

REVISTA DESAFIOS

ISSN: 2359-3652

ATIVIDADE ANTAGONISTA, ALELOPÁTICA E DIVERSIDADE QUÍMICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Cochlospermum regium* L.

ANTAGONIST AND ALLELOPATHIC ACTIVITY AND CHEMICAL DIVERSITY OF ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM *Cochlospermum regium* L.

ACTIVIDAD ANTAGONISTA, ALELOPÁTICA Y DIVERSIDAD QUÍMICA DE HONGOS ENDOFÍTICOS AISLADOS DE *Cochlospermum regium* L.

Gleys Kellen Aquino Moraes¹, Vanuza de Sales Carneiro¹, Daniela Francisca Soares², Aloisio Freitas Chagas Junior³, Vanessa Mara Chapla^{1,2*}

¹Colegiado de Ciências Exatas e Biotecnológicas, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO

²Programa de pós-graduação em Química, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO

³Engenharia Agrônoma, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO

*Autor correspondente: vmchapla@mail.uft.edu.br

Aprovado em 12/2023 publicado em 29/12/2023.

RESUMO

Cochlospermum regium é uma planta medicinal nativa do Cerrado havendo poucos estudos químicos, agrônômicos e biotecnológicos sobre esta espécie, a fim de se conhecer o potencial desta planta foram isolados cinquenta e três fungos endofíticos da folha e do caule. A identificação dos fungos endofíticos foi realizada utilizando-se a caracterização molecular com sequenciamento da região ITS. Foram identificados os fungos endofíticos *Corioloopsis rígida* (Cr-1), *Diaporthe inconspícua* (Cr-10), *Phomopsis* sp. (Cr-32), *Nigrospora oryzae* (Cr-41), *Diaporthe pseudoinconspícua* (Cr-44) e *Asordaria conoidea* (Cr-8). Todos os endófitos apresentaram atividade antagonista contra no mínimo um fitopatógeno de interesse agrônômico (*Fusarium oxysporum*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris oryzae*). No teste de alelopatia para compostos voláteis, utilizando sementes de alface, o fungo Cr-32 inibiu 100% da germinação das sementes no tempo 3. Já analisando o desenvolvimento das plântulas alguns fungos apresentaram inibição, Cr-16 com 40,80% de inibição no tempo 3, enquanto outros fungos estimularam o seu desenvolvimento, Cr-44 com 106,66% de estímulo no tempo 0. Após cultivo dos endófitos em meio PDB e obtenção dos extratos brutos AcOEt, foi confirmado a presença das classes flavonas, flavonóis, xantonas, esteroides e triterpenoides para todos os extratos, além de confirmar a atividade antioxidante frente ao DPPH também para todos os extratos.

Palavras-chave: Fungos Endossimbiontes. Atividade Antagonista. Atividade Alelopática. Atividade Antioxidante.

ABSTRACT

DOI: http://dx.doi.org/10.20873/DEZ_23_09

Revista Desafios – v.3, n.1, 2023

Cochlospermum regium is a medicinal plant native to the Cerrado and there are few chemical, agronomic and biotechnological studies on this species, in order to know the potential of this plant were isolated fifty-three endophytic fungi from the leaf and stem. The identification of endophytic fungi was performed using molecular characterization with sequencing of the ITS region. The endophytic fungi *Corioloopsis rígida*(Cr-1), *Diaporthe inconspícua* (Cr-10), *Phomopsis* sp. (Cr-32), *Nigrospora oryzae* (Cr-41), *Diaporthe pseudoinconspícua* (Cr-44) e *Asordariaconoidea*(Cr-8) were identified. All endophytes isolated showed antagonist activity against at least one phytopathogen of agronomic interest (*Fusarium oxysporum*, *Curvularialunata* and *Bipolaris oryzae*). In the allelopathy test for volatile compounds, using lettuce seeds, the fungus Cr-32 inhibited 100% of seed germination in time 3. On the other hand, analyzing the seedling development, some fungi showed inhibition, Cr-16 with 40.80% inhibition at time 3, while other fungi stimulated its development, Cr-44 with 106.66% of stimulation at time 0. After cultivation of the endophytes in PDB medium and obtaining the crude EtOAc extracts, the presence of flavones, flavonols, xanthones, steroids and triterpenoids for all extracts was confirmed, in addition to confirming the antioxidant activity against DPPH also for all extracts.

Keywords: Endosymbiont fungi. Antagonist activity. Allelopathyactivity. Antioxidantactivity.

RESUMEN

Cochlospermum regium es una planta medicinal originaria del Cerrado y existen pocos estudios químicos, agronómicos y biotecnológicos sobre esta especie, para conocer el potencial de esta planta se aislaron cincuenta y tres hongos endófitos de hoja y tallo. La identificación de hongos endófitos se realizó mediante caracterización molecular consecución de la región ITS. Los hongos endófitos *Corioloopsis rígida* (Cr-1), *Diaporthe inconspícua* (Cr-10), *Phomopsis* sp. (Cr-32), *Nigrospora oryzae* (Cr-41), *Diaporthe pseudoinconspícua* (Cr-44) y *Asordariaconoidea* (Cr-8). Todos los endófitos mostraron actividad antagonista contra al menos un fitopatógeno de interés agronómico (*Fusarium oxysporum*, *Curvularialunata* y *Bipolaris oryzae*). En la prueba de alelopatía para compuestos volátiles, utilizando semillas de lechuga, el hongo Cr-32 inhibió el 100% de la germinación de semillas en el tiempo 3. Analizando el desarrollo de plántulas, algunos hongos presentaron inhibición, Cr-16 con 40,80% de inhibición en el tiempo 3, mientras que otros hongos estimularon su desarrollo, Cr-44 con 106,66% de estimulación en el tiempo 0. Luego de cultivar los endófitos en medio PDB y obtener extractos crudos de EtOAc, se observó la presencia de flavonas, flavonoles, xantonas, esteroides y triterpenoides para todos los extractos, además de confirmando la actividad antioxidante contra DPPH también para todos los extractos.

Descriptores: Hongos endosimbiontes. Actividad antagonista. Actividad alelopática. Actividad antioxidante.

INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos são microrganismos que colonizam o interior de órgãos e tecidos vegetais como folhas, caules e raízes de várias plantas, sem causar prejuízos aos hospedeiros (Gupta *et al.*, 2020; Chaplaet *et al.*, 2014). Os fungos endofíticos são encontrados em todos os tipos de plantas, ou seja,

árvores, gramíneas, algas e plantas herbáceas (Rajamanikyamet *et al.*, 2017), com isso, são considerados componentes importantes da biodiversidade. De acordo com Zimmerman e Vitousek (2012) existem quase 300 mil espécies de plantas no mundo e cada planta hospeda um ou mais endófitos. Estima-se que existam na natureza mais de um milhão de fungos endofíticos (Rajamanikyamet *et al.*, 2017).

Os fungos endofíticos proporcionam benefícios a suas plantas hospedeiras, dentre os quais, variam do crescimento vegetal ao controle de pragas, com capacidade de inibir fitopatógenos podendo assim, servir como ótimos agentes de controle biológico (Goudaet *et al.*, 2016, Gupta *et al.*, 2020). Organismos endofíticos produzem metabólitos especiais que podem ter ainda grande importância na descoberta de novos compostos, como antibióticos, antioxidantes, anticancerígenos, na produção de enzimas de interesse industrial, entre outras aplicações (Ribeiro e Pamphile, 2017; Torres *et al.*, 2020, Cruz *et al.*, 2020). Podem ser explorados para curar diversos tipos de doenças, bem como, serem utilizados na agricultura e em outros usos biotecnológicos (Chaplaet *et al.*, 2013).

A espécie *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilgeré nativa do Cerrado, conhecida popularmente como algodãozinho-do-campo ou algodãozinho-do-cerrado, pertencente à família Bixaceae (Antar *et al.*, 2020; Gavilanet *et al.*, 2018; Solon *et al.*, 2012). Na medicina popular as raízes são utilizadas na forma de fatias, cavaco ou pó, no preparo de decoctos, infusões e garrafadas para o tratamento de diversos tipos de inflamações, como uterinas, intestinais e ovarianas, além de ser utilizado como antibacteriano e analgésico (Arunachalamet *et al.*, 2019; Galvão *et al.*, 2023).

