



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

ARTHUR VINÍCIUS DA SILVA

**FUNGOS ENDOFÍTICOS EM *MIMOSA TENUIFLORA*,
ESPÉCIE NATIVA DA CAATINGA**

RECIFE
2021

ARTHUR VINÍCIUS DA SILVA

**FUNGOS ENDOFÍTICOS EM *MIMOSA TENUIFLORA*,
ESPÉCIE NATIVA DA CAATINGA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Área de Concentração Micologia Básica, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Orientadora: Dra. Leonor Costa Maia
Coorientador: Dr. Jadson Diogo Pereira Bezerra

RECIFE
2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Silva, Arthur Vinícius da.

Fungos endofíticos em mimosa tenuiflora, espécie nativa da caatinga. / Arthur Vinícius da Silva – 2021.

76 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Leonor Costa Maia.

Coorientador: Jadson Diogo Pereira Bezerra.

Mestrado (dissertação) – Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, 2021.

Inclui referências e apêndice.

1. Diversidade de fungos. 2. Endófitos. 3. Fabaceae-Mimosoideae. 4. Floresta seca. I. Maia, Leonor Costa (Orient.). II. Bezerra, Jadson Diogo Pereira (Coorient.). III. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-027

ARTHUR VINÍCIUS DA SILVA

**FUNGOS ENDOFÍTICOS EM *MIMOSA TENUIFLORA*, ESPÉCIE NATIVA DA
CAATINGA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Área de Concentração Micologia Básica, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 29/07/2021

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Leonor Costa Maia/UFPE

Dr. Rafael José Vilela de Oliveira/UFPE

Dr. André Wilson Campos Rosado/UFV

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a construção de meu conhecimento científico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação (PROPG).

À curadoria da Micoteca URM da UFPE por ceder espaço e equipamentos para desenvolver parte do meu trabalho: Profa. Cristina, Prof. André, Téc. Eliane e colaboradoras Rosana, Greicilene e Diogo muito obrigado!

À equipe do Laboratório de Micorrizas, que fez e faz parte do meu desenvolvimento acadêmico, pela ajuda e apoio, e sempre à disposição: Inácio, Indra, Larissa, Joana, Arthur, Profa. Elaine, Profa. Leonor, em especial à Dra. Daniele Magna, Ms. Hilton e Dra. Edvaneide pelo apoio na coleta de material e à Dra. Danielle Karla pelo apoio nas análises dos dados. A todos vocês, muito obrigado!

À equipe do Laboratório de Micologia Ambiental, que fez e faz parte do meu desenvolvimento acadêmico. Obrigado a Ana Patricia, Amanda, Anthony, Layanne, Letícia, Juliana, Tamara, Prof. Alexandre, Profa. Laura, em especial a Thays pelo ensino, supervisão e ajuda nos procedimentos de extração de DNA. A todos vocês, muito obrigado!

À equipe do Laboratório I da Pós Graduação em Biologia de Fungos por ceder o espaço e equipamentos. Obrigado pela ajuda e apoio de sempre.

À equipe do Laboratório de Fungos Fitopatogênicos, em especial à colega Nicole Brito, Dr. Ana Carla e ao Prof. Roger pelo tempo dispendido comigo. Muito obrigado.

À Dra. Marcela do Laboratório de Hifomicetos pelo suporte. Muito obrigado.

Aos Técnicos do Departamento de Micologia: Debora, Leonardo e Raquel. Muito obrigado!

Agradeço a todos os docentes e discentes do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da UFPE, os quais foram de grande ajuda, contribuindo sempre no meu desenvolvimento acadêmico. Obrigado a todos e todas com quem tive o privilégio e prazer de conviver e aprender.

Aos meus familiares e aos familiares de minha esposa pelo apoio moral.

Ao meu pai Sostenes de Assis e Silva pela ajuda e apoio, sempre disponível.

Aos meus sogros Rosângela Edna de Andrade e Edivan Célio pelo apoio e ajuda.

Aos colegas que fiz durante o mestrado, que sempre estiveram disponíveis, ajudando de alguma forma na minha progressão. Obrigado por me deixarem fazer parte do seu ciclo de amizade.

Um agradecimento especial à Professora Leonor Costa Maia, pela ajuda de sempre, profissionalmente e pessoalmente, sempre com dedicação, paciência e respeito. Foi, sem dúvidas, uma pessoa chave na minha vida acadêmica, me auxiliando durante o mestrado. Fico muitíssimo grato e honrado em tê-la como orientadora. Muito agradecido, obrigado professora.

Um agradecimento especial ao Professor Dr. Jadson Bezerra pelo auxílio e ajuda na minha progressão acadêmica. Um profissional que respeito e admiro e sem dúvida foi peça importante na consolidação deste trabalho. Muitíssimo obrigado professor!

Agradeço à banca examinadora pela ajuda na melhoria e aprimoramento deste trabalho. Muito obrigado.

Faço um agradecimento especial às duas mulheres que sempre estiveram ao meu lado desde o início da minha vida acadêmica: a Ms. Rosália Cristina Andrade Silva, minha esposa, parceira, amiga e conselheira e à minha querida mãe Helena Maria da Silva, mulher guerreira que sempre está ao meu lado nas minhas tomadas de decisão. Creio que sem vocês não estaria apresentando este trabalho. Agradeço por fazerem parte desta trajetória. Muitíssimo obrigado!

“O homem não é nada além daquilo que a educação faz dele”

(KANT, 1970).

RESUMO

Fungos endofíticos compõem uma diversidade de microrganismos que não causam dano aparente ao hospedeiro, fornecendo proteção a planta contra fatores bióticos e abióticos e apresentando potencial biotecnológico. A Caatinga é uma das mais diversas regiões semiáridas do planeta com muitas espécies endêmicas/nativas de plantas, animais e fungos. *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae), nativa da Caatinga, possui papel importante na conservação do ambiente natural, mas não se conhece a sua relação com fungos endofíticos. O objetivo do estudo foi estimar a diversidade de fungos endofíticos em amostras de *M. tenuiflora* coletadas no Raso da Catarina, Bahia, em área de preservação da Caatinga. Folíolos e ramos de seis indivíduos de *M. tenuiflora* foram coletados, totalizando 540 fragmentos. No total, 17 (6,3%) fragmentos de folíolos e 124 (45,9%) de ramos foram colonizados. A colonização dos fragmentos permitiu o isolamento de 18 fungos endófitos em folíolos e 163 nos ramos. Os isolados foram identificados com base em características morfológicas e de filogenia utilizando sequências de DNA. *Readeriella* e *Leptosillia*, isolados exclusivamente de ramos, foram os gêneros mais frequentes. *Sporormiella minima* foi a espécie mais frequentemente isolada em folhas. O número de isolados e de táxons diferiu entre folíolos e ramos, com maior riqueza registrada nos ramos. Porém, a diversidade fúngica não diferiu significativamente entre folíolos e ramos. Entre os isolados de ramos, uma nova espécie de *Leptosillia* foi encontrada e descrita. Além de possuir rico micobioma, as plantas nativas da Caatinga constituem fonte de novas espécies para a ciência.

Palavras-chave: Diversidade de fungos. Endófitos. Fabaceae-Mimosoideae. Floresta seca.

ABSTRACT

Endophytic fungi compose a diversity of microorganisms that cause no apparent damage to the host, providing protection to the plant against biotic and abiotic factors and presenting biotechnological potential. The Caatinga is one of the most diverse semi-arid regions on the planet with many endemic/native species of plants, animals and fungi. *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae), native to the Caatinga, plays an important role in the conservation of the natural environment, but its relationship with endophytic fungi is unknown. This study aimed to estimate the diversity of endophytic fungi in samples of *M. tenuiflora* collected in Raso da Catarina, Bahia, in a Caatinga preservation area. Leaflets and branches of six individuals of *M. tenuiflora* were collected, using 540 fragments. In total, 17 (6.3%) fragments of leaflets and 124 (45.9%) of branches were colonized, allowing the isolation of 18 endophytes from leaflets and 163 from branches. Isolates were identified based on morphological and phylogenetic characteristics using DNA sequences. *Readeriella* and *Leptosillia*, isolated exclusively from branches, were the most frequent genera. *Sporormiella minima* was the most frequently isolated species in leaflets. The number of isolates and taxa composition differed between leaflets and branches, with the highest richness being recorded in branches. However, the fungal diversity does not differ significantly between leaflets and branches. Among the branch isolates, a new species of *Leptosillia* was also found and described herein. In addition to having a rich mycobiome, native plants from the Caatinga are a source of new species for science.

Key-words: Fungal diversity. Endophytes. Fabaceae-Mimosoideae. Dry forest.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1 CONCEITO HISTÓRICO DE FUNGO ENDOFÍTICO	12
2.2 IMPORTÂNCIA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	15
2.3 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS	16
2.4 BIOMA CAATINGA	19
2.5 ASPECTOS DA PLANTA HOSPEDEIRA (<i>MIMOSA TENUIFLORA</i>)	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 LOCAL DE ESTUDO E COLETA	21
3.1.1 Isolamento dos fungos endofíticos de <i>M. tenuiflora</i>	22
3.1.2 Identificação e preservação dos fungos	23
3.1.3 Extração de DNA, amplificação de fragmentos de DNA e sequenciamento	23
3.1.4 Alinhamento das sequências e análise filogenética	24
3.1.5 Dados ecológicos	25
3.1.6 Preservação dos fungos endofíticos e informações associadas	25
4 RESULTADOS	27
4.1 COLONIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS E FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS	27
4.2 RIQUEZA E ABUNDÂNCIA DE FUNGOS ENDOFITICOS	27
4.4 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFITICOS	31
5 DISCUSSÃO	35
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE – <i>LEPTOSILLIA MIMOSAE</i> (LEPTOSILLIACEAE, XYLARIALES), A NEW ENDOPHYTIC SPECIES FROM THE CAATINGA DRY FOREST IN BRAZIL	49

1 INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos são microrganismos que habitam o interior de plantas de forma assintomática. Mesmo com essa definição bem estabelecida, ainda existe uma discussão quanto o que é ou não um endófito, sendo esse termo apontado apenas como uma definição didática (AZEVEDO et al., 2000). No hospedeiro, esses microrganismos podem apresentar dois tipos de ciclo de vida: um completo ou total, quando o fungo cresce, se desenvolve, reproduz e morre no interior da planta; e outro de forma incompleta ou parcial, quando o hospedeiro serve apenas como incubador (PETRINI, 1991).

Estudos como os de Azevedo e Araújo (2007), Wang e Dai (2011), Chagas (2014), Canuto et al.(2012) e Candeias et al.(2016) apontaram que a relação desses microrganismos com a planta hospedeira, assim como a produção de seus metabólitos, trazem benefícios por atuarem em vários processos, proporcionando diversas vantagens para o hospedeiro. Entre esses podem ser citados: auxílio no crescimento da planta, proteção contra ataques de patógenos e aumento da tolerância do hospedeiro frente a condições de estresse (escassez de água e nutrientes no solo e outros). Outro fator estudado é a utilização desses microrganismos ou das substâncias por eles produzidas para uso na agricultura e na indústria (CANUTO et al., 2012; GONÇALVES et al., 2013; PIRES et al., 2015; PADUA et al., 2018).

A maioria dos estudos realizados com fungos endofíticos concentra suas análises em plantas de regiões tropicais de ambientes úmidos (AZEVEDO et al., 2000; RODRIGUES et al., 2018; RUFINO et al., 2018), sendo importante ampliar as pesquisas para ambientes secos (BEZERRA et al., 2012, 2013; FREIRE et al., 2015; PÁDUA et al., 2018). Pesquisas como as de Souza et al. (2004), Siqueira et al. (2008) e Gonçalves et al. (2013) mostraram elevada diversidade de fungos endofíticos em plantas de áreas com alto nível de endemismo e sugerem a descoberta de novos táxons. Plantas do bioma Caatinga, floresta seca predominante no semiárido nordestino, têm sido alvo de pesquisas com fungos endofíticos (Bezerra et al., 2012, 2017) e constituem potenciais fontes de novos estudos para conhecimento da diversidade e distribuição dos fungos no planeta, assim como a dinâmica de colonização desses microrganismos e os compostos por eles produzidos.

Mimosa tenuiflora (Willd.) Poir. (Fabaceae) é uma planta de ambiente seco que vem sendo estudada em vários aspectos e finalidades. O vegetal, rico em tanino, é utilizado para diversos fins, como: recuperação ambiental em áreas degradadas (AZEVEDO et al., 2012); uso medicinal (OLIVEIRA et al. 2017), ritualístico e/ou religioso de grupos étnicos com a produção do vinho da jurema (ALMEIDA; BANDEIRA. 2010); na construção com a

confeção de estacas (ARAÚJO et al., 2007; SANTOS et al., 2018); na alimentação (SANTOS et al., 2018); como combustível (lenha) (SANTOS et al., 2018); no setor veterinário no combate à mastite bovina (BEZERRA et al., 2009); como forrageira (SANTOS et al., 2018); no controle biológico da podridão seca causada pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* em cachos da videira cv. Itália (PEIXINHO et al., 2017); melífero (MAIA-SILVA et al., 2014); na comercialização e no artesanato (ARAÚJO et al., 2007; ALMEIDA; BANDEIRA. 2010; CALIXTO JÚNIOR et al., 2011; SANTOS et al., 2018). Os trabalhos apontam além do uso biotecnológico dos fungos endofíticos, que as plantas do bioma Caatinga se mostram potenciais fontes de novos estudos taxonômicos (Bezerra et al., 2013), ampliando o conhecimento sobre a diversidade micológica.

Mesmo diante da diversidade de pesquisas e da importância da *M. tenuiflora* em diversas áreas, os estudos relacionados a fungos endofíticos nessa planta são restritos a um trabalho desenvolvido no Brasil por Araújo (2018), que analisou a atividade antibacteriana, citotóxica e cicatrizante de um isolado de *Rhizoctonia* sp. Portanto, ainda não existem estudos descrevendo a comunidade de fungos endofíticos, assim como a sua relação com a produção de compostos por *M. tenuiflora*. A fim de contribuir para o conhecimento sobre organismos associados a *M. tenuiflora*, o objetivo desta pesquisa foi evidenciar os grupos de fungos endofíticos em folíolos e ramos de indivíduos dessa espécie. Para isso, foi estudado o material botânico proveniente do Raso da Catarina, Estação Ecológica localizada na parte centro-leste do bioma Caatinga, no estado da Bahia.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CONCEITO HISTÓRICO DE FUNGO ENDOFÍTICO

A palavra “endófito” tem origem do grego e significa *éndon* = dentro de; *phutón* = planta. Surgiu no século XIX, para designar organismos que habitam o interior das plantas (DE BARY, 1866). Nessa nomenclatura, o autor incluía os vírus, bactérias, protistas, fungos e alguns invertebrados que podem ou não causar danos ao hospedeiro. De Bary (1866), considerado o pai da fitopatologia, contribuiu significativamente para a consolidação dessa abordagem, criando também outros termos, como: simbiose, parasitas facultativos, parasitas obrigatórios e organismos saprofíticos, termos ainda hoje utilizados (ROMERO, 2002).

Em geral, os endofíticos conhecidos são constituídos majoritariamente por fungos e bactérias, por serem os grupos mais explorados nos estudos científicos (AZEVEDO et al., 2000). Entretanto, outros grupos de organismos como actinomicetos, micoplasmas, fungos formadores de ectendomicorrizas, micorrizas ericoides e pseudomicorrizas também estejam incluídos como fungos endofíticos (STOYKE; CURRAH 1991, BILLS 1996, BAYMAN et al., 1997, ARNOLD, 2007). Com a modernização nas ciências e novas descobertas sobre a relação fungo-planta, várias definições foram sugeridas para tentar esclarecer qual grupo é caracterizado especificamente como fungo endofítico. Em 1986, Carroll definiu endófitos como mutualistas por colonizarem partes aéreas de tecidos vivos de plantas e não causarem sintomas de doença, removendo desse grupo os organismos patogênicos e os fungos micorrízicos. Petrine (1991) sugeriu que o termo fosse usado apenas para microrganismos que colonizam o interior vegetal, sem causar prejuízos fisiológicos aparentes ao indivíduo, incluindo também os patógenos latentes, por considerar que vivem uma parte do ciclo de vida sem induzir sintomas nos tecidos do hospedeiro. Hallmann et al. (1997) sugeriram que organismos endofíticos são todos aqueles que podem ser recuperados do interior de plantas saudáveis, logo após a desinfestação externa de microrganismos epifíticos. Azevedo; Araújo (2007) propuseram que sejam considerados endofíticos todos os organismos que habitam o interior de tecidos vegetais sem causar danos aparentes e não produzem ou expõem estruturas externas ao hospedeiro, eliminando dessa nomenclatura os fungos micorrízicos arbusculares, os quais produzem estruturas internas (arbuscúlos) e bactérias fixadoras de nitrogênio, as quais produzem nódulos nas raízes dos vegetais. Devido à suposta condição de simbiote, os microrganismos fúngicos endofíticos podem ou não crescer em meio de cultura (AZEVEDO;

ARAÚJO, 2007). Mendes & Azevedo (2007) complementaram a proposta de Azevedo & Araújo (2007), dividindo os fungos endofíticos em dois grupos: Tipo I para os que não produzem estruturas externas à planta e Tipo II para os que produzem estruturas externas. Em 2009, Rodriguez et al. propuseram a subdivisão dos endófitos em quatro classes. Mencionando que historicamente os endófitos foram classificados como clavicipitáceos e não-clavicipitáceos, com base em dados de filogenia e traços de história de vida, os autores consideraram que os não clavicipitáceos podem ser divididos em três grupos funcionais. Para as quatro classes considerou como critérios de separação: “a colonização e transmissão do hospedeiro, diversidade na planta e benefícios de adequação conferido ao hospedeiro”. Assim, seriam três grupos não clavicipitáceos e um clavicipitáceo (RODRIGUEZ et al., 2009). Schaechter (2011) apontou que os fungos endofíticos são frequentemente divididos em duas classes de grupos principais, tendo como base: diferenças na taxonomia, gama de hospedeiros, padrões de transmissão da colonização, especificidade do tecido e função ecológica. O primeiro grupo, denominado endófitos clavicipitáceos (endófitos C) é classificado dentro da família Hypocreales (Ascomycota) e inclui espécies de vida livre e simbióticas associadas a insetos e fungos, gramíneas, juncos e ciperáceas. O segundo grupo, chamado de endófitos não clavicipitáceos (NC endófitos), é considerado um único grupo funcional, e inclui fungos endofíticos hiperdiversos associados a: folhas de árvores tropicais, tecidos vegetais acima do solo de plantas não vasculares, vasculares sem sementes, coníferas, angiospermas lenhosas e herbáceas, em biomas que variam de florestas tropicais a comunidades boreais e árticas/antárticas. Nesse grupo predominam Ascomycetes, com uma minoria de Basidiomycetes.

Os fungos “endófitos escuros septados (DSE)” é distinguido como um grupo funcional com base na presença de septos melanizados escuros. Ao contrário dos fungos micorrízicos, que colonizam as raízes das plantas e crescem na rizosfera, e dos fungos epifíticos, que, colonizam e se desenvolvem na superfície dos vegetais, os fungos endofíticos habitam tecidos vegetais vivos, podendo crescer dentro de raízes, caules e / ou folhas (STONE et al., 2000). Esses autores definem o termo endofitismo e consideram que devido à heterogeneidade de relações endofíticas, elas não devem ser consideradas apenas como comensalismo. Devido a essas particularidades e a despeito das diversas definições, a proposta mais aceita no meio científico é a apresentada por Petrine (1991), que define os endofíticos, de modo amplo, como os organismos que colonizam tecidos internos vivos do

hospedeiro, sem induzir sintomas, embora possam causar doença após um período de incubação ou latência. Mesmo com essa definição bem estabelecida, ainda existe uma discussão teórica quanto ao que se define ou não como um endófito, devido à lacuna de conhecimento na relação entre os microrganismos endofíticos e o hospedeiro, sendo esse termo apontado apenas como uma definição meramente didática (AZEVEDO et al., 2000). Rai et al. (2014) propuseram o termo “micoendófitos” para definir exclusivamente os fungos que vivem como endofíticos e, no mesmo ano, Unterseher et al. (2013) empregaram o termo “endofitologia” para caracterizar o estudo de microrganismos endofíticos. Com base no trabalho de Hyde & Soyong (2008), o quadro 1 apresenta as definições que foram propostas, até o momento, para definir o termo endófito/fungo endofítico.

