endofíticos, que são apontados como os mais diversificados em áreas tropicais (MURALI et al., 2007; SURYANARAYANAN et al., 2011).

Segundo AZEVEDO et al. (2002) os fungos endofíticos são em sua grande maioria, fungos filamentosos. Leveduras pertencentes aos filos Ascomycota e Basidiomycota também ocorrem como endófitas de espécies vegetais, porém em menor número e distribuídas de forma desigual nos demais tecidos vegetais se comparados com os fungos filamentosos (SOLIS et al., 2015). Fungos endofíticos possuem imensa diversidade e podem ser isolados da maioria das plantas e de diferentes tecidos vegetais (Tabela 1) (AZEVEDO e ARAÚJO, 2007; HYDE e SOYTONG, 2008).

Estudos revelam que espécies de fungos endofíticos apresentam diversas relações ecológicas com as plantas hospedeiras, além de produzirem vários metabólitos (PEIXOTO-NETO et al., 2004), essas interações podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas. Nas

interações simbióticas podem produzir ou induzir o vegetal a sintetizar metabólitos secundários como alcaloides, terpenóides, esteroides e compostos aromáticos repelentes, que podem auxiliar na diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, aumentar a tolerância a estresses ambientais e controlar a população de outros microrganismos devido a produção de toxinas (PEIXOTO-NETO et al., 2004; SOUZA et al., 2004). Estudos mostram que o relacionamento entre endófitos e seus respectivos hospedeiros podem aumentar em complexidade se os hospedeiros forem plantas medicinais, isso decorre do fato de que as mesmas substâncias bioativas produzidas pelo hospedeiro, em geral, também são sintetizadas pelos endófitos, o que envolve alto grau de especificidade (ZHAO et al., 2011; VENIERAKI et al., 2017).

Tabela 1. Gêneros de fungo endofíticos comumente isolados de diferentes plantas. Adaptado de NAIR e PADMAVATHY (2014).

Gêneros Reportados	Espécies Vegetais Hospedeiras
<i>Acremonium</i> sp.	<i>Huperzia serrata</i> e <i>Taxus chinensis</i>
<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Lycopersicum esculentum</i> e <i>Triticum aestivum</i>
<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cinnamomum camphora</i> e <i>Opuntia ficus indica</i>
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Lycopersicum esculentum</i>
<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Cinnamomum camphora</i> , <i>Citrus</i> spp., <i>Ginkgo biloba</i> , <i>Huperzia serrata</i> , <i>Pasania edulis</i> , <i>Samanea saman</i> , <i>Tectona grandis</i> e <i>Triticum aestivum</i>
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Huperzia serrata</i> e <i>Lycopersicum esculentum</i>
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Ginkgo biloba</i> , <i>Neolitsea sericea</i> , <i>Pasania edulis</i> , <i>Samanea saman</i> , <i>Taxus chinensis</i> e <i>Tectona grandis</i>
<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Centella asiatica</i> , <i>Citrus</i> sp., <i>Coffea arabica</i> , <i>Pasania edulis</i> , <i>Panax quinquefolium</i> e <i>Quercus variabilis</i>

Segundo KHIDIR et al. (2010), fungos endofíticos contribuem para a adequada manutenção das condições de sobrevivência da planta, quando submetida a altas temperaturas e escassez de nutrientes em regiões áridas. Esses fungos também podem interagir com o hospedeiro aumentando seu crescimento e produtividade (CLAY, 1988; WOLOCK-MADEJ e CLAY, 1991), além de melhorarem a absorção de nutrientes pela planta (GASONI e GURFMKEL, 1997).

A microbiota endofítica tem sido intensamente descrita devido a capacidade de produção de toxinas, fitormônios, enzimas, fármacos como antibióticos, imunossupressores, antitumorais, compostos de interesse biotecnológico e químico (AZEVEDO et al., 2000), isso sugere um enorme potencial desses endófitos, além de alternativas para a descoberta de novas substâncias bioativas, levando ao desenvolvimento de novas drogas derivadas de compostos produzidos por fungos endofíticos (KUMAR et al., 2011).

Os fungos endofíticos têm grande importância na agricultura e nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, podendo agir como agentes inibidores de pragas e patógenos (VOLKSCH et al., 1992), sintetizando metabólitos primários e secundários de interesse farmacológico como a L-asparaginase (THEANTANA et al., 2009), taxol (WANG et al., 1999), cryptocandina (STROBEL et al., 2002) e diversos antibióticos (GUO et al., 2008; GUNATILAKA, 2006; ZOU et al., 2000).

Segundo GENNARO et al. (2003), os fungos endofíticos estão amplamente distribuídos nos tecidos vegetais, apresentando ampla diversidade de espécies, sendo encontrados praticamente em todos os representantes do reino vegetal. A abundância dos fungos endofíticos os fazem ocupar uma infinidade de nichos ecológicos, habitando o interior de briófitas (SCHULZ et al., 1993), pteridófitas (SATI et al., 2009), gimnospermas (LEGAULT et al., 1989) e angiospermas (PETRINI et al., 1992). Estudos mostram que esses microrganismos estão presentes em hospedeiros diversos como líquens (LI et al., 2007), algas (RAGHUKUMAR, 2008), orquídeas (TAO et al., 2008) e cactos (BEZERRA et al., 2017).

Os estudos sobre a microbiota endofítica das plantas ainda são escassos, logo a prospecção em diversos vegetais se faz necessário, principalmente devido o potencial destes fungos na produção de compostos bioativos de interesse industrial (STROBEL et al., 2002). Estudos sobre a importância dos endófitos na produção industrial de enzimas e compostos orgânicos são necessários devido sua utilização em processos biotecnológicos e ambientais, com a existência de pesquisas que contribuem com o conhecimento da diversidade de fungos (ESTRADA et al., 2012; RUSSELL et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2008). Grande parte das pesquisas com fungos endofíticos utilizam plantas de interesse econômico, porém é importante que outros representantes vegetais sejam utilizados, visando o descobrimento de novas espécies fúngicas, assim como a geração de novos dados acerca da diversidade e distribuição ecológica (STONE et al., 2004; STROBEL, 2002).

3.2. Interação entre Fungos Endofíticos e Plantas

Na natureza, associações entre diversos organismos ocorrem, podendo garantir o sucesso ecológico das espécies envolvidas, o que comumente é observado nas relações entre plantas e fungos endofíticos, interações essas, que são alvos de constantes estudos, pois segundo registros de fungos em fósseis de vegetais, as interações fungo-planta parecem ter surgido há milhões de anos com as plantas terrestres superiores (KRINGS et al., 2007), além de serem extremamente complexas e inerentes a determinadas espécies de plantas ou endófitos (ARAÚJO et al., 2010).

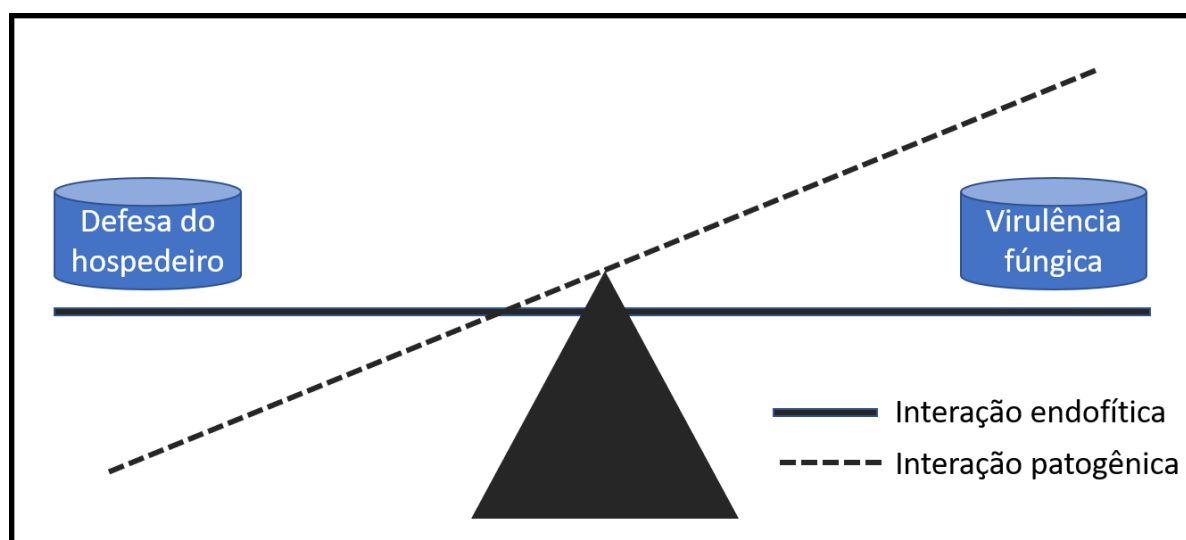
As interações entre as plantas e os fungos endofíticos são cada vez mais questionadas devido a relação simbiótica e o equilíbrio antagônico que existe entre ambos (FAETH, 2002), desta forma tanto a simbiose mutualística, quanto o equilíbrio antagônico têm sido estudados para tentar compreender melhor as interações entre endófitos e hospedeiros (SAIKKONEN et al., 2004; SCHULZ e BOYLE, 2005).

A hipótese da simbiose mutualística sugere que os fungos endofíticos coevoluíram com as plantas, desenvolvendo relações mutualísticas de forma que os dois organismos são beneficiados, onde os endófitos recebem nutrientes e proteção da planta hospedeira, enquanto as plantas também são beneficiadas com uma maior resistência a estresses ambientais causados por fatores bióticos ou abióticos (SAIKKONEN et al., 1998), proteção e resistência contra pragas e patógenos (HALLMANN et al., 1997; VOLKSCH et al., 1992), crescimento e aumento da produtividade vegetal (WOLOCK-MADEJ e CLAY, 1991).

Segundo AZEVEDO e ARAÚJO (2007) microrganismos endofíticos vivem em equilíbrio com seus hospedeiros, porém em certas condições podem se tornar patogênicos, assim como determinados patógenos, que podem perder virulência tornando-se endofíticos e como os epifíticos, que algumas vezes são encontrados no interior dos tecidos vegetais. Desta forma a colonização assintomática é consequência da interação antagônica entre o vegetal hospedeiro e o fungo (SCHULZ e BOYLE, 2005) e, portanto, se o equilíbrio é de alguma forma afetado, pela diminuição na defesa da planta, ou por aumento da virulência fúngica (Figura 1), haverá conseqüentemente o desenvolvimento de doença (SCHULZ et al., 2002). AZEVEDO et al. (2000) consideram que a divisão entre endofítico, epifítico e patogênico é meramente didática, havendo um gradiente separando-os, assim os limites dessa separação tornam-se muitas vezes difíceis de serem determinados.

De acordo com AZEVEDO et al. (2002) todas as espécies vegetais estudadas abrigam uma comunidade endofítica em ao menos uma fase do seu ciclo de vida. As condições fisiológicas do vegetal, além de seu genótipo são determinantes para o tipo de relação que uma mesma espécie de fungo venha a ter com hospedeiros diferentes. Alguns estudos indicam que existem diferenças no tipo de simbiose que os fungos realizam com a planta, onde patógenos, mutualistas e sapróbios penetram nos tecidos vegetais e permanecem latentes para captar os nutrientes do hospedeiro (REDMAN et al., 2001; RODRÍGUEZ e REDMAN, 2008).

Figura 1. Hipótese do equilíbrio antagônico entre a defesa do hospedeiro vegetal e a virulência fúngica. Adaptado de SCHULZ et al. (2002).



Fungos endofíticos habitam variados órgão vegetais como caule, raízes, frutos e sementes (PERERA et al., 2018), porém é mais frequentemente encontrado nas folhas (HALLMANN et al., 1997), desempenhando diversas relações ecológicas, pois podem estimular e induzir a produção e germinação de sementes (FREYERMUTH et al., 1996). Segundo estudos, as interações endófito-hospedeiro podem se tornar mais complexas se os hospedeiros forem plantas medicinais, pois alguns fungos podem produzir os mesmos compostos bioativos que seus hospedeiros (VENIERAKI et al., 2017; ZHAO et al., 2011).

Fungos endofíticos são importantes na proteção do hospedeiro contra insetos, espécies fúngicas como *Acremonium lolli* e *Cladosporium sphaerospermum* são descritas como produtoras de substâncias repelentes de insetos (AZEVEDO et al., 2000). Alguns fungos endofíticos do gênero *Trichoderma* são produtores de fitormônios que auxiliam no crescimento e produtividade vegetal (TAN e ZOU, 2001), como alguns isolados do gênero

Fusarium, que produzem giberelina, fitormônio que atua como fator de crescimento (STROBEL, 2003).

3.2.1. Colonização de Tecidos Vegetais por Fungos Endofíticos

STROBEL (2003) afirma que há uma íntima relação entre a evolução dos fungos endofíticos e plantas, relação essa que provavelmente iniciou-se a aproximadamente 400 milhões de anos atrás com o surgimento das primeiras plantas na Terra, isso fez com que os fungos desenvolvessem mecanismos específicos de penetração e colonização dos vegetais. Os fungos endofíticos em geral apresentam dois mecanismos principais de colonização do tecido vegetal: o mecanismo de transmissão horizontal e o mecanismo de transmissão vertical.

No mecanismo de transmissão horizontal, os fungos produzem esporos de origem sexual e/ou assexual, que são dispersados de uma planta à outra, esses esporos penetram através de aberturas naturais como estômatos ou hidatódios presentes nas estruturas aéreas das plantas como folhas, caules, cotilédones, frutos e flores (CHAPLA et al., 2013; PETRINI, 1991). Pode ocorrer também a penetração ativa de endófitos pela produção de enzimas ou estruturas que facilitem sua penetração (SCHULZ e BOYLE, 2005). Os esporos presentes no solo também podem penetrar no sistema radicular dos vegetais, onde poderá germinar ou migrar para diferentes partes da planta. Além disso, os esporos podem penetrar através de fissuras no tecido vegetal, que podem ser causadas pela ação de animais ou do ambiente (JOHRI, 2006). A dispersão por insetos também é considerada como mecanismo de transmissão horizontal, onde os esporos dos endófitos de uma planta são transportados por insetos, em geral polinizadores, que ao entrarem em contato com outras plantas auxiliam na dispersão dos esporos (SAIKKONEN et al., 2004; MARINHO et al., 2005). Os fatores bióticos e abióticos podem modificar a frequência e composição dos fungos endofíticos transmitidos horizontalmente a planta hospedeira. Entre os fatores bióticos estão a disponibilidade dos esporos, genótipo e fenótipo da planta, além de interações com outros microrganismos no hospedeiro (AHLHOLM et al., 2002). Temperatura, umidade e regime de chuvas constituem os fatores abióticos e podem influenciar significativamente na dispersão e na germinação dos esporos dos fungos endofíticos (CARROLL, 1988). Segundo ARNOLD e HERRE (2003) a chuva, orvalho ou névoa favoreceram a penetração do fungo endofítico no interior das folhas de cacauero

(*Theobroma cacao*), desta forma foi constatado que a maior densidade de endofíticos em folhas maduras pode estar associada ao tempo de exposição ao ambiente.

Na transmissão vertical os fungos endofíticos colonizam as sementes da planta hospedeira, que ao serem dispersadas para germinação transportam consigo os endófitos, o que ocorre principalmente em gramíneas. Dentro da planta o fungo endofítico pode se disseminar através do sistema vascular do vegetal, alojando-se de forma intra ou intercelular (BACON e WHITE, 2000), alimentando-se dos nutrientes que compõem a seiva elaborada (STROBEL, 2003; SAIKKONEN et al., 2004). Condições como tamanho, morfologia e a grau de maturidade das plantas arbóreas, limitam o crescimento sistêmico e o sucesso da transmissão vertical dos fungos endofíticos. Em compensação, o tamanho, morfologia e posição dos meristemas das gramíneas fornecem mais oportunidades para o crescimento sistêmico e consequentemente transmissão vertical para fungos (SAIKKONEN et al., 2004).

Os fungos endofíticos podem ser divididos em dois grupos artificiais: balansiaceos e não-balansiaceos. Os balansiaceos colonizam especificamente gramíneas, compreendendo os gêneros de ascomicetos *Balasia* e *Epichloë*, bem como seus anamorfos *Ephelis* e *Neotyphodium* (SCHULZ e BOYLE, 2005), que se disseminam de forma sistêmica e intracelular em todos os tecidos das gramíneas, cujos esporos são transmitidos de forma vertical através das sementes (BACON e WHITE, 2000). Esse grupo apresenta estruturas especializadas para absorção de nutrientes em seu micélio e são capazes de produzir uma variedade de metabólitos secundários (SCHULZ e BOYLE, 2005). A relação que existe com as gramíneas é considerada mutualista, uma vez que os fungos recebem nutrientes da planta e estão protegidos das intempéries ambientais, enquanto as plantas são protegidas contra a herbivoria devido aos alcaloides tóxicos sintetizados pelos fungos (SCHARDL, 2000; WHITE JR et al., 2000).

O grupo dos não-balansiaceos é bem diverso tanto do ponto de vista filogenético, como das relações ecológicas e estratégias de sobrevivência. É composto principalmente por espécies pertencentes ao Filo Ascomycota, compreendendo os ascomicetos formadores de ascostroma e peritécio (ALEXOUPOULOS et al., 1996; PETRINI, 1991; STONE et al., 2004). Esses fungos são amplamente distribuídos, podendo serem encontrados em todas plantas terrestres, além de serem isolados praticamente de todos os órgãos vegetais (SCHULZ e BOYLE, 2005). De acordo com PEIXOTO-NETO et al. (2002) e SCHULZ e BOYLE (2005), os principais gêneros fúngicos isolados pertencentes ao grupo dos não-balansiaceos são *Acremonium*, *Alternaria*, *Ascochyta*, *Cladosporium*,

Colletotrichum, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Mucor*, *Nodulisporium*, *Phyllosticta*, *Pestalotia*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Phoma*, *Pleospora*, *Rhizopus* e *Xylaria*.

Os fungos endofíticos podem penetrar nas plantas e apresentarem diferentes taxas de colonização (HUANG et al., 2007), que podem ser influenciadas por vários fatores, como espécie do hospedeiro, distribuição geográfica, idade do tecido foliar, tipo de tecido colonizado, altitude, umidade e precipitação anual (STROBEL e DAISY, 2003; SURYANARAYANAN e THENNARASAN, 2004; VIEIRA et al., 2011). Diferentes tipos de tecido de uma mesma planta podem apresentar comunidades distintas de endófitos (FISHER et al., 1994). PORRAS-ALFARO et al. (2008), evidenciam em seu trabalho que a taxa de colonização dos tecidos vegetal promove um papel fundamental no aumento da tolerância das plantas à seca e ao calor excessivo, criando um paralelo entre as elevadas taxas de colonização e os estresses ambientais sofridos pelo vegetal.

3.2.2. Diversidade e Especificidade dos Fungos Endofíticos

Segundo HAWKSWORTH (2001) existem cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos no planeta, porém apenas 5% estão descritos. Estima-se que haja cerca de 400 mil espécies de plantas na Terra e cada uma delas possa abrigar de três a seis espécies de fungos endofíticos, desta forma é possível que existam aproximadamente 1 milhão de espécies de fungos, analisando apenas os endofíticos (STROBEL e DAISY, 2003; STROBEL et al., 2004). ARNOLD et al. (2001) sugeriram que fungos endofíticos são extremamente diversos nos trópicos, que o número de espécies fúngicas estimada pode ultrapassar 1,5 milhões de espécies e que a especificidade do fungo ao hospedeiro é um importante fator a ser considerado nessa estimativa.

Os fungos endofíticos formam um grupo polifilético extremamente diverso, que são definidos por sua ocorrência no interior de tecidos sadios de plantas, sendo encontrados em briófitas, pteridófitas, gimnospermas, angiospermas, além de ambientes naturais e antropizados (ARNOLD, 2007). De acordo com SCHULZ e BOYLE, 2005, as espécies de fungos endofíticos mais frequentemente isoladas nos trópicos pertencem ao filo Ascomycota e suas formas anamórficas, além de espécies pertencentes aos fillos Basidiomycota e Mucoromycota, que são isoladas em menor número.

As comunidades de endófitos são compostas em geral, por poucas espécies dominantes, que na maioria das vezes são generalistas, logo são encontradas em

diferentes plantas hospedeiras não relacionadas taxonomicamente. O sucesso destes fungos em ocupar o interior de tecidos vegetais pode ser reflexo do carácter generalista destes fungos (SURYANARAYANAN et al., 2003).

Entre as espécies de fungos generalistas destacam-se os gêneros: *Alternaria* (LARRAN et al., 2001), *Cladosporium* (KHARWAR et al., 2008a), *Colletotrichum* (HUANG et al., 2008), *Curvularia* (STROBEL, 2018), *Fusarium* (GOND et al., 2007), *Pestalotiopsis* (CANNON e SIMMONS, 2002), *Phoma* (STROBEL, 2018), *Phylosticta* (SURYANARAYANAN et al., 2003), *Phomopsis* (SURYANARAYANAN et al., 2000) e *Xylaria* (HUANG et al., 2008). Em paralelo, algumas espécies denominadas acidentais, surgem representadas por um ou dois isolados entre centenas. O número de espécies obtidas é diretamente proporcional a variedade do tecido vegetal e ao tamanho do fragmento utilizado para o isolamento (BILLS e POLLISHOOK, 1992; GAMBOA et al., 2002).

Vários fatores afetam a frequência e composição das espécies de fungos endofíticos nos vegetais, entre eles o habitat da planta hospedeira, que por ser um ambiente dinâmico, está sujeito as intempéries e estresses abióticos, além de sofrerem influência da idade do tecido vegetal (VUJANOVIC e BRISSON, 2002). O estudo de VENKATACHALAM et al. (2015), com endófitos de espécies de ervas marinhas (sete da família Cymodoceaceae e três da família Hydrocharitaceae) coletados ao longo da costa do estado de Tamilnadu, Sul da Índia, revelou que a frequência de colonização dos endófitos era bem menor do que o relatado para plantas terrestres e que os representantes da ordem Eurotiales dominam a comunidade endofítica nessas angiospermas marinhas, sugerindo que o habitat do hospedeiro tem importância elevada na composição das comunidades de fungos endofíticos. No trabalho de NASCIMENTO et al. (2015) foi verificado que a taxa de colonização de fungos endofíticos de *Calotropis procera* aumentou com a idade e desenvolvimento das folhas, além disso, espécies dominantes de endófitos de *C. procera* introduzidas no Nordeste do Brasil foram diferentes das encontradas em estudos sobre a mesma espécie hospedeira e outras espécies do gênero *Calotropis* em regiões nativas.

SHENG-LIANG et al. (2014) isolaram e compararam os fungos endofíticos da planta hemiparasitária *Macrosolen tricolor* e sua hospedeira *Camellia oleífera*, com a finalidade de verificar a variação da diversidade endofítica em ambas. *M. tricolor* e *C. oleífera* apresentaram grande diversidade de fungos endofíticos compostos principalmente por representantes do filo Ascomycota, distribuído em mais de dez ordens e quatro classes (Sordariomycetes, Dothideomycetes, Leotiomyces e Eurotiomycetes), além de uma classe do filo Basidiomycota (Agaricomycetes), porém *Valsa* sp. foi a espécie dominante

em ambas as plantas. Os pesquisadores verificaram que a similaridade de fungos endófitos nos dois hospedeiros foi de 64,4% e a análise de correspondência canônica mostrou que os conjuntos endofíticos de *M. tricolor* e *C. oleifera* foram significativamente diferentes.

As comunidades endofíticas também variam espacialmente no interior do vegetal que as abriga, havendo diferença e especificidade entre as diversas partes dos tecidos (NALINI et al., 2005; GOND et al., 2007), o que pode ser explicado pela habilidade de cada microrganismo em usar diferentes substratos no seu metabolismo, além de poderem interagir com outros microrganismos epifíticos e patógenos (BEHIE et al., 2015; GIMÉNEZ et al., 2007; OSONO, 2007; SANTAMARÍA e BAYMAN, 2005).

Os fungos endofíticos podem ser encontrados em praticamente todos os locais do planeta, desde florestas tropicais cuja biodiversidade é contatadamente alta, como também em ambientes extremos, como oceanos, desertos, manguezais, áreas alpinas, ambientes xerofíticos, antárticos e até mesmo áreas geotérmicas (BEZERRA et al., 2013; RODRÍGUEZ e REDMAN, 2008; STROBEL e DAISY, 2003; SURYANARAYANAN et al., 2003). Áreas com altas concentrações de poluentes, no entanto, podem afetar o crescimento e a atividade destes fungos, causando consequentemente a diminuição das comunidades de endófitos presentes no vegetal.

3.3. Importância Econômica dos Fungos Endofíticos

3.3.1. Fungos Endofíticos na Agricultura

Os fungos endofíticos são capazes de sintetizar diversos compostos reguladores como auxinas, citocininas, etileno e giberelinas, que favorecem o crescimento e desenvolvimento dos vegetais (ARAÚJO et al., 2010), o que proporciona vantagens competitivas aos seus hospedeiros (CHEPLICK e FAETH, 2009). Alguns endófitos auxiliam na adaptação do vegetal elevando sua tolerância às intempéries ambientais, como fungos do gênero *Neotyphodium*, que aumenta a tolerância a seca de seu hospedeiro *Festuca aerundinacea* (WHITE JR. et al., 2002), além de proporcionar maior desenvolvimento foliar, produtividade e aumento da resistência do vegetal a insetos e nematoides (PANACCIONE et al., 2001). Os gêneros *Paraconiothyrium*, *Phialophora* e a espécie *Embellisia chlamydospora* exibiram efeitos significativamente positivos no aumento do número de ramificação, no teor de potássio e cálcio de plantas xerófilas como *Ammopiptanthus mongolicus*, indicando assim que esses fungos possuem elevado potencial para a

recuperação de vegetação em regiões áridas (LI et al., 2018). Os microrganismos endofíticos possuem muitos mecanismos e diferentes estratégias durante o ciclo de vida da planta, para promoção do crescimento das plantas contribuindo com o aumento da altura dos vegetais, maior biomassa de brotos, caules e raízes, além de melhorarem a lignificação de vasos de xilema, o tempo de murcha e o rendimento das culturas (AHMAD et al., 2008).