Em estudos fitoquímicos, os principais compostos isolados nas raízes de *C. regium* partir do extrato são: ácido elágico, ácido gálico, di-hidrocaempferol, di-hidrocaempferol-3-*O*- β -glucopiranosídeo, di-hidrocaempferol-3-*O*- β -(6''-galloyl)-glucopiranosídeo, pinosinol, excelsina, cochlosperminas A e B (Solon *et al.*, 2012; Camillo *et al.*, 2016), e as flavonas naringenina e aromadendrina, 1-hidroxitetradecanona-3 e os flavonoides e 3-*O*-glicosil-dihidrocanferol (Camillo *et al.*, 2016). Galvão e colaboradores (2023) identificaram 25 compostos presentes no extrato etanólico das folhas de *C. regium*, incluindo taninos e flavonoides glicosilados. O óleo essencial obtido das flores apresentou como componentes majoritários o cariofileno E, γ -muuroleno e biciclogermacreno e potente atividade antioxidante na redução do DPPH, bem como atividade antifúngica contra *Sclerotinia sclerotiorum* (Menezes-Filho *et al.*, 2020). Em relação a estudos da microbiota de *C. regium*, apenas trabalhos no nosso grupo de pesquisa foram encontrados na literatura (Arruda *et al.*, 2022; Dantas *et al.*, 2022; Montelet *et al.*, 2021).

Neste contexto, os estudos relacionados aos fungos endofíticos associados a espécie vegetal *Cochlospermum regium* são escassos e, o presente trabalho buscou avaliar o perfil químico e biológico dos fungos endofíticos isolados de *C. regium* e avaliação do potencial antimicrobiano e alelopático.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes químicos e equipamentos

Moraes et al, 2023_ATIVIDADE ANTAGONISTA, ALELOPÁTICA E DIVERSIDADE QUÍMICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Cochlospermum regium* L.

Os fungos endofíticos foram crescidos em meio de cultivo BDA (Meio de Batata Dextrose Ágar), constituído de 200g de batata, 20 g de dextrose e 20 g (Dinâmica[®]) de ágar-ágar bacteriológico (Dinâmica[®]) em 1L de água destilada. E em meio MDB (Meio de Batata Dextrose) constituído de 200g de batata e 20 g de dextrose em 1L de água destilada. Os solventes orgânicos utilizados foram adquiridos da Dinâmica[®] (Metanol PA, Acetato de Etila PA, Clorofórmio PA e Metanol HPLC). Foram também utilizados ácido clorídrico 37% (Neon), ácido sulfúrico PA (Cremoline) e etanol. Para o ensaio antioxidante foi utilizado o 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH, Sigma-Aldrich).

Os fungos foram inoculados em câmara incubadora tipo BOD (SPLABOR[®]) com fotoperíodo de 12h. As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em equipamento ZHIMADZU: bomba Shimadzu LC-10AD; auto injetor Shimadzu SIL-10A; detector Ultravioleta, em arranjo de diodos, Shimadzu SPD-M10A, com injetor manual. Utilizando como fase estacionária uma coluna analítica de fase reversa Phenomenex tipo Luna (C18, 250 x 4,60 mm e 5 µm). Este projeto de pesquisa tem cadastro no SisGen sob número A01E79C.

Coleta do material vegetal e isolamento e identificação dos fungos endofíticos

Os fungos endofíticos foram isolados da espécie vegetal *Cochlospermum regium* coletada no município de Gurupi, na unidade rural Fazenda experimental pertencente a Universidade Federal do Tocantins, Estado do Tocantins, Brasil, nas coordenadas (11°43'45''S e 49°04'07''W). As folhas/caule coletados não apresentavam ferimentos aparentes, estas foram higienizados da seguinte forma: a superfície do material vegetal foi lavada com água e sabão neutro, e posteriormente levada ao fluxo laminar (limpo e esterilizado) o material então foi imerso em solução aquosa de NaClO concentração 1% (v/v) por 1 min e em seguida, em solução hidroetanólica concentração 70% (v/v) por 1 min., seguida de duas lavagens em béqueres diferentes contendo água estéril por 2 min. A água do segundo béquer foi inoculada em placa de *Petri* contendo meio BDA (Batata Dextrose e Ágar), a fim de verificar se a assepsia do material foi eficiente. As placas foram mantidas em BOD por 30 dias a 28°C. Os dois métodos utilizados para o isolamento de fungos endofíticos foram o de secção e maceração.

O método por secção consistiu em seccionar pedaços de folhas assepticamente utilizando lâmina de bisturi, onde foram transferidas para três placas de *Petri* contendo meio de cultura sólido BDA, o qual foi adicionado, após ser autoclavado, antibiótico Amoxicilina dihidratada na concentração de 50 mg L⁻¹, para evitar o crescimento bacteriano. O mesmo procedimento foi realizado para o caule.

No método de maceração foi preparada solução tampão PBS (100 mL de água destilada estéril contendo: 0,800 g de NaCl, 0,200 g de KCl, 0,144g de K₂HPO₄ e 0,024g de KH₂PO₄). Adicionaram-se pedaços de folhas junto com tampão PBS ao almofariz e macerou-se o material, este

foi inserido em três placas de *Petri* contendo meio BDA autoclavado e antibiótico descrito anteriormente, ficando incubado por 30 dias a 28°C, onde observou-se o crescimento dos endófitos. Realizou o mesmo procedimento para o caule.

A identificação dos fungos endofíticos foi realizada por técnicas moleculares, com base no processo de amplificação e sequenciamento da região genômica ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossômico conservado da espécie fúngica estudada. Foi realizada a extração do DNA do micélio dos fungos, seguindo o protocolo de CTAB adaptado como descrito por Arruda e colaboradores(2022). As amostras de DNA foram amplificadas usando os primers ITS-1e ITS-4 e purificadas com Kit Purilink PCR Purification (Invitrogen®). A amostra de DNA foi sequenciada por eletroforese capilar em aparelho ABI3730, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v.3.1.

A sequência de nucleotídeos obtida foi comparada com as depositadas no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando o programa BLASTn. Foram escolhidas algumas sequências baseadas no melhor valor obtido relacionado à similaridade, logo após as sequências determinadas foram submetidas ao alinhamento utilizando o programa Geneious, foi construída a árvore filogenética pelo método *neighbor-joining* com bootstrap 2000 utilizando o programa MEGA versão 7.0.

Avaliação da Atividade Antagonista – Teste de confronto direto

Os experimentos de antagonismo *in vitro* pelo método de culturas pareadas em placas (Mariano, 1993), consistiu no confronto direto dos endófitos obtidos contra os fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Curvularialunatae* e *Bipolarisoryzae*. Cada placa, contendo meio BDA, recebeu dois discos de 6 mm pareados, em pontos equidistantes, sendo um disco retirado da borda da colônia do fungo fitopatogênico e o outro disco retirado da borda da colônia do fungo endofítico. Após o pareamento, as placas foram incubadas a 25°C ± 2°C por 2 e 7 dias ou até que se encontrassem o endófito e o fitopatógeno. Como testemunha, o fungo fitopatogênico foi inoculado sem a presença dos endófitos. A avaliação foi realizada quando a colônia do fungo (controle) alcançou as bordas da placa. Após o fim do pareamento, foram medidos os diâmetros, utilizando paquímetro, dos fitopatógenos pareados com os endofíticos e dos fitopatógenos da placa controle. O teste foi realizado em triplicata e os valores obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa SISVAR 5.6 e a comparação das médias com variações foi realizada pelo teste de *Tukey* com 5% de probabilidade (Lopes *et al.*, 2017).

Avaliação da Atividade Alelopática - Teste de avaliação da germinação

Para testar a inibição da germinação de sementes pela ação dos compostos voláteis produzidos pelos endófitos, foi utilizada metodologia adaptada de Macías-Rubalcava *et al.* (2010) em placas de *Petri* com divisória. Após sete dias de crescimento dos endófitos em placas de *Petri* contendo meio

Moraes et al, 2023_ATIVIDADE ANTAGONISTA, ALELOPÁTICA E DIVERSIDADE QUÍMICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Cochlospermum regium* L.

BDA a 28°C, foi retirado um disco de micélio com 6 mm de diâmetro, que foi depositado em uma das extremidades da placa de *Petri*. Em seguida, após foram colocadas 10 sementes de *Lactuca sativa* L. (alface) com 1 mL de água destilada estéril na extremidade oposta da placa.

No tempo 0 foram colocados o endófito e as sementes de alface ao mesmo tempo na placa com divisória, e no tempo 3 o endófito cresceu por 3 dias na placa com divisória e após foram colocadas as 10 sementes de alface. Em seguida, foram inoculadas em estufa climatizada (DBO) a 28°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Como controle foram inoculadas 10 sementes de alface sem a presença dos endófitos com 1 mL de água destilada estéril. Foram consideradas germinadas as sementes que apresentaram 2 mm de protusão da radícula. Após um período de sete dias foi avaliada a porcentagem de sementes germinadas e comprimento das plântulas. O teste foi realizado em triplicata e os valores obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa SISVAR 5.6 e a comparação das médias com resultados variáveis foi avaliado pelo teste de *Tukey* com 5% de probabilidade.

Cultivo dos fungos endofíticos e preparo dos extratos brutos

Foram selecionados aleatoriamente vinte fungos endofíticos isolados e cultivou-os em meio BDA, estes foram incubados em câmara DBO com temperatura programada em 25°C por 7 dias. Após os 7 dias, os fungos foram inoculados em 2 frascos de *Erlenmeyer* de 500 mL, contendo 250 mL de meio MDB (Meio de Batata e Dextrose) e inoculado em câmara DBO mantidos sob temperatura de 25°C por 20 dias.