Quadro 1: Historicidade das definições para o termo endófito ao longo dos avanços científicos (adaptado de Hyde & Soyong, 2008).

Definições	Referência bibliográfica
“Mutualísticos, estes fungos colonizam partes de tecidos de plantas vivas e não causam sintomas de doenças”	CARROLL, 1986
“Fungos que formam inaparente infecção dentro de folhas e caules de plantas saudáveis”	CARROLL, 1988
“Organismos que vivem no interior das plantas sem causar dano aparente ao seu hospedeiro”	PETRINI, 1991
“Fungos como colonizadores de tecidos internos vivos de suas plantas hospedeiras”	ROLLINGER & LANGENHEIM, 1993
“Um grupo que coloniza os tecidos internos das plantas vivas sem causar qualquer efeito negativo imediato”	HIRSCH & BRAUN, 1992
“Endófitos são quaisquer fungos isolados de tecidos assintomáticos internos da planta”	CABRAL <i>et al.</i> , 1993
“Fungos e bactérias que tem todo ou uma parte do seu ciclo de vida dentro de tecidos de plantas vivas e causam infecções inaparentes ou assintomáticas inteiramente dentro de tecidos vegetais, mas não causam sintomas de doenças”	WILSON, 1995
“Micro-organismos que habitam o interior das plantas, sendo encontrados em folhas, ramos, raízes e sementes, sem produzir estruturas externas visíveis e sem causar doenças”	AZEVEDO <i>et al.</i> , 2000
“Endófitos verdadeiros – cuja colonização nunca resulta em sintomas visíveis de doenças”	MOSTERT <i>et al.</i> , 2000
“Fungos que colonizam a planta sem causar sintomas de doenças visíveis em qualquer momento específico”	SCHULZ & BOYLE, 2005
“Micro-organismos que podem ou não crescer em meio de cultura e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar danos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas	AZEVEDO & ARAÚJO, 2007

externas emergindo dos vegetais”	
Endófitos podem ser divididos em dois tipos: “Tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; Tipo II, os que produzem estruturas externas à planta”	MENDES & AZEVEDO, 2007
Quatro classes de endofíticos, “três não clavicipitáceos e um clavicipitáceo”	RODRIGUEZ <i>et al.</i> , 2009
Dois grupos “endófitos clavicipitáceos e não clavicipitáceos”.	SCHAECHTER, 2011
“Endofitologia” para definir os estudos com fungos e bactérias	UNTERSEHER <i>et al.</i> , 2013
“Micoendófitos” para definição de estudos com fungos endofíticos.	RAI <i>et al.</i> , 2014

Fonte: O Autor, 2021.

2.2 IMPORTÂNCIA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os fungos endofíticos compreendem um importante e funcional grupo de organismos nos ecossistemas naturais, desempenhando papel fundamental na reciclagem de materiais e energia (SUN; GUO, 2011). Diversos autores também evidenciam a relação desses microrganismos com o hospedeiro, mostrando a diversidade funcional de endofíticos em diversos processos frente ao hospedeiro (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007; WANG; DAI 2011; CHAGAS, 2014; CANUTO *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 2012; CANDEIAS *et al.*, 2016; MENDES; ARAÚJO 2000). A relação de interação dos fungos endofíticos com a planta hospedeira, denominada por alguns como mutualismo, ainda não é totalmente conhecida. Não existe equipamento que mostre como se dá esse tipo de interação de organismo para organismo e como o processo de comunicação entre os organismos de fato acontece, pelo simples fato de não ser possível, na atualidade, analisar a interação (hóspede e hospedeiro) simultaneamente. Registro fóssil com aproximadamente 400 milhões de anos indica que as plantas já formavam associações com endofíticos (KRINGS *et al.*, 2007). No hospedeiro, esses microrganismos podem apresentar dois tipos de ciclo de vida: um completo ou total, quando o fungo cresce, se desenvolve, reproduz e morre no interior da planta; e outro de forma incompleta ou parcial quando o hospedeiro serve apenas como incubador (PETRINI, 1991). A colonização no hospedeiro ocorre por meio de aberturas naturais, podendo ser vertical por pontos de emissão de raízes secundárias ou de forma horizontal pelos estômatos, por ferimentos causados por tratos culturais e insetos ou outras aberturas ocasionadas por eventos naturais. Mendes & Azevedo (2007) e Sun & Go (2011) descrevem o processo de isolamento de fungos endofíticos do vegetal. Entre os benefícios da associação são

mencionados: tolerância a insetos e resistência a patógenos (Saikkonen et al., 2010); produção de hormônios de crescimento vegetal (SAIKKONEN et al., 2010) e produção de outros compostos de interesse (Xu et al., 2010; Tejesvi et al., 2011).

A maioria dos estudos realizados com fungos endofíticos concentra suas análises em plantas de regiões tropicais de ambiente úmido (AZEVEDO et al., 2000; RODRIGUES et al., 2018; RUFINO et al., 2018), com menor número registrado em ambientes secos (BEZERRA et al., 2012, 2013, 2017a; FREIRE et al., 2015; PÁDUA et al., 2018, Oliveira et al., 2020).

A produção de compostos produzidos por fungos endofíticos ou a utilização desses microrganismos para uso na agricultura e na indústria também têm sido estudadas (CANUTO et al., 2012; GONÇALVES et al., 2013; PIRES et al., 2015; PADUA et al., 2018).

Há registros da utilização dos fungos para tratamento de doenças na população chinesa há 3000 a.C., quando essa civilização usava sapatos mofados para o tratamento de feridas infeccionadas nos pés (TAKAHASHI; LUCAS, 2008). Segundo esses autores, a primeira citação científica da utilização de metabólitos produzidos por fungos data de 1901 e até 2007 surgiram mais de 11.300 publicações, incluindo patentes, sobre o assunto. Substâncias anticancerígenas estão entre as mais pesquisadas nos últimos anos, o taxol foi o primeiro, mas existem outros como a produção de L-asparaginase (STIERLE et al., 1993, PÁDUA et al., 2018), ergosterol (Siddiqui et al., 2011) e proteases (Silva et al. 2020).

2.3 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Em 1991, Hawksworth estimou que existiriam cerca de 1,5 milhão de espécies de fungos na Terra, das quais apenas 120 mil haviam sido descritas e aceitas. Essa estimativa foi baseada principalmente no número de plantas vasculares hospedando espécies de fungos, que seria na proporção de 1:6, não sendo aí considerados os fungos endofíticos. (Após aproximadamente 20 anos de estudos, esses dados foram considerados conservadores pois, além de não incluírem os endófitos, não consideravam outros fungos que vivem na planta e no solo (HAWKSWORTH; LÜCKING, 2017). Segundo esses autores, o avanço nos estudos e incremento de abordagens polifásicas para identificação de fungos impulsionou o aumento na taxa de descrição de novas espécies, que se manteve por muitos anos em 1300 por ano, mas a partir de 2010 aumentou para 1800 publicações por ano Assim, HAWKSWORTH & LÜCKING (2017) fizeram uma nova estimativa, tendo como base a atualização da relação fungo-planta de 9,8:1, considerando que existem de 2.2 a 3.8 milhões de espécies de fungos

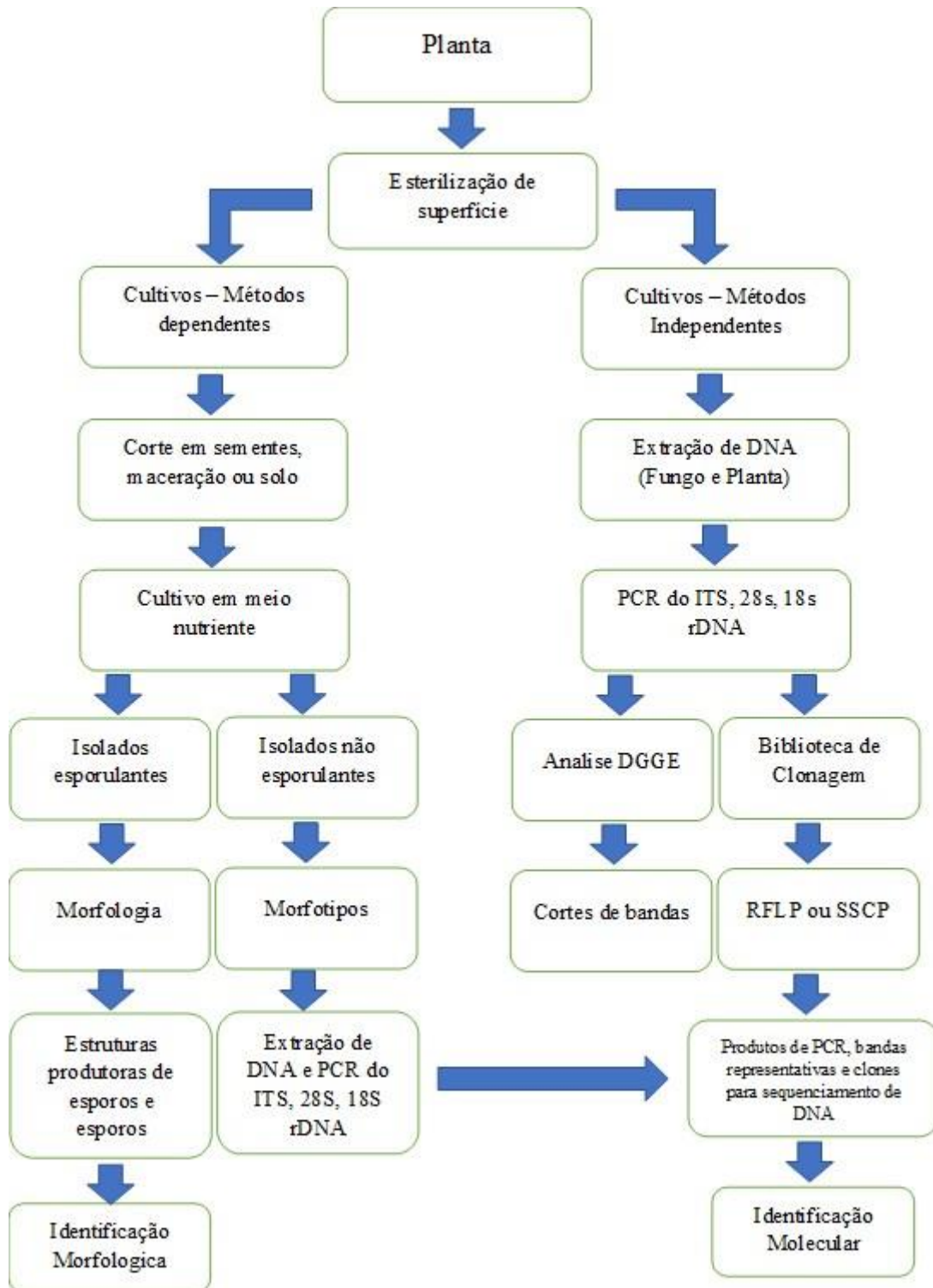
no mundo. Mesmo com o avanço nos estudos, os autores apontam, ainda, a existência de três fontes principais para a micodiversidade não reconhecida: 1- áreas geográficas e habitats ecológicos pouco ou não estudados, concentrados principalmente em regiões tropicais, 2- fungos ecologicamente enigmáticos que ocorrem no ambiente, mas geralmente não se manifestam e 3- as chamadas espécies crípticas escondidas sob nomes bem estabelecidos.

Devido ao fato de serem cosmopolitas, ou seja, poderem habitar os mais diferentes tipos de ambientes, os fungos endofíticos podem ser encontrados em plantas aquáticas (ALMEIRA et al., 2017); em plantas de florestas tropicais (STROBEL, 2002); plantas medicinais (VIEIRA et al., 2012); plantas de interesse agrícola (LIMA, et al., 2014); em cactos (BEZERRA et al., 2012; 2013), gramíneas (SU et al., 2010); Bromélias (PALHA et al., 2018) e em angiospermas de regiões frias (SANTIAGO et al., 2016), evidenciando a grande possibilidade de estudos. Além disso, podem ser isoladas dezenas a centenas de indivíduos de um único hospedeiro (STROBEL; DAISY, 2003). No entanto, considerando todas as plantas existentes no planeta, poucas tiveram estudos relacionados à diversidade da micobiota endofítica (STROBEL, 2002).

Plantas de ambientes extremos constituem um nicho de grande interesse e ainda são pouco exploradas (WANG; DAI, 2011). Entre os obstáculos para o estudo dessas plantas estão o deslocamento para coleta e a logística de recursos humanos, materiais e financeiros.

Os fungos endofíticos são tradicionalmente estudados por duas técnicas básicas: a primeira é a observação direta. Nesse método, as estruturas fúngicas são examinadas diretamente sob a luz e microscópio eletrônico, o que pode mostrar toda a micobiota endofítica dentro dos tecidos de plantas vivas, principalmente fungos biotróficos que não podem ser cultivados em meios de crescimento padrão (SUN; GUO, 2012). O problema desse procedimento está em visualizar apenas as estruturas somáticas dos indivíduos, não sendo possível, portanto, sua identificação taxonômica. O segundo método é dependente de cultivo, sendo possível isolar apenas os endófitos “cultiváveis”. Essa técnica é a mais utilizada podendo ser empregada uma abordagem polifásica. A desvantagem está em não poder recuperar os isolados biotróficos (SUN; GUO, 2012). Com base no trabalho de Sun & Guo (2012) é apresentado um organograma descrevendo os dois processos e as etapas que sucederão o isolamento de fungos endofíticos extraído de uma planta hospedeira (Figura 1).

Figura 1: Esquema de processo para isolamento de fungos endofíticos (traduzido de Sun & Guo, 2012).



Fonte: Sun & Guo, 2012.

2.4 BIOMA CAATINGA

A Caatinga cobre a maior parte da região nordeste do Brasil, abrangendo uma área aproximada de 845.000 Km² nos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe e uma parte de Minas Gerais (região sudeste), representando 11% da extensão territorial do país (MMA, 2020). O termo Caatinga é originado do tupi-guarani e significa “mata branca ou clara” e faz referência à cor acinzentada da vegetação que prenombra na região no período de estiagem, quando perde as folhas para preservar a água armazenada em seu interior (FUNDAJ, 2020). O relevo da região é bem diverso, sendo apontados por Araújo Filho (2011), com destaque a Depressão Sertaneja e as chapadas, bacias sedimentares, planaltos, superfícies cársticas, tabuleiros, várzeas e terraços aluvionares, dunas continentais e mares de morros. O solo é formado pelas ações do clima, do relevo, do tempo e da ação dos organismos, constituído principalmente de rochas cristalinas e sedimentares, apresentando-se heterogêneo. Podem ser encontrados solos do tipo: neossolos, luvisolos, planossolos, argissolos, latossolos, neossolos quartzarênicos, cambissolos, vertissolos, argissolos, neossolos flúvicos e cambissolos flúvicos nas diferentes tipologias geológicas da região (ARAÚJO FILHO, 2011).

O clima da região Caatinga é classificada como tipo BSh (semiárido quente), com temperatura média anual de 35 °C e precipitação média anual de 380-800 mm, com um período curto de dois a quatro meses de chuva e um longo período de seca (KÖPPEN, 1948). Essas características podem apresentar uma forte variação de distribuição temporal, espacial e interanual, podendo a estiagem atingir um período de 11 meses de estação seca ininterruptas (VAREJÃO-SILVA et al., 1984). Em meses com maior aridez, a temperatura do solo pode atingir 60 °C (AGEITEC, 2020). Todos esses fatores induzem a vegetação a desenvolver características e mecanismos adaptativos para sobreviver frente a um ambiente considerado extremo, com alta incidência solar, baixa precipitação pluviométrica e solos áridos, porém ricos e com pouca profundidade. Entre essas adaptações vegetativas, que caracterizam as plantas xerófitas (do grego *kserós*=seco e *phutón*=planta) estão: folhas transformadas em espinhos, caules suculentos, sistema radicular bem desenvolvido e cutículas altamente impermeáveis (NOGUEIRA et al., 2005).

A vegetação é formada principalmente por uma ampla diversidade de plantas lenhosas e classificada como floresta tropical sazonal seca (SILVA et al., 2017). A Caatinga sofre constantemente perda de sua área pela ação antrópica caracterizada pelo uso e ocupação desordenada, influenciados também pela falta de apoio governamental para orientar as

comunidades sobre o uso e manejo adequado do solo e da biodiversidade local (SILVA et al., 2017). Mesmo sofrendo grande degradação, o bioma atualmente possui 208 Unidades de Conservação, sendo 118 sob administração federal, 80 estadual e 10 municipais, representando aproximadamente 77.540 km² de áreas protegidas, o que representa apenas 8,8% da área total do bioma (CNUC/MMA, 2020).

2.5 ASPECTOS DA PLANTA HOSPEDEIRA (*Mimosa tenuiflora*)

Mimosa tenuiflora é uma angiosperma pertencente à família Fabaceae. A planta, do tipo arbustivo-arbóreo, apresenta um sistema radicular profundo, favorecendo o enriquecimento do solo, evitando a erosão e facilitando o estabelecimento de outras plantas nativas (AZEVEDO, et al., 2012; DOURADO, et al., 2013). Indivíduos de *M. tenuiflora* predominam em ambiente seco, sendo encontrados em regiões de Cerrado, Caatinga e Savana. A espécie está bem distribuída na Caatinga e é mencionada como pioneira, promissora na colonização e regeneração de áreas degradadas (CALIXTO JÚNIOR et al., 2011). Rica em taninos, *M. tenuiflora* tem sido utilizada para diversos usos como: recuperação ambiental (AZEVEDO et al., 2012); uso medicinal (OLIVEIRA et al., 2017), ritualístico e/ou religioso (ALMEIDA; BANDEIRA, 2010); na área da construção (ARAÚJO et al., 2007; SANTOS et al., 2018); na alimentação, como forrageira e como combustível (lenha) (SANTOS et al., 2018); no setor veterinário (BEZERRA et al., 2009); no controle biológico (PEIXINHO et al., 2017); como melífera (MAIA-SILVA et al., 2014; ALMEIDA; BANDEIRA 2010) na comercialização e no artesanato (ARAÚJO et al., 2007; ALMEIDA; BANDEIRA, 2010; CALIXTO JÚNIOR et al., 2011; SANTOS et al., 2018). Mesmo diante de sua importância em diversas áreas, foi encontrado apenas um trabalho que avaliou a atividade antibacteriana, citotóxica e cicatrizante de um isolado de *Rhizoctonia* sp., identificado como fungo endofítico (ARAÚJO, 2018), não havendo estudos evidenciando a diversidade fúngica endofítica em plantas de *M. tenuiflora*.