Os fungos endofíticos também podem ser utilizados no controle biológico de insetos e fitopatógenos de diversas culturas, podendo ser de forma direta, parasitando ou sintetizando compostos tóxicos para eliminar ou repelir a praga, como é o caso de fungos dos gêneros *Neotyphodium*, *Aspergillus* e *Achnatherum* que secretam alcaloides tóxicos evidenciando o importante papel na proteção das plantas ao ataque de herbívoros (SCHULZ e BOYLE, 2005).

SILVA-HUGHES et al. (2015) investigaram a comunidade fúngica endofítica associada ao cacto *Opuntia humifusa* nos Estados Unidos e avaliaram o potencial para produzir compostos antifúngicos. Estes verificaram que seis extratos de endófitos apresentaram propriedades antifúngicas, entre estes, o composto 5-metilmeleína que apresentou moderada atividade antifúngica contra o fungo fitopatogênico *Phomopsis obscurans*.

Nos estudos de BING e LEWIS (1991 e 1992) *Beauveria bassiana* foi relatada como fungo endofítico de cultivares de milho (*Zea mays*), espécie conhecida entomopatogênica. Os pesquisadores comprovaram a colonização endofítica de tecidos de plantas de milho por este fungo e verificaram uma maior mortalidade de larvas da broca do milho europeia (*Ostrinia nubilalis*) quando estas se alimentavam de plantas colonizadas endofiticamente por este fungo.

Na pesquisa de BEHIE et al. (2015) os gêneros de fungos endofíticos entomopatogênico *Metarhizium* e *Beauveria*, bem como o fungo nematófago, *Pochonia chlamydosporium* foram testados quanto a colonização tecidual preferencial em seus hospedeiros vegetais. Os resultados mostraram que *Metarhizium* foram restritos às raízes das plantas, enquanto *Beauveria* sp. e *P. chlamydosporium* foram encontrados em toda a planta, o que corrobora com o fato que a infecção de inseto por *Metarhizium* ocorrem principalmente abaixo do solo, enquanto as infecções causadas por *Beauveria* sp. e *P. chlamydosporium* ocorrem principalmente na superfície, sugerindo que certos fungos endofíticos entomopatogênico são capazes de migrar dentro do tecido da planta para regiões específicas, fornecendo proteção de plantas contra pragas acima e abaixo do solo.

O controle biológico também pode ser realizado de forma indireta quando o endófito induz a planta a produzir substâncias de defesa, que irão atuar contra o patógeno e/ou praga, acarretando no aumento da resistência sistêmica do vegetal (ARAÚJO et al., 2010). Segundo DAHLMAN et al. (1991), fungos endofíticos e seus hospedeiros podem sintetizar em conjunto compostos químicos como alcaloides, que atuam na eliminação de insetos e nematoides.

ZHANG et al. (2014) estudaram os fungos endofíticos de *Brassica napus* e avaliaram a sua eficácia na inibição dos fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea*. O estudo mostrou que aproximadamente 25% dos endófitos isolados de *Brassica napus* exibiram atividade antifúngica contra *S. sclerotiorum*, destacando-se as espécies *Aspergillus flavipes*, *Chaetomium globosum*, *Clonostachys rosea* e *Leptosphaeria biglobosa*. *Fusarium oxysporum* foi capaz de produzir compostos orgânicos voláteis inibidores de *S. sclerotiorum* e *Botrytis cinerea*, além disso, *Alternaria alternata*, *F. tricinctum* e *L. biglobosa* exibiram efeitos promotores de crescimento do hospedeiro.

3.3.2. Compostos Bioativos Sintetizados por Fungos Endofíticos

Grande parte dos estudos sobre os metabólitos secundários de fungos endofíticos surgiram na década de 80, concentrados nos compostos associados com doenças em gado, onde foram investigados os sintomas associados a contaminação de grama por *Neotyphodium* sp., que produz metabólitos tóxicos causando muitas vezes a morte dos animais (LYONS et al., 1986). Segundo STROBEL e DAISY (2003), os microrganismos, em especial os fungos, são conhecidos por sua capacidade de produzir inúmeros metabólitos secundários com ação bioativa, que por conta da sua grande variedade e complexidade estrutural são usados na indústria biotecnológica e farmacológica, podendo também servirem como precursores na síntese de outras moléculas bioativas (DEMAIN, 2006).

De acordo com PINTO et al. (2002) os fungos endofíticos constituem uma fonte potencial, porém pouco explorada de novas substâncias bioativas, pois em comparação com os fungos obtidos de outros substratos, uma quantidade relativamente baixa de metabólitos tem sido isolada de endófitos. Aproximadamente 80% dos fungos endofíticos produzem compostos biologicamente ativos como: antibacterianos, antitumorais e fungicidas (SCHULZ e BOYLE, 2005). Compostos químicos variados como alcaloides, esteroides, flavonoides e terpenóides são corriqueiramente sintetizados como metabólitos

secundários dos endófitos, devido os diferentes substratos degradados, que podem seguir diversas vias metabólicas (AZEVEDO et al., 2000; VERMA et al., 2009).

Os fungos endofíticos formam um grupo de organismos capazes de sintetizar inúmeras enzimas de interesse biotecnológico (Tabela 2), entre as quais destacam-se as amilases, celulasas, lipases, proteases, queratinases e quitinases, além de muitas outras que podem ser utilizadas nas indústrias (ARAÚJO et al., 2010; STAMFORD et al., 1998). BEZERRA et al. (2015) relataram o potencial de fungos endofíticos da planta medicinal *Bauhinia forficata* na produção de enzimas de interesse biotecnológico. No estudo, foi verificado que treze espécies de endófitos mostraram atividade proteolítica, destaque para *Phoma putaminum*, quatorze espécies eram positivas para celulase, destacando-se *Penicillium* sp. e *Myrmecridium schulzeri*, dez apresentaram atividade lipolítica, especialmente *P. glabrum* e todos os dezenove isolados testados foram positivos para xilanase.

Tabela 2. Fungos endofíticos produtores de substâncias bioativas com aplicação biotecnológica.

Fungo Endofítico	Hospedeiro	Substância Bioativa	Atividade	Referência
<i>Acremonium zeae</i>	<i>Zea mays</i>	Pirrocidina A	Antibacteriano	GUNATILAKA, 2006
<i>Aspergillus clavatus</i>	<i>Taxus mairei</i>	Brefeldina A	Antitumoral e Fungicida	GUNATILAKA, 2006
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Cynodon dactylon</i>	Fumigaclavina C	Fungicida	GUNATILAKA, 2006
<i>Bartalinia robillardoides</i>	<i>Aegle marmelos</i>	Taxol	Antitumoral	GANGADEVI e MUTHUMARY, 2007
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>Polysiphonia urceolata</i>	Chaetopyranina	Antioxidante	WANG et al., 2006
<i>Chaetomium</i> sp.	<i>Adenophora axilliflora</i>	Chaetominina	Alcalóide	JIAO et al., 2006
<i>Chloridium</i> sp.	<i>Azadirachta indica</i>	Javanicina	Antibacteriano	KHARWAR et al., 2008b
<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Cynodon dactylon</i>	Aspernigrina A	Fungicida	GUNATILAKA, 2006

<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Quercus variabilis</i>	Brefeldin A	Fungistático	WANG et al., 2006
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Artemisia mongólica</i>	Ácido Coletótrico	Antibacteriano	ZOU et al., 2000
<i>Colletotricum</i> sp.	<i>Ginkgo biloba</i>	Citosporona E	Antibacteriano	GUNATILAKA, 2006
<i>Cryptosporiopsis quercina</i>	<i>Tripterygeum wilfordii</i>	Criptocandina	Fungicida	STROBEL et al., 1999
<i>Cryptosporiopsis quercina</i>	<i>Tripterygeum wilfordii</i>	Criptocina	Fungicida	LI et al., 2000
<i>Entrophospora infrequens</i>	<i>Nothapodytes foetida</i>	Camptotecina	Antitumoral	SPITELLER et al., 2005
<i>Exserohilum rostrum</i>	<i>Stemona</i> sp.	11-Hidroximonocerina	Antimalárico	BORGES et al., 2009
<i>Fusarium</i> sp.	<i>Quercus variabilis</i>	Fusarusida	Antibacteriano	GUNATILAKA, 2006
<i>Fusarium solani</i>	<i>Camptotheca acuminata</i>	Camptothecina	Antitumoral	KUSARI et al., 2009
<i>Fusarium subglutians</i>	<i>Tripterygium wilfordii</i>	Subglutanol A e B	Imunossupressor	LEE et al., 1995
<i>Melanconium betulinum</i>	<i>Betula pendula</i>	Ác. 3 hidroxipropiônico	Nematicida	SCHWARZ et al., 2004
<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Atropa beladonna</i>	Preussomerina G	Antibacteriano	GUNATILAKA, 2006
<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Vincristina	Antitumoral	YANG et al., 1994
<i>Muscodor albus</i>	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Acetato de Isoamila	Fungicida	STROBEL et al., 2001
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Terminalia morobensis</i>	Pesaticina	Fungicida	GUNATILAKA, 2006
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Taxus wallichiana</i>	Taxol	Antitumoral	STROBEL, 2003
<i>Pestalotiopsis guepini</i>	<i>Wollemia nobilis</i>	Taxol	Antitumoral	STROBEL et al., 1996
<i>Periconia</i> sp.	<i>Taxus cuspidata</i>	Periconicina A	Antibacteriano	GUO et al., 2008
<i>Periconia</i> sp.	<i>Torreya grandifolia</i>	Taxol	Antitumoral	LI et al., 1998
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Erythrina crista-galli</i>	Fomol	Antibacteriano	GUNATILAKA, 2006

<i>Seimatoantlerium tepuiense</i>	<i>Maguireothammus speciosus</i>	Taxol	Antitumoral	STROBEL et al., 1999
<i>Taxomyces andreanea</i>	<i>Taxus brevifolia</i>	Taxol	Antitumoral	STIERLE et al., 1993
<i>Trametes hirsute</i>	<i>Podophyllum hexandrum</i>	Podofilotoxina	Antitumoral	PURI et al., 2006
<i>Xylaria</i> sp.	<i>Palicourea marcgravii</i>	Griseofulvina	Fungicida	CAFÊU et al., 2005

Diversos estudos relatam a síntese de substâncias bactericidas e bacteriostáticas por fungos endofíticos, como por exemplo a pesquisa de PIRES et al. (2015), que isolaram fungos endofíticos do cacto *Cereus jamacaru* e os testaram contra bactérias patogênicas ao homem. Dos sessenta endófitos testados vinte e um demonstraram atividade contra bactérias patogênica com destaque para *Trichoderma longibrachiatum*, *Gibberella fujikuroi* e *Lecythophora decumbens*, demonstrando que os endófitos isolados de cactos apresentam potencial para produção de compostos antibacterianos.

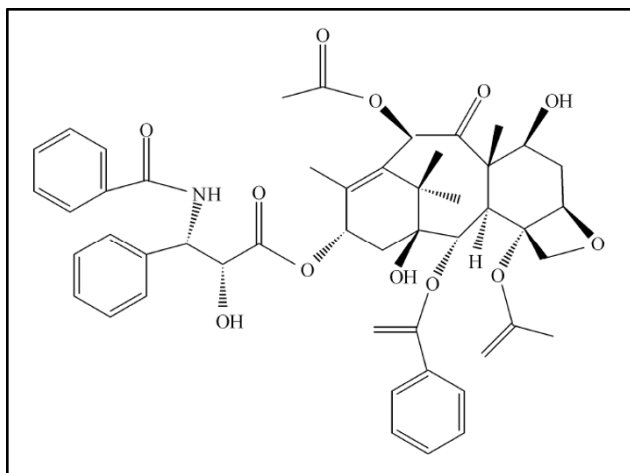
STROBEL et al. (2008) relaram a capacidade de alguns fungos endofíticos de produzirem hidrocarbonetos a partir de celulose e hemicelulose, com potencial para se tornarem combustíveis, o chamado micodiesel. Esses fungos são uma rica fonte de produção de hidrocarbonetos, pois são os primeiros microrganismos que iniciam os processos de degradação do tecido vegetal, quando uma planta morre (STROBEL, 2014a), destacando-se como os principais gêneros de endófitos produtores de hidrocarbonetos, *Ascocoryne* sp. e *Hypoxyton* sp. (MALLETTTE et al., 2014; STROBEL, 2014b; TOMSHECK et al., 2010). No estudo realizado por FERREIRA et al. (2015) com fungos endofíticos associados a planta medicinal amazônica *Carapa guianensis*, 162 isolados de fungos endofíticos foram obtidos e testados quanto a síntese de substâncias bioativas, sendo *Colletotrichum* sp. e *Pilidiella wangiensis* os que exibiram atividade antibacteriana seletiva, *Diaporthe* cf. *mayteni* e *Endomelanconiopsis endophytica* apresentaram alta atividade contra formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, além de *Colletotrichum* sp. *Guignardia mangiferae*, *Pestalotiopsis* sp. e *Diaporthe melonis* que secretaram substâncias capazes de inibir proliferação do vírus da febre amarela, o que ressalta a potencialidade desses microrganismos no fornecimento de moléculas bioativas capazes de inibir ou controlar doenças tropicais.

QADRI et al. (2014), investigaram a diversidade e o potencial antimicrobiano de fungos endofíticos associados a *Pinus wallichiana* do Ocidente Himalaia, onde um total de

130 fungos compreendendo 38 gêneros, foram isolados das folhas e caule da planta e a atividade antimicrobiana do extrato de 22 endófitos foi testada contra um ou mais patógenos. *Coniothyrium carteri*, *Truncatella betulae*, *Cochliobolus australiensis* e *Tritirachium oryzae* foram extremamente ativos contra *Candida albicans*. Os extratos de *Tritirachium oryzae* e *Coniochaeta gigantospora* destacaram-se por apresentarem atividade de amplo espectro potencialmente ativo contra as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como contra o fungo patogênico *Candida albicans*.

Um dos exemplos mais notáveis da utilização de fungos endofíticos na biotecnologia que ilustra seu potencial na produção de medicamentos foi a obtenção do taxol ou Paclitaxel® (Figura 2), um diterpenóide que apresenta atividade citotóxica muito utilizado no tratamento de câncer de mama e útero, podendo ser extraído da árvore *Taxus brevifolia*. O fungo endofítico *Taxomyces andreanea*, isolado de *Taxus brevifolia*, assim como sua hospedeira, é capaz de sintetizar o taxol, o que soluciona as questões ecológicas envolvendo o corte de centenas de árvores, além de possibilitar a produção de grandes quantidades do taxol e menor tempo (STIERLE et al., 1993).

Figura 2. Estrutura química do Taxol (Strobel, 2018).



A camptotecina é um composto bioativo de alta atividade citotóxica contra linhagens celulares de câncer humano, *in vitro*, constituindo-se como um importante precursor na produção de drogas antitumorais, o que demonstra outro exemplo de substância que é produzida tanto pelo hospedeiro vegetal, *Nothapodytes foetida*, quanto por seu endofítico, *Entrophospora infrequens* (SPITELLER et al., 2005).

Fungos endofíticos também são descritos como potenciais produtores de substâncias antidiabéticas, como o metabólito fúngico não peptídico L-783 sintetizado pelo fungo

endofítico *Pseudomassaria* sp. isolado de *Salvadora oleoides* na floresta tropical de Kinshasa, República Democrática do Congo, o qual apresentou atividade antidiabética e hipolipidêmica em ratos albinos diabéticos induzidos por glicose (DHANKHAR et al., 2013).

Estudos revelam que alguns fungos endofíticos como *Fusarium subglutinans* e *Pestalotiopsis leucothès* isolado de *Tripterygium wilfordii* produzem imunomoduladores e substâncias como o subglutanol tipo A, subglutanol tipo B, que atuam como agentes imunossupressores, drogas usadas atualmente para prevenir rejeição de aloenxerto em pacientes transplantados (KUMAR et al., 2005; PADHI et al., 2013).

Segundo THEANTANA et al. (2007, 2009) os fungos endofíticos se apresentam promissores na produção da enzima L-asparaginase em estudo com plantas medicinais da Tailândia, enzima essa que é utilizada como agente quimioterápico para o tratamento da leucemia e de linfomas malignos (APPEL, 2007; DUVAL et al., 2002).

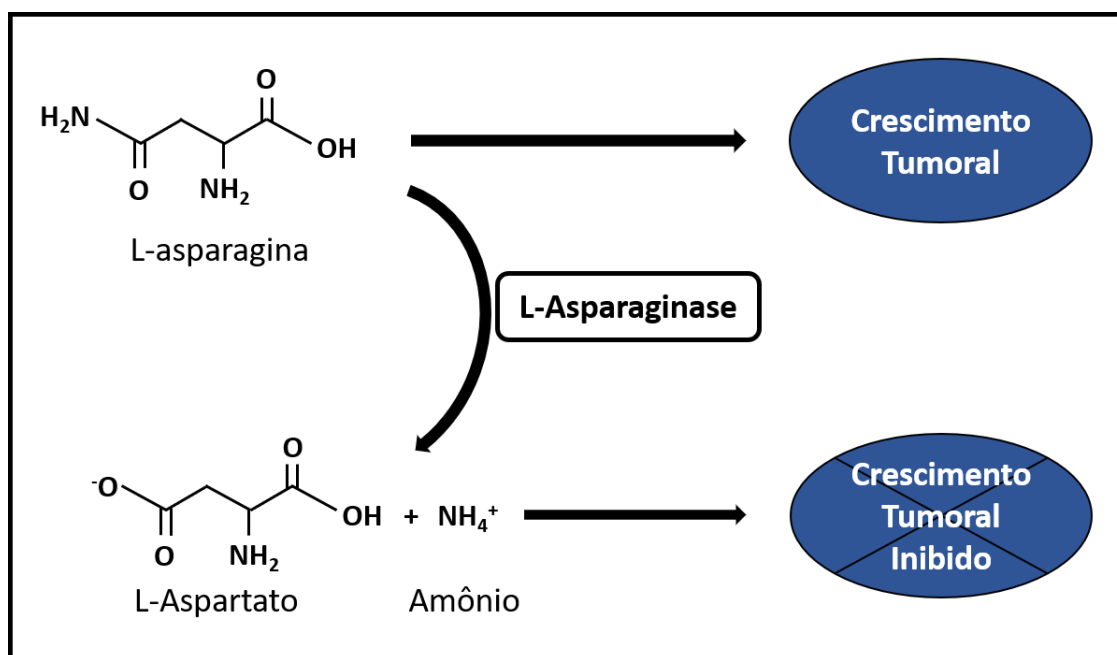
3.4. L-asparaginase

A enzima L-asparaginase (E.C. 3.5.1.1, L-asparagina amidohidrolase ou L-ASNase), é responsável por catalisar a reação de hidrólise da ligação amida da cadeia lateral da L-asparagina e/ou da L-glutamina em ácido L-aspártico e amônio (HUANG et al., 2014), sendo muito utilizada como agente quimioterápico para o tratamento de câncer humano (CAPIZZI et al., 1984), como a leucemia linfoblástica aguda (LLA), câncer que afeta sobretudo crianças e adolescentes (APPEL, 2007), além de doenças malignas do sistema linfóide, linfossarcoma e linfomas de Hodgkin (DUVAL et al., 2002), pois age privando as células cancerígenas da L-asparagina, nutriente essencial para as mesmas, inibindo o crescimento tumoral e consequentemente acarretando a morte celular por apoptose (Figura 3).

A enzima age diretamente sobre células tumorais, evitando a entrada do aminoácido L-asparagina em células cancerígenas, levando a inibição da síntese de proteínas constitutivas e regulatórias do ciclo celular, além de proteínas antiapoptóticas, resultando na morte das células malignas devido à ausência deste aminoácido (PATRO e GUPTA, 2012; PRAKASHAM et al., 2007). As células tumorais, principalmente as do sistema linfático, necessitam da L-asparagina de fonte externa para realizar a síntese de proteínas, pois não contam com a enzima L-asparagina sintetase ou produzem em baixas quantidades, desta forma elas não conseguem se desenvolver e se multiplicar na presença da enzima L-asparaginase no meio extracelular (EL-NAGGAR et al., 2014), porém as

células saudáveis não são afetadas, pois ao contrário das tumorais, são capazes de produzir e utilizar a enzima L-asparagina sintetase em quantidade adequada (VAN DEN BERG, 2011). A L-asparaginase pode ser encontrada em vários organismos como plantas, fungos, bactérias e no soro de alguns animais como roedores, porém não está presente em seres humanos (EL-BESSOUMY et al., 2004).

Figura 3. Ilustração esquemática do mecanismo de ação da L-asparaginase. Adaptada de SCHULZ et al. (2002).



A pesquisa de LANG (1904) foi a primeira a relatar a reação de hidrólise da L-asparagina em L-aspartato e amônio catalisada pela enzima L-asparaginase presente em tecidos bovinos, porém a atividade antitumoral da enzima só foi constatada no trabalho de MASHBURN e WRISTON (1964), onde os pesquisadores demonstraram capacidade da L-asparaginase produzida por *Escherichia coli* em inibir tumores em roedores. O estudo realizado por BROOME (1965) com transplantes de linfossarcoma em ratos mostrou que há uma dependência nutricional das células malignas pela L-asparagina exógena, o que correlacionou a inibição tumoral com a ação hidrolítica da enzima, impulsionando os futuros trabalhos ligados a L-asparaginase.

A L-asparaginase pode ser utilizada como medicamento pelo paciente durante todo o tratamento e durante a fase de indução/remissão da doença, podendo ser combinada com outros medicamentos como corticosteroides, além de outros agentes quimioterápicos como o metotrexato, mercaptopurina e vincristina, o que pode potencializar a ação da

enzima, melhorando os resultados do tratamento (ANDRADE et al., 2014). Devido ao amplo aparato enzimático, rápido desenvolvimento em meios simples e fácil modificação genética os microrganismos são considerados fonte primária da enzima L-asparaginase e sua produção é realizada principalmente através do processo de fermentação submersa ou fermentação em meio líquido (DESHPANDE et al., 2014; LOPES et al., 2017; THAKUR et al., 2014). De acordo com CASALE et al. (1983) a bactéria *E. coli* é capaz de sintetizar dois tipos de enzimas antitumorais, a L-asparaginase I ou EC1, de origem citoplasmática e a L-asparaginase II ou EC2, com origem na matriz periplasmática, porém apenas a L-asparaginase II tem atividade antitumoral (WHITECAR et al., 1970).

Atualmente a L-asparaginase vendida comercialmente é de origem bacteriana e apresentada em três diferentes formas de formulação, duas formas naturais produzidas por *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* (Elspar® e Erwinase®), além de uma terceira (Oncaspar®) produzida pela conjugação da enzima L-asparaginase de *Escherichia coli* e polietilenoglicol (Narta et al., 2007). A utilização da L-asparaginase bacteriana por longos períodos pode induzir resposta do sistema imunológico do paciente, levando a produção de anticorpos antiasparaginase, acarretando na resistência, sensibilidade e redução da eficácia do medicamento, além de quadros de alergia que incluem erupções cutâneas, prurido, urticária, bronco espasmo, hipotensão e em casos raros choque anafilático (AVRAMIS, 2012; PIETERS et al., 2012), o que faz com que a utilização da enzima de origem procariótica muitas vezes seja desvantajosa.

A toxicidade da L-asparaginase não é causada realmente por essa enzima, e sim por outras amido-hidrolases, como a L-glutaminase, enzimas contaminantes de difícil eliminação durante a síntese da asparaginase, que muitas vezes resulta em reações de hipersensibilidade, como choque anafilático (DORIYA e KUMAR, 2016). Desta forma a busca por uma fonte eucariótica de L-asparaginase a partir de fungos, mostra-se muito promissora, minimizando as reações alérgicas, a sensibilidade ao medicamento e os efeitos colaterais (SARQUIS et al., 2004), logo a produção industrial de L-asparaginase tem como principal desafio a busca por novos microrganismos capazes de produzirem a enzima com menos efeitos adversos.

Além da aplicação medicinal, a L-asparaginase tem um papel fundamental na indústria de alimentos, pois é utilizada na prevenção da formação de acrilamida em alimentos processados sob altas temperaturas, visto que a acrilamida possui efeitos neurotóxicos e apresenta propriedades carcinogênicas para seres humanos (ARISSETO e TOLEDO, 2006; DIAS et al., 2016; MOHAN KUMAR et al., 2013). A acrilamida (C_3H_5NO) é

um dos produtos formados na reação de Maillard, que ocorre entre açúcares redutores e aminoácidos, como a asparagina presente nos alimentos de origem animal e vegetal, quando estes são submetidos a altas temperaturas, entretanto esse fenômeno não ocorre em alimentos cozidos (TAREKE et al., 2000). Desta forma a L-asparaginase tem o papel de catalisar a reação de hidrólise da asparagina presente nos alimentos, antes que essa consiga reagir quimicamente com os açúcares redutores, formando a acrilamida (DAMODARAN et al., 2010). Segundo ZYZAK et al. (2003), a utilização da enzima L-asparaginase antes do processamento térmico do alimento reduziria mais de 99% do nível de acrilamida no produto final processado, pois a enzima hidroliza cerca de 88% da concentração de L-asparagina no alimento *in natura*.