Ao final do período de fermentação dos fungos endofíticos, a suspensão micelar foi filtrada utilizando filtração a vácuo com papel filtro qualitativo e funil de Buchner, separando-o do micélio. O filtrado aquoso foi submetido à partição líquido/líquido com acetato de etila (3 x 250 mL) segundo a metodologia descrita por Azevedo (1998). Após evaporação do solvente orgânico em rotaevaporador, obteve-se os respectivos extratos brutos para cada fungo e estes foram mantidos sob refrigeração.

Avaliação das classes de metabólitos secundários

Preparou-se uma solução metanólica de todos os extratos bruto obtidos na concentração de 1 mg mL⁻¹. Logo em seguida, foram adicionados 4 mL da solução em 5 tubos de ensaios. Para a identificação dos metabólitos secundários foram utilizadas as soluções aquosas de HCl concentrações 0,05 mol L⁻¹ e de NaOH 0,05 mol L⁻¹ para acidificar a pH 3 e alcalinizar a pH 8 e 11, respectivamente.

A presença da classe de metabólitos secundários foi registrada como positivo (+), quando houve mudança na coloração, e ausência de cor e precipitação como negativo (-) seguindo a metodologia de Barbosa et al. (2004) e Boaset al. (2019). Foram analisadas as classes: flavonas, flavonóis e xantonas; flavanonas; antocianinas e antocianidinas; chalconas e auronas; flavanonóis; leucoantocianidinas; taninos e flavonas. Para os testes de esteróides e triterpenóides dissolveu-se alguns miligramas de extrato bruto seco em 10 mL de clorofórmio. Logo após, foi filtrado com

algodão e transferiu-se para um tubo de ensaio seco. Adicionou-se 0,1 mL de anidrido acético e agitou suavemente, e em seguida adicionou 3 gotas de H₂SO₄ concentrado. Depois tornou a agitar suavemente. Observou-se a mudança na coloração. Para a presença de alcalóides, dissolveu-se alguns miligramas em 2 mL de solução aquosa de HCl concentração 0,05 mol L⁻¹ (v/v), filtrou-se quando necessário, posteriormente adicionou-se gotas do reagente Bouchardat. Observou-se a presença ou ausência de precipitado.

Análise da diversidade química por CCDC e CLAE

Na cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC), foram utilizadas placas pré-prontas de sílica gel 60 (F254-Filter-Bio), utilizando clorofórmio:metanol (9:1, v/v) como eluente. As amostras foram aplicadas na placa de CCDC com auxílio de um capilar e eluídas em cuba cromatográfica. Após a eluição, as placas foram reveladas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) e à exposição de vapores de Iodo (I₂ g). Esse processo foi aplicado para todos os extratos brutos que foram obtidos.

Na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o perfil cromatográfico dos extratos brutos foi obtido em equipamento ZHIMADZU. Os extratos foram preparados a uma concentração de 2 mg mL⁻¹ em solução metanólica de 95%, foi utilizado como fase estacionária uma coluna analítica de fase reversa Phenomenex tipo Luna (C18, 250 x 4,60 mm e 5 μ m) e eluição em gradiente de H₂O: CH₃OH (95:05 v/v a 0:100% em 45 minutos permanecendo nesta condição por mais 10 min.), com uma vazão de 1,0 mL min⁻¹.

Avaliação da atividade antioxidante qualitativa

Os extratos brutos foram aplicados em placas de sílica (CCDC) e eluídos com CHCl₃:CH₃OH (9:1, v/v). As cromatoplasmas foram borrifadas com uma solução metanólica com concentração de 0,2% de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), em seguida, foram mantidas em local escuro durante 30 minutos. O potencial antioxidante foi evidenciado pela presença de manchas amareladas, decorrentes da redução da solução estoque de DPPH, contra a coloração roxa do fundo (Simões-Pires *et al.*, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento e identificação dos fungos endofíticos

Foram isolados cinquenta e três cepas fúngicas da folha e do caule da planta de *C. regium*, sendo vinte e três fungos isolados pela metodologia por secção e trinta fungos isolados por maceração. Pela metodologia de maceração obteve-se um número maior de fungos endofíticos, isso porque a trituração quebra o tecido vegetal, o que permite a completa liberação dos microorganismos dos tecidos do hospedeiro (Araújo *et al.*, 2010). Desse total de cinquenta e três fungos obtidos, vinte e

sete foram isolados das folhas e vinte e seis foram provenientes do caule. Os fungos endofíticos isolados foram nomeados com o código Cr referente a planta *Cochlospermum regium* precedido do número do fungo (Cr-1 até Cr-53).

Os fungos endofíticos isolados de *C. regium* que foram submetidos a identificação por meio de técnicas da biologia molecular foram: Cr-1, Cr-2, Cr-10, Cr-16, Cr-17, Cr-24, Cr-27, Cr-30, Cr-32, Cr-41, Cr-44, Cr-48 e Cr-50, foi possível extrair o DNA de todos estes isolados, e submetê-los a amplificação por PCR (Figura S1, material suplementar). A identificação de fungos tem sido realizada por técnicas moleculares, por meio da região ITS (Internal Transcribed Spacer), essa região é altamente conservada intraespecificamente, mas variável entre diferentes espécies, fornecendo assim a possibilidade da identificação de gêneros e espécies de fungos, devido à amplificação e sequenciamento dessa região, comparando os dados do sequenciamento com os bancos de dados disponíveis (Alberto *et al.*, 2011).

A análise molecular da região ITS do fungo endofítico Cr-1 mostrou 99% de semelhança com *Corioloopsisrigida*. O clado filogenético formado apoiou a separação das espécies (alto valor de bootstrap (Figura S2). Portanto, é possível dizer que o fungo endofítico isolado é *Corioloopsisrigida*. O fungo endofítico Cr-32 mostrou 99% de semelhança com *Phomopsis* sp. No entanto, não foram encontradas divergências significativas entre as espécies para permitir a identificação de Cr-32 ao nível de espécie (Figura S3).

A análise molecular da região ITS do fungo endofítico Cr-41 mostrou 97% de semelhança com *Nigrosporaoryzae*. O clado filogenético formado apoiou a separação das espécies (Figura S4), logo com esse resultado é suficiente para fornecer a identificação completa do endofítico Cr-41 como *Nigrosporaoryzae*. No caso do fungo Cr-44 a análise molecular da região ITS mostrou 86% de semelhança com *Diaporthe pseudoinconspicua*. O clado filogenético formado apoiou a separação das espécies (alto valor de bootstrap, (Figura S5). Portanto, com este resultado é possível dizer que o fungo endofítico isolado provavelmente é *Diaporthe pseudoinconspicua*. A análise molecular da região do ITS do fungo Cr-8 apresentou 100% de similaridade com a espécie *Asordariaconoidea* (Arruda *et al.*, 2022). Dessa forma, sete fungos endofíticos foram identificados conforme mostrado na Tabela 1, os demais continuam em análise.

Tabela 1. Código e nome dos fungos identificados

Código do fungo	Nome identificado
Cr-1	<i>Corioloopsisrigida</i>
Cr-8	<i>Asordariaconoidea</i>
Cr-10	<i>Diaporthe inconspicua</i>
Cr-17	<i>Phomopsis</i> sp.
Cr-32	<i>Phomopsis</i> sp.
Cr-41	<i>Nigrosporaoryzae</i>
Cr-44	<i>Diaporthe pseudoinconspicua</i>

Fonte: Autores, 2023.

Atividade Antagonista

Os testes realizados através do método *in vitro* revelaram o potencial antagonista de cinquenta e três fungos endofíticos, por pareamento direto, os fungos endofíticos codificados como Cr-2, Cr-10, Cr-16, Cr-17, Cr-24, Cr-27, Cr-30, Cr-32, Cr-40, Cr-41, Cr-42, Cr-44, Cr-48 e Cr-50 apresentaram inibição dos fitopatógenos quando comparado a testemunha. Os dados medidos do tamanho da colônia dos fitopatógenos foram usados para obtenção da tabela de inibição através do programa estatístico SISVAR 5.6. Foram levados em conta os dias 2 e 7 dos testes. Os resultados de inibição de todos os fungos encontram-se na Tabela S1, S2 e S3 (material suplementar).

Pela análise estatística do teste de *Tukey*, foi possível observar a inibição utilizando os fitopatógenos *F. oxysporum*, *B. oryzae* e *C. lunata*. Para ambos patógenos, os que apresentaram maior inibição em 2 dias foram Cr-40, Cr-42 e Cr-50, sendo estes superiores quando comparados com a testemunha, com coeficiente de variância (CV) de 18,53%. Já para a análise em 7 dias foi possível observar a inibição em ambos patógenos pelo fungo Cr-41 o que apresentou maior inibição, com CV de 5,08% como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Média do confronto direto de fungos endofíticos com os fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Bipolaris oryzae* e *Curvularia lunata* em 2 e 7 dias.

