

ELIO GOMES FERNANDES

**FUNGOS ENDOFÍTICOS EM SOJA (*Glycine max*): DIVERSIDADE,
BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS E ANÁLISE DE METABÓLITOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F363f
2015
Fernandes, Elio Gomes, 1981-
Fungos endofíticos em soja (*Glycine max*) : diversidade,
biocontrole de fitopatógenos e análise de metabólitos / Elio
Gomes Fernandes. – Viçosa, MG, 2015.
xvi, 128f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Marisa Vieira de Queiroz.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Fungos endofíticos. 2. Micro-organismos fitopatogênicos
- Controle. 3. Biodiversidade. 4. Metabólitos. 5. Soja.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 634.2

ELIO GOMES FERNANDES

**FUNGOS ENDOFÍTICOS EM SOJA (*Glycine max*): DIVERSIDADE,
BIOCONTROLE DE FITOPATÓGENOS E ANÁLISE DE METABÓLITOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 25 de maio de 2015.


Hilário Cuquetto Mantovani


Humberto Josué de Oliveira Ramos


Patrícia Gomes Cardoso


Robert Weingert Barreto


Denise Mara Soares Bazzolli
(Presidente da banca)

Aos meus pais, Elio e Maria Aparecida

Dedico!

Existe poesia no mundo real; a
ciência é a poesia da realidade.

Richard Dawkins

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade oferecida, tanto no Brasil quanto no exterior, pelo apoio financeiro.

À Marisa Vieira de Queiroz, minha orientadora, pela dedicação, ensinamentos, confiança e paciência na realização deste trabalho, e por permitir que eu me aventurasse pelas diversas áreas da microbiologia, as quais compõem esta tese.

Ao meu coorientador Olinto Liparini Pereira pelos ensinamentos sobre taxonomia de fungos filamentosos.

Ao meu coorientador Silas Granato Villas-Bôas pela oportunidade de estudar e pesquisar em seu laboratório na Nova Zelândia e pelos valiosos ensinamentos.

À professora Cynthia Cânedo da Silva pelos ensinamentos sobre filogenia e DGGE.

Ao pesquisador Humberto Josué de Oliveira Ramos, pela ajuda nas análises sobre metabólitos de fungos filamentosos.

À Nívea Moreira Vieira, do Núcleo de Biomoléculas da UFV, que sempre me ajudou prontamente nas instalações do Núcleo de Biomoléculas da UFV.

Aos colegas pesquisadores Cláudia Braga Pereira Bento e Júlio Cesar Delvaux pela ajuda com o desenvolvimento da técnica do DGGE e as análises de resultados.

Aos colegas do laboratório de Genética de Micro-organismos da UFV e funcionários do Bioagro pelo companheirismo e ajuda nas mais diversas situações.

Aos amigos da Caixa Alta: Rafael, Flávio, Vinícius, Felipe David, Tiago, Renato Vilas-Boas, Renato e Felipe Couto, José Júnior, Luíz Felipe, Gustavo e Paulo.

Aos amigos de Viçosa e que levarei para a vida inteira: Afonso Campos, Bruno Brasileiro, Carla Camargos, Diego Bernardes, Nelson Marques e Milton Lopes.

As pessoas especiais que conheci do outro lado do mundo: Douglas Teixeira, Hans Gottardo, Helaine Valcacio, Lara Rupf e Luíza Gava.

A todos familiares e amigos, meus alicerces, que de alguma forma contribuíram para mais essa conquista.

BIOGRAFIA

Elio Gomes Fernandes, filho de Maria Aparecida Solero Gomes Fernandes e Elio de Oliveira Fernandes, nasceu no dia 10/02/1981 na cidade de Úba, Estado de Minas Gerais.

Em março de 2004 ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Montes Claros, graduando-se bacharel, em dezembro de 2007.

Em março de 2008 ingressou no programa de Microbiologia Agrícola e do Ambiente na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, defendendo a dissertação em fevereiro de 2010.

Em março de 2011 ingressou no Programa de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, onde fez parte do doutoramento, entre outubro de 2013 a setembro de 2014, na The Univesity of Auckland – Nova Zelândia, submetendo-se a defesa em maio de 2015.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	VIII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
INTRODUÇÃO GERAL	01
REVISÃO DE LITERATURA	03
Glycine max e fungos endofíticos.....	03
Fungos endofíticos.....	06
Produção de compostos bioativos por fungos endofíticos	14
Referências Bibliográficas.....	16
Capítulo 1 - Diversity of endophytic fungi in Glycine max	26
Abstract.....	26
Introduction	27
Materials and methods.....	29
Results	35
Discussion.....	40
Conclusion.....	48
References	49
Supplementary material 1.....	59
Capítulo 2 - avaliação da atividade inibitória do crescimento de fungos endofíticos de Glycine max contra fungos fitopatogênicos e análise do extrato metabólico de Guignardia mangiferae	65
Resumo	65
Introdução.....	66
Materiais e métodos.....	69

Resultados.....	74
Discussão.....	82
Conclusões.....	87
Referências Bibliográficas.....	88
Capítulo 3 - Comparação metabolômica de isolados do fungo endofítico <i>Guignardia mangiferae</i> coletados em diferentes hospedeiros e regiões geográficas	94
Resumo	94
Introdução.....	95
Materiais e Métodos	97
Resultados.....	102
Discussão.....	116
Conclusões.....	121
Referências Bibliográficas.....	122
CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

‰: Porcentagem

®: Marca registrada

µL: Microlitro

µm: Micrômetro

3D: Terceira dimensão

ACN: Acetonitrila

AMDIS: The automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System

B.O.D: Câmara incubadora

BDA/ PDA: Batata dextrose ágar

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BlastN: Nucleotide BLAST

Bp: Base pair

BSA: Bovine serum albumin

C18: Coluna de Octadecil Silano

CC: Cromatografia em coluna

CCD: Cromatografia em camada delgada

CDC: Centers for disease control and prevention

CFU: Colony forming unit

cm: Centímetro

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Deoxyribonucleic acid

dNTP: Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EtOAc: Acetato de etila

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid

EI: Electron ionization

EUA: Estados Unidos da América

eV: Eletron volt

g/L: Grama por litro

g: Giro

g: Grama

GABA: Ácido gama-aminobutírico

GC-MS: Gas chromatography-mass spectrometry

GenBank: Banco genético

h: Hora

H': Índice de Shannon

HPLC: High-performance liquid chromatography

ICMP: International Collection of Micro-organisms from Plants

ITS: Internal transcribed spacer

Kv: Quilovolt

LC-MS: Liquid chromatography–mass spectrometry

m/z: Relação massa/íon

m: Metro

M: Molar

mAU: Milli Absorbance Unit

MCF: Cloroformato de metila

MEOH: Metanol

mg/μL: Miligrama/microlitro

mg/L: Miligrama/litro

mg/mL: Miligrama/mililitro

mg: Miligrama

MgCl₂: Cloreto de magnésio

MgSO₄: Sulfato de magnésio

Min: Minuto

min⁻¹: Por minuto

MS: Mass Spectrometer

NaCl: Cloreto de sódio

NaOCl: Hipoclorito de sódio

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ng: Nanograma

nm: Nanômetro

°C: Graus Celsius

OTU: Operational taxonomic units

p/v: Peso por volume

PCA: Principal Component Analysis

PCR: Polymerase chain reaction

PDA: Potato dextrose agar

pH: Potencial hidrogeniônico

pmol: Pico mol

r.p.m.: Rotações por minuto

rDNA: DNA ribossomal

S: Índice de riqueza

s: Segundos

S: Sul

sec: Segundo

sp: Abreviação para espécie não identificada

SSU: Small subunit ribosomal

TIC: Total ion current

U: Unidade

UFV: Universidade Federal de Viçosa

UHPLC-MS: Ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry

UPGMA: Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages

UV: Ultra violeta

V: Volts

w/v: Weight/Volume Percentage Concentration

W: Oeste

XIC: Extracted ion chromatogram

µg: Micrograma

µl: Microlitro

RESUMO

FERNANDES, Elio Gomes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2015. **Fungos endofíticos em soja (*Glycine max*): diversidade, biocontrole de fitopatógenos e análise de metabólitos.** Orientadora: Marisa Vieira de Queiroz. Coorientadores: Silas Granato Villas-Boas e Olinto Liparini Pereira.

Os fungos endofíticos são micro-organismos que vivem no interior das plantas, colonizando os espaços intercelulares de todos os órgãos e tecidos, sem causar aparentemente qualquer dano ao hospedeiro. Alguns fungos endofíticos apresentam atividade antagonista a fitopatógenos, por meio da competição por nutrientes e espaço ou pela produção de antimicrobianos. Além de poderem exercer diversas funções importantes em benefício do hospedeiro, os fungos endofíticos são potencialmente úteis na agricultura e indústria como fonte de substâncias de interesse econômico, como enzimas, substâncias antimicrobianas entre outros compostos bioativos relacionados com o metabolismo fúngico. Estudos vêm demonstrando que a planta *Glycine max* representa um reservatório para espécies fúngicas endofíticas, incluindo decompositoras, produtoras de compostos bioativos, biocontroladoras de patógenos e espécies fitopatogênicas. O presente trabalho teve como objetivos: (I) isolar fungos endofíticos de folhas e raízes de *G. max*, identificá-los por meio do ITS-PCR, que correspondente ao sequenciamento dos espaçadores de transcrito interno (ITS) e por taxonomia morfológica; (II) estudar a diversidade dos fungos isolados em meio de cultura e por meio de eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE); (III) avaliar a atividade de fungos biocontroladores isolados de *G. max* contra fitopatógenos selecionados (*Phomopsis* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporium*, *Fusarium solani* e *Colletotrichum truncatum*); (IV) extrair os metabólitos de um fungo endofítico selecionado no teste de biocontrole de fitopatógenos (*Guignardia mangiferae*) e analisar os compostos antimicrobianos por meio de fracionamento em coluna de sílica gel; (V) avaliar as diferenças existentes entre isolados do fungo endofítico *G. mangiferae* coletados de dois diferentes hospedeiros (*G. max* e *Vaccinium virgatum*) e regiões geográficas (Brasil e Nova Zelândia) em relação ao perfil metabólico e metaboloma. O trabalho foi iniciado com o isolamento de fungos endofíticos de *G. max*, que foram caracterizados com base em características morfológicas e moleculares (regiões ribossômicas ITS1, 5.8 e ITS2). Foram isolados 229 fungos de *G. max*, sendo 187 isolados nas folhas e 42 nas raízes. Fungos como *Ampelomyces* sp., *Cladosporium* cladosporioides, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diaporthe helianthi*, *G. mangiferae*,

Phoma sp. foram isolados mais frequentemente das folhas, enquanto que nas raízes houve predominância dos fungos *F. oxysporum*, *F. solani* e *Fusarium* sp. Na análise dos fungos isolados, os índices de riqueza correspondentes ao índice de Simpson, Shannon e equitabilidade apresentaram os maiores valores para as folhas em relação às raízes, enquanto o índice de dominância foi maior nas raízes. Entretanto, a avaliação por meio do perfil de bandas gerados por meio da técnica PCR-DGGE, indicou que a riqueza era maior nas raízes do que nas folhas. Por meio dos testes de cultura pareada entre os fungos endofíticos isolados de *G. max* e fungos fitopatogênicos, foi observado que 38, 20% dos isolados inibiram o crescimento de um ou mais fitopatogênicos, sendo um isolado da espécie *G. mangiferae* capaz de inibir o crescimento de *S. sclerotiorum* e *Phomopsis* sp. O fungo *G. mangiferae* foi então selecionado para a análise de seus metabólitos e após a extração metabólica, a atividade antifúngica de *G. mangiferae* foi perdida. Entretanto foi constatada atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Lactococcus lactis*. Essa fração contendo atividade antibacteriana foi analisada por LC-MS e não foram detectadas massas moleculares específicas para compostos antibacterianos já descritos e isolados de *G. mangiferae* (ácido guignárdico e guignardone I). Na análise de perfil metabólico e metaboloma por meio de GC-MS e LC-MS entre os dois isolados de *G. mangiferae*, isolados de diferentes hospedeiros e regiões geográficas, variações metabólicas foram verificadas entre os dois isolados, tanto pela análise dos cromatogramas de íons quanto nos compostos detectados e por meio da análise dos componentes principais. Por meio do perfil metabólico e intensidade relativa de cada íon específico detectado entre os dois isolados da espécie *G. mangiferae*, foi possível verificar que o fungo F75 (*G. max*, Brasil) produziu em maior quantidade o hormônio vegetal GABA e 2,3-butanodiol (composto usado na produção de borracha sintética, solventes e drogas farmacêuticas), enquanto o isolado ICMP 15453 (*V. virgatum*, Nova Zelândia) apresentou uma maior produção para o antifúngico benzofurano. Além disso, foi detectado uma grande quantidade de ácido fumárico e málico em ambos os isolados. Esses resultados demonstram que existe uma grande diversidade na comunidade fúngica endofítica associada a *G. max* e que alguns dentre os fungos endofíticos são potencialmente promissores como controladores de fungos fitopatogênicos e produtores de compostos antimicrobianos, bioativos e de interesse industrial. Além disso, foi verificado que a mesma espécie isolada de hospedeiros e regiões diferentes apresenta variações em seus metabolismos.

ABSTRACT

FERNANDES, Elio Gomes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2015. **Endophytic fungi in soybean (*Glycine max*): diversity, biocontrol of phytopathogens and analysis of metabolites.** Adviser: Marisa Vieira de Queiroz. Co-advisers: Silas Granato Villas-Boas and Olinto Liparini Pereira.

The endophytic fungi are microorganisms that live inside the plants, colonizing the intercellular spaces of all organs and tissues, without apparently causing any damage to the host. Some endophytic fungi show activity as phytopathogens controller, through competition for nutrients and space or for the production of antibiotics. In addition fungi perform several important functions to the host, the endophytic fungi are potentially useful in agriculture and industry to become a viable alternative for obtaining substances of economic interest, such as enzymes, antibiotics, and other bioactive compounds related to the fungal metabolism. Studies have demonstrated that plant *Glycine max* is a reservoir for endophytic fungal species and between these species there are decomposers, producers of bioactive compounds, biocontrollers of pathogens and phytopathogenic species. This study aimed to (I) isolate endophytic fungi *G. max* leaves and roots, identify them by ITS-PCR, which corresponds to the internal transcribed spaces (ITS) and morphological taxonomy; (II) to study the diversity of fungi isolated in culture medium and by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); (III) to evaluate the activity of *G. max* isolated biocontrollers fungi against phytopathogens (*Phomopsis* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporium*, *Fusarium solani* and *Colletotrichum truncatum*); (IV) to extract metabolites of the endophytic fungus selected in biocontrol of phytopathogens test (*Guignardia mangiferae*) and to analyze the antimicrobial compounds by fractionation on silica gel column; (V) to evaluate the differences between isolates of endophytic fungus *G. mangiferae* collected from different hosts (*G. max* and *Vaccinium virgatum*) and geographical regions (Brazil and New Zealand) in relation to the metabolic profile and metabolome. The study was initiated with the isolation of endophytic fungi from *G. max*, which were characterized based on morphological and molecular characteristics (ribosomal regions ITS1, 5.8 and ITS2). 229 fungi were isolated from *G. max*, 187 being isolated in leaves and 42 in roots. Fungi as *Ampelomyces* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diaporthe helianthi*, *G.mangiferae* and *Phoma* sp. were more frequently isolated from the leaves while the roots predominated fungi like *F. oxysporum*, *F. solani* and *Fusarium* sp. In the analysis of fungi isolated,

the richness, Simpson, Shannon and equitability indices showed the highest values for the leaves in relation to the roots, while the dominance indices were higher in the roots. However, the evaluation through band profile generated by PCR-DGGE technique showed that the richness has been higher in roots than in leaves. Through the paired culture tests between endophytic fungi isolated from *G. max* and phytopathogenic fungi it was observed that 38.20% were able to inhibit the growth of phytopathogens, one isolated from the species *G. mangiferae* was able to inhibit the growth of *S. sclerotiorum* and *Phomopsis* sp. The fungus *G. mangiferae* was selected for the analysis of metabolites and after the metabolic extraction, the antifungal activity of *G. mangiferae* was lost. However it was detected antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Lactococcus lactis*. This fraction containing antibacterial activity was analyzed by LC-MS and specific compounds described and isolated from *G. mangiferae* (guignardic acid and guignardone I) have not been detected in antibacterial fraction. In the metabolic profile and metabolome analysis by GC-MS and LC-MS between the two isolates of *G. mangiferae* isolated from different hosts and geographic regions, metabolic changes were observed between the two isolated both through the ion chromatograms and the principal components analysis. Through the metabolic profile and relative intensity of each specific ions detected between two isolates species of the *G. mangiferae*, the fungus F75 (*G. max*, Brazil) produced the largest amount of plant hormone GABA and 2,3-butanediol (compound used in synthetic rubber production, solvents and pharmaceutical drugs) while ICMP 15453 (*V. virgatum*, New Zealand) isolate had a higher production for the antifungal benzofuran. In addition, has been detected a large production of fumaric and malic acid in both isolates. These results demonstrate that there is a great diversity in fungal community associated with *G. max* and that these endophytic fungi are potentially promising as biocontrollers of phytopathogens and producers of antimicrobial and bioactive compounds. In addition, we find that the same species isolated from different hosts and regions have variations in their metabolisms.

INTRODUÇÃO GERAL

Os fungos endofíticos são aqueles cultiváveis ou não, que tem parte ou todo o seu ciclo de vida associado à planta hospedeira, vivendo no interior da planta, interagindo com outros micro-organismos e seu hospedeiro. Eles não causam danos aparentes à planta hospedeira, colonizando todos os órgãos e tecidos. Já foi demonstrada a influência desses micro-organismos em diversas funções ecológicas relacionadas ao seu hospedeiro como na proteção contra herbivoria e fitopatógenos, produção de hormônios de crescimento vegetal e de compostos bioativos como antimicrobianos e ainda participam da decomposição da matéria orgânica vegetal morta. Aparentemente, todas as plantas possuem associações simbióticas com fungos endofíticos e eles podem ser hospedeiro-específico ou generalistas, e para isso, os fungos endofíticos desenvolveram modos de transmissão que garantem a continuidade de sua associação com os vegetais, sendo representados pela transmissão vertical e horizontal.

É estimado que o reino Fungi possua aproximadamente 1,5 milhões de espécies e parte desses fungos são endofíticos. A maioria das espécies já descritas como endofíticas são representantes do filo Ascomycota, havendo também espécies do filo Basidiomycota nesse nicho ecológico. Os fungos endofíticos possuem uma enorme diversidade de espécies, alguns podendo passar apenas uma parte do seu ciclo de vida como endofíticos enquanto outros possuem uma estreita relação co-evolucionária com seu hospedeiro. Outras espécies de fungos endofíticos podem ainda, por diversos motivos como estresse vegetal, alterações mutagênicas, entre outros, se tornarem fitopatogênicas. Entretanto, a maioria das espécies endofíticas possui uma relação mutualística benéfica com seus hospedeiros.

Os fungos endofíticos representam uma vasta e ainda pouco explorada fonte de moléculas bioativas. A diversidade de compostos produzidos por eles é proveniente da própria capacidade metabólica ou ainda otimizada evolutivamente pela diversidade de espécies vegetais hospedeiras. Muitas espécies fúngicas endofíticas são bons biocontroladores de outros micro-organismos, além de fontes de metabólitos com grande aplicabilidade para a indústria farmacêutica, a pecuária e a agricultura.

Dentre as diversas espécies vegetais hospedeiras de fungos endofíticos, a planta da soja (*Glycine max*) se destaca devido a sua enorme importância como fonte mundial de alimento. Ainda são escassos os trabalhos envolvendo a comunidade fúngica endofítica relacionada à planta da soja, bem como as possíveis aplicações biotecnológicas de produtos gerados por esses fungos e/ou a utilização destes como biocontroladores de fitopatógenos.

Desta maneira, os fungos endofíticos de *G. max* foram avaliados quanto a diversidade e ao seu potencial como biocontroladores de fitopatógenos da soja. Foi analisado também o extrato metabólico com atividade antibacteriana e compostos bioativos de *Guignardia mangiferae*, bem como diferenças de metabólitos existentes entre *G. mangiferae* isoladas de diferentes hospedeiros e regiões geográficas.

REVISÃO DE LITERATURA

Glycine max e fungos endofíticos

A planta da soja é uma leguminosa que foi domesticada há cerca de 5 mil anos pelos chineses. A forma primitiva, a soja selvagem, crescia nas terras baixas e úmidas na China Central. Por volta do ano de 1712, foi introduzida pelo botânico alemão Engelbert Kaempfer na Europa e depois em vários outros países do mundo (Liu, 1997; Kantolic et al., 2006). As primeiras referências sobre soja no Brasil datam de 1882, na Bahia, no entanto, as primeiras cultivares introduzidas dos Estados Unidos não tiveram boa adaptação. Em 1891, novas cultivares foram introduzidas em Campinas, São Paulo, apresentando melhor desenvolvimento. Nesse mesmo ano, houve a introdução no Rio Grande do Sul. Na década de 1920, a soja foi introduzida em Minas Gerais, em 1930 em Santa Catarina e na década de 1950 em Goiás. Nos demais estados da região Centro-Norte-Nordeste, a introdução ocorreu principalmente a partir da década de 1970 (Sedyama, 2009).

A soja é uma importante fonte alimentar por ser rica em nutrientes. Os grãos de soja contém teores elevados de proteínas, além de oligossacarídeos, fibras, fitoquímicos, mineirais e aproximadamente 18-22% de óleo (principalmente triglicerídeos). Todos esses nutrientes tornam a soja um dos alimentos mais importantes, tanto para alimentação humana quanto para a alimentação animal (Aparicio et al., 2008). A produção mundial de soja vem registrando recordes de produtividade a cada ano, liderada pelos Estados Unidos, Brasil e Argentina, que na safra de 2010/2011, produziram 81,5% da produção mundial (Hirakuri & Lazzarotto, 2011). Estima-se que a produtividade mundial na safra de 2014/2015 em 315,1 milhões de toneladas, sendo o Brasil responsável pela produção de 94,4 milhões de toneladas, ou seja, 29,9% de toda a produção mundial (USDA, 2015).

No mundo são relatadas mais de 100 doenças diferentes causadas por micro-organismos em soja e no Brasil já foram identificados em torno de 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus. Esse número tende a aumentar devido à expansão da soja para novas áreas de cultivo e também, como consequência da monocultura. As doenças mais comuns da soja são: oídio, mofo branco, podridão negra da raiz, ferrugem asiática, podridão de fitóftora, antracnose e mancha alvo (Almeida et al., 2005).

Os primeiros estudos envolvendo fungos endofíticos em *G. max* foram desenvolvidos nos Estados Unidos por Miller & Roy (1982a). Estes autores isolaram 33 espécies fúngicas do tecido foliar de *G. max*, correspondendo a *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia lunata*, *Epicoccum nigrum*, *Glomerella cingulata*, *Glomerella glycines*, *Nigrospora sphaerica*, *Penicillium* sp. *Aspergillus* sp., *Cephalosporiopsis* sp., *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina*, *Chaetomium globosum*, *Diaporthe phaseolorum*, *Epicoccum purpurascens*, *Geniculisporium* sp., *Helminthosporium* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Mucor* sp., *Mycosphaerella* sp., *Myrothecium roridum*, *Nodulisporium* spp., *Papularia* sp., *Pestalotia* sp., *Phoma* sp., *Pithomyces chartarum*, *Podospora* sp., *Pyricularia grisea*, *Septoria glycines*, *Sordaria fimicola*, *Sporormiella minim*, *Trichoderma* sp. e *Verticillium nigrescens*. Esses mesmo autores avaliaram a ação do fungicida Benomil sobre o isolamento dos fungos endofíticos de soja, demonstrando que houve reduções significantes no isolamento e na frequência dos fungos endofíticos em plantas submetidas ao tratamento com esse fungicida (Miller & Roy, 1982b).

Larran et al. (2002), na Argentina, isolaram 15 espécies de fungos endofíticos de indivíduos de *G. max* em diferentes estádios de desenvolvimento (R2-R3 e R4-R5), chegando a conclusão que não houve diferenças significativas na frequência e

isolamento de diferentes espécies quando comparados com os diferentes estádios da planta. Villarroel et al. (2004) compararam nos Estados Unidos a frequência de isolamento de fungos endofíticos de soja convencional versus transgênica, concluindo que a frequência de isolamento foi maior na planta convencional quando comparado com a planta modificada geneticamente, 54 e 46%, respectivamente. No Brasil, o primeiro registro do isolamento de fungos endofíticos em *G. max* foi realizado por Pimentel et al. (2006), sendo isoladas espécies pertencentes aos gêneros de *Acremonium* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Drechslera* sp., *Fusarium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Scopulariopsis* sp., e *Mycelia sterilia*.

A partir de 2010, os trabalhos envolvendo os fungos endofíticos de *G. max* começaram a ser desenvolvidos por pesquisadores de vários outros países. Novas pesquisas foram surgindo, abordando a capacidade da produção de compostos bioativos, de interesse biotecnológico como enzimas e hormônios estimuladores do crescimento vegetal, bem como visando o isolamento e identificação precisa de fungos biocontroladores de fitopatógenos associados a *G. max*. Marlida et al. (2010) demonstraram que dois fungos isolados como endofíticos de *G. max* (*Rhizoctonia* sp. e *Fusarium verticillioides*) eram bons produtores da enzima fitase. Em outro trabalho, demonstrou-se que *Aspergillus fumigatus* isolado como endofítico de *G. max*, aumentava a germinação de sementes e o comprimento radicular da planta da soja (Waqas et al., 2012). Ainda em 2012, foi demonstrado que fungos endofíticos isolados de *G. max* foram eficientes em controlar, *in vitro*, fungos fitopatogênicos como *Alternaria solani*, *Fusarium solani*, *Phomopsis* sp. e *Rhizoctonia solani* (Bernardi-Wenzel et al., 2012).

Leite et al. (2013) avaliaram a eficiência da técnica de extinção e fragmentação de tecidos no isolamento de fungos endofíticos da soja, sendo constatado que ambos os métodos foram eficientes. Em outros estudos, demonstrou-se que a colonização pelo fungo endofítico *Penicillium funiculosum* em seu hospedeiro (*G. max*) favoreceu a planta na resposta ao estresse quando cultivada em solos contendo contaminação por metal-pesado (cobre) (Khan & Lee, 2013). Outros trabalhos exploram a diversidade de fungos endofíticos em *G. max* (Impullitti & Malvick, 2013; Tenguria & Firodiya, 2013), inclusive demonstrando que fungos endofíticos influenciaram positivamente o desenvolvimento da planta e a germinação de sementes de *G. max* (Radhakrishnan et al., 2013).

Recentemente, foi demonstrado que mais de 20% dos fungos isolados de *G. max* apresentam altas concentrações de lipídios, sendo denominados fungos oleaginosos, e também que esses mesmo fungos são bons produtores de celulases, sendo promissores no uso da produção de biodiesel (Yan et al., 2014). Hamayun et al. (2015) demonstraram que o fungo endofítico *Cephalotheca sulfurea*, isolado das raízes de *G. max*, foi capaz de ativar e aumentar a produção de giberelina pela planta, favorecendo assim o aumento do crescimento e do desenvolvimento vegetal (Hamayun et al., 2015).

Fungos endofíticos

Micro-organismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que vivem no interior das plantas, habitando órgãos e tecidos do hospedeiro vegetal. Esses micro-organismos endofíticos não causam prejuízos aparentes ao seu hospedeiro, podendo ter um papel essencial no desenvolvimento vegetal, já que alguns atuam como biocontroladores de fitopatógenos e de herbívoros e podem produzir substâncias promotoras de crescimento (Neto et al., 2002).

Os micro-organismos endofíticos, ao contrário dos fitopatógenos, que causam doenças em plantas, e dos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais, são encontrados apenas no interior da planta. Entretanto, pode ocorrer sobreposição entre esses grupos microbianos, o que dificulta a sua separação. Os micro-organismos epifíticos podem, eventualmente, penetrar no interior do vegetal, permanecendo por um determinado período ou até causar prejuízo à planta (Azevedo, 1999). Há momentos em que propágulos de micro-organismos endofíticos necessariamente precisam estar na superfície do vegetal para penetrar no interior do tecido, é, portanto, nesse estágio que os endófitos são semelhantes aos epifíticos, como no caso do fungo *Beauveria bassiana* em milho (Wagner & Lewis, 2000; Neto et al., 2002).

O reconhecimento da existência de tais micro-organismos foi feito pela primeira vez por Heinrich Anton de Bary em 1866 (Bary, 1866), entretanto este fato permaneceu negligenciado por mais de 100 anos, por não produzirem estruturas externas visíveis sobre as plantas colonizadas e pela falta de conhecimentos sobre suas reais funções no interior das plantas (Neto et al., 2002).

Rodriguez et al. (2009) agruparam os fungos endofíticos em quatro classes de acordo com: modo de transmissão, hospedeiro colonizado, tipo de colonização, variação de hospedeiros colonizados e a riqueza de espécies no hospedeiro. Essa classificação teve o objetivo de proporcionar uma melhor compreensão das relações envolvidas na interação entre os fungos endofíticos e a planta hospedeira. A primeira classe (classe 1) é representada por fungos endofíticos clavicipitaceos. Esses são fungos endofíticos que apresentam transmissão vertical e horizontal, são específicos de gramíneas e são representantes da família Clavicipitaceae. São fungos mutualistas que defendem seus hospedeiros (Figura 1).

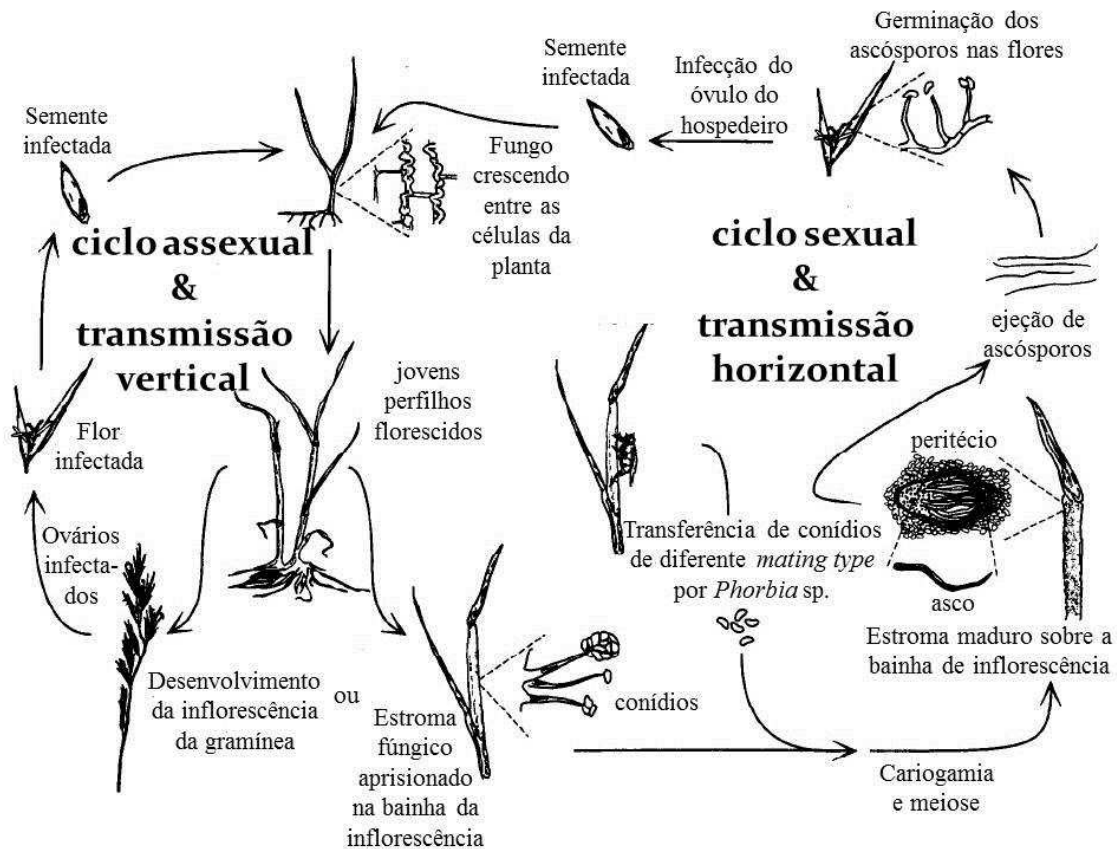


Figura 1. Exemplo do ciclo de vida coordenado entre o fungo endofítico *Epichloë festucae* e sua planta gramínea hospedeira *Festuca rubra*, demonstrando os ciclos sexual e assexual e também a transmissão vertical e horizontal do fungo. No ciclo assexual, a planta infectada produz sementes que hospedam o fungo e então ocorre a transmissão vertical por meio das sucessivas gerações. O ciclo sexual é iniciado com o crescimento do estroma fúngico próximo do perfilho, impedindo a maturação da inflorescência. Após ocorrer a cariogamia, os ascósporos são ejetados até outras plantas, ocorrendo assim a transmissão horizontal (contagiosa). Espécies antagonistas de *Epichloë* esterilizam quase ou todas as inflorescências de seus hospedeiros e nunca (ou raramente) são transmitidos verticalmente. Adaptado de Schardl et al. (1997)

A classe 2 é constituída de fungos endofíticos que possuem transmissão vertical e horizontal e compreende uma maior diversidade de espécies, sendo a maioria das espécies pertencente ao filo Ascomycota e a minoria ao filo Basidiomycota. Nesta classe, os fungos endofíticos são capazes de colonizar vários órgãos e tecidos, são transmitidos por meio de sementes e/ou rizomas e geralmente não são hospedeiro-dependentes. Os fungos da classe 3 são dispersos por meio da transmissão horizontal e primariamente ou exclusivamente colonizadores de tecidos encontrados acima do solo. São transmitidos horizontalmente e não são necessariamente hospedeiro-específicos.

Possuem representantes colonizadores de folhas de árvores tropicais, tecidos de plantas não vasculares, coníferas e podem ser encontrados até na Antártida. Finalmente, os fungos endofíticos representantes da classe 4 são transmitidos horizontalmente, possuem pigmentação escura e são encontrados associados a raízes de plantas terrestres, sendo denominados de “pseudo-micorrízicos” e possuem certa especificidade de hospedeiro.