Os fungos têm sido amplamente investigados quanto a produção de L-asparaginase, por sua maior compatibilidade com o sistema imunológico humano, desta forma novos estudos têm sido realizados com o objetivo de melhorar o processo de produção e estabelecer novas metodologias para a síntese da enzima (SARQUIS et al., 2004). Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são os mais estudados quanto a produção da L-asparaginase (DANGE e PESHWE, 2015), porém a atividade da enzima também foi demonstrada por fungos de diversos gêneros como *Alternaria*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Nigrospora*, *Paecilomyces*, *Phaeotrichoconis*, *Phoma* e *Pithomyces* (THIRUNAVUKKARASU et al., 2011).

LOUREIRO et al. (2012) avaliaram de forma pioneira a L-asparaginase de fungos como um agente antitumoral em linhagens de células humanas. No trabalho os pesquisadores purificaram e caracterizaram a L-asparaginase nativa produzida por *Aspergillus terreus*, bem como sua forma modificada com polietilenoglicol (PEG), avaliando e comparando suas atividades antiproliferativas ao fim do processo. A enzima produzida por *A. terreus*, cujo o pH e temperatura ótimos foram de 9,0 e 40 ° C respectivamente, apresentaram 100% da atividade nestes padrões por 120 minutos. A L-asparaginase combinada com polietilenoglicol foi mais resistente à tripsina do que a enzima nativa, entretanto, a L-asparaginase nativa não apresentou citotoxicidade contra células normais humanas e mostraram efeitos antiproliferativos após 72 h de incubação.

3.5. Fungos Endofíticos Produtores de L-asparaginase

A pesquisa de metabólitos antitumorais produzidos por fungos endofíticos se iniciou na década de 1990 com a descoberta do fungo *Taxomyces andreanea* endófito de *Taxus*

brevifolia, assim como a produção do Taxol por esse fungo, desenvolvendo, portanto, o conceito de endófitos como fonte de novas drogas antineoplásicas (STILER et al., 1993; STROBEL, 1993). Vários estudos demonstraram que fungos endofíticos podem sintetizar inúmeros compostos com atividades biológicas de interesse, tais como antitumorais (CHANDRA, 2012; JIN-LONG et al., 2011), dentre esses, a enzima L-asparaginase (THEANTANA et al., 2009).

Os fungos endofíticos produtores de L-asparaginase são bastante diversos e vários trabalhos no mundo destacam os inúmeros gêneros e espécies capazes de sintetizar essa enzima (Tabela 3), THEANTANA et al. (2009) pesquisaram os principais fungos endofíticos produtores de L-asparaginase presentes em plantas medicinais na Tailândia. Os resultados dos trabalhos mostraram que os principais fungos produtores dessa enzima pertencem aos gêneros *Colletotrichum*, *Eupenicillium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Talaromyces*.

Tabela 3. Principais gêneros de fungo endofíticos descritos como produtores de L-Asparaginase.

Gênero do Endófito	Espécies Hospedeiras	Referências
<i>Acremonium</i>	<i>Lagerstroemia microcarpa</i>	NAGARAJAN et al., 2014
<i>Alternaria</i>	<i>Macaranga peltata</i> ; <i>Sargassum</i> sp.; <i>S. wightii</i> ; <i>Litsea floribunda</i> ; <i>Terminalia paniculata</i> ; <i>Turbinaria</i> sp.; <i>Stoechospermum marginatum</i> ; <i>Syzygium densiflorum</i> ; <i>Withania somnifera</i>	MOHARRAM et al., 2016; NAGARAJAN et al., 2014; THIRUNAVUKKARASU et al., 2011
<i>Aspergillus</i>	<i>Cassia fistula</i> ; <i>Cereus jamacaru</i> ; <i>Sueada maritime</i> ; <i>W. somnifera</i>	KALYANASUNDARAM et al., 2015; MOHARRAM et al., 2016; NAGARAJAN et al., 2014; SANTOS et al., 2015
<i>Botrytis</i>	<i>Daphniphyllum neilgherrensi</i>	NAGARAJAN et al., 2014
<i>Chaetomium</i>	<i>Grateloupia lithophila</i> ; <i>Ulva fasciata</i> ; <i>U. lactuca</i> ; <i>Padaina tetrastromatica</i> ; <i>Halymenia</i> sp.; <i>S. marginatum</i> ; <i>W. somnifera</i>	MOHARRAM et al., 2016; THIRUNAVUKKARASU et al., 2011
<i>Cladosporium</i>	<i>Diospyros montana</i> ; <i>Portieria hornemonii</i> ; <i>G. lithophila</i> ; <i>S. wightii</i> ; <i>Sargassum</i> sp.; <i>U. lactuca</i> ; <i>W. somnifera</i>	MOHARRAM et al., 2016; NAGARAJAN et al., 2014; THIRUNAVUKKARASU et al., 2011

Colletotrichum	<i>Adenanthera microsperma</i> ; <i>Betula alnoides</i> ; <i>Cassia alata</i> ; <i>Caulerpa racemosa</i> ; <i>Hiptage benghalensis</i> ; <i>Houttuynia cordata</i> ; <i>Oldenlandia difusa</i> ; <i>Pereskia bleo</i> ; <i>Sargassum</i> sp.; <i>Tabernaemontana heyneana</i> ; <i>Turbinaria</i> sp.	CHOW e TING, 2015; MANASA e NALINI, 2014; THEANTANA et al., 2009; THIRUNAVUKKARASU et al., 2011
Corynespora	<i>W. somnifera</i> ; <i>Eunonymos undulates</i> ; <i>Ligustrum roxburghii</i>	NAGARAJAN et al., 2014;
Curvularia	<i>Caulerpa scalpelliformis</i> ; <i>L. floribunda</i> ; <i>Sargassum</i> sp.; <i>S. wightii</i> ; <i>T. heyneana</i> ; <i>Turbinaria</i> sp.	MANASA e NALINI, 2014; NAGARAJAN et al., 2014; THIRUNAVUKKARASU et al., 2011
Cylindrocladium	<i>Cycas</i> sp.	NAGARAJAN et al., 2014
Diaporthe	<i>Myracrodruon urundeuva</i>	PÁDUA et al., 2018
Eupenicillium	<i>A. microsperma</i> ; <i>B. alnoides</i> ; <i>C. alata</i> ; <i>H. benghalensis</i> ; <i>H. cordata</i>	THEANTANA et al., 2009
Eurotium	<i>Curcuma longa</i>	JALGAONWALA e MAHAJAN, 2014
Fusarium	<i>A. microsperma</i> ; <i>B. alnoides</i> ; <i>C. alata</i> ; <i>C. jamaru</i> ; <i>Carica papaya</i> ; <i>Cymbopogon citratus</i> ; <i>Calibarba arborea</i> ; <i>Gracillaria edulis</i> ; <i>H. benghalensis</i> ; <i>H. cordata</i> ; <i>Murraya koenigii</i> ; <i>O. difusa</i> ; <i>T. heyneana</i> ; <i>P. bleo</i> ; <i>Turbinaria</i> sp.; <i>Sargassum</i> sp.; <i>S. wightii</i>	CHOW e TING, 2015; KUMAR et al., 2016; MANASA e NALINI, 2014; NAGARAJAN et al., 2014; SANTOS et al., 2015; THEANTANA et al., 2009
Gibberella	<i>C. jamaru</i>	SANTOS et al., 2015
Lasiodiplodia	<i>Cordia oblique</i> ; <i>L. floribunda</i>	NAGARAJAN et al., 2014
Nigrospora	<i>Jamia adherens</i> ; <i>Turbinaria</i> sp.; <i>U. fasciata</i> ; <i>U. lactuca</i> ; <i>G. lithophila</i>	THIRUNAVUKKARASU et al., 2011
Paecilomyces	<i>Caulerpa scalpelliformis</i> ; <i>Turbinaria</i> sp.	THIRUNAVUKKARASU et al., 2011;
Penicillium	<i>A. microsperma</i> ; <i>B. alnoides</i> ; <i>C. alata</i> ; <i>C. jamaru</i> ; <i>C. scalpelliformis</i> ; <i>Caulerpa sertularioides</i> ; <i>C. racemosa</i> ; <i>H. benghalensis</i> ; <i>H. cordata</i> ; <i>Halimeda macroloba</i> ; <i>P. hornemonii</i> ; <i>Pereskia bleo</i> ; <i>Tillandsia catimbauensis</i>	CHOW e TING, 2015; SANTOS et al., 2015; SILVA et al., 2018; THEANTANA et al., 2009

<i>Pestalotiopsis</i>	<i>Litsia cubeba</i> ; <i>Terminalia bellerica</i>	NAGARAJAN et al., 2014;
<i>Petromyces</i>	<i>W. somnifera</i>	MOHARRAM et al., 2016
<i>Phaeotrichoconis</i>	<i>Turbinaria</i> sp.;	THIRUNAVUKKARASU et al., 2011
<i>Phoma</i>	<i>C. citratus</i> ; <i>Sargassum</i> sp.	CHOW e TING, 2015; THIRUNAVUKKARASU et al., 2011
<i>Phomopsis</i>	<i>Portieria hornemonii</i> ; <i>T. heyneana</i> ;	MANASA e NALINI, 2014; THIRUNAVUKKARASU et al., 2011
<i>Pithomyces</i>	<i>Sargassum</i> sp.;	THIRUNAVUKKARASU et al., 2011
<i>Pleospora</i>	<i>W. somnifera</i>	MOHARRAM et al., 2016
<i>Sarocladium</i>	<i>M. urundeuva</i>	PÁDUA et al., 2018
<i>Sordaria</i>	<i>Cordia wallichii</i>	NAGARAJAN et al., 2014
<i>Talaromyces</i>	<i>A. microsperma</i> ; <i>B. alnoides</i> ; <i>C. alata</i> ; <i>Curcuma amada</i> ; <i>H. benghalensis</i> ; <i>H. cordata</i> ; <i>M. urundeuva</i> ; <i>T. catimbauensis</i>	KRISHNAPURA e BELUR 2016; PÁDUA et al., 2018; SILVA et al., 2018; THEANTANA et al., 2009
<i>Verticillium</i>	<i>T. heyneana</i>	MANASA E NALINI, 2014
<i>Volutella</i>	<i>T. heyneana</i>	MANASA E NALINI, 2014

THIRUNAVUKKARASU et al. (2011) constataram que a asparaginase também pode ser sintetizada por endófitos de algas marinhas. Entre os principais gêneros produtores, os que mais se destacaram são: *Alternaria*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Nigrospora*, *Paecilomyces*, *Phaeotrichoconis*, *Phoma* e *Pithomyces*.

Alternaria sp., *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp. e *Fusarium* sp. isolados de algas marinhas e plantas medicinais na Índia apresentaram máxima atividade de asparaginase no estudo conduzido por THANGAVEL et al. (2013), além disso os resultados mostraram que esses fungos produziram a L-asparaginase livre da glutaminase, cuja atividade pode causar efeitos colaterais adversos, como respostas alérgicas e anafilaxia nos pacientes sensíveis a glutaminase.

No estudo realizado por MANASA e NALINI (2014) os endófitos de várias partes da planta medicinal indiana *Tabernaemontana heyneana*, foram isolados e testados quanto a síntese da asparaginase. Foram obtidos 727 isolados pertencentes a 20 taxa, destacando-se os gêneros *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Phomopsis*, *Verticillium* e *Volutella*.

Fusarium graminearum e *Fusarium verticillioides* exibiram um alto nível de atividade enzimática entre os endófitos testados (0,95 U/mL e 1,13 U/mL respectivamente).

Novas metodologias são desenvolvidas no estudo da produção de asparaginase, de modo que os pesquisadores possam saber se o fungo é capaz de sintetizá-la e possam quantificar essa enzima produzida. Entre as metodologias usadas pode-se destacar a metodologia qualitativa descrita no estudo de PATIL et al. (2012), que desenvolveram um novo método de triagem seletiva de fungos endofíticos de *Aegle marmelos* na produção de asparaginase. A metodologia consiste em inocular o fungo no meio ágar Czapek Dox modificado com vermelho de fenol, indicador que muda de coloração com a variação do pH do meio, tornando-se amarelo em meio ácido e rosa em meio básico.

Em geral os estudos com a atividade enzimática da asparaginase são qualitativos, ou seja, quando se procura observar a síntese da enzima, contudo, sem quantificá-la, como no trabalho de CHOW e TING (2015), onde isolaram e testaram a capacidade de produção de L-asparaginase por fungos endofíticos de quatro plantas medicinais com propriedades anticancerígenas, *Cymbopogon citratus*, *Murraya koenigii*, *Oldenlandia diffusa* e *Pereskia bleo*. Foi verificado que dos 89 isolados, cerca de 28% apresentaram atividade enzimática para L-asparaginase, detectada pela formação de halos rosados em ágar, resultado de hidrólise de asparagina em ácido aspártico e amônia, que converte o indicador vermelho de fenol da cor amarela (pH ácido) para a rosa (pH básico). *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Phoma* foram os principais gêneros de endófitos isolados.

JALGAONWALA e MAHAJAN (2014) isolaram cepas de fungos endofíticos *Eurotium* sp. de rizomas de *Curcuma longa* e avaliaram quanto à produção de asparaginase em ensaio qualitativo em ágar Czapek dox modificado e quantitativo pelo método de Nesslerization. A atividade enzimática máxima foi verificada à temperatura de 40 °C e pH 8,0, havendo formação de um halo enzimático de 2,3 cm e produção de 1.304 U/mL de asparaginase.

No estudo de SANTOS et al. (2015) fungos endofíticos isolados do cacto *Cereus jamacaru* apresentaram capacidade de produção de L-asparaginase em meio sólido e líquido. Testes iniciais em meio sólido verificaram que 68% dos fungos isolados de *C. jamacaru* exibiram a formação de halo ao redor da colônia fúngica, indicando a capacidade de produção da enzima. Em meio líquido, 43% dos endófitos produziram a enzima L-asparaginase. *Aspergillus ochraceus*, *A. japonicus*, *A. terreus*, *A. sydowii*, *Fusarium oxysporum*, *Gibberella fujikuroi* e *Penicillium brevicompactum* apresentaram maior capacidade de sintetizar L-asparaginase.

As pesquisas com asparaginase também podem ter carácter quantitativo, quando a síntese da proteína é mensurada em unidades da enzima por mililitro de extrato bruto (U/mL) ou unidades da enzima por grama de biomassa fungica (U/g), como KUMAR et al. (2016), que isolaram e caracterizaram fungos produtores de L-asparaginase de folhas das plantas medicinais *Azadirachta indica*, *Carica papaya* e *Ocimum tenuiflorum* na Índia. Utilizando o meio líquido Czapek-Dox modificado suplementado com L-asparagina, os pesquisadores testaram os dez isolados obtidos das plantas quanto a síntese da enzima e dois isolados exibiram produção significativa. *Fusarium* sp. apresentou maior atividade enzimática (111,07 U/mL).

KRISHNAPURA e BELUR (2016) isolaram microrganismos endófitos dos rizomas de cinco plantas medicinais da família Zingiberaceae, entre eles bactérias, actinomicetos e fungos, para testá-los quanto a síntese de asparaginase. Dentre todos os microrganismos, o fungo *Talaromyces pinophilus* isolado de *Curcuma amada* apresentou a maior atividade de L-asparaginase (108,95 U/mL), o que demonstra o grande potencial dos fungos endofíticos em relação a outros organismos na produção desta enzima.

Estudos sobre a otimização da síntese da L-asparaginase estão sendo realizados com maior frequência nos últimos anos, visando novas metodologias que permitam a produção em larga escala, por exemplo correlacionando a exigência nutricional do fungo com a produtividade enzimática. HERMANTO e TING (2015) sugeriram em sua pesquisa que fontes de nitrogênio impactam no crescimento de fungos e na sua biomassa, o que consequentemente influencia a produção de L-asparaginase. Na pesquisa foram utilizadas duas fontes de nitrogênio, L-asparagina e nitrato de sódio na produção de L-asparaginase pelo endófito *Fusarium* sp. Os resultados revelaram que o nitrato de sódio promoveu níveis baixos da enzima (0,65 U/mL), se comparado com a L-asparagina (3,01 U/mL), o que confirma a hipótese da correlação nutricional.

KALYANASUNDARAM et al. (2015) publicaram um artigo sobre a otimização da produção de L-asparaginase por fungos endofíticos isolados da planta sarça do mar (*Sueada marítima*). Dentre os isolados analisados *Aspergillus* sp. demonstrou atividade enzimática máxima de 35,28 U/ml, após cinco dias de fermentação, em pH 7 à 30 °C, diferentes fontes nutricionais como glicose, sulfato de amônio e substrato a base de farelo de trigo foram testados na otimização do processo, obtendo bons resultados (26,5 U/mL, 24,6 U/mL e 35,72 U/mL respectivamente).

CHOW e TING (2017) estudaram a influência das concentrações de glicose e L-asparagina na produção de L-asparaginase por cinco fungos endofíticos. A otimização da

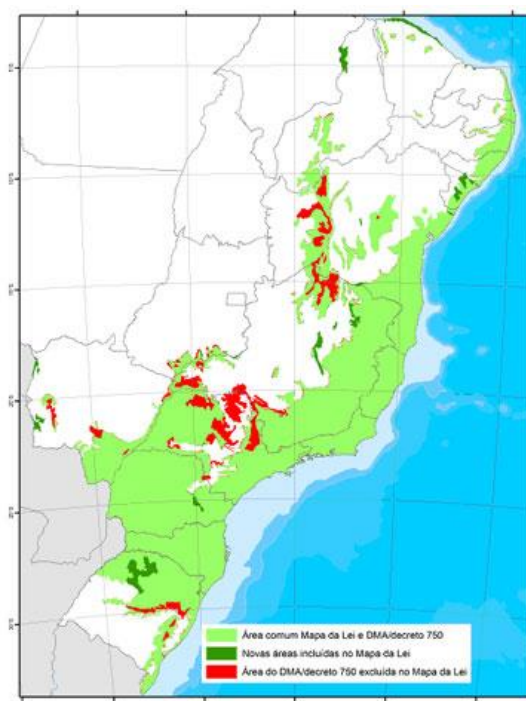
produção da enzima foi feita através do cultivo desses fungos em diferentes concentrações de glicose e L-asparagina, por um período de 20 dias. Os resultados revelaram que a suplementação com L-asparagina induziu maiores atividades de L-asparaginase em comparação com a fonte de glicose, desta forma o estudo revela que fontes de nitrogênio, como a L-asparagina são mais efetivas que fontes de carbono na indução da atividade desta enzima.

3.6. Mata Atlântica

A Mata Atlântica é a segunda maior floresta tropical do continente americano, estendendo-se ao longo da costa brasileira até o interior sul do país, abrangendo também o leste do Paraguai e o nordeste da Argentina (TABARELLI et al., 2005).

A Mata Atlântica brasileira (figura 4) é classificada como uma floresta ombrófila densa, com áreas de transição entre floresta estacional semidecidual, floresta estacional decidual, encraves de campos de altitude e brejos de altitude, associada também a ecossistemas costeiros de restinga, mussunungas e mangue, ocupando cerca de 1.110.182 km², correspondendo a 13,04% do território nacional e cerca de 28% da cobertura vegetal original (REZENDE et al., 2018).

Figura 4. Distribuição da Mata Atlântica brasileira (INPE, 2009).



A floresta possui clima tropical úmido, com temperaturas que variam entre 22 e 25 °C e período seco de 2 a 5 meses (OLIVEIRA-FILHO e FONTES, 2000). Devido à sua riqueza extremamente alta de espécies endêmicas de plantas vasculares, anfíbios, répteis, aves e mamíferos, o bioma da Mata Atlântica está classificado entre os principais *hotspots* de biodiversidade do mundo (MYERS et al., 2000).

Nos últimos 500 anos, a Mata Atlântica foi explorada e destruída, sendo substituída inicialmente por cana-de-açúcar na região nordeste durante o século XVI e depois pelo café no Rio de Janeiro e São Paulo entre os séculos XVIII e XIX, por pecuária em São Paulo e Minas Gerais entre os séculos XIX e XX, pelo cacau na Bahia no século XX, e mais recentemente pela floresta de eucalipto para celulose para produção de papel (COLOMBO e JOLY, 2010).

Para proteger a diversidade biológica, a estratégia mais utilizada tem sido a conservação de ecossistemas naturais em unidades de conservação da natureza (ALMEIDA et al., 2011), como a Reserva Biológica de Pedra Talhada (AL) e o Parque Nacional e Histórico de Monte Pascoal (BA).

Aproximadamente 500 espécies de plantas e animais que ocorrem no bioma estão oficialmente ameaçadas a nível do bioma, outras a nível nacional e algumas a nível global, além disso muitas dessas espécies não são encontradas em áreas protegidas, o que indica a necessidade de se racionalizar e expandir o atual sistema de unidades de conservação (TABARELLI et al., 2005).

Estudos em florestas tropicais sugerem que a diversidade de fungos endofíticos é muito maior nos trópicos que nas regiões temperadas (CANNON e SIMMONS, 2002). Levando-se em consideração a ampla diversidade de fungos, principalmente em regiões temperadas e de clima tropical há grandes chances de se encontrar novas espécies de fungos, principalmente microscópicos, cujos dados ecológicos são escassos e pouco estudados, por ocuparem de forma oculta, habitats particulares, como é o caso dos fungos endofíticos, o que constitui uma fonte promissora de diversidade genética (STONE et al., 2004; STROBEL e DAISY, 2003). Entre os principais *hotspots* de biodiversidade mundial, a Mata Atlântica apresenta cerca de 8.000 espécies de plantas endêmicas, o que corresponde a 2,7% de todas as espécies vegetais mundiais (MYERS et al., 2000). Dentre essas encontra-se a *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos (CAMILLO e SALOMÃO, 2016), chamada popularmente de ipê-amarelo.

3.7. Ipê-amarelo

A família Bignoniaceae é composta por cerca de 827 espécies de plantas lenhosas distribuídas em 82 gêneros (OLMSTEAD et al., 2009). Predominantemente neotropical, a família encontra-se distribuída por todo o Brasil, abrangendo cerca de 100 espécies popularmente chamadas de ipê (GENTRY, 1992; SOUZA e LORENZI, 2005). Durante muitos anos, quase todas as espécies de ipês no Brasil pertenciam ao gênero *Tabebuia*, um dos maiores de Bignoniaceae, porém estudos filogenéticos recentes baseado em dados moleculares mostraram que *Tabebuia* é polifilético, subdividindo o táxon em três gêneros distintos: *Handroanthus*, *Roseodendron* e *Tabebuia* (GROSE e OLMSTEAD, 2007).

Handroanthus chrysotrichus (Mart. ex DC.) Mattos, também conhecida como Ipê-amarelo (Figura 5) é uma espécie florestal nativa que apresenta madeira pesada, durável e muito utilizada na arborização urbana e na ornamentação devido à beleza de seu porte e de suas flores (FONSECA et al., 2005).

Figura 5. Exemplar de *Handroanthus chrysotrichus* (Ipê-amarelo).

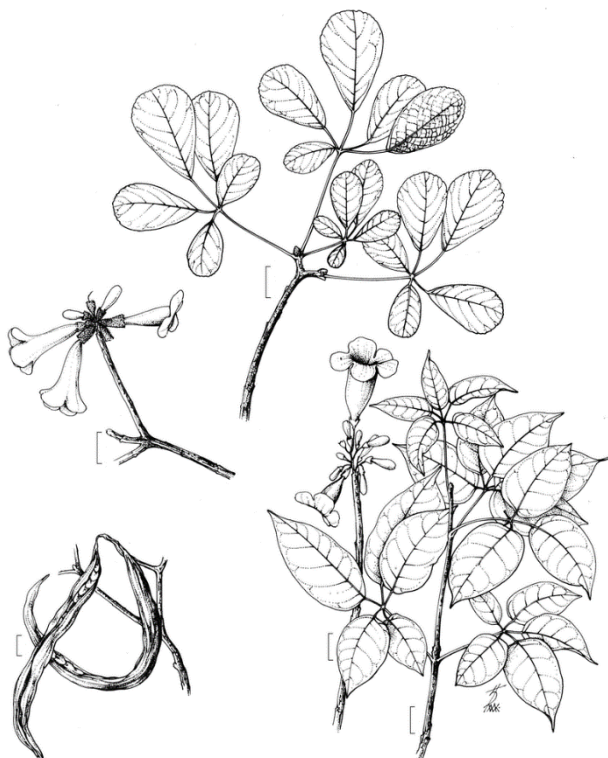


Fonte: Rede de catálogos polínicos online, 2019.

Handroanthus chrysotrichus apresenta ampla distribuição, ocupando a faixa litorânea, desde o Maranhão até o Rio Grande do Sul (BACKES e IRGANG, 2003). O ipê-amarelo é uma planta heliófita, características de áreas abertas da floresta ombrófila densa, restingas e frutícetos, com dispersão descontínua e irregular, ocorrendo geralmente em

baixa frequência, sendo encontrada entre 0 a 1000 metros acima do nível do mar (BORGIO et al., 2011). *H. chrysotrichus* é uma árvore de pequeno porte, com 3 a 10 metros de altura, possui copa globosa densa e tronco parcialmente tortuoso e cilíndrico de 30 a 40 cm de diâmetro. Possui folhas opostas, compostas palmadas com três a cinco folíolos oblongos membranáceos a cartáceos, inteiros denteados próximo ao ápice (Figura 6). Possui inflorescência em tirso ou fascículo e flores subsésseis, na época de floração, a planta perde as suas folhas, havendo maior destaque para o amarelo das flores neste período. O fruto é do tipo cápsula linear cilíndrica, deiscente, com intensa pubescência castanha, com 11 a 38 cm de comprimento e 0,8 a 1,2 cm de largura, contendo muitas sementes aladas (BACKES e IRGANG, 2003; CARVALHO et al., 1976).