Fitopatógeno	2 dias		7 dias	
	Tratamentos	Médias ¹ (mm)	Tratamentos	Médias ¹ (mm)
<i>F. oxysporum</i>	Controle	67,00 c	Controle	78,33 e
	Cr-40	77,57 d	Cr-41	75,33 e
	Cr-42	75,89 d		
	Cr-50	75,33 d		
	CV (%) ²	18,53	CV (%) ²	5,08
<i>B. oryzae</i>	Controle	45,66 b	Controle	64,44 d
	Cr-40	71,22 c	Cr-41	75,22 e
	Cr-42	77,55 c		
	Cr-50	72,88 c		
	CV (%) ²	14,42	CV (%) ²	7,71
<i>C. lunata</i>	Controle	48,11 f	Controle	65,55 d
	Cr-40	73,55 g	Cr-41	74,77 e
	Cr-42	77,00 g		
	Cr-50	78,11 g		
	CV (%) ²	6,19	CV (%) ²	5,08

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de *Tukey* a 5% de significância. ²CV = Coeficiente de variação. Fonte: Autores, 2023.

A partir destes dados, 16 endófitos (30,2%) apresentaram atividade inibitória contra pelo menos um dos fitopatógenos testados, sendo que desses 7,54% apresentaram atividade contra os três fitopatógenos testados. De acordo com Azevedo *et al.* (2002) os endofíticos podem atuar inibindo o

crescimento de fitopatógenos pela competição de nutrientes, produção de alguma substância antagonista ou até mesmo fazendo com que a planta desenvolva resistência à doença.

Diversos trabalhos têm identificado a atividade antagonista de fungos endofíticos contra diferentes fungos fitopatógenos de interesse agrícola (Grabkaet *al.* 2022; Silva-Valderrama *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2020; Lopes, *et al.*, 2017; Santos e Varavalho 2011). A utilização de microrganismos com ação de biocontrole e/ou promoção de crescimento vem sendo apontada como alternativa viável para sistemas de produção agrícola ecológica e economicamente sustentáveis, e o controle biológico através de antagonistas tem possibilitado solução viável para várias doenças consideradas de difícil controle (Grabkaet *al.* 2022; Chen *et al.*, 2016).

Atividade Alelopática

O parâmetro mais utilizado na avaliação da atividade alelopática é a germinação de sementes. A inibição da germinação das sementes da alface pela ação dos metabólitos voláteis produzidos pelos endófitos foi observada apenas no tempo (3), pelos fungos Cr-2, Cr-16 e Cr-32 (Tabela S4, material suplementar). Podemos destacar o fungo Cr-32 que inibiu 100% a germinação das sementes de alface, isto pode ser devido a presença de compostos inibidores potentes tanto na germinação das sementes como no crescimento de plantas (Oliveira *et al.*, 2014).

Dos fungos endofíticos testados, 13 (81,25%) não apresentaram atividade inibitória sobre a germinação das sementes de alface (Tabela S4), isto pode ser devido a germinação normalmente ser o processo menos afetado pelos aleloquímicos e que em alguns casos o efeito destes podem ocorrer sobre outro parâmetro, como crescimento da plântula (Paula *et al.*, 2014).

Para as sementes que germinaram foram medidas o tamanho das plântulas. Considerando o tempo 0 e 3 (Tabela 3). No tempo 0, após análise estatística do teste de *Tukey* foi possível observar a inibição do crescimento das plântulas pelos fungos Cr-1, Cr-10, Cr-16 e Cr-17, ou seja, estes endófitos possuem ação alelopática dos compostos voláteis, o fungo que apresentou maior inibição foi o Cr-17 com 33,33% de inibição no crescimento das plântulas. Os endófitos Cr-2, Cr-24, Cr-27, Cr-30, Cr-32, Cr-39, Cr-40, Cr-41, Cr-42, Cr-44, Cr-48 e Cr-50 auxiliaram no crescimento das plântulas, sugerindo a produção de hormônios de crescimento, destacando que o fungo Cr-44 causou um aumento nas plântulas de 106,66%.

Já no tempo 3 foi possível observar a inibição do crescimento das plântulas pelos fungos Cr-1, Cr-2, Cr-10, Cr-16, Cr-17, Cr-32 e Cr-40, ou seja, estes endófitos possuem ação alelopática, sendo os que apresentaram maior inibição o Cr-32, Cr-2 e Cr-16 com 100%, 28% e 40% de inibição das plântulas, respectivamente. Os endófitos Cr-24, Cr-27, Cr-30, Cr-39, Cr-41, Cr-42, Cr-44, Cr-48 e Cr-50 auxiliaram no desenvolvimento das plântulas, sendo os fungos Cr-39 e Cr-44 os que mais auxiliaram o crescimento das plântulas em 28% e 16%, respectivamente, comparando-se com o controle. Observa-se que no tempo 3 houve uma inibição maior e menor crescimento das plântulas

pelos endófitos, dessa forma o tipo de compostos voláteis aleloquímico produzidos pode estar relacionado ao tempo de crescimento dos fungos.

De acordo com Macías-Rubalcava *et al.* (2010) a inibição da germinação ou a inibição do crescimento das plântulas pode ocorrer se as sementes tivessem sido expostas a compostos aleloquímicos produzidos por fungos, que foram cultivados de 1 a 3 dias ou mais de 15 dias. A alteração na toxicidade em culturas mais antigas pode ser devida à depleção de nutrientes do meio de cultura, o que pode resultar na mudança da produção dos compostos voláteis.

Tabela 3. Média de crescimento das plântulas pela ação dos metabólitos voláteis produzidos pelos endófitos no tempo 0 e 3.

Tratamentos	Médias ¹ (mm)		Médias ¹ (mm)	
	t (0) ²	% Inibição (-) ou Crescimento (+)	t (3) ²	% Inibição (-) ou Crescimento (+)
Controle	15,00 e	0,00	25,00 g	0,00
Cr-1	14,00 c	- 6,67	23,00 f	- 8,00
Cr-2	18,60 g	+ 24,00	18,00 c	- 28,00
Cr-10	13,00 b	- 13,33	23,00 f	- 8,00
Cr-16	14,80 d	- 1,34	14,80 b	- 40,80
Cr-17	10,00 a	- 33,33	20,00 d	- 20,00
Cr-24	17,00 f	+ 13,33	27,00 h	+ 8,00
Cr-27	19,00 h	+ 26,66	27,10 h	+ 8,40
Cr-30	17,00 f	+ 13,33	27,00 h	+ 8,00
Cr-32	22,00 i	+ 46,66	0,00 a	- 100,00
Cr-39	29,00 n	+ 93,33	32,00 k	+ 28,00
Cr-40	25,00 k	+ 66,66	22,00 e	- 12,00
Cr-41	24,00 j	+ 60,00	28,00 i	+ 12,00
Cr-42	26,00 m	+ 73,33	28,00 i	+ 12,00
Cr-44	31,00 o	+ 106,66	29,00 j	+ 16,00
Cr-48	25,00 k	+ 66,66	28,00 i	+ 12,00
Cr-50	26,00 m	+ 73,33	27,00 h	+ 8,00
CV ³ (%)	0,00		0,00	

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de *Tukey* com 5% de significância. ²Tempo de crescimento do endófito antes de colocar a semente ³CV = Coeficiente de variação. Fonte: Autores, 2023.

De forma geral, os aleloquímicos produzidos pelos endófitos, influenciaram o desenvolvimento das plântulas de alfaca. O estímulo do crescimento da radícula e do caule das plântulas pode estar ligada ao caráter benéfico dos fungos endofíticos para a planta hospedeira. Enquanto a inibição do crescimento das plântulas pode estar ligada à produção de substâncias químicas capazes de alterar a síntese e a ação das enzimas. Segundo *Aschehouget al.* (2012), embora ainda de forma limitada, a indução química por fungos endofíticos pode afetar o potencial alelopático das plantas. Os fungos endofíticos podem produzir diferentes aleloquímicos ou estimular diferentes

níveis de produção aleloquímica da planta, os estudos também indicam que os endófitos podem melhorar um mecanismo competitivo existente ou fornecer outro mecanismo que funciona de maneira aditiva na espécie hospedeira.

Diversidade química

Estudos têm demonstrado que fungos endofíticos são fontes potentes de compostos bioativos, com ampla gama de aplicações, como promotores de crescimento de plantas e agroquímicos; e estruturalmente diversos e novos, pertencentes a várias classes, como flavonoides, alcaloides, esteroides, polifenóis, terpenóides e taninos (Raiet *al.*, 2021). Podemos destacar na Tabela 4 que os endófitos Cr-1, Cr-4 e Cr-46 apresentaram maior rendimento comparando-se com os demais fungos, vale ressaltar que cada fungo possui condições ótimas de cultivo, o que está diretamente ligada ao seu desenvolvimento e produção de compostos, neste estudo todos os fungos foram cultivados sob mesmas condições.