Evidências da interação entre fungos endofíticos e plantas datam em 400 milhões de anos, no período Devoniano da era Paleozóica na forma de vestígios de fragmentos miceliais em tecidos vegetais fossilizados. Entretanto, fósseis de fungos da ordem Glomerales, sabidamente micorrízicos de plantas arbusculares, já foram encontrados por volta de 460 milhões de anos atrás, no período Ordoviciano, sugerindo que o início das interações mutualísticas entre plantas e fungos possam ter iniciado nessa época (Blackwell, 2000). Ainda segundo Blackwell (2000), devido aos fungos endofíticos serem microscópicos e não ser evidenciada a sua presença nas plantas, a detecção e identificação de estruturas fúngicas são difíceis em fósseis mineralizados, o que dificulta a determinação de sua origem mutualista com as plantas. Entretanto, existem registros de fungos pertencentes à família Clavicipitaceae que se originaram a partir de espécies parasitas de insetos e se tornaram hospedeiros de plantas há 50-80 milhões de anos atrás (Schardl et al., 2008).

Estudos tem demonstrado a presença de fungos endofíticos em plantas pertencentes aos grupos briófitas (Zhang et al., 2013); pteridófitas (Olmo-Ruiz & Arnold, 2014); gimnospermas (Soca-Chafre et al., 2011) e angiospermas (Impullitti & Malvick, 2013). Em outra teoria, Sieber (2007) propõe que durante a evolução dessa interação fungo-planta, os endofíticos seriam derivados de fitopatógenos que perderam a virulência após um longo período de crescimento dentro da planta ou que ainda seriam

patógenos em potencial, mas com o passar do tempo, teriam co-evoluido com seus hospedeiros, perdendo os genes específicos de virulência.

Os fungos endofíticos mais estudados quanto à adaptação a seus hospedeiros, são pertencentes a família Clavicipitaceae, pertencentes aos gêneros *Acremonium*, *Atkinsonella*, *Balansia*, *Balansiopsis*, *Epichloë* e *Myriogenospora* (Clay, 1990; Torres, 2009). Como exemplo, a adaptação do fungo *Epichloë festucae* quanto ao modo de transmissão de seu hospedeiro pode ser vista na figura 1. A variação da compatibilidade genética entre a planta hospedeira e fungo endofítico pertencente à família Clavicipitaceae contribui para uma diversidade de resultados ecológicos e da relação simbiótica entre eles. Demonstrações desses resultados foram feitas por Leuchtman & Clay (1989), onde usando técnicas de inoculação de ascósporos diretamente no hospedeiro, examinaram a compatibilidade do fungo *Atkinsonella hypoxylon* com populações de três espécies de gramíneas perenes, demonstrando que algumas combinações de isolados endofíticos (geneticamente distintos) e populações hospedeiras não eram compatíveis. Em outro estudo, Brem & Leuchtman (2003) revelaram a diferenciação genética encontrada em *Epichloë bromicola* quando estes foram isolados de diferentes hospedeiros. Mais recentemente, Saikkonen, et al. (2010) mostraram por meio de combinações de genótipos que divergências genéticas podem ocorrer entre o hospedeiro e o fungo endofítico e que o genótipo do hospedeiro modificado por meio de cruzamentos dentro das populações do mesmo hospedeiro pode contribuir para a perda da infecção do fungo endofítico.

Schardl et al. (1997) avaliaram as relações co-evolucionárias complexas de gramíneas hospedeiras e seus fungos endofíticos e por meio da filogenia, foi demonstrado que espécies pleiotrópicas e antagonistas de *Epichloë*, coevoluíram a partir do mesmo ancestral dentro de seus hospedeiros.

Os fungos endofíticos distribuem-se distintamente pelos órgãos e tecidos do vegetal, sendo associados as mais diversas estruturas vegetais como folhas, ramos, caules, raízes e estruturas florais, como ovário, anteras e estames (Porrás-Alfaro & Bayman, 2011). Os endofíticos distribuídos por todo o vegetal também podem possuir funções relacionadas aos micro-organismos saprófitas, sendo que muitas espécies atuam no processo de maturação e decomposição foliar (Promputtha et al., 2007; Sieber, 2007) além de produzir diversas enzimas responsáveis pela decomposição de matéria orgânica vegetal (Sunitha et al., 2013).

A interação entre o micro-organismo endofítico e a planta hospedeira, com algumas exceções, se dá de forma mutualística, em que o vegetal fornece nutrição ao micro-organismo e este fornece proteção à planta (Stone et al., 2000), podendo exercer influência sobre a comunidade vegetal, bem como a sucessão e ciclagem de nutrientes (Davitt et al., 2010). Esses endofíticos vivem em ambientes protegidos que conferem vantagens competitivas sobre os micro-organismos presentes na rizosfera e na filosfera, bem como no fluxo de nutrientes, pH e umidade (Backman & Sikora, 2008). Há casos em que fungos endófitos induzem alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em seus hospedeiros, podendo afetar o desempenho da planta, garantindo maior resistência do hospedeiro a estresses bióticos (como herbivoria e defesa de fitopatógenos) e abióticos como déficit hídrico, salinidade, altas concentrações de metais pesados no solo e herbicidas. Os fungos residentes também podem atuar na promoção do crescimento por meio de alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em seus hospedeiros (Bayat et al., 2009; Gundel et al., 2010). Um esquema das relações ecológicas envolvidas entre os fungos endofíticos e a planta hospedeira podem ser visualizadas na Figura 2.

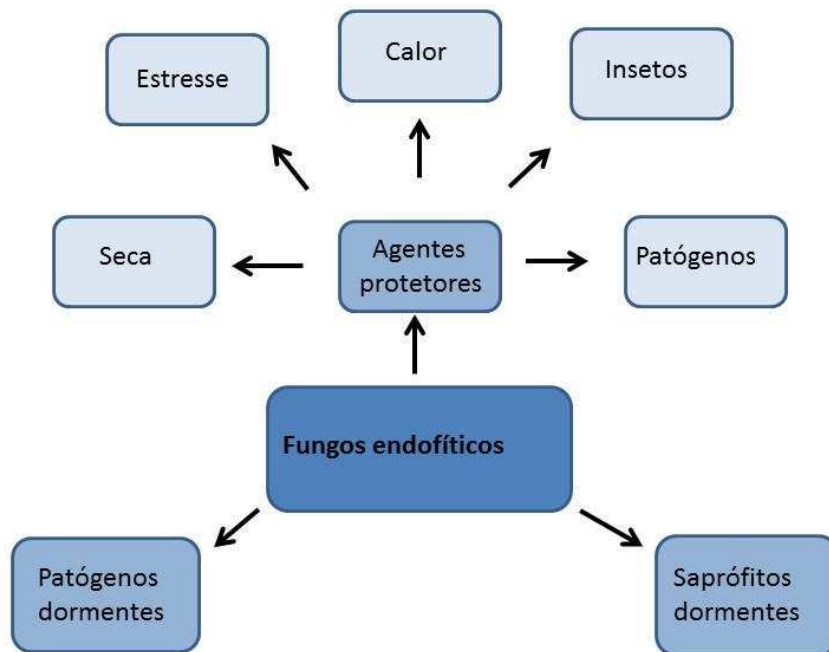


Figura 2. Representação das interações envolvidas entre os fungos endofíticos com seu hospedeiro durante seu ciclo de vida, ou em resposta à planta ou ao estresse ambiental (Adaptado de Porrás-Afaro & Bayman, 2011).

Em relação às formas de transmissão dos fungos endofíticos, a veiculação pode ocorrer de forma vertical ou horizontal. Na transmissão vertical o fungo é sistematicamente difundido por meio das sementes para os descendentes da planta hospedeira. Na transmissão horizontal, são originadas colonizações, como o desenvolvimento de estroma fúngico, localizados em órgãos e tecidos vegetais, sendo esta a forma mais comum de transmissão dos fungos endofíticos entre todos os tipos de plantas (Saikkonen et al., 2004). A transmissão horizontal pode ocorrer por meio dos ventos ou ainda por meio de animais, como moscas e formigas (Schardl et al., 1997). A exemplificação dos dois métodos de transmissão de fungos endofíticos é apresentada na figura 1. A transmissão para o novo hospedeiro é o principal componente para o

sucesso no número de infecções em novos hospedeiros (Frank, 1996), além de ser positivamente correlacionado com a virulência do endofítico (Ebert & Herre, 1996; Day, 2001).

A diversidade de fungos endofíticos em um determinado hospedeiro já foi reportada em diferentes publicações (Neto et al., 2002; Roy et al., 2000; Porras-Alfaro & Bayman, 2011; Impullitti & Malvick, 2013, Leite et al., 2013). Essa diversidade e abundância pode variar em função do hospedeiro, idade da planta, localização geográfica, condições ecológicas e sazonais, incluindo altitude e precipitação. Foi constatado em alguns estudos que uma ou duas espécies predominam como endofíticas em um determinado hospedeiro, sendo baixa a frequência de outras espécies (Carrol & Carrol, 1978; Bezerra et al., 2013). Um ponto importante a ser observado é o fato da diversidade de espécies de fungos endofíticos isolados de um mesmo hospedeiro variar significativamente em função do método de isolamento utilizado em cada estudo (Hyde & Soyong, 2008; Leite et al., 2013).

O aprimoramento das técnicas usadas para isolamento de fungos endofíticos e o surgimento de novas ferramentas moleculares, tornaram possíveis um melhor entendimento e a elucidação e compreensão da microbiota fúngica em diversos ambientes. Novas tecnologias de sequenciamentos, entre estas o pirosequenciamento (Fakruddin, et al., 2012); os chips de DNA (Dinkins et al, 2010) e a plataforma Ion Torrent PGM (Kemler et al., 2013), além de bancos genéticos acurados de identificação fúngica baseados em sequencias ribossomais como o UNITE (<http://unite.ut.ee>), proporcionam cada vez mais aos pesquisadores a identificação de novos fungos endofíticos associados a diversas espécies vegetais, principalmente pelo acesso e identificação de espécies fúngicas fastidiosas e/ou não cultiváveis, e assim mudando o entendimento sobre a complexidade da diversidade microbiana endofítica em seus

hospedeiros (Jumpponen & Jones, 2009; Jumpponen & Jones, 2010; Zimmerman & Vitousek, 2012).

Produção de compostos bioativos por fungos endofíticos

Micro-organismos endofíticos em geral, podem produzir uma série de compostos bioativos que podem modificar a fisiologia da planta hospedeira. Por exemplo, determinadas proteínas produzidas pelos micro-organismos endofíticos podem afetar a regulação dos genes da planta, promovendo a biossíntese de metabólitos secundários tóxicos que diminuem a herbivoria. Em outros casos, plantas conhecidas como tóxicas são na verdade, hospedeiras de micro-organismos produtores de alcaloides que causam intoxicações em herbívoros (Wolfe et al., 1998; Neto et al., 2002; Panaccione et al., 2014). Existem relatos de que essa interação entre micro-organismos endofíticos produtores de toxinas e gramíneas pode resultar em sérios prejuízos econômicos, como observado na pecuária, em casos de intoxicações de ruminantes, afetando de forma negativa no desenvolvimento e até causando a morte desses animais. Por outro lado, associações plantas-endofíticos podem proteger as plantas hospedeiras contra herbívoros e patógenos, além de atuarem na promoção do crescimento das raízes e partes aéreas e também aumentar a resistência a estresses bióticos e abióticos (Hallman et al., 1997; Neto et al., 2002).

Fungos endofíticos representam um grupo promissor como fonte de novos metabólitos. O número de patentes que envolvem a utilização de endofíticos para a produção de metabólitos secundários ou compostos com importância biológica tem aumentado drasticamente (Priti et al., 2009). Pesquisas demonstram que a porcentagem de isolados endofíticos produtores de substâncias com atividade antimicrobiana pode ser superior a 30%, sendo alguns isolados capazes de produzir quantidades elevadas de

moléculas bioativas (Huang et al., 2001; Strobel, 2003; Peláez, 2006; Wang et al., 2007; Morath et al., 2012; Qadri et al., 2013; Ravnikar et al., 2015). Segundo Schutz et al. (2002) 51% dos compostos bioativos isolados de fungos endofíticos possuíram estrutura química desconhecida, sendo, portanto, novos compostos.

Estudos realizados por Stierle et al. (1993) despertaram ainda mais o interesse dos pesquisadores pelos compostos bioativos dos fungos endofíticos. Esses pesquisadores isolaram o fungo endofítico *Taxomyces andreanae* do interior da planta *Taxus brevifoliae* e obtiveram compostos bioativos, dentre os quais o agente anticancerígeno paclitaxel (Taxol[®]), um diterpenóide, cuja única fonte era anteriormente conhecida apenas a partir de algumas espécies vegetais. Isso estimulou vários trabalhos que resultaram na descoberta de novos metabólitos secundários de interesse para a indústria farmacêutica (Neto et al., 2002).

Segundo Tan & Zou (2001), os metabólitos produzidos pelos organismos endofíticos podem originalmente ser característicos de seus hospedeiros, podendo esse fato estar relacionado com uma transferência horizontal de genes ocorrida entre a planta hospedeira e o endofítico ao longo de anos de evolução. O endofítico *T. andreanae* e o hospedeiro *T. brevifolia* são, provavelmente, um exemplo dessa transferência lateral de genes do hospedeiro para o fungo, devido ao fato dos dois organismos produzirem o paclitaxel (Stierle et al., 1993). A partir dessa característica envolvendo endofíticos e hospedeiro, é prudente especular que alguns compostos bioativos atribuídos a algumas espécies vegetais possam estar relacionados, de alguma forma, às substâncias produzidas por micro-organismos endofíticos ou pelo vegetal em resposta a uma infecção (Arnold et al., 2000; Ferrara, 2006).

Outro ponto importante nos estudos de novos compostos farmacêuticos se refere à descoberta de novos antimicrobianos, como fungicidas e antibacterianos. A utilização indiscriminada de antibióticos e antifúngicos vem provocando a seleção de microorganismos patogênicos multirresistentes, tanto na agricultura, pecuária quanto na saúde humana. Por isso, a pesquisa de novos compostos antimicrobianos de fontes não convencionais em países com grande biodiversidade como o Brasil é promissora. A descoberta de novos compostos antimicrobianos, além de permitir o combate as pragas e as doenças, pode gerar lucros econômicos para o país (Neto et al., 2002).

Considerando que os fungos endofíticos apresentam alta diversidade de espécies, capacidade de controle de fitopatógenos e potencial para produção de novos compostos antimicrobianos e bioativos, esta tese busca investigar a diversidade de fungos endofíticos em *G. max*; investigar fungos endofíticos controladores de crescimento de fungos fitopatogênicos; realizar a bioprospecção de compostos antimicrobianos, compostos bioativos e precursores moleculares de interesse industrial e farmacológico e, por fim, avaliar as diferenças metabólicas entre *Guinardia mangiferae* isoladas de diferentes hospedeiros e regiões geográficas.

Referências Bibliográficas

- Almeida, A. M. R.; Ferreira, L. P.; Yorinori, J. T.; Silva, J. F. V.; Henning, A.A; Godoy, C. V.; Costamilan, L. M.; Meyer, M. C. Doenças da soja (*Glycine max*). In: Kimati, H.; Filho, A. B.; Camargo, L. E. A.; Rezende, J. A. M. (eds). **Manual de Fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas**, v. 2. São Paulo: Ceres, pp. 569-588, 2005.
- Aparicio, M.; Cuence, A. R.; Suárez, M. J. S.; Revilla, M. A. Z. Soybean, a promising health source, **Nutrición Hospitalaria**, v. 23, n. 4, p. 305-312, 2008.

- 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.
- Azevedo, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada?. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 225-229, 1999.
- Backman, P. A.; Sikora, R. A. Endophytes: An emerging tool for biological control. **Biological Control**, v. 46, p. 1-3, 2008.
- Bary, A. **Morphologie und physiologie der pilze, Flechten und Myxomyceten**.v. 2. Leipzig: Holmeisters Handbook of Physiological Botany, 1866.
- Bayat, F.; Mirlohi, A.; Khodambashi, M. Effects of endophytic fungi on some drought tolerance mechanisms of tall fescue in a hydroponics culture. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 56, n. 4, p. 510-516, 2009.
- Bernardi-Wenzel, J.; Siqueira, A. L.; Burin, F. A. G.; Hein, D. P. R.; Silveira, J. A.; Romani, S. Isolamento e atividade antagonista de fungos endofíticos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 86-96, 2012.
- Bezerra, J. D. P.; Santos, M. G. S.; Barbosa, R. N.; Svedese, V. M.; Lima, D. M M.; Fernandes, M. J. S.; Gomes, B. S.; Paiva, L. M.; Cortez, J. S. A; Motta, C. M. S. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in brazilian tropical dry forest: a first study. **Symbiosis**, v. 60, p. 53-63, 2013.
- Blackwell, M. Terrestrial life: Fungal from the start?. **Science**, v. 289, n. 5486, p. 1884-1885, 2000.
- Brem, D.; Leuchtman, A. Molecular evidence for host-adapted races of the fungal endophyte *Epichloë bromicola* after presumed host shifts. **Evolution**, v. 57, n. 1, p. 37-51, 2003.
- Carrol, G. C.; Carrol, F. E.; Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, v. 56, p. 3034-3043, 1978.

- Clay, K. Fungal endophytes of grasses. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, n. 21, p. 275-297, 1990.
- Davitt, A. J.; Stansberry, M.; Rudgers, J. A. Do the costs and benefits of fungal endophyte symbiosis vary with light availability. **New Phytologist**, v. 188, n.3, p. 824-834, 2010.
- Day, T. Parasite transmission modes and the evolution of virulence. **Evolution**, v. 55, n. 12, p. 2389–2400, 2001.
- Dinkins, R. D.; Barnes, A.; Waters, W. Microarray analysis of endophyte-infected and endophyte-free tall fescue. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 1197-1203, 2010.
- Ebert, D.; Herre, E. A. The evolution of parasitic diseases. **Parasitology Today**, v. 12, n. 3, p. 96–101, 1996.
- Fakruddin, M. D., Chowdhury, A.; Hossain, M. D. N.; Mannan, K. S. B.; Mazumdar, R. M. Pyrosequencing – principles and applications. **International Journal of Life & Pharma Research**, v. 2, n. 2, p. 65-76, 2012.
- Ferrara, M. A. Fungos endofíticos. Potencial para a produção de substâncias bioativas. **Revista Fitos**, v. 2, n. 1, p. 73-79, 2006.
- Frank, S. A. Models of parasite virulence. **Quarterly Review of Biology**, v. 71, n. 1, p. 37–78, 1996.
- Gundel, P. E.; Martinez-Guersal, M. A.; Batista, W. B.; Ghera, C. M. Dynamics of *Neotyphodium* endophyte infection in ageing seed pools: incidence of differential viability loss of endophyte, infected seed and non infected seed. **Annals of Applied Biology**, v. 156, n. 2 p. 199-209, 2010.
- Hallmann, J.; Quadt-Hallmann, A.; Mahaffee, W. F.; Kloepper, J. W. Bacterial endophytes in agriculture crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.

Hamayun, M.; Khan, S. A.; Khan, A. L.; Afzal, M.; Lee, I. J. Endophytic *Cephalotheca sulfurea* AGH07 reprograms soybean to higher growth. **Journal of Plant Interactions**, v. 7. n. 4, p. 301-306, 2015.

Hirakuri, M. H.; Lazzarotto, J. J. **Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundiais e brasileiro**. 3. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2011, 68p.

Huang, Y.; Wang, J.; Li, G.; Zheng, Z.; Su, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 31, p. 163-167, 2001.

Hyde, K. D.; Soyong, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, v. 33, p. 163-173, 2008.

Impullitti, A. E.; Malvick, D. K. Fungal endophyte diversity in soybean. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 5, p. 1500-1506, 2013.

Jumpponen, A.; Jones, K. L. Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. **New Phytologist**, v.184, n. 2, 438–448, 2009.

Jumpponen, A.; Jones, K. L. Seasonally dynamic fungal communities in the *Quercus macrocarpa* phyllosphere differ between urban and nonurban environments. **New Phytologist**, v. 186, n. 2, p. 496–513, 2010.

Kantolic, A. G.; Fuente, E. B.; Giménez, P. L. Soja. In : Bellido, L. L. (Ed). **Cultivos Industriales**. Madri: Mundi-Prensa. p. 97-144, 2006.

Kemler, M.; Garnas, J.; Wingfield, M. J.; Gryzenhout, M.; Pillay, K. A.; Slippers, B. Ion Torrent PGM as tool for fungal community analysis: a case study of endophytes in *Eucalyptus grandis* reveals high taxonomic diversity. **Plos One**, v. 8, n. 12, p. 1-9, 2013.

- Khan, A. L.; Lee, I. J. Endophytic *Penicillium funiculosum* LHL06 secretes gibberellin that reprograms *Glycine max* L. growth during copper stress. **BMC Plant Biology**, v. 13, n. 86, p. 1-14, 2013.
- Larran, S.; Rollan, C.; Angeles, H. B.; Alippi, H. E.; Urrutia, M. I. Endophytic fungi in healthy soybean leaves. **Investigación agraria. Producción y protección vegetal**, v. 17, n. 1, p. 174 – 178, 2002.
- Leite, T. S.; Cnossen-Fassoni, A.; Pereira, O. L.; Mizubuti, E. S. G.; Araujo, E. F.; Queiroz, M. V. Novel and highly diverse fungal endophytes in soybean revealed by the consortium of two different techniques. **Journal of Microbiology**, v. 51, p. 56-69, 2013.
- Leuchtman, A.; Clay, K. Experimental evidence for genetic variation in compatibility between the fungus *Atkinsonella hypoxylon* and its three host grasses. **Evolution**, v. 43, n. 4, p. 825-834, 1989.
- Liu, K. S. Chemistry and nutritional value of soybean components. In: Liu, K. S. (Ed). **Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization**. New York: Chapman & Hall, p. 25-113, 1997.
- Marlida, Y.; Delfita, R.; Adnadi, P.; Ciptaan, G. Isolation, characterization and production of phytase from endophytic fungus its application for feed. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 9, n. 5, p. 471-474, 2010.
- Miller, W. A.; Roy, K. W. Mycoflora of soybean leaves, pods and seeds in Mississippi. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, p. 2716-2723, 1982a.
- Miller, W.; Roy, K. W. Effects of benomyl on the colonization of soybean leaves, pods, and seeds by fungi. **Plant Disease**, v. 66, n. 10, p. 918-920, 1982b.

Morath, S. U.; Hung, R.; Bennett, J. W. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, v. 26. p. 73-83, 2012.

Neto, P. A. S. P.; Azevedo, J. L.; Araújo, W. L. Micro-organismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 62-76, 2002.

Olmo-Ruiz, M. D.; Arnold, A. E. Interannual variation and host affiliations of endophytic fungi associated with ferns at La Selva, Costa Rica. **Mycologia**, v. 106, n. 1, p. 8-21, 2014.

Panaccione, D. G.; Wesley T. Beaulieu, W. T.; Cook, D. Bioactive alkaloids in vertically transmitted fungal endophytes. **Functional Ecology**, v. 28, n. 2, p. 299-314, 2014.

Peláez, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products –Can history repeat?. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 981-990, 2006.

Pimentel, I. C.; Blanco, C. G.; Gabardo, J.; Stuart, R. M.; Azevedo, J. L. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 5, p. 705-711, 2006.

Porrás-Alfaro, A.; Bayman, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Annual Review of Phytopathology**, n. 49, p. 291-315, 2011.

Priti, V.; Ramesha, B. T.; Sing, S.; Ravikanth, G.; Ganeshaiyah, K. N.; Suryanarayanan, T. S.; Shaanker, R. U. How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites?. **Current Science**, v. 97, n. 4, p. 477-478, 2009.

Promptutha, I.; Lumyong, S.; Dhanasekaran, V.; McKenzie, E. H.; Hyde, K. D.; Jeewon, R. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. **Microbial Ecology**, v. 53, n. 4, p. 579-590, 2007.

Qadri, M.; Johri, S.; Shah, B. A.; Khajuria, A.; Sidiq, T.; Lattoo, S. K.; Abdin, M. Z.; Hassan, S. R. U. Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas. **Springer Plus**, v. 2, n. 8, p. 1-14, 2013.

Radhakrishnan, R.; Khan, A. L.; Lee, I. J. Endophytic fungal pre-treatments of seeds alleviates salinity stress effects in soybean plants. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 850-857, 2013.

Ravnikar, M.; Tercelj, M.; Janes, D.; Strukelj, B.; Kreft, S. Antibacterial activity of endophytic fungi isolated from conifer needles. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 10, p. 867-871, 2015.

Rodriguez, R. J.; White, J. F.; W, Arnold, A.E.; Redman, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v.182, n. 2, p. 314-330, 2009.

Roy, K. W.; Baird, R. E.; Abney, T. S. A review of soybean (*Glycine max*) seed, pod, and flower mycofloras in North American, with methods and key for identification os selected fungi. **Mycopathologia**, v.150, n. 1, p. 15-27, 2000.

Saikkonen, K.; Wali, P.; Helander, M.; Faeth, S. H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 6, p. 275-280, 2004.

Saikkonen, K., Wali, P. R.; Helander, M. Genetic compatibility determines endophyte-grass combinations. **Plos One**, v. 5, n. 6, p. 1-6, 2010.

Schardl, C. L.; Leuchtman, A.; Chung, K. R.; Penny, D.; Siegel, M. R. Coevolution by common descent of fungal symbionts (*Epichloe* spp.) and grass host. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 2, p. 133-143, 1997.

Schardl, C. L.; Craven, K. D.; Speakman, S.; Lindstrom, A.; Stromberg, A.; Yoshida, R. A novel test for host-symbiont codivergence indicates ancient origin of fungal endophytes in grasses. **Systematic Biology**, v. 57, n. 3, 483–498, 2008.

Schutz, B.; Boyle, C.; Draeger, S.; Rommert, A. K.; Krohn, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

Sedyama, T. **Tecnologias de produção e uso da soja**, Londrina: Mecemas, 2009, 314p.

Sieber, T. N. Endophytic fungi in forest trees: Are they mutualists?. **Fungal Biology Reviews**, v. 21 n. 2-3, p. 75-89, 2007.

Soca-Chafre, G.; Rivera-Orduna, F.N.; Hidalgo-Lara, M.E.; Rodriguez, C. H; Marsch, R.; Cotera, F. L.B. Molecular phylogeny and paclitaxel screening of fungal endophytes from *Taxus globosa*. **Fungal Biology**, v. 115, p.143- 156, 2011.

Stierle, A.; Strobel, G. A.; Stierle, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v.260, n. 5105, p. 214–216, 1993.

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**. New York: Marcel Dekker, p. 3-30, 2000.

Strobel, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 6, p. 535-544, 2003.

Sunitha, V. H.; Devi, D. N.; Srinivas, C. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolates from medicinal plants. **World Journal of Agricultural Sciences**, n. 9, v. 1, p.01-09, 2013.

Tan, R. X.; Zou, W. X. Endophytes: A rich source of functional metabolites. **Natural Product Report**, v. 18, p. 448-459, 2001.

Tenguria, R. K.; Firodiya, A. Diversity of endophytic fungi in leaves of Glycine max (L.) Merr. From central region of Madhya Pradesh. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 6, p.5928-5934, 2013.

Torres, M. S. Clavicipitaceae: Free-living and saprotrophs to plant endophytes. In: Schaechter, M. (ed). **Encyclopedia of Microbiology**. 3 ed. Oxford: Elsevier, pp. 422-430, 2009.

USDA (United States Department of Agriculture), available in: <http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>. Accessed 08/04/2015.

Villarroel, D. A.; Baird, R. E.; Trevathan, L. E.; Walson, C. E.; Scruggs, M. L. Pod and seed mycoflora on transgenic and conventional soybean [Glycine max (L.) Merrill] cultivars in Mississippi. **Mycopathologia**, v. 157, p. 207-215, 2004.

Wagner, B. L.; Lewis, L. C. Colonization of corn, Zea mays, by the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3468-3473, 2000.

Wang, F. W.; Jiao, R. H.; Cheng, A. B.; Tan, S. H.; Song, Y. C. Antimicrobial potential of endophytic fungi residing in Quercus variabilis and brefeldin A obtained from Cladosporium sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 79- 83, 2007.

Waqas, M.; Khan, A. L.; Hamayun, M.; Karmran, M.; Kang, S. M.; Kim, Y. H.; Lee, I. J. Assessment of endophytic fungi cultural filtrate on soybean seed germination. **Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 85, p. 15435-15143, 2012.

Wolfe, B. A.; Bush, M.; Monfort, S. L.; Mumford, S. L.; Pessier, A.; Montali, R. J. Abdominal lipomatosis attributed to tall fescue toxicosis in deer. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 12, p. 1783-1786, 1998.

Yang, Y.; Yan, M.; Hu, B. Endophytic fungal strains of soybean for lipid production. **Bioenergy Research**, v. 7, p. 353-361, 2014.

Zhang, T.; Zhang, Y.; Liu, H.; Wei, Y.; Li, H.; Su, J.; Zhao, L.; Yu, L. Diversity and cold adaptation of culturable endophytic fungi from bryophytes in the fildes region, King George Island, maritime Antarctica. **FEMS Microbiology Letters**, v. 341, n. 1, p. 52-61, 2013.

Zimmerman, N.B.; Vitousek, P. M. Fungal endophyte communities reflect environmental structuring across a Hawaiian landscape. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 109, n. 32, p. 13022–13027, 2012.

DIVERSITY OF ENDOPHYTIC FUNGI IN *Glycine max*

Elio Gomes Fernandes¹, Olinto Liparini Pereira², Cynthia Câneo da Silva¹, Claudia Braga Pereira Bento¹, Marisa Vieira de Queiroz^{1*}

¹ Department of Microbiology - Bioagro, Universidade Federal de Viçosa. Av. PH Rolfs s/n - Campus Universitário. CEP: 36570 900 - Viçosa – MG – Brasil.

²Department of Phytopathology, Universidade Federal de Viçosa. Av. PH Rolfs s/n - Campus Universitário. CEP: 36570 900 - Viçosa – MG – Brasil.

*Corresponding author. Tel +553138992971

mvqueiro@ufv.br

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that live within plant tissues without causing disease during part of their life cycle. With the isolation and identification of these fungi, new species are being discovered, and ecological relationships with their hosts have also been studied. In *Glycine max*, limited studies have investigated the isolation and distribution of endophytic fungi throughout leaves and roots. The distribution of these fungi in various plant organs differs in diversity and abundance, even when analyzed using molecular techniques that can evaluate fungal communities in different parts of the plants, such as DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis). Our results show there is greater species richness of culturable endophytic filamentous fungi in the leaves *G. max* as compared to roots. Additionally, the leaves had high values for diversity indices i.e. Simpsons, Shannon and Equitability. Conversely, Dominance index was higher in roots as compared to leaves. The fungi *Ampelomyces* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diaporthe helianthi*, *Guignardia mangiferae* and *Phoma* sp. were more frequently isolated from the leaves, whereas the fungi *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* and *Fusarium* sp. were prevalent in the roots. However, by evaluating the two communities by DGGE, we concluded that the species richness was higher in the roots than in the leaves. UPGMA analysis showed consistent clustering of isolates; however, the fungus *Leptospora rubella*, which belongs to the order Dothideales, was grouped with species of the order Pleosporales. The presence of endophytic *Fusarium* species in *G. max* roots is unsurprising, since *Fusarium* spp. isolates have been previously described as endophyte

in other reports. However, it remains to be determined whether the *G. max* Fusarium endophytes are latent pathogens or non-pathogenic forms that benefit the plant. This study provides a broader knowledge of the distribution of the fungal community in *G. max* leaves and roots, and identifies the genetic relationships among the isolated species.

Keywords: DGGE, fungal community, ITS, clustering analysis, phytopathogenic fungi.

INTRODUCTION

Endophytic fungi are microorganisms found inside plant species (Stone et al., 2000) and may play a key role in plant development by controlling phytopathogens and herbivorous insects or producing growth-promoting substances (Neto et al., 2002). Endophytic fungi also have functions related to saprophytic microorganisms, and many species are involved in the process of maturation and leaf decomposition (Promputtha et al., 2007; Sieber, 2007). In addition, these fungi produce several enzymes responsible for the decomposition of plant organic matter (Sunitha et al., 2013).

The endophytic organisms live in protected environments that provide a competitive advantage over the microorganisms present in the rhizosphere and phyllosphere and are beneficial for nutrient flow, pH and humidity (Backman and Sikora, 2008). In turn, endophytes can guarantee greater host resistance to biotic and abiotic stresses, including water deficits, salinity, and elevated heavy metal concentrations in the soil. Furthermore these mutualists can protect plants against the effects of herbicides, herbivory and phytopathogens, and they may also act to stimulate growth through induction of morphological, physiological and biochemical changes in their hosts (Bayat et al., 2009; Gundel et al., 2010).

Endophytic microorganisms found in plants include fungi (Larran et al, 2002; Leite et al, 2013; Tenguria and Firodiya, 2013; Nalini et al, 2014) and bacteria (Zinniel et al,

2002; Rosenblueth and Martínez-Romero, 2006; Jasim et al, 2014; Ji et al, 2014). For example, the density of endophytic bacteria in *Phaseolus vulgaris* leaves varied from 4.5×10^2 to 2.8×10^3 colony-forming units (CFU)/g⁻¹ of fresh weight plant material (Costa et al, 2012) and, for endophytic fungi, colonization rates in leaves can vary up to 90% in tropical forest trees (Lodge et al, 1996). These microorganisms penetrate into the plant tissue through the stomata, roots, and wounds and directly by secretion of hydrolytic enzymes (Esposito and Azevedo, 2004). Another method of endophytic propagation is by vertical transmission through seeds (Saikkonen and Helander, 2010; White et al., 1993) or horizontal transmission through spores (Rodriguez et al, 2009). Endophytic fungi and plants have been in association for over 400 million years (Krings et al., 2007).

Endophytic fungi are distinctly distributed throughout the organs and tissues of plants and are associated with various plant structures, such as leaves, branches, stems, roots, shoots (Porrás-Alfarro and Bayman, 2011). Among the endophytic fungi isolated from different cultures, notoriously pathogenic species are commonly isolated. Alternatively, in some cases, the endophytes are not pathogenic and their presence can in fact, benefit the host plant as described for *Fusarium verticillioides* on maize (Lee et al., 2009) and non-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum* on banana (Athman et al., 2006). In other cases, it was observed that some endophytic fungi are able to cause disease symptoms in the plant after long incubation period, indicating that they were a latent form of the pathogen, as observed by Photita et al. (2004) on banana plants infected by the fungus *Deightonella torulosa*.

Soybean is a plant belonging to the genus *Glycine* that constitutes several species originating from the regions of Africa, East Asia and Australia, including the cultivated soybean species *Glycine max* (Sedyama, 2009). The reproductive stages in soybean

consist of eight stages in four development phases: flowering (R1 and R2), pod development (R3 and R4), seed development (R5 and R6) and plant maturation (R7 and R8). The period represented by R9 corresponds to soybean harvest (Sediyama, 2009). In the 2014/2015 harvest, the world production of soybean reached 315.1 million tons with Brazil soybean production estimated at 94.4 million tons (USDA, 2015).