Figura 6. Ilustração de *Handroanthus chrysotrichus* (Ipê-amarelo).



Fonte: SANTOS et al. (2013).

Posição taxonômica (DAHLGREN, 1989)

Divisão: Magnoliophyta (Angiospermae)

Classe: Magnoliopsida (Dicotyledonae)

Ordem: Lamiales

Família: Bignoniaceae

Espécie: *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos

O ipê-amarelo é árvore ornamental indicada para arborização urbana devido ao seu pequeno porte e aspecto paisagístico bastante atrativo. Por apresentar crescimento rápido e ser freqüentemente encontrada em formações secundárias é importante em reflorestamentos mistos para a recuperação de áreas degradadas (LORENZI, 2008).

A madeira moderadamente pesada, muito resistente e de grande durabilidade é usada em construções pesadas e estruturas externas, como postes, peças para pontes, cercas e em construções internas como tábuas para assoalho, tacos, molduras e rodapés, além de ser tilizada na fabricação de móveis (BORGO et al., 2011).

4. METODOLOGIA

4.1. Área de coleta

As coletas foram realizadas na Reserva Biológica de Pedra Talhada (09°15'26.8"S, 36°25'53.7"W), localizada em área de Mata Atlântica no nordeste do Brasil, durante a estação chuvosa (julho de 2018). A unidade de conservação apresenta área de 4.469 hectares distribuídos entre os municípios de Quebrangulo e Chã Preta, em Alagoas, e Lagoa do Ouro e Correntes, em Pernambuco. A área de estudo inclui diferentes fitofisionomias da Floresta Sazonal e Caatinga, representando enclaves de floresta úmida cercados por floresta seca, com temperatura média anual de 25 °C e precipitação média anual de 1.628 mm. O clima é marcado por duas estações características, uma estação seca que ocorre de outubro a fevereiro e uma estação chuvosa de março a setembro (ICMBIO, 2017).

4.2. Material vegetal

Amostras de folhas de quatro indivíduos de ipê-amarelo [*Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos] foram coletadas aleatoriamente em área antropizada da Reserva Biológica de Pedra Talhada na estação chuvosa. Após a coleta, o material vegetal foi devidamente acondicionado em sacos de papel e processados no laboratório em até 48 horas. A coleta de materiais vegetais foi autorizada pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) / Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio); número de permissão: 63010-1, emitido em julho de 2018.

4.2.1. Isolamento de Fungos Endofíticos a partir das Folhas

Para eliminar microrganismos epifíticos, o material botânico coletado foi desinfetado superficialmente como descrito por SIQUEIRA et al. (2011). As amostras de folhas *H. impetiginosus* foram lavadas em água corrente, seguida por imersão em etanol a 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio (2,0% a 2,5% de cloro disponível) por 3 minutos, em etanol a 70% por 30 segundos e lavadas três vezes com água destilada esterilizada. A eficiência da desinfecção foi confirmada pela inoculação de 1mL da última água de lavagem em placas de Petri contendo o meio de cultura batata-dextrose-água (BDA).

Após o processamento as folhas foram fragmentadas com auxílio de uma lâmina de bisturi esterilizada, obtendo-se 45 fragmentos (1cm²) por indivíduo, totalizando 180 fragmentos, os quais foram inoculados em placas de Petri contendo BDA suplementado com cloranfenicol (100 mg/L) e tetraciclina (50 mg/L) para restringir o crescimento bacteriano. Todas as placas foram incubadas a 28 ± 2 °C por até 15 dias. O crescimento fúngico foi observado diariamente e todas as colônias foram isoladas, purificadas e mantidas em BDA a 28 ± 2 °C para posterior identificação.

4.3. Identificação Morfológica dos Fungos Endofíticos

A identificação com base das características morfológicas foi realizada observando-se características macroscópicas das colônias (cor, aspecto, consistência, presença de pigmento, etc.) e características microscópicas (morfologia de estruturas somáticas e reprodutivas). Para os fungos filamentosos foram realizados microcultivos em lâmina (Riddell, 1950) com diferentes meios de cultura (BDA, ágar extrato de malte, ágar Czapeck, ágar Czapeck extrato de levedura, dentre outros), a depender do gênero isolado, para observação das características morfológicas. Chaves taxonômicas foram utilizadas e na sequência as espécies foram identificadas com descrições específicas comparativas de acordo com a literatura especializada como exemplo: BARNETT e HUNTER, 1987; SUTTON, 1980; SIVANESAN, 1984; HANLIN e MENEZES, 1996; SAMSON e FRISVAD, 2004; DOMSCH et al., 2007).

4.4. Identificação Molecular dos Fungos Endofíticos

4.4.1. Extração, amplificação de fragmentos do DNA e Sequenciamento

Para extração do DNA, as culturas representativas de cada morfotipo foram cultivadas em BDA e incubadas a 25 °C por 7 dias. O micélio de cada fungo, separadamente, foi transferido para microtubos de 2 mL com tampa rosqueável, acrescidos com 0,5 g de esferas de vidro. Em seguida, a biomassa foi triturada em alta velocidade por agitação com o auxílio do aparelho FastPrep. A extração de DNA seguiu o protocolo proposto pelo Kit de extração Wizard® SV Genomic DNA Purification System do fabricante Promega. Parte do gene β -tubulina foi amplificada utilizando os primers Bt2a e Bt2b (GLASS e DONALDSON, 1995).

Após as análises das regiões β -tubulina e ITS do rDNA outros loci tais como *TEF1*, *RPB2* e calmodulina, foram selecionados de acordo com cada gênero ou grupo taxonômico dos fungos (GROENEWALD et al., 2013). As análises de PCR foram realizadas conforme descrito por BEZERRA et al. (2017). Os produtos amplificados foram purificados e sequenciados na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento e Expressão Gênica do Centro de Biociências da UFPE.

4.4.2. Alinhamento das Sequências e Análise Filogenética

Os cromatogramas do sequenciamento foram analisados para auxiliar na edição manual das sequências. As sequências obtidas foram preliminarmente comparadas com sequências similares depositadas no GenBank do NCBI utilizando a ferramenta BLASTn, alinhadas na interface online MAFFT v.6 (KATO e TOH, 2010) e editadas no MEGA v.7 (KUMAR et al., 2016).

A análise de Máxima Verossimilhança foi realizada no MEGA v. 7 (KUMAR et al., 2016) utilizando o modelo de substituição de nucleotídeos estimado conforme o MrModelTest v. 2.3 (NYLANDER, 2004). A análise bayesiana (1×10^6 gerações) foi realizada no MrBayes no XSEDE hospedado no portal científico da CIPRES (MILLER et al., 2010). As árvores obtidas foram visualizadas com TreeView v. 1.6.6 (Page, 1996).

4.5. Análises Estatísticas e Ecológicas

As comunidades dos fungos em cada indivíduo vegetal foram avaliadas em termos quantitativos e qualitativos (frequência de ocorrência, abundância relativa) e sua estruturação, analisada por meio de índices ecológicos (riqueza e diversidade). Foram calculadas a taxa de colonização (TC%), que é a razão entre o número de fragmentos com crescimento fúngico (Nf) e o número total de fragmentos (TC%) ($FI = Nf/Nt \times 100$) (ARAÚJO

et al., 2002). Foi calculada também a Frequência Relativa (*fr*) de isolamento, que é a razão entre o número de isolados de uma espécie e o total do número de isolados (PHOTITA et al., 2001). Para o cálculo da diversidade foram utilizados os índices de diversidade de Shannon-Wiener (MAGURRAN, 1988), calculado pela equação $H' = [N \ln(N) - \sum n_i \ln(n_i)] / N$ e o índice de diversidade de Simpson (BROWER e ZARR, 1984) calculado pela equação $C = 1 - [\sum n_i (n_i - 1) / N (N - 1)]$, onde: n_i = número de isolados da espécie i , N = número total de isolados de todas as espécies.

4.6. Seleção dos Fungos Endofíticos Quanto à Produção de L-asparaginase (ASNase)

Foram selecionados aleatoriamente 20 isolados para a etapa da produção da enzima L-asparaginase.

Os isolados selecionados, previamente armazenados em solução de glicerol 10% foram reativados em placas de Petri contendo BDA a 28 ± 2 °C, durante sete dias. Para a produção da enzima L-asparaginase foram seguidas as etapas pré-fermentativa e a fermentativa como descrito por LOUREIRO et al. (2012).

Na etapa pré fermentativa foi preparado o meio Czapek Dox modifico (CDM) (SAXENA e SINHA, 1981), composto por glicose (2,0 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), $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g/L), pH 6,2. Na pré-fermentação foram utilizados 50 mL do meio CDM contidos em frascos tipo Erlenmeyer (250 mL), onde cinco discos de 5 mm de micélio das culturas foram inoculados e incubados a 37 °C, a 120 rpm por 96 horas. Após esse período, as culturas foram filtradas com auxílio de bomba de vácuo, Kitassato e funil de Büchner, utilizando papel de filtro Whatman nº 1.

Durante a etapa fermentativa todo o micélio coletado na pré-fermentação foi inoculado em frascos tipo Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL do meio CDM (sem glicose) e incubados a 37°C, a 120 rpm por 96 horas. Após esse período, as culturas foram filtradas utilizando papel de filtro Whatman nº 1 e a biomassa obtida foi utilizada para determinar a atividade enzimática.

4.7. Determinação da Atividade da Enzima L-asparaginase

A determinação da atividade da enzima foi executada de acordo com LOUREIRO et al. (2012). A solução para determinação da atividade foi composta de 1,5 mL Tris-HCl (20 mM, pH 8,6), 0,2 mL solução de L-asparagina (100 mM), 0,2 mL solução de hidroxilamina

pH 7,0 (1 M) e 0,1 g de biomassa fúngica. Na biomassa de cada cultura (0,1 g) foi adicionado o tampão Tris-HCl e a mistura agitada em vórtex. Nas amostras foram adicionadas as soluções de L-asparagina e hidroxilamina. Tanto as amostras quanto as amostras em branco (biomassa e Tris-HCl) foram incubados 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 FeCl_3 e ácido tricloroacético a 5% (w/v) em 0,66 mol·L⁻¹ HCl] em todas as amostras. Aos brancos foram acrescentadas as soluções de asparagina e hidroxilamina.

Todas as amostras e o branco foram centrifugadas a 6.000 rpm por 15 minutos, 2 mL do sobrenadante foi retirado com o auxílio do pipetador e transferido para as cubetas de vidro, onde as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 500 nm.

Cada unidade de L-asparaginase foi considerada como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de β -hidroxâmico aspártico por minuto. 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 em U/g para a atividade intracelular dentre as cepas testadas neste estudo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento e identificação de Fungos Endofíticos a partir das Folhas de *Handroanthus chrysotrichus*

Dentre os 180 fragmentos de folhas analisados foram isolados um total de 279 espécimes de fungos endofíticos filamentosos, sendo 34 do indivíduo A, 106 do indivíduo B, 65 do indivíduo C e 74 do indivíduo D (Tabela 4). Os 279 endófitos foram distribuídos em 21 gêneros pertencentes ao filo Ascomycota e as classes Dothideomycetes (12), Sordariomycetes (8) e Eurotiomycetes (1).

Tabela 4. Distribuição de fungos endofíticos isolados de folhas de *Handroanthus chrysotrichus* de área de Mata Atlântica.

Fungos Endofíticos	Indivíduo A	Indivíduo B	Indivíduo C	Indivíduo D	Total
<i>Alternaria</i>	0	1	0	0	1
<i>Botryosphaeria</i>	0	1	5	1	7
<i>Cladosporium</i>	1	17	1	1	20
<i>Colletotrichum</i>	3	9	15	13	40

<i>Diaporthe</i>	14	28	19	6	67
<i>Fusarium</i>	3	0	0	0	3
<i>Hypoxyton</i>	0	1	0	0	1
<i>Microsphaeropsis</i>	2	0	0	2	4
<i>Mycosphaerella</i>	0	1	0	0	1
<i>Nemania</i>	0	1	0	0	1
<i>Neofusicoccum</i>	0	0	1	1	2
<i>Nigrospora</i>	0	1	0	0	1
<i>Nothophoma</i>	0	1	0	0	1
<i>Ophiostoma</i>	0	0	0	1	1
<i>Paraconiothyrium</i>	1	1	0	3	5
<i>Paraphaeosphaeria</i>	1	0	0	0	1
<i>Penicillium</i>	1	5	0	0	6
<i>Phyllosticta</i>	0	0	9	39	48
<i>Preussia</i>	0	2	1	1	4
<i>Xylaria</i>	8	35	14	6	63
<i>Zasmidium</i>	0	2	0	0	2
TOTAL					279

Todos os fungos endofíticos isolados neste estudo pertencem ao Filo Ascomycota e abrigam duas das Classes (Sordariomycetes e Dothideomycetes), que segundo ARNOLD (2007), correspondem a maioria dos fungos endofíticos isolados em folhas.

Ainda são escassos os estudos referentes a diversidade de fungos endofíticos de ipê-amarelo, porém pesquisas com plantas pertencentes ao mesmo gênero (*Handroanthus/Tabebuia*) têm sido relatadas. SADANANDA et al. (2011) isolaram treze espécies de fungos endofíticos de diferentes partes de *Tabebuia argentea* na Índia. As principais espécies isoladas foram *Alternaria carthami*, *A. helianthi*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. flaviceps*, *Cercospora carthami*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. verticilloides* e *Hypoxyton oryzae*. Em nossa pesquisa, embora tenhamos observado maior diversidade de gêneros, também identificamos isolados pertencentes a *Alternaria*, *Fusarium* e *Hypoxyton* corroborando com os resultados de SADANANDA et al. (2011).

GOVINDAPPA et al. (2013) avaliaram a atividade antioxidante e triagem fitoquímica de extratos de fungos endofitos isolados de folhas, galhos, cascas e raízes de *Tabebuia argentea* na Índia. No estudo os pesquisadores isolaram um total de sete espécies distintas de fungos endofíticos de 150 fragmentos de tecidos vegetais. Entre os isolados estão: *Alternaria* sp, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp. e *Trichoderma* sp.

SOUZA et al. (2018) isolaram 122 fungos endofíticos de folhas de *Handroanthus impetiginosus* (ipê-roxo) no Brasil e testaram os isolados quanto a produção de lipase extracelular. *Preussia africana* destacou-se entre os isolados.

A diferença entre as comunidades de fungos endofíticos em ambientes diferentes pode estar relacionada a diversos fatores ambientais, como a heterogeneidade entre os microhabitats, as relações ecológicas entre as comunidades de fungos e na planta hospedeira, as variações climáticas e tipo de tecido da planta hospedeira (KOIDE et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2015;). Esses fatores afetam a frequência e composição das espécies de fungos endofíticos nos vegetais, visto que o habitat da planta hospedeira, que por ser um ambiente dinâmico, está sujeito as intempéries e estresses abióticos (VUJANOVIC e BRISSON, 2002).

Em geral os tecidos provenientes das folhas apresentam alto grau de colonização se comparado com os demais tecidos vegetais, além disso plantas de uma mesma família podem abrigar comunidades de endófitos mais similares, se comparadas com plantas de outras famílias (JIANQIU et al., 2008; OSES et al., 2006).

O bioma Mata Atlântica é caracterizado como uma floresta ombrófila densa e a menor exposição à radiação solar pode interferir diretamente no número de fungos isolados. A diferença de intensidade e exposição solar é um fator determinante para a população de fungos endofíticos, pois estes microrganismos são muitas vezes sensíveis à intensa radiação solar (PETRINI, 1991). A elevada umidade das florestas úmidas como é o caso da Mata Atlântica, também pode atuar como fator positivo na sobrevivência dos fungos endofíticos, se comparados com ambientes de maior incidência de radiação solar sobre as folhas e outros órgãos vegetais (PIMENTEL et al., 2006).

No presente estudo, todos os 279 fungos endofíticos isolados das folhas de *H. chrysotrichus* foram agrupados de acordo com a morfologia e as culturas representativas de cada morfotipo tiveram o DNA extraído e fragmentos de genes/ regiões de interesse foram amplificados. As sequências obtidas foram comparadas com sequências similares depositas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn.

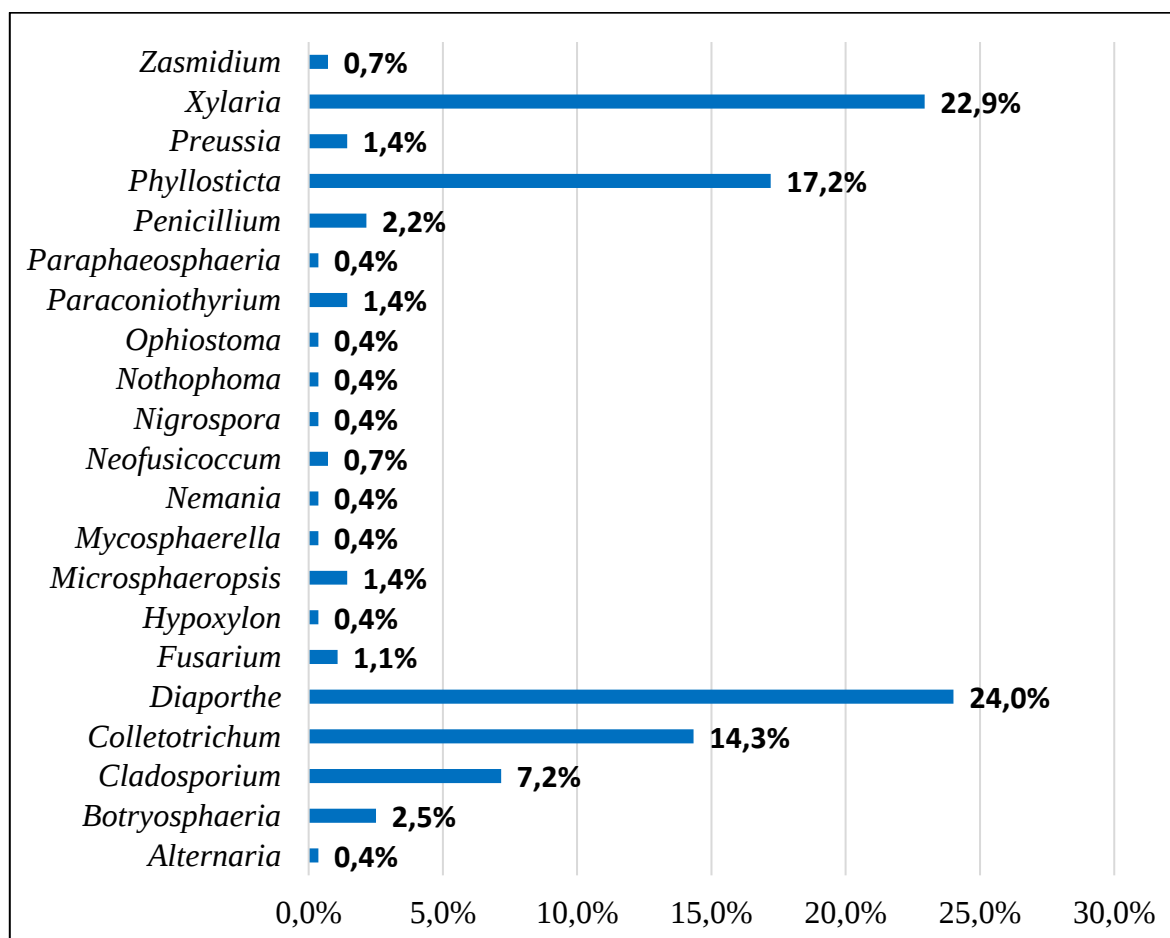
Foram contabilizados 21 gêneros (Figura 7), dos quais *Diaporthe* foi o mais prevalente (24%), seguido por *Xylaria* (22,6%), *Phyllosticta* (17,2%), *Colletotrichum* (14,3%), *Cladosporium* (7,2%), *Botryosphaeria* (2,5%), *Penicillium* (2,2%), *Paraconiothyrium* (1,4%), *Microsphaeropsis* (1,4%), *Preussia* (1,4%), *Fusarium* (1,1%), *Zasmidium* (0,7%), *Neofusicoccum* (0,7%), *Paraphaeosphaeria* (0,4%), *Nothophoma* (0,4%), *Hypoxylon* (0,4%), *Nigrospora* (0,4%), *Nemania* (0,4%), *Mycosphaerella* (0,4%),

Alternaria (0,4%) e *Ophiostoma* (0,4%). *Diaporthe passifloricola* foi a espécie mais frequente isolada no estudo.

Estudos relacionados à quantidade de fungos endofíticos de *H. chrysotrichus* ainda são escassos, entretanto trabalhos com representantes de Bignoniaceae apresentam dados relevantes sobre a comunidade de fungos endofíticos nesta família. MAHESWARI e RAJAGOPAL (2013) analisaram 732 fungos endofíticos isolados de cascas e folhas de *Kigelia pinnata* (Bignoniaceae). Foram identificados 21 gêneros, entre eles *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Nigrospora* e *Penicillium*.

DAS e NARZARY (2017) estudando comunidades de fungos endofíticos de folhas, caule, sementes, casca e raízes de *Oroxylum indicum* (Bignoniaceae), isolaram 76 espécimes representando 11 gêneros. *Colletotrichum* foi o gênero mais representativo com 36% dos isolados. Entre os gêneros identificados estavam *Botryosphaeria*, *Diaporthe*, *Fusarium* e *Penicillium*.

Figura 7. Percentual de fungos endofíticos isolados de folhas de *Handroanthus chrysotrichus* de área de Mata Atlântica.



Cladosporium, *Alternaria* e *Nigrospora* já foram registrados como fungos endofíticos mais frequentes em raízes de árvores nativas da Mata Atlântica brasileira (BONFIM et al., 2016). *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Phyllosticta* e *Xylaria* e são considerados fungos generalistas, com alta taxa de crescimento em meios de cultura não seletivos e são encontrados frequentemente em diferentes hospedeiros de plantas tropicais (ARNOLD e LUTZONI, 2007; HUANG et al., 2008; HYDE E SOYTONG, 2008; MURALI et al., 2007; SURYANARAYANAN et al., 2011). Comunidades de fungo endofíticos são compostas, por poucas espécies dominantes, que na maioria das vezes são generalistas, sendo encontradas em diferentes plantas hospedeiras não relacionadas taxonomicamente e o sucesso destes fungos em ocupar o interior de tecidos vegetais pode ser reflexo deste carácter generalista (SURYANARAYANAN et al., 2003).

Aparentemente *Diaporthe* parece ter uma íntima relação ecológica com *H. chrysotrichus*, pois apresentou a maior frequência em três das quatro plantas estudadas, fazendo-se presente em todas elas. O gênero *Diaporthe* é frequentemente registrado como fungo endofítico de diversas plantas hospedeiras (MURALI et al., 2007; THOMPSON et al., 2015; HUANG et al., 2015). As espécies de *Diaporthe* são comumente isoladas como patógenos vegetais, endófitos ou sapróbios, encontrados em uma grande variedade de hospedeiros (GOMES et al., 2013, GAO et al., 2014, PÁDUA et al., 2018).

Cerca de 200 espécies de *Diaporthe* foram descritas a partir de vários hospedeiros de plantas em todo o mundo e a classificação das espécies é suportada com dados moleculares (GOMES et al. 2013), porém a taxonomia do gênero depende amplamente de filogenias moleculares (UDAYANGA et al., 2012, GOMES et al., 2013), pois poucos caracteres morfológicos podem ser usados na delimitação de espécies (GAO et al., 2017).

Frequentemente fungos endofíticos pertencentes ao gênero *Diaporthe* são utilizados como potenciais produtores de substâncias bioativas (SPECIAN et al., 2012; PÁDUA et al., 2018) e como agentes de biocontrole (RUBINI et al., 2005).

Phyllosticta foi o gênero predominante no indivíduo D (39 isolados), enquanto *Diaporthe* apresentou seu menor número de isolados para esse indivíduo (6), o que pode ser explicado pela aparente relação antagônica entre membros de *Phyllosticta* e *Diaporthe*. Estudos apontam a existência de um efeito sinérgico entre os metabolitos produzidos por *Diaporthe* no controle de espécies fitopatogênicas de *Phyllosticta*, inibindo a germinação de seus esporos (GOMES, 2012; TONIAL et al., 2017), uma vez que *Diaporthe* apresenta

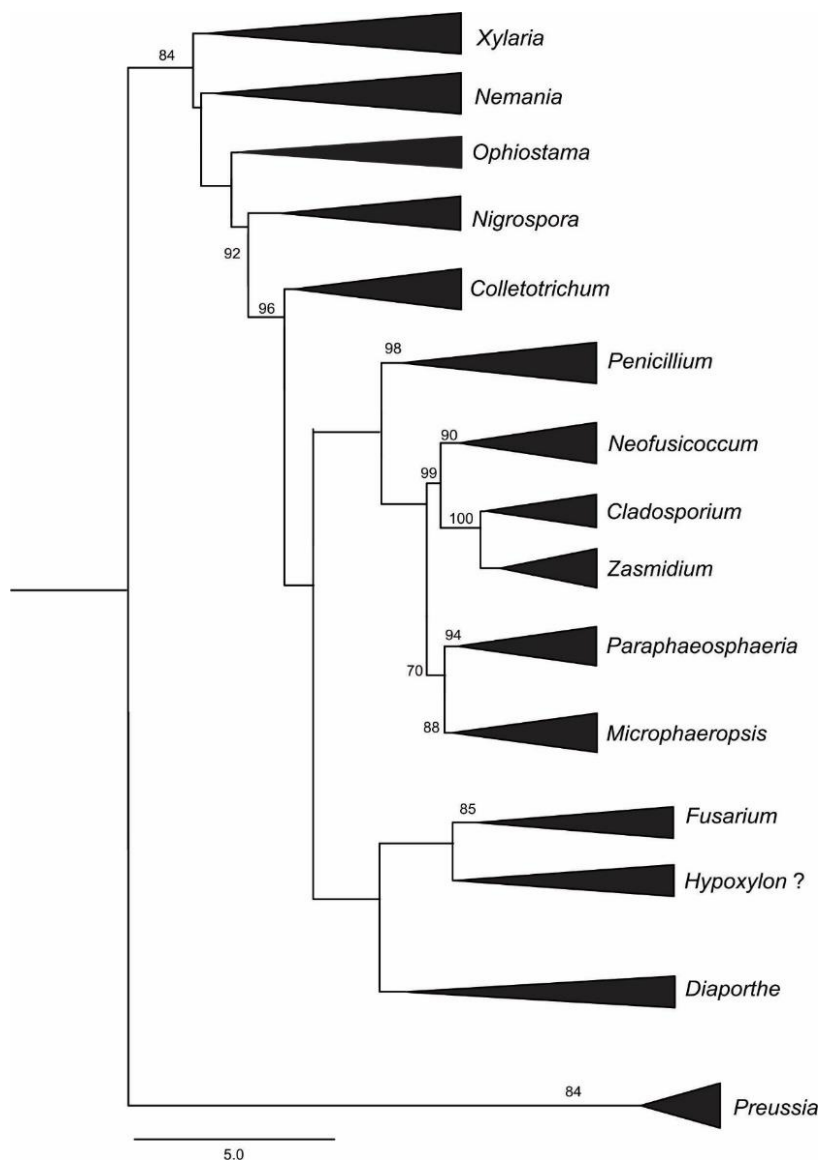
baixa taxa de colonização no tecido vegetal em questão, a população de *Phyllosticta* pode aumentar, inibindo o crescimento de outras espécies.