Tabela 4: Rendimento total dos extratos brutos obtidos dos fungos endofíticos

Extratobruto	Rendimento (mg)	Extratobruto	Rendimento (mg)
Cr-1	324,0	Cr-12	7,1
Cr-2	99,2	Cr-13	162,8
Cr-4	497,2	Cr-14	27,1
Cr-5	91,8	Cr-15	22,0
Cr-6	108,6	Cr-17	227,2
Cr-7	99,8	Cr-29	103,2
Cr-8	119,0	Cr-34	222,6
Cr-9	42,6	Cr-37	220,0
Cr-10	150,0	Cr-39	216,0
Cr-11	56,8	Cr-46	407,6

Fonte: Autores, 2023.

Na CCDC foi possível observar diferentes manchas com diferentes fatores de retenção para os extratos brutos, isso pode estar relacionado com a alta produtividade de metabólitos secundários dos fungos endofíticos. Todos os extratos brutos foram submetidos a avaliação do perfil cromatográfico por CLAE. Os cromatogramas dos extratos brutos Cr-01, Cr-02, Cr-06, Cr-07, Cr-08, Cr-09, Cr-10, Cr-15, Cr-29, Cr-34, Cr-37, Cr-39, e Cr-46, apresentaram diferentes picos com diferentes tempos de retenção, sugerindo uma produção variada de metabólitos secundários, variando de alta até baixa polaridade (figura S6, material suplementar). Já para os extratos brutos Cr-04 e Cr-05, Cr-11 e Cr-12, Cr-13 e Cr-14, os cromatogramas apresentaram picos semelhantes, com o mesmo tempo de retenção, ou seja, considera-se que possa se tratar do mesmo fungo ou fungos do mesmo gênero.

Todos os extratos brutos obtidos foram submetidos ao ensaio para identificar as classes de metabólitos secundários presentes. Todos os extratos brutos apresentaram resultados positivos para as

classes de flavonas, flavonóis e xantonas, positivo também para flavanonas, esteroides e triterpenóides.

Nos resultados para o ensaio de atividade antioxidante, todos os extratos brutos testados apresentaram atividade antioxidante positiva sobre o radical livre DPPH. A atividade antioxidante observada para os extratos brutos pode estar associada a presença de flavonas, flavonóis e xantonas, estes compostos são descritos como possuindo atividade antioxidante (Stagos 2020). Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, ou seja, possuem um papel importante na adaptação das plantas aos seus ambientes tendo uma boa interação com os diferentes ecossistemas. Os compostos fenólicos e flavonoides são potenciais captadores de radicais livres, principalmente ao Oxigênio singlete, portanto, existe uma estreita correlação entre a quantidade de compostos fitoquímicos, sua atividade antioxidante e sua atividade antitumoral e anticancerígena (Gobbo-Neto e Lopes, 2007; Palanichamy *et al.*, 2018).

De acordo com Pontes e colaboradores (2018) as propriedades antioxidantes e farmacológicas de plantas e microrganismos geralmente estão relacionadas com a presença de compostos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos e flavonoides. A capacidade antioxidante desses compostos é atribuída principalmente às suas propriedades redutoras de óxidos, permitindo que eles atuem como agentes redutores, doadores de Hidrogênio livre (H^+) e supressores de Oxigênio singlete, e atuam em sinergismo com outros antioxidantes como as vitaminas C e E, preservando as biomoléculas e DNA e RNA.

CONCLUSÃO

Foram isolados cinquenta e três fungos endofíticos de *Cochlospermum regium* indicando uma diversidade de fungos presentes nesta espécie vegetal. Todos os fungos endofíticos isolados foram submetidos ao ensaio de antagonismo, os fungos Cr-40, Cr-42 e Cr-50 apresentaram inibição de crescimento dos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Culvularialunatae* *Bipolarisoryzae*. Considerando-se os resultados obtidos neste trabalho, podemos afirmar que os isolados têm um enorme potencial biotecnológico para ser usado no controle biológico de doenças de plantas. Dezesesseis fungos endofíticos foram submetidos ao ensaio de atividade alelopática, os que apresentaram melhores resultados foram Cr-1, Cr-2, Cr-10, Cr-16, Cr-17, Cr-32 e Cr-40, destacando-se o Cr-32 que inibiu completamente a germinação das sementes de alface, sendo um fungo com potencial biotecnológico para uso no biocontrole de ervas daninhas.

A identificação das classes de metabólitos, flavonas, flavonóis, xantonas, esteroides e triterpenóides podem estar relacionados à atividade antioxidante evidenciada pelos extratos brutos. Os compostos antioxidantes desempenham um papel importante na adaptação das plantas ao ambiente, dessa forma os endófitos presentes na espécie hospedeira *C. regium* podem ajudá-la na adaptação e protegem a planta de estresse oxidativo e contra fitopatógenos.

AGRADECIMENTO

O desenvolvimento desta pesquisa contou com benefícios do Programa Institucional de Produtividade em Pesquisa da UFT (PROPESQ/ UFT). Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelas bolsas de estudo.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

ALBERTO, R. N.; RAVELY CASSAROTI, R.; ALMEIDA, T. T.; PAMPHILE, J. A. Identificação molecular de fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum*. In: VII EPCC - Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar, 2011, Maringá. **Anais eletrônicos**. 2011.

ASCHEHOUG, E.T.; METLEN, K.L.; CALLAWAY, R.M.; NEWCOMBE, G. Fungal endophytes directly increase the competitive effects of an invasive forb. **Ecology**, v. 93, n. 1, p. 3–8, 2012.

ARAUJO, W. L.; LACAVA, P. T.; MARCON, J.; LIMA, A. O. S.; SOBRAL, J. K.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALO, 2010.

ARUNACHALAM, K.; DAMAZO, A.S.; PAVAN, E.; OLIVEIRA, D.M.; FIGUEIREDO, F.F.; MACHADO, M.T.M.; BALOGUN, S.O.; SOARES, I.M.; BARBOSA, R.S.; ALVIM, T.C.; ASCENCIO, S.D.; MARTINS, D.T.O. *Cochlospermum regium* (Mart. ex Schrank) Pilg.: Evaluation of chemical profile, gastroprotective activity and mechanism of action of hydroethanolic extract of its xylopodium in acute and chronic experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 101–114, 2019.

ANTAR, G.M.; LOZANO, E.D.; SANO, P.T. Bixaceae do Estado do Paraná, Brasil. **Hoehnea**, v. 47, n. 4:e672019, 2020.

ARRUDA, G. L. Sensibilidade da técnica de PCR na caracterização e detecção de *Fusarium verticillioides* em sementes de milho. Gurupi, TO. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Graduação - Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2017.

ARRUDA, G.L.; MORAIS, G.K.A.; CHAGAS JR., A.F.; ARAUJO, A.R.; CHAPLA, V.M. Aromatic compounds from the endophytic fungus *Asordaria conoidea* and their allelochemical property using OSMAC strategy. **Natural Products Research**, v. 36, n. 15, p. 3999-4002, 2022.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. 235-268. In: Serafini, L. A.; Barros, N. M.; Azevedo, J. L. **Biotechnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul, EDUCS, p. 235–268, 2002.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. **Ecologia Microbiana**. Embrapa-CNPMA: Jaguariúna, p. 117–137, 1998.

BARBOSA, W.L.R. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. **Revista Científica da UFPA**, v. 4, p. 1-19, 2004.

BOAES, T.S.; ARRUDA, G.L.; FERREIRA, T.P.S.; CHAGAS JUNIOR, A.F.; CHAPLA, V.M. Variação da produção metabólica do fungo endofítico *Diaporthesp.* Isolado de *Clitoria guianensis* Benth utilizando OSMAC. **Periódico Tchê Química**. v. 16, n. 32, p. 870 – 877, 2019.

CAMILLO, J.; MARTINS, R.C.; GUARIM NETO, G.; GULIAS, A.P.S.M.; FILGUEIRAS, A.D.; COSTA, L.C. da; SILVA, D.B. da. *Cochlospermum regium*: algodão-do-campo. In: VIEIRA, R.F.; CAMILLO, J.; CORADIN, L. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Centro-Oeste**. 1.160 p. (Série Biodiversidade; 44). p. 717-730. Brasília, DF: MMA, 2016.

CHAPLA, V.M.; BIASETTO, C.R.; ARAUJO, A.R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v.5, n.3 p. 421-437, 2013.

CHAPLA, V.M.; ZERAIK, M.L.; XIMENES, V.F.; ZANARDI, L.M.; LOPES, M.N.; CAVALHEIRO, A.J.; SILVA, D.H.; YOUNG, L.M.F.; BOLZANI, V.S.; ARAUJO, A.R. Bioactive Secondary Metabolites from *Phomopsis* sp., an Endophytic Fungus from *Senna spectabilis*. **Molecules**, v. 19, p. 6597-6608, 2014.