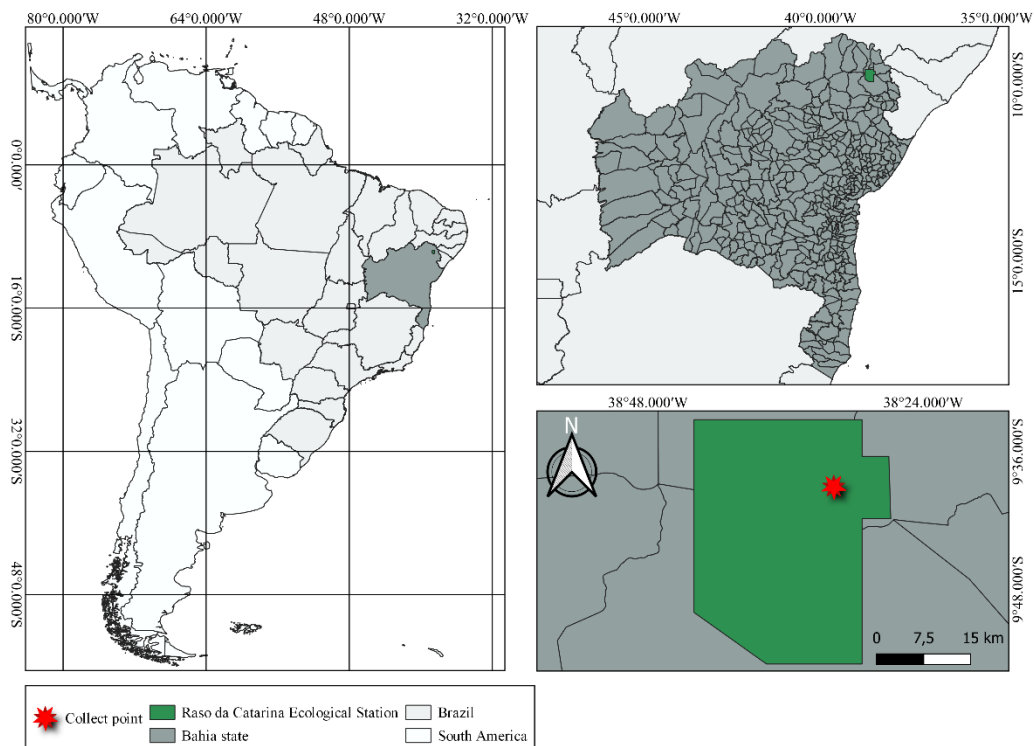
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE ESTUDO E COLETA

Coletas foram realizadas em área de conservação da Caatinga na Estação Ecológica (Esec) Raso da Catarina, nas proximidades do município de Jeremoabo, Bahia (09°39'03.6" S, 38°31'48.2" W). A Esec estende-se pelos municípios de Rodelas, Paulo Afonso e Jeremoabo e foi criada em 1984 com o objetivo de conservar a Caatinga e para realização de pesquisas científicas; atualmente sua área cobre 104,8 hectares, onde são encontradas espécies nativas, endêmicas e/ou ameaçadas de extinção (ICMBio, 2019) (Figura 2).

Folículos e ramos foram coletados de seis indivíduos de *Mimosa tenuiflora* com até 5 metros de altura (Figura 3). Esse material botânico foi acondicionado em sacos de papel Kraft e transportado para o Laboratório de Micologia Ambiental da UFPE, onde foi processado em até 48h. Para isolamento dos endófitos, 45 fragmentos de folículos e 45 fragmentos de ramo de cada um dos indivíduos foram utilizados (totalizando 270 fragmentos dos folículos e 270 dos ramos).

Figura 2: Localização geográfica da Estação Ecológica Raso da Catarina, município de Jeremoabo, Bahia, Brasil.



Fonte: Cruz, M.O., 2021.

Figura 3: Estação Ecológica Raso da Catarina, município de Jeremoabo, Bahia, Brasil. (A) Exemplo de um indivíduo de *M. tenuiflora*. (B) Trajeto para coleta de *M. tenuiflora*.



Fonte: Passos, J.H., 2019.

3.1.1 Isolamento dos fungos endofíticos de *M. tenuiflora*

Para o procedimento de isolamento de fungos endofíticos, a metodologia proposta por Bezerra et al. (2015) foi utilizada. Na primeira etapa do procedimento, a assepsia do material vegetal foi realizada utilizando água destilada e detergente neutro. A seguir, o material vegetal foi lavado sequencialmente em três recipientes individuais, pré-esterilizados com volume de 2 litros. Nos três recipientes individualmente continham: 1,5 litro de etanol 70% (1 min), 1,5 litro de hipoclorito de sódio (2-2,5% de cloro ativo) (3 min), 1,5 litro de etanol 70% (30 s), no qual foram mergulhados o vegetal. Para a finalização foram efetuadas mais três lavagens sucessivas com água destilada esterilizada (1 min cada lavagem) para a remoção dos resíduos de hipoclorito de sódio e etanol, respectivamente. Após a assepsia, o material foi cortado em fragmentos com tamanho de 0,5 cm² e distribuído em placas de Petri (5 fragmentos por placa) contendo o meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) + 100 mg/L de clorafenicol para inibir o desenvolvimento de bactérias.

As placas foram incubadas a 28±2 °C por até 30 dias, em um ciclo natural de luz-escuro e observadas diariamente para isolamento de fungos endofíticos, os quais foram preservados em tubos tipo eppendorf com água e glicerol (10%) na coleção de trabalho do Laboratório de Micologia Ambiental da UFPE.

3.1.2 Identificação e preservação dos fungos

A análise morfológica prévia para a identificação dos fungos foi realizada com observação das características macroscópicas e microscópicas dos isolados e comparando-se com literatura especializada (ex. SUTTON, 1980; SIVANESAN, 1984; HANLIN; MENEZES 1996).

Para a descrição de novos táxons, foram observadas: características macroscópicas das colônias em placa de Petri (cor, aspecto, consistência, presença de pigmento, etc.) e características microscópicas através de observação em lâmina (morfologia de estruturas somáticas e reprodutivas) com o auxílio de técnica e literatura específicas (ex. ELLIS, 1971; SUTTON, 1980; DOMSCH et al., 2007; CROUS et al., 2007a, 2007b; BENSCH et al., 2010; ROSSMAN; SEIFERT, 2011; SAMSON et al., 2011a, 2011b; BENSCH et al., 2012; PHILLIPS et al., 2013).

3.1.3 Extração de DNA, amplificação de fragmentos de DNA e sequenciamento

Para identificação dos fungos com base em sequência de DNA, biomassa fúngica foi obtida a partir de culturas dos isolados mantidas em placa de Petri com BDA, a 28°C em ciclo natural de luz-escuro por sete dias. Para a extração do DNA foi utilizado o Kit de purificação de DNA genômico da Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit), seguindo a metodologia proposta pelo fabricante. Para amplificação da região ITS foram utilizados os iniciadores ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990). Os parâmetros para amplificação e as concentrações dos reagentes (dNTPs, cloreto de magnésio, Taq DNA polimerase e tampão de reação) foram realizados de acordo com Bezerra et al. (2017).

Controles negativos, contendo todos os componentes, exceto DNA, foram utilizados em cada procedimento para detectar possíveis contaminações. Os produtos das extrações de DNA e das reações de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% corados com GelRed (Biotium), sob luz UV. Os produtos da amplificação foram purificados utilizando as enzimas Exonuclease I e Fosfatase Alcalina contidas no kit Illustra ExoProStar

1-Step (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante, e posteriormente encaminhados para sequenciamento na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento e Expressão Gênica do Centro de Biociências da UFPE.

Para a identificação/descrição de nova espécie do gênero *Leptosillia* foram utilizados outros marcadores, após a análise de sequências da região ITS do rDNA. Os loci foram escolhidos de acordo com literatura específica de taxonomia de *Leptosillia*: LSU rDNA, TEF1, RPB2 e β -tubulina (VOGLMAYR et al., 2019).

3.1.4 Alinhamento das sequências e análise filogenética

Os cromatogramas do sequenciamento foram analisados para a determinação das sequências consenso. Após a edição, todas as sequências foram utilizadas para busca por sequências mais similares depositadas no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTn. As sequências experimentais foram alinhadas em conjunto com as recuperadas da base de dados utilizando o programa MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) e corrigidas manualmente utilizando o programa MEGA 7 (KUMAR et al., 2016). As novas sequências foram depositadas no GenBank do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) e os alinhamentos no banco de dados TreeBASE (www.treebase.org/) [depósitos em processamento].

A construção das árvores filogenéticas foi realizada através da máxima verossimilhança (MV) com 1000 reamostragens de bootstrap. A construção da árvore por máxima verossimilhança foi realizada usando o modelo de substituição nucleotídica GTR+G+I no programa RAxML-HPC BlackBox v.8.2.12 (STAMATAKIS et al., 2008) implementado na plataforma CIPRES Science Gateway (MILLER et al., 2010). Valores de bootatrap $\geq 70\%$ foram considerados para inclusão na árvore filogenética. A árvore foi visualizada no software FigTree (RAMBAUT, 2009) e exportada para edição. Para o manuscrito de descrição da nova espécie de *Leptosillia* foram construídos diferentes alinhamentos e metodologias semelhantes foram utilizadas para as análises filogenéticas (com adição da análise de Bayesiana) (ver o Apêndice - manuscrito de descrição da nova espécie para mais detalhes).

3.1.5 Dados ecológicos

A taxa de colonização (TC%) foi calculada pela razão entre o número de fragmentos com crescimento fúngico (Nf) e o número total de fragmentos utilizados (Nt) ($FI = Nf/Nt \times 100$) (ARAÚJO et al., 2002). A frequência relativa (Fr) de isolamento de endófitos foi calculada como o número de isolados de uma espécie (frequência absoluta – Fa) dividido pelo número total de isolados (PHOTITA et al., 2001).

A comunidade de fungos endofíticos foi avaliada quanto à riqueza e à diversidade de táxons. A riqueza foi mensurada como o número de espécies observadas de acordo com as análises morfológicas e filogenéticas. O número estimado de espécies foi calculado usando a estimativa Chao 2 (CHAO, 1987). Para o cálculo de diversidade foi utilizado o índice de Shannon–Wiener (H') (SHANNON; WEAVER 1949).

As diferenças na composição das comunidades de fungos endofíticos foram avaliadas utilizando análise de similaridade (ANOSIM) e a análise multivariada PERMANOVA. A correção de Bonferroni foi aplicada aos valores de p para comparação entre os indivíduos estudados. Similaridades na composição das comunidades de fungos endofíticos em folíolos e ramos foram visualizadas usando o escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) com base no índice de Bray-Curtis (BRAY; CURTIS 1957). A análise de agrupamento da comunidade de endófitos foi realizada com base no índice de similaridade de Jaccard (JACCARD, 1901). Valores de espécies indicadoras, uma combinação da abundância relativa e da frequência relativa de espécies, foram calculados para fungos endofíticos dos folíolos e ramos. Espécies foram consideradas boas indicadoras quando apresentaram valor de $p < 0,05$ (SILVA et al., 2014, modificado de DUFRÊNE; LEGENDRE, 1997). As análises foram realizadas utilizando pacotes específicos no programa R v.3.5.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM 2018).

3.1.6 Preservação dos fungos endofíticos e informações associadas

Todos os fungos endofíticos estudados foram preservados em glicerol 10% em tubos de crio preservação e depositados em duplicata na coleção de trabalho do Laboratório de Micologia Ambiental do Departamento de Micologia da UFPE. Essa coleção foi uma ferramenta para prevenir perdas do material genético estudado, além de possibilitar estudos posteriores. Culturas de referência, incluindo as culturas representativas e ex-tipo de uma

novidade taxonômica foram depositadas na Micoteca URM e lâminas com estruturas microscópicas dos fungos representando o holótipo da nova espécie encontrada foram depositadas no Herbário URM, ambos no Departamento de Micologia da UFPE. Informações associadas ao material depositado nos dois acervos estão incluídas nos bancos de dados respectivos (<http://splink.cria.org.br/manager/detail?resource=URM> e <https://www.ufpe.br/micoteca>). Culturas representativas também estão depositadas da coleção de trabalho FCCUFG do Laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás.

4 RESULTADOS

4.1 COLONIZAÇÃO DOS FRAGMENTOS E FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS

Dos 540 fragmentos (270 de folíolos e 270 de ramos) dos seis indivíduos de *M. tenuiflora* estudados foram colonizados apenas 141 fragmentos, sendo 17 (3,14 %) de folíolos e 124 (22,96 %) de ramos (Tabela 1).

Tabela 1 - Número de fragmentos colonizados (A) e taxa de colonização (B) por fungos endofíticos isolados de fragmentos de folíolos (270) e de ramos (270) de *M. tenuiflora* de área conservação da Caatinga na Esec Raso da Catarina-BA, Brasil.

Indivíduos	<i>M. tenuiflora</i>			
	Folíolos		Ramos	
	A	B	A	B
1	3	1,11%	11	4,07%
2	1	0,37%	34	12,59%
3	0	-	35	12,96%
4	6	2,22%	1	0,37%
5	4	1,48%	37	13,70%
6	3	1,11%	6	2,22%
Total	17	6,30%	124	45,93%

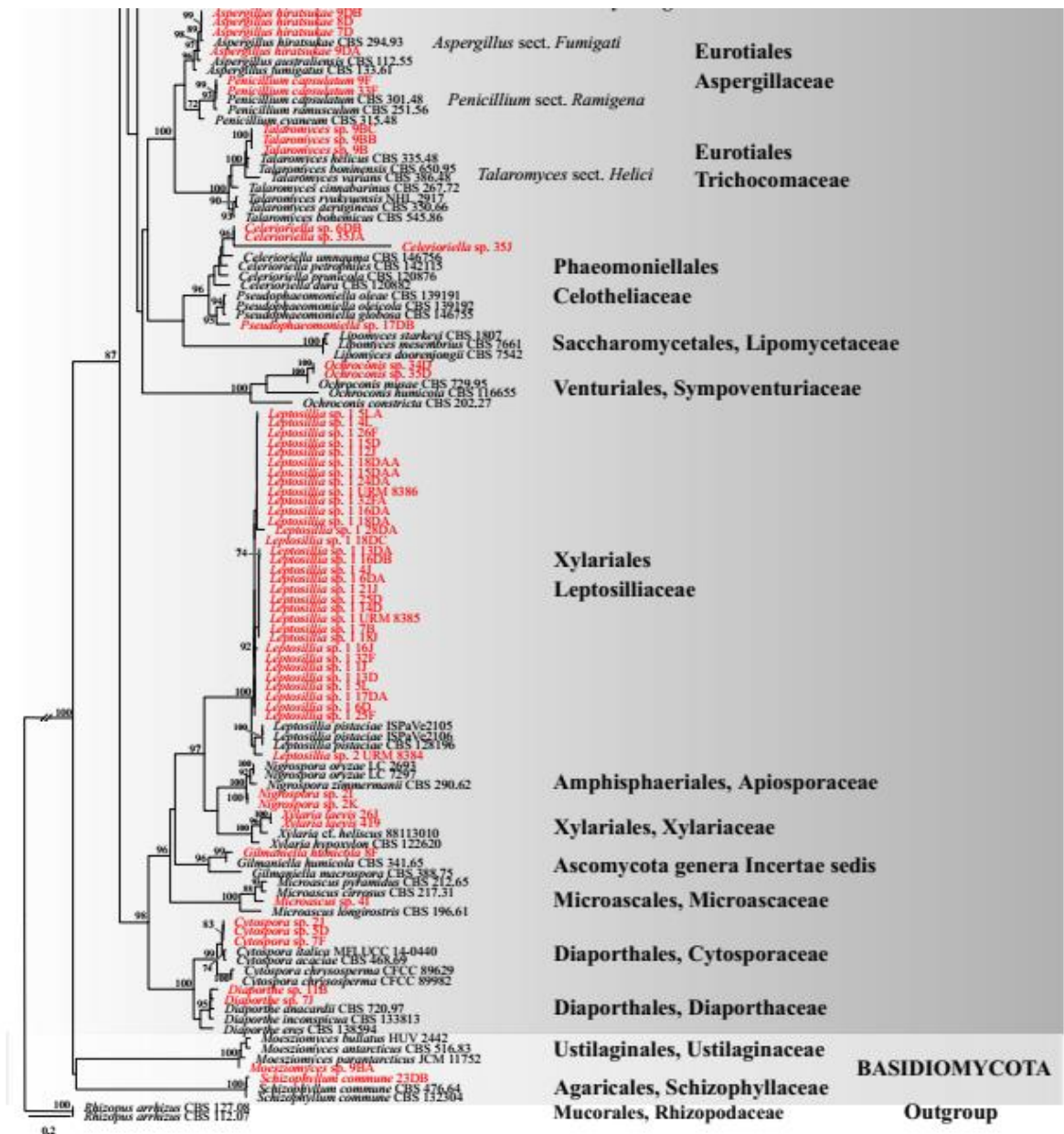
Fonte: O autor, 2021

4.2 RIQUEZA E ABUNDÂNCIA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Com base nas análises das características morfológicas preliminares e das sequências da região ITS do rDNA (Figura 4) dos fungos endofíticos de *M. tenuiflora* foi constatado que os 181 isolados obtidos representam 28 táxons. A maioria dos endófitos está no filo Ascomycota, distribuídos em quatro classes: Dothideomycetes (10); Sordariomycetes (6); Eurotiomycetes (3) e Saccharomycetes (1), 14 ordens e 20 famílias. Os dois endófitos de Basidiomycota representam duas ordens e duas famílias (Agaricales - Schizophyllaceae e Ustilaginales - Ustilaginaceae).

Em Ascomycota, Dothideomycetes foi a classe com mais representantes (seis ordens e 10 famílias). Pleosporales foi a segunda ordem com mais representantes (quatro famílias), seguida por Eurotiales, Xylariales, Diaportales e Capnodiales (duas famílias cada uma). Microascales, Amphisphaeriales, Centuriales, Saccharomycetales, Phaeomoniellales, Hysteriales, Dothideales e Kirschsteiniotheliales apresentaram apenas um representante cada.

Figura 4 (continuação) – Árvore de máxima verossimilhança utilizando sequências de ITS do rDNA de fungos endofíticos isolados de folíolos e ramos de *M. tenuiflora* de área de conservação da Caatinga no Brasil. Isolados obtidos no presente estudo estão destacado em vermelho. Valores de bootstrap $\geq 70\%$ estão incluídos nos nós. *Rhizopus arrhizus* (CBS 127.08 e CBS 112.07) foi utilizado como outgroup.



Fonte: O autor, 2021.

Os táxons mais frequentes foram *Readeriella* sp. (32,60%), *Leptosillia* sp. 1 (17,68%), *Sporormiella minima* (11,60%) e *Aureobasidium pullulans* (9,94%). *Readeriella* sp., *Leptosillia* sp. 1 e *Aureobasidium pullulans* foram registrados exclusivamente nos ramos, *Microascus* sp. e *Nigrospora* sp. apenas nos folíolos, enquanto *Sporormiella minima* foi isolada a partir de folíolos e ramos. Os ramos de diferentes indivíduos de *M. tenuiflora* (1, 2, 4 e 6) apresentaram diferença na riqueza de endófitos (Tabela 2).

Tabela 2 – Fungos endofíticos isolados de folíolos e ramos de *Mimosa tenuiflora* de área de conservação da Caatinga, Brasil. fa = frequência absoluta e fr (%) = frequência relativa.

Táxons	Folíolos						Ramos						fa	fr (%)
	Indivíduos						Indivíduos							
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6		
<i>Alternaria</i> sp.				2				1					3	1,66
<i>Aureobasidium pullulans</i>							5	11		1	1		18	9,94
<i>Aspergillus hiratsukae</i>								4					4	2,21
<i>Celerioriella</i> sp.								1			2		3	1,66
<i>Cladosporium</i> sp.								1			3		4	2,21
<i>Cytospora</i> sp.								1	1		1		3	1,66
<i>Diaporthe</i> sp.							1				1		2	1,10
<i>Gilmaniella humicola</i>									1				1	0,55
<i>Incertae sedis</i> 1 (Dothideomycetes, Ascomycota)									1				1	0,55
<i>Incertae sedis</i> 2 (Dothideomycetes, Ascomycota)									1				1	0,55
<i>Incertae sedis</i> 3 (Dothideomycetes, Ascomycota)							1						1	0,55
<i>Latorua caligans</i>								1					1	0,55
<i>Leptosillia</i> sp. 1							1	17	5		6	3	32	17,68
<i>Leptosillia</i> sp. 2									1				1	0,55
<i>Kirschsteiniothelia</i> sp. 1											2		2	1,10
<i>Kirschsteiniothelia</i> sp. 2											1		1	0,55
<i>Microascus</i> sp.					1								1	0,55
<i>Moesziomyces</i> sp.								1					1	0,55
<i>Nigrospora</i> sp.					1	1							2	1,10

<i>Ochroconis</i> sp.	2								2				1,10	
<i>Penicillium capsulatum</i>	2								2				1,10	
<i>Preussia</i> sp.	1		1		1				1		4	2,21		
" <i>Sporormiella minima</i> "	2	1	4	1	3	2	2		4	2	21	11,60		
<i>Periconia</i> sp.	1								1				0,55	
<i>Pseudosydowia</i> sp.									1				1	0,55
<i>Pseudophaeomoniella</i> sp.	1								1				0,55	
<i>Readeriella</i> sp.	15								26	18		59	32,60	
<i>Rhytidhysteron</i> sp. 1	2								2				1,10	
<i>Rhytidhysteron</i> sp. 2	1								1				0,55	
<i>Schizophyllum commune</i>	1								1				0,55	
<i>Talaromyces</i> sp.	3								3				1,66	
<i>Xylaria laevis</i>									1		1		0,55	
Total de isolados	2	1	0	7	4	4	13	58	44	1	41	6	181	
Riqueza	1	1	0	3	4	2	6	14	12	1	12	3	32	
Riqueza geral	10								32					

Fonte: O autor, 2021

4.4 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFITICOS

Houve diferença na composição da comunidade de endófitos isolados de folíolos e ramos de *M. tenuiflora* (Figura 5) (Dimensões = 2 e Stress = 0.02753081; PERMANOVA $F = 6.879$ e $p = 0.0024$). Maior riqueza de fungos endofíticos foi registrada em ramos do que em folíolos de *M. tenuiflora* ($F = 5.3556$ e $p = 0.043195$) (Figura 6) com 18 táxons (, sendo 16 táxons exclusivos para os ramos, 2 táxons exclusivos para folíolos e 1 táxon compartilhado entre ramos e folíolos. A diversidade (Shannon H') de fungos não diferiu significativamente entre folíolos e ramos ($F = 2.873$ e $p = 0.12094$). A partir dos endófitos obtidos dos ramos verificou-se a presença de uma nova espécie do gênero *Leptosillia* e o presente estudo também está fazendo o primeiro relato de ocorrência deste gênero no Brasil (ver o Apêndice para mais detalhes). Além da nova espécie de *Leptosillia*, outros fungos endofíticos aparecem como possíveis novas espécies com base na análise filogenética prévia de sequências de ITS do rDNA.

