



ISSN: 2525-815X

Journal of Environmental Analysis and Progress

Journal homepage: www.jeap.ufrpe.br/

10.24221/jeap.6.3.2021.3376.167-173



Prospecção química e atividade antagônica *in vitro* do endófito *Phomopsis* sp. contra fungos fitopatogênicos

Chemical prospection and *in vitro* antagonistic activity of the endophyte *Phomopsis* sp. against phytopathogenic fungi

Giancarlo de Brito Lyra Santos^a, João Manoel da Silva^b, Roberto Ramos Sobrinho^c, Ariana Rafaela Silva Nascimento^c, Yamina Coentro Montaldo^c, Ricardo Manoel dos Santos Silva^c, Tania Marta Carvalho dos Santos^c, Luiz Carlos Caetano^b

^a Instituto Federal de Alagoas-IFAL. Av. do Ferroviário, n. 530, Centro, Maceió, Alagoas, Brasil. CEP: 57020-600. E-mail: gianbritobio@hotmail.com.

^b Universidade Federal de Alagoas-UFAL, Instituto de Química e Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia. Avenida Lourival Melo Mota, Tabuleiro dos Martins, Maceió, Alagoas, Brasil. CEP: 57072-970. E-mail: jm.agro@hotmail.com, lcc@qui.ufal.br.

^c UFAL, Centro de Ciências Agrárias, BR 104, s/n, Rio Largo, Alagoas, Brasil. CEP: 57100-000. E-mail: ariana.rafaela@hotmail.com, ycmzte11@gmail.com, robortosobrinho@gmail.com, rickmanoel@yahoo.com.br, tmcs@ceca.ufal.br.

ARTICLE INFO

Recebido 21 Abr 2020

Aceito 01 Mai 2021

Publicado 26 Jul 2021

ABSTRACT

Microorganisms have long been a promising source of biotechnology resources with agricultural applications, such as controlling phytopathogens. In this way, several studies have been conducted to identify microorganisms, such as fungi, with potential agriculture applications. This study aimed to investigate the chemical prospecting and *in vitro* antagonistic activity of the endophyte fungus *Phomopsis* sp. against phytopathogenic fungi. Two experiments were conducted. In the first experiment, mycelial biomass was evaluated for fungal endophyte growth in five culture mediums: Potato Dextrose Agar (PDA), Potato Sucrose Agar (PSA), Carrot Agar (CA), Czapek (CZA) and Tryptone Soy Agar (TSA), and light incidence and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) of the carbon crystals obtained from the mycelial extracts. The second experiment comprised the pairing test and inhibition halo formation against three phytopathogenic fungi (*Rhizoctonia* sp., *Pestalotiopsis* sp. and *Colletotrichum* sp.), where they were inoculated in plates containing PDA medium and evaluated after five days of incubation, where the presence of inhibition halo was verified. That the endophyte fungus *Phomopsis* sp. has better growth in PDA medium under continuous light and ergosterol presence in his membranes. The fungal isolate was also able to produce an inhibition halo against the phytopathogens tested.

Keywords: Filamentous fungi, mycelial biomass, antagonic fungi.

RESUMO

Há muito tempo, os micro-organismos vêm sendo uma promissora fonte de recursos biotecnológicos com aplicações na agropecuária, como para o controle de fitopatógenos. Desta forma, vários estudos têm sido conduzidos com o intuito de se descobrir micro-organismos, como fungos, com potenciais aplicações na agricultura. Diante disto, objetivou-se por meio deste estudo a prospecção química e atividade antagônica *in vitro* do fungo endófito *Phomopsis* sp. contra fungos fitopatogênicos. Foram conduzidos dois experimentos. No primeiro experimento, foram conduzidos ensaios de prospecção química do micélio do fungo supracitado, onde foi avaliada a biomassa micelial, seu crescimento em cinco meios de cultura: Batata Dextrose Agar (BDA), Batata Sacarose Agar (BSA), Cenoura Agar (CA), Czapek (CZA) e Triptona Soja Agar (TSA), e incidência de luz e Ressonância