CHEN, J.L., SUN, S.Z., MIAO, C.P., WU, K., CHEN, Y.W., XU, L.H., GUAN, H.L.; ZHAO, L.X. Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: A promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. **Journal of Ginseng Research**, v. 40, n. 4 p. 315 - 324, 2016.

CRUZ, J.S.; SILVA, C.A.; HAMERSKI, L. Natural Products from Endophytic Fungi Associated with Rubiaceae Species. **Journal Fungi**, v. 6, n. 3, p. 128, 2020.

DANTAS, S.B.S.; MORAES, G.K.A.; ARAUJO, A.R.; CHAPLA, V.M. Phenolic compounds and bioactive extract produced by endophytic fungus *Corioloopsis rigida*. **Natural Product Research**, 2023.

GALVÃO, F.; SANTOS, E.; DANTAS, F.G.S.; SANTOS, J.I.S.; SAUDA, T.P.C.; SANTOS, A.C.; SOUZA, R.I.C.; PINTO, L.S.; MORAES, C.A.F.; SANGALLI, A.; KASSUYA, C.A.L.; NOGUEIRA, C.R.; OLIVEIRA, K.M.P. Chemical composition and effects of ethanolic extract and gel of *Cochlospermum regium* (Schrank) Pilg. Leaves on inflammation, pain, and wounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 302, p.115881, 2023.

GAVILAN, N.H.; FURLAN, F.C.; ZOZ, A.Z.; OLIVEIRA, L.S.; CAMPOS, W.F.; BRONDANI, G.E. Chemical sterilization of culture medium for in vitro multiplication of *Cochlospermum regium*. **Ciência Rural**, v.48 n. 09: e20170581, 2018.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374 - 381, 2007.

GOUDA, S.; DAS, G.; SEN, S. K.; HAN-SEUNG SHIN, H. S.; PATRA, J. K. Endophytes: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal Importance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1538, 2016.

GRABKA, R.; D'ENTREMONT, T.W.; ADAMS, S.J.; WALKER, A.K.; TANNEY, J.B.; ABBASI, P.A.; ALI, S. Fungal Endophytes and Their Role in Agricultural Plant Protection against Pests and Pathogens. **Plants**, v. 11, p. 1, 2022.

- Moraes et al, 2023_ATIVIDADE ANTAGONISTA, ALELOPÁTICA E DIVERSIDADE QUÍMICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Cochlospermum regium* L.
- GUPTA, S.; CHATURVEDI, P.; KULKARNI, M. G.; STADEN, J. V. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. **Biotechnology Advances**, v.39, p. 107462, 2020.
- HUANG, L.Q.; NIU, Y.C.; SU, L.; DENG, H.; LYU, H. The Potential of Endophytic Fungi Isolated from Cucurbit Plants for Biocontrol of Soilborne Fungal Diseases of Cucumber. **MicrobiologyResearch**, v. 231, p. 126369, 2020.
- LOPES, J.C.; CHAGAS JR., A.F.; NEVES, A.C.C.; CHAPLA, V.M.; BATISTELLA, C.A.R. Fungos endofíticos isolados do capim citronela e seleção de antagonistas a fitopatógenos. **Biota Amazônica**, v. 7, n. 3, p. 84-88, 2017.
- MACÍAS-RUBALCAVA, M.L.; HERNANDEZ-BAUTISTA, B.E.; OROPEZA, F.; DUARTE, G.; GONZALES, M.C.; GLENN, A.E.; HANLIN, R.T.; ANAYA, A.L. Allelochemical Effects of Volatile Compounds and Organic Extracts from *Muscodoryucatanensis*, a Tropical Endophytic Fungus from *Bursera simaruba*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, p. 1122-1131, 2010.
- MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 1, p. 369- 409, 1993.
- MENEZES-FILHO, A. C. P.; SOUZA, W. C.; CHRISTOFOLI, M.; CASTRO, C. F. S. Perfil químico e atividade antioxidante e antifúngica do óleo essencial da flor de *Cochlospermum regium* (Mart. Ex Schrank.)-Pier. (Bixaceae). **Colloquium Agrariae**, v. 16, n. 4, p. 89 – 101, 2020.
- MORAES, G. K. A. Estudo do potencial bioherbicida do fungo endofítico *Phomopsis* Sp. isolado de *Cochlospermum regium*. Gurupi, TO. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Tocantins, 2020.
- OLIVEIRA, A. K. M.; PEREIRA, K.C.L.; MULLER, J.A.L.; MATIAS, R. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteriaramiflorana* germinação de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 41-47, 2014.
- PALANICHAMY, P.; KRISHNAMOORTHY, G.; KANNAN, S.; MARUDHAMUTHU, M. Bioactive potential of secondary metabolites derived from medicinal plant endophytes. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 4, p. 303 – 312, 2018.
- PAULA, S.; CANTELLI, V.C.; SILVA, C.B.; CAMPOS, R.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. Atividade alelopática do extrato e frações das folhas de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n.1, p. 47-52, 2014.
- PONTES, F.C.; ABDALLA, V.C.P.; IMATOMI, M.; FUENTES, L.F.G.; GUALTIERI, S.C.J. Antifungal and antioxidant activities of mature leaves of *Myrcia splendens* (Sw.) DC. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n.1, p. 127-132, 2018.
- RAI, N.; KESHRI, P.K.; VERMA, A.; KAMBLE, S.C.; MISHRA, P.; BARIK, S.; SINGH, S.K.; GAUTAM, V. Plant associated fungal endophytes as a source of natural bioactive compounds. **Mycology**, v. 12, n. 3, p. 139–159, 2021.
- RAJAMANIKYAM, M.; VADLAPUDI, V.; AMANCHY, R.; UPADHYAYULA, M.S. REICHERT, F.W.J. Controle de plantas daninhas e seletividade a culturas pela aplicação de isolados fúngicos. Erechim, RS. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal da Fronteira Sul, 2017.

Moraes et al, 2023_ATIVIDADE ANTAGONISTA, ALELOPÁTICA E DIVERSIDADE QUÍMICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Cochlospermum regium* L.

RIBEIRO, A.S.; PAMPHILE, J.A. Microrganismos endofíticos e seu potencial biotecnológico. **Revista UNINGÁ Review**, v. 29, n. 3, p. 88-93, 2017.

SANTOS, T.T. DOS; VARAVALLLO, M.A. Aplicação de Microrganismos Endofíticos Na Agricultura e Na Produção de Substâncias de Interesse Econômico. **Semin. Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, p. 199–212, 2011.

SILVA-VALDERRAMA, I.; TOAPANTA, D.; MICCONO, M. DE LOS A.; LOLAS, M.; DÍAZ, G. A.; CANTU, D.; CASTRO, A. Biocontrol Potential of Grapevine Endophytic and Rhizospheric Fungi Against Trunk Pathogens. **Frontiers of Microbiology**, v.11, p. 1, 2021.

SIMÕES-PIRES, C. A., QUEIROZ, E. F., HENRIQUES, A. T., & HOSTETTMANN, K. Isolation and on-line identification of anti-oxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 5, p. 307–314, 2005.

SOLON, S.C.; BRANDÃO, C.A.; GARDINI, L.F.; MACEDO, M.S.; KLEIN, A.; DIAS-JUNIOR, C.A.; SIQUEIRA, J.M. Phenolic derivatives and other chemical compounds from *Cochlospermum regium*. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1169-1172, 2012.

STAGOS, D. Antioxidant activity of polyphenolic plant extracts. **Antioxidants**, v. 9, n. 1, p. 19 - 26, 2020.

TORRES, M.D.; ORTEGA, H.E.; CUBILLA-RIOS, L. Patents on endophytic fungi related to secondary metabolites and biotransformation applications. **Journal Fungi**, v. 6, n. 2, p. 58, 2020.

ZIMMERMAN, N.B., VITOUSEK, P.M., 2012. Fungal endophyte communities reflect environmental structuring across a Hawaiian landscape. **Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.**, v. 109, p. 13022–13027, 2012.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Atividade antagonista, alelopática e diversidade química de fungos endofíticos isolados de *Cochlospermum regium* L.