Figura 5 - Escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) baseado nas comunidades de fungos endofíticos de folíolos e ramos de *M. tenuiflora* em área de conservação da Caatinga, Brasil.

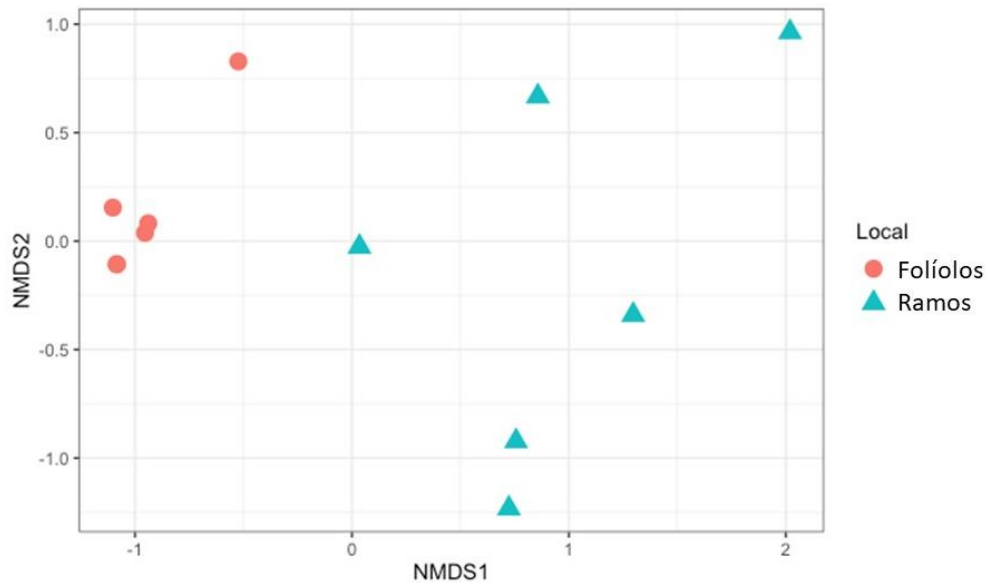
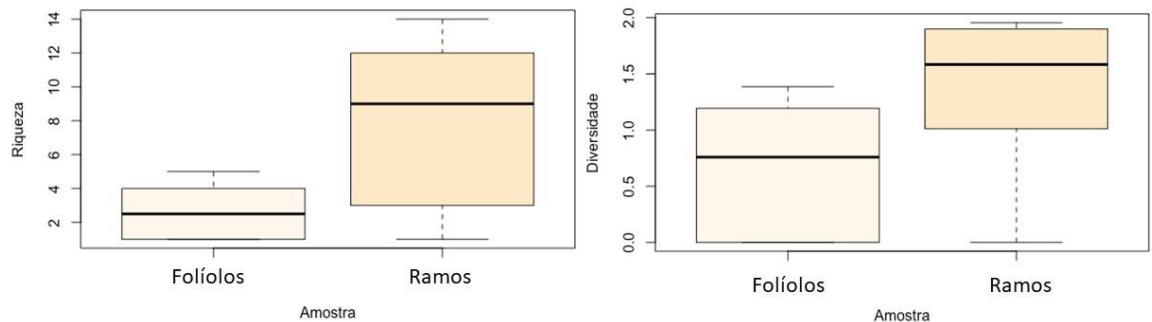


Figura 6 – Riqueza e diversidade de fungos endofíticos de folíolos e ramos de *M. tenuiflora* em área de conservação da Caatinga, Brasil.



A curva de rarefação (baseada em Chao 2) atingiu uma assíntona para a estimativa de táxons esperados em associação com os folíolos (Figura 7 A), porém o mesmo não ocorreu para os ramos e para o conjunto folíolos + ramos, demonstrando que o esforço amostral não recuperou toda a riqueza estimada de endófitos (Figura 7 B e C). Para os folíolos foi recuperada uma riqueza de 17 endófitos, enquanto a estimada era de cinco; para os ramos foram recuperados 54 endófitos e foi estimada uma riqueza de 43; no total para *M. tenuiflora* foi recuperada uma riqueza de 91 endófitos, enquanto a riqueza estimada foi de 45.

A análise de agrupamento demonstrou a formação de três grupos de endófitos, com os fungos dos ramos de um indivíduo formando o primeiro grupo, o segundo grupo é formado por fungos isolados dos folíolos (incluindo endófitos de ramos de outro indivíduo) e o terceiro grupo é formado exclusivamente por endófitos dos ramos (Figura 8), demonstrando que a comunidade de fungos endofíticos é distinta entre folíolos e ramos nos seis indivíduos botânicos estudados. A análise de espécie indicadora demonstrou que o táxon *Leptosillia* sp. 1 ($p = 0.014$), foi exclusivamente isolado dos ramos, pode ser encontrado com mais frequência (ou exclusivamente) em ramos quando o objetivo for a obtenção de isolados endofíticos do referido gênero.

Figura 7 - Curvas de acumulação de espécies e estimativa da riqueza (baseada em Chao 2) de fungos endofíticos de folíolos e ramos de *M. tenuiflora* em área de conservação da Caatinga, Brasil. A = riqueza observada e estimativa para folíolos. B = riqueza observada e estimativa para ramos. C = riqueza total observada e estimativa total para *M. tenuiflora*.

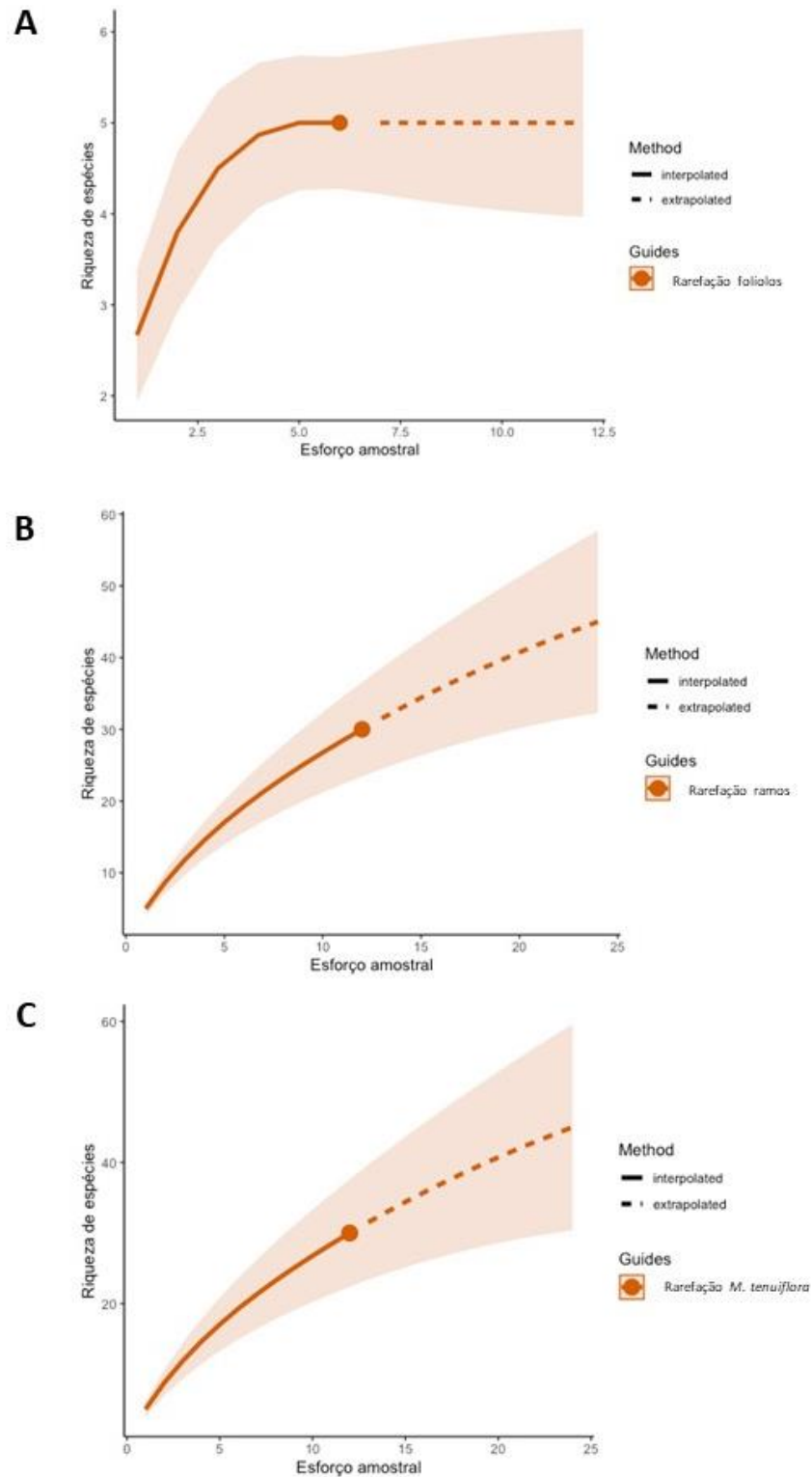
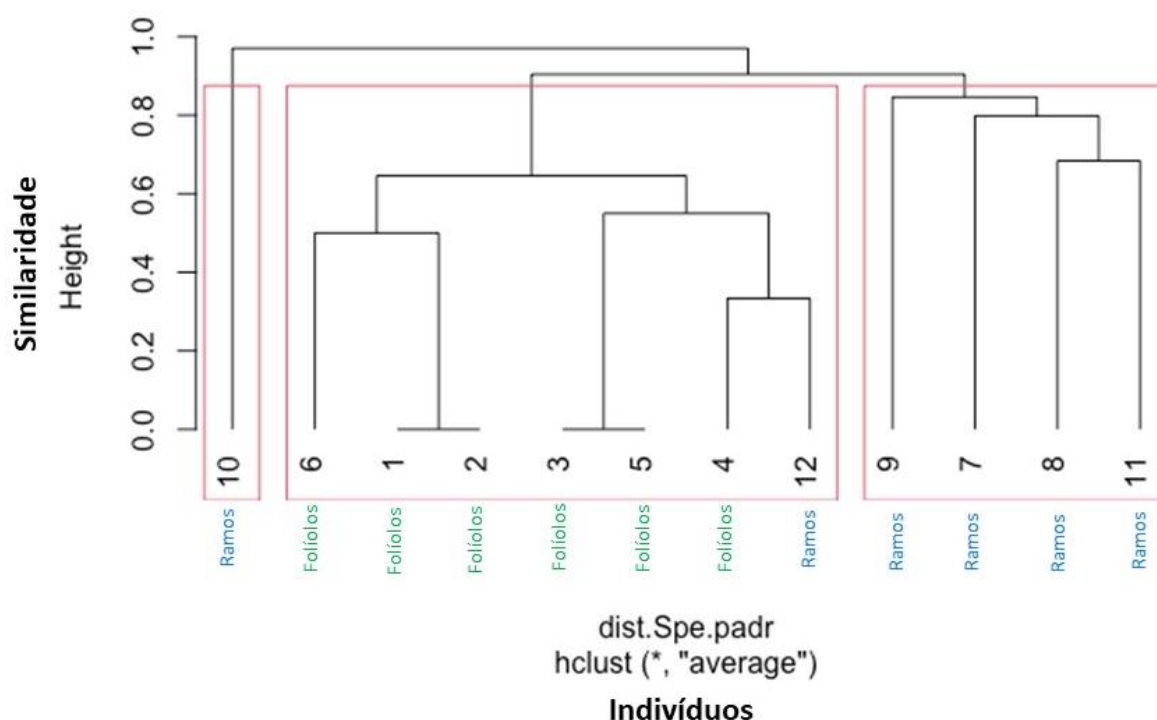


Figura 8 – Análise da similaridade (baseado em Jaccard) de fungos endofíticos de folíolos e ramos de *M. tenuiflora* em área de conservação da Caatinga, Brasil.



5 DISCUSSÃO

Folíolos e ramos de *M. tenuiflora* em área de conservação da Caatinga, no Raso da Catarina, possuem uma relevante diversidade de fungos endofíticos quando consideramos os números de isolados/táxons obtidos. No presente estudo foram obtidos 181 fungos endofíticos o que representou 16 táxons em ramos e dois táxons em folíolos de *M. tenuiflora*, com taxa de colonização de 6,30% em folíolos e 45,3% em ramos. *Readeriella* sp., *Leptosillia* sp. 1 e *Sporormiella minima* foram os táxons mais representativos, sendo *Readeriella* e *Leptosillia* isolados exclusivamente de ramos e *S. minima* de folíolos e ramos. Bezerra et al. (2012) realizaram um estudo pioneiro sobre a riqueza endofítica de cacto da Caatinga, retirando 45 fragmentos de *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae) e obtiveram um número menor de fungos (44) pertencentes a 12 gêneros e 13 espécies, sendo *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* as mais frequentes.

Outros estudos demonstraram uma marcante riqueza e diversidade de fungos endofíticos em plantas de outras regiões do Brasil. Em folhas de *Bauhinia brevipes* (Fabaceae) no Cerrado, Hilarino et al. (2011) obtiveram 1.110 endófitos agrupados em 126 táxons. *Diaporthe* [*Phomopsis*] foi o principal gênero, seguido por *Dothiorella*, *Pestalotiopsis* e

Acremonium. No estudo, a taxa de colonização foliar foi de 81,7%; 653 isolados (58,83%) não apresentaram estruturas de reprodução em meio de cultura e alguns táxons foram específicos de algum estágio foliar, apresentando colonização apenas de 141 fragmentos dos 540 obtidos de folíolos e ramos (33,51 %), o que pode ser considerado baixa colonização. Ainda no Cerrado, Carvalho et al. (2012) isolaram 320 fungos endofíticos a partir de 900 fragmentos de *Stryphnodendron adstringens* (Fabaceae), classificados em 66 morfotipos pertencentes a 25 gêneros, e apontando *Diaporthe* cf. *phaseolorum*, *Guignardia camelliae*, *Preussia pseudominima*, *Xylaria hypoxylon*, *Pseudofusicoccum stromaticum* e *Cytospora* sp. como os fungos mais frequentes.

Pádua et al. (2018) estudaram a diversidade e produção de enzima anticancerígena produzida por fungos endofíticos isolados de *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae) relataram o isolamento de 35 fungos de folhas coletadas em área da Caatinga e 133 de folhas obtidas em área de brejo de altitude, sendo *Diaporthe* o gênero mais comum. *Diaporthe* também foi relatado como mais frequente em estudo sobre a diversidade endofítica de *Poincianella pyramidalis* (Fabaceae), planta da qual foram isolados 189 endófitos de folíolos e ramos (OLIVEIRA et al., 2020) com novos táxons descritos, incluindo o *Caatingomyces brasiliensis*, pertencente à família Teratosphaeriaceae (Capnodiales) (HYDE et al., 2019). Analisando a variação sazonal da diversidade de fungos endofíticos em 10 espécies das famílias Fabaceae, Moraceae, Combretaceae, Boraginaceae e Myrtaceae em áreas de ecótono (Cerrado-Caatinga), incluindo *M. tenuiflora*, Silva et al. (2020), obtiveram 131 isolados no período seco apontando *Pestalotiopsis steyaert* (15,27%) como a espécie mais frequente; representantes de *Aureobasidium*, *Chaetomium*, *Phoma* e *Diaporthe* tiveram menor frequência de ocorrência/isolamento. Em seu estudo, eles sugerem que a sazonalidade exerce influência na composição fúngica do hospedeiro.

Em muitos estudos sobre fungos endofíticos de regiões semináridas são relatadas grandes frequências de isolamento/ocorrência de representantes de *Phoma*, *Aureobasidium*, *Diaporthe*, *Xylaria* e *Aspergillus* (RASHMI et al., 2019), diferindo do presente estudo onde se obteve a maior frequência de isolados de *Leptosillia*, “*Sporormiella*” e *Readeriella*.

Em outros lugares do mundo, como em área desértica a noroeste da China, Li et al. (2020) obtiveram 1046 fungos endofíticos a partir de 1600 fragmentos teciduais de 10 espécies de halófitas, registrando 36 táxons e variação na taxa de colonização e na riqueza de fungos endofíticos. *Alternaria eichhorniae* foi o endófito mais representativo no caule. Singh et al. (2017) estudando as variações geográficas e sazonalidades na composição de fungos endofíticos de *Tectona grandis* (Verbenaceae) em regiões tropicais da Índia, evidenciaram

uma taxa de colonização de 62,83%, sendo *Diaporthe* mais uma vez reportado como gênero mais frequente. Investigando fungos endofíticos e sua associação simbiótica em folhas e caules de *Larrea tridentata*, *Simmondsia chinensis* e outros vegetais, Massimo et al. (2015) obtiveram 457 isolados a partir de 22.656 fragmentos vegetais, apontando *Preussia* como gênero mais frequente no estudo em região árida deserto de Sonora no Arizona-EUA.

Estudos apontam uma baixa diversidade de fungos endofíticos em plantas de ambientes secos e uma alta colonização em ramos, em comparação a plantas de ambientes tropicais/subtropicais úmidos (GONZÁLEZ-MENÉNDEZ et al., 2018.; LI et al., 2020.; OLIVEIRA et al., 2020.; SILVA et al., 2020). No presente estudo, a diversidade não diferiu entre folíolos e ramos, embora a riqueza tenha sido estatisticamente maior nos ramos. Fatores bióticos e abióticos contribuem para a preferência do endófito em colonizar um determinado hospedeiro, tendo em vista que a colonização fúngica está intimamente relacionada à umidade, temperatura, tecido do hospedeiro, tipo de solo e fatores climáticos (RODRIGUEZ et al., 2009; MASSIMO et al., 2015; MARTINS et al., 2016; PADUA et al., 2018; LI et al., 2020). A variação do clima em ecossistemas com predomínio de longos períodos de seca, como a Caatinga, exerce estresse ambiental que influencia a atividade microbiana e a diversidade de organismos (SCHIMEL et al., 1999). Além disso, estudo recente aponta que a sazonalidade também é um fator influenciador da taxa de colonização dos endófitos nos tecidos vegetais em espécies florestais da família Fabaceae (SILVA et al., 2020). Outro ponto importante é que parte da vegetação da Caatinga é caducifólia, perdendo 70% de sua cobertura foliar no período de estiagem e isso poder ser um dos fatores que auxiliem a elucidar a baixa riqueza de fungos endofíticos na região foliar do hospedeiro neste tipo e bioma (SILVA et al., 2017).