O gênero *Nothophoma*, isolado apenas uma vez no presente estudo, foi relatado como endófito da planta medicinal *Rhazya stricta* na Arábia Saudita (ABDEL-WAHAB et al., 2017). Outros gêneros apresentados neste estudo como *Hypoxylon*, *Nemania*, *Neofusicoccum*, *Nigrospora*, *Mycosphaerella*, *Phaeosphaeria* e *Zasmidium* possuem registros como fungos endofíticos de espécies vegetais variadas (MEDINA et al., 2019; LI et al., 2018; PÁDUA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018; ZHANG & YAO, 2015; THIRUNAVUKKARASU et al., 2011; TOMSHECK et al., 2010).

5.2. Análises Filogenéticas

Para confirmar os resultados obtidos nas pesquisas BLASTn, foram construídas árvores filogenéticas baseadas em análise de Máxima Verossimilhança e Bayesiana obtida de sequências de β -tubulina. As análises mostraram a presença de endófitos pertencentes a nove ordens em Ascomycota (Botryosphaeriales, Capnodiales, Diaporthales, Eurotiales, Glomerellales, Hypocreales, Ophiostomatales, Pleosporales e Xylariales) (Figura 8).

Figura 8. Árvore de máxima verossimilhança (ML) obtida de sequências de β -tubulina dos principais gêneros de fungos endofíticos isolados dos folíolos da planta *H. chrysotrichus* de área de Mata Atlântica. Os valores de suporte do ML bootstrap foram acima de 50%.



Para a construção da árvore foram utilizadas sequências de β -tubulina de isolados representantes de 15 dentre os 21 gêneros identificados. Não foi possível amplificar parte do gene β -tubulina de *Alternaria*, *Botryosphaeria*, *Mycosphaerella*, *Nothophoma*, *Paraconiothyrium* e *Phyllosticta*, sendo identificados por análises das regiões ITS do rDNA.

Quatro isolados foram inicialmente identificados por caracteres morfológicos como pertencentes ao gênero *Fusarium*. O uso de sequências dos genes *TEF1* e *RPB2* para realizar pesquisas BLASTn no banco de dados GenBank do NCBI, indicou que a maior

identidade com sequências do complexo de espécies *F. fujikuroi* (FFSC) e do complexo de espécies *F. lateritium* (FLSC).

As topologias das árvores não diferiram entre as análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. Árvores de Inferência Bayesiana foram usadas para representar resultados, com os valores de BPP e ML-BS mostrados próximos aos nós das árvores (Figuras 9 e 10).

As análises filogenéticas moleculares de três loci (*RPB2*, *TEF1* e *TUB2*) apoiaram fortemente que dois dos isolados como um táxon irmão de *F. pseudocircinatum* e membro do subclado africano do FFSC (Figura 9). Os outros dois isolados pertencentes ao FLSC formaram uma linhagem genealógica exclusiva em um único clado bem suportado (Figura 10).

Figura 9. Árvore filogenética bayesiana realizada utilizando sequências de *RPB2*, *TEF1* e *TUB2* de membros representativos membro do subclado africano do FFSC.

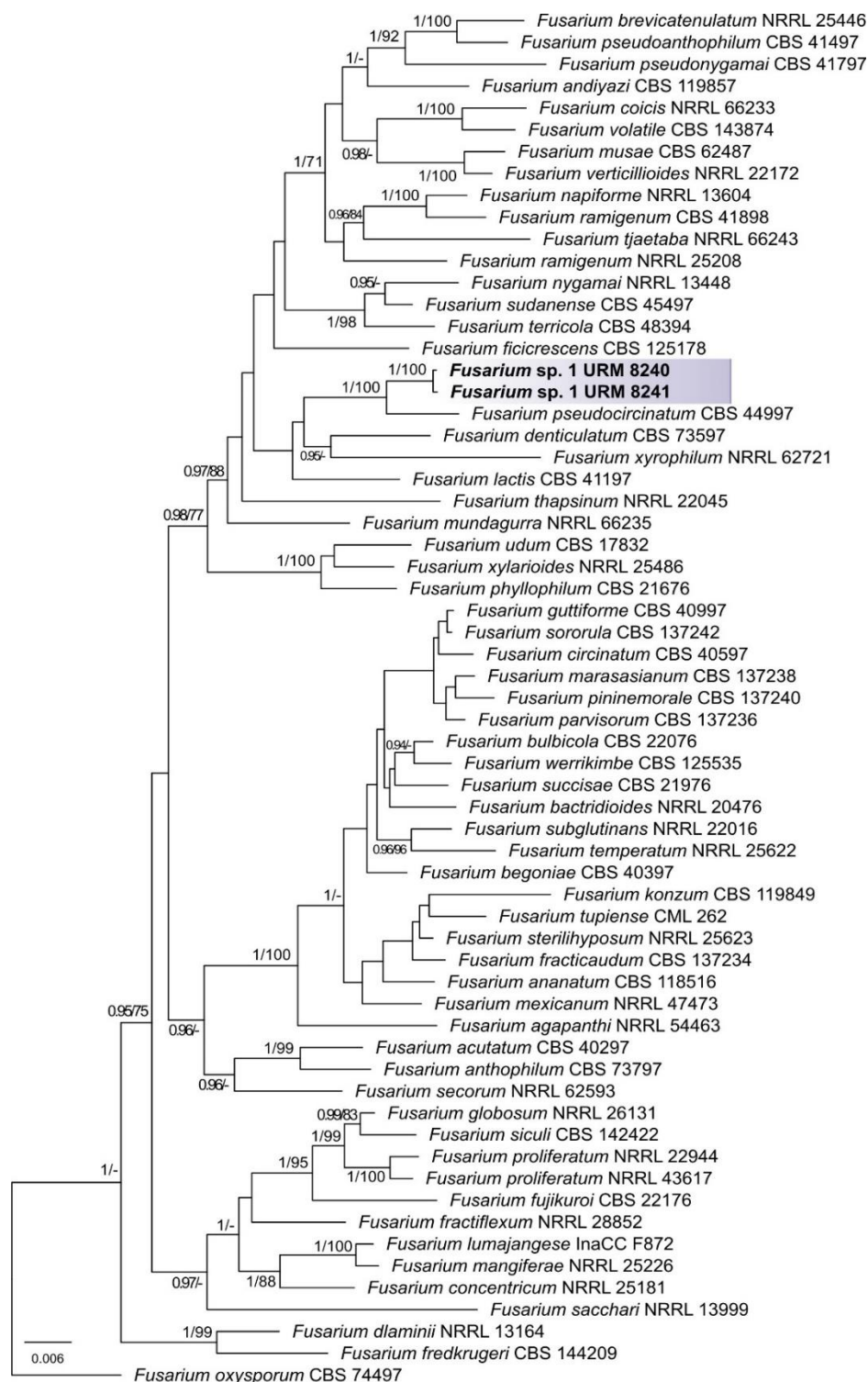
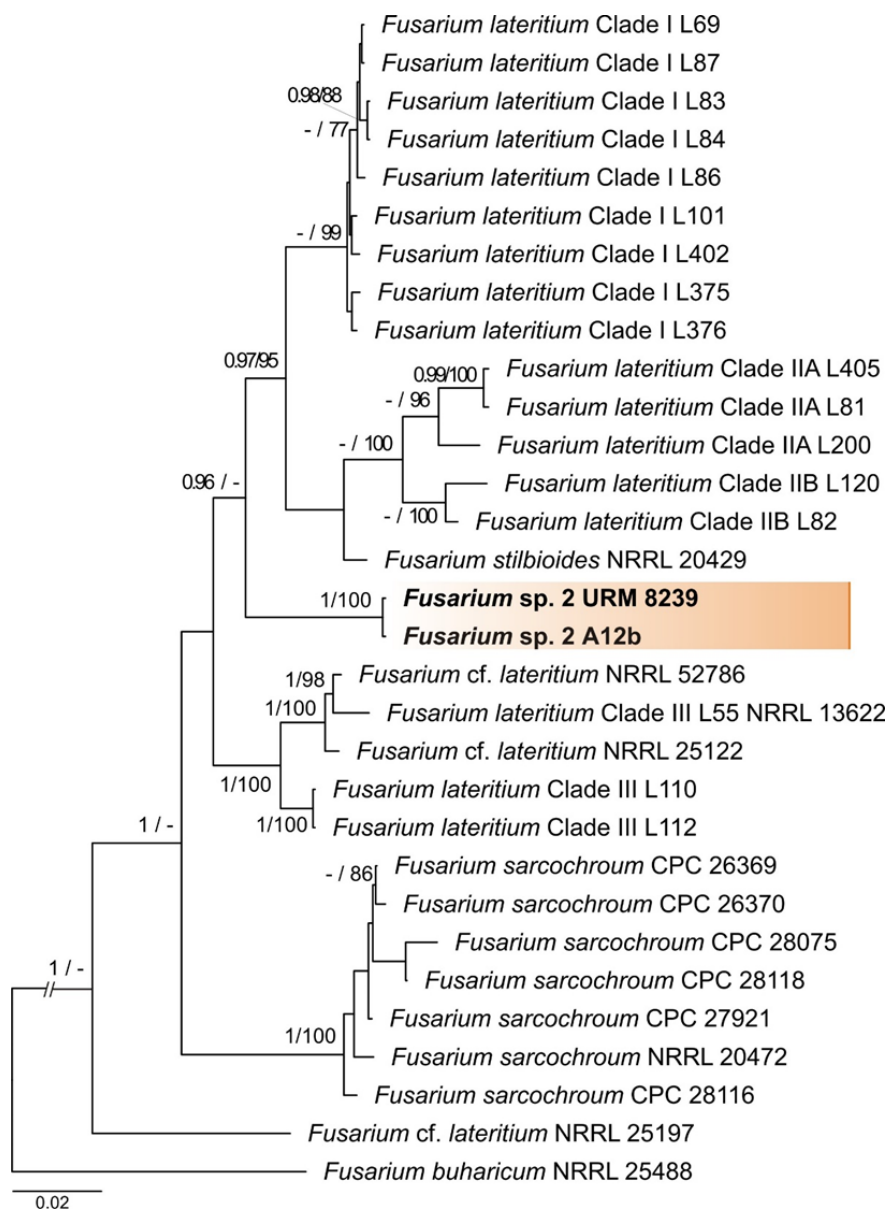
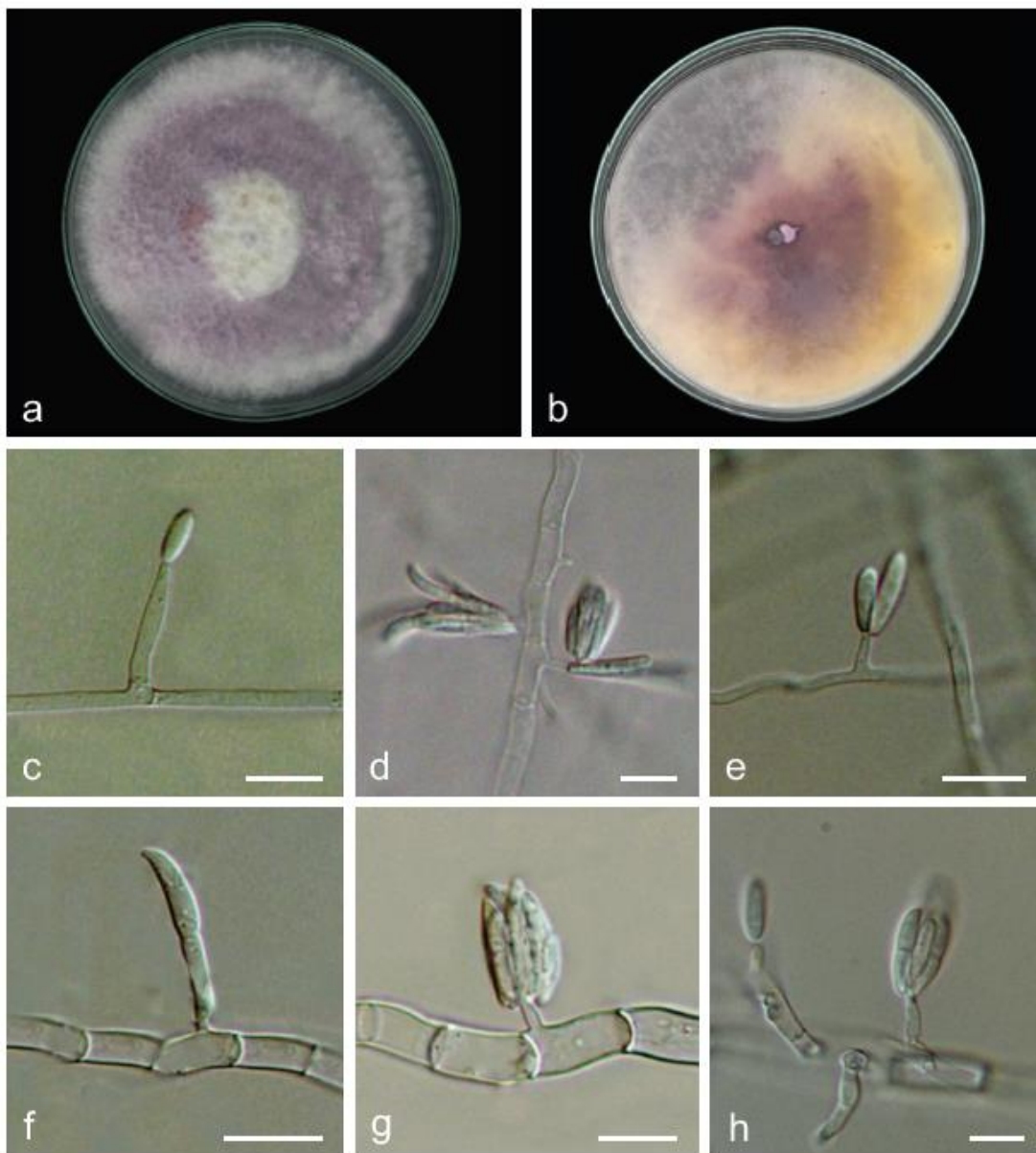


Figura 10. Árvore filogenética bayesiana realizada utilizando sequências de *RPB2*, *TEF1* e *TUB2* de membros representativos membro do FLSC.



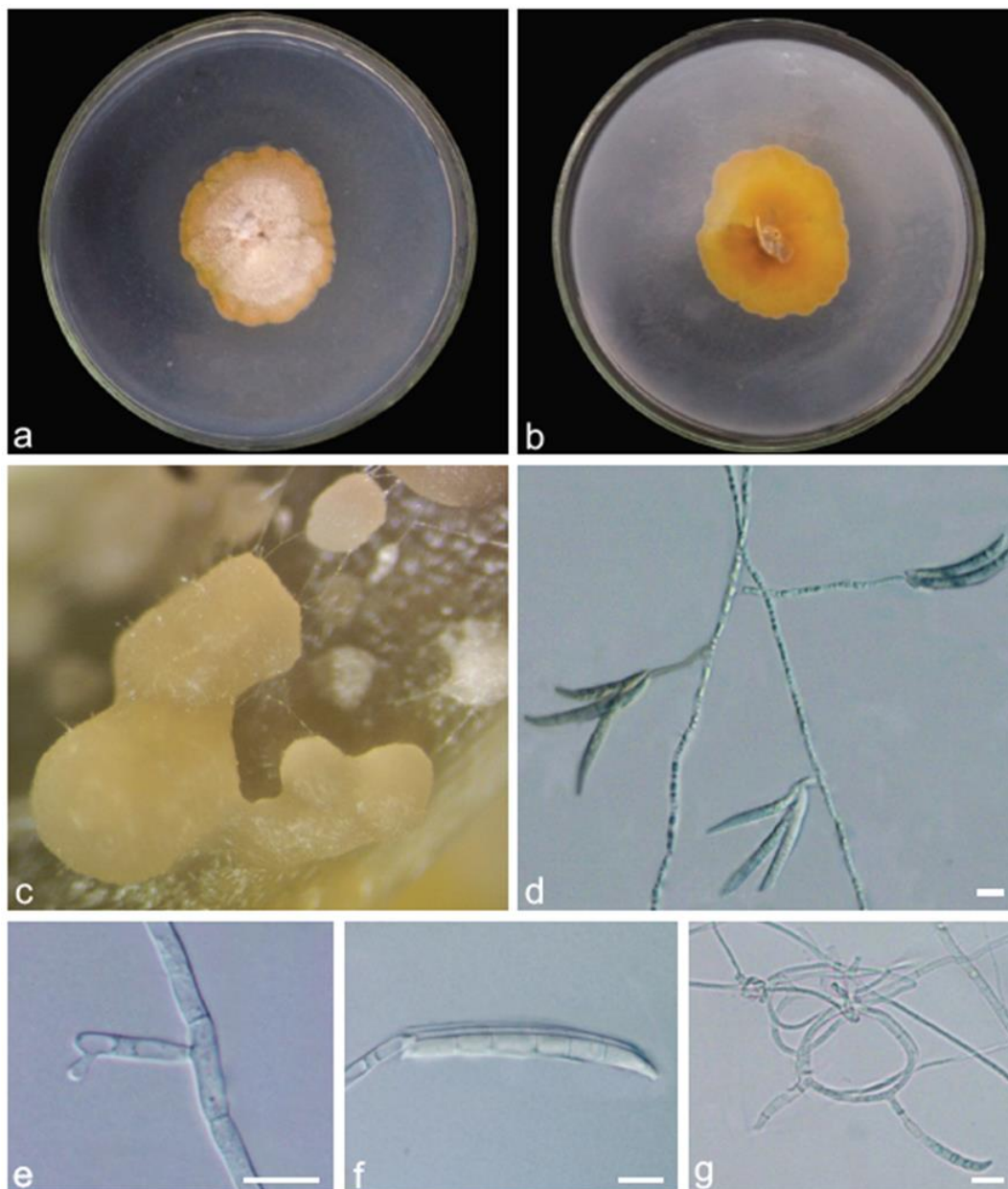
Fusarium sp. 1 (Figura 11) apresenta conídios aéreos curtos, ovais a elípticos, raramente clavados e fusiformes com célula apical embotada ou papilada e célula basal em forma de gancho, septados, microconídios agregados em cadeias e formando cabeças falsas observados. Conídios esporoquiais obovóides a elípticos e fusiformes a falcados com célula apical em forma de gancho ou papilada, septados ou asseptados.

Figura 11. *Fusarium* sp. 2 **a e b** Colônia em BDA após 7 dias. **c–h** Células conidiogênicas e conídios. Escalas em barra: **c–m** = 10 μ m.



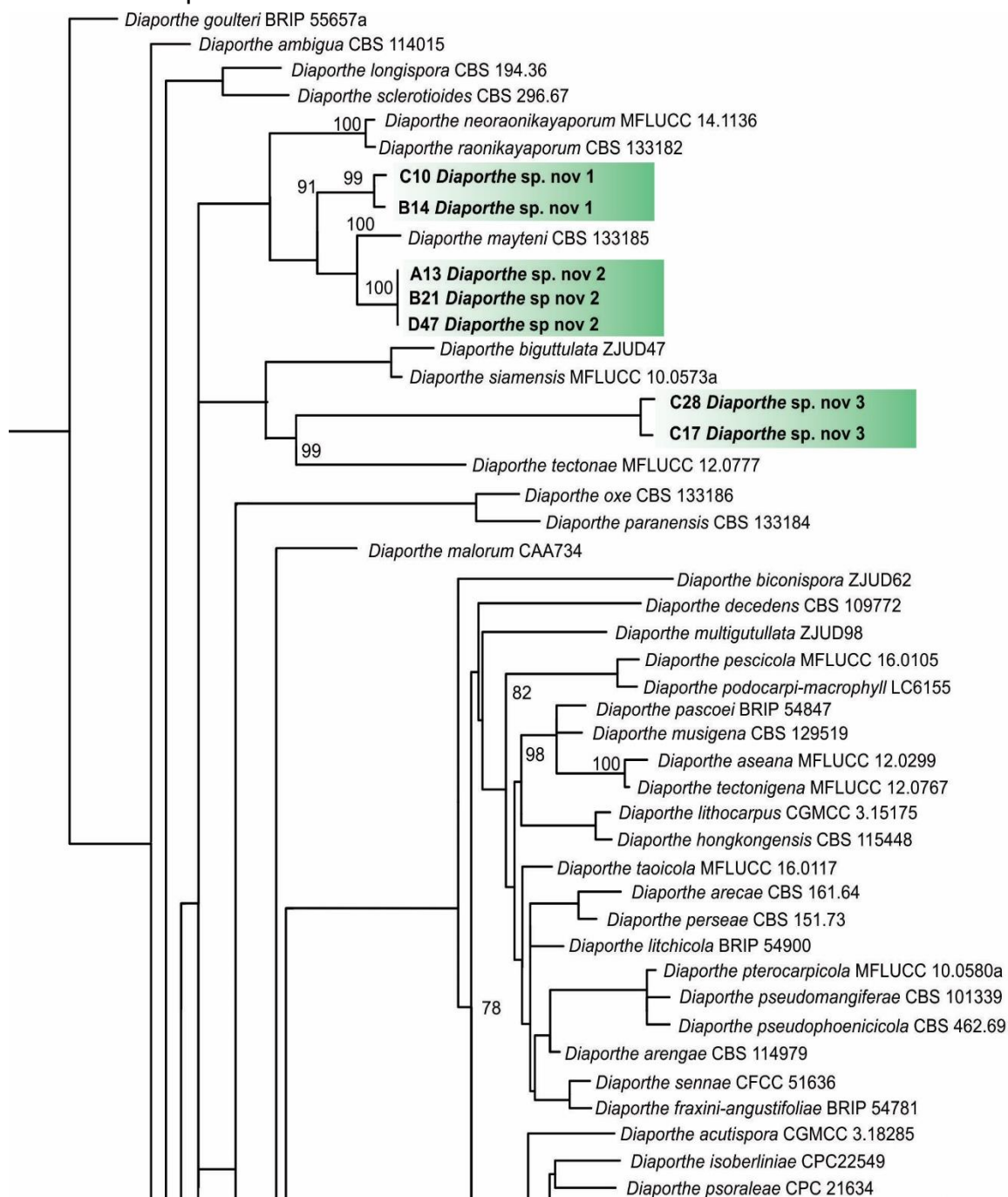
Fusarium sp. 2 (Figura 12) apresenta colônias com crescimento micelial lento. Conídios aéreos septados, célula apical longa, reta a faltar, sem corte, em formato de gancho ou papilada e entalhada na célula basal em forma de pé, produzido em células monofialidicas conidiogênicas. Esporodóquio laranja pálido a laranja, conídios esporodóquiais são falcados, septados, células apicais em formato de gancho ou papilada e células basais em forma de pé.