Magnética Nuclear (RMN) dos cristais de carbono obtidos nos extratos miceliais. O segundo experimento compreendeu ao teste de pareamento e formação de halo de inibição contra três fungos fitopatogênicos (*Rhizoctonia* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Colletotrichum* sp.), onde foram inoculados em placas contendo meio BDA e avaliados após cinco dias de incubação, onde se verificou a presença de halo de inibição. Por meio da prospecção química foi verificado que o fungo endófito *Phomopsis* sp. possui melhor crescimento em meio BDA sob luz contínua e presença de ergosterol em suas membranas. O isolado também foi capaz de produzir halo de inibição contra os fitopatogênicos testados.

Palavras-Chave: Fungos filamentosos, biomassa micelial, fungos antagonicos.

Introdução

A utilização de micro-organismos no controle de pragas e doenças de plantas é uma estratégia que vem crescendo como alternativa ao uso de agroquímicos na agricultura. Nesta perspectiva, vários micro-organismos têm sido utilizados como agentes biológicos para esta finalidade. Dentre os organismos patogênicos às plantas, os fungos são capazes de causar doenças em todos os estádios de desenvolvimento e órgãos dos vegetais de importância agrícola.

Com a crescente utilização de micro-organismos na agricultura com a finalidade de promover crescimento vegetal, os endófitos recebem uma atenção especial, devido a serem considerados organismos que vivem em harmonia no interior das plantas sem que cause doenças ou distúrbios nocivos (Azevedo et al., 2000), sendo estes uma fonte de prospecção biotecnológica.

Quanto à aplicação como agentes de controle contra fungos fitopatogênicos, a utilização de fungos, sejam de solo ou endófitos é mais apreciada e investigada devido ao seu potencial, no confronto direto contra os fitopatogênicos, pois além de produzirem metabólitos, também possuem a capacidade de hiperparasitar outros fungos (Silva et al., 2017) ou produzir metabólitos, como relatado em estudos com trichoderma (Hajieghrari et al., 2008; Silva et al., 2017), impedindo ou retardando seu crescimento.

Várias espécies de fungos endófitos têm sido relatadas na literatura. O gênero *Phomopsis* foi descrito como endófito de várias plantas como *Theobroma cacao* (Rubini et al., 2005), *Spondias mombin* (Rodrigues et al., 2000), *Aspidosperma tomentosum* (Corrado & Rodrigues, 2004), *Heterosmilax japonica* (Gao et al., 2005), *Turnera subulata* (Santos et al., 2017).

Ainda assim, a interação entre esses micro-organismos e as suas plantas hospedeiras não é, por enquanto, totalmente compreendida, nos últimos anos eles têm sido cada vez mais utilizados, tanto na agricultura, promovendo crescimento e/ou controlando patogenias em plantas (Santos & Varavallo, 2011; Silva et al., 2015), ou na produção de compostos com aplicação terapêutica (Stierle et al., 1993), dentre outros.

Diante do exposto, o estudo objetivou conduzir uma prospecção química, avaliação da produção de biomassa e atividade antagonica do fungo endófito *Phomopsis* sp. contra fungos fitopatogênicos.

Material e Métodos

Micro-organismos utilizados

Foram utilizados o fungo endófito *Phomopsis* sp. isolado de folhas de *Turnera subulata* (Santos et al., 2017) e conservado na coleção de micro-organismos do Laboratório de Química Orgânica – Instituto de Química e Biotecnologia (IQB/UFAL) e os fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Colletotrichum* sp. os quais estão depositados na coleção de micro-organismos do Laboratório de Fitopatologia – CECA/UFAL, o qual cedeu as cepas para os estudos.

Prospecção química do micélio de Phomopsis sp.