Estudos vêm apontando alta variedade de fungos endofíticos, incluindo fungos raros, em regiões áridas e semiáridas de diferentes ecossistemas na Austrália (DASTOGEER et al., 2018), Hungria (KNAPP et al., 2015), China (SUN et al., 2012, Li et al., 2020), Brasil (BEZERRA et al., 2012, 2013, 2017a, b, c; 2019a; PADUA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2020; SILVA et al., 2020), Espanha (GONZÁLEZ-MENÉNDEZ et al., 2018), Estados Unidos (MASSIMO et al., 2015), México (FONSECA-GARCÍA et al., 2016) e Venezuela (LORO et al., 2012). Tais estudos vão de encontro aos estudos que afirmavam que essas áreas secas possuem baixa diversidade de fungos endofíticos em comparação com ambientes temperados, tropicais úmidos e/ou subtropicais úmidos (ARNOLD et al., 2000, 2007; BANERJEE, 2011). Um ponto peculiar é que na maioria dos estudos apresentados no presente trabalho apontam o filo ascomycota, como o grupo com maior números de fungos

endofíticos, representando parte expressiva da diversidade fúngica (ARNOLD et al., 2000), dominante em folhas de ambientes úmidos tropicais (LUGTENBERG et al., 2016), em ramos de vegetais de ambientes tropicais secos (OLIVEIRA et al., 2020) e possuindo especificidade ao órgão hospedeiro.

Mesmo com o avanço em pesquisas, os estudos envolvendo a diversidade de fungos endofíticos em ambientes secos, tais como a Caatinga, ainda são incipientes (BEZERRA et al., 2015; MOURA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2020, SILVA et al., 2020). Estudos com fungos endofíticos em plantas de ambientes secos têm demonstrado baixa taxa de colonização dos tecidos vegetais, entretanto existe alta riqueza e diversidade de espécies associadas a diferentes tecidos vegetais quando comparados ao registrado em ambientes temperados, tropicais e/ou subtropicais úmidos (SURYANARAYANAN et al., 2005; KHIDIR et al., 2010; SUN et al., 2012; LORO et al., 2012; BEZERRA et al., 2012, 2013).

Houve uma riqueza de 29 táxons de fungos endofíticos relacionada aos tecidos sadios de *M. tenuiflora*, a estimativa de riqueza foi de 45. Pleosporales é a ordem mais frequentemente apontada entre os fungos endofíticos isolados de plantas de regiões áridas (GONZÁLEZ-MENÉNDEZ et al., 2018). Como mencionado, as características ambientais apresentadas pela Caatinga podem influenciar na composição da riqueza e abundância da microbiota fúngica endofítica (SUN et al., 2011, 2012^a; OLIVEIRA et al., 2020).

Outros aspectos como sazonalidade, clima e tipo de solo também farão interferência na composição fúngica endofítica nos diferentes tecidos vegetais (MARTINS et al., 2016; SILVA et al., 2020). Além dos fatores abióticos, outros fatores como o tipo de transmissão fúngica, ou seja, a colonização do fungo no hospedeiro, que pode ser do tipo horizontal quando ocorre a disseminação de propágulos fúngicos entre hospedeiros por meio do vento, chuva ou polinizadores/dispersores de sementes e predadores (LUGTENBERG et al., 2016) ou do tipo vertical, quando o próprio vegetal transfere o fungo através das sementes para seus descendentes, também pode ser outro fator influenciador na composição da diversidade e riqueza dos fungos endofíticos no hospedeiro. Além disso a competição intraespecífica entre os diferentes fungos e a mudança nos estágios de crescimento da planta podem desencadear a colonização de novos indivíduos ao longo do tempo (FANG et al., 2013; MARTINS et al., 2016). Diversos são os aspectos que devem ser averiguados para elucidar a relação fungo-hospedeiro e quais são os mecanismos usados neste processo, havendo um leque de perguntas à serem respondidas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Folíolos e ramos de *Mimosa tenuiflora* coletados na Caatinga são pouco colonizados por fungos endofíticos, com os ramos mostrando-se mais suscetíveis à colonização que os folíolos. Apesar disso, evidencia-se elevada riqueza e diversidade de fungos endofíticos, especialmente nos ramos dessa planta hospedeira.
- A composição das comunidades de fungos endofíticos difere entre folíolos e ramos de *Mimosa tenuiflora*, demonstrando que existe uma comunidade de fungos específica para os tecidos vegetais estudados. Assim, no material estudado *Microascus* sp. e *Nigrospora* sp. são exclusivos dos folíolos, enquanto *Readeriella* sp., *Leptosillia* sp. 1 e *Aureobasidium pullulans* habitam tipicamente os ramos.
- Estudos da diversidade de fungos endofíticos de plantas da Caatinga contribuem com a estimativa nacional e global da diversidade de fungos, com relatos de espécies para o país e descrição de novos táxons e possível descoberta de novas substâncias de interesse diversos.
- A descrição de táxons endofíticos em diferentes espécies vegetais, além de preencher a lacuna de conhecimento sobre a diversidade fúngica da Caatinga, proporciona dados e informações sobre o status ecológico do ecossistema, contribuindo também para estudos futuros visando a produção de compostos de importância biotecnológica, e fornecendo subsídios para o desenvolvimento de programas de preservação e manejo ambiental.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, T.T.; RIBEIRO, M. A. S.; POLONIO, J. C.; et al. Curvulin and spirostaphylotrichins R and U from extracts produced by two endophytic *Bipolaris* sp. associated to aquatic macrophytes with antileishmanial activity. **Natural Product Research**, v. 1, 1–9, 2017.
- ALMEIDA, V.S.; BANDEIRA, F.P.S.F. O significado cultural do uso de plantas da caatinga pelos quilombolas do Raso da Catarina, município de Jeremoabo, Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, v. 61, n. 2, 195–209, 2010.
- ARAÚJO, L.V.C.; SOUSA PAULO, M.C.; PAES, J.B. Características dendrométricas e densidade básica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.) de duas regiões do estado da Paraíba. **Revista Caatinga**, v. 20, n. 1, 89–96, 2007.
- ARAÚJO, J.F.O. Atividade antibacteriana, citotóxica e cicatrizante *in vitro* de fungos endofíticos de isolados de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., *Poincianella pyramidalis* Tul. e *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart. **Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Enfermagem)**. Universidade Federal de Alagoas, 2018.
- ARNOLD, A. E., MAYNARD, Z., GILBERT, G. S., COLEY, P.D., KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v. 3, p. 267–274, 2000.
- 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**, v. 95, p. 388–398, 2003.
- ARNOLD, A. E., LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? **Ecology**, v. 88, n. 3, p. 541–549, 2007.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Valparaíso, **Electronic Journal of Biothechnology**, v. 3, n. 1, 40–65, 2000.
- 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**, New Delhi, Anamaya Publishers, 189–207, 2007.
- AZEVEDO, S.M.A.; BAKKE, I.A.; BAKKE, O.A.; et al. Crescimento de plântulas de jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret) em solos de áreas degradadas da caatinga. **Engenharia Ambiental**, v. 9, n. 3, 150–160, 2012.

- ALBUQUERQUE, U.P.; SILVA, V.A.; ANDRADE, L.H.C. Uso e conservação da diversidade de florestas secas e úmidas de Pernambuco. In: TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. (Orgs.) **Diagnóstico da Biodiversidade de Pernambuco**, Massangana, Recife, v.2, 2002.
- BAYMAN, P.; LEBRÓN, L.L.; TREMBLAY, R.L.; LODGE, D.J. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). **New Phytologist** 135: 143–149, 1997.
- BRAY, J. R.; CURTIS, J. T. An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin: **Ecological Monographs**, v. 27, 325–349. 1957.
- BEZERRA, D.A.C.; PEREIRA, A.V.; LÔBO, K. M. S.; et al. Atividade biológica da jurema-preta [*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.] sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, 814–817, 2009.
- BEZERRA, J.D.P.; AZEVEDO, J.L.; SOUZA-MOTTA, C.M. Why study endophytic fungal community associated with cacti species? In: AZEVEDO J.L, Quecine MC. (eds.) **Diversity and benefits of microorganisms from the tropics**. New York, Springer. 21–35. 2017.
- BEZERRA, J.D.P.; SANTOS, M.G.S.; BRABOSA, R.N.; et al. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. **Symbiosis**, 60: 53–63, 2013.
- BEZERRA, J.D.P.; SANTO, M.G.S; SVEDESE, V.; et al. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28: 1989–1995, 2012.
- BEZERRA, J.D.P., NASCIMENTO, C.C.F., BARBOSA, R.N., et al. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 46, n. 1, 49–57, 2015.
- CARVALHO, C. R.; GONÇALVES, V. N.; PEREIRA, C. B.; et al. The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. **Symbiosis**, 57(2), 95–107. 2012.
- CARROLL G.C.. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody plants. In: FOKKEMA N.J, VAN DEN HEUVEL J., eds. **Microbiology of the phyllosphere**. Cambridge (UK): Cambridge University Press, 205–222, 1986
- CANDEIAS, et al. Fungos endofíticos de raízes de sisal antagonistas ao *aspergillus niger*. centro de pesquisas do cacau, ilhéus, bahia, brasil. **Agrotrópica** v. 28, n. 1, 29–36, 2016.

- CANUTO, K.M.; RODRIGUES, T.H.S.; OLIVEIRA, F.S.A.; GONÇALVES, F.J.T. Fungos Endofíticos: Perspectiva de Descoberta e Aplicação de Compostos Bioativos na Agricultura. **Embrapa**. ISSN 2179–8184, 2012.
- CALIXTO JÚNIOR, J.T.; DRUMOND, M.A.; JÚNIOR, F.T.A. Estrutura e distribuição espacial de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. em dois fragmentos de caatinga em Pernambuco. **Revista Caatinga**, v. 24, n. 2, 95–100, 2011.
- CHAO, A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics* 43:783–791, 1987.
- CROUS, P.W.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J.Z. *Mycosphaerella* is polyphyletic. **Studies in Mycology**, 58: 1–32. 2007a.
- CROUS, P.W.; BRAUN, U.; SCHUBER T.K.; et al. Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. **Studies in Mycology**, 58: 33–56.
- ELLIS, M.B. **Dematiaceus Hyphomycetes**. Commonwealth Mycological Institute, Kew. 1971.
- DASTOGEER, K.M.; LI, H.; SIVASITHAMPARAM, K.; et al. Host Specificity of Endophytic Mycobiota of Wild Nicotiana Plants from Arid Regions of Northern Australia. **Microbial Ecology** 75, 74–87, 2018.
- FANG, W., YANG, L., ZHU, X., et al. Seasonal and habitat dependent variations in culturable endophytes of *Camellia sinensis*. *J. Plant Pathol. Microbiol.* 4 (169), 6. 2013.
- FREIRE, K.T.L.S.; ARAÚJO, G.R.; BEZERRA, J.D.P.; et al. Fungos endofíticos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae) sadia e infestada por *Dactylopius opuntiae* (Cockerell, 1896) (Hemiptera: Dactylopiidae). **Gaia Scientia**, v. 9, 104–110, 2015.
- FONSECA-GARCÍA, C.; COLEMAN-DERR, D.; GARRIDO, E.; et al. The Cacti Microbiome: Interplay between Habitat-Filtering and Host-Specificity. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 150, 2016.
- GROENEWALD, J.Z.; NAKASHIMA, C.; NISHIKAWA, J.; et al. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. **Studies in Mycology**. 75: 115–170, 2013.
- GONÇALVES, F.J.T.; FREIRE, F.C.O.; LIMA, J.S. Fungos endofíticos e seu potencial como produtores de compostos bioativos. **Essentia**, v. 15, n. 1, 71–92, 2013.
- GONZÁLEZ-MENÉNDEZ, V.; CRESPO, G.; DE PEDRO, N.; et al. Fungal endophytes from arid areas of Andalusia: high potential sources for antifungal and antitumoral agents. **Scientific Reports**, 8(1). 2018.
- HAWKSWORTH, D.L. A dimensão fúngica da biodiversidade: magnitude, importância e conservação. **Mycological Research**, 95: 641–655, 1991.

HAWKSWORTH, D.L. 'Misidentifications' em bancos de dados de sequência de DNA de fungos . **New Phytologist**, 161: 13–15. 2004.

HYDE, K.D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, V. 33, p. 163-173. 2008.

HYDE, K.D.; TENNAKOON, D.S.; JEEWON, R.; et al. Fungal diversity notes 1036-1150: taxonomic and phylogenetic contributions on genera and species of fungal taxa. **Fungal Diversity** 96: 1–242. 2019.

JACCARD, P. Étude Comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**, 7, 547–579. 1901.

KNAPP, D.G.; KOVÁCS, G.M.; ZAJTA, E.; et al. Dark septate endophytic pleosporalean genera from semiarid areas. **Persoonia**, v. 35, 87–100, 2015.

KRINGS, M.; TAYLOR, T.N.; HASS, H.; et al., Fungal endophytes in a 400-millionyr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. **New Phytologist** 174, 648–657, 2007.

KHIRALLA, A.; SPINA, R.; YAGI, S.; et al. Endophytic fungi: occurrence, classification, function and natural products in: HUGHES, E.(ed.) **Microbiology Research Advances**. New York: Ed. Nova Science Publishers, 2016.

KÖPPEN, W. **Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra**. México: Fondo de Cultura Econômica; 1948.

LI, J.L.; SUN, X.; ZHENG, Y.; et al. Diversidade e comunidade de fungos endofíticos cultiváveis de caules e raízes de halófitos do deserto no noroeste da China. **MycoKeys** 62: 75-95. 2020.

LIMA, T.E.F.; OLIVEIRA, R.J.V.; BEZERRA, J.L.; CAVALCANTI, M. A. Q. Endophytic fungi from leaves and roots of *Vitis labrusca* cv. Isabel in Pernambuco/Brazil. **Sydowia**, v. 66, 115–128, 2014.

LORO, M.; VALERO-JIMÉNEZ, C.A.; NOZAWAC, S.; et al. Diversity and composition of fungal endophytes in semiarid Northwest Venezuela. **Journal of Arid Environments**, v. 85, p. 46–55, 2012.

LUGTENBERG, B.J.; CARADUS, J.R.; JOHNSON, L.J. Fungal endophytes for sustainable crop production. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology, v. 92, no. 12, 2016.

- MAIA-SILVA, C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; SILVA, C.I.; et al. Environmental windows for foraging activity in stingless bees, *Melipona subnitida* Ducke and *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Sociobiology**, v.61, n.4, 378–385, 2014.
- MARTINS, F.; PEREIRA, J.A.; BOTA, P.; et al. Fungal endophyte communities in above- and belowground olive tree organs and the effect of season and geographic location on their structures. *Fungal Ecology*, vol. 20, pp. 193-201. 2016.
- MASSIMO, N. C.; NANDI DEVAN, M. M.; ARENDT, K. R., et al. Fungal endophytes in aboveground tissues of desert plants: infrequent in culture, but highly diverse and distinctive symbionts. **Microbial Ecology**, v. 70, n. 61-76, 2015.
- MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: MAIA, L. C.; MALOSSO, E.; YANO-MELLO, A. M. (Eds.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 129–140, 2007.
- MUSSI-DIAS, V.; ARAÚJO, A.C.O.; SILVEIRA, S.F.; ROCABADO, J.M.A.; ARAÚJO, K.L. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira Pl..... Med.....**, v.14, n.2, 261–266, 2012.
- MOURA L.F.W.G.,; OLIVEIRA, M.V.; MOTA, J.G.S.M.; et al. Isolamento e identificação de fungos associados às plantas medicinais nativas da Caatinga da região dos Inhamuns, Tauá, Ceará, Brasil. **Essentia** 17: 43–63. 2016.
- NASCIMENTO, T.L.; OKI, Y.; LIMA, D.M.M.; et al. Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. **Fungal Ecology**, v. 14, p. 79-86, 2015.
- NOGUEIRA, R.J.M.C; ALBUQUERQUE, M.B.; CIRÍACO-SILVA, E. Aspectos Ecofisiológicos da tolerância à seca em plantas da caatinga. In: NOGUEIRA, R.J.M.C; LIMA ARAÚJO, L.; WILLADINO, L.G.; CAVALCANTE, U.M.T. (Orgs.) **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Mxm gráfica e editora, Recife-PE, 22–31, 2005.
- OLIVEIRA, J.F.; ROCHA, J.; LESSA, L.; et al. Antimicrobial and Antiseptic Activity of Genus *Mimosa* spp.: A Literature Review. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 6, 218–222, 2017.
- OLIVEIRA, T.G.L.; BEZERRA, J.D.P.; SILVA, I.R.; et al. Diversity of endophytic fungi in the leaflets and branches of *Poincianella pyramidalis*, an endemic species of Brazilian tropical dry forest. **Acta Botanica Brasilica** 34: 755–764, 2020.

- PADUA, A.P.S.L.; FREIRE, K.T.L.S.; OLIVEIRA, T.G.L.; et al. Fungal endophyte diversity in the leaves of the medicinal plant *Myracrodruon urundeuva* in a Brazilian dry tropical forest and their capacity to produce L-asparaginase. **Acta Botanica Brasilica**, v. 32, 00, 2018.
- PALHA, P.M.G.; SILVA, J.S.; SILVA, J.S.; et al. Parâmetros ecológicos de fungos em Bromeliaceae em ecossistemas naturais e cultivadas na Bahia. **Rodriguesia**, v. 69, 2025–2033, 2018.
- PETRINI, O. Fungal Endophytes of Tree Leaves. In: ANDREWS J.H.; HIRANO S.S. (eds) **Microbial Ecology of Leaves**. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. Springer, New York, 1991.
- PIRES, I.M.O.; SILVA, A.V.; SANTOS, M.G.S; et al. Potencial antibacteriano de fungos endofíticos de cactos da Caatinga, uma Floresta Tropical Seca no Nordeste do Brasil. **Gaia Scientia (UFPB)**, v. 9:2, 163–169, 2015.
- PIROZYNSKI, K.A.; MALLOCH, D.W. The origin of land plants: a matter of mycotrophism. **Biosystems**, 6:153–164, 1975.
- PEIXINHO, G.S; SANTOS, C.M.G.; VALTEMIR, G.R.; et al. Avaliação da eficiência de extratos de plantas nativas da caatinga sobre o controle da podridão seca (*Lasiodiplodia theobromae*) em cachos da videira cv. Itália. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 2, 155–157, 2017.
- RAI, M.; GADE, A.; RATHOD, D.; DAR, M.; VARMA, A. Review: Mycoendophytes in medicinal plants: diversity and bioactivities. **Nusantara Bioscience**, v.4, n.2, p.86-96, 2012.
- RASHMI, M.; KUSHVEER, J.S.; SARMA, V.V. A worldwide list of endophytic fungi with notes on ecology and diversity. **Mycosphere** 10:1, 798–1079, 2019.
- RASHMI, M.; KUSHVEER, J.S.; SARMA, V.V. A worldwide list of endophytic fungi with notes on ecology and diversity. **Mycosphere** 10(1), 798–1079, 2019.
- RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, v.42, 265–270, 1950.
- ROSA, L.H.; VAZ, A.B.M.; CALIGIORNE, R.B. et al. Fungos endofíticos associados ao capim antártico *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). **Polar. Biol.** 32, 161–167, 2009.
- RODRIGUEZ, R. J.; WHITE, J. F.; ARNOLD, A. E.; et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytol.** 182, 314–330. 2009.
- RODRIGUES, R.G. Paisagens do sertão setentrional. In: SIQUEIRA FILHO, J.A. (Org.) **Flora das caatingas do rio são Francisco: História natural e conservação**. Andrea Jakobsson Estúdio Editorial Ltda. Rio de Janeiro, 112–159, 2012.