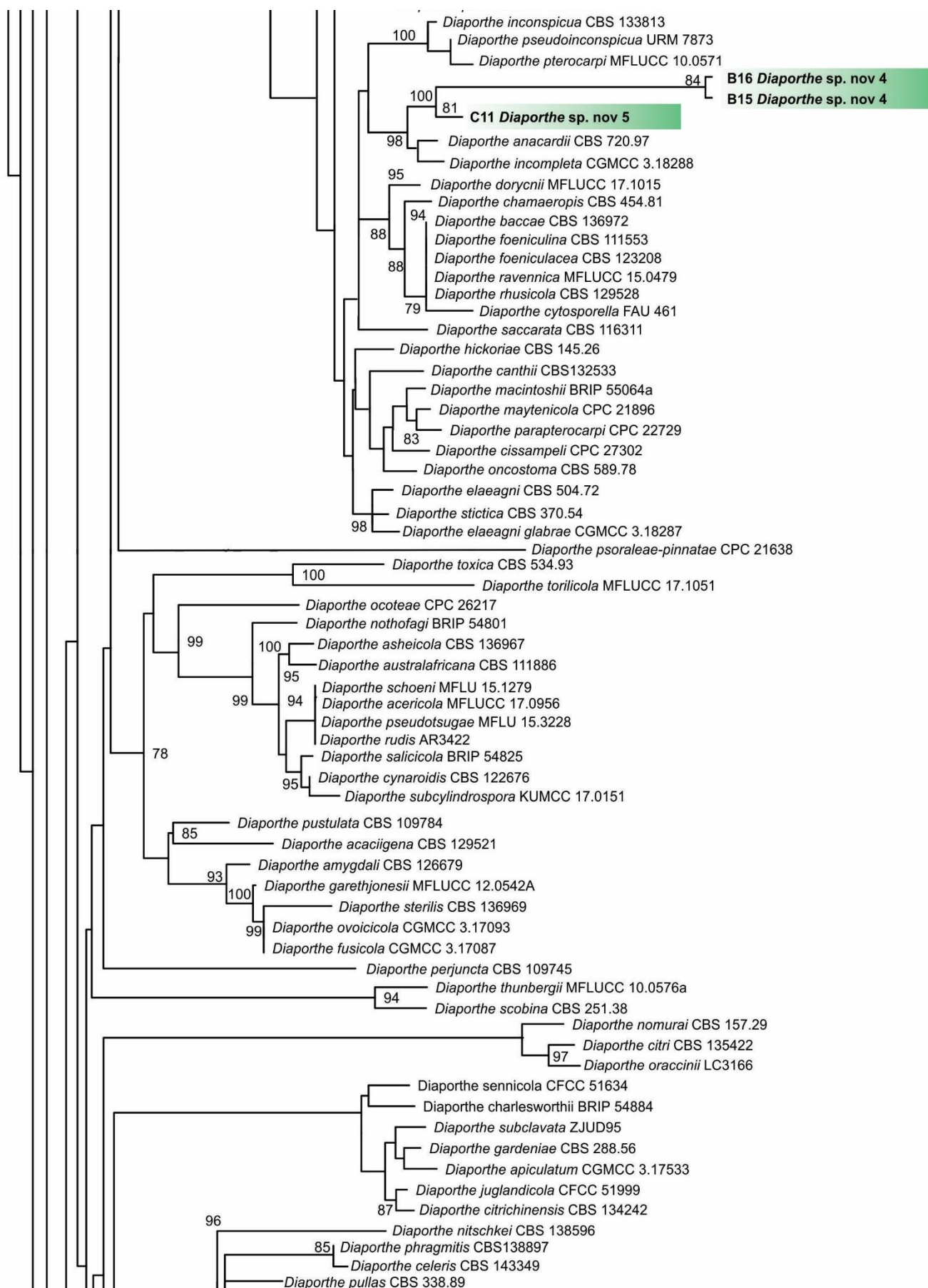
Figura 12. *Fusarium* sp. 2 **a** e **b** Colônia em BDA após 7 dias. **c** Detalhe do esporodóquio. **d–g** Células conidiogênicas e conídios. Escalas em barra: **c–m** = 10 µm.

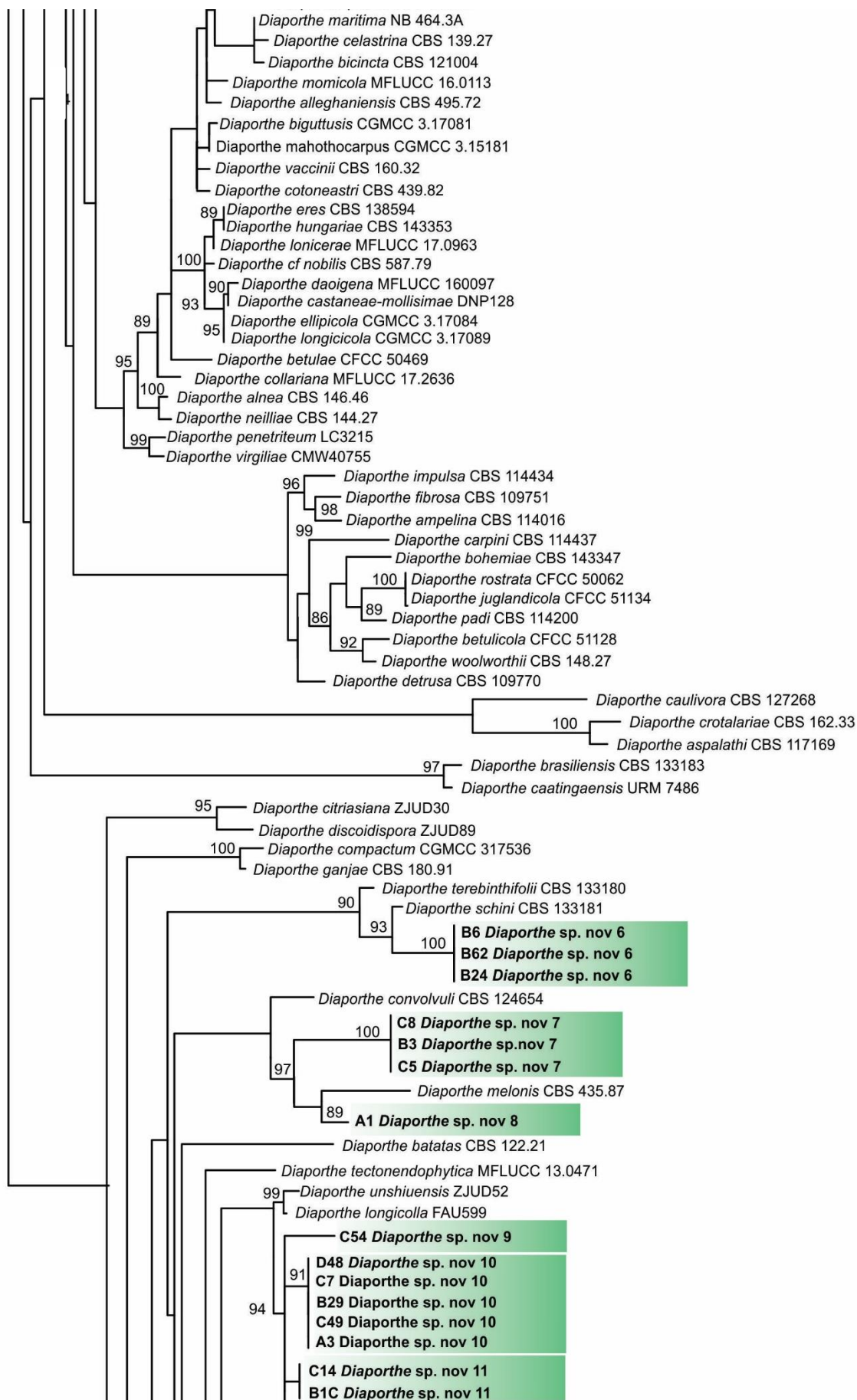


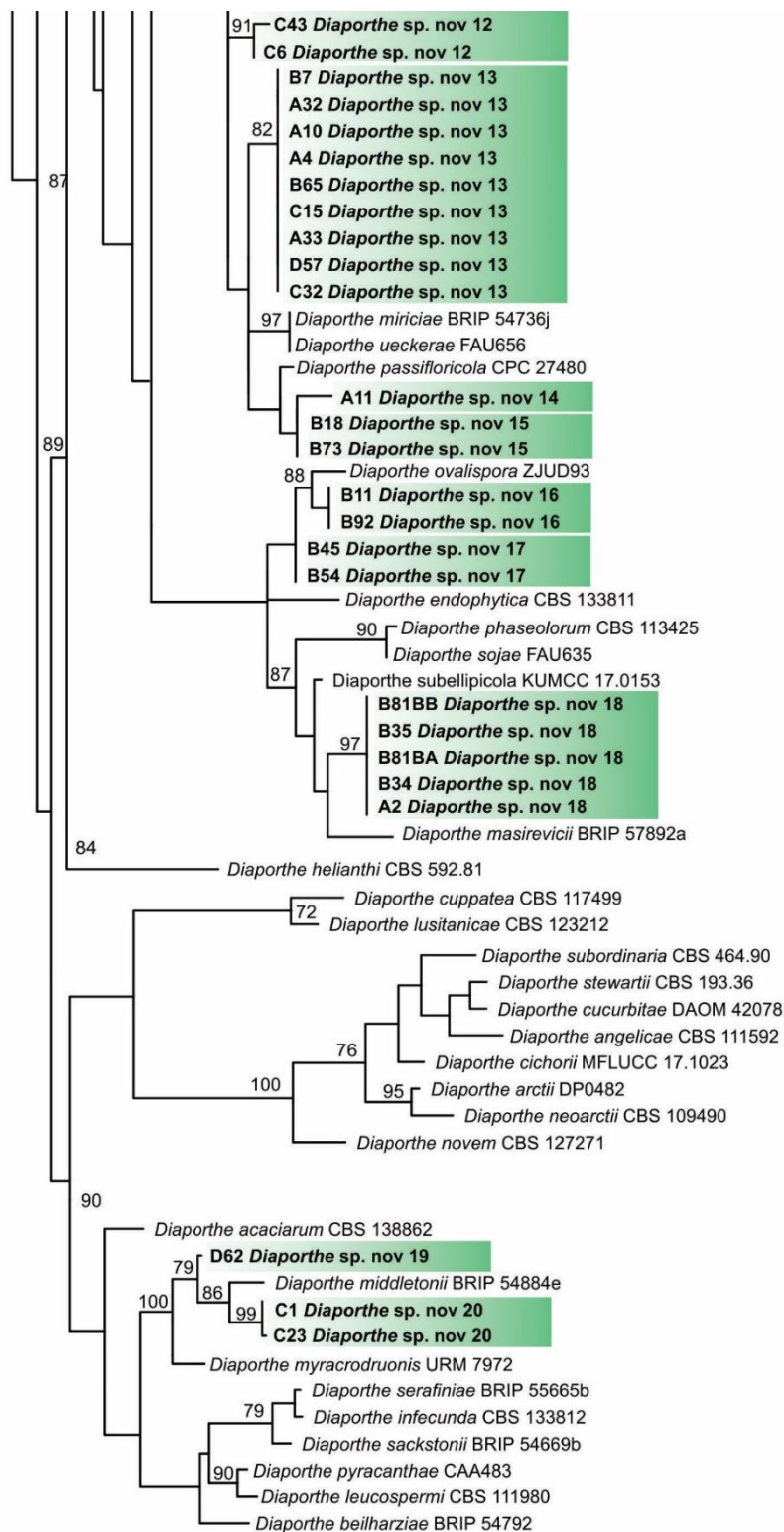
Explorando o padrão da diversidade endofítica presente em *H. chrysotrichus* foram realizadas análises filogenéticas utilizando sequências de *TUB2* de isolados do gênero *Diaporthe* e foram construídas árvores de Máxima Verossimilhança. As análises filogenéticas moleculares apoiam fortemente que os isolados do gênero *Diaporthe* analisados compõem vinte prováveis novas espécies (Figura 13).

Figura 13. Árvore de filogenética de Máxima Verossimilhança realizada utilizando seqüências de *TUB2* de membros representativos membro de *Diaporthe*. *Diaporthella corylina* (CBS 121124) foi utilizado como grupo externo. Os valores de suporte do ML bootstrap foram acima de 50%.









— *Diaporthella corylina* CBS 121124

5.3. Análises Ecológicas

A taxa de colonização total dos fragmentos foliares de *H. chrysotrichus* por fungos endofíticos foi de 89,4%. Os fragmentos dos indivíduos B e D foram 100% colonizados, enquanto os fragmentos foliares dos indivíduos A e C apresentaram taxas de colonização de 62% e 96% respectivamente.

O presente estudo apresentou taxa de colonização superior à de outros trabalhos, RAKOTONIRIANA et al. (2008) relataram uma taxa de colonização de 78% por fungos endofíticos em folhas de *Centella asiatica* coletadas na região leste de Madagascar. Em outro estudo, BEZERRA et al. (2015) relataram uma taxa de colonização de 52,7% em fragmentos de folhas, sépalas, hastes e sementes da planta medicinal *Bauhinia forficata*.

Estudos de RANA et al. (2017) apresentaram uma taxa de colonização endofítica de 17,2% em tecidos da planta *Rhododendron campanulatum*, coletadas em diferentes altitudes no Nepal. Na pesquisa de PÁDUA et al. (2018) com fungos endofíticos em folhas de *Myracrodruon urundeuva* coletadas em brejo de altitude e Caatinga, os pesquisadores relataram taxa de colonização de 39,58% para brejo de altitude e 10,41% para Caatinga. Ambas as áreas apresentaram taxa de colonização total de 25%. Em 2012, SUWANNARACH e colaboradores isolaram 2.774 endófitos de 2.250 amostras de folhas e caules de *Cinnamomum bejolghota* (Lauraceae) na Tailândia. Os pesquisadores obtiveram uma taxa de colonização média de 97,9%.

Diversos fatores podem influenciar a taxa de colonização por fungos endofíticos, como a composição dos meios de culturas utilizados (QI et al., 2012), o tamanho do fragmento utilizado para o isolamento (GAMBOA et al., 2002) e o tipo de tecido vegetal estudado (FISHER et al., 1994).

Diaporthe foi o gênero dominante em folhas de *H. chrysotrichus* de área de Mata Atlântica, apresentando a maior frequência relativa (*fr*) de 24,01%, sendo o gênero dominante em dois dos quatro indivíduos analisados. *Xylaria* (*fr*: 22,94%) foi o segundo gênero mais frequente, sendo dominante no indivíduo B. *Diaporthe*, *Xylaria*, *Colletotrichum* e *Cladosporium* foram isolados de todos os indivíduos, enquanto *Paraphaeosphaeria*, *Nothophoma*, *Hypoxylon*, *Nigrospora*, *Nemania*, *Mycosphaerella*, *Alternaria* e *Ophiostoma* foram isolados uma única vez, portanto considerados táxons raros para na espécie vegetal em estudo (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência absoluta e relativa de fungos endofíticos isolados de folhas de *Handroanthus chrysotrichus* de área de Mata Atlântica.

Fungos Endofíticos	Frequência Absoluta (f)	Frequência Relativa (fr)
<i>Alternaria</i> sp.	1	0,36
<i>Botryosphaeria</i> sp.	7	2,51
<i>Cladosporium</i> spp.	20	7,17
<i>Colletotrichum</i> spp.	40	14,34
<i>Diaporthe</i> spp.	67	24,01
<i>Fusarium</i> spp.	3	1,08
<i>Hypoxylon</i> sp.	1	0,36
<i>Microsphaeropsis</i> sp.	4	1,43
<i>Mycosphaerella</i> sp.	1	0,36
<i>Nemania</i> sp.	1	0,36
<i>Neofusicoccum</i> sp.	2	0,72
<i>Nigrospora</i> sp.	1	0,36
<i>Nothophoma</i> sp.	1	0,36
<i>Ophiostoma</i> sp.	1	0,36
<i>Paraconiothyrium</i> sp.	4	1,43
<i>Paraphaeosphaeria</i> sp.	1	0,36
<i>Penicillium</i> spp.	6	2,15
<i>Phyllosticta</i> spp.	48	17,20
<i>Preussia</i> sp.	4	1,43
<i>Xylaria</i> sp.	64	22,94
<i>Zasmidium</i> sp.	2	0,72

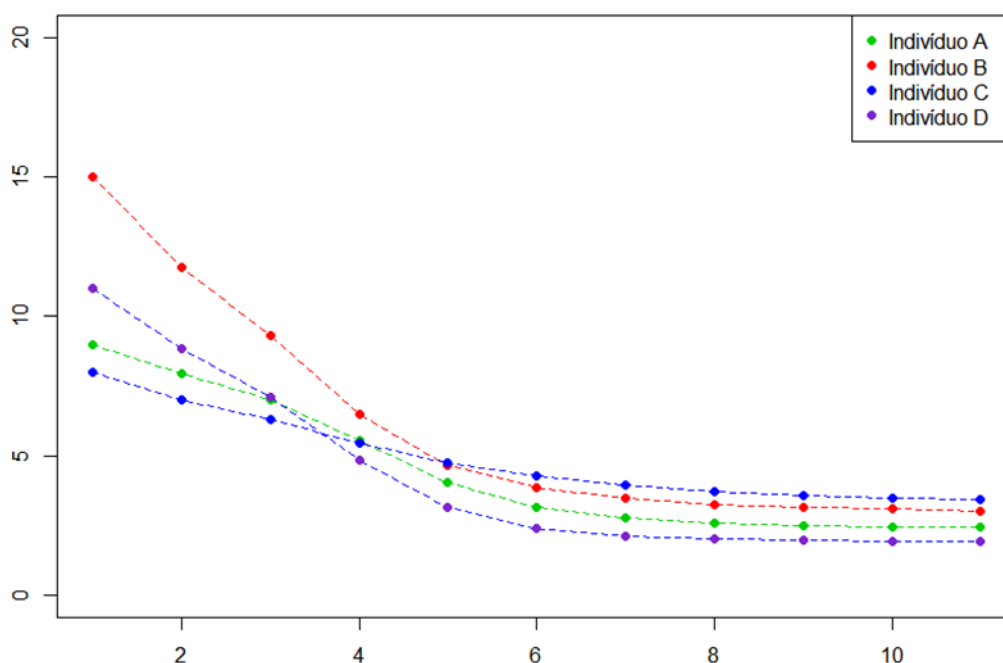
A riqueza e a diversidade dos fungos endofíticos de *H. chrysotrichus*, com base no índice de Shannon, foram maiores para o indivíduo B (tabela 6), mas não há diferença significativa de diversidade entre os membros de *H. chrysotrichus* de Mata Atlântica, o que pode indicar o elevado grau de especificidade das espécies de fungos endofíticos associadas a esta espécie hospedeira (Figura 14).

Considerando o índice de Simpson, o indivíduo D apresenta uma maior diversidade se comparado aos demais, isso pode ter ocorrido devido o fato do índice de Simpson calcular a dominância de determinadas espécies, sendo sensível a espécies raras. O indivíduo B apresenta uma maior riqueza e diversidade de fungos endofíticos, além de apresentar uma alta taxa de espécies raras.

Tabela 6. Riqueza e diversidade de fungos endofíticos isolados de folhas de *Handroanthus chrysotrichus* de área de Mata Atlântica.

Indivíduos de <i>H. chrysotrichus</i>	Riqueza	Índice de Shannon-Wiener (H')	Índice de Simpson (D)
Indivíduo A	9	1,715763	0,7525952
Indivíduo B	15	1,866285	0,7846209
Indivíduo C	8	1,692324	0,7891124
Indivíduo D	11	1,580457	0,6812444

Figura 14. Perfis de diversidade dos fungos endofíticos de *Handroanthus chrysotrichus*.



5.4. Produção da enzima L-Asparaginase.

Dos 20 fungos endofíticos selecionados para produção de L-asparaginase apenas 13 isolados produziram biomassa suficiente para o teste de produção da enzima L asparaginase. Os isolados A12 (*Fusarium* sp.), A21 (*Paraphaeosphaeria* sp.), B17 (*Penicillium skrjabinii*), B53 (*Zasmidium* sp.), C10 (*Diaporthe* sp.), C50 (*Preussia minima*) e D42 (*Microsphaeropsis* sp.) não produziram a quantidade de biomassa mínima exigida para

o teste, desta forma não foi possível avaliar a atividade enzimática de L asparaginase destes isolados.

Dos 13 isolados testados, 9 apresentaram atividade enzimática. Os melhores produtores de L-asparaginase foram *Cladosporium perangustum* com 0,93 U/g de atividade enzimática, seguido por *Neofusicoccum kwambonambiense* (0,76 U/g), *Diaporthe* sp. (0,73 U/g) e *Botryosphaeria* sp. (0,70 U/g) (Tabela 7).

Tabela 7. Atividade de L-asparaginase obtida por fungos endofíticos isolados de *Handroanthus chrysotrichus* em Área de Mata Atlântica.

Fungo Endofítico	Código do Isolado	Atividade Enzimática (U/g)
<i>Botryosphaeria</i> sp.	B9B	0,70
<i>Cladosporium perangustum</i>	B59B	0,93
<i>Cladosporium</i> sp.	B68	0,58
<i>Colletotrichum siamense</i>	B41	0,60
<i>Colletotrichum</i> sp.	C31	0,00
<i>Diaporthe</i> sp.	A1	0,73
<i>Diaporthe</i> sp.	D62	0,58
<i>Diaporthe</i> sp.	A6	0,00
<i>Fusarium</i> sp.	A20	0,59
<i>Neofusicoccum kwambonambiense</i>	C51	0,76
<i>Paraconiothyrium</i> sp.	D54B	0,00
<i>Penicillium citrinum</i>	B101	0,61
<i>Phyllosticta</i> sp.	D1	0,00

Os resultados dessa pesquisa quanto à produção de L-asparaginase mostram-se promissores, pois aproximadamente 70% dos isolados que passaram para a etapa de fermentação conseguiram sintetizar a enzima. Os resultados obtidos no presente trabalho foram satisfatórios, uma vez que a quantidade de enzima produzida se mostrou superior à de outros estudos.

No trabalho sobre asparaginase, publicado por SILVA et al. (2018) espécies endofíticas de *Penicillium* e *Talaromyces* foram isoladas de *Tillandsia catimbauensis* e testadas quanto a capacidade de produção da enzima L-asparaginase. Vinte isolados endofíticos foram selecionados para a produção de L-asparaginase e destes, 50% apresentaram potencial para produção da enzima, destacando-se *Talaromyces* cf. *cecidicola* e *Penicillium* sp. e a produção de L-asparaginase variou entre 0,58 e 1,02 U/g.

PÁDUA et al. (2018) verificaram recentemente que fungos endofíticos isolados da planta medicinal aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) apresentaram potencial para a produção de L-asparaginase em meio líquido. No estudo, os fungos *Diaporthe* spp., *Talaromyces* sp. e *Sarocladium terricola* se destacaram por apresentarem uma maior produção da enzima (2,41 U/g, 1,91 U/g e 1,37 U/g respectivamente).

Estudos realizados na Índia evidenciaram que fungos dos gêneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Curvularia*, *Cladosporium*, *Corynespora*, *Cylindrocladium*, *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Pestalotiopsis* e *Sordaria* isolados como endofíticos de plantas, também produziam L-asparaginase (NAGARAJAN et al., 2014), porém representantes do gênero *Alternaria* apresentaram maior atividade enzimática 1,17 U/mg⁻¹.

No artigo de MOHARRAM et al., 2016 os fungos endofíticos da planta medicinal *Withania somnifera* foram caracterizados e testados quanto a sua capacidade de produzir L-asparaginase. Os resultados mostraram que *Pleospora allii* foi o endófito de maior atividade (1,98 U/mL), seguido por *Alternaria alternata* (1,22 U/mL) e *Chaetomium globosum* (1,12 U/mL).

No presente estudo não foi realizada a otimização do processo fermentativo para produção da enzima asparaginase, estima-se que após o processo de otimização as cepas testadas possam apresentar um aumento na taxa de síntese enzimática. Diversos fatores devem ser avaliados para a produção máxima da L-asparaginase pelo processo de fermentação, TIPPANI e SIVADEVUNI (2012) verificaram em sua pesquisa as principais exigências nutricionais de *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum* e *F. semitectum*, para máxima produção enzimática. A maior quantidade de L-asparaginase obtida por *F. semitectum*, *F. moniliforme* e *F. oxysporum* foi sintetizada utilizando-se a glicose como principal fonte de carbono, enquanto a prolina demonstrou ser a principal fonte de nitrogênio requerida.

É o primeiro registro de produção da enzima L-asparaginase por *Cladosporium perangustum* (0,93 U/g), *Neofusicoccum kwambonambiense* (0,76 U/g) e *Botryosphaeria* sp. (0,70 U/g), o que ressalta a importância de trabalhos na busca por novas espécies produtoras da enzima.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa permitem concluir que:

Folhas de *Handroanthus chrysotrichus* do bioma Mata Atlântica apresentam alta riqueza de fungos endofíticos.

O gênero *Diaporthe* é o endófito dominante nas folhas de *Handroanthus chrysotrichus* no bioma Mata Atlântica.

Há um padrão de similaridade da comunidade endofítica presente em os indivíduos de *Handroanthus chrysotrichus* em área de Mata Atlântica.

Existe alto nível de especificidade entre os fungos endofíticos e *Handroanthus chrysotrichus*.

A diversidade de endófitos das folhas de *Handroanthus chrysotrichus* no bioma Mata Atlântica contribui para descobertas de novas espécies para a Ciência.

Os fungos endofíticos de folhas de *H. chrysotrichus* no bioma Mata Atlântica apresentam potencial para a produção de L-asparaginase, especialmente os isolados B59B (*Cladosporium perangustum*), C51 (*Neofusicoccum kwambonambiense*), A1 (*Diaporthe* sp.) e B9B (*Botryosphaeria* sp.).