Inicialmente foi realizada a identificação do meio de cultura mais adequado para o crescimento do isolado *Phomopsis* sp.. Para isso foram realizados ensaios com cinco diferentes meios: Batata Destrose Agar (BDA), Batata Sacarose Agar (BSA), Cenoura Agar (CA), Czapek (CZA) e Tripton Soja Agar (TSA) na presença e ausência de luz. Para a análise, foi instalado um experimento em esquema fatorial (5×2) em um delineamento inteiramente casualizado e cinco repetições por tratamento, os quais constituíram dos meios de cultura e ausência e presença de luz.

Foram preparados discos fúngicos com 5 mm de diâmetro com micélio crescido em meio Agar-Agua (AA) por cinco dias sob luz contínua e ausência de luz e temperatura de 25°C (± 3°C). Os discos foram depositados no centro das placas de Petri contendo cada tratamento e foram feitas duas marcações perpendiculares no verso das placas (cinco por parcela), onde foram realizadas medições diárias do crescimento diametral (ortogonal) do isolado para a confecção de curvas de crescimento. Foi realizada análise de variância dos tratamentos utilizando o teste F e as médias (do quinto dia) foram comparadas pelo teste de

Tukey ($p \leq 0,05$) por meio do *software* Sisvar (Ferreira, 2014).

Obtenção de biomassa e dos extratos

Foram preparados 40 frascos contendo 100 mL de meio de cultivo líquido Batata Dextrose (BD) e inoculados com um disco fúngico contendo micélio e conídios viáveis, de cerca de 5 mm de diâmetro e mantidos no escuro, sem aeração, à temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ para a produção de biomassa. Após 30 dias de cultivo, a biomassa foi filtrada em papel de filtro quantitativo e levada à secagem em estufa de ventilação forçada a 45°C até apresentar massa seca constante. A biomassa seca foi extraída, por meio de maceração, com *n*-hexano (5×250 mL), clorofórmio (5×250 mL), acetato de etila (5×250 mL) e metanol (5×250 mL). As soluções foram concentradas em evaporador rotatório a uma temperatura de 60°C para cada solvente (50% a 55% para o metanol).

Após o preparo do extrato *n*-hexânico, evidenciou-se a presença de cristais. Foi realizada a purificação dos cristais presentes. Para isso, a separação das fases líquida e sólida foi realizada de forma manual e o cristal foi diluído novamente. Após a cristalização do mesmo e antes da evaporação total do solvente, retirou-se a fase sólida. O cristal foi submetido à Ressonância Magnética Nuclear (RMN) dos carbonos.

Antagonismo *in vitro* do endófito *Phomopsis* sp. contra fungos fitopatogênicos

O isolado *Phomopsis* sp. foi avaliado como antagonista contra os fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Colletotrichum* sp.. As cepas utilizadas foram cedidas pelo Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias – UFAL, onde os mesmos são conservados e depositados em uma coleção de micro-organismos. Para tanto, utilizou-se o método de cultura pareada em placa de Petri contendo meio de cultivo BDA (Mariano, 1993).

Assim, discos de micélio (cinco mm de diâmetro) do antagonista *Phomopsis* sp. e de cada fitopatógeno, individualmente, foram depositados em polos opostos nas placas de Petri, a 1cm da borda interna dos meios de cultivo. Estas culturas foram mantidas no escuro a temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$ durante cinco dias. Para cada experimento foram aplicadas cinco repetições em delineamento inteiramente casualizado. Para o tratamento controle foram inoculados apenas discos de micélio dos fitopatógenos em um polo da placa. Após incubação, investigou-se a presença de halo de inibição do crescimento micelial dos fungos patogênicos em relação ao endófito.

Visando investigar a possibilidade de produção de substâncias voláteis pelo endófito, foram testados os isolados patogênicos utilizando o método de Dick & Hutchinson (1966), com modificações. Ao invés das placas sobrepostas, foram usadas placas sem o meio de cultura, formando uma divisória, impedindo o contato direto entre o antagonista e o patógeno.