- SANTIAGO, I.F.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Endophytic symbiont yeasts associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis*. **Polar Biology**, v. 39, 1–7, 2016.
- SANTOS, C.A.B.; ANDRADE, W.M.; SILVA, J.S.B. (ORGS). Sustentabilidade do Bioma caatinga. **Sabeh**, 2018.
- SILVA, M.C; BARBOSA, L.C.F.; LEAL, I.R.; TABARELLI, M. The Caatinga: Understanding the challenges In: SILVA, .M.C; LEAL, I.R.; TABARELLI, M. (Orgs.) **Caatinga: The Largest Tropical Dry Forest Region in South America**. Springer. (eBook) p.3–15 p. 2017.
- SILVA, A.C.; SILVA, E.F.T.; FRANÇA QUEIROZ, A.E.S.; et al. Production, biochemical characterization and kinetic/thermodynamic study of novel serine protease from *Aspergillus avenaceus* URM 6706. **Biotechnology Progress**, 2020.
- SILVA, H.F.; SANTOS, A.M.G.; SANTOS, M.V.O.; et al. Seasonal variation in the occurrence of fungi associated with forest species in a cerrado-caatinga transition area. **Revista Arvore**, v. 44, 2020.
- SIDDIQUI, I. N.; ZAHOR, A.; HUSSAIN, H.; et al., Diversonol and blennolide derivatives from the endophytic fungus *Microdiplodia* sp.: absolute configuration of diversonol. **Journal of Natural Products**, 74, 365–373, 2011.
- SHANNON, C.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: University of Illinois Press. 1949.
- SOUZA, Q.L.S.; SOUZA, A.D.L; FILHO, S.P.; et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofiticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longuiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos congesta* Benth. **Acta Amazônica**. 34 (2): 185–195, 2004.
- STONE, J.K.; BACON, C.W.; WHITE, J.F. An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined. In: BACON, C.W.; WHITE, J.F., Eds., **Microbial Endophytes**, Marcel Dekker, New York, 3-29. 2000.
- SUN, X. & GUO, L.D. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques, **Mycology**, 3:1, 65–76, .2012.
- SUN, Y.; WANG, Q.; LU, X.; et al. Endophytic fungal community in stems and leaves of plants from desert areas in China. **Mycological Progress** 11:781–790. 2012.
- SUN, X.; DING, Q.; HYDE, K.D.; et al. Community structure and preference of endophytic fungi of three woody plants in a mixed forest. **Fungal Diversity**, 5: 624-632. 2012.
- SUN, Y.; WANG, Q.; LU, X.; el at. Endophytic fungal Community in stems and leaves of plants from desert areas in China. **Mycological Progress**, 11: 781-790. 2012.

- SUTTON, B.C. **The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata.** Commonwealth Mycological Institute, Kew. 1980.
- SURYANARAYANAN, T.S.; WITTLINGER, S.K.; FAETH, S.H.; Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. **Mycological Research**, v. 109, n. 635–639, 2005.
- SURYANARAYANAN, T.S. Endophyte research: going beyond isolation and metabolite documentation. **Fungal Ecology**, v. 6, n. 6, 561–568, 2013.
- SCHAECHTER, M. (org). 2011. **Eukaryotic Microbes.** Elsevier: SAN DIEGO, C.A.;
- SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research** 106(9), 996–1004, 2002.
- STONE, J.K.; BACON, C.W.; WHITE, J.R. An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined. In: **Microbial Endophytes.** BACON, C.W. & WHITE, JR. (Eds.) Marcel Dekker, 2000, pp. 3-29.
- STROBEL, G.A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, 22: 315-333, 2002.
- STROBEL, G.A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 67(4): 491–502, 2003.
- STIERLE A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science** 260: 214–216. 1993.
- TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, 1807–1813, 2008.
- UNTERSEHER, M.; PERŠOH, D.; SCHNITTLER, M. Leaf-inhabiting endophytic fungi of European Beech (*Fagus sylvatica* L.) co-occur in leaf litter but are rare on decaying wood of the same host. **Fungal Diversity** 60, 43–54, 2013.
- UNTERSEHER, M.; PETZOLD, A.; SCHNITTLER, M. Xerotolerant foliar endophytic fungi of *Populus euphratica* from the Tarim River basin, Central China are conspecific to endophytic ITS phylotypes of *Populus tremula* from temperate Europe. **Fungal Diversity**, v. 54, n. 1, 133–142, 2012.
- WANG, Y.; DAI, C-C. Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. **Annals of Microbiology** 61: 207–215. 2011.
- VAREJÃO-SILVA M.A.; BRAGA, C.C.; AGUIAR M.J.N.; et al. Atlas Climatológico do Estado da Paraíba. UFPB, Campina Grande. 1984.

VIEIRA, P.D.S.; GOMES-SILVA, F.; MEDRADO, W.T.S.; et al. Primeiro registro de fungos endofíticos em alfinete-de-soldado (*Ixora coccinea* L.) em Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, 1–4, 2012.

Sites:

<http://www.icmbio.gov.br/portal/unidadesdeconservacao/biomas-brasileiros/caatinga/unidades-de-conservacao-caatinga/2119-esec-raso-da-catarina> Acessado 31 de Maio de 2019.

<http://sistemas.mma.gov.br/cnuc/index.php?ido=relatorioparametrizado.exibeRelatorio&relatorioPadrao=true&idUc=74> Acessado 31 de maio de 2019.

Saiba quais são as características da Caatinga. Fundação Joaquim Nabuco. Acessado 6 de março de 2020. Disponível em: <https://www.fundaj.gov.br/index.php/conselho-nacional-da-reserva-da-biosfera-da-caatinga/9193-saiba-quais-sao-as-caracteristicas-da-caatinga>

Caatinga. Ministério do Meio Ambiente. Acessado 6 de março de 2020. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>

Cadastro Nacional de Unidades de Conservação. Ministério do Meio Ambiente. Acessado 10 de março de 2020. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/areas-protegidas/cadastro-nacional-de-ucs>

World Wide Fund. Bioma caatinga. Acessado 10 de março de 2020. Disponível em: https://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/questoes_ambientais/biomas/bioma_caatinga/

Embrapa temperatura Acessado 10 de março de 2020. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/bioma_caatinga/arvore/CONT000g798rt3p02wx5ok0wtedt3n17xgwk.html

**APÊNDICE – *LEPTOSILLIA MIMOSAE* (LEPTOSILLIACEAE, XYLARIALES),
A NEW ENDOPHYTIC SPECIES FROM THE CAATINGA DRY FOREST IN
BRAZIL**

Manuscrito científico aceito para publicação na revista Nova Hedwigia
(o texto do manuscrito está formatado seguindo as normas da revista Nova Hedwigia:
https://www.schweizerbart.de/journals/nova_hedwigia/instructions)

***Leptosillia mimosae* (Leptosilliaceae, Xylariales), a new endophytic species from the Caatinga dry forest in Brazil**

Arthur V. Silva^{1#}, Thays G. L. Oliveira^{1#}, Cristina M. Souza-Motta¹, Jadson D. P. Bezerra², Leonor C. Maia¹

¹Departamento de Micologia Prof. Chaves Batista, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, CEP: 50740-600. Recife, PE, Brazil

²Setor de Micologia, Departamento de Biociências e Tecnologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG), Rua 235, s/n, Setor Universitário, CEP: 74605-050. Goiânia, GO, Brazil

[#] The authors contributed equally to this work.

^{*} Correspondence: Jadson D. P. Bezerra (jadsondpb@gmail.com, jadsonbezerra@ufg.br) and Leonor C. Maia (leonorcmaia@gmail.com).

With 3 figures

Abstract

Exploring the diversity of endophytic fungi from branches of *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae), a native plant of the Caatinga dry forest in the Northeast Brazil, 33 strains were preliminarily identified as members of *Leptosillia* (Leptosilliaceae) based on sequences of the internal transcribed spacer region (ITS rDNA). Subsequently, morphological features of the isolates were analyzed, and for species identification, a multi-marker analysis was performed using the internal transcribed spacer region (ITS), the partial large subunit nuclear ribosomal RNA gene (LSU rDNA), the second-largest subunit of RNA polymerase II gene (*RPB2*), the translation elongation factor EF-1 alpha gene (*TEF1*), and the β -tubulin gene (*TUB2*). Our isolates were placed in two independent lineages: *Leptosillia mimosae* sp. nov. is proposed to name 32 of the endophytic isolates, while the isolate URM 8384 was identified as *Leptosillia* sp. and is likely another new species. In the phylogenetic tree, the endophytic *Leptosillia mimosae* sp. nov. and *Leptosillia* sp. appeared in the same clade having the pathogen *L. pistaciae* as their sister species.

Keywords: Caatinga forest, fungal taxonomy, multi-gene phylogeny, one new species.

Introduction

The genus *Leptosillia* Höhnel (1928) was recently revised based on new information on its morphology, phylogeny, taxonomy, ecology and life cycle, being rearranged in the monotypic family Leptosilliaceae (Xylariales), currently with 11 species (Crous et al. 2019; Voglmayr et al. 2019; Senanayake et al. 2020). Species of *Leptosillia* are morphologically characterized by a teleomorph having perithecial ascomata with asci containing eight 0- to 11-septate ascospores, an anamorph with pycnidial conidiomata, and one or two types of conidia with different origin and shape (Voglmayr et al. 2019). *Leptosillia* species have been reported mainly on the bark of living or dead branches or trunks, as endophytes, as phytopathogenic fungi, and some species have previously been treated as putative lichen-forming fungi (Pažoutová et al. 2012; Vitale et al. 2018; Voglmayr et al. 2018, 2019). Recently, Senanayake et al. (2020) introduced a new species, *L. cordyline* Senan. & K.D. Hyde [as '*cordylinea*'], isolated as a saprobic fungus on leaves of *Cordyline fruticosa* (L.) A.Chev. (Asparagaceae) without any disease symptoms.

Endophytic xylariaceous species have been widely isolated from several plants growing in temperate, tropical, and subtropical regions (Okane et al. 2008; Chen et al. 2013; Rajulu et al. 2013; U'Ren et al. 2016) with few reports from Caatinga forest in Brazil (Almeida et al. 2016). Species of *Xylaria* (Xylariales) are commonly isolated as endophytes (Davis et al. 2003; Thomas et al. 2016), but they have not been widely isolated from woody plants of the Brazilian tropical dry forest (Caatinga) where species of Diaporthales and Pleosporales have the highest occurrence (Bezerra et al. 2019a).

Caatinga, an exclusively Brazilian biome, is the most species-rich seasonally dry tropical forest in the New World (Queiroz et al. 2017). Located in the northeastern region of the country, this heterogeneous domain presents diverse physiognomies and high diversity of

plants, with more than 170 families (Flora do Brasil 2020) and animals, many of them endemic (Silva et al. 2017). However, the fungal diversity of this region has been underestimated, and more recent studies have revealed a remarkable richness and abundance of species, including new taxa belonging to Ascomycota (Vitoria et al. 2020), Basidiomycota (Drechsler-Santos et al. 2010), Glomeromycota (Marinho et al. 2019), and Mucoromycota (Santiago et al. 2013). Some plant species of the Caatinga forest, mainly cacti, have been studied regarding their diversity of fungal endophytes (Bezerra et al. 2012, 2013, 2017a, b, c, 2018, 2019a, b, Freire et al. 2015, Pádua et al. 2019, Silva et al. 2018, Oliveira et al. 2020). These studies have contributed to the knowledge of the Brazilian and global fungal diversity.

During the study of endophytic fungi from *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir. (Fabaceae) of the Caatinga forest, 33 endophytes with coelomycetous anamorphs were isolated. Based on ITS rDNA sequences, these isolates showed affinity to Xylariales and were identified as members of *Leptosillia*. According to this finding, a morphological characterization and a multi-marker (ITS and LSU rDNA, *RPB2*, *TEF1*, and *TUB2*) analyses allowed the description of a new species named as *Leptosillia mimosae* A.V. Silva, L.C. Maia & J.D.P. Bezerra.

Material and methods

Endophytic fungi

Endophytic fungi were isolated as described by Bezerra et al. (2015) from healthy branches of six individuals (named as B, D, F, H, J, and L) of *M. tenuiflora* growing in an area of Caatinga, at the Raso da Catarina Ecological Station (Paulo Afonso municipality, Bahia state, Brazil [09°39'03.6" S, 38°31'48.2" W]). The collection was authorized by the Ministério do Meio Ambiente (MMA)/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) under number 69009-1 and authentication code 0690090120190425 issued on 25 March, 2019.

Representative endophytic isolates and the ex-type strain of the new *Leptosillia* species are deposited at the URM culture collection (*Micoteca URM Profa. Maria Auxiliadora Cavalcanti*) and the holotype material (permanent microscopic slides) at the URM fungarium (*Herbário Pe. Camille Torrend*), both located at the Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil. In addition, endophytic isolates are also deposited in the working collection of J.D.P. Bezerra (*Fungal Culture Collection of the Universidade Federal de Goiás – FCCUFG*) housed at the Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública of the Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil.

Morphology

Isolates of *Leptosillia* were cultured on potato dextrose agar (PDA), malt extract agar (MEA) and oatmeal agar (OA) and incubated up to 30 days at 28 °C in a natural day-night cycle. For fungal sporulation, we also used plant tissue and different incubation condition (e.g. temperature and natural day-night cycle). Cultures characteristics were observed on the 15th day to measure colonies and observe macroscopic features. After 30 days on PDA, reproductive structures were observed in some isolates, and the micromorphological characteristics of pycnidia (at least 10 structures), conidiogenous cells (30) and conidia (30) were measured, and the average used to estimate their size. Colony colours were determined according to Rayner's colour charts (Rayner 1970).

DNA extraction, amplification and sequencing

For DNA extraction, endophytic isolates were cultured on PDA and incubated at 25 °C for 7 days in day-night cycle. Genomic DNA extraction was performed using the manufacturer protocol of the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA). The primers ITS1/ITS4 (White et al., 1990), LR0R/LR5 (Vilgalys & Hester 1990; Vilgalys & Sun 1994),

RPB2-5F2/fRPB2-7cR (Liu et al. 1999; Sung et al. 2007), EF1-728F/EF1-2218R (Carbone & Kohn 1999; Rehner & Buckley 2005), and Bt2a/Bt2b (Glass & Donaldson 1995) were used to amplify the ITS rDNA region, part of the LSU rDNA region, RNA polymerase II subunit 2 (*RPB2*), translation elongation factor 1- α (*TEF1*), and β -tubulin (*TUB2*) genes, respectively. The amplification reactions were performed with a total volume of 12.5 μ l and the PCR thermal cycle program for each gene was performed as described by Senanayake et al. (2020). The PCR products were treated with EXO + SAP (Alkaline Phosphatase/Exonuclease I) (Cellco, Brazil) and sequencing reactions were performed as described by Bezerra et al. (2017c).

Sequence alignment and phylogenetic analysis

The consensus sequences were visually checked using MEGA v. 7 software (Kumar et al. 2016). Using the BLASTn tool, the newly generated sequences were used to search for similar ones deposited in the GenBank database of the NCBI. Based on the dataset and phylogenetic analyses of Voglmayr et al. (2019) and Senanayake et al. (2020) our sequences were aligned together with those retrieved from GenBank using the MAFFT interface (Katoh & Standley 2013) and manually corrected using MEGA. Two datasets were constructed: 1) thirty-three ITS rDNA sequences of the newly obtained endophytic *Leptosillia* isolates were used to verify their relationship with 59 sequences representing eight *Leptosillia* species and other unidentified isolates (mainly endophytes, based on Voglmayr et al. 2019); 2) sequences from six of our endophytic isolates were selected to construct a multi-locus dataset of five genes (ITS and LSU rDNA, *RPB2*, *TEF1*, and *TUB2*) along with 27 sequences from type materials and other strains representing eight *Leptosillia* species. In both datasets, *Furfurella nigrescens* (CBS 143621 and CBS 143622) was used as the outgroup. The newly generated

sequences were deposited in GenBank (Table 1) and alignments and resulting trees in TreeBASE (study ID S28348).

Bayesian inference (BI) and maximum likelihood (ML) analyses were conducted with MrBayes v 3.2.7a on XSEDE (Ronquist et al. 2012) and RAxML-HPC BlackBox v.8.2.12 (Stamatakis et al. 2008), respectively, at the CIPRES Science Gateway (Miller et al. 2010). For the BI analyses, MrModelTest v.2.3 (Nylander 2004) was used to estimate the best nucleotide model. BI analyses were conducted with two Markov Chain Monte Carlo (MCMC) chains, 1×10^7 generations with a burn-in value of 25%, and trees were sampled every 1,000 generations. ML analyses were performed with 1,000 bootstrap replicates by using default parameters. BI posterior probability (BPP) and ML bootstrap (ML-BS) values equal or higher than 0.95 and 70%, respectively, are shown near nodes.

Results

Phylogenetic analyses

The ITS matrix included 94 sequences and comprised 641 characters (including gaps). For the BI analysis, the SYM + I + G was the best model for the ITS matrix by MrModelTest. The GTR + I + G was used as the best model test for the ML analysis. The Bayesian inference (BI) tree (Fig. 1) of ITS rDNA matrix demonstrated that the 33 newly obtained isolates are placed in two independent lineages closely related to *Leptosillia pistaciae* (Voglmayr, S. Vitale, D. Aiello, Guarnaccia, Luongo & Belisario) Voglmayr. Of these, the first highly supported clade (BPP = 1 and ML-BS = 100) contains 32 endophytic isolates while the single isolate URM 8384 represents the second clade.

The five-gene matrix includes 35 sequences (ITS = 35, LSU = 33, *RPB2* = 31, *TEF1* = 29, and *TUB2* = 29) representing eight *Leptosillia* species and comprising 3615 characters (including gaps) (ITS = 636, LSU = 714, *RPB2* = 890, *TEF1* = 901, and *TUB2* = 474). For the

BI analysis, SYM + I + G was the best model for the ITS and *RPB2* matrixes by MrModelTest, while GTR + I was the best model for LSU and HKY + I + G was the best model for *TEF1* and *TUB2* alignments. For the ML analysis, GTR + I + G was used as the best model test for each locus and combined matrix. ML analysis using individual dataset was also performed, but no topological phylogenetic conflict was observed as presented in the combined 5-gene tree; an exception occurred in the LSU rDNA tree where the new species and the isolate URM 8384 were placed in the same clade (Supplementary Figure 1).

In the combined tree, the six included endophytic isolates obtained in our study were also placed as two independent lineages, five of them in a highly supported clade (BPP = 1 and ML-BS = 100) and the isolate URM 8384 as a single lineage closely related to *L. pistaciae*.

Taxonomy

Leptosillia mimosae A.V. Silva, L.C. Maia & J.D.P. Bezerra, **sp. nov.** Fig. 3A–M.

MycoBank: MB839861.

Etymology: In reference to the host genus, *Mimosa*, from which the endophyte was isolated.

Type: **Brazil**, Bahia state, Paulo Afonso municipality, Raso da Catarina Ecological Station (09°39'03.6" S, 38°31'48.2" W), isolated as an endophyte from a branch of *Mimosa tenuiflora*, Mach 2019, A.V. Silva (URM 94408, holotype).

Ex-type culture: URM 8386 = FCCUFG 07 [isolate 29D]).

Description: *Conidiomata* pycnidial, superficial or immersed, single to aggregated, globose or subglobose, dark brown to blackish, without ostiole, irregularly rupturing at the apex and exuding a pale whitish conidial drop, 60–115 × 54–104 µm ($\bar{x}$ = 83 × 72 µm). *Pycnidial* wall thin, pale brown, forming a *textura angularis*. *Conidiophores* short,

reduced, fasciculate, branched, hyaline, smooth. Conidiogenous cells enteroblastic, phialidic, lageniform to cylindrical, hyaline, smooth, $(3.5-4-5.5(-6.5) \times 1.5-2.5 \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 5 \times 2 \mu\text{m}$). Conidia straight to slightly allantoid, hyaline, smooth, 1-celled, $(2.5-3-3.5(-4.5) \times (1-1.5(-2) \mu\text{m}$ ($\bar{x} = 3 \times 1.5 \mu\text{m}$). Teleomorph not observed.

Culture characteristics: Colonies on PDA reaching 33 mm diam. after two weeks, with velvety texture, white in the entire margin, dark brown at the centre. On MEA, colonies growing up to 30 mm diam. after two weeks, with velvety texture, white to greyish, reverse brown to dark brown. On OA, colonies reaching 39 mm diam., brown at the centre and with white margin, with sparse aerial mycelium.