GleysKellen Aquino Moraes¹, Vanuza de Sales Carneiro¹, Daniela Francisca Soares², Aloisio Freitas Chagas Junior³, Vanessa Mara Chapla^{1,2*}

¹Colegiado de Ciências Exatas e Biotecnológicas, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO

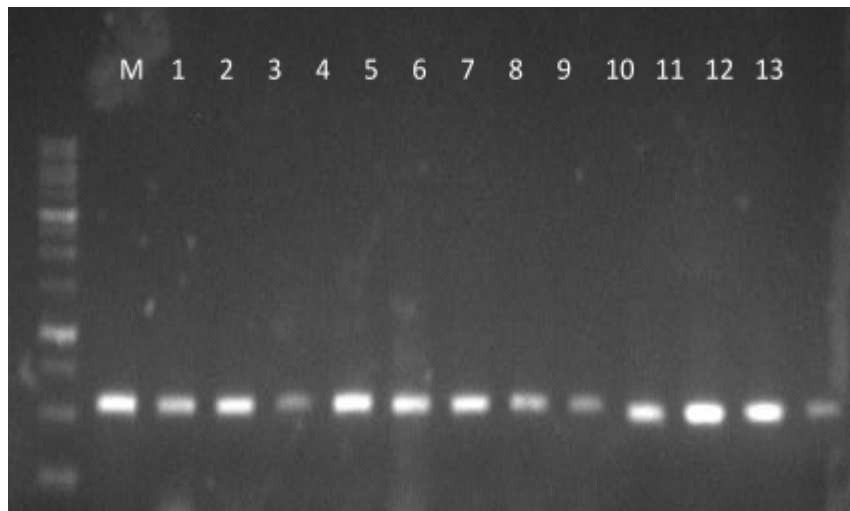
²Programa de pós-graduação em Química, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO

³Engenharia Agrônômica, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi-TO

*Autor correspondente: vmchapla@mail.uft.edu.br

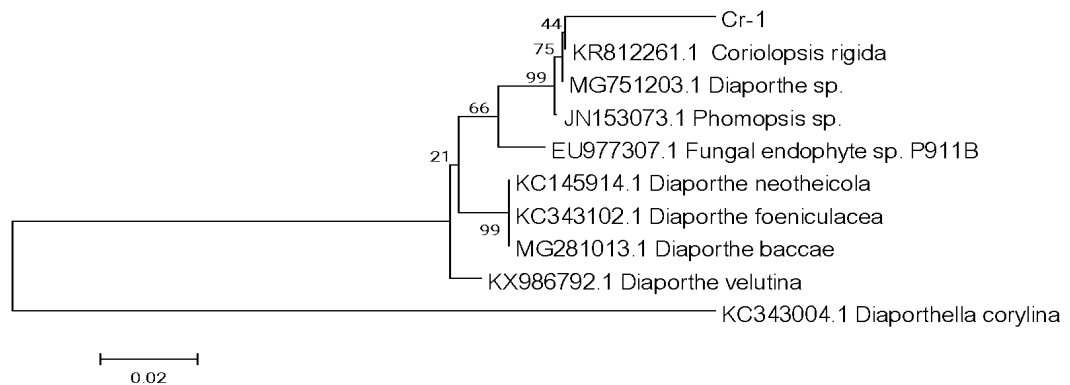
SUMÁRIO

Figura S1- Resultado da Amplificação por PCR dos endofíticos*.	1
Figura S2 - Árvore filogenética obtida a partir da sequência da região ITS do isolado Cr-1.	1
Figura S3 - Árvore filogenética obtida a partir da sequência da região ITS do isolado Cr-32.	2
Figura S4 - Árvore filogenética obtida a partir da sequência da região ITS do isolado Cr-41.	2
Figura S5 - Árvore filogenética obtida a partir da sequência da região ITS do isolado Cr-44.	3
Figura S6- Cromatogramas dos extratos brutos obtido dos fungos endofíticos.	4
Tabela S1 – Média do confronto direto de fungos endofíticos com o fitopatógeno <i>Fusarium oxysporum</i> em 2 e 7 dias.	10
Tabela S2 – Média do confronto direto de fungos endofíticos com o fitopatógeno <i>Bipolaris oryzae</i> em 2 e 7 dias.	11
Tabela S3 – Média do confronto direto de fungos endofíticos com o fitopatógenos <i>Curvularia lunata</i> em 2 e 7 dias.	12
Tabela S4 – Porcentagem da germinação das sementes de alface frente aos fungos endofíticos.	13



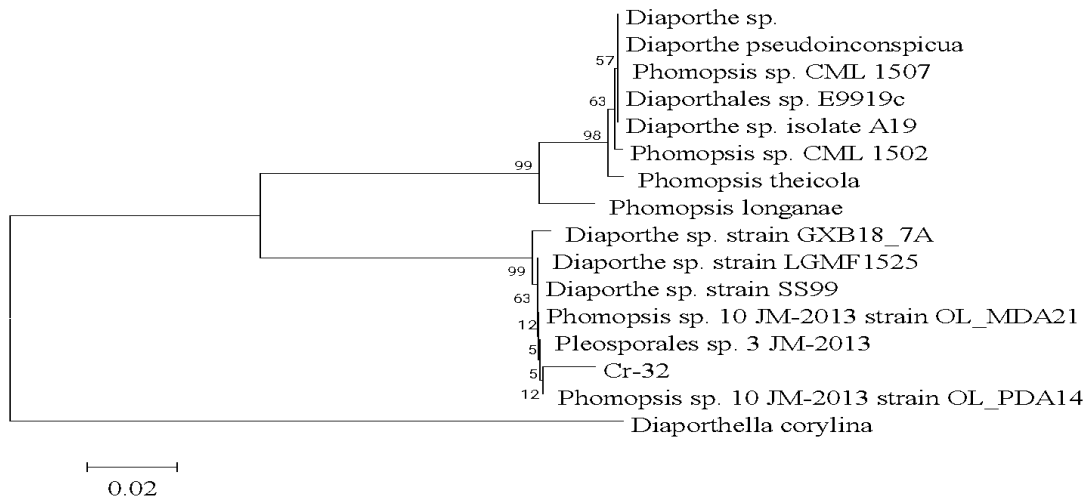
Fonte: elaboração do próprio autor

Figura S1: Resultado da Amplificação por PCR dos endofítos. Coluna M- Marcador de peso molecular (1 Kb), coluna 1 - Cr-1, coluna 2 - Cr-2, coluna 3- Cr-10, coluna 4- Cr-16, coluna 5- Cr-17, coluna 6- Cr-24, coluna 7- Cr-27, coluna 8- Cr-30, coluna 9- Cr-32, coluna 10- Cr-41, coluna 11- Cr-44, coluna 12- Cr-48 e coluna 13-Cr-50.



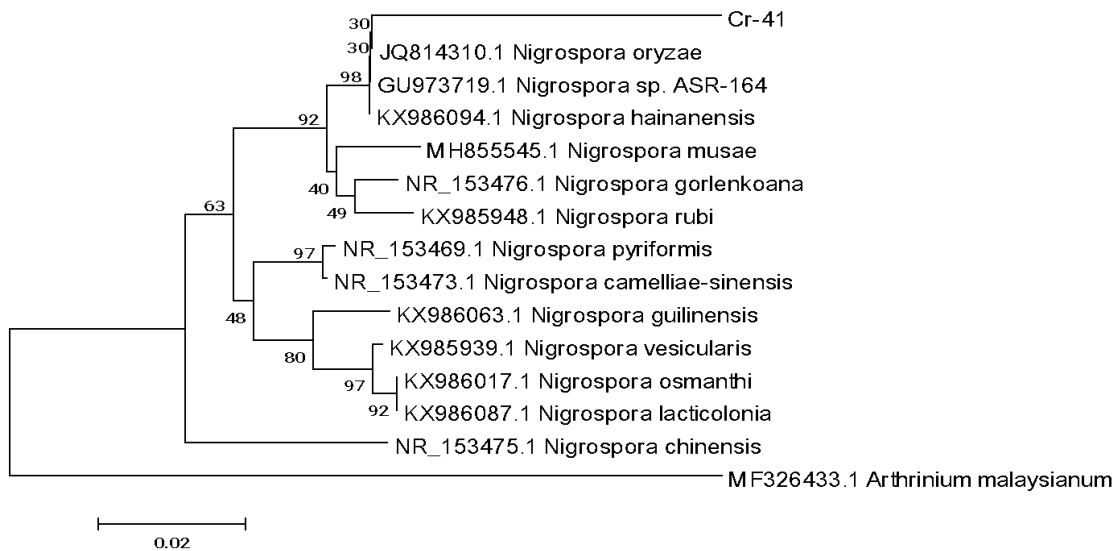
Fonte: elaboração do próprio autor

Figura S2:Árvore filogenética obtida a partir da sequência da região ITS do isolado Cr-1.