Resultados e Discussão

Os meios de cultura estudados quanto ao melhor desenvolvimento do isolado em estudo foram estatisticamente diferentes, isto é, o meio BDA e o BSA, que não diferiram estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) (Tabela 1), onde BSA e BDA proporcionaram as melhores taxas de crescimento micelial do endófito *Phomopsis* sp.. Ao observar o efeito da luz no crescimento diametral do micélio, foi constatado que, de modo geral, o fungo *Phomopsis* sp. cresce mais rapidamente sob luz constante do que quando submetido a ausência total da luz (Figuras 1 e 2).

Tabela 1. Crescimento diametral de colônias do fungo endofítico *Phomopsis* sp. submetido a diferentes meios de cultura e estado de iluminação em um período de cinco dias de cultivo. Fonte: Santos et al. (2020).

Meio de Cultura*	Luminosidade*	
	Luz	Ausência de Luz
BDA	7,33 Aa	5,93 Ab
BSA	7,26 Aa	6,36 Bb
CA	5,53 Ba	5,66 Ba
CZA	3,23 Ca	3,10 Ca
TSA	3,43 Cb	3,73 Ca

*Letras iguais maiúsculas entre linhas e minúsculas entre colunas não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

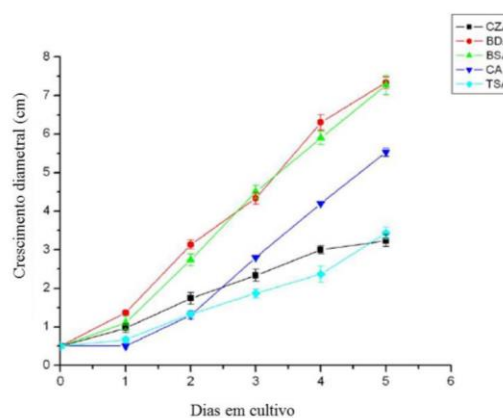


Figura 1. Crescimento diametral do fungo *Phomopsis* sp. em diferentes meios de cultivo sob iluminação contínua e temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, durante cinco dias de incubação. Fonte: Santos et al. (2020).

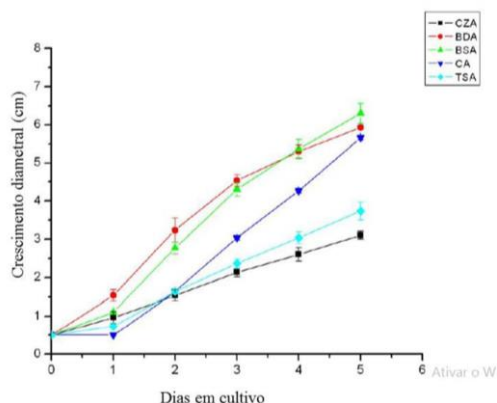


Figura 2. Crescimento diametral do fungo *Phomopsis* sp. em diferentes meios de cultivo sob escuro contínuo e temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, durante cinco dias de incubação. Fonte: Santos et al. (2020).

Após 30 dias de cultivo em meio líquido para aumento de biomassa do isolado, com rendimento total aproximado de 16 g de biomassa seca do isolado de *Phomopsis* sp. (cerca de 0,4 g por 100 mL de meio de cultivo), foram obtidas as seguintes quantidades de extratos: em *n*-hexano,

Tabela 3. Resultados da ressonância magnética nuclear (RMN) de isótopo carbono ^{13}C do cristal obtido do extrato *n*-hexânico de biomassa seca de *Phomopsis* sp. e comparação com os dados de identificação do ergosterol obtidos por Shirane et al. (1996). Fonte: Santos et al. (2020).