Other materials examined: **Brazil**, Bahia state, Paulo Afonso municipality, Raso da Catarina Ecological Station (09°39'03.6" S, 38°31'48.2" W), isolated as an endophyte from a branch of *Mimosa tenuiflora*, March 2019, A.V. Silva (URM 8385 [isolate 10DA]). **Brazil**, Bahia state, Paulo Afonso municipality, Raso da Catarina ecological station (09°39'03.6" S, 38°31'48.2" W), isolated as endophytes from branches of *Mimosa tenuiflora*, March 2019, A.V. Silva (isolates obtained from five individuals [named as B, D, F, J, and L] of *M. tenuiflora* and preserved in the working collection of the Laboratório de Micologia Ambiental, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil: 7B; 6D, 6DA, 13D, 13DA, 14D, 15D, 15DAA, 16DA, 16DB, 17DA, 18DAA, 18DA, 24DA, 25D, and 28DA; 25F, 26F, 32F, and 32FA; 1J, 4J, 12J, 16J, 18J, and 21J; 4L, 5L, and 5LA).

A presumably new *Leptosillia* species

Leptosillia sp. Fig. 3N.

Culture characteristics: Colony on PDA reaching 35 mm diam. after two weeks, floccose, white to greyish, reverse having white margin and brown to dark brown colour at the centre. On MEA, growing fast up to 53 mm diam. after two weeks, floccose, white to

yellowish. On OA, colonies growing fast up to 70 mm diam. after two weeks, velvety, white to greyish. Reproductive structures not observed.

Material examined: **Brazil**, Bahia state, Paulo Afonso municipality, Raso da Catarina Ecological Station (09°39'03.6" S, 38°31'48.2" W), isolated as an endophyte from a branch of *Mimosa tenuiflora*, March 2019, A.V. Silva (Micoteca URM 8384 = FCCUFG = 08 [isolate 19F]).

Discussion

The genus *Leptosillia* is reported as endophyte and saprobe and commonly found as a pathogen on leaves and branches (Vitale et al. 2018, Voglmayr et al. 2019, Senanayake et al. 2020). Species in this genus have mainly been reported from Europe, Asia, Africa and North America (Crous et al. 2019; Voglmayr et al. 2019; Senanayake et al. 2020). We report in this study the first occurrence of *Leptosillia* in Brazil, isolated as an endophyte from healthy branches of *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae), which we describe as the novel species *L. mimosae*. Multi-marker phylogenetic analyses using sequences of *Leptosillia*, including the morphological features of our isolates, confirmed that *L. mimosae* is a new species, even when compared to *L. pistaciae*, which is the phylogenetically closest species. Another yet unnamed endophytic fungus from *Mimosa tenuiflora* was placed as a unique lineage related to *L. pistaciae* and could be further described as a new species, but to confirm that more isolates and morphological analysis are needed.

Leptosillia pistaciae was originally described in the genus *Liberomyces* for a fungus causing pistachio cankers and decline in crop areas in Italy (Vitale et al. 2018) and later it was transferred to *Leptosillia* (Voglmayr et al. 2019). Vitale et al. (2018) obtained isolates of *L. pistaciae* from the margins of twig, branch and stem cankers of declining plants, and pathogenicity test on plants of *Pistacia vera* L. grafted on *P. terebinthus* L. (Anacardiaceae)

confirmed *L. pistaciae* as the causal agent producing similar symptoms as observed in nature. The novel species described here, *L. mimosae*, was isolated as an endophyte from healthy branches of *M. tenuiflora* (Fabaceae) in a tropical dry forest in Brazil, highlighting the different life styles that related *Leptosillia* species can have in association with plant species in different environments.

Based on the multi-marker phylogenetic analyses, *L. mimosae* seems related to *L. pistaciae* but placed in a well-supported clade (Figs. 1 and 2). The new species differs morphologically from *L. pistaciae* which is mainly characterized by a slow colony growth, production of pigment diffusing in the growth medium, and by the formation of densely aggregated pycnidia on the inoculum plug and colony surface (Vitale et al. 2018). The micromorphological features also have important differences, in *L. pistaciae* the conidiogenesis is described as holoblastic and the conidiogenous cells are arranged in dense intercalary or terminal whorls having a sympodial proliferation (Vitale et al. 2018), while in *L. mimosae* the conidiogenesis is enteroblastic-phialidic. In *L. pistaciae*, pycnidia (100–)170–260(–330) μm diam., conidiogenous cells [(5.5–)6.5–8.5(–10.0) $\times$ 1.7–2.5(–2.7) μm], and conidia [(3.2–)3.8–4.5(–5.0) $\times$ (1.0–)1.2–1.5(–2.0) μm] are also larger than in *L. mimosae* [pycnidia = 60–115 $\times$ 54–104 μm ; conidiogenous cells = (3.5–)4–5.5(–6.5) $\times$ 1.5–2.5 μm ; conidia = (2.5–)3–3.5(–4.5) $\times$ (1–)1.5(–2) μm]. The macro- and micro-morphological features along with phylogenetic inferences were important parameters to describe this novel endophytic *Leptosillia* species.

Another endophytic fungus (URM 8384) was also placed as a unique lineage phylogenetically related to *L. pistaciae*, but we were not able to stimulate the production of reproductive structures. Voglmayr et al. (2019) noted the absence of reproductive structures after sub-culturing *Leptosillia* isolates; on the other hand, Vitale et al. (2018) described *L. pistaciae* producing aggregated pycnidia when growing on culture media. In our study,

several attempts were done trying to stimulate the endophytic fungi sporulation, and after several weeks we observed the formation of structures in some of the isolates, while for the strain URM 8384 this was not observed. Some studies of endophytes also demonstrated the limited or lacking capacity of endophytic isolates to produce reproductive structures in culture (Bezerra et al. 2013; Guo et al. 2000; Knapp et al. 2015).

This study showed that *Leptosillia* isolates/species can be found in tropical dry forests, like the Caatinga forest in Brazil, living as endophytes in branches of *M. tenuiflora*. These findings are important for the knowledge of Brazilian and global fungal diversity, and can also contribute to the understanding of the ecology and lifestyle of xylarialean fungi. The information achieved with this study is also important to show the importance of conservation units for the protection of natural areas and biodiversity in Brazil.

Acknowledgements

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Finance code 001), the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE APQ 0492-2.03/17), and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support (Proc. Universal 420.129/2018-9; Proc. INCT 465.420/2014-1). A.V. Silva has a scholarship from CAPES and L.C. Maia has a fellowship from CNPq (Proc. PQ 306.880/2020-2). We also thank Dr. Alexandre Machado, Dr. Laura Paiva and other colleagues of the Laboratório de Micologia Ambiental/UFPE for their technical support.

References

- Almeida, D.A.C., Gusmão, L.F.P. & Miller, A.N. (2016): Taxonomy and molecular phylogeny of Diatrypaceae (Ascomycota, Xylariales) species from the Brazilian semi-arid region, including four new species. – Mycol. Progress 15: 53, 27 pp.
- Bezerra, J.D.P., Santos, M.G.S., Svedese, V.M., Lima, D.M.M., Fernandes, M. et al. (2012): Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. – World. J. Microbiol. Biotechnol. 28: 1989–1995.
- Bezerra, J.D.P., Santos, M.G.S., Barbosa, R.N., Svedese, V.M., Lima, D.M.M. et al. (2013): Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. Symbiosis 60: 53–63.
- Bezerra, J.D.P., Nascimento, C.C.F., Barbosa, R.N., Silva, D.C.V., Svedese, V.M. et al. (2015): Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: diversity and biotechnological potential. – Braz. J. Microbiol. 46: 49–57.
- Bezerra, J.D.P., Azevedo, J.L. & Souza-Motta, C.M. (2017a): Why study endophytic fungal community associated with cacti species? – In: Azevedo, J.L. & Quecine, M.C. (eds.): Diversity and benefits of microorganisms from the tropics; p. 21–35. Springer, New York.
- Bezerra J.D.P., Sandoval-Denis M., Paiva L.M., Silva, G.A., Groenewald, J.Z. et al. (2017b): New endophytic *Toxicocladosporium* species from cacti in Brazil, and description of *Neocladosporium* gen. nov. – IMA. Fungus 8(1): 77–97.
- Bezerra, J.D.P., Oliveira, R.J.V., Paiva, L.M., Silva, G.A. & Groenewald, J.Z. (2017c): Bezerromycetales and Wiesneriomycetales ord. nov. (class Dothideomycetes), with two novel genera to accommodate endophytic fungi from Brazilian cactus. – Mycol. Progress 16: 297–309.

- Bezerra J.D.P., Machado A.R., Firmino A.L. et al. (2018): Mycological Diversity Description I. – *Acta. Bot. Bras.* 32(4): 656–666.
- Bezerra J.D.P., da Silva L.F. & Souza-Motta C.M. (2019a): The explosion of Brazilian endophytic fungal diversity: taxonomy and biotechnological potentials. – In: Satyanarayana T., Deshmukh S., Deshpande M. (eds.): *Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology*; p. 405–433. Springer, Singapore.
- Bezerra, J.D.P., Pádua, A.P.S.L., Oliveira, T.G.L., Paiva, L.M., Guarnaccia, V. et al. (2019b): *Pseudoplagiostoma myracrodruonis* (Pseudoplagiostomataceae, Diaporthales): a new endophytic species from Brazil. – *Mycol. Progress* 18: 1329–1339.
- Carbone, M.I. & Kohn L.M. (1999): A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. – *Mycologia* 91: 553–556.
- Chen, J., Zhang, L-C., Xing, Y-M., Wang, Y-Q., Xing, X-K., Zhang, D-W. et al. (2013): Diversity and taxonomy of endophytic xylariaceous fungi from medicinal plants of *Dendrobium* (Orchidaceae). – *PLoS One* 8(3): e58268.
- Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Wingfield, M.J., Roets, F. & Swart, W.J. (2019): *Leptosillia mayteni* Crous, sp. nov. – *Fungal Planet description sheets* 978: 294–295.
- Davis, E.C., Franklin, J.B., Shaw, A.J. & Vilgalys, R. (2003): Endophytic *Xylaria* (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms: phylogenetics, distribution, and symbiosis. – *Am. J. Bot.* 90(11): 1661–1667.
- Drechsler-Santos, E.R., Santos, P.J.P. & Gibertoni, T.B. (2010): Ecological aspects of Hymenochaetaceae in an area of Caatinga (semi-arid) in Northeast Brazil. – *Fungal Divers.* 42: 71–78.
- Freire, K.T.L.S., Araujo-Magalhaes, G.R., Nascimento, S.S., Paiva, L.M., Barbosa, R.N. et al. (2020): First report of *Penicillium brasilianum* Bat., *P. cluniae* Quintan., and *P.*

- echinulonalgiovense* S. Abe ex Houbraken & R.N. Barbosa as endophytes from a bromeliad in the Caatinga dry forest in Brazil. – Check List 16: 1055–1061.
- Glass, N.L. & Donaldson, G.C. (1995): Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. – Appl. Environ. Microbiol. 61: 1323–1330.
- Guo, L.D., Hyde, K.D. & Liew, E.C.Y. (2000): Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. – New. Phytol. 147: 617–630
- Höhnelt, F. von. (1928): Über *Septoria notha* Sacc. – Mitteilungen aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule in Wien 5: 108–112.
- Katoh, K. & Standley, D.M. (2013): MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. – Mol. Biol. Evol. 30: 772–780.
- Knapp, D.G., Kovács, G.M., Zajta, E., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. (2015): Dark septate endophytic pleosporalean genera from semiarid areas. – Persoonia. 35: 87–100.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. – Mol. Biol. Evol. 33(7): 1870–1874.
- Liu, Y.J., Whelen, S. & Hall, B.D. (1999): Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. – Mol. Biol. Evol. 16: 1799–1808.
- Marinho, F., Oehl, F., Silva, I.R., Coyne, D., Veras, J.S.N. et al. (2019): High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural and anthropized sites of a Brazilian tropical dry forest (Caatinga). – Fungal. Ecol. 40: 82–91.
- Miller, M.A., Pfeiffer W. & Schwartz, T. (2010): Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. – In: Gateway Computing Environments Workshop (GCE); p. 1–8.

- Nylander, J.A.A. (2004): MrModeltest Version 2. Program Distributed by the Author. – Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Okane, I., Srikitikulchai, P., Toyama, K., Laessoe, T., Sivichai, S. et al. (2008): Study of endophytic Xylariaceae in Thailand: diversity and taxonomy inferred from rDNA sequence analyses with saprobes forming fruit bodies in the field. – *Mycoscience*. 49: 359–372.
- Oliveira, T.G.L., Bezerra, J.D.P., Silva, I.R., Souza-Motta, C.M. & Magalhães, O.M.C. (2020): Diversity of endophytic fungi in the leaflets and branches of *Poincianella pyramidalis*, an endemic species of Brazilian tropical dry forest. – *Acta. Bot. Bras.* 34: 755–764.
- Pádua A.P.S.L., Freire K.T.L.S., Oliveira T.G.L., Silva L.F., Araújo-Magalhães G.R. et al. (2019): 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. Bot. Bras.* 33:39–49.
- Queiroz, L.P., Cardoso, D., Fernandes, M.F. & Moro, M.F. (2017): Diversity and evolution of flowering plants of the Caatinga domain. – In: Silva, J.M.C., Leal, I.R. & Tabarelli, M. (eds): *Caatinga*; p. 23–63. Springer, Cham.
- Rajulu, M.B.G., Thirunavukkarasu, N., Babu, A.G., Aggarwal, A., Suryanarayanan, T.S. et al. (2013): Endophytic Xylariaceae from the forests of Western Ghats, southern India: distribution and biological activities. – *Mycology* 4(1): 29–37.
- Rayner, R.W. (1970): *A mycological colour chart*. – CMI and British Mycological Society, Kew.
- Rehner, S.A. & Buckley, E. (2005): A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. – *Mycologia* 97: 84–98.

- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A. et al. (2012): MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. – *Syst. Biol.* 61: 539–542.
- Santiago, A.L.C.M.A., Santos, P.J.P. & Maia, L.C. (2013): Mucorales from the semiarid of Pernambuco, Brazil. – *Braz. J. Microbiol.* 44(1): 299–305.
- Senanayake, I.C., Jeewon, R., Hyde, K.D., Bhat, J.D. & Cheewangkoon, R. (2020): Taxonomy and phylogeny of *Leptosillia cordylinea* sp. nov. from China. – *Phytotaxa* 435(3): 213–226.
- Silva, J.M.C., Leal, I.R. & Tabarelli, M. (2017): Caatinga: The Largest Tropical Dry Forest Region in South America. – Springer, Cham.
- Silva, L.F., Freire, K.T.L.S., Araújo-Magalhães, G.R. et al. (2018): *Penicillium* and *Talaromyces* endophytes from *Tillandsia catimbauensis*, a bromeliad endemic in the Brazilian tropical dry forest, and their potential for L-asparaginase production. – *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 34: 162.
- Stamatakis, A., Hoover, P. & Rougemont J. (2008): A rapid bootstrap algorithm for RAxML web-servers. – *Syst. Biol.* 57: 758–771.
- Sung, G.H., Sung, J.M., Hywel-Jones, N.L. et al. (2007): A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. – *Mol. Phylogenet. Evol.* 44: 1204–1223.
- Thomas, D.C., Vandegrift, R., Ludden, A., Carroll, G.C. & Roy, B.A. (2016): Spatial ecology of the fungal genus *Xylaria* in a tropical cloud forest. – *Biotropica* 48: 381–393.
- U'Ren, J.M., Miadlikowska, J., Zimmerman, N.B., Lutzoni, F., Stajich, J.E. et al. (2016): Contributions of North American endophytes to the phylogeny, ecology, and taxonomy of Xylariaceae (Sordariomycetes, Ascomycota). – *Mol. Phylogenet. Evol.* 98: 210–232.

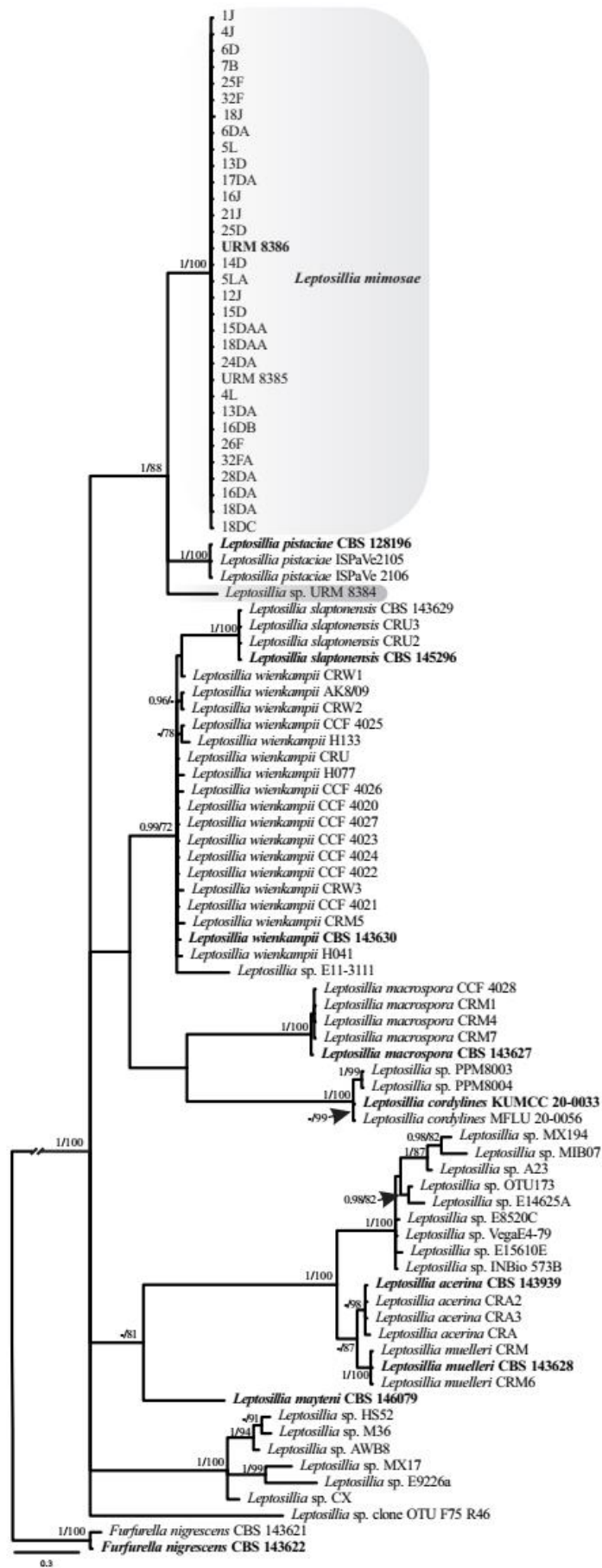
- Vilgalys, R. & Hester, M. (1990): Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. – J. Bacteriol. 172(8): 4239–4246.
- Vilgalys, R. & Sun, B.L. (1994): Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91(10): 4599–4603.
- Vitale, S., Aiello, D., Guarnaccia, V., Luongo, L., Galli, M. et al. (2018): *Liberomyces pistaciae* sp. nov., the causal agent of pistachio cankers and decline in Italy. – MycoKeys 40: 29–51.
- Vitoria, N.S., Fortes, N.G.S. & Santos, M.A.L. (2020): Mycota (Ascomycota) of *Syagrus coronata* (Mart.) Becc., Raso da Catarina Ecological Station, Brazil: new records. – Acta Brasiliensis 4(2): 110–120.
- Voglmayr, H., Aguirre-Hudson, M.B., Wagner, H.G., Tello, S. & Jaklitsch, W.M. (2019): Lichens or endophytes? The enigmatic genus *Leptosillia* in the Leptosilliaceae fam. nov. (Xylariales), and *Furfurella* gen. nov. (Delonicicolaceae). – Persoonia 42: 228–260.
- Voglmayr, H. & Mehrabi, M. (2018): Molecular phylogeny and a new Iranian species of *Caudospora* (Sydowiellaceae, Diaporthales). – Sydowia. 70: 67–80.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, L. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. – In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds): PCR protocols. A guide to methods and applications; p. 315–322. Academic Press, San Diego.