Estudos futuros visando a otimização do processo fermentativo, poderão elevar a capacidade de produção enzimática por esses isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-WAHAB, M.A., BAHKALI, A.H.A., EL-GORBAN, A.M., HODHOD, M.S. Natural products of *Nothophoma multilocularis* sp. nov. an endophyte of the medicinal plant *Rhazya stricta*. *Mycosphere* 8(8): 1185–1200, 2017.
- AHLHOLM, J., HELANDER, M.L., ELAMO, P., SALONIEMI, I., NEUVONEN, S., HANHIMÄKI, S., SAIKKONEN, K. Micro-fungi and invertebrate herbivores on birch trees: fungal mediated plant–herbivore interactions or responses to host quality? *Ecology Letters* 5: 648–655, 2002.
- AHMAD, F., AHMAD, I., KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth-promoting activities. *Microbiol Research* 163:173–181, 2008.
- ALEXOUPoulos, C.J., MIMS, C.W., BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. New York: John Wiley, 1996.
- ALMEIDA, F.S., GOMES, D.S., QUEIROZ, J.M. Estratégias para a conservação da biodiversidade biológica em florestas fragmentadas. *Ambiência* 7(2): 367–382, 2011.
- ANDRADE, A.F., BORGES, K.S., SILVEIRA, V.S. Update on the use of L-asparaginase in infants and adolescent patients with acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Medicine Insights: Oncology* 8: 95–100, 2014.
- APPEL, I. M., KESSEL-BAKVIS, C. V., STIGTER, R., PIETERS, R. Influence of two different regimens of concomitant treatment with and dexamethasone on hemostasis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 21: 2377–80, 2007.
- ARAÚJO, W.L., LACAVA, P.T., MARCON, J., LIMA, A.O.S., SOBRAL, J.K., PIZZIRANI-KLEINER, A.A., AZEVEDO, J.L. *Guia prático: isolamento e caracterização de micro-organismos endofíticos*. Copiadora Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2010.
- ARAÚJO, W.L., MARCON, J., MACCHERONI JUNIOR, W., ELSAS, J.D.V., VUURDE, J.W.L., AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction 175 with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68(176): 4906–4914, 2002.
- ARISSETO, A. P., TOLEDO, M. C. F. Acrilamida em alimentos: uma revisão. *Brazilian Journal of Food Technology* 9: 123–134, 2006.
- ARNOLD, A.E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* 21: 51–66, 2007.
- ARNOLD, A.E., HERRE, E.A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* 95: 388–398, 2003.
- ARNOLD, A. E., LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88(3), 541–549, 2007.
- AVRAMIS, V.I. Asparaginases: biochemical pharmacology and modes of drug resistance. *Anticancer Research* 32: 2423–2438, 2012.
- AZEVEDO, J.L., ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI B.N., DESHMUKH S.K. (Eds.) *Fungi: multifaceted microbes*. CRC Press, Boca Raton, pp. 189–207, 2007.

AZEVEDO, J.L., MACCHERONI JR., W., PEREIRA, J.O., ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3: 40–65, 2000.

AZEVEDO, J.L., SERAFINE, L.A., BARROS, N.M. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINE, L.A., BARROS N.M., AZEVEDO, J.L. (Eds.) *Biotecnologia: avanços na agricultura e na indústria*. Caxias do Sul, Editora da Universidade de Caxias do Sul, pp. 233–265, 2002.

BACKES, P., IRGANG, B. Árvores do Sul: guia de identificação & interesse ecológico - as principais espécies nativas sul-brasileiras. *Santa Cruz do Sul: Clube da Árvore - Instituto Souza Cruz*, 326p, 2003.

BACON, C.C.W., WHITE, J.F. Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. In: BACON, C.J., WHITE, J.F. (Eds.). *Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker, 2000.

BANDARA, W.M.M.S., SENEVIRATNE, G., KULASOORIYA, S.A. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. *Journal of Biosciences* 31: 645–650, 2006.

BEHIE, S.W., JONES, S.J., BIDOCHKA, M.J. Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecology* 13: 112–119, 2015.

BEZERRA, J.D.P., NASCIMENTO, C.C.F., BARBOSA, R.N., SILVA, D.C.V., SVEDESE, V.M., SILVA-NOGUEIRA, E.B., GOMES, B.S., PAIVA, L.M., SOUZA-MOTTA, C.M. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: diversity and biotechnological potential. *Brazilian Journal of Microbiology* 46: 49–57, 2015.

BEZERRA, J.D.P., SANDOVAL-DENIS, M., PAIVA, L.M., SILVA, G.A., GROENEWALD, J.Z., SOUZA-MOTTA, C.M., CROUS, P.W. New endophytic *Toxicocladosporium* species from cacti in Brazil, and description of *Neocladosporium* gen. nov. *IMA Fungus* 8: 77–97, 2017.

BEZERRA, J.D.P., SANTOS, M.G.S., BARBOSA, R.N., SVEDESE, V.M., LIMA, D.M.M., FERNANDES, M.J.S., GOMES, B.S., PAIVA, L.M., ALMEIDA-CORTEZ, J.S., SOUZA-MOTA, C.M. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. *Symbiosis* 60: 53–63, 2013.

BEZERRA, J. D. P., SANTOS, M. G. S., SVEDESE, V.M., LIMA, D. M. M., FERNANDES, M. J. S., PAIVA L. M., SOUZA-MOTTA, C. M. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 1989–1995, 2012.

BILLS, G.F., POLLISHOOK, J.D. Recovery of endophytic fungi from *Chamaecyparis thyoides*. *Sydowia* 44: 1–12, 1992.

BING, L.A., LEWIS, L.C. Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. *Environmental Entomology* 20: 1207–1211, 1991.

BING, L.A., LEWIS, L.C. Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Biocontrol Science and Technology* 1: 29–47, 1992.

BONFIM, J.A., VASCONCELLOS, R.L.F., BALDESIN, L.F., SIEBER, T.N., CARDOSO, E.J.B.N. Dark septate endophytic fungi of native plants along an altitudinal gradient in the Brazilian Atlantic forest. *Fungal Ecology* 20: 202–210, 2016.

BORGES, W.S., BORGES, K.B., BONATO, P.S., SAID, S., PUPO, M.T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. *Current Organic Chemistry* 13: 1137–1163, 2009.

BORGIO, M., PETEAN, M.P., HOFFMANN, P.M. *Handroanthus chrysotrichus* - Ipê-amarelo. In: CORADIN, L., SIMINSKI, A., REIS, A. (eds.). Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas para o Futuro - Região Sul. Brasília: MMA, 934p, 2011.

BROOME, J.D. Antilymphoma activity of L-asparaginase in vivo: clearance rates of enzyme preparations from guinea pig serum and yeast in relation to their effect on tumor growth. *Journal of the National Cancer Institute* 35: 967–974, 1965.

BROWER, J.E., ZARR, J.H. *Field & laboratory methods for general ecology*. 2 ed. Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa, 226p, 1984.

BARNETT, H. L., HUNTER, B.B. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. New York, MacMillan Publishing Company, 1987.

CAFÊU, M.C., SILVA, G.H., TELES, H.L., BOLZANI, V.S., ARAÚJO, A.R., YOUNG, M.C.M., PFENNING, L.H. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (rubiaceae). *Química Nova* 28: 991–995, 2005.

CANNON, P.F., SIMMONS, C.M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia* 94: 210–220, 2002.

CAPIZZI, R. L., POOLE, M., COOPER, M. R., RICHARDS, F., STUART, J. J., JAKSON, D.V., WHITE, D. R., SPURR, C. L., HOPKINS, J. O., MUSS, H. B. Treatment of poor risk acute leukaemia with sequential high-dose ARA-C and asparaginase. *Blood* 63:649–700, 1984.

CARROLL, G.C. Fungal endophytes in stem and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69: 2–9, 1988.

CARVALHO, N. M., GOES, M., AGUIAR, I. B., FERNANDES, P. D. Armazenamento de sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia chrysotricha*). *Científica* 4(3): 315–319, 1976.

CASALE, T., SOLLITTI, P., CHESNEY, R.H. Cytoplasmic L-asparaginase: isolation of a defective strain and mapping of ansA. *Journal of Bacteriology* 154: 513–515, 1983.

CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95:47–59, 2012.

CHAPLA, V.M., BIASETTO, C.R., ARAÚJO, A.R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. *Revista Virtual de Química* 5: 421–437, 2013.

CHEPLICK, G.P., FAETH, S.H. *Ecology and Evolution of the Grass-endophyte Symbiosis*. Oxford University Press, New York, 2009.

CHOW, Y., TING, A.S.Y. Endophytic L-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. *Journal of Advanced Research* 6: 869–876, 2015.

CHOW, Y., TING, A.S.Y. Influence of glucose and L-asparagine concentrations on L-asparaginase production by endophytic fungi. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 7: 186–189, 2017.

CLAY, K. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* 69: 10–16, 1988.

COLOMBO, A.F., JOLY, C.A. Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. *Brazilian Journal of Biology* 70(3): 697-708, 2010.

DAHLGREN, G. The last dahlgrenogram. System of classification of the Dicotyledons. In: TAN, K. (Ed.), *Plant Taxonomy, Phytogeography and Related Subjects*. Edinburgh University Press, Edinburgh, pp.249-260, 1989.

DAHLMAN, D.L., EICHENSEER, H., SIEGEL, M.R. Chemical perspectives on endophyte grass interactions and their applications to insect herbivore. In: BARBOSA, P., KRISCHIK, V.A., JONES, C.G. (eds.). *Microbial Mediation of Plant-herbivore Interaction*. New York: Wiley 227–252, 1991.

DAMODARAN, S., PARKIN, K.L., FENNEMA, O.R. *Química de Alimentos de Fennema*. 4ª edição. Porto Alegre, Artmed, 2010.

DANGE, V., PESHWE, S. Purification and biochemical characterization of L-asparaginase from *Aspergillus niger* and evaluation of its antineoplastic activity. *International Journal of Science and Research* 4: 564–569, 2015.

DAS, S., NARZARY, D. Diversity study on endophytic fungi associated with *Oroxylum indicum* and their interactions with some phytopathogens. *Journal of Advanced Plant Sciences* 9(2): 27–41, 2017.

DEMAIN, A.L. From natural products discovery to commercialization: a success story. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33: 486–495, 2006.

DESHPANDE, N., CHOUBEY, P., AGASHE, M. Studies on optimization of growth parameters for L-asparaginase production by *Streptomyces ginsengisoli*. *The Scientific World Journal* 2014: 1–6, 2014.

DHANKHAR, S., DHANKHAR, S., YADAV, J.P. Investigations towards new antidiabetic drugs from fungal endophytes associated with *Salvadora oleoides* Decne. *Medicinal Chemistry* 9: 624–632, 2013.

DIAS, F.F.G., JUNIOR, S.B., HANTAO, L.W., AUGUSTO, F., SATO, H.H. Acrylamide mitigation in french fries using native L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. *LWT - Food Science and Technology* 76: 222-229, 2016.

DOMSCH, K.H., GAMS, W., ANDERSON, T-H. Compendium of soil fungi. Eching: IHW-189 Verlag, 2007.

DORIYA, K., KUMAR, D.S. Isolation and screening of L-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. 3 *Biotech* 6: 239, 2016.

DUVAL, M., SUCIU, S., FERSTER, A., RIALLAND, X., NELKEN, B., LUTZ, P., BENOIT, Y., ROBERT, A., MANEL, A. M., VILMER, E., OTTEN, J., PHILIPPE, N. Comparison of *Escherichia coli* - asparaginase with erwiniaasparaginase 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* 99: 2734–2739, 2002.

EL-BESSOUMY, A.A., SARHAN, M., MANSOUR, J. Production, isolation, and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid state fermentation. *Journal of biochemistry and molecular biology* 37: 387–393, 2004.

EL-NAGGAR, N.E.A., EL-EWASI, S.M., EL-SHWEIHY, N.M. Microbial L-asparaginase as a Potential Agent for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia: The Pros and Cons. *International Journal Pharmacology* 10: 182–199, 2014.

ESTRADA, A.E.R., JONKERS, W., KISTLER, H.C., MAY, G. Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Ustilago maydis*, and *Zea mays*: An endophyte, a pathogen, and their shared plant host. *Fungal Genetics and Biology* 49: 578–587, 2012.

FAETH, S.H. Are endophytic fungi defensive plant mutualism? *Oikos* 98: 25–36, 2002.

FERREIRA, M.C., VIEIRA, M.L.A., ZANI, C.L., ALVES, T.M.A., SALES JR., P.A., MURTA, S.M.F., ROMANHA, A.J., GIL, L.H.G.V., CARVALHO, A.G.O., ZILLI, J.E., VITAL, M.J.S., ROSA, C.A. ROSA, L.H. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 59: 36–44, 2015.

FISHER, P.J., SUTTON, B.C., PETRINI, L.E., PETRINI, O. Fungal endophytes from *Opuntia stricta*: a first report. *Nova Hedwigia* 59:195–200, 1994.

FREYERMUTH, S.K.; LONG, R.I.G.; MATHUR, S. Metabolics aspects of plant interaction with commensal methylotrophs. In: LIDSTROM, M.E. & TABITS, F.R. (eds.). *Microbial growth on C1 compoends*. Kluwer, The Netherlands. pp. 277–284, 1996.

FONSECA, F.L., MENEGARIO, C., MORI, E. S., NAKAGAWA, J. Physiological maturity of ipê amarelo seeds, *Tabebuia chrysotrichus* (Mart. Ex DC.) Standl. *Scientia Forestalis* 69: 136–141, 2005.

GAMBOA, M.A., LAUREANO, S., BAYMAN, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? *Mycopathologia* 156: 41–45, 2002.

GANGADEVI, V., MUTHUMARY, J. Taxol, na anticancer drug produced by an endophytic fungus *Bartalinia robillardoides* Tassi, isolated from medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:717–724, 2007.

GAO, Y.H., SU, Y.Y., SUN, W., CAI, L. *Diaporthe* species occurring on *Lithocarpus glabra* in China, with descriptions of five new species. *Fungal Biology* 119: 295–309, 2014.

GAO, Y.H., LIU, F., DUAN, W., CROUS, P.W., CAI, L. *Diaporthe* is paraphyletic. *IMA Fungus* 8: 153–187, 2017.

GASONI, L., GURFMKEL, B.S. The endophyte *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton roots: phosphorus uptake and host growth. *Mycological Research* 101: 867–870, 1997.

GENNARO, M., GONTHIER, P., NICLOTTI, G. Fungal endophytic communities in healthy and declining *Quercus robur* L. and *Q. cerris* L. trees in northern Italy. *Journal of Phytopathology* 151:529–534, 2003.

GENTRY, A.H. Bignoniaceae – Part II (Tribe Tecomeae). *Flora Neotropica: Monograph* 25 (II). Organization for Flora Neotropica, New York, 1992.

GIMÉNEZ, C., CABRERA, R., REINA, M., GONZÁLES-COLOMA, A. Fungal endophytes and their role in plant protection. *Current Organic Chemistry* 11: 707–720, 2007.

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

GOMES, R.R. Filogenia e taxonomia do gênero *Diaporthe* e a sua aplicação no controle biológico da mancha preta dos Citros. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 94p, 2012.

Gomes, R.R., Glienke, C., Videira, S.I., Lombard, L., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 31: 1–41, 2013.

GOND, S.K.; VERMA, V.C.; KUMAR, A. Study of endophytic fungal community from different parts of *Argle marmelos* Correa (Rutaceae) from Varanasi (India). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1371–1375, 2007.

GOVINDAPPA, M., CHANNABASAVA, R., KUMAR, K.R.S., PUSHPALATHA, K.C. Antioxidant Activity and Phytochemical Screening of Crude Endophytes Extracts of *Tabebuia argentea* Bur. & K. Sch. *American Journal of Plant Sciences* 4: 1641–1652, 2013.

GROSE, S.O., OLMSTEAD, R.G. Taxonomic revisions in the polyphyletic genus *Tabebuia* s. l. (Bignoniaceae). *Systematic Botany* 32: 660–670, 2007.

GROENEWALD, J.Z., NAKASHIMA, C., NISHIKAWA, J., SHIN, H.D., PARK, J.H., JAMA, A.N., GROENEWALD, M., BRAUN, U., CROUS, P.W. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. *Studies in Mycology* 75: 115–170, 2013.

GUNATILAKA, A.A.L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of Natural Products* 69: 509–526, 2006.

GUO, B., WANG, Y., SUN, X., TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 44: 136–142, 2008.

HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W.F., KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 895–914, 1997.

HANLIN, R. T., MENEZES, M. *Gêneros ilustrados de Ascomicetos*. UFRPE, Recife-PE, 1996.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105: 1422–1432, 2001.

HERMANTO, A., TING, A.S.Y. Comparative effect of L-asparagine and sodium nitrate in inducing L-asparaginase production by endophytic *Fusarium* sp. *Acta Biologica Szegediensis* 60: 145–150, 2015.

HUANG, F., UDAYANGA, D., WANG, X., HOU, X. FU, Y., HYDE, K.D., LI, H. Endophytic *Diaporthe* associated with Citrus: A phylogenetic reassessment with seven new species from China. *Fungal Biology* 119: 331–347, 2015.

HUANG, L., LIU, Y., SUN, Y., YAN, Q. E JIANG, Z. Biochemical characterization of a novel L-asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and its application in food safety and leukemia treatment. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 1561–1569, 2014.

HUANG, W.Y., CAI, Y.Z., HYDE, K.D., CORKE, H., SUN, M. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity* 33: 61–75, 2008.

HUANG, W.Y., CAI, Y.Z., XING, J., CORKE, H., SUN, M. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. *Economic Botany* 61: 14–30, 2007.

HYDE, K.D., SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 33: 163–173, 2008.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Plano de Manejo da Reserva Biológica de Pedra Talhada. Brasília: MMA, 126p, 2017.

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE). INPE e SOS Mata Atlântica e divulgam dados do Atlas dos Remanescentes Florestais. Disponível em: http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=1834. Acesso em: 12 de novembro 2019.

JALGAONWALA, R.E., MAHAJAN, R.T. Production of anticancer enzyme asparaginase from endophytic *Eurotium* sp. isolated from rhizomes of *Curcuma longa*. *European Journal of Experimental Biology* 4: 36–43, 2014.

JIANQIU, S., LIANGDONG, G., WEI, Z., WENXIANG, P., DEFU, C. Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants. *Science in China Series C: Life Sciences* 51: 751–759, 2008.

JIAO, R.H., XU, S., LIU, J.Y., GE, H.M., DING, H., XU, C., ZHU, H.L., TAN, R.X. Chaetominine, a Cytotoxic Alkaloid Produced by Endophytic *Chaetomium* sp. IFB-E015. *Organic Letters* 8: 5709–5712, 2006.

JIN-LONG, C., SHUN-XING, G., PEI-GEN, X. Antitumor and antimicrobial activities of endophytic fungi from medicinal parts of *Aquilaria sinensis*. *Journal of Zhejiang University Science B* 12: 385–392, 2011.

JOHRI, B.N. Endophytes to the rescue of plants! *Current Science* 90: 1315–1316, 2006.

KALYANASUNDARAM, I., NAGAMUTHU, J., SRINIVASAN, B., PACHAYAPPAN, A., MUTHUKUMARASAMY, S. Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from salt marsh fungal endophytes. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4: 663–677, 2015.

KATOH, K., TOH, H. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics* 26: 1899–1900, 2010.

KHARWAR, R.N., VERMA, V.C., STROBEL, G., EZRA, D. The endophytic fungal complex of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Current Science* 95: 228–233, 2008a.

KHARWAR, R.N., VERMA, V.C., KUMAR, A., GOND, S.K., HAPER, J.K., HESS, W.M., LOBKOVOSKY, E., MA, C., REN, Y., STROBEL, G.A. Javanicin, an antibacterial naphthaquinone from an endophytic fungus of Neem, *Chloridium* sp. *Current Microbiology* 58: 233–238, 2008b.

KHIDIR, H.H., EUDY, D.M., PORRAS-ALFARO, A., HERRERA, J., NATVIG, D.O., SINSABAUGH, R.L. A general suite of fungal endophytes dominate the roots of two dominant grasses in a semiarid grassland. *Journal of Arid Environments* 74: 35–42, 2010.

KOIDE, R.T., RICKS, K.D., DAVIS E. Climate and dispersal influence structure of leaf endophyte communities of *Quercus gambelii* in the eastern Great Basin, USA. *Fungal Ecology* 30:19–28, 2017.

KRINGS, M., TAYLOR, T.N., HASS, H., KERP, H., DOTZLER, N., HERMSEN E.J. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytologist* 174: 648–657, 2007.

KRISHNAPURA, P.R., BELUR, P.D. Isolation and screening of endophytes from the rhizomes of some Zingiberaceae plants for L-asparaginase production. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 46: 281–287, 2016.

KUMAR, D.S., LAU, C.S., WAN, J.M., YANG, D., HYDE, K.D. Immunomodulatory compounds from *Pestalotiopsis leucothès*, an endophytic fungus from *Tripterygium wilfordii*. *Life Sciences* 78: 147–156, 2005.

KUMAR, R., SEDOLKAR, V.K., TRIVENI, A.G., KUMAR, M.S., SHIVANNAVAR, C.T., GADDAD, S.M. Isolation, screening and characterization of L-asparaginase producing fungi from medicinal plants. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 8: 281–283, 2016.

KUMAR, S., STECHER, G., TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874, 2016.

KUMAR, U., SINGH, A., SIVAKUMAR, T. Isolation and screening of endophytic actinomycetes from different parts of *Embllica officinalis*. *Pharmaceutical Sciences* 2: 423–434, 2011.

KUSARI, S., ZÜHLKE, S., SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. *Journal of Natural Products* 72: 2–7, 2009.

LANG, S. Über desamidierung im Tierkörper. *Beiträge zur Chemischen Physiologie und Pathologie* 5: 321–345, 1904.

LARRAN, S., MÔNACO, C., ALIPPI, H.E. Endophytic fungi in leaves of *Lycopersicon esculentum* Mill. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 17: 181–184, 2001.

LEE, C.J., LOBKOVSKY, E., PLIAM, N.B., STROBEL, G.A., CLARDY, J. Subglutinols A and B, immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. *Journal of Organic Chemistry* 60: 7076–7077, 1995.

LEGAULT, D.; DESSUREAULT, M.; LAFLAMME, G. Mycoflore of the *Pinus banksiana* et *Pinus resinosa* I. Champignons endophytes. *Canadian Journal of Botany* 67: 2053–2060, 1989.

LI, J.Y., SIDHU, R.S., FORD, E., HESS, W.M. STROBEL, G.A. The induction of taxol production in the endophytic fungus *Periconia* sp. from *Torreya grandifolia*. *Journal of Industrial Microbiology* 20: 259–264, 1998.

LI, J.Y., STROBEL, G.A., HARPER, J.K., LOBKOVSKY, E., CLARDY, J. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Organic Letters* 2: 767–770, 2000.

LI, T., DENG, W.Q. LI, T.H., ZHANG, W.M., HOSEN, M.I., SONG, B. Endophytic fungal communities associated with leaves, stems and roots of four medicinal plants in South China. *Studies in Fungi* 3(1): 126–140, 2018.

LI, X., HE, X., HOU, L., REN, Y., WANG, S., SU, F. Dark septate endophytes isolated from a xerophyte plant promote the growth of *Ammopiptanthus mongolicus* under drought condition. *Scientific Reports* 8: 7896, 2018.

LI, W.C., ZHOU, J., GUO, S.Y., GUO, L.D. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. *Fungal Diversity* 25: 69–80, 2007.

LOPES, A.M., OLIVEIRA-NASCIMENTO, L., RIBEIRO, A., TAIRUM JR., C.A., BREYER, C.A., OLIVEIRA, M.A., MONTEIRO, G., SOUZA-MOTTA, C.M., MAGALHÃES, P.O., AVENDAÑO, J.G.F., CAVACO-PAULO, A.M., MAZOLLA, P.G., RANGEL-YAGUI, C.O., SETTE, L.D., CONVERTI, A., PESSOA, A. Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. *Critical Reviews in Biotechnology* 37: 82–99, 2017.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2008.

LOUREIRO, C. B., BORGES, K.S., ANDRADE, A. F., TONE, L.G., SAID, S. Purification and biochemical characterization of native and pegylated form of L-asparaginase produced by *Aspergillus terreus* and evaluation of its antiproliferative activity. *Advances in Microbiology* 2: 138–145, 2012.

LYONS, P.C., PLATTNER, R.D., BACON, C.W. Occurrence of peptide and clavine ergot alkaloids in tall fescue grass. *Science* 232: 487–489, 1986.

MAGURRAN, A.E. *Ecological Diversity and its measurement*. Princeton, Newjersey, 179p, 1988.

MAHESWARI, H., RAJAGOPAL, K. Biodiversity of endophytic fungi in *Kigelia pinnata* during two different seasons. *Current Science* 104(4): 515–518, 2013.

MALLETTE, N.D., PANKRANTZ, E.M., BUSSE, S., STROBEL, G.A., CARLSON, R.P., PEYTON, B. Evaluation of cellulose as a substrate for hydrocarbon fuel production by *Ascomycorhiza sarcooides* (NRRL 50072). *Journal of Sustainable Bioenergy Systems* 4: 33–49, 2014.

MANASA, C., NALINI, M.S. L-asparaginase activity of fungal endophytes from *Tabernaemontana heyneana* Wall. (Apocynaceae), endemic to the western ghats (India). *International Scholarly Research Notices* 2014: 925131, 2014.

MARINHO, A.M.R., RODRIGUES-FILHO, E., MOITINHO, M.R.L., SANTOS, L.S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16: 280–283, 2005.

MASHBURN, L.T., WRISTON, J.C. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 105: 450–452, 1964.

MEDINA, R.P., ARAUJO, A.R., BATISTA JR, J.M., CARDOSO, C.L., SEIDL, C., VILELA, A.F.L., DOMINGOS, H.V., COSTA-LOTUFO, L.V. ANDERSEN, R.J., SILVA, D.H.S. Botryane terpenoids produced by *Nemania bipapillata*, an endophytic fungus isolated from red alga *Asparagopsis taxiformis* Falkenbergia stage. *Scientific Reports* 9:12318, 2019.

MILLER, M.A., PFEIFFER, W., SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: *Proceedings of the gateway computing environments workshop* (GCE) 14 Nov 2010. Institute of Electrical and Electronics Engineers, New Orleans, LA, pp 1–8, 2010.

MOHAN KUMAR, N.S., SHIMRAY, C.A., INDRANI, D., MANONMANI, H.A. Reduction of Acrylamide Formation in Sweet Bread with L-asparaginase Treatment. *Food and Bioprocess Technology* 7: 741–748, 2013.

MOHARRAM, A.M., ZOHRI, A.A., SEDDEK, N.H. L-asparaginase production by endophytic fungi isolated from *Withania somnifera* in Egypt. *SS International Journal of Multidisciplinary Research* 2: 2016.