Carbono	Valor obtido	Ergosterol (Shirane et al., 1996)	Carbono	Valor obtido	Ergosterol (Shirane et al., 1996)
1	39,37	38,30	15	23,00	23,00
2	31,98	32,00	16	28,30	28,20
3	70,46	70,40	17	55,71	55,70
4	40,78	40,80	18	12,05	12,00
5	139,79	139,80	19	16,29	16,20
6	119,59	119,60	20	40,44	40,40
7	116,29	116,30	21	21,11	21,10
8	141,17	141,30	22	135,57	135,50
9	46,25	46,20	23	131,97	132,00
10	37,02	37,00	24	42,82	42,80
11	21,10	21,10	25	33,09	33,10
12	39,08	39,10	26	19,70	19,90
13	42,82	42,80	27	19,65	19,60
14	54,55	54,50	28	17,60	17,60

Ergosterol é o componente lipídico fúngico, responsável por inúmeras características físicas importantes das membranas, tais como estrutura, permeabilidade e modulação da fluidez. Sua ausência causa alterações na permeabilidade da membrana plasmática e inibição do crescimento (Thevissen et al., 2003). Deste modo, a presença desta molécula permite dizer que o isolado endófito *Phomopsis* sp. não possui

1,68 g, em clorofórmio, 1,28 g, em acetato de etila, 0,72 g e em metanol, 1,92 g, apresentando um rendimento aproximado, da soma dos extratos, de 35% de biomassa total seca (Tabela 2).

Tabela 2. Rendimento dos extratos de biomassa de *Phomopsis* sp. após 30 dias de incubação em relação à biomassa seca. Fonte: Santos et al. (2020).

Solvente	Peso seco	Rendimento
	(g)	(%)
<i>n</i> -hexano	1,68	10,50
Clorofórmio	1,28	8,00
Acetato de etila	0,72	4,50
Metanol	1,92	12,00
Total	-	35,00

No espectro de RMN do ^{13}C dos cristais obtidos a partir do extrato *n*-hexânico foi possível detectar a presença de 28 carbonos. A análise dos carbonos e a comparação com os dados da literatura (Tabela 3) indicaram ser a molécula purificada a estrutura do ergosterol, esteroide comum em membranas de fungos.

alterações morfológicas/estruturais bem como em seu metabolismo.

O ergosterol é uma substância que foi isolada de outros fungos endófitos como o *Rhizoctonia* sp. (Santos, 2001) e *Pestalotiopsis* microspora (Li et al., 1998) e em fungos utilizados na alimentação humana, como o *Agaricus blazei* e *Ganoderma lucidum*. Além de inferir acerca das funções dos fungos, esta

molécula também é utilizada como alvo de ação de antimicrobianos.

Assim, foi possível constatar que o fungo endófito *Phomopsis* sp., apresenta melhor crescimento nos meios BDA e BSA, quando comparado com o crescimento que ocorre nos demais meios de cultivo utilizados no estudo, bem como apresenta também um melhor crescimento em presença de iluminação contínua. Foi possível também detectar a presença de ergosterol no extrato *n*-hexânico da biomassa seca do fungo isolado.

O endófito *Phomopsis* sp. foi capaz de inibir *in vitro* o crescimento de *Rhizoctonia* sp. devido a um antagonismo por competição de espaço e nutrientes. Este fato foi evidenciado devido à formação de halo de inibição por pareamento. Este tipo de experimento não verificou se a ação antagonista foi devido à produção de voláteis, sendo necessária a realização de um procedimento para tentar detectar a possível ação de voláteis.

Desta forma, não se pode sugerir que o endófito produz substâncias bioativas voláteis contra o patógeno *Rhizoctonia* sp. O mesmo resultado foi observado para *Colletotrichum* sp.. O endófito *Phomopsis* sp. não foi capaz de reduzir o crescimento de *Pestalotiopsis* sp. por confronto direto, contudo promoveu alterações morfológicas, impedindo a produção de pigmentos, fato que possui relevância, pois a alteração morfológica indica que também há alterações nas estruturas metabólicas. De acordo com Rocha et al. (2020), por meio de estudos de metabolômica, a alteração de pigmentos infere sobre o metabolismo dos fungos.

Conseqüentemente, foi realizado o procedimento de avaliação do crescimento dos fungos em antagonismo utilizando placas com divisão de meio, onde foram obtidos os mesmos resultados. Este fato, que merece melhor investigação em estudos futuros, principalmente envolvendo alterações na taxa de esporulação deste fungo. Pode-se afirmar que este efeito inibitório foi produzido por compostos voláteis, uma vez que não houve contato direto entre antagonista e fitopatógeno.