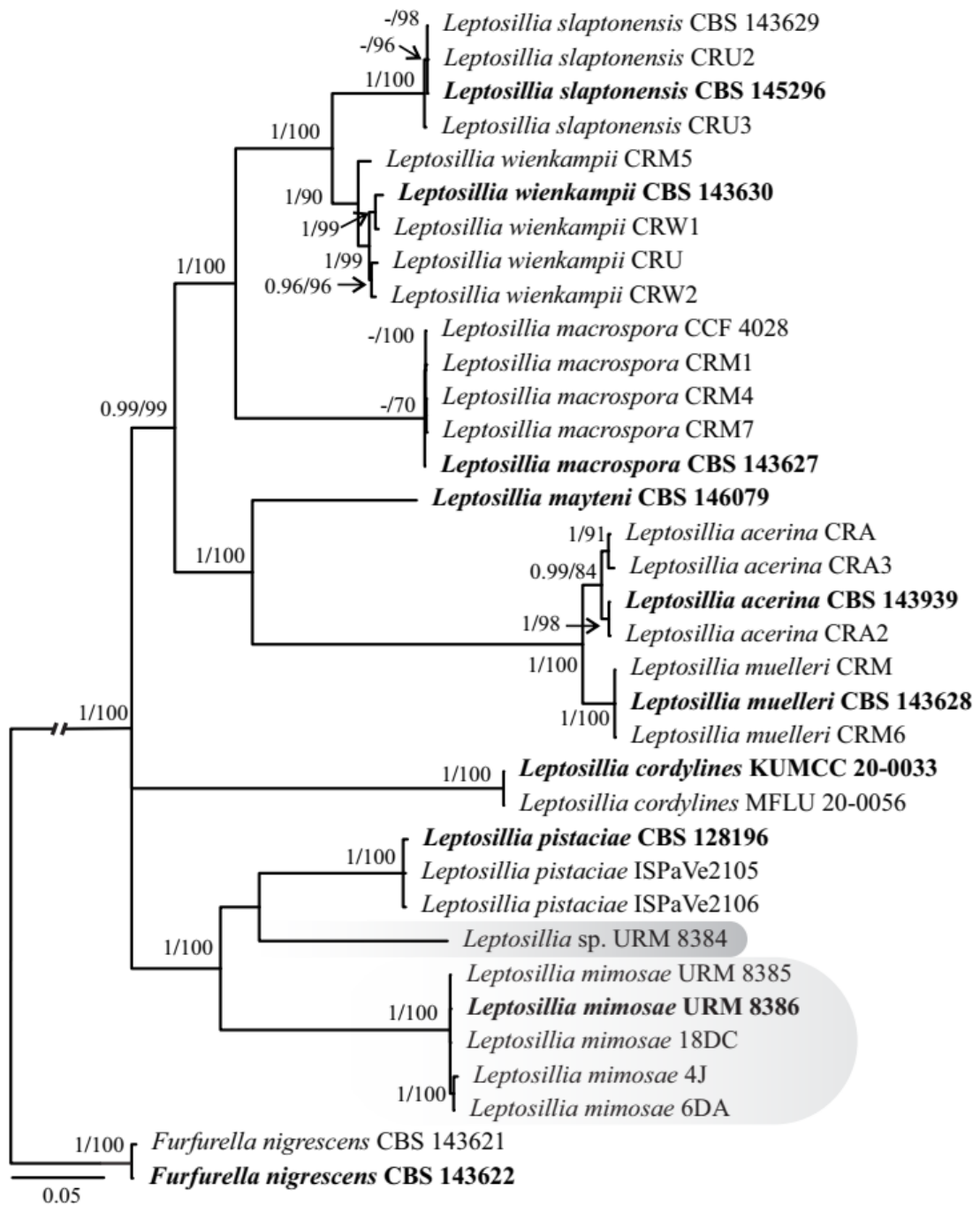
Figures legends

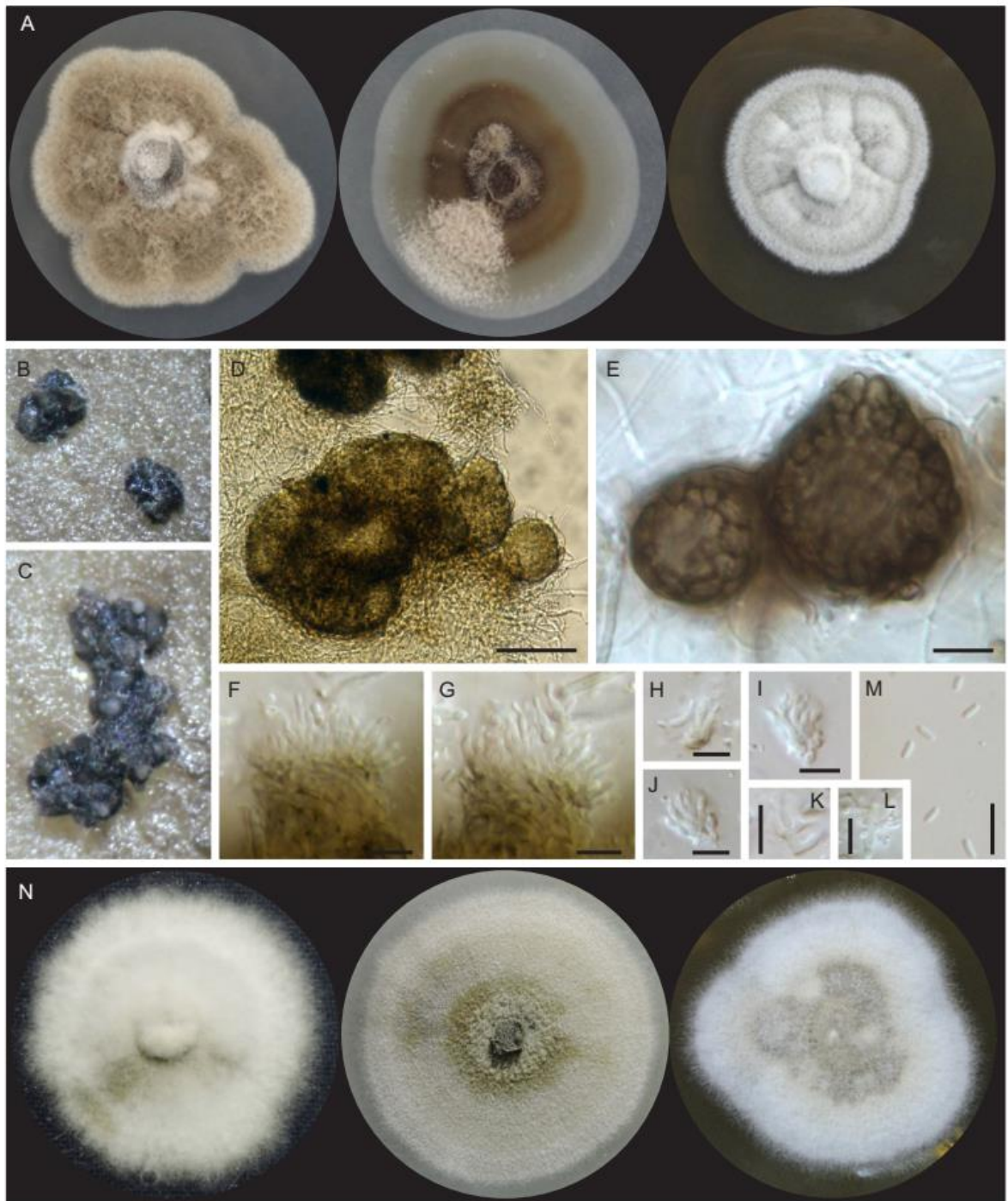
Fig. 1. Phylogram generated from Bayesian inference analysis based on ITS rDNA sequences. Sequences from type species are in bold. Bayesian posterior probabilities and maximum likelihood bootstrap values above 0.95 and 70%, respectively, are shown near nodes. The tree was rooted with *Furfurella nigrescens* (CBS 143621 and CBS 143622). The bar represents number of substitutions per site.

Fig. 2. Phylogram generated from Bayesian inference analysis based on combined ITS and LSU rDNA, *RPB2*, *TEF1* and *TUB2* sequences. Sequences from type species are in bold. Bayesian posterior probabilities and maximum likelihood bootstrap values above 0.95 and 70%, respectively, are shown near nodes. The tree was rooted to *Furfurella nigrescens* (CBS 143621 and CBS 143622). The bar represents the number of substitutions per site.

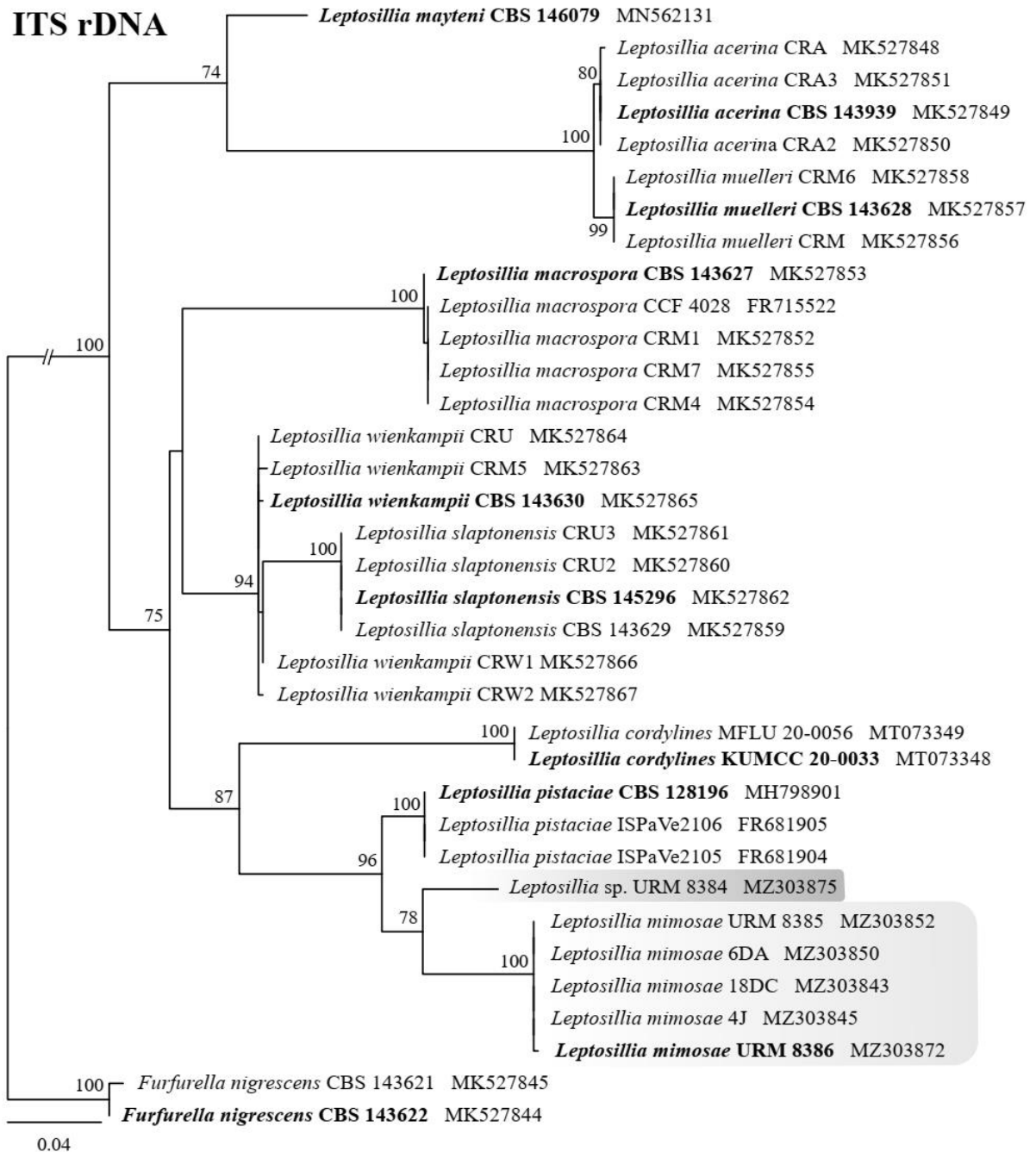
Fig. 3. *Leptosillia mimosae* URM 8386, ex-type. A. Colonies on PDA, OA, and MEA after 2 weeks at 28 °C. B–C. Pycnidia on PDA surface. D–E. Pycnidial mounts. F–L. Conidiogenous cells and conidia. M. Conidia. *Leptosillia* sp. URM 8384. N. Colonies on PDA, OA, and MEA after 2 weeks at 28 °C. Scale bars: D–E = 100 µm and F–M = 10 µm.

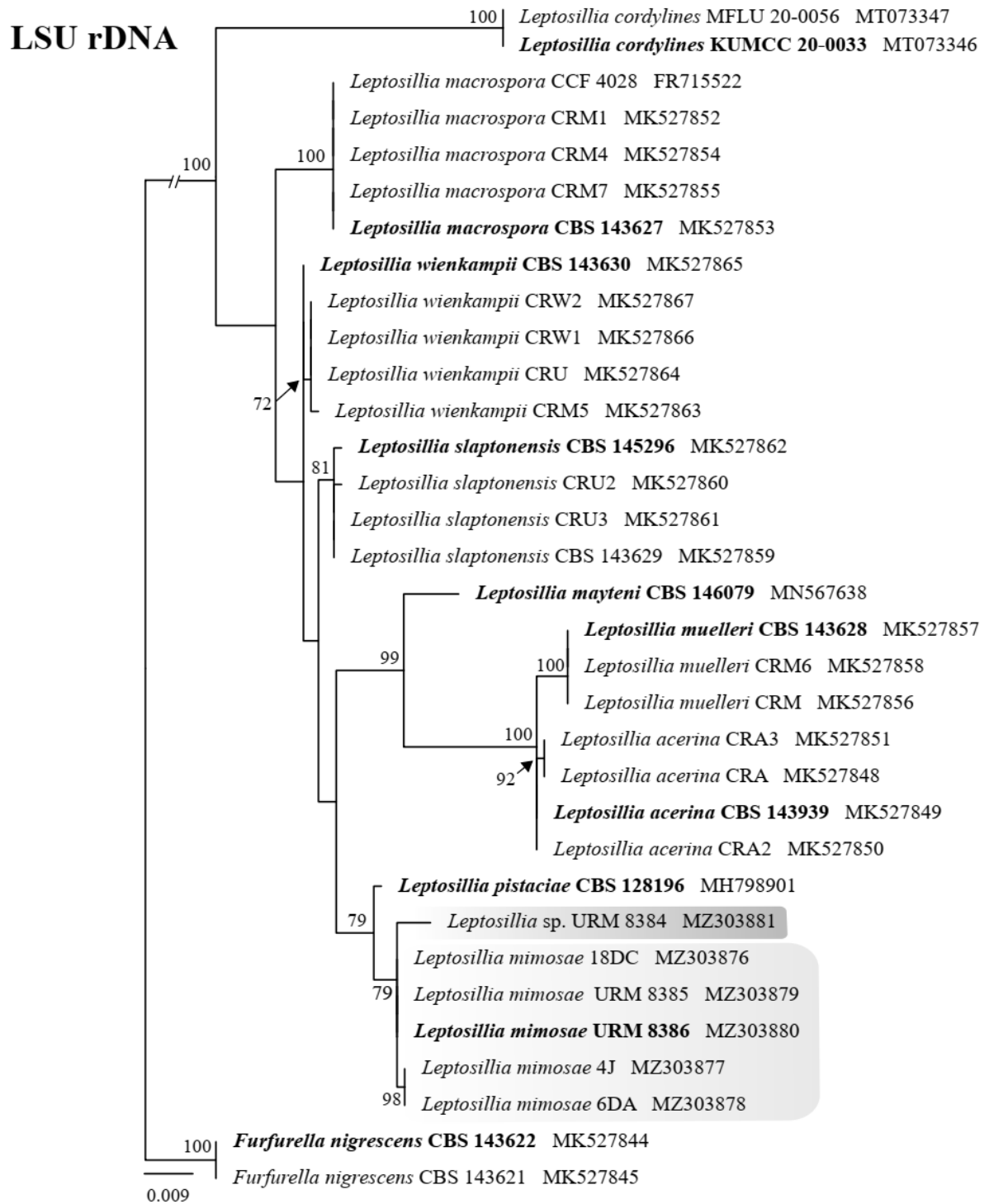


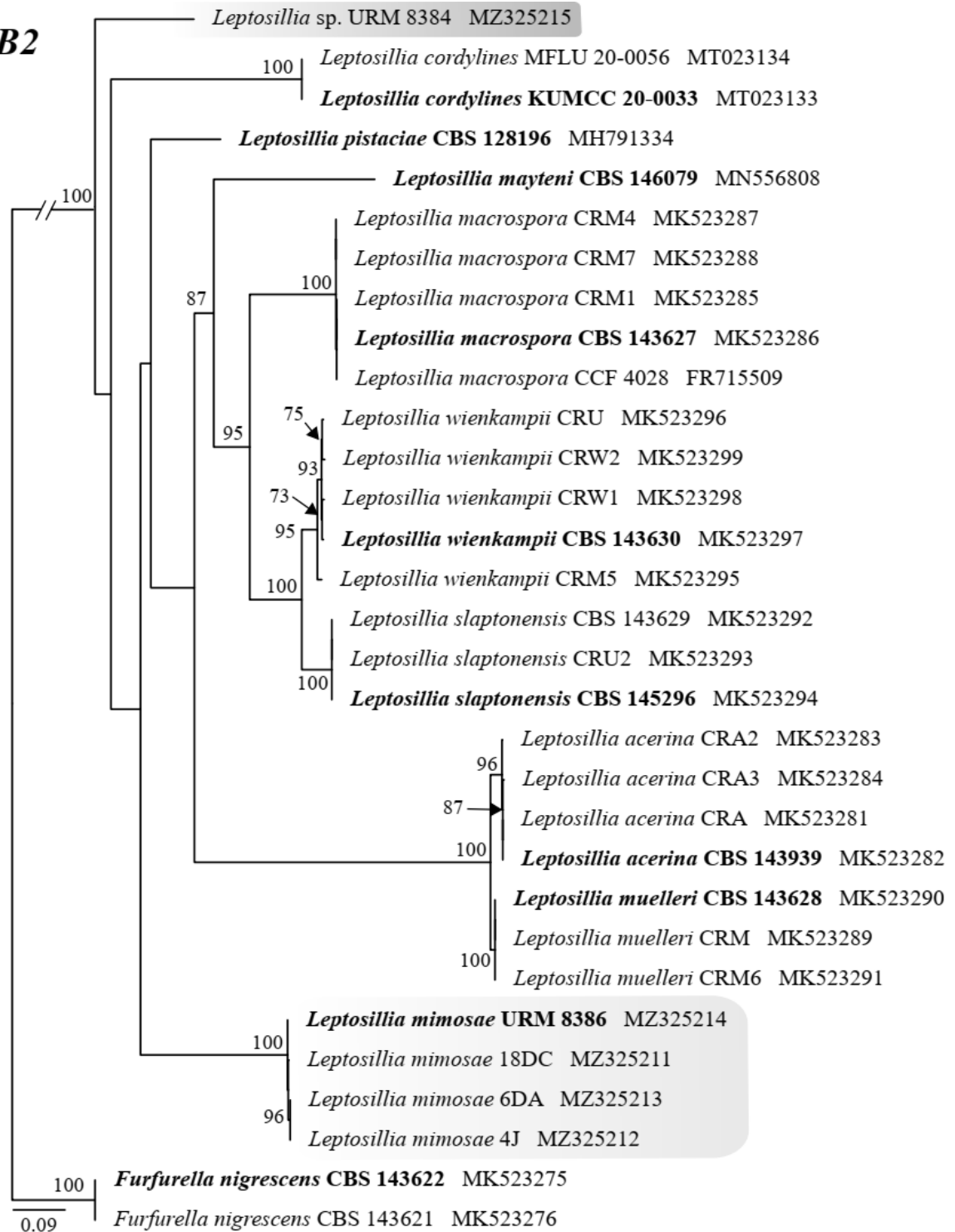




Supplementary Figure 1 ITS-LSU-RPB2-TEF-TUB trees - Silva et al.





RPB2

TEF1