Dalal and Kulkarni (2014) found that the diversity and distribution of endophytic fungi in the soybean plant are influenced by the vegetative and reproductive stages. The age of the plant and type of cultivation environment, such as open fields and greenhouses, also contribute to the diversity of endophytic fungi in soybean (Pimentel et al., 2006). Studies on the fungal community in *G. max* showed that the method used for fungal isolation influences the abundance and richness of isolated species (Impullitti and Malvick, 2013; Leite et al., 2012).

An understanding of the endophytic fungi present in *Glycine max*, through direct isolation techniques or molecular measurement is important because it broadens knowledge of the distribution of these microorganisms in the plant. Importantly, this may reveal potential biological control agents against pathogens or help to source novel antimicrobial compounds. In this study, our objectives were therefore to 1) to isolate and identify genetically and morphologically filamentous endophytic fungi of *G. max* leaves and roots, 2) perform the grouping among species using molecular techniques, 3) investigate variation in the diversity and distribution of the endophytic fungi population of *G. max* leaves and roots through culture-dependent and culture-independent approaches.

MATERIALS AND METHODS

Source of the *Glycine max* plant samples

Ten whole plants of the cultivar Monarca[®] in the R2 stage of development were collected for removal of leaves and roots at the experimental field Diogo Alves de Mello at the Universidade Federal de Viçosa – UFV, Brazil (20°46'0.47" S and 42°52'10.8 W) from random points covering the entire cultivated area of 10.000 m², which had not previously been exposed to any pesticide.

Isolation of endophytic fungi through dilution-to-extinction culturing

In total, 50 leaves were selected randomly while all root systems were harvested. These were washed to remove soil residue and dust, then, 10 g each of leaves and roots were disinfected by soaking in 70% ethanol for 1 min followed by 3% sodium hypochlorite (NaOCl) for 2 min. After rinsing to remove excess NaOCl, the samples were pressed on potato dextrose agar (PDA-Himedia) culture medium for 5 seconds to assess the efficacy of surface disinfection (Schulz et al., 1993; Schulz et al., 1998 and Schulz et al, 1999). Samples that did not incur any growth on the culture medium after 10 days (photoperiod of 12 hours, 27°C) were considered surface-sterile and used for the isolation of endophytic fungi.

Each plant sample type was pooled for the isolation of endophytic fungi according to the protocols developed by Paulus et al. (2003), Collado et al. (2007), Unterseher and Schnittler (2009) and Leite et al. (2013) with modifications. 10 g of each leaves and roots were added to a 0.85% NaCl solution (w/v) and homogenized in a blender for 60 sec. The resulting suspension was filtered through 500 µm and 106 µm sterile sieves. The plant pieces retained on the 106 µm sieve were collected and added to a test tube containing 30 mL 0.85% saline solution. Then, 300 µL of the supernatant was plated onto PDA, and 15 Petri dishes with culture medium and each plant sample were established. The culture medium was supplemented with 50 mg/L streptomycin

sulfate (Sigma) and 50 mg/L tetracycline (Sigma) to avoid isolating endophytic bacteria. Next, the Petri dishes were placed in a growth chamber with a photoperiod of 12 hours at 27°C for 10 days. The fungi were collected from fifth to tenth days and transferred to corn meal agar (Himedia) for sporulation and PDA medium for DNA extraction.

DNA extraction, amplification and sequencing of the rDNA ITS region of the filamentous fungi

After seven days of fungal growth on PDA, the DNA of each isolate was extracted using the UltraClean[®] Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories) as per manufacturer instruction.

Fungal DNA was analyzed by sequencing the internal transcribed spacer (ITS) region of the rDNA, which utilized the universal primers ITS 1F (5' – CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA - 3') and ITS 4 (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') (White et al., 1990 and Gardes and Bruns, 1993), and the fragment corresponding to the ITS-1, 5.8S and ITS-2 region was amplified by PCR using an Eppendorf Mastercycler[®] thermal cycler (Eppendorf, Germany) programmed to perform an initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 39 cycles at 95°C for 1 min, 50°C for 1 min and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 7 min.

The PCR mixture consisted of 8.75 ng of total DNA, 1x Colorless Go Taq[®] Flexi Buffer, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTPs, 0.2 μM ITS1F primer, 0.2 μM ITS4 primer, 0.2 units Go Taq[®] DNA Polymerase (Promega, Madison, USA) to a total reaction volume of 25 μL. The negative controls replaced DNA with MilliQ water to evaluate the presence of contaminants. All materials used for the preparation of reactions were

sterile and nuclease free. After amplification, the PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1.2% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 ng/ mL agarose) by stirring gently for 15 min; the products were then visualized under UV light. PCR reactions were sent to Macrogen (Seoul/ South Korea) for sequencing.

Identification, clustering analysis and diversity indexes of the filamentous fungi

All the nucleotide sequences of the ITS region (ITS1, 5.8S and ITS2) of each isolate were aligned using the software DNA Baser[®] 3.5.3. Nucleotide sequences obtained from the fungal isolates were identified by comparison against the GenBank database using a local alignment algorithm for nucleotide sequences (BlastN) (Altschul et al., 1990). The database sequences that exhibited the highest identity, query and score and the lowest e-values relative to our sequences allowed us to identify fungi to genus or species level. Identifications were confirmed by morphological taxonomy. The clustering analysis was constructed by importing the sequences of each fungal species into the MEGA 6.06[®] software and aligning them with reference sequences from GenBank using the ClustalW software. The Tamura-Nei substitution model and UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) analysis were used. The robustness of the clustering analysis was tested by bootstrap analysis ($\geq 50\%$) using a total of 1,000 interactions (Tejesvi et al., 2010).

The species diversity of the endophytic fungi was measured using the diversity indices which parameters are species richness and relative species abundance. The species evenness, which assesses the contribution of the individuals to the community, was also calculated.

The diversity indices used for the isolates were the Shannon Wiener index (H') (formula: $\sum [(ni/n) \ln (ni/n)]$), Simpson's diversity index ($1 - D$) (formula: $1 - [D = \sum (ni/n)^2]$) and Simpson's dominance index (D), where ni is the number of distinct species

(i) and (n) is the abundance of each species in the community. The equitability was calculated by the following formula: $E = H'/H_{max}$, where H' is the Shannon Wiener index and H_{max} is the \ln of n_i . The diversity analyses were performed using the software Past[®] version 2.15 (Hammer et al., 2001).

Morphological taxonomy

The identification of different fungi was primarily by molecular taxonomy. However, when there were uncertainties regarding identification, morphological taxonomy was also used. For this, morphological characteristics of the isolate were examined on corn meal agar (Himedia). Then, colony fragments were removed from the margin of developing cultures, transferred to slides containing lactophenol and visualized under a light microscope (Dialux 22EB, Leitz). Morphological characteristics of the isolate were then compared with previous descriptions available in the literature and taxonomic keys (Barnett and Hunter, 1972; Sutton, 1980; Hanlin, 1998; Seifert, 2011).

Preparation of plant samples and extraction of total DNA for diversity analysis using DGGE

The samples and surface disinfection was performed as described for the isolation of endophytic fungi.

The total DNA was extracted from leaves and roots with the commercial kit Nucleospin Soil[®] (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's recommendations. The DNA was then quantified using a Qubit 2.0[®] Fluorometer (Invitrogen) and standardized to 10 ng/ μ L DNA.

Partial amplification of the SSU rDNA region for DGGE analysis

The specific fungal primers FF390 (5' - CGA TAA CGA ACG AGA CCT - 3') and FR1 GC (5' - CCC CCG CGC GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GCC GAI CCA TTC AAT CGG TAI T - 3') (I = Inosine) described by Vainio and Hantula (2000) were used to amplify part of the SSU (small subunit or 18S) rDNA region. Three reactions of each sample (leaf and root) were conducted separately with the proper modifications required for each reaction. The amplifications were performed directly with the primer containing the GC clamp (nested) using the Eppendorf Mastercycler[®] thermal cycler (Eppendorf, Germany) programmed to perform an initial denaturation at 94°C for 4 min, followed by 35 cycles at 94°C for 1 min, 50°C for 1 min and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 10 min. The 50 µL amplification reaction contained: 1x Colorless Go Taq[®] Flexi Buffer, 0.25 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTPs, 0.2 µM FF390 primer, 0.2 µM FR1 GC primer, 0.5 mg mL⁻¹ of bovine serum albumin (BSA), 2.0 µL DMSO, 1.0 µL formamide, Go Taq[®] DNA polymerase 1.25 units (Promega, Madison, USA), 10 ng of total genomic DNA for each sample. The negative controls consisted of PCR reaction without genomic DNA to evaluate the presence of contaminants. All materials used in the preparation of the reactions were sterile and nuclease free. After amplification, the PCR products were analyzed by gel electrophoresis on a 1.2% agarose gel.

Comparative analysis between leaves and roots by DGGE

DGGE was performed in a C.B.S. Scientific[®] model 240 DGGE system for access the endophytic fungal communities from leaves and roots. The electrophoresis was performed on a 1 mm thick 6% polyacrylamide gel, with an acrylamide-bisacrylamide ratio of 37.5: 1, and the vertical denaturing gradient of urea and formamide from 35% to 55%. The running buffer was 1x TAE (40 mM Tris, 40 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 7.4). Approximately 50 ng of PCR product was used for

the DGGE analysis and mixed with the same volume of staining buffer (2% bromophenol blue, 2% xylene cyanol, 100% glycerol). The samples were separated at a constant temperature of 60°C for 16 hours at 100 V, stained with SYBR Gold (50 µg/mL) (Invitrogen) by stirring gently for 15 minutes, and visualized under UV light.

The DGGE profiles were analyzed using the software Bionumerics® 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Similarities in the banding patterns among the three replicates of leaves and roots were calculated based on the presence and absence of bands and expressed as a coefficient of similarity. The Dice similarity coefficient was used to compare the DGGE profiles. This similarity coefficient was calculated using the following formula: $D_{sc} = [2j/(a+b)]$, where a = number of bands or OTUs (Operational taxonomic units) in DGGE on lane 1, b = number of bands on lane 2, j = number of common bands in lanes 1 and 2, and $D_{sc} = 1$ indicates an identical profile. Dendrograms showing a cluster were constructed using the UPGMA. Diversity of the fungal communities was analyzed using the Richness index (S). Variable richness was estimated based on the binary matrix that was generated by software BioNumerics® version 5.1. BioNumerics® analyzes a scanned image of the gel where the presence of a band is coded as one (1) and absence as zero (0).

RESULTS

Identification and characterization of the filamentous endophytic fungi from G.

max.

A total of 229 isolates were obtained, with the majority (187 isolates) originating from the leaves and 42 isolated from the root (Table 1). Amplification of ITS rDNA region generated DNA fragments ranging from 530 to 908 bp in size. A list of the endophytic fungi isolated with their accession number (NCBI), genetic similarity to the sequences deposited (identity), accuracy (query) and origin can be found in

Table 1. Endophytic fungi isolated from the leaves and roots of *G. max*.

Isolated species	Leaves (%)*	Roots (%)*	Total (%)**	Order
<i>Alternaria arborescens</i>	4 (2.13)	-	4 (1.47)	Pleosporales
<i>Alternaria</i> sp.	-	1 (2.38)	1 (0.43)	Pleosporales
<i>Alternaria tenuissima</i>	-	1 (2.38)	1 (0.43)	Pleosporales
<i>Ampelomyces</i> sp.	17 (9.09)	-	17 (7.42)	Pleosporales
<i>Cercospora apii</i>	1 (0.53)	-	1 (0.43)	Capnodiales
<i>Cercospora beticola</i>	1 (0.53)	-	1 (0.43)	Capnodiales
<i>Cercospora guatemalensis</i>	2 (1.06)	1 (2.38)	3 (1.31)	Capnodiales
<i>Cercospora piaropi</i>	4 (2.13)	-	4 (1.47)	Capnodiales
<i>Cercospora</i> sp.	2 (1.06)	-	2 (0.87)	Capnodiales
<i>Cercospora zebrina</i>	1 (0.53)	-	1 (0.43)	Capnodiales
<i>Chaetomium funicola</i>	-	1 (2.38)	1 (0.43)	Sordariales
<i>Chaetomium</i> sp.	-	1 (2.38)	1 (0.43)	Sordariales
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	10 (5.34)	-	10 (4.36)	Capnodiales
<i>Cladosporium gossypiicola</i>	1 (0.53)	-	1 (0.43)	Capnodiales
<i>Cladosporium</i> sp.	1 (0.53)	-	1 (0.43)	Capnodiales
<i>Cochliobolus geniculatus</i>	1 (0.53)	1 (2.38)	2 (0.87)	Pleosporales
<i>Colletotrichum boninense</i>	6 (3.20)	-	6 (2.62)	Hypocreales
<i>Colletotrichum fruticola</i>	2 (1.06)	-	2 (0.87)	Hypocreales
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	23 (12.29)	-	23 (10.04)	Hypocreales
<i>Colletotrichum karstii</i>	1 (0.53)	-	1 (0.43)	Hypocreales
<i>Coniothyrium</i> sp.	1 (0.53)	-	1 (0.43)	Pleosporales
<i>Coprinellus radians</i>	2 (1.06)	-	2 (0.87)	Agaricales
<i>Curvularia</i> sp.	2 (1.06)	-	2 (0.87)	Pleosporales
<i>Curvularia trifolii</i>	-	1 (2.38)	1 (0.43)	Pleosporales
<i>Diaporthe heveae</i>	1 (0.53)	-	1 (0.43)	Diaporthales
<i>Diaporthe helianthi</i>	13 (6.95)	-	13 (5.67)	Diaporthales
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	3 (1.60)	-	3 (1.31)	Diaporthales
<i>Fusarium oxysporum</i>	2 (1.06)	21 (50.00)	23 (10.04)	Hypocreales
<i>Fusarium solani</i>	-	8 (19.04)	8 (3.49)	Hypocreales
<i>Fusarium</i> sp.	-	3 (7.14)	3 (1.31)	Hypocreales
<i>Gibberella zeae</i>	1 (0.53)	-	1 (0.43)	Hypocreales
<i>Guignardia mangiferae</i>	6 (3.20)	-	6 (2.62)	Botryosphaerales
<i>Leptosphaeria</i> sp.	2 (1.06)	-	2 (0.87)	Pleosporales
<i>Leptospora rubella</i>	1 (0.53)	-	1 (0.43)	Dothideales
<i>Macrophomina phaseolina</i>	-	1 (2.38)	1 (0.43)	Botryosphaerales
<i>Myrothecium inundatum</i>	1 (0.53)	-	1 (0.43)	Hypocreales
<i>Myrothecium</i> sp.	1 (0.53)	-	1 (0.43)	Hypocreales
<i>Neofusicoccum parvum</i>	2 (1.06)	-	2 (0.87)	Botryosphaerales
<i>Nigrospora oryzae</i>	1 (0.53)	-	1 (0.43)	Trichosphaerales
<i>Peyronellaea prosopidis</i>	1 (0.53)	-	1 (0.43)	Pleosporales
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1 (0.53)	-	1 (0.43)	Xylariales
<i>Pestalotiopsis vismiae</i>	1 (0.53)	1 (2.38)	2 (0.87)	Xylariales
<i>Phoma glomerata</i>	5 (2.67)	-	5 (2.18)	Pleosporales
<i>Phoma pomorum</i>	1 (0.53)	-	1 (0.43)	Pleosporales

continuation table 1.

Phoma sp.	55(29.41)	1 (2.38)	56 (24.45)	Pleosporales
Phomopsis sp.	4 (2.13)	-	4 (1.47)	Diaporthales
Saccharicola bicolor	1 (0.53)	-	1 (0.43)	Pleosporales
Stagonosporopsis cucurbitacearum	2(1.06)	-	2(0.87)	Pleosporales
Total	187(81.65%)	42(18.34%)	229	

* Isolated fungi followed by the specified percentage of each environment (leaf or root).

** Sum total of isolated fungi in both environments followed by the total percentage in both environments.

Supplementary Material 1.

The genetic identity was considered co-specific for the majority of the isolates when 99 and 100% identities were reached; the only exceptions were *Peyronellaea prosopidis* (98% identity) and *Saccharicola bicolor* (96% identity). All the isolate characterizations were confirmed morphologically whenever reproductive structures could be confirmed. Six isolates were identified as *Phoma* sp. by ITS sequencing and did not produce reproductive structures when cultured on corn meal agar. In this case, identification was based solely on ribosomal sequences. All the fungal sequences corresponding to the rDNA-ITS regions obtained in this study and their taxonomic identifications were deposited in GenBank (table 1 and Supplementary Material 1).

Analysis of diversity and clustering

All 229 isolates (Table 1) belonged to species of the phyla Ascomycota and Basidiomycota, and the isolates were represented by three classes, namely, Agaricomycetes (2 isolates, 0.87%), Dothideomycetes (132 isolates, 57.64%) and Sordariomycetes (95 isolates, 41.48%), and were distributed over 11 orders, including Agaricales (2 isolates), Botryosphaeriales (9 isolates), Capnodiales (24 isolates), Diaporthales (21 isolates), Dothideales (1 isolate), Hypocreales (70 isolates), Pleosporales (92 isolates), Sordariales (2 isolates), Trichosphaeriales (1 isolates), and Xylariales (3 isolate). In the leaves, the most prevalent order of fungi was Pleosporales, whereas in the roots, Hypocreales predominated. Members of orders of fungi listed

above were present in the leaves, with the exception of the Sordariales, which was only found in the roots (Figure 1). In leaves, the most abundant genera and species were *Phoma* sp. (29.41%), followed by *Colletotrichum gloeosporioides* (12.29%), *Ampelomyces* sp. (9.09%) and *Diaporthe helianthi* (6.95%). In the roots, the most abundant fungi were *Fusarium oxysporum* (50%), followed by *Fusarium solani* (19.04%) (Table 1).

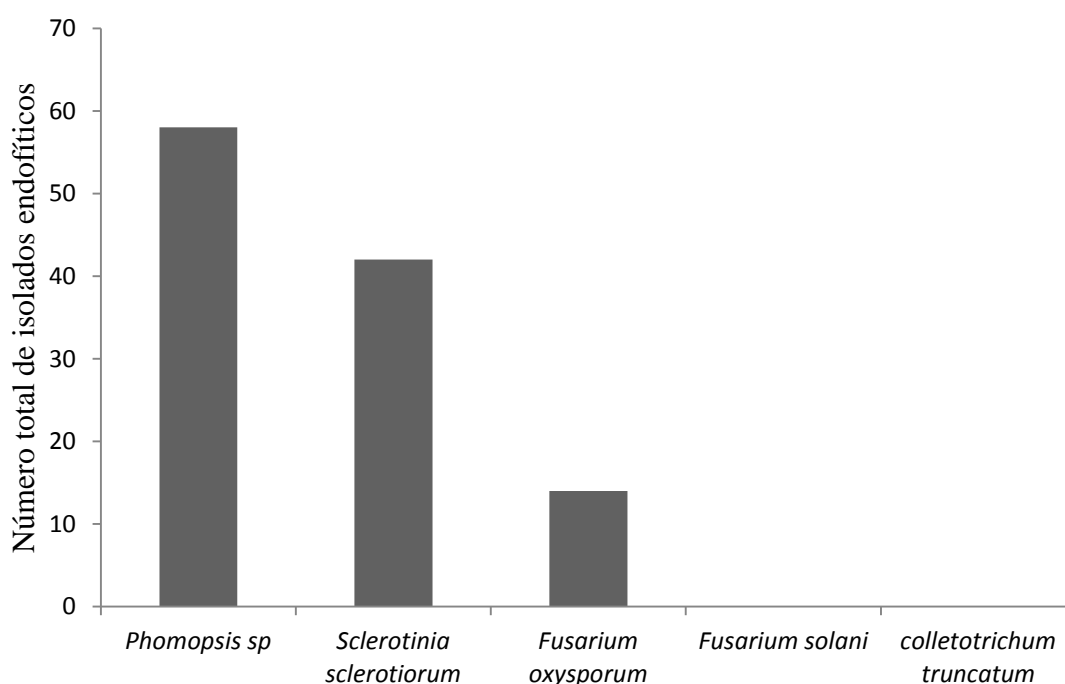


Figure 1: Distribution of the endophytic fungal orders isolated from the leaves and roots of *Glycine max.*

The diversity of endophytic fungi was observed at the level of their richness (number of taxa = S) and abundance (number of isolates or individuals), and there were differences between the tissues analyzed. There was a greater species richness and abundance in the leaves as compared to roots (S = 40 vs. 13, individuals = 187 vs. 42). The Simpson's, Shannon-Wiener, Dominance, and Equitability of fungi isolated in the leaves and roots were calculated. Highest diversity values were found in leaves compared to roots: Simpson index (0.876 and 0.702), Shannon-Wiener index (2.777 and 1.741) and

Equitability (0.752 and 0.678). Only the Dominance index had a value where roots were higher than leaves (0.297 and 1.123) (Table 2).

Table 2. Analysis of the diversity of fungal isolates from *G. max*.

	Leaves	Roots
Taxa S	40	13
Individuals	187	42
Dominance D	0.123	0.297
Simpson 1-D	0.876	0.702
Shannon H	2.777	1.741
Equitability J	0.752	0.678

Diversity indices calculated by software PAST version 2.5.

The clustering analysis shows the relationship between the different species isolated from the leaves and roots of *G. max* (Figure 2). The clustering analysis was constructed using as out-group a fungus belonging to the Basidiomycota (*Psilocybe cubensis*) because most endophyte isolates obtained from *G. max* (99.12%) belonged to the Ascomycota. The values listed from left to right next to each cluster node correspond to the bootstrap values performed using 1,000 replications, and the branches shown correspond to values $\geq 70\%$, being fungi grouped according to their Order. In this clustering analysis, the fungus *Leptospora rubella* (Dothideales order) was clustered among the species of the order Pleosporales, showing a strong genetic closeness to this order.

Analysis of the DGGE profiles

The molecular profiles of the *G. max* endophytic fungi obtained by amplification of the SSU ribosomal region are shown in Figure 3. Richness analysis was performed by evaluating the number of bands in each sample (leaves or roots) by DGGE to indicate variability in the population of fungi between the leaves and roots of the plant. In total 17 bands were found in the leaf samples and 39 bands in the roots. However, four abundant bands were identified among replicates from leaves and twelve abundant

bands from roots (Figure 3 and Table 3). The cluster analysis performed by the UPGMA method showed low similarity between the two clades (leaves and roots), although in the leaves, there was greater similarity and uniformity than in the roots (Figure 3).

DISSCUSSION

To study and identify endophytic representatives of this diverse group fungal, it is important to use molecular techniques and classical taxonomy (Garro et al., 1999; Sun and Guo, 2012). The use of molecular techniques alone, such as a sequence analysis of the ITS region, can be hampered by the presence of ambiguous sequences that were deposited in genomic databases, as observed by Yamamoto and Bibby (2014), who used Genbank sequences to show that 15.3% of the fungal rDNA ITS sequences analyzed were ambiguous as to the fungal species. However, the rDNA ITS region is regarded as the best region for identification at the fungal species level and was designated as a fungal barcode (Schoch et al., 2012). In turn, identification using morphological taxonomy only is hampered by the presence of a vast diversity of endophytic fungi. Many of the isolated endophytic fungi do not sporulate in culture and are therefore designated as Mycelia sterilia.

In our study, we used morphological taxonomy to confirm the molecular taxonomy and distinguish situations where the same sequence showed high levels of identity with sequences described for both sexual and asexual stages of some fungal species, including for asexual stage *Colletotrichum gloeosporioides* from the sexual stage *Glomerella cingulata*, asexual stage *Phyllosticta capitalensis* from the sexual stage *Guignardia mangiferae*, and sexual stage *Botryosphaeria parva* from the asexual form *Fusicoccum parvum*. In another example, the sequences showed 100% identity with sequences belonging to different genera of fungi, such as *Curvularia* sp., *Bipolaris*

Figure 2: UPGMA cluster analysis of endophytic fungi associated with *Glycine max*. Cluster analysis was inferred using the UPGMA method, showing the relationship between endophytic fungi based on the ITS1, 5.8S and ITS2 region of rDNA of all taxa isolated. The evolutionary distances were calculated using the Tamura-Nei model. An individual of each taxon isolated was used in the construction of the clustering together with a reference sequence retrieved from GenBank (●). The Bootstrap numbers shown on the left ($\geq 70\%$) were obtained using 1000 replicates. The fungus *Psilocybe cubensis* was used as outgroup for the construction of the tree. The horizontal scale indicates the level of dissimilarity.

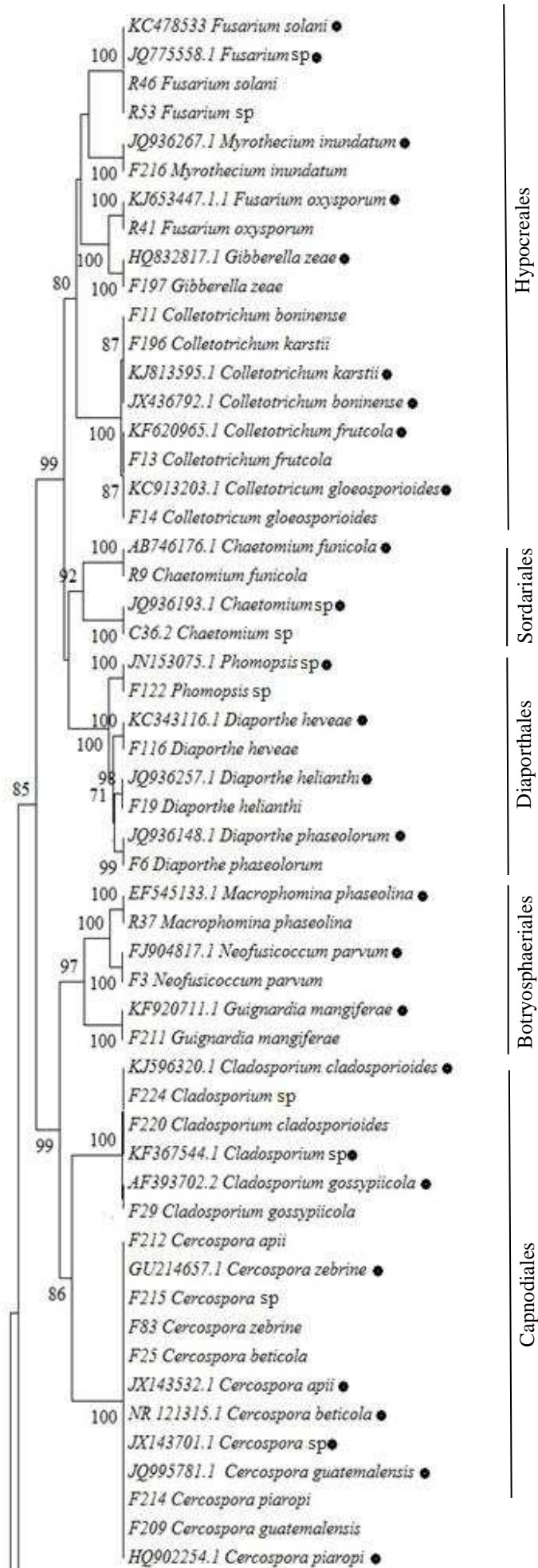
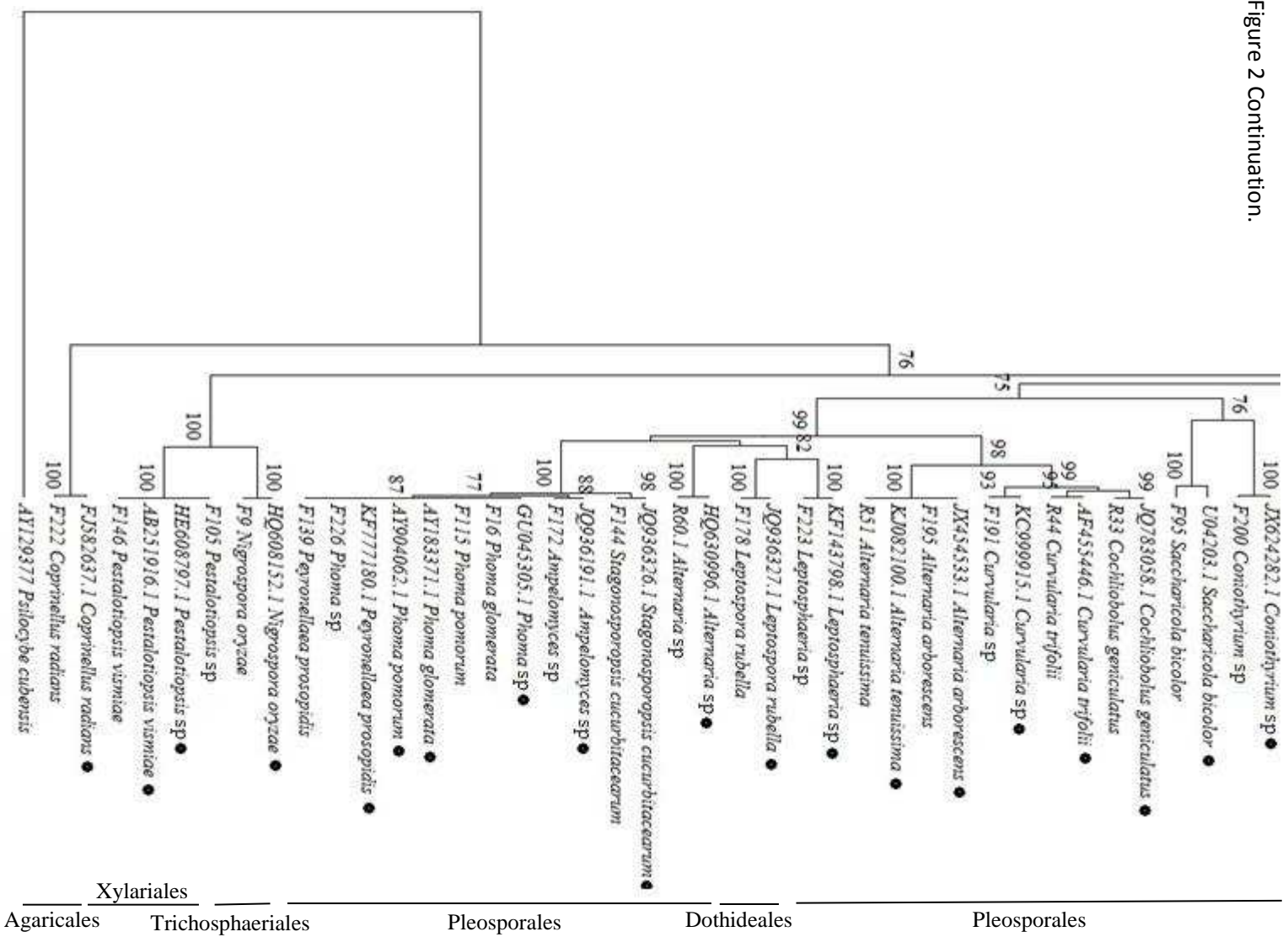


Figure 2 Continuation.



sp. and *Drechslera* sp., and in these situations, it was necessary to use morphological taxonomy to accurately identify the genus and/or species isolated.

Table 3. Richness from *G. max* leave and roots analysis by DGGE profile.

	Leaves			Roots		
	L1	L2	L3	R3	R2	R1
Richness	6	6	5	13	12	14

The richness was analyzed by the presence of bands in the electrophoretic profile on DGGE gel and was obtained using binary matrix generated by gel analysis in BioNumerics 5.1 software. L1 to L3 are repetitions of the leaves and R1 to R3 are repetitions of the roots.

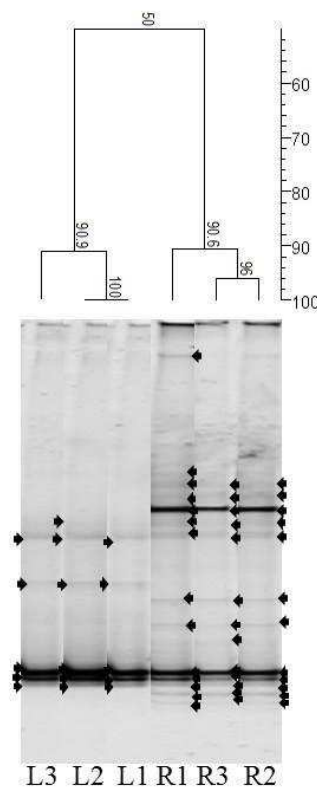


Figure 3. Electrophoretic profile of ribosomal sequences corresponding to part of the Small Subunit of rRNA (SSU) of *G. max* leaves and roots obtained by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). The profiles were obtained after amplification using oligonucleotides (FR1GC and FF390) specific to fungi (Vainio and Hantula, 2000). Were collected 10 whole plants, randomly, and a total of 50 leaves and all roots were randomly separated from plants and disinfected. Ten grams of each sample was used for extraction and amplification of DNA. All the process was repeated 3 times (L1, L2 and L3 for leaves and R1, R2 and R3 for roots). The dendrograms were generated based on the UPGMA method by Bionumerics 5.1 with denaturing gradient from 35 to 55%. The vertical scale indicates the level of similarity. The black arrows show bands.

The successful isolation of endophytic fungi requires the correct disinfection of the surface of the leaves to eliminate epiphytic microorganisms (Sun and Guo, 2012). Disease-free plants were used and at the time of disinfection, it was ensured that no symptoms of microbial diseases were present in the leaves or roots. The disinfection process indicated that all fungal isolates were of endophytic origins. On another note, the size of the plant fragments and number of samples influence the isolation and diversity of the isolated fungal community (Sun and Guo, 2012); however, it is difficult to establish a relationship between the isolated fungi and those described in other studies because many factors can influence isolation, such as the sample number, plant age and nutritional and plant water status.

In this study and previous studies on the isolation and identification of endophytic fungi from soybean leaves, genera such as *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Nigrospora* sp., *Phomopsis* sp., (Larran et al., 2002 and Leite et al., 2013) and *Colletotrichum* sp. (Pimentel et al., 2006; Leite et al., 2013; Tenguria and Firodiya, 2013) were isolated. Among these genera, the species of the genus *Alternaria* were also present among the isolates of leaf endophytic fungi in several plant species including plants with medicinal qualities (Anitha et al., 2013 and Goveas et al., 2011); *Pinus halepensis* (Botella and Diez, 2011); *Cannabis sativa* (Gautam et al., 2012); *Taxus globosa* (Orduna et al., 2011); *Bletilla ochracea* (Tao et al., 2008) and algae (Zuccaro et al., 2008).