Moretto et al. (2001) demonstraram inibição de *Colletotrichum acutatum* por *Trichoderma* spp., tanto em cultura pareada, quanto pela produção de metabólitos tóxicos. Neste estudo foi observada inibição no crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. quando este foi submetido a uma cultura pareada com o isolado *Phomopsis* sp. Rodrigues et al. (2000) pesquisaram a bioatividade de extratos de fungos endófitos isolados de *Spondias mombin*.

Estes extratos, incluindo o de *Phomopsis* sp., apresentaram atividade antimicrobiana contra actinomicetos.

O gênero *Phomopsis* é um grupo de fungos com elevado potencial biotecnológico. Isso se deve à produção de metabólitos secundários como alcaloides com capacidades farmacológicas, tais como fomopsinas (Cockrum et al., 1994) e 2,4-diidroxi-5,6-dimetil benzoato de etila e fomopsilactona, que exibiram atividade antifúngica contra fitopatógenos, produzidos por *Phomopsis cassiae*, endófito de *Cassia specatabilis* (Silva et al., 2005).

Além da produção de antimicrobianos, fungos endófitos podem excluir patógenos que ocupem o mesmo nicho ecológico por competição como relatado por Bao & Lazarovits (2001). Como o isolado *Phomopsis* sp. aqui testado apresentou significativa atividade antagonista contra os fitopatógenos alvo do experimento, este apresenta potencial no controle biológico de doenças de plantas. Uma vantagem dos micro-organismos endófitos no que se trata à habilidade antagonista é que eles possuem afinidade simbiótica com as plantas, sendo capazes de conferir-lhes resistência, uma vez que habitam o interior dos tecidos vegetais sem que lhes cause danos.

Conclusões

O fungo endófito *Phomopsis* sp. possui melhor crescimento micelial quando inoculado em meio de cultivo BDA, bem como pela incubação sob luz contínua, o que favorece a presença do ergosterol em suas membranas. Além disso, o isolado possui atividade antagonista contra os fitopatógenos *Rhizoctonia* sp., *Pestalotiopsis* sp. e *Colletotrichum* sp..

Referências

- Azevedo, J. L.; Sarabia, S.; Maccheroni J. R. W.; Pereira, J. O.; Araújo, W. L. 2000. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. *Environmental Biotechnology*, 3, (1), 31. Doi: 10.4067/S0717-34582000000100004
- Bao, J. R.; Lazarovits, G. 2001. Differential colonization of tomato roots by nonpathogenic and pathogenic *Fusarium oxysporum* strains may influence *Fusarium wilt* control. *Phytopathology*, 91, (5), 449-456. Doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.5.449
- Corrado, M.; Rodrigues, K. F. 2004. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. *Journal of Basic*