MURALI, T.S., SURYANARAYANAN, T.S., VENKATESAN, G. Fungal endophytes communities in two tropical forest of southern India: diversity and host affiliation. *Mycological Progress* 6:191–199, 2007.

MYERS, N., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., DA FONSECA, G.A. B., KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858, 2000.

NAGARAJAN, A., THIRUNAVUKKARASU, N., SURYANARAYANAN, T. S., & GUMMADI, S. N. Screening and isolation of novel glutaminase free L-asparaginase from fungal endophytes. *Research Journal of Microbiology* 9: 163–176, 2014.

NAIR, D.N., PADMAVATHY, S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *The Scientific World Journal* 2014: 11p, 2014.

NALINI, M.S., MAHESH, B., TEJESVI, M.V., PRAKASH, S.H., SUBBAIAH, V., KINI, K.R., SHETTY, H. Fungal endophytes from the three-leaved caper, *Crataeva magna* (Lour.) D.C. (Capparidaceae). *Mycopathologia* 159: 245–249, 2005.

NARTA, U.K., KANWAR, S.S., AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 61: 208–221, 2007.

NASCIMENTO, T.L., OKI, Y., LIMA, D.M.M., ALMEIDA-CORTEZ, J.S., FERNANDES, G.W., SOUZA-MOTTA, C.M. Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. *Fungal Ecology* 14: 79–86, 2015.

NYLANDER, J.A.A. MrModelTest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, 2004.

OLIVEIRA, D.M., PEREIRA, C.B., MENDES, G., JUNKER, J., KOLLOFF, M., ROSA, L.H., ROSA, C.A., ALVES, T.M.A., ZANI, C.L., JOHANN, S., COTA, B.B. Two new usnic acid derivatives from the endophytic fungus *Mycosphaerella* sp. *Zeitschrift für Naturforschung C Journal of Biosciences* 73:449–455, 2018.

OLIVEIRA-FILHO, A.T., FONTES, M.A.L. Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate. *Biotropica* 32(4): 793-810, 2000.

OLMSTEAD, R.G., ZJHRA, M.L., LOHMANN, L.G., GROSE, S.O., ECKERT, A.J. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. *American Journal of Botany* 96:1731–1743, 2009.

OSÉS, R., VALENZUELA, S., FREER, J., SANFUENTES, E., RODRÍGUEZ, J. Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Diversity* 33: 77–86, 2006.

OSONO, T. Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*) in British Columbia. *Mycoscience* 48: 47–52, 2007.

PADHI, L., MOHANTA, Y.K., PANDA, S.K. Endophytic fungi with great promises: A review. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* 3: 152–170, 2013.

PÁDUA, A.P.S.L., FREIRE, K.T.L.S., OLIVEIRA, T.G.L., SILVA, L.F., ARAÚJO-MAGALHÃES, G.R., AGAMEZ-MONTALVO, G.S., SILVA, I.R., BEZERRA, J.D.P., SOUZA-MOTA, C.M. 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* no ahead. ISSN 0102-3306, 2018.

PAGE, R.D. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, v. 12, p. 357-358, 1996.

PANACCIONE, D.G., JOHNSON, R.D., WANG, J., YOUNG, C.A., DAMRONGKOOL, P., SCOTT, B., SCHARDT, C.L. Elimination of ergovaline from grass-*Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of endophyte. *Proceedings of the National Academy of Science* 98: 12820–12825, 2001.

PATIL, M.P., PATIL, R.H., MAHESHWARI, V.L. A novel and sensitive agar plug assay for screening of asparaginase-producing endophytic fungi from *Aegle marmelos*. *Acta Biologica Szegediensis* 56: 175–177, 2012.

PATRO, K.R., GUPTA, N. Extraction, purification and characterization of L-asparaginase from *Penicillium* sp. by submerged fermentation. *Biology Research* 3, 30–34, 2012.

PEIXOTO-NETO, P.A.S., AZEVEDO, J. L., ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 29: 32–37, 2002.

PEIXOTO-NETO, P.A.S., AZEVEDO, J. L., CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: Status atual e perspectivas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 3: 69–72, 2004.

PERERA, R.H., HYDE, K.D., DISSANAYAKE, A.J., JONES, E.B.G., LIU, J.K., WEI, D., LIU, Z.Y. *Diaporthe collariana* sp. nov., with prominent collarettes associated with *Magnolia champaca* fruits in Thailand. *Studies in Fungi* 3: 141–151, 2018.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews, J., Hirano, S.S. (Ed.). *Microbial ecology of leaves*. New York: Springer Verlag, 1991.

PETRINI, O.; Stone, J.; Carroll, F.E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. *Canadian Journal of Botany* 60: 789–796, 1992.

PHOTITA, W., LUMYONG, S., LUMYONG, P. HYDE, K.D. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycological Research* 105: 1508-1513, 2001.

PIETERS, R., HUNGER, S.P., BOOS, J., RIZZARI, C., SILVERMAN, L., BARUCHEL, A., GOEKBUGET, N., SCHRAPPE, M., PUI, C.H. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase. *Cancer* 117: 238–249, 2012.

PIMENTEL, I. C., KUCZKOWSKI, F. R., CHIME, M. A., AUER, C. G., JUNIOR, A. G. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). *Floresta*, 36(1), 2006.

PINTO, A.C., SILVA, D.F.S., BOLZANI, V.S., LOPES, N.P., EPIFANO, R.A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. *Química Nova* 25: 45–61, 2002.

PIRES, I.M.O., SILVA, A.V., SANTOS, M.G.S., BEZERRA, J.P.D., BARBOSA, R.N., SILVA, D.C.V., SVEDESE, V.M., SOUZA-MOTTA, C.M., PAIVA, L.M. Potencial antibacteriano de fungos endofíticos de cactos da caatinga, uma floresta tropical seca no nordeste do brasil. *Gaia Scientia* 9: 155–161, 2015.

PORRAS-ALFARO, A., HERRERA, J., SINSABAUGH, R. L., ODENBACH, K. J., LOWREY, T., NATVIG, D. O. Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 2805–2813, 2008.

PURI, S.C., NAZIR, A., CHAWLA, R., ARORA, R., RIYAZ-UL-HASAN, S., AMNA, T., AHMED, B., VERMA, V., SINGH, S., SAGAR, R., SHARMA, A., KUMAR, R., SHARMA, R.K., QAZI, G.N. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. *Journal of Biotechnology* 122: 494–510, 2006.

PRAKASHAM, R.S., RAO, C.S., RAO, R.S., LAKSHMI, G.S. E SARMA, P.N. L-asparaginase production by isolated *Staphylococcus* sp. *Journal of Applied Microbiology* 102: 1382–1391, 2007.

QADRI, M., RAJPUT, R., ABDIN, M.Z., VISHWAKARMA, R.A., RIYAZ-UL-HASSAN, S. Diversity, molecular phylogeny, and bioactive potential of fungal endophytes associated with the himalayan blue pine (*Pinus wallichiana*). *Microbial Ecology* 67: 877–887, 2014.

QI, F., JING, T., ZHAN, Y. Characterization of endophytic fungi from *Acer ginnala* Maxim. In an artificial plantation: media effect and tissue-dependent variation. *Plos One*: 7(10): e46785, 2012.

RAGHUKUMAR, C. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. *Fungal Diversity* 31: 19–35, 2008.

RAKOTONIRIANA, E.F., MUNAUT, F., DECOCK, C., RANDRIAMAMPIONONA, D., ANDRIAMBOLOLOINAINA, M., RAKOTOMALALA, T., RAKOTONIRINA, E.J., RABEMANANTSOA, C., CHEUK, K., RATSIMAMANGA, S.U., MAHILLON, J., EL-JAZIRI, M., QUETIN-LECLERCQ, J., CORBISIER, A.M. Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves. *Antonie van Leeuwenhoek* 93(1-2): 27–36, 2008.

RANA, P., BOONCHIRD, C., KOIRALA, M., BHUJU, D.R. Impact of altitude on the colonization frequency of endophytic fungi isolated from *Rhododendron campanulatum* D. Don of Sagarmatha National Park, Nepal. *Journal of Basic and Applied Plant Sciences* 1(2): 109, 2017.

REDMAN, R.S., DUNIGAN, D.D., RODRIGUEZ, R.J. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist* 151: 705–716, 2001.

REZENDE, C.L., SCARANO, F.R., ASSAD, E.D., JOLY, C.A., METZGER, J.P., STRASSBURG, B.B.N., TABARELLI, M., FONSECA, G.A., MITTERMEIER, R.A. From hotspot to hopespot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. *Perspectives in Ecology and Conservation* 16: 208–214, 2018.

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. *Mycologia* 42:265-270, 1950.

RODRÍGUEZ, R., REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 59: 1109–1114, 2008.

RUBINI, M.R., SILVA-RIBEIRO, R.T., POMELLA, A.W.V., MAKI, C.S., ARAÚJO, W.L., SANTOS, D.R., AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences* 1: 24–33

RUSSELL, J.R., HUANG, J., ANAND, P., KUCERA, K., SANDOVAL, A.G., DANTZLER, K.W., HICKMAN, D., JEE, J., KIMOVEC, F.M., KOPPSTEIN, D., MARKS, D.H., MITTERMILLER, P.A., NÚÑEZ, S.J., SANTIAGO, M., TOWNES, M.A., VISHNEVETSKY, M., WILLIAMS, N.E., VARGAS, M.P.N., BOULANGER, L-A., BASCOM-SLACK, C., STROBEL, S.A. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 6076–6084, 2011.

SADANANDA T.S., NIRUPAMA R., CHAITHRA K., GOVINDAPPA M., CHANDRAPPA C.P., VINAY RAGHAVENDRA B. Antimicrobial and antioxidant activities of endophytes from *Tabebuia argentea* and identification of anticancer agent (lapachol). *Journal of Medicinal Plants Research* 5(16): 3643–3652, 2011.

- SARQUIS, M.I.M., OLIVEIRA, E.M.M., SANTOS, A.S., COSTA, G.L. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99: 489–492, 2004.
- SATI, S.C., PARGAEIN, N., BELWAL, M. Diversity of aquatic hyfomycetes as root endophytes on pteridophytic plants in Kumaun Himalaya. *Journal of American Science* 5: 179–182, 2009.
- SAIKKONEN, K., FAETH, S.H., HELANDER, M., SULLIVAN, T.J. Fungal Endophytes: A Continuum of Interactions with Host Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 319–43, 1998.
- SAIKKONEN, K., WÄLI, P., HELANDER, M., FAETH S.H. Evolution of endophyte-plant symbiosis. *Trends Plant Science* 9: 275–280, 2004.
- SANTAMARÍA, J. BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffe leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology* 50: 1–8, 2005.
- SAMSON, R.A., FRISVAD, J.C. *Penicillium* Subgenus *Penicillium*: new Taxonomics 210 Schemes, Mycotoxins and Other Extrolites. *Studies in Micology* 49: 1-260, 2004.
- SANTOS, L.L., SANTOS, L.L., ALVES, A.S.A., OLIVEIRA, L.S.D, SALES, M.F. Bignoniaceae Juss. no Parque Nacional Vale do Catimbau, Pernambuco. *Rodriguésia* 64(3): 479-494, 2013.
- SANTOS, M.G.S., BEZERRA, J.D.P, SVEDESE, V.M., SOUSA, M.A., SILVA, D.C.V., MACIEL, M.H.C., PAIVA, L.M., PORTO, A.L.F., SOUZA-MOTTA, C.M. Screening of endophytic fungi from cactus of the Brazilian tropical dry forest according to their L-asparaginase activity. *Sydowia* 67: 147–156, 2015.
- SAXENA, R.K., SINHA, U. L-Asparaginase and glutaminase activities in the cultures filtrates of *Aspergillus nidulans*. *Current Science* 50: 281–219, 1981.
- SCHARDL, C.L. *Epichloe festucae* and related mutualistic symbionts of grasses. *Fungal Genetics and Biology* 33: 69–82, 2000.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; AUST, H.J.; RÖMMERT, A.K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106: 996–1004, 2002.
- SCHULZ, B., BOYLE, C. The endophytic continuum. *Mycological Research* 109: 661–686, 2005.
- SCHULZ, B.; WANKE, U.; DRAEDER, S.; AUST, H.J. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness on surface sterilization methods. *Mycological Research* 97: 1447–1450, 1993.
- SELOSSE, M.A., BAUDOIN, E., VANDENKOORNHUYSE, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *Comptes Rendus Biologies* 327: 639–648, 2004.
- SHENG-LIANG, Z., SHU-ZHEN, Y., ZHEN-YING, W., SHUANG-LIN, C. Endophytic fungi associated with *Macrosolen tricolor* and its host *Camellia oleifera*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30:1775–1784, 2014.
- SILVA-HUGHES, A.F., WEDGE, D.E., CANTRELL, C.L., CARVALHO, C.R., PAN, Z., MORAES, R.M., MADDOXX, V.L., ROSA, L.H. Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. *Microbiological Research* 175:67–77, 2015.

SILVA, L.F., FREIRE, K.T.L.S., ARAÚJO-MAGALHÃES, G.R., AGAMEZ-MONTALVO, G.S., SOUSA, M.A., COSTA-SILVA, T.A., PAIVA, L.M., PESSOA-JUNIOR, A., BEZERRA, J.D.P., SOUZA-MOTTA, C.M. *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* 34: 162, 2018.

SIQUEIRA, M.V., BRAUN, U., SOUZA-MOTTA, C.M. *Corynespora subcylindrica* sp. nov., a new hyphomycete species from Brazil and a discussion on the taxonomy of corynespora-like genera. *Sydowia* 60: 113–122, 2008.

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

SIVANESAN, A. *The bitunicate Ascomycetes and their anamorphs*. J. Cramer., Germany, 1984.

SOLIS, M.J.L., YURKOV, A., CRUZ, T.E., UNTERSEHER, M. Leaf-inhabiting endophytic yeasts are abundant but unevenly distributed in three *Ficus* species from botanical Garden greenhouses in Germany. *Mycological Progress* 14: 10–19, 2015.

SOUZA, A. Q. L., SOUZA, A. D. L., ASTOLFI FILHO, S., BELÉM PINHEIRO, M. L., SAQUIS, M. I. M., PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* (Bentham). *Acta Amazonica* 34: 185–195, 2004.

SOUZA, I.M., BASSI, G.J., LUIZ, J.H.H., HIRATA, D.B. Isolation and Screening of Extracellular Lipase-Producing Endophytic Fungi from *Handroanthus impetiginosus*. *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology* 4(2): 1–10, 2018.

SOUZA, V.C., LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa, 640p, 2005.

SPECIAN, V., SARRAGIOTTO, M.H., PAMPHILE, J.A., CLEMENTE, E. Chemical characterization of bioactive compounds from the endophytic fungus *Diaporthe helianthi* isolated from *Luehea divaricata*. *Brazilian Journal of Microbiology* 43(3): 1174–1182, 2012.

SPITELLER, M., PURI, S.C., VERMA, V., AMNA, T., QAZI, G.N. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. *Journal of Natural Products* 68: 1717–1719, 2005.

STAMFORD, T.L.M., ARAÚJO, J.M., STAMFORD, N.P. Atividade enzimática de microrganismos isolados de Jacupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciências de Tecnologia dos Alimentos* 18: 382–385, 1998.

STIERLE, A., STROBEL, G.A. STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreans* an endophytic fungus of pacific yew. *Science* 260: 214–216, 1993.

STONE, J.K., POLISHOOK, J.D., WHITE, JR.F. Endophytic fungi. In: Muller, J.M., Bills, G.F., Foster, M.S. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. San Diego: Elsevier Academic Press, pp. 241–270, 2004.

STROBEL, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection* 5: 535–544, 2003.

STROBEL, G.A. Methods of discovery and techniques to study endophytic fungi producing fuel related hydrocarbons. *Natural Product Reports* 39: 259–272, 2014a.

STROBEL, G.A. The story of mycodiesel. *Current Opinion in Microbiology* 19: 52–58, 2014b.

STROBEL, G.A. The Emergence of Endophytic Microbes and Their Biological Promise. *Journal of Fungi* 4: 57, 2018.

STROBEL, G.A., DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 491–502, 2003.

STROBEL, G.A., DAISY, B., CASTILLO, U., HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 67: 257–268, 2004.

STROBEL, G. A., DIRKSE, E., SEARS, J., MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. *Journal of the Society for General Microbiology* 147: 2943–2950, 2001.

STROBEL, G.A., FORD, E., LI J.Y., SEARS, J., SIDHU, R.S., HESS, W.M. *Seimatoantlerium tepuiense* gen. nov. a unique endophytic fungus producing taxol from the Venezuelan-Guayana system. *Applied Microbiology* 22: 426–433, 1999.

STROBEL, G.A., FORD, E., WORAPONG, J., HARPER, J.K., ARIF, A.M, GRANT, D.M, FUNG, P.C.W., CHAU, R.M.W. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry* 60: 179–183, 2002.

STROBEL, G.A., KNIGHTON, B., KLUCK, K., REN, Y., LIVINGHOUSE, T., GRIFFEN, M., SPAKOWICZ, D., SEARS, J. The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072). *Microbiology* 154: 3319–3328, 2008.

STROBEL, G.A., STIERLE, A., STIERLE, D., HESS, W.M. *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew. *Mycotaxon* 47: 71–78, 1993.

STROBEL, G.A., YANG, X., SEARS, J., KRAMER, R., SIDHU, R.S., HESS, W.M. Taxol from *Pestalotiopsis microspore*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology* 142: 435–440, 1996.

SURYANARAYANAN, T.S., MURALI, T.S., THIRUNAVUKKARASU, N., RAJULU, M.B.G., VENKATESAN, G., SUKUMAR, R. Endophytic fungal communities in woody perennials of three tropical forest types of the Western Ghats, southern India. *Biodiversity and Conservation* 20:913–928, 2011.

SURYANARAYANAN, T.S., SENTHILARASU, G., MURUGANANDAM, V. Endophytic fungi from *Cuscuta reflexa* and its host plants. *Fungal Diversity* 4: 117–123, 2000.

SURYANARAYANAN, T. S., THENNARASAN, S. Temporal variations in endophyte assemblages of *Plumeria rubra* leaves. *Fungal Diversity* 15:197–204, 2004.

SURYANARAYANAN, T.S., VENKATESAN G., MURALI, T.S. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. *Current Science* 85: 489–493, 2003.

SUTTON, B. C. *The Coelomycetes: Fungy Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata*. Kew Commonwealth Mycological Intitute, 1980.

SCHWARZ, M., KÖPCKE, B., WEBER, R.W.S, STERNER, O. ANKE, H. 3-Hydroxypropionic acid as a nematocidal principle in endophytic fungi. *Phytochemistry* 65: 2239–2245, 2004.

THAKUR, M., LINCOLN, L., NIYONZIMA, F.N., MORE, S.S. Isolation, purification and characterization of fungal extracellular L-asparaginase from *Mucor hiemalis*. *Journal of Biocatalysis and Biotransformation* 2: 12–14, 2014.

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

TAO, G., LIU, Z.Y., HYDE, K.D., LUI, X.Z., YU, Z.N. Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). *Fungal Diversity* 33: 101–122, 2008.

TAREKE, E., RYDBERG, P., KARLSSON, P., ERIKSSON, S., TÖRNQVIST, M. Acrylamide: a cooking carcinogen? *Chemical Research in Toxicology* 13: 517–522, 2000.

THANGAVEL, A., KRISHNAMOORTHY, G., SUBRAMANIAN, M., MARUTHAMUTHU, M. Seaweed endophytic fungi: a potential source for glutaminase free L-asparaginase. *Chemical Science Review and Letters* 2: 348–354, 2013.

THEANTANA, T., HYDE, K. D., LUMYONG, S. Asparaginase production by endophytic fungi isolated from some Thai medicinal plants. *KMITL Science and Technology Journal* 7:13–18, 2007.

THEANTANA, T., HYDE, K. D., LUMYONG, S. Asparaginase production by endophytic fungi from Thai medicinal plants: citotoxicity properties. *International Journal Integrative Biology* 7:1–8, 2009.

THIRUNAVUKKARASU, N., SURYANARAYANAN T.S., MURALI, T.S., RAVISHANKAR, J.P., GUMMADI, S.N. L-asparaginase from marine derived fungal endophytes of seaweeds. *Mycosphere* 2: 147–155, 2011.

THOMPSON, S.M., TAN, Y.P., SHIVAS, R.G., NEATE, S.M., MORIN, L., BISSETT, A. Green and brown bridges between weeds and crops reveal novel *Diaporthe* species in Australia. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 35: 39–49, 2015.

TIPPANI, R., SIVADEVUNI, G. Nutritional factors effecting the production of L-asparaginase by the *Fusarium* sp. *African Journal of Biotechnology* 11: 3692–3696, 2012.

TOMSHECK, A., STROBEL, G.A., BOOTH, E., GEARY, B., SPAKOWICZ, D., KNIGHTON, B., FLOERCHINGER, C., SEARS, J., LIARZI, O., EZRA, D. *Hypoxylon* sp. an endophyte of *Persea indica*, producing 1,8-cineole and other bioactive volatiles with fuel potential. *Microbial Ecology* 60: 903–914, 2010.

TONIAL, F., MAIA, B.H.L.D.N., SOBOTTKA, A.M., SAVI, D.C., VICENTE, V.A., GOMES, R.R., GLIENKE, C. Biological activity of *Diaporthe terebinthifolius* extracts against *Phyllosticta citricarpa*. *FEMS Microbiology Letters* 364(5), 2017.

VAN DEN BERG, H. Asparaginase revisited. *Leukemia & Lymphoma*. 52: 168–178, 2011.

VENIERAKI, A., DIMOU, M., KATINAKIS, P. Endophytic fungi residing in medicinal plants have the ability to produce the same or similar pharmacologically active secondary metabolites as their hosts. *Hellenic Plant Protection Journal* 10: 51–66, 2017.

VENKATACHALAM, A., THIRUNAVUKKARASU, N., SURYANARAYANAN, T.S. Distribution and diversity of endophytes in seagrasses. *Fungal Ecology* 13: 60–65, 2015.

- VERMA, V.C.; GOND, S.K.; KUMAR, A.; MISHRA, A.; KHARWAR, R N.; GANGE, A.C. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity and antimicrobial activity. *Microbial Ecology* 57: 749–756, 2009.
- VIEIRA, P.D.S.; SOUZA-MOTTA, M.C.; LIMA, D.; TORRES, J.B.; QUECINE, M.C.; AZEVEDO, J.L.; OLIVEIRA, N.T. Endophytic fungi associated with transgenic and non-transgenic cotton. *Mycology* 2: 91–97, 2011.
- VOLKSCH, B., ULLRICH, M., FRITSCH, W. Identification and population dynamics of bacteria in leaf spots of soybean. *Microbial Ecology* 24: 305–311, 1992.
- VUJANOVIC, V., BRISSON, J. A comparative study of endophytic mycobiota in leaves of *Acer saccharum* in eastern North America. *Mycological Progress* 1: 147–154, 2002.
- WANG, F.W., JIAO, R.H., CHENG, A.B., TAN, S.H., SONG, Y.C. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 79–93, 2006.
- WANG, J.F., LU, H.Y., HUANG, Y.J., ZHENG, Z.H. AND SU, W.J. A taxol-producing endophytic fungus isolated from *Taxus mairei* and its anticancer activity. *Journal of Xiamen University (Natural Science)* 38: 485–487, 1999.
- WANG, S., LI, X.M., TEUSCHER, F., LI, D.L., DIESEL, A., EBEL, R., PROKSCH, P., WANG, B.G. Chaetopyranin, a benzaldehyde derivative, and other related metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus derived from the marine red alga *Polysiphonia urceolata*. *Journal of Natural Products* 69: 1622–1625, 2006.
- WHITECAR, J.P., BODEY, G.P., HARRIS, J.E., FREIREICH, E.J. L-asparaginase. *New England Journal of Medicine* 282: 732–734, 1970.
- White Jr., J.F., Belanger, F., Meyer, W., Sullivan, R.F., Bischoff, J.F., Lewes, E.A. Clavicipitalean fungal epibionts and endophytes – development of symbiotic interaction with plants. *Symbiosis* 33: 201–213, 2002.
- White Jr., J.F., Reddy, P.V., Bacon, C.W. Biotrophic endophytes of grasses: a systemic appraisal. In: BACON, C.W., WHITE, J.F. (Eds.). *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker, 2000.
- WOLOCK-MADEJ, C., CLAY, K. Avian seed preference and weight loss experiment: the role of fungal-infected fescue seeds. *Oecologia* 88: 296–302, 1991.
- YANG, X., STROBEL, G.A., STIERLE, A., HESS, W.H., LEE, J., CLARDY, J. A fungal endophyte-tree relationship: *Phoma* sp. in *Taxus wallachiana*. *Plant Science* 102: 1–9, 1994.
- ZHANG, Q., ZHANG, J., YANG, L., ZHANG, L., JIANG, D., CHEN, W., LI, G. 2014. Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biological Control* 72: 98–108, 2014.
- ZHANG, T., YAO, Y.F. Endophytic fungal communities associated with vascular plants in the High Arctic zone are highly diverse and host-plant specific. *PLOS ONE* 10(6), 2015.
- ZHAO, J., SHAN, T., MOU, Y., ZHOU, L. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. *Mini Reviews in Medical Chemistry* 11: 159–168, 2011.
- ZOU, W.X., MENG, J.C., LU, H., CHEN, G.X., SHI, G.X., ZHANG, T.Y., TAN, R.X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *Journal of Natural Products* 63: 1529–1530, 2000.

ZYZAK, D.V., SANDERS, R.A., STOJANOVIC, M., TALLMADGE, D.H., EBERHART, B.L., EWALD, D.K., GRUBER, D.C., MORSCH, T.R., STROTHERS, M.A., RIZZI, G.P., VILLAGRAN, M.D. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 4782–4787, 2003.