In the roots, there was a dominance of the order Hypocreales, and the species were represented by *F. oxysporum* (50%), *F. solani* (19.04%) and *Fusarium* sp. (7.14%) (Figure 1). *F. oxysporum* was also isolated from leaves with low abundance, accounting for 1.06% of the total species isolated in the leaves (Table 1). Pathogenic fungi are commonly isolated following endophyte extraction processes. The *Fusarium* case is

particularly interesting because non-pathogenic isolates are frequently found as endophytes from different plants (Gotz et al., 2006; Sun et al., 2014). *Fusarium* species has been isolated from various parts of the soybean plant (Impullitti and Malvick, 2013; Kumar and Firodiya, 2013; Leite et al., 2013; Pimentel et al., 2006; Rathod and Pawar, 2013; Roy et al., 2000). However, it is undetermined whether these isolates are non-pathogenic and beneficial to the plant or if they are latent pathogens.

Endophytic *Fusarium* strains obtained in our study should be further tested for their ability to produce disease symptoms in *G. max* and whether they protect the plant against pathogenic isolates. However, the use of non-pathogenic *Fusarium* endophytes to control pathogens must be treated with care. Ma et al. (2010) showed the transfer of just two chromosomes between *F. oxysporum* strains can create a pathogenic strain from a non-pathogen. The mechanism responsible for the transfer of these chromosomes is currently unclear. However, it is important to consider that exchange can occur between two *F. oxysporum* isolates colonizing the same plant.

The diversity indices calculated for endophytic fungi isolates of *G. max* leaves and roots are shown in Table 2. The Simpson's index estimates the probability that two randomly selected individuals from a community belong to different species (Simpson, 1949). In our results, the index calculated was greater for the leaves than that for the roots (0.876 and 0.702). The Shannon-Wiener index assesses species richness and relative species abundance, ranging from 0 in communities with only one species to high values in communities with many species, which comprise a few individuals each. The highest index value was found in the leaves rather than in roots (2.777 and 1.741), demonstrating the leaves have a more diverse fungal community compared the roots. Equitability reflects the contribution of an individual to the community, ranging between 0 and 1 where 1 represents maximum equitability (i.e. when the proportion of

all species is similar). Again, the highest value was found in the leaves (0.752) than in roots (0.678). This suggests that there is greater uniformity in the leaves than in roots. For the Dominance index, which refers to the dominance of one or more species in a given community, the roots had a higher calculated index than the leaves (0.297 and 0.123 respectively). This is likely due to the isolation of *F. oxysporum* e *Fusarium solani* in the roots (Table 1).

The DGGE technique can be widely used, including for studying changes in microbial communities in natural environments and environments subjected to stress conditions or for monitoring specific microorganisms in a natural environment (Rosado and Duarte, 2002). In addition to its use in characterizing complex communities, DGGE is also applied to the monitoring of microorganisms from environmental samples to track the dynamics of specific populations according to environmental changes or operational conditions of a system (Doung et al., 2006; Kirk et al., 2004; Vainio and Hantula, 1999; Xiaoxu and Fuqiang, 2011). The use of the FF390 and FRCG primers generated fragments of approximately 400 bp of the SSU region, which is a desirable size for good resolution on a DGGE gel, beyond these primers are specific for fungi (Vainio and Hantula, 2000). Unlike the observation of greater fungal richness and diversity in the leaves than in the roots for the cultivable fungi isolated in this study, the analysis of the DGGE results through the evaluation of bands suggests the opposite i.e. greater fungal species richness in the roots compared to the leaves (17 bands in the leaves and 39 bands in the roots) (Table 3). The identification of these bands (or OTUs - operational taxonomic units) would be necessary to determine the species that are present in these communities as well as their distribution.

As the roots are in an environment where populations of fungi are numerous, is possible that this interferes with the increased richness values obtained when roots are

compared to the leaves by DGGE. According to Asan et al. (2010), high concentrations of fungi were isolated from soil samples, i.e., 170.6×10^4 CFU/g, compared to just 737 CFU from air samples. Additionally, this study isolated 33 species belonging to 16 genera in soil with the most isolated genus being *Penicillium*, followed by *Fusarium* and *Aspergillus*. Comparatively, in air samples, the most isolated genus was *Alternaria*, followed by *Cladosporium* and *Phoma*.

A comparison between the endophytic fungi populations isolated from the leaves and roots of the soybean plant revealed a tendency of certain species of fungi to colonize different parts of the plant. *Phoma* sp. (29.41%), *Colletotrichum gloeosporioides* (12.29%) and *Ampelomyces* sp. (9.09%) were the most predominant fungi in leaves, whereas *Fusarium oxysporum* (50%) and *Fusarium solani* (19.04%) were the most predominant in the roots. The leaves had the highest species richness for the isolated fungi compared to the roots ($S = 40$ and 13), however, the richness between the leaves and roots analyzed through the isolation of endophytic fungi and molecular profiles generated by DGGE showed inverse values. For example, the richness index generated by the number of bands showed greater value in the roots than in the leaves ($S = 39$ and 17). In addition, the UPGMA analysis of DGGE profile showed the formation of distinct clustering for endophytic fungi community of roots and leaves. Thus, the differences between fungal populations of the leaves and roots are obvious and are shown by both fungal isolation and molecular profiling analysis. Notably, according Bayman (2006), the best strategy for endophytic fungi sampling is to use a combination of both methods.

Genera such as *Alternaria*, *Cercospora*, *Fusarium* and *Phomopsis* are frequently isolated from soybean, as demonstrated by Roy et al. (2000) and in our study; however, the genera *Ampelomyces*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Guignardia* and

Phoma are also fairly representative of the isolates in this study. According to Azevedo (2014), studies on the biodiversity of endophytic fungi in their hosts help develop strategies for future biotechnological applications, such as the production of enzymes by Phoma sp. and Phomopsis sp. (Suryanarayanan et al., 2012), antibiotics by Guignardia mangiferae (Mei et al., 2012) and antitumor drugs by Pestalotiopsis sp. and Phomopsis sp. (Baker and Satish, 2012). Saikkonen et al. (2010) performed a literature review on the relationship of endophytic fungi and their hosts with herbivory and reported that the presence of endophytic fungi can increase resistance to herbivory through the production of alkaloids and/or mycotoxins. According to Porrás-Alfarro and Bayman (2011), certain genera have a preference for particular regions of the plant, which was also observed in our study, as indicated by the high rates of Fusarium isolates (which have phytopathogenic species in the roots). As shown by Promputtha et al. (2010), genera such as Colletotrichum sp., Fusarium sp., Phomopsis, and Leptosphaeria and species such as Colletotrichum gloeosporioides and Guignardia mangiferae are important endophytic fungi that start producing various enzymes after leaf senescence, and each species or genus produces specific enzymes at a particular decomposition stage of the plant material; together, these activities complete a sequence of stages culminating in the degradation of the plant.

CONCLUSION

We conclude that the diversity observed following isolation of endophytic fungi in Glycine max is greater in leaves compared to roots. Conversely, the fungal communities sampled by DGGE analysis showed that the endophytic fungi community of leaves is different of roots. Among the endophytic fungi isolated from G. max, a high dominance was observed in the roots of Fusarium species, which can be worrisome because this species is causing large outbreaks of disease in plant species. For the

isolated fungal species, we found that molecular identification techniques based on ITS region and classical taxonomy of fungi isolated are complementary and together, these techniques allow for accurate identification of endophytic fungi.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for granting the doctoral scholarship to the first author, FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for financing of this research. We would like to thank also the researcher Júlio Cesar Delvaux for helping with the development of specialized techniques and analyzing the results.

REFERENCES

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403–410.
- Anitha D, Vijaya T, Pragathi D, Reddy NV, Mouli KC, Venkateswarulu N, Bhargav DS. Isolation and characterization of endophytic fungi from endemic medicinal plants of Tirumala hills. *Int J LifeSc Bt* 2013; 2(3):336-374.
- Asan A, Okten SS, Sen B. Airborne and soilborne microfungi in the vicinity Hamitabat Thermic Power Plant in Kirklareli City (Turkey), their seasonal distributions and relations with climatological factors. *Environ. Monit. Assess* 2010; 164(1-4): 221-231, <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-009-0887-8>
- Azevedo JL, Endophytic fungi from Brazilian tropical hosts and their biotechnological applications. In: Kharwar RN, Upadhyay R, Dubey N, Raghuwanshi R, editors. *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. India: Springer; 2014. p. 17-22.

- Backman PA, Sikora RA. Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control* 2008; 46(1): 1-3, <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.biocontrol.2008.03.009>
- Baker S, Satish S. Endophytes: Natural warehouse of bioactive compounds. *Drug Invent Today* 2012; 4(11): 548-533.
- Barnett HL, Hunter BB. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th ed. Saint Paul: APS Press; 1972.
- Bayat F, Mirlohi A, Khodambashik M. Effects of endophytic fungi on some drought tolerance mechanisms of tall fescue in a hydroponics culture. *Russ J Plant Physl* 2009; 56(4): 510-516, <http://dx.doi.org/10.1134/S1021443709040104>
- Bayman P. 2006. Diversity, scale and variation of endophytic fungi in leaves of tropical plants. In: Bailey MJ, Lilley AK, Timms-Wilson TM, editors. *Microbial Ecology of Aerial Plant Surfaces*. Oxfordshire: CABI; 2006; p. 37–50.
- Botella L, Diez JJ, 2011. Phylogenic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Divers* 2011, 47: 9-18, <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-010-0061-1>
- Collado J, Platas G, Paulus B, Bills GF. High-throughput culturing of fungi from plant litter by a dilution-to-extinction technique. *FEMS Microbiol Ecol* 2007; 60: 521-533.
- Costa LEO, Queiroz MV, Borges AC, Moraes CA, Araújo EF. Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Braz. J. Microbiol* 2012; 43(4): 1562-1575, <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838220120004000041>
- Dalal JM, Kulkarni NS. Population variance and diversity of endophytic fungi in soybean (*Glycine max* (L) Merril). *RRJBS* 2014; 3(4): 33-39.

Duong LM, Jeewon R, Lumyong S, Hyde KD. DGGE coupled with ribosomal DNA gene phylogenies reveal uncharacterized fungal phylotypes. *Fungal Divers* 2006; 23:121-138.

Esposito E, Azevedo JL. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. 2th ed. Caxias do Sul: Edusc, 2004.

Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 1993; 2(2):113-118.

Garro P, Gene J, Alberto MS. Developments in Fungal Taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(3): 454–500.

Gautam AK, Kant M, Thakur Y. Isolation of endophytic fungi from *Cannabis sativa* and study their antifungal potential. *Archives of phytopathology and plant protection* 2013; 46(6): 627-635, <http://dx.doi.org/10.1080/03235408.2012.749696>

Gotz M, Nirenberg H, Krause S, Wolters H, Draeger S, Buchner A, Lottmann J, Berg G, Smalla K. Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. *FEMS Microbiol Ecol* 2006; 58: 404-413, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00169.x>

Goveas SW, Madtha R, Nivas SK, D`Souza L. Isolation of endophytic fungi from *Coscium fenestratum* a red listed endangered medicinal plant. *Eurasia J Biosci* 2011; 5: 48-53, <http://dx.doi.org/10.5053/ejobios.2011.5.0.6>

Gundel PE, Martínez-Guersal MA, Batista WB, Ghera CM. Dynamics of *Neotyphodium* endophyte infection in ageing seed pools: incidence of differential viability loss of endophyte, infected seed and non infected seed. *Ann Appl Biol* 2010; 156(2): 199-209, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7348.2009.00379.x>

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD, 2001. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 1-9.

Hanlin RT. Combined Keys to Illustrated Genera of Ascomycetes vols. I & II. 1th ed. Saint Paul: APS Press; 1998.

Impullitti AE, Malvick DK. Fungal endophyte diversity in soybean. *J Appl Microbiol* 2013; 114(5): 1500-1506, <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12164>

Jasim B, Joseph AA, John CJ, Mathew J, Radhakrishnan EK. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from the rhizome of *Zingiber officinale*. *Biotech* 2014; 4: 197-204, <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-013-0143-3>

Ji SH, Gururani MA, Chun S. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiol Res* 2014; 169: 83-98, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.06.003>

Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT. Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods* 2004; 58(2): 169-188, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2004.04.006>

Krings M, Taylor TN, Hass H, Kerp H, Dotzler N, Hermsen EJ. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytol* 2007; 174(3): 648–657, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02008.x>

Kumar S, Kaushik N. Isolation , characterization and bioactivity of endophytic fungi from *Withania somnifera*. *Indian Phytopath* 2013; 66: 322-323.

Larran S, Rollan C, Angeles HB, Alippi HE, Urrutia MI. Endophytic fungi in healthy soybean leaves. *Invest Agr.: Prod Prot* 2002; 17(1): 174 – 178.

Lee K, Pan JJ, May G. Endophytic *Fusarium verticillioides* reduces disease severity caused by *Ustilago maydis* on maize. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 299(1): 31-37, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01719.x>

Leite TS, Cnossen-Fassoni A, Pereira OL, Mizubuti ESG, Araujo EF, Queiroz MV. Novel and highly diverse fungal endophytes in soybean revealed by the consortium of two different techniques. *J Microbiol* 2013; 51: 56-69, <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-013-2356-x>

Lodge DJ, Fisher PJ, Sutton BC. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia* 1996; 88:733–38.

Ma LJ, van der Does HC, Borkovich KA, Coleman JJ, Daboussi MJ, Di Pietro A, Dufresne M, Freitag M, Grabherr M, Henrissat B, Houterman PM, Kang S, Shim WB, Woloshuk C, Xie X, Xu JR, Antoniw J, Baker SE, Bluhm BH, Breakspear A, Brown DW, Butchko RA, Chapman S, Coulson R, Coutinho PM, Danchin EG, Diener A, Gale LR, Gardiner DM, Goff S, Hammond-Kosack KE, Hilburn K, Hua-Van A, Jonkers W, Kazan K, Kodira CD, Koehrsen M, Kumar L, Lee YH, Li L, Manners JM, Miranda-Saavedra D, Mukherjee M, Park G, Park J, Park SY, Proctor RH, Regev A, Ruiz-Roldan MC, Sain D, Sakthikumar S, Sykes S, Schwartz DC, Turgeon BG, Wapinski I, Yoder O, Young S, Zeng Q, Zhou S, Galagan J, Cuomo CA, Kistler HC, Rep M. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 2010; 464:367–373, <http://dx.doi.org/10.1038/nature08850>

Ma LJ, Geiser DM, Proctor RH, Rooney AP, O'donnell K, Trail F, Gardiner DM, Manners JM, Kazan K. *Fusarium* pathogenomics. *Ann Rev Microbiol* 2013; 67:399-416, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>

Mei WL, Zheng B, Zhao YX, Zhong HM, Chen XLW, Zeng YB, Dong WH, Huang JL, Proksch P, Dai HF. Meroterpenes from endophytic fungus A1 of mangrove plant *Scyphiphora hydrophyllacea*. *Mar Drugs* 2012; 10: 1993-2001, <http://dx.doi.org/10.3390/md10091993>

Nalini MS, Sunayana N, Prakash HS. Endophytic fungal diversity in medicinal plants of Western Ghats, India. *Int. J. Biodivers* 2014; 2014: 1-9, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/494213>

Neto PASP, Azevedo JL, Araújo WL. Micro-organismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 2002, 29: 62-76.

Orduna FNR, Sanchez RAS, Bustamante ZRF, Rodriguez JNG, Cotera LBF. Diversity of endophytic fungi of *Taxus globosa* (Mexican yew). *Fungal Divers* 2011; 47: 65-74, <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-010-0045-1>

Athman SY, Dubois T, Coyne D, Gold CS, Labuschagne N, Viljoen A. Effect of *Fusarium oxysporum* on host preference of *Radapholus similis* to tissue culture bananas plants. *J Nematol* 2006; 38(4):455-460

Paulus B, Gadek P, Hyde KD. Estimation of microfungal diversity in tropical rainforest leaf litter using particle filtration: The effects of leaf storage and surface treatment. *Mycol Res* 2003; 107(6): 748-756.

Photita W, Lumyong S, Lumyong P, McKenzie EHC, Hyde KD. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens?. *Fungal Divers* 2004; 16:131-140.

Pimentel IC, Blanco CG, Gabardo J, Stuart RM, Azevedo JL. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) under different environmental conditions. *Braz Arch Biol Technol* 2006; 49(5): 705-711, <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132006000600003>

Porrás-Alfaro A, Bayman P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annu Rev Phytopathol* 2011; 49: 24.1-24.25, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081831>

Promptuttha I, Hyde KD, McKenzie EHC, Peberdy JF, Lumyong S. Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes?. *Fungal Divers* 2010; 41(1): 89-99, <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-010-0024-6>

Promptuttha I, Lumyong S, Dhanasekaran V, McKenzie EH, Hyde KD, Jeewon R. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microb Ecol* 2007; 53(4): 579-590.

Rathod LR, Pawar NB. In vitro seed treatment of fungicides for the control of seed borne fungi of soybean variety Durga. *Global Research Analysis* 2013; 2(10): 15-16.

Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman RS. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol* 2009; 182(2): 314-330, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x>

Rosado AS, Duarte GF. Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana. In: Mello IS, editors. *Genética e melhoramento de microrganismos*. São Paulo:EdUSP; 2002. p. 97-129.

Rosenblueth M, Martínez-Romero, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *MPMI* 2006; 19(8): 827-837, <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-19-0827>

Roy KW, Baird RE, Abney TS. A review of soybean (*Glycine max*) seed, pod, and flower mycofloras in North America, with methods and key for identification of selected fungi. *Mycopathol* 2000; 150: 15-27.

Saikkonen K, Saari SS, Helander M. Defensive mutualism between plants and endophytic fungi? *Fungal Divers* 2010; 41: 101-113, <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-010-0023-7>

Schoch CJ, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque A, Chen W, Consortium FB. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a

universal DNA barcode marker for fungi. PNAS 2012; 109(16): 6241–6246, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1117018109>

Schulz B, Draeger WS, Aust HJ. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. Mycol Res 1993; 97(12):1447-1450, [http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80215-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80215-3)

Schulz B, Guske S, Dammann U, Boyle C. Endophyte host interactions II. Defining symbiosis of the endophyte host interaction. Symbiosis 1998; (25): 213–227.

Schulz B, Rommert AK, Dammann U, Aust HJ, Strack D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism?. Mycol Res 1999; 103(10): 1275-1283, <http://dx.doi.org/10.1017/S0953756299008540>

Sedyama T. Tecnologias de produção e uso da soja. Londrina: Editora Mecemas; 2009.

Seifert KA, Morgan-Jones G, Gams W, Kendrick B. The genera of Hyphomycetes. 2th ed. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre; 2011.

Sieber TN. Endophytic fungi in forest trees: Are they mutualists? Fungal Biol Rev 2007; 21(2-3): 75-89, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2007.05.004>

Simpson EH. Measurement of diversity. Nature 1949; 163: 688–688.

Stone JK, Bacon W, White JF. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon CW, White JF, editors. Microbial Endophytes. New York: Dekker; 2000.

Sun SS, Chen XM, Guo SX. Analysis of endophytic fungi in roots of *Santalum album* linn. and its host plant *Kuhnia rosmarinifolia* Vent. J Zhejiang Univ Sci B 2014; 15(2): 109-115, <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.B1300011>

Sun X, Guo LD. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques, *Mycology* 2012; 3(1): 65-76, <http://dx.doi.org/10.1080/21501203.2012.656724>

Sunitha VH, Devi DN, Srinivas C. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolates from medicinal plants. *World J. Agric. Sci* 2013; 9(1): 01-09, <http://dx.doi.org/10.5829/idosi.wjas.2013.9.1.72148>

Suryanarayanan TS, Thirunavukkarasu N, Govindarajulu MB, Gopalan V. Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts, *Fungal Divers* 2012; 54(1): 19-30, <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-012-0168-7>

Sutton BC. *The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata.* 1th ed. Kew: CMI; 1980.

Tao G, Liu ZY, Hyde K D, Yu ZN. Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). *Fungal Divers* 2008; 33: 101-122.

Tejesvi MV, Ruotsalainen AL, Markkola AM, Pirttilä AM. Root endophytes along a primary succession gradient in northern Finland. *Fungal Divers* 2010; 41: 125-134, <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-009-0016-6>

Tenguria RK, Firodiya A. Diversity of endophytic fungi in leaves of *Glycine max* (L.) merr. From central region of Madhya Pradesh. *WJPPS* 2013; 2(6): 5928-5934.

Unterseher M, Schnittler M. Dilution to extinction cultivation of leaf inhabiting endophytic fungi in beech (*Fagus sylvatica* L.) - different cultivation techniques influence fungal biodiversity assessment. *Mycol Res* 2009; 113(5): 645-654, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycres.2009.02.002>

USDA (United States Department of Agriculture), available in: <http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>. Accessed 08/04/2015.

Vainio E. J, Hantula J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycol Res* 2000; 104(8): 927-936, <http://dx.doi.org/10.1017/S0953756200002471>

White JrJF, Morgan-Jones G, Morrow AC. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. *Agric Ecosystems Environ* 1993; 44(1-4): 13-37, [http://dx.doi.org/10.1016/0167-8809\(93\)90037-P](http://dx.doi.org/10.1016/0167-8809(93)90037-P)

White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. New York: Academic Press. 1990. p. 315-322.

Xiaoxu F, Fuqiang S. Dynamics of fungal diversity in different phases of *Pinus* litter degradation revealed through denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) coupled with morphological examination. *Afr J Microbiol Res* 2011; 5(31): 5674-5681, <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR11.999>

Yamamoto N, Bibby K. Clustering of Fungal community internal transcribed spacer sequence data obscures taxonomic diversity. *Environ Microbiol* 2014; 16: 2491-2500, <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12390>

Zinniel DK, Lambrecht P, Harris NB, Feng Z, Kuczarski D, Higley P, Ishimaru CA, Arunakumari A, Barletta RG, Vidaver AK. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(5): 2198-2208, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.5.2198-2208.2002>

Zuccaro A, Schoch CL, Spatafora JW, Kohlmeyer J, Draeger S, Mitchell JL. Detection and identification of fungi intimately associated with the brown seaweed *Fucus serratus*. *Appl and Environ Microbiol* 2008; 74: 931-941, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01158-07>

Supplementary Material 1: Characterization of the endophytic fungi from *G. max*.

Isolate	Access number deposited	Closest match in NCBI*	Accession number	Maximal identity (%)	Sequence coverage (%)
F205	KM979854	<i>Alternaria arborescens</i>	JX454533.1	100	100
F185	KM979936	<i>Alternaria arborescens</i>	JX454533.1	100	100
F195	KM979806	<i>Alternaria arborescens</i>	JX454533.1	100	100
F198	KM979953	<i>Alternaria arborescens</i>	JX454533.1	100	100
R60.1	KM979815	<i>Alternaria</i> sp.	HQ630996.1	99	100
R51	KM979980	<i>Alternaria tenuissima</i>	JN634833.1	100	100
F172	KM979802	<i>Ampelomyces</i> sp.	JQ936191.1	100	100
F109	KM979823	<i>Ampelomyces</i> sp.	JQ936191.1	100	100
F192	KM979843	<i>Ampelomyces</i> sp.	JQ936191.1	100	100
F156	KM979849	<i>Ampelomyces</i> sp.	JQ936191.1	100	100
F78	KM979911	<i>Ampelomyces</i> sp.	JQ936191.1	100	100
F161.1	KM979941	<i>Ampelomyces</i> sp.	JQ936191.1	100	100
F225	KM979934	<i>Ampelomyces</i> sp.	JQ936191.1	100	100
F117.1	KM979937	<i>Ampelomyces</i> sp.	JQ936191.1	100	100
F154	KM979956	<i>Ampelomyces</i> sp.	JQ936191.1	100	100
F169	KM979855	<i>Ampelomyces</i> sp.	JQ936092.1	100	100
C105	KM979871	<i>Ampelomyces</i> sp.	JQ936092.1	100	100
F112	KM979901	<i>Ampelomyces</i> sp.	JQ936092.1	100	100
F151	KM979836	<i>Ampelomyces</i> sp.	JQ936092.1	100	100
F132	KM979838	<i>Ampelomyces</i> sp.	JQ936092.1	99	100
F138	KM979876	<i>Ampelomyces</i> sp.	JQ936092.1	100	100
F170	KM979938	<i>Ampelomyces</i> sp.	JQ936092.1	100	100
F164	KM979992	<i>Ampelomyces</i> sp.	JQ936092.1	100	100
F212	KM979955	<i>Cercospora apii</i>	JX143531.1	100	100
F25	KM979810	<i>Cercospora beticola</i>	AY840527.2	100	100
F209	KM979778	<i>Cercospora guatemalensis</i>	JQ995781.1	99	100
R26	KM979900	<i>Cercospora guatemalensis</i>	JQ995781.1	99	100
F204	KM979942	<i>Cercospora guatemalensis</i>	JQ995781.1	99	100
F190	KM979954	<i>Cercospora piaropi</i>	HQ902254.1	100	100
F24	KM979958	<i>Cercospora piaropi</i>	HQ902254.1	99	100
F214	KM979785	<i>Cercospora piaropi</i>	HQ902254.1	100	100
F201	KM979801	<i>Cercospora piaropi</i>	HQ902254.1	100	100
F215	KM979791	<i>Cercospora</i> sp.	JX143701.1	100	100
M85	KM979897	<i>Cercospora</i> sp.	HQ232415.1	100	100
F83	KM979960	<i>Cercospora zebrina</i>	GU214657.1	99	100
R9	KM979902	<i>Chaetomium funicola</i>	AB746176.1	100	100
C36.2	KM979989	<i>Chaetomium</i> sp.	JQ936193.1	99	99
F182	KM979891	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	JX230994.1	100	100
F28	KM980007	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	JX230994.1	100	100
F27	KM979933	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	JX230994.1	100	100
F220	KM979882	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	JX230994.1	100	100

Supplementary
Material 1:
continued

F207	KM979963	Cladosporium cladosporioides	JX230994.1	100	100
F203	KM979883	Cladosporium cladosporioides	HM148014.1	100	100
F79	KM979858	Cladosporium cladosporioides	JQ936096.1	100	100
F221	KM979886	Cladosporium cladosporioides	JQ936096.1	100	100
F77	KM979939	Cladosporium cladosporioides	JQ936096.1	100	100
F159	KM979928	Cladosporium cladosporioides	JX981454.1	100	100
F29	KM979893	Cladosporium gossypicola	AF393702.2	100	100
F224	KM979864	Cladosporium sp.	KC339216.1	100	100
R33	KM979826	Cochliobolus geniculatus	JQ783058.1	100	100
F183	KM979949	Cochliobolus geniculatus	JQ783058.1	100	100
F26	KM979969	Colletotrichum boninense	JX436792.1	100	100
F11	KM979784	Colletotrichum boninense	JX436792.1	100	100
F206	KM979786	Colletotrichum boninense	JX436792.1	100	100
F157	KM979943	Colletotrichum boninense	JX436792.1	100	100
F158	KM979959	Colletotrichum boninense	JX436792.1	100	100
F8	KM979792	Colletotrichum boninense	JX436793.1	100	100
F120	KM979833	Colletotrichum fructicola	JX010165.1	100	100
F13	KM979788	Colletotrichum fructicola	JX010165.1	100	100
F127	KM979811	Colletotrichum gloeosporioides	JX231012.1	100	100
F91	KM979844	Colletotrichum gloeosporioides	JX231012.1	100	100
F14	KM979781	Colletotrichum gloeosporioides	JX231012.1	100	100
F93	KM979825	Colletotrichum gloeosporioides	JX231012.1	100	100
F40	KM979867	Colletotrichum gloeosporioides	JX231012.1	100	100
F147	KM979915	Colletotrichum gloeosporioides	JX231012.1	100	100
F39	KM979925	Colletotrichum gloeosporioides	JX231012.1	100	100
F70	KM979971	Colletotrichum gloeosporioides	JX231012.1	100	100
A12	KM979896	Colletotrichum gloeosporioides	JX258674.1	100	100
F35	KM979807	Colletotrichum gloeosporioides	JX258761.1	100	100
F136	KM979841	Colletotrichum gloeosporioides	JX258761.1	99	100
F117	KM979842	Colletotrichum gloeosporioides	JX258761.1	100	100
F85	KM979868	Colletotrichum gloeosporioides	JX258761.1	100	100
F23	KM979818	Colletotrichum gloeosporioides	JX258761.1	100	100
F104	KM979828	Colletotrichum gloeosporioides	JX258761.1	100	100
F20	KM979975	Colletotrichum gloeosporioides	JX258761.1	100	100
F101	KM979790	Colletotrichum gloeosporioides	JX258787.1	100	100
F7	KM979789	Colletotrichum gloeosporioides	JX258798.1	100	100
F41	KM979812	Colletotrichum gloeosporioides	JX258798.1	100	100
F99	KM979829	Colletotrichum gloeosporioides	JX258688.1	100	100
F32	KM979874	Colletotrichum gloeosporioides	JX258688.1	100	100
F106	KM979964	Colletotrichum gloeosporioides	JX258688.1	100	100
F88	KM979914	Colletotrichum gloeosporioides	JX258802.1	100	100
F196	KM979962	Colletotrichum karstii	JX625173.1	99	100
F200	KM979793	Coniothyrium sp.	JX624282.1	99	98
F222	KM979799	Coprinellus radians	FJ582637.1	99	100

Supplementary
Material 1:
continued

F213	KM979914	<i>Coprinellus radians</i>	FJ582637.1	100	100
F160	KM979879	<i>Curvularia</i> sp.	KC816045.1	99	96
F191	KM979878	<i>Curvularia</i> sp.	KC816045.1	99	96
R44	KM979920	<i>Curvularia trifolii</i>	AF455446.1	100	100
F116	KM979910	<i>Diaporthe heveae</i>	KC343116.1	99	98
F19	KM979780	<i>Diaporthe helianthi</i>	JQ936257.1	99	100
F97	KM979819	<i>Diaporthe helianthi</i>	JQ936257.1	99	100
F86	KM979782	<i>Diaporthe helianthi</i>	JQ936143.1	100	100
F87	KM979830	<i>Diaporthe helianthi</i>	JQ936143.1	100	100
F153	KM979834	<i>Diaporthe helianthi</i>	JQ936143.1	99	100
F90	KM979894	<i>Diaporthe helianthi</i>	JQ936143.1	100	100
F124	KM979906	<i>Diaporthe helianthi</i>	JQ936143.1	100	100
C22	KM979817	<i>Diaporthe helianthi</i>	JQ936143.1	100	100
F123	KM979875	<i>Diaporthe helianthi</i>	JQ936143.1	100	100
F108	KM979907	<i>Diaporthe helianthi</i>	JQ936143.1	99	100
F179	KM979922	<i>Diaporthe helianthi</i>	JQ936143.1	100	100
F218	KM979926	<i>Diaporthe helianthi</i>	JQ936143.1	99	100
F73	KM979994	<i>Diaporthe helianthi</i>	AJ312356.1	99	100
F6	KM979794	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	JQ936148.1	100	100
F98	KM979859	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	JQ936148.1	100	100
P	KM979899	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	HQ130439.1	100	100
R41	KM979970	<i>Fusarium oxysporum</i>	EU839370.1	100	100
R42	KM979978	<i>Fusarium oxysporum</i>	EU839370.1	99	100
R12	KM979821	<i>Fusarium oxysporum</i>	JN232162.1	100	100
R7	KM979872	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC196121.1	100	100
R35	KM979873	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC196121.1	100	100
R4	KM979881	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC196121.1	99	100
R49	KM979931	<i>Fusarium oxysporum</i>	KF367514.1	100	100
R1	KM979968	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC196121.1	100	100
R8	KM979972	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC196121.1	100	100
R20	KM979973	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC196121.1	100	100
R10	KM979981	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC196121.1	100	100
R43	KM979982	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC196121.1	100	100
R26.1	KM979988	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC196121.1	100	100
R52	KM979990	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC196121.1	100	100
R18	KM980002	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC196121.1	100	100
R50	KM980005	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC196121.1	100	100
F34	KM979783	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC196121.1	100	100
R27	KM979816	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC196121.1	100	100
R48	KM979950	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC196121.1	100	100
R3	KM979974	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC196121.1	100	100
R60	KM979995	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC196121.1	100	100
R25	KM980004	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC196121.1	100	100
F4	KM979795	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC787030.1	100	100

Supplementary
Material 1:
continued

R46	KM979997	<i>Fusarium solani</i>	JQ625576.1	99	100
R39	KM979866	<i>Fusarium solani</i>	JN006817.1	100	100
R30	KM979979	<i>Fusarium solani</i>	JN006817.1	99	100
R33.1	KM979983	<i>Fusarium solani</i>	JN006817.1	100	100
R45	KM979984	<i>Fusarium solani</i>	JN006817.1	100	100
R31	KM979996	<i>Fusarium solani</i>	JN006817.1	100	100
R19	KM980003	<i>Fusarium solani</i>	JN006817.1	100	100
R32	KM980008	<i>Fusarium solani</i>	JN006817.1	100	100
R53	KM979870	<i>Fusarium</i> sp.	JQ775558.1	99	100
R29	KM979898	<i>Fusarium</i> sp.	JQ775558.1	100	100
R38	KM980001	<i>Fusarium</i> sp.	JQ775558.1	100	100
F197	KM979889	<i>Gibberella zeae</i>	HQ832817.1	100	100
F211	KM979800	<i>Guignardia mangiferae</i>	JX436789.1	100	100
F202	KM979850	<i>Guignardia mangiferae</i>	JX436789.1	100	100
F75	KM979852	<i>Guignardia mangiferae</i>	JX436789.1	99	100
F210	KM979885	<i>Guignardia mangiferae</i>	JX436789.1	100	100
F188	KM979895	<i>Guignardia mangiferae</i>	JX436789.1	99	100
F187	KM979840	<i>Guignardia mangiferae</i>	JX436789.1	100	100
F223	KM979808	<i>Leptosphaeria</i> sp.	KC507235.1	99	97
F92	KM979814	<i>Leptosphaeria</i> sp.	KC507235.1	99	96
F178	KM979905	<i>Leptospora rubella</i>	JQ936327.1	100	100
R37	KM979991	<i>Macrophomina phaseolina</i>	EF545133.1	100	100
F216	KM979993	<i>Myrothecium inundatum</i>	JQ936267.1	99	100
F129	KM979797	<i>Myrothecium</i> sp.	HQ631058.1	100	100
F3	KM979776	<i>Neofusicoccum parvum</i>	FJ904817.1	99	100
F161	KM979798	<i>Neofusicoccum parvum</i>	FJ904817.1	99	100
F9	KM979813	<i>Nigrospora oryzae</i>	HQ608152.1	100	100
F105	KM979952	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	HE608797.1	100	100
F146	KM979857	<i>Pestalotiopsis vismiae</i>	FJ481027.1	99	100
R11	KM980000	<i>Pestalotiopsis vismiae</i>	FJ481027.1	100	100
F139	KM979961	<i>Peyronellaea prosopidis</i>	KF777180.1	98	99
F16	KM979796	<i>Phoma glomerata</i>	AY183371.1	99	100
F74	KM979921	<i>Phoma glomerata</i>	AY183371.1	99	100
F21	KM979809	<i>Phoma glomerata</i>	AY183371.1	99	100
F118	KM979831	<i>Phoma glomerata</i>	AY183371.1	99	100
F166	KM979880	<i>Phoma glomerata</i>	AY183371.1	99	100
F115	KM979827	<i>Phoma pomorum</i>	AY904062.1	99	99
F199	KM979916	<i>Phoma</i> sp.	GU045305.1	100	100
F226	KM979787	<i>Phoma</i> sp.	JQ388278.1	100	99
F178.1	KM979837	<i>Phoma</i> sp.	JQ388278.1	100	100
F140	KM979929	<i>Phoma</i> sp.	JQ388278.1	100	100
F175	KM979945	<i>Phoma</i> sp.	JQ388278.1	100	62
F81	KM979903	<i>Phoma</i> sp.	JQ936186.1	99	100
F80	KM979967	<i>Phoma</i> sp.	JQ936186.1	100	100

Supplementary
Material 1:
continued

F37	KM979865	Phoma sp.	JQ936186.1	100	100
F38	KM979869	Phoma sp.	JQ936186.1	100	100
F76	KM979966	Phoma sp.	KC812274.1	100	99
F186	KM979861	Phoma sp.	JN207319.1	99	100
F137	KM979779	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F165	KM979803	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F149	KM979824	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F119	KM979839	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F72	KM979912	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F176	KM979917	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F114	KM979932	Phoma sp.	GU045305.1	99	100
F155	KM979918	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F110	KM979845	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F103	KM979846	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F150	KM979847	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F193	KM979848	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F177	KM979851	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F194	KM979853	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F171	KM979856	Phoma sp.	GU045305.4	100	100
F128	KM979860	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F17	KM979862	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F15	KM979863	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F163	KM979877	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F12	KM979884	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F143	KM979887	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F135	KM979888	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F152	KM979890	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F145	KM979908	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F189	KM979909	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F131	KM979919	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F130	KM979923	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
R5	KM979930	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F22	KM979935	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F113	KM979940	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F141	KM979944	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F174	KM979946	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F162	KM979947	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F173	KM979948	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F134	KM979951	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F133	KM979957	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F167	KM979965	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F107	KM979976	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F71	KM979985	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F96	KM979986	Phoma sp.	GU045305.1	100	100

Supplementary
Material 1:
continued

F1	KM979987	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F84	KM979998	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F10	KM979999	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F148	KM980006	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F18	KM979913	Phoma sp.	GU045305.1	100	100
F89	KM979832	Phomopsis sp.	JN153051.1	99	99
F126	KM979924	Phomopsis sp.	JN153051.1	100	100
F122	KM979805	Phomopsis sp.	JN153075.1	99	97
F102	KM979820	Phomopsis sp.	EU002919.1	99	99
F95	KM979977	Saccharicola bicolor	AF455415.1	96	99
F144	KM979835	Stagonosporopsis cucurbitacearum	JQ936326.1	99	100
F111	KM979927	Stagonosporopsis cucurbitacearum	JQ936326.1	99	100

* Identification based on ITS sequence analysis and/or morphological traits

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE
Glycyne max CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS E ANÁLISE DO
EXTRATO METABÓLICO DE *Guignardia mangiferae***

Elio Gomes Fernandes¹, Sergey Tumanov³, Silas Granato Villas-Boas³, Humberto Josué de Oliveira Ramos², Marisa Vieira de Queiroz^{1*}

¹Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa. Av. PH Rolfs s/n - Campus Universitário. CEP: 36570 900 - Viçosa – MG – Brasil.