- Microbiology, 44, (2), 157-160. Doi: 10.1002/jobm.200310341
- Dick, C. M.; Hutchinson, S. A. 1966. Biological activity of volatile fungal metabolites. *Nature*, 20, (211), 868.
- Ferreira, D. F. 2014. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, 38, (2), 109-112. Doi: 10.1590/S1413-70542014000200001
- Gao, X.; Zhou, H.; Xu, D. Y.; Chen, Y. Q.; Qu, L. H. 2005. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. *FEMS Microbiological Letters*, 249, (2), 255-266. Doi: 10.1016/j.femsle.2005.06.017
- Hajjehgari, B.; Torabi-Giglou, M.; Mohammadi, M. R.; Davari, M. 2008. Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. *African Journal of Biotechnology*, 7, (8), 967-972.
- Li, J. Y.; Sidhu, R. S.; Bollon, A.; Strobel, G. A. 1998. Stimulation of taxol production in liquid cultures of *Pestalotiopsis microspora*. *Mycological Research*, 102, (4), 461-464. Doi: <https://doi.org/10.1017/S0953756297005078>
- Mariano, R. L. R. 1993. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 1, 369-409.
- Moretto, K. C. K.; Gimenes-Fernandes, N.; Santos, J. M. dos. 2001. Influence of *Trichoderma* spp. on *Colletotrichum acutatum* mycelial growth and morphology and on infection of 'Tahiti' lime detached flowers. *Summa Phytopathologica*, 27, (4), 357-364. 2001.
- Rocha, J. R.; Crispim, A. C.; Silva, J. M.; Santana, A. E. G.; Caetano, L. C. 2020. Evaluation of the metabolic production of the endophytic fungus *Phomopsis* sp.. *Química Nova*, 43, (3), 314-318. Doi: 10.21577/0100-4042.20170485
- Rodrigues, K. F.; Hesse, M.; Werner, C. 2000. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *Journal of Basic Microbiology*, 40, (4), 261-267. Doi: 10.1002/1521-4028(200008)40:4<261::AID-JOBM261>3.0.CO;2-D
- Rubini, M. R.; Silva-Ribeiro, R. T.; Pomella, A. W. V.; Maki, C. S.; Araújo, W. L.; Santos, D. R.; Azevedo, J. L. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Science*, 1, (1), 24-33. Doi: 10.7150/ijbs.1.24
- Santos, D. A. P. 2001. Isolamento e identificação de metabólitos secundários dos fungos comestíveis *Agaricus blazei* e *Ganoderma lucidum*. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, Brasil.
- Santos, G. B. L.; Caetano, L. C.; Nascimento, A. R. S.; Ramos Sobrinho, R.; Silva, R. M. S.; Silva, J. M.; Montaldo, Y. C.; Santos, T. M. C. 2017. *Phomopsis* sp. as an endophyte of *Turnera subulata* L.: Isolation, identification and antimicrobial and antioxidant activity of their extracts. *African Journal of Microbiology Research*, 11, (17), 668-672. Doi: 10.5897/AJMR2016.7975
- Santos, T. T.; Varavallo, M. A. 2011. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 32, (2), 199-212. Doi: 10.5433/1679-0367.2011v32n2p199
- Shirane, N.; Takenaka, H.; Ueda, K.; Hashimoto, T.; Katoh, K.; Ishii, H. 1996. Sterol analysis of dmi-resistant and sensitive strains of *Venturia inaequalis*. *Phytochemistry*, 41, (5), 1301-1308. Doi: 10.1016/0031-9422(95)00787-3
- Silva, G. H.; Teles, H. L.; Trevisan, H. C.; Bolzani, V. da S.; Young, M. C. M.; Pfenning, L. H.; Eberlin, M. N.; Haddad, R.; Costa-Neto, C. M.; Araújo, Â. R. 2005. New Bioactive Metabolites Produced by *Phomopsis cassiae*, an Endophytic Fungus in *Cassia spectabilis*. *Journal of The Brazilian Chemical Society*, 16, (6), 1463-1466. Doi: 10.1590/S0103-50532005000800029
- Silva, J. M.; Teixeira, R. R. O.; Rocha, J. R.; Santos, T. M. 2017. *In vitro* and *in vivo* antagonism of *Scerrotium rolfsii* sacc by strains of *Trichoderma* spp. *International Journal of Agriculture, Environment and Bioresearch*, 2, (1), 60-67.
- Silva, J. M.; Santos, T. M. C.; Albuquerque, L. C.; Montaldo, Y. C.; Oliveira, J. U. L.; Silva, S. G. M.; Nascimento, M. S.; Teixeira, R. R. O. 2015. Potential of the endophytic bacteria (*Herbaspirillum* spp. and *Bacillus* spp.) to promote sugarcane growth. *Australian Journal of Crop Science*, 9, (8), 754-760.
- Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260, (5105), 214-216.

Thevissen, K.; Kathelijne, K. A.; Ferket, I.;
François, E. J. A.; Cammue, B. P. A. 2003.
Interactions of antifungal plant defensins

with fungal membrane components.
Peptides, 24, (11), 1705-1712.