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa. Av. PH Rolfs s/n - Campus Universitário. CEP: 36570 900 - Viçosa – MG – Brasil.

³Centre for Microbial Innovation, School of Biological Sciences, University of Auckland, Private Bag 92019, Auckland, New Zealand.

*Corresponding author: mvqueiro@ufv.br

RESUMO

Fungos endofíticos usados no controle de fungos fitopatogênicos podem produzir um vasto número de compostos com aplicações biotecnológicas, tais como antimicrobianos. Foi avaliada a atividade inibitória do crescimento de 178 fungos endofíticos isolados de *Glycyne max* em relação a cinco isolados de fungos fitopatogênicos (*Phomopsis* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporium*, *Fusarium solani* e *Colletotrichum truncatum*). Entre os fungos endofíticos testados, 68 isolados (38,20%) tiveram efeito inibitório sobre crescimento de um ou mais fungos fitopatogênicos, sendo que 55 (30,89%) isolados inibiram *Phomopsis* sp, 42 (23,59%) inibiram *S. sclerotiorum* e 11 (6,17%) foram eficientes no controle do crescimento de *F. oxysporium*. Não foi observada inibição do crescimento de *C. truncatum* e *F. solani*. O fungo endofítico *Guignardia mangiferae* foi selecionado para investigação de seus metabólitos devido a

sua eficiência em controlar o crescimento micelial dos fungos *S. sclerotium* e *Phomopsis* sp., e por haver escassa informação sobre os compostos antimicrobianos produzidos por esta espécie. *Guignardia mangiferae* foi cultivado e em seguida foi realizada a extração dos metabólitos com metanol e acetato de etila. Os metabólitos foram fracionados através de coluna cromatográfica de sílica gel e foi avaliada a atividade antimicrobiana contra as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Lactococcus lactis*, as leveduras *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* e os fungos filamentosos *Botrytis cinerea* e *S. sclerotiorum*. Foi constatado que a atividade antifúngica foi perdida após a extração dos metabólitos. Entretanto, foi constatada atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *L. lactis*. Essa fração contendo atividade antibacteriana foi analisada por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (LC-MS) e por meio da análise do cromatograma, foram detectados 7 picos predominantes. A análise das massas dos íons presentes nessa fração contendo o composto antibacteriano não detectou as massas específicas para compostos antibacterianos já isolados de *G. mangiferae* (ácido guignárdico e guignardone D), o que sugere que esse isolado produz um novo composto que ainda não foi descrito para essa espécie endofítica.

Palavras chaves: Fungos endofíticos, *Guignardia mangiferae*, HPLC, LCMS, extrato metabólico.

INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos são aqueles micro-organismos encontrados no interior de tecidos vegetais, sem causar sintomas aparentes de doença (Porras-Alfaro & Bayman, 2011). Os fungos endofíticos não causam prejuízos ao seu hospedeiro, podendo ter um papel essencial no desenvolvimento vegetal, atuando como controladores de

fitopatógenos e insetos herbívoros ou como produtores de substâncias promotoras de crescimento e antimicrobianos (Neto et al., 2002).

Com o aumento do uso indiscriminado de agrotóxicos na agricultura, vários tipos de contaminações por produtos químicos vêm sendo detectadas nos alimentos, tornando-os, por exemplo, possíveis carcinogênicos para a população humana. Tais produtos químicos podem também ser responsáveis pelo aparecimento de pragas resistentes a defensivos agrícolas e, devido a esse excesso, o uso de controladores biológicos tem sido estimulado em diversas pesquisas (Epstein & Bassein, 2003; Strobel & Daisy, 2003). Neste contexto, muitos fungos endofíticos vêm demonstrando serem bons controladores de fungos fitopatógenos, como o fungo *Trichoderma gamsii* contra *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* e *F. solani* (Rinu et al., 2014) e *Clonostachys rosea* contra *Moniliophthora roreri* (Mejía et al., 2008), sendo que alguns destes fungos já se encontram em formulações comerciais, como o fungicida biológico a base de esporos de *Trichoderma harzianum*, *Trichodermil*[®] (Itaforte Bioprodutos). Além disso, os fungos endofíticos podem ser isolados de seus hospedeiros, cultivados e aplicados na própria planta hospedeira para protegê-la do desenvolvimento de doenças causadas por esses fitopatógenos (Mejía et al., 2008).

Como os fungos endofíticos apresentam características de antagonistas à fitopatógenos em geral, eles são reconhecidos como promissores para a prospecção de novos metabólitos, pois o controle do crescimento pode ser resultado da produção e liberação de compostos antimicrobianos. O número de patentes que envolvem a utilização de endofíticos para a produção de metabólitos secundários de importância biológica aumentou a partir de 1993 (Priti et al., 2009; Alfaro & Bayman, 2011) e segundo Bhardwaj & Agrawal (2014), o potencial de utilização dos biocompostos produzidos por fungos endofíticos ainda é explorado de forma modesta pelas indústrias

farmacêuticas e de alimentos. Várias pesquisas têm demonstrado que a porcentagem de fungos endofíticos em um determinado hospedeiro e produtores de substâncias com atividade antimicrobiana pode ser superior a 30%, sendo alguns isolados capazes de produzir elevadas quantidades de moléculas bioativas (Huang et al., 2001; Strobel, 2003; Peláez, 2006; Wang et al., 2006; Morath et al., 2012, Qadri et al., 2013). Schulz (2002), em uma avaliação feita com fungos endofíticos, demonstrou que 51% dos compostos bioativos produzidos por esses fungos possuíam estrutura química desconhecida, caracterizando, portanto, novos compostos.

Os metabólitos bioativos obtidos de endofíticos incluem alcalóides (Guo et al., 2008), benzopironas, citocalasinas, esteroides, fenóis, isocumarinas, quinonas, terpenóides, xantonas (Schulz et al., 2002) e enzimas como amilases, pectinases, celulases, lacases entre outras (Sunitha et al., 2013). Esses compostos podem ter atividades contra bactérias e fungos (Phongpaichit et al., 2006; Qadri et al., 2013; Sadrati et al., 2013), atividade imunossupressora, controlar a diabetes, vírus (Guo et al., 2008), protozoários como *Plasmodium falciparum* (malária), *Leishmania donovani* (leishmaniose) e *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas) (Higginbotham et al., 2013) e podem também ser anticancerígenos, como o taxol (Stierle et al., 1993; Zhou et al., 2010).

Por outro lado, menos de 1% dos antibióticos conhecidos apresentam utilidade clínica, devido entre outras coisas à sua toxicidade para humanos (Madigan et al., 2010). Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos, a emergência da resistência microbiana a antibióticos é crescente e cerca de 2 milhões de pessoas são infectadas por bactérias resistentes a antibióticos, elevando ainda mais a necessidade de busca e detecção de novos fármacos.

Considerando o potencial antagonista de parte dos fungos endofíticos contra fungos fitopatogênicos e também à reconhecida produção de compostos antimicrobianos, esse estudo foi executado em duas partes: na primeira parte foi realizada uma prospecção de fungos endofíticos isolados de *G. max* em busca de isolados com atividade inibitória ao crescimento de isolados de fungos patogênicos para a planta da soja; na segunda parte desta pesquisa foi realizado o fracionamento e a análise do extrato bruto metabólico contendo atividade antimicrobiana do fungo endofítico selecionado na primeira parte deste trabalho.

MATERIAIS E MÉTODOS

Fungos filamentosos usados nos ensaios de inibição do crescimento

Foram analisados 178 fungos endofíticos previamente isolados a partir de folhas e raízes de *G. max* cultivada no campo experimental Diogo Alves de Mello, localizado na Universidade Federal de Viçosa, 20°46'0.47" S e 42°52'10.8 W, Brasil e depositados na micoteca do Laboratório de Genética de Micro-Organismos/BIOAGRO da UFV (Tabela 1).

Determinação da capacidade inibitória dos fungos endofíticos contra fungos fitopatogênicos

Todas as etapas dos testes de verificação da capacidade inibitória dos fungos endofíticos isolados da soja foram realizadas no Laboratório de Genética de Micro-organismos/Bioagro da UFV, Brasil. As análises dos fungos endofíticos quanto a capacidade de inibição do crescimento *in vitro* dos fungos fitopatógenos previamente isolados de *G. max* (*Colletotrichum truncatum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Phomopsis* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum*) foram realizadas utilizando a técnica de cultura pareada, como descrito por Campanile et al. (2007) com modificações. Os

fungos endofíticos foram testados em triplicatas, sendo cada isolado testado contra cada fitopatógeno individualmente. Os fungos (endofíticos e fitopatógenos) foram previamente cultivados por 10 dias em placas de Petri de 9 cm com meio batata dextrose ágar (BDA/Himedia), em seguida cada isolado teve um disco da borda do micélio de 5 mm de diâmetro transferido e posicionado em lados equidistantes, em meio de cultura BDA, seguido por um período de incubação em B.O.D. de 10 dias a 27°C. Após o tempo de incubação, a determinação da atividade inibitória consistiu na visualização do halo de inibição com provável liberação de compostos bioativos pelo fungo endofítico no meio de cultura.

Preparação dos extratos fúngicos

O fungo endofítico *G. mangiferae*, selecionado por meio dos testes de inibição, foi liofilizado e acomodado em uma caixa com isolamento térmico e enviado ao Laboratório de Metabolômica da University of Auckland (Metabolomics Laboratory), Nova Zelândia, onde foram realizadas todas as etapas referentes à análise do extrato metabólico deste fungo.

Inicialmente, o fungo selecionado foi cultivado em três placas contendo meio BDA por 20 dias a 25°C, na ausência de luz. Após o crescimento do fungo, o meio de cultura e o micélio foram cortados em pequenos fragmentos e transferidos para um tubo Falcon de 50 mL e coberto com papel alumínio, sendo adicionado em seguida 15 ml de metanol, gelado. O tubo foi agitado em vortex na velocidade máxima por 1 min, deixado descansar por 5 min e agitado novamente por mais 1 min. Em seguida, o material foi centrifugado a 4000 g por 15 min a 4°C e então o sobrenadante foi distribuído em tubos Eppendorf e concentrado, por meio da evaporação completa do solvente, em evaporador rotatório (SC250EXP, Thermo Scientific) a temperatura ambiente e os tubos foram estocados em ultrafreezer à -80°C. Após a recuperação do

metabólito bruto extraído com metanol, foi realizada uma segunda extração do precipitado insolúvel em metanol, utilizando 15 mL de acetato de etila gelado e todo o procedimento de centrifugação e concentração foi realizado novamente. Todo o procedimento anterior à concentração foi realizado sobre gelo.

Ensaio da atividade antimicrobiana do extrato fúngico.

A fim de detectar as demais atividades antimicrobianas produzidas pelo fungo *G. mangiferae*, os extratos metabólicos brutos e secos obtidos por meio da extração com metanol e acetato de etila, foram ressuspensos em 500 µl de metanol e acetato de etila respectivamente. Os ensaios antimicrobianos foram realizados em duplicatas por meio do método de disco-difusão. Uma alíquota de 45 µl/disco de cada extrato metabólico bruto concentrado foi adicionada a papel filtro de 6,0 mm de diâmetro, sendo estes em seguida depositados sobre o meio de cultura contendo o micro-organismo teste. A atividade antimicrobiana dos extratos metabólicos de *G. mangiferae* foi avaliada quanto a inibição dos seguintes micro-organismos testes: *S. sclerotiorum* e *Botrytis cinerea* (fungos filamentosos); *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* (leveduras); *Staphylococcus aureus* e *Lactococcus lactis* (bactérias Gram-positivas) e *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (bactérias Gram-negativas). Os inóculos dos micro-organismos foram obtidos a partir de culturas, preparando-se suspensões padronizadas por meio da escala 0.5 de MacFarland (Koneman, 2001; Oplustil et al., 2010), sendo essas suspensões preparadas a partir de: conídios de *B. cinerea* e micélio de *S. sclerotiorum* e testados em meio BDA, 25°C no escuro por 5 dias; células de *C. albicans* e *S. cerevisiae* cultivadas em meio Saborraud, 37°C no escuro por 24 horas; *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *L. lactis* cultivadas em meio ágar nutriente, 37°C, no escuro por 24 horas. Todos os testes tiveram como controle discos contendo acetato de etila ou metanol.

Fracionamento do extrato metabólico bruto por coluna cromatográfica

O extrato bruto foi submetido à cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando misturas de eluentes (clorofórmio, metanol, acetato de etila, acetonitrila, acetona e hexano) até a obtenção de frações do extrato bruto. Para este procedimento, foram utilizadas placas cromatográficas de sílica Gel (Sigma) como fase estacionária e misturas de eluentes como fase móvel, variando a polaridade e a proporção conforme o comportamento da fração analisada. Para cada experimento, o extrato metabólico bruto foi aplicado na base da placa cromatográfica utilizando capilares de vidros e este foi depositado dentro de um béquer (250 mL) e adicionados 4 mL da mistura de eluentes. O sistema foi tampado para promover a saturação do ambiente e o início da corrida. A corrida foi interrompida quando as amostras chegaram a aproximadamente 1 cm do topo da placa cromatográfica. Para revelar as bandas e o fracionamento dos compostos, foram utilizados luz Ultra-Violeta e Iodo em pó para detecção de compostos contendo ligações duplas e anéis aromáticos em geral.

Após a determinação do melhor sistema de solvente para a separação dos compostos por meio do CCD, o extrato bruto foi submetido a procedimentos de cromatografia em coluna (CC), onde utilizou-se sílica Gel 60 (230-400 mesh) da Merk. Os eluentes da fase móvel inicial foram selecionados de acordo com a análise feita em cromatografia em camada delgada (CCD), tendo aumento gradual de polaridade. O eluente mais o produto carregado foram recolhidos por gotejamento em frascos de aproximadamente 10 ml, numerados sequencialmente, sendo cada frasco concentrado em evaporador rotatório a temperatura ambiente. O conteúdo de cada frasco, contendo uma fração metabólica seca, foi ressuspensa em 500 µl de acetonitrila (ACN) e uma alíquota de cada fração foi analisado novamente por CCD e Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: high-performance liquid chromatography – HPLC)

(Shimadzu), para verificar o grau de pureza. Cada fração metabólica obtida foi novamente testada por meio do método de disco-difusão em placas de meio de cultura com os micro-organismos testes (*B. cinerea*, *S. sclerotiorum*, *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *L. lactis*), sendo determinadas quais frações apresentavam atividade antimicrobiana. As frações que apresentaram resultado negativo para atividade antimicrobiana foram descartadas.

Fracionamento e análise dos extratos metabólicos brutos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O extrato metabólico bruto, bem como as frações obtidas por colunas cromatográficas de sílica gel também foram submetidas a fracionamento e/ou leituras efetuadas por HPLC seguindo protocolo de Santiago et al. (2012) com modificações. Uma alíquota de 300 µL de extrato bruto ressuspendido em acetonitrila (ACN) foi injetado no sistema HPLC equipado com uma coluna de fase reversa Gemini-NX 5u C₁₈ (Phenomenex) a 25°C, e os compostos eluídos da coluna foram monitorados utilizando um detector UV para a faixa de onda de 200 e 340 nm. Foi aplicado um fluxo de 1 mL/min⁻¹ durante 90 min, em eluição isocrática e em gradiente de H₂O ultra pura/ACN. O sistema de separação foi iniciado com eluição em gradiente de 30% de ACN/H₂O até 42% de ACN durante 10 min; seguido de outra eluição em gradiente até 100% durante 40 min; uma eluição isocrática de 100% de ACN durante 10 min; uma eluição em gradiente de 100% ACN até 30% ACN/H₂O durante 20 min; seguida por 10 min de eluição isocrática de 30% ACN. As frações foram coletadas em tubos de ensaio com um volume de 1,5 mL.

Análise da fração antimicrobiana por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (LC-MS)

As frações que apresentaram atividade antimicrobiana foram analisadas pelo sistema de LC-MS nas seguintes condições: UHPLC-MS; Accela 1250 acoplado com Q-Exactive Orbitrap, sistema de espectrômetro de massa (Thermo Fisher Scientific, Auckland, New Zealand) operando no modo de ionização por eletropulverização aquecida. As amostras foram analisadas simultaneamente pela alternância automática dos modos positivo-negativo. As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna Synchronis C18 100 x 2.1 mm, 1.7 μ m (Thermo Fisher Scientific, Auckland, New Zealand). Os solventes A e B foram ácido fórmico a 0,1% de em água e ácido fórmico a 0,1% em acetonitrila, respectivamente. Um fluxo de solvente de 0,40 μ L min⁻¹ foi aplicado com eluição em gradiente: 98% A por 1,5 minutos e subsequentemente eluição isocrática até 99% B durante 14 minutos, seguido por 2 minutos à 99% B e um rápido retorno à 95% A por um minuto e mantido 95% de A por 4 minutos para equilibrar a coluna. As amostras e colunas foram mantidas em 4 e 30°C, respectivamente. Volumes de 5 μ L de amostras foram injetados. Os espectros de massas foram adquiridos por meio de escaneamentos de MS1 (method) no intervalo de massa de 80 – 1200 m/z utilizando o detector de massas Orbitrap, com resolução de massa de 70,000 (FWHM como definida para m/z 400), AGC 1 e6, IT 100ms, Sheath gas 50, Aux gas 15, Sweep gas 2, Spray voltage 4.00 kV, temperatura capilar 370°C, S-lens RF 50.0, temperatura de aquecimento de 370°C. Calibrações de massas foram realizadas antes de cada análise analítica utilizando uma mistura de calibração definida pelo fabricante do equipamento.

RESULTADOS

Atividade inibitória dos fungos endofíticos contra fungos fitopatogênicos

Os resultados do ensaio de pareamento de culturas conduzidos em condições de laboratório confirmaram a capacidade de parte dos fungos endofíticos isolados de G.

max de inibirem o crescimento de fungos fitopatogênicos. Entre os 178 fungos endofíticos testados, 68 (38,20%) apresentaram atividade inibitória do crescimento para um ou mais fungos fitopatogênicos da soja (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1. Resultados dos ensaios de inibição do crescimento in vitro dos fungos fitopatogênicos por isolados fúngicos endofíticos de *G. max*

Espécies testadas	Quantidade de isolados	Sclerotinia sclerotiorum	Phomopsis sp	Fusarium solani	Fusarium oxysporum	Colletotrichum truncatum
<i>Alternaria alternata</i>	1					
<i>Alternaria arborescens</i>	2		x			
<i>Alternaria dauci</i>	1					
<i>Alternaria solani</i>	1					
<i>Alternaria sp.</i>	1					
<i>Ampelomyces sp.</i>	2		x			
<i>Annulohyphoxylon stygium</i>	1					
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	1					
<i>Cercospora apii</i>	1					
<i>Cercospora guatemalensis</i>	1					
<i>Cercospora piaropi</i>	1					
<i>Cercospora sp.</i>	1					
<i>Cercospora zebrinae</i>	2					
<i>Cercosporora beticola</i>	1					
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3					
<i>Cochliobolus geniculatus</i>	1					
<i>Cochliobolus sativus</i>	6		x			
<i>Cochliobolus sp.</i>	1		x			
<i>Colletotrichum boninense</i>	3					
<i>Colletotrichum capsici</i>	1					
<i>Colletotrichum fruticola</i>	1					
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	17	x	x			
<i>Colletotrichum karstii</i>	1					
<i>Colletotrichum lupini</i>	1			x		
<i>Colletotrichum truncatum</i>	4	x	x			
<i>Coniocytrion sp.</i>	1					
<i>Coprinellus radians</i>	1	x	x			
<i>Curvularia trifolli</i>	1					
<i>Davidiella tassiana</i>	2					
<i>Diaporthe helianthi</i>	1		x			
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	2					
<i>Epicoccum sp.</i>	1					
<i>Fusarium equiseti</i>	7	x	x			

Tabela 1. Continuação.

Espécies testadas	Quantidade de isolados	Sclerotinia sclerotiorum	Phomopsis sp	Fusarium solani	Fusarium oxysporum	Colletotrichum truncatum
<i>Fusarium proliferatum</i>	1					
<i>Gibberella moniliformes</i>	2					
<i>Gibberella zeae</i>	1	x				
<i>Guignardia mangiferae</i>	2	x	x			
<i>Guignardia vaccinii</i>	2	x	x			
<i>Leptosphaeria</i> sp.	2		x			
<i>Leptospora rubella</i>	1					
<i>Macrophomina phaseolina</i>	1					
<i>Magnaporthe grisea</i>	1					
<i>Monographella</i> sp.	1				x	
<i>Myrothecium gramineum</i>	2					
<i>Myrothecium inundatum</i>	1	x	x			
<i>Myrothecium</i> sp.	1	x	x			
não identificados	45					
<i>Nectria mauriticola</i>	2					
<i>Neofusicoccum parvum</i>	1					
<i>Neofusicoccum</i> sp.	2					
<i>Nigrospora orizar</i>	1					
<i>Nigrospora sphaerica</i>	2					
<i>Paraconiothyrium variabile</i>	1					
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1					
<i>Pestalotiopsis vismae</i>	1					
<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.	5	x	x			
<i>Phoma glomerata</i>	1					
<i>Phoma herbarum</i>	4					
<i>Phoma</i> sp.	1	x				
<i>Phomopsis</i> sp.	5					
<i>Rhizopycnis vagum</i>	1					
<i>Saccharicola bicolor</i>	1					
<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	1					
<i>Xylaria berteri</i>	10				x	
Total de isolados	178					

A ocorrência de halo de inibição do crescimento de fitopatógenos é indicada com um x.

O fungo fitopatogênico *Phomopsis* sp. foi o mais susceptível a inibição do crescimento pelos fungos endofíticos, sendo inibido por 55 deles (30,89%), seguido por *S. sclerotiorum* inibido por 42 (23,59%), *F. oxysporum* inibido por 11 (6,17%), sendo que *C. truncatum* e *F. solani* não tiveram o crescimento alterado por qualquer um dos

fungos endofíticos. As espécies endofíticas *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum truncatum*, *Coprinellus radians*, *Fusarium equiseti*, *G. mangiferae*, *Guignardia vaccinii*, *Myrothecium inundatum*, *Myrothecium sp.* e *Phaeosphaeriopsis sp.* foram eficientes em inibir o crescimento dos fungos fitopatogênicos *S. sclerotiorum* e *Phomopsis sp.* Somente *Monographella sp.* e *Xylaria berteri* foram antagonistas para *F. oxysporum*, enquanto que os demais fungos testados não apresentaram capacidade de inibir qualquer um dos fitopatógenos in vitro (Tabela 1 e Figura 1).

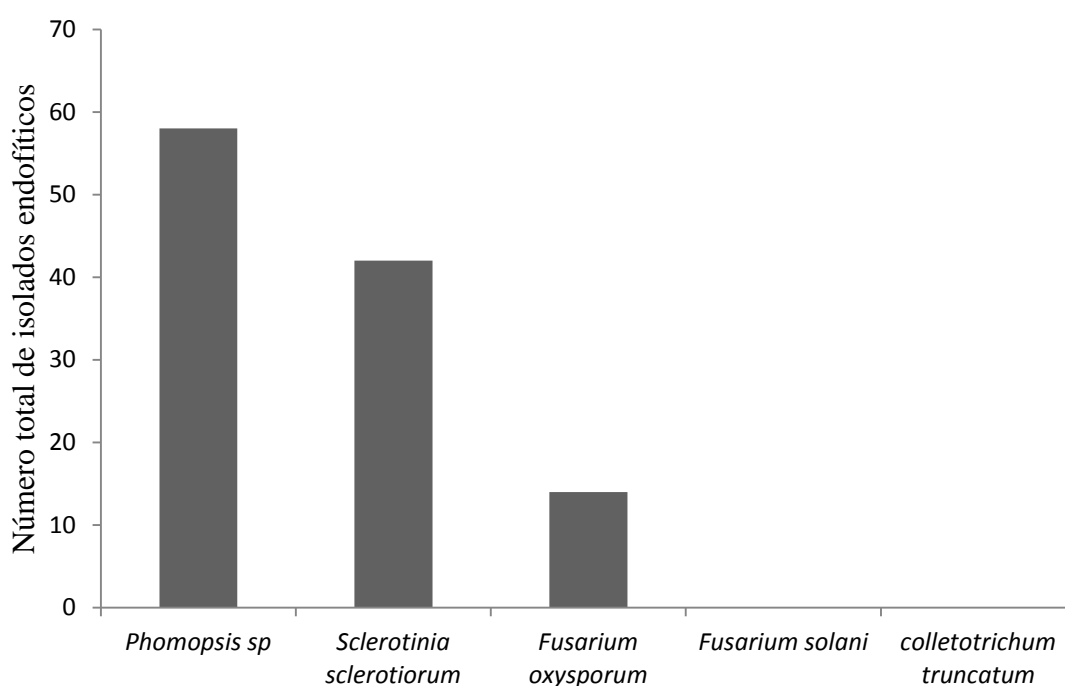


Figura 1. Relação da quantidade de isolados endofíticos apresentando inibição do crescimento para espécies fúngicas fitopatogênicas.

Dentre todos os fungos endofíticos que apresentaram atividade inibitória do crescimento contra os fungos fitopatogênicos, o fungo *G. mangiferae* F75 foi selecionado para a análise do extrato metabólico. Este fungo apresentou atividade inibitória contra *S. sclerotiorum* e *Phomopsis sp.*, formando um grande halo de inibição, provavelmente devido a liberação de compostos no meio de cultura (Figura 2). Foi

considerado também o fato de haver pouca informação disponível sobre os compostos antimicrobianos produzidos por essa espécie.

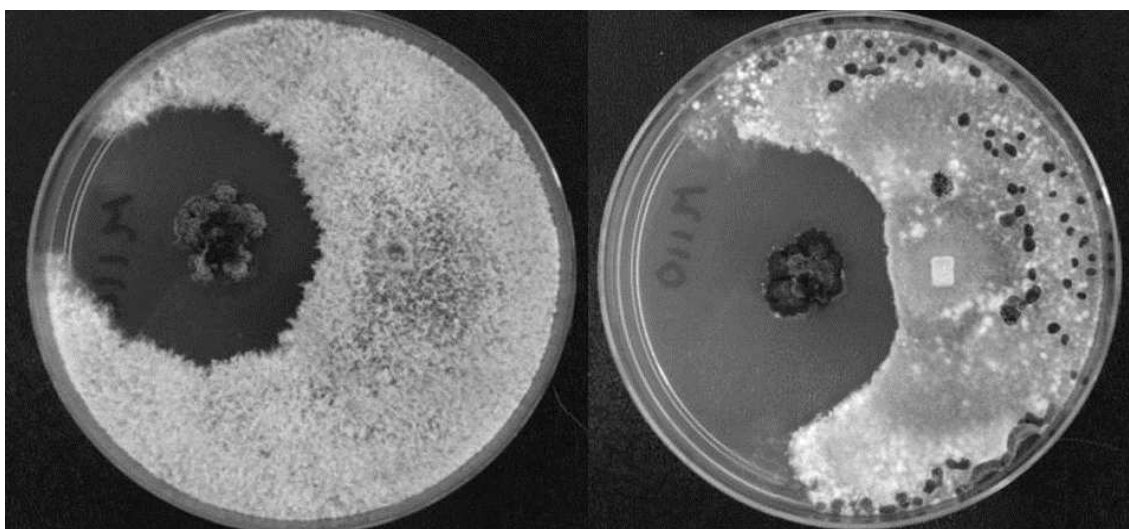


Figura 2. Halo de inibição do crescimento de *Phomopsis* sp. (esqueda) e *S. sclerotiorum* (direita) apresentado pelo fungo filamentosso endofítico *G.mangiferae* F75 após 10 dias à 27°C em meio BDA.

Extração metabólica, fracionamento e análise da fração antimicrobiana por LC-MS de *G. mangiferae*

Neste estudo, toda a etapa envolvendo extração dos metabólitos e fracionamentos foram desenvolvidos por meio da combinação de solventes para a extração e de testes de misturas e proporções de eluentes para o fracionamento. Na etapa de extração, foram testados como solventes metanol e acetato de etila, contudo, não foi constatada atividade antimicrobiana do extrato metabólico bruto obtido de *G. mangiferae*. Entretanto, nas frações obtidas com acetato de etila, foi verificada atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *L. lactis*.

O extrato metabólico bruto com atividade antibacteriana foi avaliado quando a pureza e foram testados diferentes eluentes para a fase móvel da coluna de sílica gel por meio da técnica de CCD. O sistema eluente clorofórmio/acetato de etila na proporção

4/10 como fase móvel foi o que apresentou o melhor resultado, obtendo a separação do extrato metabólico em cinco frações.

Foram realizadas várias tentativas de fracionamento do extrato metabólico bruto por meio de HPLC. Entretanto, não foi observada atividade antimicrobiana após os fracionamentos, sendo então o HPLC utilizado apenas para leitura analítica da pureza das frações obtidas por meio da coluna de sílica gel.

O extrato metabólico bruto foi fracionado em coluna de sílica gel iniciando com a proporção de eluente correspondendo a acetato de etila/clorofórmio na proporção crescente de 1:9 até 10:0, obtendo-se assim 10 frações sem atividade antibacteriana. Em seguida, um novo sistema de eluentes foi usado na mesma coluna de sílica gel, composta por metanol/clorofórmio na proporção crescente de 1:9 até 10:0 respectivamente, sendo obtidas 10 frações, sendo então constatada a atividade antibacteriana na quinta fração coletada (proporção 5:5 metanol/clorofórmio). Por meio da leitura analítica realizada através do HPLC, foi verificado que a fração contendo atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *L. lactis* era composta de uma mistura de composto (Figura 3), necessitando da realização de demais etapas de fracionamento por meio da coluna cromatográfica de sílica gel. A fim de obter um extrato mais puro, uma nova coluna de sílica gel foi preparada, sendo adicionada a fração anterior contendo atividade antibacteriana e os eluentes foram metanol/acetato de etila na proporção crescente de 1:9 até 10:0, respectivamente. Ao final das corridas, foi repetido a fase móvel correspondente ao metanol puro por mais 4 vezes, coletando-se no final uma fração oleosa amarelada, apresentando atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *L. lactis*.

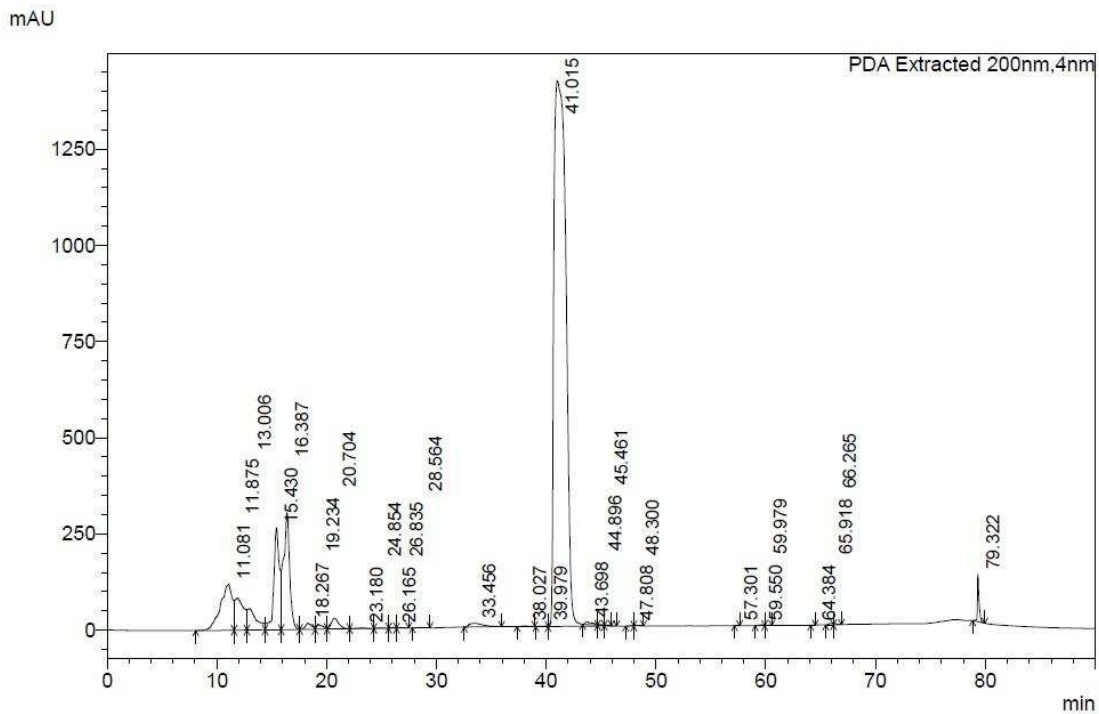


Figura 3. Cromatograma obtido por HPLC demonstrando os picos e tempos de retenções da fração clorofórmio/metanol 5:5 fracionada com coluna de sílica gel e apresentando atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *L. lactis*.

A fração oleosa e amarelada contendo atividade antibacteriana foi analisada por LC-MS e foram constatados, pelo menos, 7 picos em diferentes tempos de retenção, sendo os mais abundantes em termos relativos. Estes picos foram obtidos nos tempos de retenção 9,24 e 9,98, seguidos dos picos intermediários nos tempos de retenção 1,28; 1,99; 10,59; 12,81 e 14,83 (Figura 4).

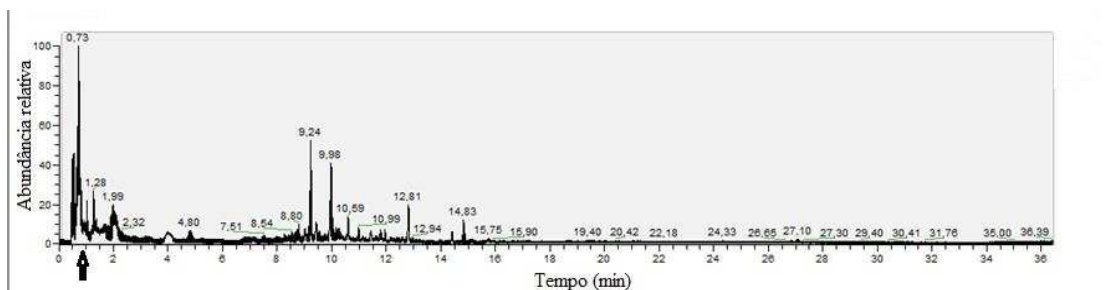


Figura 4. Cromatograma total de íons (TIC), mostrando os tempos distintos de retenções obtidos por meio de LC-MS do último fracionamento do extrato metabólico através da coluna de sílica gel, correspondente ao composto oleoso de *G. mangiferae* F75 e contendo atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *L. lactis*. Os valores reais dos tempos de retenção foram obtidos a partir dos 0,87 min, demonstrado pela seta escura.

Por meio do programa Thermo Xcalibur[®] 2.2 SP1, foram verificados, tanto em módulo negativo quanto positivo, 38 íons eluídos nos tempos de retenção citados acima, com suas respectivas massas moleculares provenientes da fração antibacteriana (Tabela 2). Nenhuma das massas moleculares presentes na fração antibacteriana extraída de *G. mangiferae* apresentou a mesma massa molecular correspondente para os compostos já descritos como antibacterianos produzidos por *G. mangiferae*, como ácido o guignardico (C₁₄H₁₄O₅, massa molecular: 262,2580) e Guignardone I (C₁₇H₂₆O₅, massa molecular: 310,3853).

Tabela 2. Massas moleculares presentes na fração metabólica com atividade antibacteriana do fungo endofítico *G. mangiferae* F75 obtidas por meio de LC-MS

Tempo de retenção	m/z	Intensidade	Relativa	Ionização
1,28	259,12823	1.557.405.824	100	+
	129,01852	837064960	100	-
	203,01915	358882272	42,87	-
1,99	101,02335	578942912	59,82	+
	132,10164	967739392	100	+
	177,01855	994137408	100	-
9,24	177,0867	2348086528	62,68	+
	233,14905	3746035712	100	+
	129,01855	253606368	100	-
	175,06052	182831312	72,09	-
	231,13469	200613664	79,1	-
	407,20316	106150392	41,86	-
9,98	101,02334	946764992	49,59	+
	129,05438	1909315200	100	+
	147,06479	1046611264	54,82	+
	231,1122	1051477568	55,07	+
	229,09795	31827148	44,63	-

Tabela 2. continuação

Tempo de retenção	m/z	Intensidade	Relativa	Ionização
	289,07181	71309504	100	-
	295,04584	70637864	99,06	-
	865,19843	54510136	76,44	-
10,59	291,08557	1190255488	100	+
	289,07172	536484352	100	-
	579,1507	276835008	51,6	-
12,81	224,09116	1245874944	100	+
	268,08072	576482752	46,27	+
	266,06699	1593399552	100	-
14,83	129,05447	621568960	91,36	+
	175,09619	680383296	100	+
	116,92776	4588038	80,5	-
	235,92595	3220143,3	56,5	-
	269,17587	5699530	100	-
1,28	259,12823	1.557.405.824	100	+
	129,01852	837064960	100	-
	203,01915	358882272	42,87	-
1,99	101,02335	578942912	59,82	+
	132,10164	967739392	100	+
	177,01855	994137408	100	-
9,24	177,0867	2348086528	62,68	+

*Foram considerados apenas os picos de intensidade relativa acima de 40 %.

DISCUSSÃO

Fungos endofíticos como controladores de crescimentos de fungos fitopatogênicos

Os fungos endofíticos habitam um ambiente semelhante aquele ocupado por fitopatógenos, assim por meio da competição por recursos, parasitismo ou mesmo por produção de substâncias antagônicas, os fungos endofíticos podem acabar controlando os fitopatógenos (Neto et al., 2002; Porrás-Alfaro & Bayman, 2011). Uma forma simples de observar o potencial de um fungo biocontrolador de fitopatógenos é por meio do teste *in vitro* de co-cultura ou cultura pareada, onde é possível observar vários tipos de interações entre os fungos, como entrelaçamento entre os micélios; inibição por contato e inibição à distância (com produção de compostos antagonistas) pela espécie inibidora ou ainda por inibição mútua entre os fungos por competição de recurso ou produção de compostos antagonistas (Magan & Lacey, 1984). Em nossa hipótese de trabalho, avaliamos apenas a interação entre os fungos pela inibição a distância do fungo fitopatogênico pelo fungo endofítico, onde assumimos que a formação do halo de inibição sugere a produção de composto antimicrobiano pelo fungo endofítico (Figura 2).

Foi observado que 38,20% dos fungos endofíticos isolados de *G. max* avaliados contra fungos fitopatógenos inibiram o crescimento *in vitro* de alguns fitopatógenos por meio de testes de cultura pareada. Resultados semelhantes, onde fungos endofíticos isolados de plantas inibiram o crescimento de fitopatógenos em cultura pareada, foram observados em *Solanum tuberosum* (batata) contra *Rhizoctonia solani* (Lahlali & Hijri, 2010); *Quercus cerris* contra o fitopatógeno *Diplodia corticola* (Campanile et al., 2007); *Nothapodytes foetida* contra os fitopatógenos *Penicillium citrinum*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gleosporoides*, *Drechslera tetramera* e *Aspergillus niger* (Rehman et al., 2011); *Oryza sativa* (arroz) contra os fitopatógenos *Rhizoctonia solani*, *Nigrospora oryzae*, *Macrophomina phaseolina*, *Phoma sorghina*, *Alternaria alternata* (Naik et al., 2009); *Hyoscyamus muticus* contra *Gibberella zeae* e *Thanatephorus*

cucumeris (Abdel-Motaal et al., 2010) e *Symphytum officinale* contra o fitopatógeno *S. sclerotiorum* (Rocha et al., 2009).

Em nosso estudo, 16 espécies de fungos endofíticos apresentaram a capacidade de inibir o crescimento de *Phomopsis* sp. e 11 espécies endofíticas foram antagonistas para *S. sclerotiorum*, e dentre estas espécies, o isolado de *G. mangiferae* F75 apresentou uma região de inibição significativa, conferida pelo halo e impedindo o crescimento dos dois fitopatógenos (Figura 2).

O fungo endofítico *G. mangiferae* já foi descrito por Jeenkeawpieam et al. (2012) como produtor de extrato metabólico contendo compostos antifúngicos contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Ferreira et al. (2015) também demonstraram *in vitro* que o extrato metabólico bruto possui atividade antifúngica contra *C. albicans* sendo também efetivo contra *Candida krusei* e *Cladosporium phaeosporum*.

Outros fungos endofíticos testados neste trabalho também já foram citados na literatura como inibidores do crescimento de fungos fitopatogênicos. O gênero *Ampelomyces* é conhecido como micoparasita do oídio *Erysiphe polygoni* (Kiss et al., 2004) e em nossos resultados ele inibiu o crescimento micelial do fungo *Phomopsis* sp. Brum et al. (2012) demonstraram que os fungos endofíticos *Xylaria berteri* e *Diaporthe helianthi* isolados de *Vitis labrusca*, produzem compostos que inibem o fitopatógeno *F. oxysporum*, sendo que em nosso trabalho, apenas *Xylaria berteri* inibiu o crescimento de *F. oxysporum* e o isolado de soja *Diaporthe helianthi* foi capaz de inibir o crescimento do fitopatógeno *Phomopsis* sp. Segundo Chapla et al. (2014), os fungos *C. gloeosporioides* e *Xylaria* sp. isolados como endofíticos de *Michelia champaca* também foram eficientes em inibir o crescimento *in vitro* do fitopatógeno *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*.

O basidiomiceto endofítico *Coprinellus radians* inibiu o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e de *Phomopsis* sp e também foi reconhecido por Mkrtchyan (2014) como apresentando atividade inibitória do crescimento em cultura pareada contra *Penicillium griseofulvum*, *Acremonium alternatum* e *Chrysosporium keratinophilum*.

Desta forma, podemos concluir que a inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos *in vitro* é frequente entre os fungos endofíticos, corroborando assim nossos resultados onde foi observado que parte dos fungos endofíticos isolados de *G. max* são controladores do crescimento de fungos fitopatogênicos de plantas e podem ser promissores como agentes de controle biológico.

Análise da fração antibacteriana realizada por LC-MS

O fungo endofítico *G. mangiferae* foi submetido ao isolamento do extrato metabólico, e após a extração dos compostos metabólicos com diferentes solventes, não foi observado atividade antifúngica contra fungos filamentosos testes (*S. sclerotiorum* e *B. cinerea*), embora a *G. mangiferae* F75 tenha formado halo de inibição no meio de cultura quando submetida ao teste de cultura pareada contra dois fungos fitopatogênicos (*S. sclerotiorum* e *Phomopsis* sp.) (Figura 2). Além disso, não foi constatada atividade antifúngica contra as leveduras testes (*C. albicans* e *S. cerevisiae*). Entretanto, foi constatada a atividade antibacteriana no extrato metabólico extraído com acetato de etila contra *S. aureus* e *L. lactis*.

Segundo Villas-Bôas (2007), os produtos do metabolismo de micro-organismos podem sofrer degradação ou conversão logo após a extração com solventes, ou possuem meia vida na ordem de segundos. Metabólitos também podem ser voláteis e/ou constantemente produzidos e liberados para o meio extracelular e, neste caso, o fungo poderia estar constantemente liberando um composto antifúngico no meio de cultura e

assim impedindo o desenvolvimento do fitopatógeno e, logo em seguida, sendo degradado ou volatilizado. Outros possíveis motivos da perda de atividade antifúngica após a extração podem ser a degradação ou a perda da interação química bem como a inativação pela presença de luz como ocorre em compostos fotossensíveis.

G. mangiferae já foi isolado de diversas espécies vegetais e reconhecido como produtor de metabólitos secundários com atividade antibacteriana. Heerklotz et al. (2003) isolou e identificou uma molécula antibacteriana de *G. mangiferae* que possui atividade contra *S. aureus* denominando-a de ácido guignardico (fórmula molecular: $C_{14}H_{14}O_5$, massa molécula: 262,2580). Essa mesma molécula foi identificada posteriormente por Molitor et al. (2012) em *Guignardia bidwellii*, mas mostrou resultado negativo para atividade antibacteriana. Em outro estudo, Mei et al. (2012) isolaram e identificaram algumas moléculas de um fungo endofítico do gênero *Guignardia*, sendo a molécula denominada Guignardone I (fórmula molecular: $C_{17}H_{26}O_5$, massa molecular: 310,3853) e esta apresentou atividade antibacteriana contra *S. aureus*. A análise do extrato metabólico obtida pelo fungo endofítico *G. mangiferae*, extraído com acetato de etila e fracionado em coluna cromatográfica de sílica gel contendo atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *L. lactis*, revelou por meio do LC-MS, que nenhuma dessas massas moleculares já conhecidas de compostos antibacterianos já descritos para espécies do gênero *Guignardia* estavam presentes no extrato metabólico fracionado, sugerindo que possa existir um novo composto antibacteriano produzido por *G. mangiferae* ainda não isolado e descrito para esta espécie.

Várias espécies de fungos endofíticos vêm se mostrando promissoras para controlar fungos fitopatogênicos e também no isolamento e descobrimentos de novos compostos bioativos (Strobel & Daisy, 2003; Guo et al., 2008; Staniek et al., 2008;

Baker & Satish, 2012). Vários artigos vêm sendo publicados objetivando a avaliação e prospecção desse isolados quanto a produção de compostos bioativos e agentes biocontroladores de fitopatógenos (Porrás-Alfaro & Bayman, 2011). Como demonstrado neste trabalho, muitos fungos endofíticos foram eficientes em controlar o crescimento de fungos fitopatogênicos e alguns desses fungos ainda não foram explorados quanto a produção de metabólitos com atividade antimicrobiana. Para o fungo endofítico *G. mangiferae*, observamos que na fração metabólica contendo atividade antibacteriana, nenhuma das massas moleculares presentes correspondem a compostos antibacterianos já descritos para este fungo.

CONCLUSÕES

Concluimos por meio deste estudo, que parte da comunidade de fungos endofíticos isolados de *G. max* é constituída de bons biocontroladores de fungos fitopatogênicos *in vitro*, podendo ser promissores em programas de controle biológico. Concluimos também que o fungo endofítico *G. mangiferae* apresenta atividade antibacteriana contra as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *L. lactis*, não sendo detectados os compostos antibacterianos já descritos para esta espécie na fração com a atividade analisada, sugerindo ser um novo composto antibacteriano ainda não descrito para *G. mangiferae*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), órgãos de fomento à pesquisa do Brasil, pelo financiamento da pesquisa no Brasil e pela concessão da bolsa de estudos ao primeiro autor por meio do programa Institucional de

Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), para realização de parte desta pesquisa na The University of Auckland (New Zealand).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Motaal, F. F.; Nassar, M. S. M.; El-Zayat, S. A.; El-Sayed, M. A.; Ito, S. I. Antifungal activity of endophytic fungi isolated from Egyptian henbane (*Hyoscyamus muticus* L.), **Pakistan Journal of Botany**, v. 42, n. 4, p. 2883-2894, 2010.

Baker, S.; Satish, S. Endophytes: Natural warehouse of bioactive compounds, **Drug Invention Today**, v. 4, n. 11, p. 548-553, 2012.

Bhardwaj, A.; Agrawal, P. A review fungal endophytes: as a store house of bioactive compound. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 9, p. 228-237, 2014.

Brum, M. C. P.; Araújo, W. L.; Maki, C. S.; Azevedo, J. L. Endophytic fungi from *Vitis labrusca* L. (Niagara Rosada) and its potencial for the biological control for *Fusarium oxysporum*, **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 4, p. 4187-4197, 2012.

Campanile, G.; Ruscelli, A.; Luisi, N. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in planta tests, **European Journal of Plant Pathology**, v. 117, p. 237-246, 2007.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Disponível em: <http://www.cdc.gov/drugresistance>. Acessado em 03\06\2015.

Chapla, V. M.; Zeraik, M. L.; Leptokarydis, I. H.; Silva, G. H.; Bolzani, V. S.; Young, M. C. M.; Pfenning, L. H.; Araújo, A. R. Antifungal compounds produced by *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus from *Michelia champaca*, **Molecules**, v. 19, p. 19243-19252, 2014.

Epstein, L.; Bassein, S. Patterns of pesticide use in California and the implications for strategies for reduction of pesticides. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 351-375, 2003.

Ferreira, M. C.; Vieira, M. L. A.; Zani, C. L.; Alves, T. M. A.; Junior, P. A. S.; Murta, S. M. F.; Romanha, A. J.; Gil, L. H. V. G.; Carvalho, A. G. O.; Zilli, J. E.; Vital, M. J. S.; Rosa, C. A.; Rosa, L. H. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae), **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p. 36-44, 2015.

Guo, B.; Wang, Y.; Sun, X.; Tang, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136- 142, 2008.

Heerklotz, K. F. R.; Heerklotz, J. A.; Werner, C. Ethyl Acetate Extract from *Guignardia* used to treat an individual infected by fungi or bacteria, **United States Patent US 544,524 B2**, April 2003.

Higginbotham, S. J.; Arnold, A. E.; Ibanez, A.; Spadafora, C.; Coley, P. D.; Kursar, T. A. Bioactivity of fungal endophytes as a function of endophytes taxonomy and the taxonomy and distribution of their host plants. **Plos One**, v. 8, n. 9, p. 1-11, 2013.

Huang, Y.; Wang, J.; Li, G.; Zheng, Z.; Su, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 31, p. 163-167, 2001.

Jeenkeawpieam, J.; Phongpaichit, S.; Rukachaisirikul, V.; Sakayaro, J. Antifungal activity and molecular identification of endophytic fungi from the angiosperm *Rhodomyrtus tomentosa*. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 75, p. 14007-14016, 2012.

- Kiss, L.; Russell, J. C.; Szentivanyi, O.; Xu, X.; Jeffries, P. Biology and biocontrol potential of *Ampelomyces* mycoparasites, natural antagonists of powdery mildew fungi, **Biocontrol science and Technology**, v. 14, n. 7, p. 635-651, 2004.
- Koneman, E. W. **Diagnóstico microbiológico**. 5 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, p.551-578, 2001.
- Lahlali, R.; Hijri, M. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants, **FEMS Microbiology Letters**, v. 311, n. 2, p. 152-159, 2010.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Dunlap, P. V. M.; Clark, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- Magan, N.; Lacey, J. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 82, n. 1, p. 83-93, 1984.
- Mei, W. L.; Zheng, B.; Zhao, Y. X.; Zhong, H. M.; Chen, X. L. W.; Zeng, Y. B.; Dong, W. H.; Huang, J. L.; Proksch, P.; Dai, H. F. Meroterpenes from endophytic fungus A1 of mangrove plant *Scyphiphora hydrophyllacea*, **Marine Drugs**, v. 10, p. 1993-2001, 2012.
- Mejía, L. C.; Rojas, E. I.; Maynard, Z.; Bael, S. V.; Arnold, A. E.; Hebbbar, P.; Samuels, G. J.; Robbins, N.; Herre, E. A. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control**, v. 46, p. 4-14, 2008.
- Mkrtychyan, J. A. Antifungal/antagonistic activity of some coprini mushrooms against fungi potentially pathogenic for humans and animals. **Medical Journal**, v. 9, n. 1, p. 47-52, 2014.

Molitor, D.; Liermann, J. C.; Lohnertz, B, B.; Buckel, I.; Opatz, T.; Thines, E. Phenguignardic Acid and Guignardic Acid, Phytotoxic Secondary Metabolites from *Guignardia bidwellii*, **Journal of Natural Products**, v.75, p.1265-1269, 2012.

Morath, S. U.; Hung, R.; Bennett, J. W. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, v. 26. p. 73-83, 2012.

Naik, B. S.; Shashikala, J.; Krishnamurthy, Y. L. Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities in vitro, **Microbiological Research**, v. 164, p. 290-296, 2009.

Neto, P. A. S. P.; Azevedo, J. L.; Araújo, W. L. Micro-organismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 62-76, 2002.

Oplustil, C. P.; Zoccoli, C. M.; Tobuti, N.R.; Sinto, S. I. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier. pp. 544. 2010.

Peláez, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products –Can history repeat?. **Biochemical Pharmacology**, v. 30, p. 981-990, 2006.

Phongpaichit, S.; Nattawut, R.; Rukachaisirikul, V.; Sakayaroj, J. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 48, p. 367-372, 2006.

Porrás-Alfaro, A. P.; Bayman, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Annual Review of Phytopathology**, N. 49, p. 24.1-24.25, 2011.

Priti, V.; Ramesha, B. T.; Sing, S.; Ravikanth, G.; Ganeshaiyah, K. N.; Suryanarayanan, T. S.; Shaanker, R. U. How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites?. **Current Science**, v. 97, n. 4, p. 477-478, 2009.

Qadri, M.; Johri, S.; Shah, B. A.; Khajuria, A.; Sidiq, T.; Lattoo, S. K.; Aadin, M. Z.; Hassan, S. R. U. Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas. **Springer Plus**, v. 2, n. 8, 2013.

Rehman, S.; Mir, T.; Kour, A.; Qazi, P. H.; Sultan, P.; Shawl, A. S. In vitro antimicrobial studies of *Nodulisporium* specie: An endophytic fungus, **Journal of Yeast and Fungal Research**, v.2, n. 4, p.53-58, 2011.

Rinu, K.; Sati, Priyanka, S.; Pandey, A. *Trichoderma gamsii* (NFCCI 2177): A newly isolated endophytic, psychrotolerant, plant growth promoting, and antagonistic fungal strains. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 408-417, 2014.

Rocha, R.; Luz, D. E.; Engels, C.; Pileggi, S. A. V.; Filho, D. S. J.; Matiello, R. R.; Pileggi, M. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for in vitro biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib), **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 73-78, 2009.

Sadrati, N.; Daoud, H.; Zerroug, A.; Dahamma, S.; Bouharati, S. Screening of antimicrobial and antioxidante secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (*Triticum durum*), **Journal of Plant Protection Research**, v. 53, n. 2, p. 128-136, 2013.

Santiago, C.; Fitchett, C.; Munro, M. H. G.; Jalil, J.; Santhanam, J. Cytotoxic and antifungal activities of 5-Hydroxyramulosin, a compound produced by an endophytic fungus isolated from *Cinnamomum mollissimum*, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

Schulz, B.; Boyle, C.; Draeger, S.; Römmert, A. K.; Krohn, K. Endophytic fungi: A source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v.106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

- Staniek, A.; Woerdenbag, H. J.; Kayser, O. Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. **Journal of Plant Interactions**, 3, n. 2, p. 75–93, 2008.
- Stierle, A.; Strobel, G. A.; Stierle, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v.260, n. 5105, p. 214–216, 1993.
- Strobel, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 535-544, 2003.
- Strobel, G.; Daisy, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.
- Sunitha, V. H.; Devi, D. N.; Srinivas, C. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolates from medicinal plants. **World Journal of Agricultural Sciences**, n. 9, v. 1, p.01-09, 2013.
- Villas-Bôas, S.G. Sampling and sample preparation. In: Villas-Bôas, S. G., Roessner, U., Hansen, M. A. E., Smedsgaard, J.; Nielsen (eds). **Metabolome Analysis: An Introduction**. Hoboken: John Wiley & Sons, p.39–82, 2007.
- Wang, F. W.; Jiao, R. H.; Cheng, A. B.; Tan, S. H.; Song, Y. C. Antimicrobial potential of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 79-83, 2006.
- Zhou, X.; Zhu, H.; Liu, L. Lin, J.; Tang, K. a review: recent advances and future prospects of taxol producing endphytic fungi, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1707-1717, 2010.

**COMPARAÇÃO GENÉTICA E METABOLÔMICA DE ISOLADOS DO
FUNGO ENDOFÍTICO *Guignardia mangiferae* COLETADOS EM DIFERENTES
HOSPEDEIROS E REGIÕES GEOGRÁFICAS**

Elio Gomes Fernandes¹, Silas Granato Villas-Boas², Humberto Josué de Oliveira Ramos³, Marisa Vieira de Queiroz¹

¹Departamento de Microbiologia, ¹Universidade Federal de Viçosa. Av. PH Rolfs s/n - Campus Universitário. CEP: 36570 900 - Viçosa – MG – Brasil.

²Centre for Microbial Innovation, School of Biological Sciences, University of Auckland, Private Bag 92019, Auckland, New Zealand.

³Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa. Av. PH Rolfs s/n - Campus Universitário. CEP: 36570 900 - Viçosa – MG – Brasil.

*Corresponding author: mvqueiro@ufv.br

RESUMO

O fungo *Guignardia mangiferae* é um endofítico encontrado em diversas espécies vegetais e possui distribuição geográfica mundial. Neste estudo foram avaliados dois isolados dessa espécie provenientes do Brasil (F75) e da Nova Zelândia (ICMP 15453) e de diferentes hospedeiros vegetais, *Glycyne max* (F75) e *Vaccinium virgatum* (ICMP 15453) quanto às diferenças encontradas no perfil metabólico por meio de GC-MS (Gas chromatography mass spectrometry) e metaboloma por meio de LC-MS (Liquid chromatography mass spectrometry). Nas análises de perfis metabólicos, os extratos brutos analisados por meio de GC-MS revelaram que 19,76% dos compostos detectados variaram significativamente ($P \leq 0,05\%$), no extrato metanólico, 17,44% das moléculas detectadas variaram significativamente entre os metabólitos extraídos por meio do

acetato de etila e 10% dos compostos detectados como ácidos graxos variaram significativamente, entretanto todos os compostos estavam presentes nos dois isolados. Nos resultados gerados por LC-MS, foram observadas nos cromatogramas, sobreposições nos tempo de retenção entre os dois isolados em todos os tratamentos (extração dos metabólitos com acetato de etila detectados com ionização positiva e negativa e extração dos metabólitos com metanol com ionização positiva e negativa). Também foram observados variações significativas por meio do teste “t” ($P \leq 0,05$) dos compostos detectados entre os dois fungos, enquanto foi maior a variação entre os compostos dos fungos e do controle. A análise dos componentes principais realizada com os íons detectados por meio do LC-MS, em todos os tratamentos, mostrou que o primeiro componente explicou a maioria dos compostos, agrupando mais de 90% de todos os compostos. O componentes 2 e 3 foram menos representativos, com o segundo componente explicando menos de 10 % das variações e o terceiro menos de 1%. Por meio deste estudo, foi possível identificar produtores promissores de compostos de interesse industrial e biotecnológico, sendo o isolado F75 o melhor isolado para a produção de GABA e 2,3-butanodiol e o isolado ICMP 15453 o melhor produtor do antifúngico benzofurano. Entretanto, ambos os isolados apresentaram uma grande produção de ácidos orgânicos como fumárico e málico. Concluimos ainda que estes dois fungos isolados de diferentes regiões geográficas e hospedeiros, apresentaram variações metabólicas, tanto em nível de abundância quanto por tipo metabólico.

Palavras chaves: Metaboloma, perfil metabólico, LC-MS e GC-MS

INTRODUÇÃO

O fungo *Guignardia mangiferae* (anamórfico: *Phyllosticta capitalensis*) pertence ao filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Botryosphaeriales e família

Botryosphaeriaceae. A espécie *G. mangiferae* é endofítica e já foi isolada de várias espécies vegetais, possuindo distribuição geográfica mundial. Estudos anteriores demonstram o isolamento de *G. mangiferae* como endofítico em *Trichilia emetica* na África do Sul, *Scheffera* sp. na Costa Rica e de *Paphiopedilum* sp. na Alemanha (Baayen et al., 2002); de citros na Nova Zelândia (Everett & George, 2006) e nos Estados Unidos (Er et al., 2014); de *Rhododendron* sp. no Japão (Sutan et al., 2011) e de *Glycine max* no Brasil (Leite et al., 2013). Além disso, o fungo *G. mangiferae* tem sido alvo de estudos envolvendo o isolamento e identificação de compostos antimicrobianos (Phongpaichit et al., 2007; Jeenkeawpieam et al., 2012; Mei et al., 2012).

Os fungos endofíticos, incluindo *G. mangiferae*, são habitantes de diversos tecidos das plantas, sendo capazes de interagir geneticamente durante um longo tempo e podendo ainda co-evoluir juntamente com seu hospedeiro (Yuan et al., 2010). Contudo, a interação com o ambiente biótico (por exemplo, diferentes hospedeiros) e abiótico (regiões geográficas distintas) possuem reflexo tanto na fisiologia do fungo, como no metabolismo, nutrição, crescimento e reprodução (Walker & White, 2005). O reino Fungi ainda é caracterizado por possuir muitas espécies com rotas bioquímicas específicas e, conseqüentemente, gerando compostos diversos e únicos, como penicilinas, ciclosporinas, componentes tóxicos, farmacêuticos, entre outros (Keller et al., 2005). O metabolismo dos fungos é dividido em duas partes: primário, o qual fornece energia e precursores químicos às células, que são essenciais para a reprodução e crescimento dos organismos e o secundário, que não aparenta ter função relevante no crescimento celular, mas pode gerar alguma vantagem competitiva ao organismo, como na produção de micotoxinas e antimicrobianos (Keller et al., 2005; Brakhage & Schroeckh, 2011).

O conjunto de metabólitos reflete as adaptações provocadas pelo ambiente a nível genômico, bem como as atividades celulares de um micro-organismo (Baidoo & Keasling, 2013). As análises de perfil metabólico e metaboloma representam as abordagens mais apropriadas para investigar diferenças intraespecíficas entre indivíduos da mesma espécie, pois envolve a identificação e a quantificação de todos os compostos de baixo peso molecular, intra e extracelular, produzidos pelo metabolismo (Nielsen, 2007). Para a realização dessa abordagem em metabolômica microbiana, as técnicas mais promissoras utilizadas atualmente em pesquisas envolvem o emprego de equipamentos como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) (Baidoo & Keasling, 2013).

Tendo em vista que o ambiente (localidade geográfica e hospedeiro) podem provocar mudanças que englobam a diferenciação em níveis quantitativos e qualitativos no metaboloma de uma espécie fúngica, os objetivos do nosso estudo foi avaliar as diferenças existentes entre dois isolados endofíticos de *G. mangiferae* coletados no Brasil e na Nova Zelândia e de diferentes hospedeiros, por meio do metaboloma e dos perfis metabólicos obtidos por meio de LC-MS e GC-MS. Além disso, detectar compostos bioativos produzidos por esses isolados, identificando o fungo mais promissor para prospecção de compostos com aplicações industriais e biotecnológicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Origens dos isolados

Dois isolados do fungo filamentoso endofítico *G. mangiferae* foram usados neste estudo. O fungo F75 foi originalmente isolado de folhas de *G. max* (soja) e depositado na micoteca do Laboratório de Genética de Micro-organismos da Universidade Federal

de Viçosa – Brasil. O fungo ICMP 15453 foi isolado da planta *Vaccinium virgatum* e depositado no International Collection of Micro-organisms from Plants –Nova Zelândia.

Cultivo, interrupção do metabolismo (Quenching) e extração dos metabólitos brutos

Para cada isolado, foram preparadas 6 placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Himedia). Foi inoculado um disco da borda do micélio de 5 mm de diâmetro de cada isolado, em cinco placas de Petri, sendo uma usada como controle, onde não foi realizada a inoculação do fungo. Todas as placas foram mantidas em estufa, no escuro, por 20 dias a 25°C. Após o crescimento, o processo de extração e “quenching” foram feitos conforme protocolo desenvolvido por Smart et al. (2010), com modificações.

Cada placa foi retirada da estufa de crescimento tipo B.O.D e imediatamente o meio de cultura contendo o fungo foi macerado com nitrogênio líquido até reduzir a pó. Este pó foi transferido para tubo tipo Falcon de 50 mL, envolto de papel alumínio para evitar luz, e foram adicionados 15 mL de metanol gelado, seguido de 500 µL de solução de D5-triptofano (0,01 mg/µL) como padrão interno. O tubo foi armazenado por 10 min em freezer - 20°C e, em seguida, agitado em rotação máxima (2500 rpm) por 1 min. Cada tudo foi então centrifugado a -9°C por 4000g/15 min e recolhido o sobrenadante. Foi adicionado novamente 5 mL de metanol e repetido o processo de centrifugação e coleta do sobrenadante (sem adição do padrão interno). O total de aproximadamente 20 mL de extrato bruto metanólico de cada placa de cultivo foi armazenado em ultrafreez a - 80°C. Foi realizada uma segunda extração do precipitado, insolúvel em metanol, utilizando acetato de etila gelado. Foram adicionados 10 mL de acetato de etila gelado, em seguida, 20 µL de 12-bromo-dodecanol (10 mM) para o padrão interno. A solução ficou por 10 min em freezer - 20°C e em seguida foi agitada em rotação máxima por 1 min. Cada tubo foi então centrifugado a -9°C por 4000g/15 min e o sobrenadante

coletado. O extrato bruto metanólico foi concentrado até remoção total do solvente em liofilizador, enquanto a solução contendo acetato de etila foi concentrada em evaporador rotatório a temperatura ambiente e ambos foram estocados em ultrafreezer -80°C até a sua utilização nas próximas etapas. Metade do metabólito bruto de cada extração foi destinada a análise por meio de GC-MS e a outra metade para análise por meio de LC-MS.

Derivatização química dos metabólitos

As amostras liofilizadas extraídas com metanol foram derivatizadas de acordo com o protocolo descrito por Smart et al. (2010) usando cloroformato de metila (MCF). Resumidamente, as amostras foram ressuspensas em 400 µL de hidróxido de sódio (1 M) e foram adicionados 20 µL de 2,3,3,3-d4-alanina (padrão interno). As amostras foram transferidas para tubos sinalizados de vidro, seguido da adição de 334 µL de metanol e 68 µL de piridina. Foram acrescentados 40 µL de MCF seguido da agitação vigorosa por 30 s, e novamente foram adicionados 40 µL de MCF seguido da agitação vigorosa por 30 s, e então a derivatização teve início. Após a derivatização, para separar os compostos derivatizados da mistura reativa, foram adicionados 800 µL de clorofórmio e agitado vigorosamente durante 10 s, seguidos da adição de 800 µL de bicarbonato de sódio (50 mM), e os tubos foram agitados vigorosamente por 10 s. A fase aquosa foi removida e desidratada com sulfato de sódio anidro e o sobrenadante foi transferido para tubos apropriados para GC-MS. As amostras extraídas com acetato de etila foram encaminhadas diretamente ao aparelho de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) sem o processo de derivatização.

Cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massa (GC-MS), análise e identificação dos compostos

Foi injetado 1 μL das amostras derivatizadas e extraídas por acetato de etila no modo “splitless” pulsado com a temperatura do injetor a 290 °C, sendo o gás hélio em fluxo de 1,0 mL/min. O aparelho usado foi um Agilent GC7890 de sistema acoplado a um detector seletivo de massa MSD5975 (EI) operando a 70 eV. Foi usada uma coluna capilar de sílica ZB-1707, 30 m de comprimento e 0,25 mm de espessura, 0,15 μm de fase estacionária (86% dimetilpolisiloxano, 14% cianopropilfenil, Phenomenex). O gás carreador da fase móvel usado foi o hélio de ultra-alta pureza (99,9999%). Os parâmetros de análises foram seguidos de acordo com Smart et al (2010). A temperatura de aquecimento do GC iniciou-se a 45 °C durante 2 min. Em seguida, a temperatura foi elevada, com um gradiente de 9°C/ min até atingir 180°C e mantida por 5 min. Novamente a temperatura foi elevada a 40°C/min até 220°C e mantida por 5 min. Em seguida, a temperatura foi gradualmente elevada a 40°C/min até atingir 240°C e mantida durante 11,5 min. Elevou-se a temperatura gradualmente a 40°C/min até atingir 280°C e esta foi mantida por 2 min. A temperatura de interface foi de 250°C, sendo a temperatura do quadrupolo correspondente a 200°C.

Os dados gerados pelo GC-MS foram analisados e identificados por meio do programa “The automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System” (AMDIS) usando uma biblioteca MCF de espectro de massa e outra para compostos não-derivatizados e ácido graxos, ambas construídas no laboratório “Metabolomics Laboratory da The University of Auckland”. Os picos foram normalizados em função da abundância e intensidade do pico padrão representado pelo D-Triptofano (amostras derivatizadas) e 12-bromo-dodecanol (amostras extraídas por acetato de etila). As identificações foram realizadas em ambos MS espectro e seus tempos específicos de retenções no cromatograma. A abundância relativa dos metabólitos identificados foram

determinados pelo programa ChemStation (Agilent) usando os valores de picos-base dos íons de referência.

Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (LC-MS)

Os extratos metabólicos extraídos por metanol e acetato de etila dos dois isolados fúngico foram analisados através do LC-MS. As amostras foram analisadas por UHPLC-MS; Accela 1250 acoplado com Q-Exactive Orbitrap, sistema de espectrômetro de massa (Thermo Fisher Scientific, Auckland, New Zealand) operando no modo de ionização por eletropulverização aquecida. As amostras foram analisadas simultaneamente pela alternância automática dos modos positivo-negativo. As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna Synchronis C18 100 x 2.1 mm, 1.7 μ m (Thermo Fisher Scientific, Auckland, New Zealand). Os solventes A e B foram 0,1% de ácido fórmico em água e ácido fórmico a 0,1% em acetonitrila, respectivamente. Um fluxo de solvente de 0,40 μ L min⁻¹ foi aplicado com eluição em gradiente: 98% A por 1,5 minutos e subsequentemente eluição isocrática até 99% B durante 14 minutos, seguido por 2 minutos à 99% B e um rápido retorno à 95% A por um minuto e mantido 95% de A por 4 minutos para equilibrar a coluna. As amostras e colunas foram mantidas em 4 e 30°C, respectivamente. Volumes de 5 μ L de amostras foram injetados. Os espectros de massas foram adquiridos por meio de escaneamentos de MS1 (method) no intervalo de massa de 80 – 1200 m/z utilizando o detector de massas Orbitrap, com resolução de massa de 70,000 (FWHM como definida para m/z 400), AGC 1 e6, IT 100ms, Sheath gas 50, Aux gas 15, Sweep gas 2, Spray voltage 4.00 kV, temperatura capilar 370°C, S-lens RF 50.0, temperatura de aquecimento de 370°C. Calibrações de massas foram realizadas antes de cada análise analítica utilizando uma mistura de calibração definida pelo fabricante do equipamento.

As análises dos dados foram efetuadas utilizando do programa Sieve versão 2.1, onde os compostos foram alinhados com base no pico padrão para D5-triptofano (amostras extraídas com metanol) e com a técnica de alinhamento de cromatograma total de íons (TIC- total ion count) para amostras extraídas por acetato de etila.

Análise estatística

O valor referente à intensidade relativa de cada íon detectado por meio de GC-MS e LC-MS, entre os dois isolados fúngicos, foram analisados por meio do teste “t” para confirmar diferenças entre os fungos. Foi considerado estatisticamente significativo quando $P < 0,05$. Ainda para os dados gerados por LC-MS, os picos de intensidades de todos os compostos foram analisados por meio dos componentes principais (PCA- Principal Component Analysis). As análises foram realizadas no programa estatístico Past versão 2.15 enquanto os gráficos de cada tipo de extração e detecção (Metanol e detecção de íons positivos e negativos e Acetato de etila com detecção de íons positivos e negativos) foram gerados pelo programa Sieve versão 2.1 por possibilitar a plotagem dos dados específicos de cada repetição e em gráficos 3D, assim proporcionando uma melhor visualização dos resultados.

RESULTADOS

Perfil metabólico dos isolados de *G. mangiferae*

Resultados gerados por meio do GC-MS do perfil metabólico para os extratos brutos extraídos com metanol mostraram que 18 compostos variaram significativamente em termos de abundância entre os dois isolados ($P \leq 0,05$). Esses compostos representam 19,76% dos compostos totais detectados via GC-MS (Tabela 1). Para o extrato bruto extraído com acetato de etila, 26 (17,44%) dos compostos detectados variaram significativamente entre os dois isolados (Tabela 2) e apenas um composto (10%) identificado como ácido palmítico, variou significativamente entre os dois

Tabela 1. Compostos extraídos com metanol dos dois isolados de *G. mangiferae* e detectados por GC-MS

Compostos	Média da intensidade F75 (n = 5)	Desvio padrão	Média da intensidade 15453 (n = 5)	Desvio padrão	Média intensidade controle (n = 2)	Teste T*
ácido palmitoléico	0,082	0,006	0,139	0,027	0,067	0,002**
Ácido 5-oxotetrahydrofuran-2-carboxílico	5,652	1,539	2,719	0,713	4,035	0,012**
Ácido glutárico	0,105	0,009	0,144	0,028	0,165	0,012**
Ácido succínico	21,935	3,767	14,567	6,575	25,342	0,013**
Composto desconhecido	0,253	0,054	0,156	0,064	0,230	0,014**
Composto desconhecido	0,016	0,009	0,034	0,022	0,051	0,018**
Ácido 4-aminobutírico (GABA)	0,764	0,214	0,404	0,163	0,653	0,018**
ácido vanílico	0,038	0,010	0,023	0,017	0,052	0,026**
2,3-Butanediol	3,374	2,082	0,201	0,036	0,134	0,027**
Ácido 2-hidroxi-butírico	0,057	0,021	0,026	0,003	0,018	0,029**
Ácido cítrico	3,190	0,328	4,545	0,878	2,828	0,029**
Ácido levulínico	0,842	0,126	0,609	0,231	0,077	0,031**
Ácido esteárico	6,439	1,724	3,998	1,245	1,396	0,033**
Ácido oléico ou vacênico	3,633	0,538	4,474	1,668	0,165	0,033**
Ácido tartárico	0,437	0,091	0,311	0,144	0,625	0,034**
Ácido 4-hidroxifeniletanol	1,563	1,038	0,118	0,049	0,085	0,036**
Composto desconhecido	0,132	0,019	0,108	0,017	0,125	0,041**
Acetato de fenetila	0,110	0,075	0,017	0,075	0,196	0,050**
Ácido fumárico	59,232	8,357	44,787	18,719	1,362	0,052
Diisooctil éster 1,2-ácido benzenodicarboxílico	2,071	0,115	1,896	0,605	3,035	0,056
Cisteína	2,211	0,174	2,907	1,167	0,087	0,058
Ácido 2-hidroxiisobutírico	0,054	0,024	0,027	0,004	0,020	0,064
Ácido N-acetilglutâmico	0,421	0,056	0,359	0,027	0,358	0,070
Glutaciona	4,496	0,655	5,519	1,930	8,210	0,072
Ácido 4-hidroxifenilacético	5,362	1,598	3,673	1,499	0,146	0,082
Ácido 2-oxovalérico	16,721	3,363	21,163	8,511	0,117	0,084
d4-alanina	1,090	0,167	1,296	0,270	0,578	0,087
Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico	0,019	0,004	0,026	0,010	0,039	0,097
Ácido nicotínico	0,287	0,124	0,168	0,202	0,594	0,098
Ornitina	4,557	1,971	2,797	1,489	5,164	0,117
Ácido trans-cinâmico	0,020	0,005	0,024	0,004	0,013	0,121
Ácido citramálico	0,412	0,117	0,298	0,118	0,043	0,123
Ácido aspártico	13,194	1,234	15,698	7,682	29,537	0,133
Ácido mirístico	0,189	0,038	0,156	0,078	0,344	0,134
Ácido 4-aminobenzóico	0,088	0,027	0,067	0,011	0,038	0,155
Ácido 2-isopropilmálico	0,600	0,131	0,466	0,203	0,019	0,157

Tabela 1. Continuação

Compostos	Média da intensidade F75 (n = 5)	Desvio padrão	Média da intensidade 15453 (n = 5)	Desvio padrão	Média intensidade controle (n = 2)	Teste T*
Ácido 3-hidroxibenzóico	1,000	0,554	0,576	0,175	0,140	0,163
Glutamina	1,122	0,456	0,781	0,238	0,169	0,171
EDTA	0,140	0,024	0,118	0,243	0,643	0,193
Ácido málico	15,208	7,439	9,908	3,901	1,703	0,198
Ácido beta-citrila-L-glutâmico	0,193	0,063	0,142	0,150	0,470	0,200
Ácido malônico	31,529	2,924	28,414	11,022	0,488	0,204
Ácido araquídico	0,199	0,064	0,155	0,049	0,040	0,219
Histidina	0,846	0,208	0,696	0,497	1,679	0,244
Ácido 3-metil-2-oxopentanóico	4,563	0,721	4,991	1,834	0,156	0,268
Glicina	8,043	2,650	6,116	12,148	31,612	0,287
Ácido palmítico	5,324	1,172	4,675	1,025	2,034	0,295
Lisina	24,090	3,652	20,562	7,577	29,395	0,296
Ácido 4-metil-2-oxopentanóico	4,404	0,697	4,777	1,747	0,177	0,314
Tirosina	9,655	2,371	7,922	9,231	26,293	0,333
Composto desconhecido	0,585	0,171	0,499	1,373	3,276	0,339
O-acetilserina	0,399	0,342	0,239	1,519	3,457	0,359
Ácido para-toluico	0,075	0,005	0,070	0,012	0,091	0,361
Ácido 2-oxoglutárico	4,283	1,041	5,074	1,748	6,847	0,378
Ácido láctico	2,636	0,419	2,438	0,981	4,301	0,389
Asparagina	8,955	2,495	7,582	6,862	21,845	0,404
ácido 2-aminoadípico	0,344	0,152	0,273	0,292	0,848	0,441
Ácido citracônico	0,246	0,055	0,220	0,069	0,301	0,454
Ácido glutâmico	24,802	2,411	26,664	10,599	44,343	0,465
Ácido 2-oxobutírico	0,273	0,123	0,317	0,101	0,092	0,516
Ácido cis-aconítico	12,720	1,703	12,055	1,870	12,934	0,555
Ácido pirúvico	0,585	0,329	0,676	0,421	1,759	0,582
Prolina	37,192	8,446	34,118	25,685	83,151	0,586
Ácido benzóico	1,401	0,651	1,227	0,416	0,225	0,599
Ácido quínico	0,889	0,115	0,847	0,133	0,916	0,606
Ácido oxálico	0,723	0,104	0,689	0,126	0,454	0,650
Serina	1,215	0,154	1,289	0,894	2,994	0,693
Ácido linoléico	4,718	0,770	4,910	1,923	0,093	0,700
Treonina	4,875	1,147	5,303	6,841	18,639	0,704
Triptofano	8,382	2,996	7,556	13,303	35,475	0,721
Alanina	36,866	4,669	35,104	27,143	86,749	0,744
Cistationina	0,601	0,119	0,618	0,075	0,416	0,792
Composto desconhecido	0,318	0,028	0,313	0,064	0,390	0,812
Ácido piroglutâmico	25,379	5,205	26,183	13,782	52,202	0,816
Metionina	0,787	0,305	0,739	1,868	4,638	0,831

Tabela 1. Continuação

Compostos	Média da intensidade F75 (n = 5)	Desvio padrão	Média da intensidade 15453 (n = 5)	Desvio padrão	Média intensidade controle (n = 2)	Teste T*
Ácido isocítrico	0,279	0,131	0,291	0,143	0,053	0,886
Leucina	30,748	9,631	29,687	30,586	88,138	0,898
Fenilalanina	11,437	3,338	11,117	13,057	37,380	0,902
Isoleucina	9,033	2,128	8,888	6,140	19,127	0,944
NADP_NADPH	0,256	0,072	0,258	0,042	0,161	0,948
Nicotinamida	0,160	0,044	0,161	0,024	0,132	0,948
Ácido itacônico	3,959	0,968	3,990	0,834	4,766	0,949
Valina ou Norvalina	27,276	7,572	27,631	28,824	83,348	0,958
Creatinina	1,189	0,370	1,184	1,294	4,160	0,988
D5 triptofano (padrão interno)	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000

*Teste “t” realizado apenas com os picos de intensidade dos dois isolados, deixando os valores referentes ao controle apenas para comparação da presença ou ausência dos compostos quando o fungo estava presente no meio de cultivo.

**Compostos que diferiram significativamente entre os dois isolados por meio do teste T de Student ($P \leq 0,05$)

isolados para os ácidos graxos detectados por meio de GC-MS (Tabela 3).

A análise feita por meio do GC-MS detectou 85 compostos nas amostras extraídas com metanol e derivatizadas, compreendendo os compostos polares, sendo a maioria identificada utilizando a biblioteca MCF MS do próprio laboratório.

Entre os compostos que variaram significativamente, o isolado F75 apresentou maiores médias de picos de intensidade quando comparado com o isolado ICMP 15453 para os compostos: 2,3-Butanediol (3,374 contra 0,201); ácido 2-Hidroxi-butírico (0,057 contra 0,026); ácido esteárico (6,439 contra 3,998) e ácido 4-Hidroxi-feniletanol (1,563 contra 0,118), respectivamente. Por outro lado, o fungo ICMP 15453 apresentou uma maior média de picos de intensidades quando comparados com o isolado F75 para os compostos: ácido cítrico (4,545 contra 3,190); ácido palmitoléico (0,139 contra 0,082) e ácido oleico ou vacênico (4,474 contra 3,633), respectivamente. Os picos de intensidade também revelaram diferenças nas taxas de consumo de determinados compostos pelos

Tabela 2. Compostos extraídos com acetato de etila dos dois isolados de *G.mangiferae* e detectados por GC-MS.

Compostos	Média da intensidade F75 (n = 5)	Desvio padrão	Média da intensidade 15453 (n = 5)	Desvio padrão	Média intensidade controle (n = 2)	Test T*
1,14-tetradecanodiol	0,046	0,008	0,083	0,009	0,027	0,000**
2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno	0,586	0,111	0,260	0,048	0,044	0,001**
Benzofurano	0,029	0,009	0,077	0,022	0,015	0,005**
4-Amino benzonitrila	0,047	0,015	0,095	0,024	0,027	0,007**
Acetato 11-tetradecen-1-ol	0,151	0,057	0,264	0,034	0,027	0,008**
Metil-éster ácido hexadecanóico ou Metil-éster (Z)-9-hexadecanóico	0,146	0,054	0,252	0,027	0,030	0,008**
1,3-Difenil-2-propanona	0,017	0,006	0,037	0,011	0,008	0,011**
2-metilpropil éster ácido benzeacético ou 2-Etil-6-metil-piridina-3-ol	0,042	0,013	0,075	0,019	0,023	0,014**
Metil-éster ácido hexadecanóico	0,526	0,245	0,937	0,101	0,013	0,016**
Composto desconhecido	0,028	0,005	0,020	0,003	0,024	0,017**
Tetrahydro-2,5-dimetil-furano	0,021	0,001	0,018	0,002	0,027	0,020**
2-hidroxi-1-(hidroximetil)etil ester-ácido octadecanóico	0,134	0,014	0,081	0,034	0,115	0,021**
4-Metóxi-l-fenilalanina	0,024	0,007	0,037	0,007	0,007	0,023**
Composto desconhecido	0,021	0,007	0,042	0,014	0,007	0,024**
2,4-Diidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furano-3	0,047	0,003	0,056	0,006	0,048	0,024**
(1,2-dimetoxietil)-benzeno	0,023	0,007	0,035	0,007	0,009	0,029**
1-Hidroxy-6-3-(3-isopropenil-ciclopropi-1-enil)6-metil-heptano-2-um	0,305	0,154	0,698	0,275	0,015	0,030**
2,4-dimetil decano	0,051	0,003	0,059	0,005	0,052	0,031**
Metil-éster ácido 9-octadecanóico	0,901	0,260	1,273	0,167	0,062	0,032**
Etil-éster ácido hexadecanóico	0,007	0,003	0,003	0,001	0,002	0,034**
4-(4-fluorofenil)-acenafteno	0,011	0,004	0,016	0,003	0,004	0,038**
Ácido carbâmico	0,033	0,004	0,043	0,008	0,032	0,039**
1,2-diidrotojuopeno-(11)	0,009	0,003	0,014	0,003	0,004	0,040**
2,3-Butanodiol	0,429	0,313	0,018	0,005	0,018	0,043**
[R-(R*,R*)]-2,3-Butanodiol	0,446	0,328	0,018	0,004	0,018	0,044**
Metil éster ácido 9-octadecanóico	0,937	0,284	1,293	0,170	0,068	0,050**
Composto desconhecido	0,029	0,006	0,040	0,008	0,018	0,051
3,7-dimetil undecano	0,034	0,004	0,043	0,007	0,032	0,053
4-Oxo-.beta.-isodamascol ou 2-Metil-7H-1,3,4-tiadiazolo[3,2-a]pirimidina-7-um ou 2-Amino-4-etil-5-metil-tiopheno-3-carboxilico acido metil ester	0,042	0,026	0,012	0,006	0,005	0,057
2-Pentadecanona	0,004	0,001	0,010	0,005	0,002	0,057
6-Undecano	0,002	0,000	0,010	0,007	0,001	0,058
Ácido benzenoacético	0,047	0,024	0,107	0,053	0,004	0,064
Metil-éster ácido benzenoacetico	0,018	0,009	0,052	0,030	0,003	0,066

Tabela 2. Continuação

Compostos	Média da intensidade F75 (n = 5)	Desvio padrão	Média da intensidade 15453 (n = 5)	Desvio padrão	Média intensidade controle (n = 2)	Test T*
5-metil Undecano	0,045	0,003	0,054	0,008	0,044	0,068
4,5-dimetil nonano ou 5- etil-2-metil octano	0,064	0,018	0,096	0,029	0,047	0,072
2,4-Bis(1,1-dimetiletil)-fenol	0,133	0,018	0,114	0,009	0,227	0,073
Metacetamol	0,012	0,001	0,013	0,001	0,009	0,074
1-Iodo-Nonano	0,025	0,004	0,031	0,006	0,021	0,079
2-Heptadecano	0,017	0,003	0,037	0,021	0,003	0,087
Dimetil-1,8-naftalenodioxisilano	0,003	0,001	0,004	0,001	0,000	0,088
Hezametil ciclotrisiloxano	0,006	0,001	0,022	0,016	0,006	0,093
9-Metiltetraciclo[7.3.1.0(2.7).1(7.11)-]tetradecano	0,088	0,037	0,149	0,060	0,005	0,097
Composto desconhecido	0,084	0,005	0,090	0,005	0,093	0,099
Octametil ciclotetrasiloxano	0,005	0,001	0,013	0,009	0,005	0,102
Metil tetradecanoato	0,006	0,002	0,008	0,000	0,002	0,105
2,3-diidro-3,5-diidroxi-6-metil-4H-Pirano-4	0,033	0,006	0,042	0,009	0,025	0,108
Composto desconhecido	0,025	0,010	0,016	0,002	0,019	0,110
3-Hexanona	0,082	0,006	0,089	0,007	0,092	0,114
N-metil-DL-triptofano	0,045	0,004	0,049	0,004	0,044	0,115
3,3-dimetil Octano	0,020	0,011	0,035	0,015	0,009	0,117
1,12-Dodecanediol	0,195	0,004	0,190	0,006	0,193	0,124
1-etnil-4-metoxi-benzeno ou p-isopropenilfenol	0,002	0,001	0,003	0,001	0,000	0,127
2-(Dimetilamino)-1,3-dimetiltetrahydro-1,3,2-diazafosfole 2-oxido	0,007	0,001	0,008	0,001	0,007	0,128
Metil éster 9,12-ácido octadecadienóico	0,948	0,292	1,211	0,161	0,036	0,128
Ácido octadecanóico	0,507	0,067	0,440	0,059	0,074	0,131
2,5-bis(trimetiltisiloxi) ácido benzóico	0,004	0,001	0,006	0,002	0,004	0,140
Decano	0,066	0,004	0,073	0,009	0,062	0,144
(R)-3-Pirrolidinol	0,028	0,006	0,038	0,011	0,021	0,149
1,3-Dimetil-cis-ciclohexano	0,022	0,001	0,024	0,002	0,019	0,160
Ácido 9,12-octadecadienóico	0,705	0,099	0,810	0,119	0,050	0,167
2-Hexanona	0,089	0,006	0,095	0,006	0,096	0,172
2-Metilbicyclo[3.2.1]octano ou 8-dodeceno-1-ol, (Z)	0,005	0,004	0,002	0,000	0,002	0,175
2-Decanona	0,009	0,001	0,011	0,003	0,004	0,186
Ácido acético	0,210	0,029	0,254	0,061	0,840	0,200
Ácido n-hexadecanóico	0,284	0,055	0,244	0,033	0,077	0,204
3-Hidroxi 2-butanona	0,030	0,011	0,022	0,004	0,034	0,210
2,4-dimetil-hexano	0,192	0,014	0,212	0,030	0,687	0,211
2-Coumaranona	0,003	0,002	0,007	0,005	0,000	0,211
Composto desconhecido	0,016	0,004	0,019	0,004	0,010	0,218
3-Hexano	0,008	0,001	0,009	0,002	0,004	0,224

Tabela 2. continuação

Compostos	Média da intensidade F75 (n = 5)	Desvio padrão	Média da intensidade 15453 (n = 5)	Desvio padrão	Média intensidade controle (n = 2)	Test T*
Ciclohexildimetoximetil Silano	0,012	0,002	0,011	0,001	0,000	0,226
Metil ester ácido octadecanóico/ ácido esteárico	0,490	0,175	0,606	0,084	0,013	0,231
Composto desconhecido	0,184	0,010	0,193	0,014	0,177	0,251
3,8-dimetil undecano	0,013	0,003	0,015	0,003	0,007	0,254
p-Xileno	0,052	0,004	0,057	0,007	0,048	0,266
2,5-dimetil-2-hexeno	0,059	0,004	0,063	0,005	0,049	0,268
2H-1-benzopiran-2-um, 7-(dietilamino)-4-metil ou 3,5-Di-t-butil-alfa-imidofeniletano	0,006	0,002	0,004	0,002	0,000	0,270
Ácido tetradecanóico, 12-metil-metil-éster ou metil-éster ácido pentadecanóico	0,007	0,003	0,009	0,001	0,002	0,272
Composto desconhecido	0,032	0,005	0,027	0,009	0,012	0,272
4-Hidrazinobenzonitrila	0,003	0,002	0,005	0,003	0,004	0,276
Composto desconhecido	0,046	0,003	0,048	0,004	0,043	0,280
Ácido hexadecanóico	0,071	0,008	0,063	0,012	0,059	0,280
Z-11-ácido hexadecanóico	0,233	0,043	0,206	0,029	0,072	0,283
Diidro-3-metileno-2,5-furandione	0,004	0,001	0,006	0,004	0,002	0,283
1-Iodo-decano	0,033	0,006	0,043	0,018	0,019	0,286
3,4-dimetil-2-hexeno	0,055	0,006	0,061	0,008	0,045	0,286
2-Undecenal	0,009	0,005	0,007	0,001	0,004	0,300
2-etil-1,3-Dioxolano	0,047	0,003	0,049	0,004	0,044	0,301
Propil-éster 3-metil-ácido butanóico ou trimetil[4-(1,1,3,3,-tetrametilbutil)phenoxi]silano	0,009	0,001	0,013	0,008	0,007	0,320
2,2-bis(hidroximetil)-1,3-propanediol	0,037	0,005	0,030	0,014	0,016	0,323
2-Hexanol	0,024	0,002	0,026	0,002	0,029	0,333
2,4-Decadienal	0,006	0,004	0,004	0,001	0,002	0,337
5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldeído	0,004	0,001	0,008	0,008	0,004	0,338
3-(2-ciclopentenil)-2-metil-1,1-diphenil-1-propeno	0,052	0,029	0,038	0,004	0,037	0,341
Composto desconhecido	0,029	0,005	0,047	0,037	0,022	0,352
Ácido 9-octadecanóico	0,904	0,126	0,979	0,134	0,105	0,385
(Z)- 2-(9-octadeceniloxi)-etanol	0,112	0,026	0,095	0,031	0,070	0,392
1,4-dietinil benzeno	0,003	0,001	0,009	0,015	0,000	0,401
Bis(2-etilhexil) ester ácido-decanodióico	0,022	0,006	0,029	0,017	0,043	0,421
(E,E)-2,4-Decadienal	0,005	0,003	0,003	0,001	0,001	0,422
5-metil-2-fenil-1H-indol	0,086	0,077	0,056	0,006	0,040	0,423
Glicerina	0,010	0,003	0,016	0,016	0,003	0,424
Tolueno	0,090	0,008	0,094	0,008	0,081	0,429
2,4-dimetil-2-hexeno	0,026	0,001	0,027	0,003	0,021	0,431
Tetrahydro-4-hidroxi-4-metil-2H-piran-2	0,034	0,012	0,040	0,011	0,019	0,432
Composto desconhecido	0,017	0,006	0,020	0,007	0,016	0,444
Composto desconhecido	0,005	0,001	0,004	0,001	0,006	0,452

Tabela 2. continuação

Compostos	Média da intensidade F75 (n = 5)	Desvio padrão	Média da intensidade 15453 (n = 5)	Desvio padrão	Média intensidade controle (n = 2)	Test T*
Composto desconhecido	0,043	0,016	0,034	0,020	0,041	0,458
5,5-Dimetil-1-etil-1,3-Ciclopentadieno	0,003	0,001	0,003	0,001	0,002	0,483
1-Iodoundecano	0,013	0,002	0,014	0,002	0,009	0,494
Metil-éster ácido 11,14,17-eicosatrienóico	0,142	0,096	0,109	0,026	0,021	0,495
O-Xileno	0,062	0,002	0,058	0,011	0,053	0,508
Ergosterol (3.beta.,22E)	0,103	0,087	0,069	0,065	0,136	0,511
1a,3,4,7,11,11a-hexaidro-8,11a-dimetil-, [1aR-(1aR*,4S*,7R*,11aS*)]-4,7-Metanofuro[3,2-c]oxireno[f]oxacicoundecina-5(2H)	0,032	0,014	0,037	0,010	0,002	0,514
Composto desconhecido	0,005	0,002	0,004	0,000	0,003	0,516
Acetato (éster) 4-Piridinol	0,065	0,010	0,061	0,011	0,038	0,555
3,6-dimetil-decano	0,013	0,002	0,014	0,002	0,009	0,556
Etil-éster ácido 9-octadecenóico	0,094	0,034	0,080	0,044	0,090	0,592
Ciclododecino	0,040	0,016	0,033	0,020	0,043	0,609
Composto desconhecido	0,022	0,006	0,024	0,011	0,006	0,640
Composto desconhecido	0,027	0,004	0,029	0,005	0,017	0,676
Ácido tetradecanóico	0,018	0,004	0,017	0,006	0,015	0,712
1,1-(1,2-ciclobutanedil)bis-trans-benzeno	0,005	0,006	0,004	0,001	0,001	0,721
Composto desconhecido	0,013	0,005	0,014	0,002	0,003	0,738
Metil-éster, (Z,Z,Z)-9,12,15-ácido-octadecatrienóico	0,194	0,116	0,175	0,043	0,022	0,745
Triciclo[4.2.1.1(2,5)] decano	0,304	0,071	0,290	0,066	0,031	0,748
Metil 10-oxo-8-decanoato	0,013	0,003	0,013	0,002	0,010	0,761
1-iodo-dodecano	0,012	0,004	0,013	0,003	0,006	0,782
Tetrahydro-2,5-dimetil-furano	0,033	0,001	0,032	0,003	0,040	0,821
Etilbenzeno	0,043	0,006	0,042	0,010	0,035	0,827
Composto desconhecido	0,046	0,005	0,047	0,009	0,044	0,833
Composto desconhecido	0,038	0,010	0,040	0,018	0,004	0,857
Estireno	0,008	0,000	0,008	0,001	0,007	0,861
1,1,1,5,7,7,7-Heptametil-3,3-bis-(trimetilsiloxi)tetrasiloxano	0,008	0,002	0,007	0,004	0,007	0,868
Vinil trans-cinamato	0,008	0,006	0,009	0,011	0,000	0,875
[3-(2,3-epoxipropoxi)propil]etoxidimetil-Silano	0,003	0,002	0,003	0,004	0,000	0,898
Ácido dodecanóico	0,009	0,002	0,009	0,003	0,008	0,901
Ácido sulfuroso, 2-etil hexil hexil-éster	0,038	0,004	0,038	0,004	0,045	0,907
11-cloro-1-undecano	0,026	0,004	0,026	0,004	0,026	0,908
Fenil éster benzenoacético	0,078	0,021	0,079	0,021	0,030	0,918
Metil-éster ácido 9,12,15-octadecatrienóico	0,041	0,008	0,040	0,007	0,016	0,922
Dodecametil pentasiloxano	0,002	0,002	0,002	0,002	0,001	0,930
Composto desconhecido	0,064	0,049	0,062	0,012	0,026	0,938
Composto desconhecido	0,029	0,002	0,029	0,004	0,019	0,947

Tabela 2. continuação

Compostos	Média da intensidade F75 (n = 5)	Desvio padrão	Média da intensidade 15453 (n = 5)	Desvio padrão	Média intensidade controle (n = 2)	Test T*
Ergosta-5,22-dien-3-ol (3.beta.,22E, 24S)	0,118	0,042	0,120	0,049	0,086	0,955
2-(9,12-octadecadieniloxi)-, (Z,Z)-etanol	0,431	0,088	0,429	0,095	0,033	0,978
1,6-Anidro-beta-D-glucopiranosose-(levoglucosano)	0,027	0,012	0,027	0,009	0,006	0,980
Composto desconhecido	0,018	0,017	0,018	0,008	0,012	0,989
Dodecametil ciclohexasiloxano	0,005	0,001	0,005	0,002	0,004	0,997
12-Bromo-dodecanol (Padrão interno)	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000

*Teste 't' de Student realizado apenas com os picos de intensidade dos dois isolados, deixando os valores referente ao controle apenas para comparação da presença ou ausência dos compostos quando o fungo estava presente no meio de cultivo.

**Compostos que diferiram significativamente entre os dois isolados por meio do teste T de Student ($P \leq 0,05$)

isolados F75, ICMP 15453 quando comparados com os picos de intensidade no controle (somente meio de cultura).

Por exemplo, para o composto ácido tartárico, que apresentou um maior valor no controle (0,625), sendo mais consumido pelo isolado ICMP 15453 (0,311) do que pelo isolado F75 (0,437). Outro exemplo foi observado com o composto acetato de fenetila, onde esse composto foi mais assimilado pelo isolado ICMP 15453 (0,017) do que pelo isolado F75 (0,110) (Tabela 1).

Além dos compostos polares que apresentaram variações significativas entre os dois isolados, foi detectada uma grande quantidade de compostos como ácido fumárico e ácido málico nos dois isolados quando comparados com o controle. Para o ácido fumárico, a média da intensidade foi de 59,232 para o F75, 44,787 para o ICMP 15453 e 1,362 para o controle. As intensidades médias observadas para o ácido málico foram 15,208 para o F75, 9,908 para o ICMP 15453 e 1,703 para o controle, demonstrando a grande produção desses ácidos pelo metabolismo de *G. mangiferae* (Tabela 1).

Tabela 3. Ácidos graxos extraídos com acetato de etila dos dois isolados de *G. mangiferae* e detectados por GC-MS.

Compostos	Média da intensidade F75	Desvio padrão	Média da intensidade 15453	Desvio padrão	Média intensidade controle	Test T*
Ácido palmítico	479974,400	182272,487	754547,200	52889,551	10001,000	0,025**
ácido esteárico	179209,600	43765,723	223564,800	7633,110	6904,500	0,086
Ácido oléico	311590,400	45816,817	351001,600	14658,697	9983,000	0,129
Ácido alfa-linoléico	222950,400	51985,349	249126,400	25168,955	2784,000	0,351
ácido gama-linoléico	222950,400	51985,349	249126,400	25168,955	2784,000	0,351
Ácido linoléico	511347,200	78126,024	545344,000	25849,187	7080,500	0,399
ácido cis-vacênico	12482,800	4637,193	9584,200	5604,924	11363,000	0,400
Ácido 9-heptadecenóico	7782,000	1172,170	7328,400	813,106	6047,000	0,500
Ácido 10-heptadecenóico	7782,000	1172,170	7328,400	813,106	6047,000	0,500
Ácido margarítico	6964,400	3724,194	5792,800	882,384	413,500	0,528

*Teste “t” realizado apenas com os picos de intensidade dos dois isolados, deixando os valores referente ao controle apenas para comparação da presença ou ausência dos compostos quando o fungo presente no meio de cultivo.

**Compostos que diferiram significativamente entre os dois isolados através do teste T de Student ($P \leq 0,05$)

Nas amostras extraídas com acetato de etila, ou seja, de compostos voláteis e apolares ou com baixa polaridade, foi detectado um número maior de compostos quando comparado com as amostras extraídas com metanol. Foram detectados 152 picos de intensidade através do GC-MS e a maioria destes picos foi identificada com uma biblioteca para compostos não derivatizados do próprio laboratório (Tabela 2). Nesta análise, dos 26 compostos que variaram entre os isolados, 19 apresentaram um maior pico de intensidade nas amostras isoladas do fungo ICMP 15453, sendo apenas 6 compostos observados com uma maior produção pelo isolado F75. Exemplos de compostos detectados com uma maior produção em ICMP 15453 quando comparado com o isolado F75 foram: 1,14-tetradecanodiol (0,083 contra 0,046); benzofurano (0,077 contra 0,029) e 4-amino benzonitrila (0,095 contra 0,047). Exemplos de compostos onde foram observados maiores picos de intensidade no isolado F75 quando comparado com o ICMP 15453 foram: Etil-éster ácido 9-hexadecanóico (0,007 contra

0,003) e 2,3-butanodiol (0,429 contra 0,018) (Tabela 2). Na análise dos compostos extraídos com acetato de etila e que foram significativamente diferentes entre os isolados, apenas o composto tetrahydro-2,5-dimetil-furano, que é derivado da celulose, apresentou uma maior média no pico de intensidade no controle do que nos isolados fúngicos (0,027 no controle; 0,21 no isolado F75 e 0,018 no isolado ICMP 15453) (Tabela 2).

Na abordagem metabolômica por LC-MS, foi possível a detecção de um número maior de moléculas quando comparado com o GC-MS, pois abrange a detecção de várias classes moleculares, sem restrição de volatilidade e que podem ser comparadas entre diversas condições experimentais, representando uma visão mais global dos metabolitos presentes em um organismo. Desta forma, comparações e alinhamentos dos cromatogramas totais (TIC) e específicos cromatogramas extraídos dos íons detectados (XIC- Extracted ion chromatogram), nos permite observar diferenças nos perfis e também discrepantes abundâncias entre os tratamentos. De modo geral, observamos semelhanças nos perfis cromatográficos por LC-MS entre os isolados, para ambos os extratores, metanólico e acetato de etila. Maiores variações nos alinhamentos dos cromatogramas totais dos íons foram observadas para os contrastes entre o meio de cultura na presença e ausência do fungo, o que era esperado e indicando que os íons observados no tratamento com os fungos foram originados do metabolismo fúngico. A abordagem computacional permite também extrair os cromatogramas de cada íon para comparar suas abundâncias (Figura 1).

Na análise de detecção de massas moleculares obtidos por LC-MS (Tabela 4) ou metaboloma, foram detectadas 2921 massas ao todo no extrato bruto extraído com acetato de etila no modo negativo de ionização.

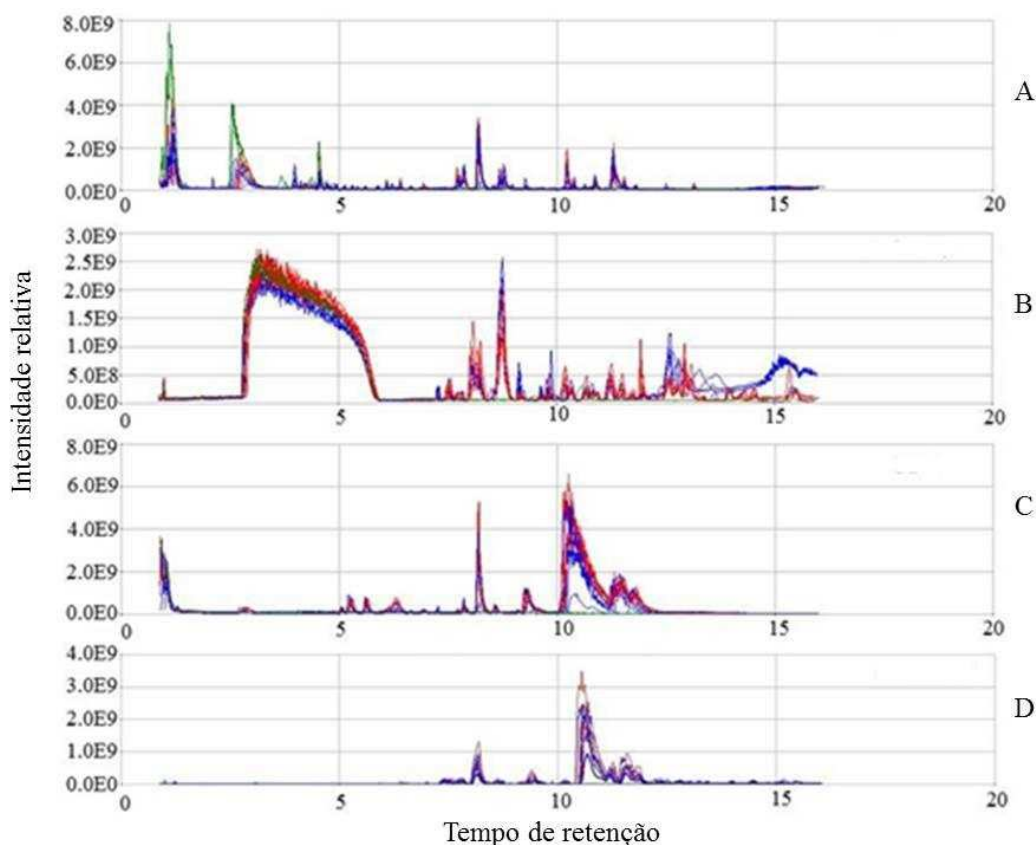


Figura 1. Cromatogramas obtidos por meio dos valores referentes a intensidade detectada para cada íon (TIC) por meio de LC-MS dos extratos brutos de *Guignardia mangiferae* F75 e ICMP 15453. A linha verde representa o controle (meio de cultura BDA); vermelho: F75 e azul: ICMP 15453. Foram realizadas cinco ($n = 5$) repetições para cada isolado e duas ($n = 2$) repetições para o controle. As siglas a direita de cada cromatograma representa: A – metabólitos extraídos por metanol e detecção de íons com carga positiva; B – metabólitos extraídos por acetato de etila e detecção de íons com carga positiva; C – metabólitos extraídos por metanol e detecção de íons com carga negativa e D – metabólitos extraídos por acetato de etila e detecção de íons com carga negativa.

Tabela 4. Massas moleculares detectadas por LC-MS nos extratos metabólicos dos dois isolados de *Guignardia mangiferae* e controle (meio de cultura BDA).

Tipo de extração/ionização	Total de massas detectadas	Detectadas nos fungos/(%)	Detectadas no controle/(%)	Detectadas F75*	Detectadas ICMP 15453*	P ≤ 0,005***	Não detectados no controle***
EcOET/negative	2921	2921 (100)	2719 (93,08)	2872	2890	451	202
EcOET/positive	3189	3142 (98,52)	2420 (75,88)	3121	3125	960	208
MEOH/negative	3310	3126 (94,44)	2365 (71,45)	3113	3050	224	85
MEOH/positive	3398	3329 (97,96)	3036 (89,34)	3304	3304	123	24

EtOAc: acetato de etila e MeOH: metanol.

* Massas moleculares detectadas especificamente para os isolados F75 ou ICMP 15453.

** Massas moleculares que variaram significativamente ($P \leq 0,05$) entre os isolados fúngicos através do teste 't'.

*** Quantidade de massas moleculares que diferiram significativamente entre os isolados e que não foram detectadas no controle.

Do total de massas detectadas, 2921 (100%) foram detectados nos extratos fúngicos e 2719 (93,08%) foram detectados no controle. Do total de massas detectadas nos fungos, 451 variaram significativamente entre os dois isolados. Na análise dos extratos brutos extraídos por acetato de etila com ionização positiva, foram detectadas 3189 massas moleculares, sendo que 3142 (98,52%) foram detectadas nos extratos fúngicos e 2420 (75,88%) foram detectadas no controle. Houve 960 massas moleculares que variaram significativamente entre os isolados. Na análise feita com os extratos brutos extraídos com metanol e ionização negativa, foram detectadas 3310 massas moleculares, sendo que 3126 (94,44%) foram detectadas nos extratos fúngicos e 2365 (71,45%) foram detectadas no controle. Variaram significativamente 224 massas moleculares entre os isolados. Na análise dos extratos metanólicos com ionização positiva, foram detectadas 3398 massas moleculares, sendo que 3329 (97,96%) foram detectadas nos extratos fúngicos e 3036 (89,34%) foram detectados no controle. Variaram significativamente 123 massas moleculares entre os isolados.

Diferenças visualizadas por abordagem matemática, como por exemplo, na análise de componentes principais (PCA), demonstraram, como esperado, uma grande diferença entre os compostos existentes no meio de cultura e os produzidos pelos fungos, pois em todos os gráficos, os valores plotados ocuparam regiões opostas (Figura 2).

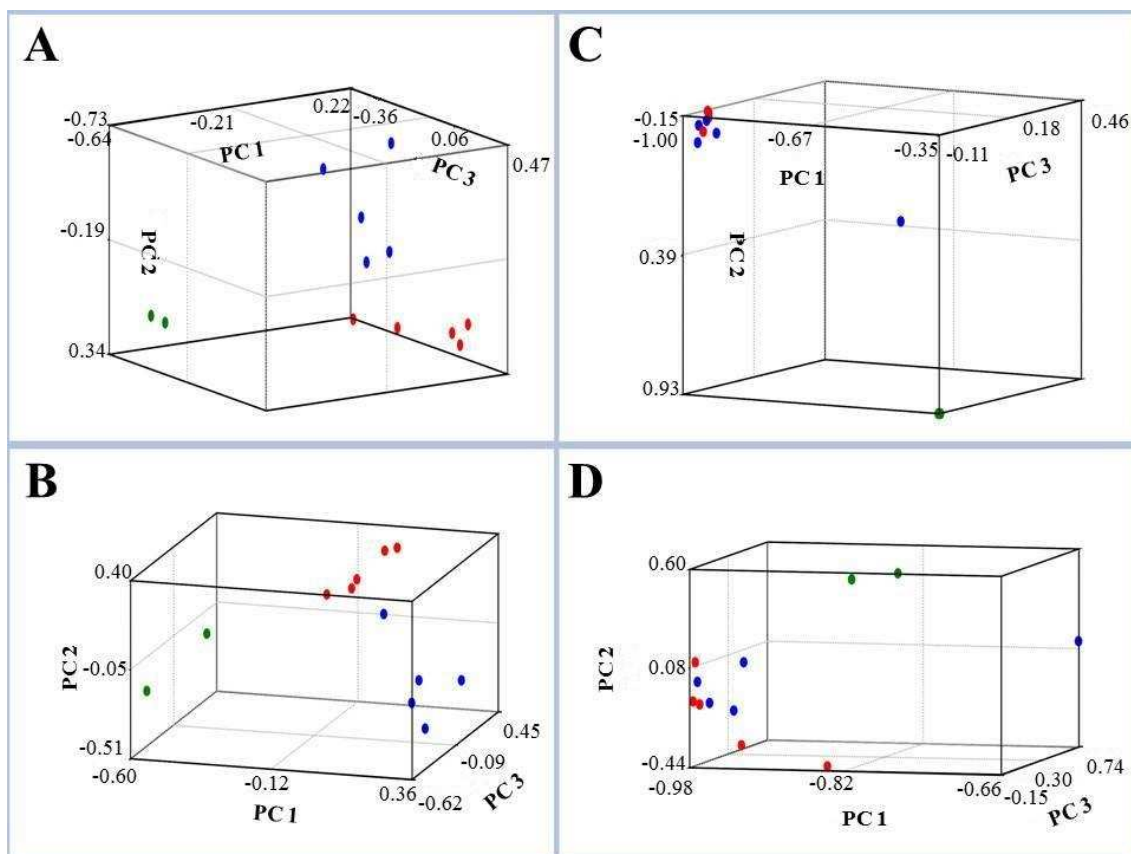


Figura 2. Análise dos componentes principais dos extratos brutos de *Guignardia mangiferae* gerados por meio do alinhamento, análise estatística pelo programa Sieve 2.1. e posicionamento manual do gráfico. Os dados foram plotados a partir da análise dos valores específicos de cada íon detectado por meio do LC-MS. Foram realizadas 5 ($n = 5$) repetições para cada isolado e duas ($n = 2$) repetições para o controle. Os pontos verdes representam o controle (meio de cultura BDA); vermelho: F75 e azul: ICMP 15453. (A) acetato de etila com detecção de íons negativos; (B) acetato de etila com detecção de íons positivos; (C) metanol com detecção de íons negativos e (D) metanol com detecção de íons positivos.

Por meio da análise simples de autovalores (Scree plot), foi estipulado que três componentes principais explicavam significativamente todos os metabólitos provenientes das extrações (metanol e acetato de etila) e formas de detecção (positivas e negativas) dos dois isolados e do controle (meio de cultura). A comparação entre os dois isolados apresentou semelhanças nos extratos metanólicos (tanto positivo quanto negativo), com exceção de uma repetição do fungo F75 que teve uma maior variação comparada com as repetições e valores do isolado ICMP 15453. Nos resultados para os extratos brutos extraídos com acetato de etila, a variação entre os componentes

principais foi mais acentuada. Tanto para a detecção de íons positivos quanto para íons negativos, houve distinção entre as plotagens, sendo agrupados em posições diferentes no gráfico, demonstrando que a produção de metabólitos apolares possui uma maior variação do que quando comparados aos metabólitos polares (Figura 2).

Em todas as análises, o primeiro componente (PC1) explicou a maioria das variações dos compostos, correspondendo as extrações com metanol e detecção positiva e negativa (90,39 e 93,45% respectivamente) e extração com acetato de etila e detecção positiva e negativa (98,45 e 98,23%). O PC2 explicou 9,11 e 6,24% das variações dos metabólitos extraídos com metanol e detecções positivas e negativas, respectivamente, enquanto para a extração com acetato de etila com detecção positiva e negativa foram 1,15 e 1,43%, respectivamente. Por último, o terceiro componente (PC3) explicou a minoria das variações, correspondendo a 0,49 e 0,29% os valores estimados para os metabólitos extraídos com metanol e detecção positiva e negativa, enquanto para acetato de etila com detecção positiva e negativa os valores foram 0,39 e 0,33%, respectivamente.

DISCUSSÃO

Análise dos metabólitos extraídos entre os isolados fúngicos

A análise do metaboloma e do perfil metabólico permitem uma interpretação dos dados metabólicos e dos níveis das atividades celulares, bem como uma interpretação do metabolismo de um organismo (Baidoo & Keasling, 2013). Em nosso estudo, para abranger o máximo de compostos extraídos, usamos metanol para a extração de compostos polares e acetato de etila para extração de compostos apolares e/ou com baixa polaridade e esses extratos metabólicos foram analisados por GC-MS e LC-MS.

A análise dos perfis metabólicos gerados a partir das extrações realizadas com metanol (correspondendo principalmente aos metabólitos do metabolismo primário,

como aminoácidos e ácidos orgânicos) e acetato de etila (compostos voláteis, metabolismo primário e secundário) (Smart et al., 2010; Morath et al., 2012) e analisados por GC-MS revelou que quase todos os compostos detectados nos dois isolados fúngicos foram também detectados no controle (apenas seis compostos apolares não foram identificados no controle), entretanto, por meio da análise dos picos de intensidade específicos para cada tratamento (F75, ICMP 15453 e meio de cultura) foi determinado se um composto foi produzido pelo metabolismo do fungo ou se foi consumido pelo fungo no meio de cultura. Como exemplo, temos o ácido valínico (Tabela 2), onde a média do pico de intensidade para o isolado F75 foi 0,038; para o isolado ICMP 15453 foi de 0,023 e para o controle (meio de cultura), a média do pico de intensidade foi de 0,052. Este resultado sugere que houve um consumo desse composto pelos fungos durante o crescimento. Por outro lado, o composto denominado ácido levulínico (Tabela 2), teve uma média no pico de intensidade de 0,842 para o isolado F75; de 0,609 para o isolado ICMP 15453 e de apenas 0,077 para o controle, sugerindo que esse composto estava presente no meio de cultura, mas que foi produzido em maior quantidade pelo metabolismo dos dois isolados fúngicos.

Entre os compostos polares que apresentaram variações entre os fungos, o isolado ICMP 15453 apresentou maior produção de ácido oleico quando comparado ao isolado F75, 4,474 e 3,633, respectivamente. O ácido oleico já foi relacionado, por exemplo, a ativação da esporulação em *Aspergillus nidulans* (Calvo et al., 2002). Outro composto que apresentou variação entre os isolados foi o 4-aminobutírico (GABA). O isolado F75 apresentou maior produção de GABA (0,764) em comparação ao isolado ICMP 15453 (0,404), entretanto este composto também foi detectado no grupo controle (0,653), sendo somente detectado em maior quantidade no isolado F75 em relação ao controle. O composto GABA é relacionado como um hormônio produzido pelos

vegetais durante respostas a estresse abiótico, como seca, estresse oxidativo e pH (Shelp et al., 2012). A detecção do composto GABA no isolado endofítico *G. mangiferae* sugere que esse fungo pode beneficiar a planta hospedeira contra estresses ambientais, sendo esta uma vantagem à planta hospedeira dessa espécie endofítica. Por meio desse resultado, o fungo F75, isolado de *G. max* e no Brasil, seria o mais promissor para inoculação em espécies vegetais ou fonte de extração desse metabólito, devido a maior produção de GABA quando comparado ao fungo da espécie isolado de *V. virgatum* na Nova Zelândia. Contudo, a maioria dos demais compostos detectados pela extração com metanol e derivatizados fazem parte do metabolismo primário, como ácido glutárico e succínico (Côte et al., 2008 e Smart et al., 2010) e essas variações detectadas entre os isolados demonstram as diferenças no metabolismo entre os dois fungos.

Muitos ácidos orgânicos também foram detectados nos compostos polares dos fungos, demonstrando que ambos os isolados podem ser promissores na produção e isolamento de ácidos de interesse na indústria alimentícia, farmacêutica e de polímeros. Dois ácidos orgânicos, o ácido fumárico (produção de resinas de papeis e aditivos para alimentos) (Engel et al., 2008) e o ácido málico (conservantes em bebidas e suplementação alimentar) (Zhang et al., 2013) não possuem competitividade econômica atualmente por meio da fermentação microbiana quando comparado com a produção a partir do petróleo (ácido fumárico) e síntese química a partir do ácido maléico (ácido málico) (Kubicek et al., 2011), entretanto, esses dois ácidos apresentaram elevadas intensidades de detecção nos dois isolados quando comparado com o controle (Tabela 1) demonstrando serem promissores para a produção e isolamento desses compostos via fermentação.

No perfil metabólico dos compostos voláteis detectados por GC-MS entre os fungos, foram observados compostos provenientes do metabolismo (primário e

secundário) como, por exemplo, ergosterol, que é um composto estrutural presente na membrana plasmática dos fungos (Dupont et al., 2012) e que não apresentou variações significativas entre os isolados. Entre os compostos que variaram significativamente entre os isolados, o isolado ICMP 15453 apresentou uma maior produção de benzofurano (composto antifúngico contra *Candida albicans* (Masubuchi et al., 2003)) em relação ao isolado F75, 0,077 e 0,029, respectivamente. O isolado F75 apresentou uma grande produção para o composto 2,3-Butanodiol (0,429), sendo a detecção no isolado ICMP 15453 praticamente iguais ao detectado no controle (0,018). O composto 2,3-Butanodiol é utilizado nas indústrias para produção de borrachas sintéticas, solventes e drogas farmacêuticas, entretanto, a sua produção via fermentação é conhecido em bactérias como *Klebsiella pneumonia*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia sp.*, e *Bacillus polymyxa* (Ng et al., 2012) e neste estudo foi demonstrado que o isolado F75 apresenta uma grande produção desse composto quando comparado com o isolado ICMP 15453.

O perfil metabólico gerado a partir da detecção específica de ácidos graxos, também apresentou variações significativas ($P < 0,05$) entre os dois isolados somente para o ácido palmítico. Foi observado equiparação nos níveis de intensidade relativa, entre os dois isolados e o controle nos compostos ácido cis-vacênico; ácido 9-heptadecenóico e ácido 10-heptadecenóico, enquanto para todos os demais ácidos graxos detectados, foram observadas grandes diferenças na detecção dos compostos específicos nos fungos em relação ao controle (Tabela 3). Os ácidos graxos detectados, entre eles, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico são compostos que costumam variar em quantidades dependendo da fase de crescimento fúngico, sendo a adição de saturações ou insaturações nesses compostos responsável pela variação e quantificação desses ácidos graxos durante o ciclo de vida do fungo (Carvalho et al,

1999). Outra característica apresentada pela composição e quantificação de ácidos graxos em uma determinada espécie fúngica é referente à regularidade apresentada por cada espécie, sendo possível distinguir espécies por meio da composição e quantificação apresentadas por cada uma (Stahl & Klug, 1996).

Em uma visão geral dos perfis metabólicos apresentados pelos dois isolados, os compostos detectados nos extratos metabólicos e analisados por GC-MS apresentaram variações entre os fungos. Nos resultados deste estudo, fica evidente que nos compostos detectados e identificados por GC-MS, os dois isolados produzem os mesmo metabólitos, mostrando apenas uma variação entre catabolismo e anabolismo. Segundo Fiehn (2002), a proporção entre os metabólitos produzidos reflete as funções biológicas de uma determinada espécie e a similaridade dentro da mesma espécie é uma eficiente ferramenta para classificação e identificação desse organismo quanto ao seu metabolismo (Smedsgaard, 2007).

Nos nossos resultados obtidos por LC-MS, observamos novamente similaridades entre as massas moleculares detectadas, como exemplo na extração com metanol e análise por ionização positiva foi detectada a mesma quantidade de massas moleculares entre os fungos F75 e ICMP 15453 (3304 moléculas), sendo constatados que apenas 123 moléculas (3,72%) variaram significativamente entre os dois fungos (Tabela 4). A maior variação obtida por essa análise correspondeu as moléculas encontradas nas extrações com acetato de etila e ionização positiva, onde 960 moléculas (30,10%) variaram significativamente ($p \leq 0,05$) entre os dois isolados, em um total 3189 moléculas detectadas. Essa quantificação e detecção de moléculas nos permite avaliar melhor as diferenças encontradas entre os metabolomas dos dois isolados e isso é devido a alta sensibilidade de detecção de íons por meio de LC-MS. Esta ferramenta se mostra bastante útil para detectar o maior número de compostos produzidos por um

micro-organismo (Baidoo & Keasling, 2013) e assim constatar as diferenças ou similaridades entre indivíduos da mesma espécie.

Nos cromatogramas obtido por LC-MS (Figura 1) podemos constatar os picos de intensidade obtidos pelos dois fungos e o controle (meio de cultura). Como observado, somente nos primeiros minutos dos tempos de retenção (até aproximadamente 7 min), tanto nas extrações com metanol quanto nas extrações com acetato de etila, ocorreu sobreposição entre os metabólitos e em seguida, apenas os dois isolados se alternam nas sobreposições. Isso demonstra que a maioria dos metabólitos detectados é proveniente da alteração da composição do meio de cultura e do metabolismo dos fungos. A análise dos principais componentes (Figura 2) também revelou a similaridade entre os metabólitos detectados entre os fungos quando extraídos com metanol, ou seja, composto polares (Figura 2 C e D) e a variação apresentada para os compostos extraídos com acetato de etila (Figura 2 A e B). Entretanto, é nítida a variação entre os compostos dos fungos e do controle (meio de cultura).

CONCLUSÕES

Por meio desse estudo, concluímos que os dois isolados, apesar de serem da mesma espécie, apresentaram variações em seus metabolismos, tanto no tipo de metabólitos quanto na abundância entre eles, sugerindo que mudanças geográficas e de hospedeiros favorecem as alterações metabólicas. O isolamento e a adaptação ambiental e de hospedeiro podem ter levado a mudanças genéticas pontuais, que alteraram o funcionamento da maquinaria protéica, podendo ter modulado o metabolismo, de modo a gerar variações metabólicas entre os dois isolados em meio de cultura sintético. Devido a essas alterações condicionadas a adaptação específica de cada fungo, constatamos que o isolado F75 é promissor para o isolamento de compostos de interesse industriais e biotecnológicos como o hormônio vegetal GABA e o composto 2,3-

butanodiol (para produção de borrachas sintéticas, solventes e drogas farmacêuticas), enquanto o isolado ICMP 15453 foi mais promissor para produção do composto antifúngico benzofurano. Entretanto, os dois isolados se mostraram também promissores para a produção de ácido fumárico e ácido málico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), órgãos de fomento à pesquisa do Brasil, pelo financiamento da pesquisa no Brasil e pela concessão da bolsa de estudos ao primeiro autor por meio do programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), para realização de parte desta pesquisa na The University of Auckland (New Zealand).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baayen, R. P.; Bonants, P. J. M.; Verkley, G.; Carroll, G. C.; Van Der Ar, H. A.; Weerdt, M.; van Brouwershaven, I. R.; Shutte, G. C.; Maccheroni Jr, W.; Blanco, C. G. B.; Azevedo, J. L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllostica capitalensis*). **Ecology and Population Biology**, v. 92, n. 5, p. 464-478, 2002.
- Baidoo, E. E. K.; Keasling, J. D. Microbial metabolomics: welcome to the real world. **Metabolomics**, v. 9, p. 755-756, 2013.
- Brakhage, A. A.; Schroeckh, V. Fungal secondary metabolites – strategies to activate silente gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 15-22, 2011.

Calvo, A. M.; Wilson, R. A.; Bok, J. W.; Keller, N. P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 447-459, 2002.

Carvalho, P. O.; Oliveira, J. G.; Pastore, G. M. Enhancement of gamma-linolenic acid production by the fungus *Mucor* sp. LB-54 by growth temperature. **Revista de Microbiologia**. V. 30, p. 170-175, 1999.

Côte, V.; Kos, G.; Mortazavi, R.; Ariya, P. A. Microbial and “de novo” transformation of dicarboxylic acids by three airborne fungi. **Science of the Total Environment**, v. 390, n. 2-3, p. 530-537, 2008.

Dupont, S.; Lemetais, G.; Ferreira, T.; Cayot, P.; Gervais, P.; Beney, L. Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land?. **Evolution**, v. 66, n. 9, p. 2961-2968, 2012.

Engel, C. A. R.; Straathof, A. J. J.; Zijlmans, T. W.; Gulik, W. M. V.; Wielen, L. A. M. V. D. Fumaric acid production by fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 379-389, 2008.

Er, H. L.; Hendricks, K.; Goss, E. M.; Smith, M.; Schubert, T. S.; Roberts, T. S.; van Bruggen, A. H. C. Isolation and biological characterization of *Guignardia* species from citrus in Florida. **Journal of Plant Pathology**, v. 96, n. 1, p. 43-55, 2014.

Everett, K. R.; George, J. R. Species specific PCR Primers for *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae*. **New Zealand Plant Protection**, v. 59, p. 141-145, 2006.

Fiehn, O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 155-171, 2002.

Jeenkeawpieam, J.; Phongpaichit, S.; Rukachaisirikul, V.; Sakayaroj, J. Antifungal activity and molecular identification of endophytic fungi from the angiosperm

Rhodomyrtus tomentosa. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 75, p. 14007-14016, 2012.

Keller, N. P.; Turner, G.; Bennett, W. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 937-946, 2005.

Kubicek, C. P.; Punt, P.; Visser, J. Production of organic acids by filamentous fungi. In: Hofrichter, M. (ed). **The Mycota: Industrial applications**, v. 10. Springer Berlin Heidelberg, pp. 215-234, 2011.

Leite, T. S.; Clossen-Fassoni, A.; Pereira, O. L.; Mizubuti, E. S. G.; Araujo, E. F.; Queiroz, M. V. Novel and highly diverse fungal endophytes in soybean revealed by the consortium of two different techniques. **Journal of Microbiology**, v. 51, p. 56-69, 2013.

Masubuchi, M.; Ebiike, H.; Kawasaki, K.; Sogabe, S.; Morikami, K.; Shiratori, Y.; Tsujii, S.; Fujii, T.; Sakata, K.; Hayase, M.; Shindoh, H.; Aoki, Y.; Ohtsuka, T.; Shimma, N. Synthesis and biological activities of benzofuran antifungal agents targeting fungal N-Myristoyltransferase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 4463-4478, 2003.

Mei, W. L.; Zheng, B.; Zhao, Y. X.; Zhong, H. M.; Chen, X. L. W.; Zeng, Y. B.; Dong, W. H.; Huang, J. L.; Proksch, P.; Dai, H. F. Meroterpenes from endophytic fungus A1 of mangrove plant *Scyphiphora hydrophyllacea*, **Marine Drugs**, v. 10, p. 1993-2001, 2012.

Morath, S. U.; Hung, R.; Bennett, J. W. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, p. 73-83, 2012.

Ng, C. Y.; Jung, M.; Lee, J.; Oh, M. Production of 2, 3-butanediol in *Saccharomyces cerevisiae* by in silico aided metabolic engineering. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 65, p. 2-14, 2012.

Nielsen, J. Metabolomics in functional genomics and systems biology. In: Villas-Bôas, S. G., Roessner, U., Hansen, M. A. E., Smedsgaard, J. & Nielsen, J. (eds). **Metabolome Analysis: An Introduction**. Hoboken: John Wiley & Sons, pp. 39–82, 2007.

Phongpaichit, S.; Nikom, J.; Rungjindamai, N.; Sakayaroj, J.; Towatana, N.; Rukachaisirikul, V.; Kirtikara, K. Biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, p. 517-525, 2007.

Shelp, B. J.; Bozzo, G. G.; Trobacher, C. P.; Zarei, A.; Deyman, K. L.; Brikis, C. J. Hypothesis/review: contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. **Plant Science**, v. 193-194, p. 130-135, 2012.

Smart, K. F.; Aggio, R. B. M.; Houtte, J. R. V.; Villas-Bôas, S. Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Nature Protocol**, v. 5, n. 10, p.1709-1729, 2010.

Smedsgaard, J. Mass profiling of fungal extract from *Penicillium* species. In: Villas-Bôas, S. G., Roessner, U., Hansen, M. A. E., Smedsgaard, J. & Nielsen, J. (eds). **Metabolome Analysis: An Introduction**. Hoboken: John Wiley & Sons, pp. 239–252, 2007.

Stahl, P. D.; Klug, M. J. Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 92, n. 11, 1996.

Sutan, A.; Johnston, P. R.; Park, D.; Robertson, A. W. Two new pathogenic ascomycetes in *Guignardia* and *Rosenscheldiella* on New Zealand's pygmy mistletoes (*Korthalsella*: Viscaceae). **Studies in Mycology**, n. 68, p. 237-247, 2011.

Walker, G. M.; White, N. A. Introduction to fungal physiology. In: Kavanagh, K. (ed). **Fungi: biology and applications**. 1ed, Chichester: John Wiley & Sons, pp. 1-34. 2005.

Yuan, W. H.; Liu, M.; Jiang, N.; Guo, Z. K.; Ma, J.; Zhang, J.; Song, Y. C.; Tan, R. X. Guignardones A-C: Three meroterpenes from *Guignardia mangiferae*. **European Journal of Chemistry**, p. 6348-6353, 2010.

Zhang, K.; Zhang, B.; Yang, S.T. Production of citric, itaconic, fumaric, and malic acids in filamentous fungal fermentations. In: Yang, S. T.; El-Enshasy, H. A.; Thongchul, N. (eds.). **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**. John Wiley & Sons, pp. 375-397, 2013.

CONCLUSÕES GERAIS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foi observada uma maior riqueza de fungos endofíticos nas folhas em relação às raízes de *Glycine max*;
- A avaliação de diversidade calculada por meio dos índices de Simpson, Shannon e Equitabilidade apresentou maiores valores nas folhas do que nas raízes em relação à comunidade fúngica isolada. Entretanto, nas raízes foi obtido o mais alto valor de Dominância quando comparado às folhas;
- A análise de agrupamento obtida por meio das regiões ribossomais ITS dos fungos isolados de *G. max*, realizada pelo método de agrupamento UPGMA demonstrou coerência no agrupamento das espécies dentro de suas respectivas ordens, com exceção da espécie *Leptospora rubella* (ordem Dothideales) que foi agrupada entre os representantes da ordem Pleosporales;
- Por meio da técnica PCR-DGGE foi possível observar similaridade intermediária obtida pelo método de agrupamento UPGMA entre os perfis moleculares das folhas e raízes;
- Ainda por meio da técnica de PCR-DGGE, por meio da análise de perfil de bandas das comunidades fúngicas, foi observado uma maior riqueza nas raízes quando comparado com as folhas.
- Entre as espécies isoladas como endofítica de soja, destacaram-se os fungos *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*, responsáveis por vários surtos de doenças em plantas;
- Parte dos fungos isolados de *G. max* demonstraram serem bons controladores do crescimento de fungos fitopatogênicos *in vitro*;

- A análise do extrato metabólico do fungo endofítico *Guignardia mangiferae* demonstrou ter atividade antibacteriana. Contudo, não foram detectadas massas moleculares de compostos já descritos como antibacterianos de *G. mangiferae* no extrato metabólico contendo atividade antibacteriana desta mesma espécie isolada de *G. max*;
- Foram observadas diferenças significativas entre os perfis metabólicos (metabólitos primários, secundários, e compostos voláteis) e metabolomas dos isolados endofíticos de *G. mangiferae* obtidos de diferentes hospedeiros e regiões geográficas.
- O fungo endofítico isolado *G. mangiferae* F75 se mostrou mais promissor para produção do hormônio vegetal GABA e o precursor molecular 2,3-butanodiol para produção de borrachas sintéticas, solventes e drogas farmacêuticas, enquanto o isolado ICMP 15453 foi mais promissor para a produção do antifúngico benzofurano. Além disso, foram detectados grandes quantidades de ácido fumárico e málico no metabolismo dos dois isolados.

Os resultados deste estudo sugerem que os fungos endofíticos de *G. max* são diversos, e possuem preferência na colonização de diferentes órgãos vegetais, sendo encontrados espécies com potencial de biocontrole de fitopatógenos, produtores de antimicrobianos e compostos de interesse industrial e farmacológicos, além de possíveis fitopatógenos. Diferenças metabólicas demonstradas entre os isolados de *G. mangiferae* isolados de diferentes hospedeiros e regiões geográficas, sugerem também que o ambiente onde esses fungos estão presentes influencia o seu metabolismo e que em casos de fungos produtores de compostos antimicrobianos e bioativos, pode-se selecionar isolados da mesma espécie em diferentes regiões e plantas hospedeiras.