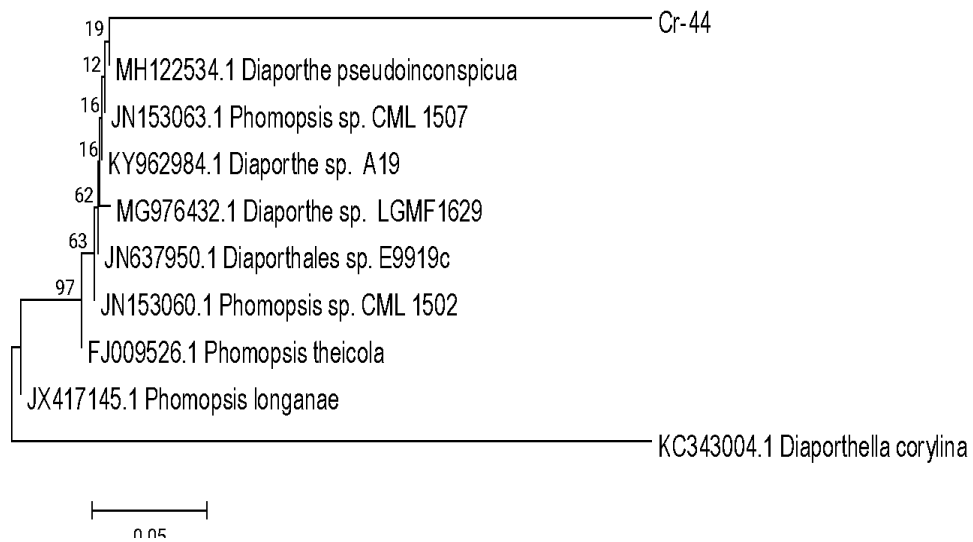
Fonte: elaboração do próprio autor

Figura S3: Árvore filogenética obtida a partir da sequência da região ITS do isolado Cr-32.



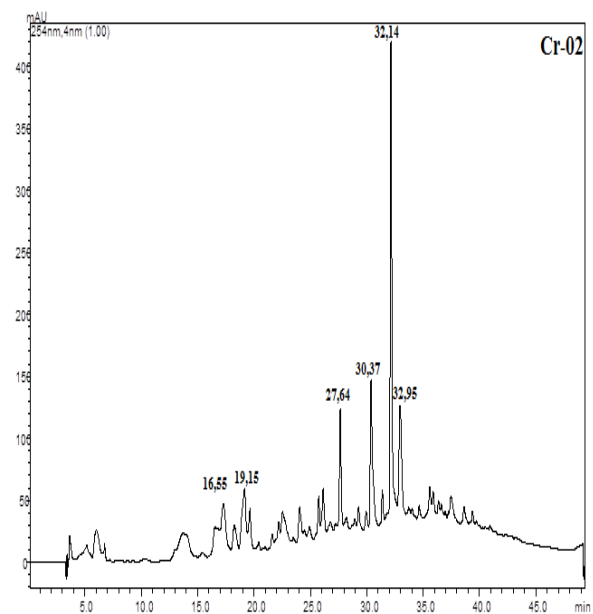
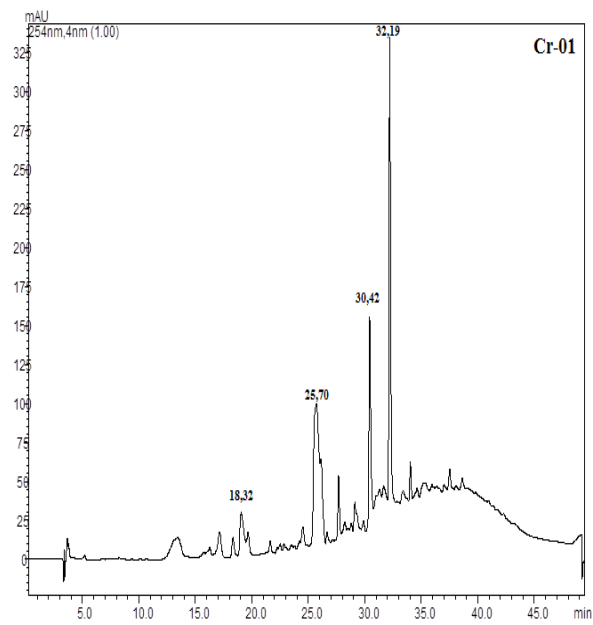
Fonte: elaboração do próprio autor

Figura S4:Árvore filogenética obtida a partir da sequência da região ITS do isolado Cr-41.



Fonte: elaboração do próprio autor

Figura S5:Árvore filogenética obtida a partir da sequência da região ITS do isolado Cr-44.



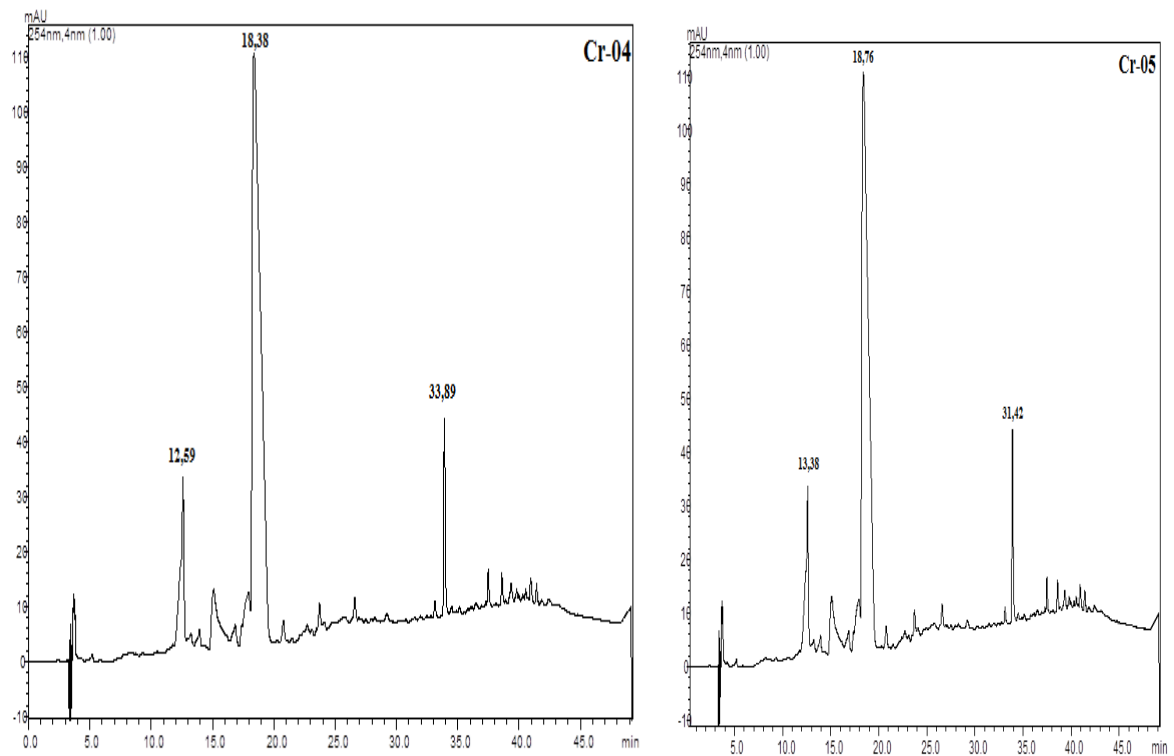
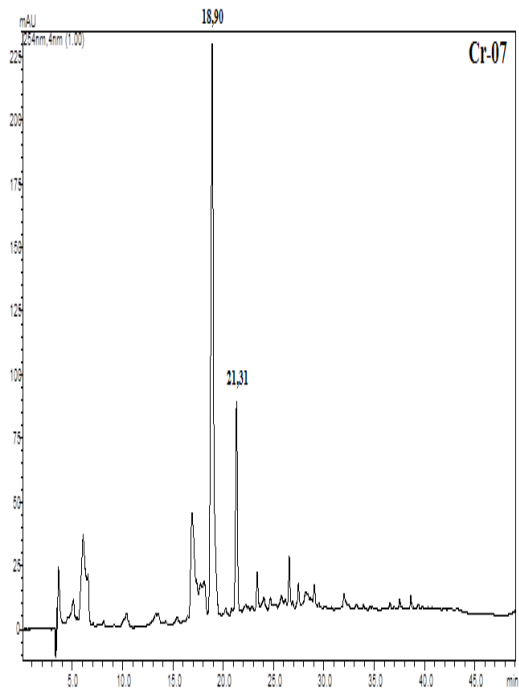
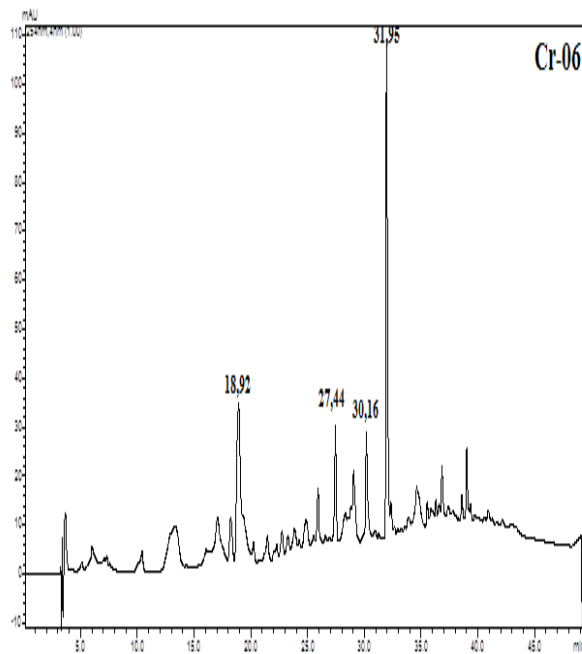
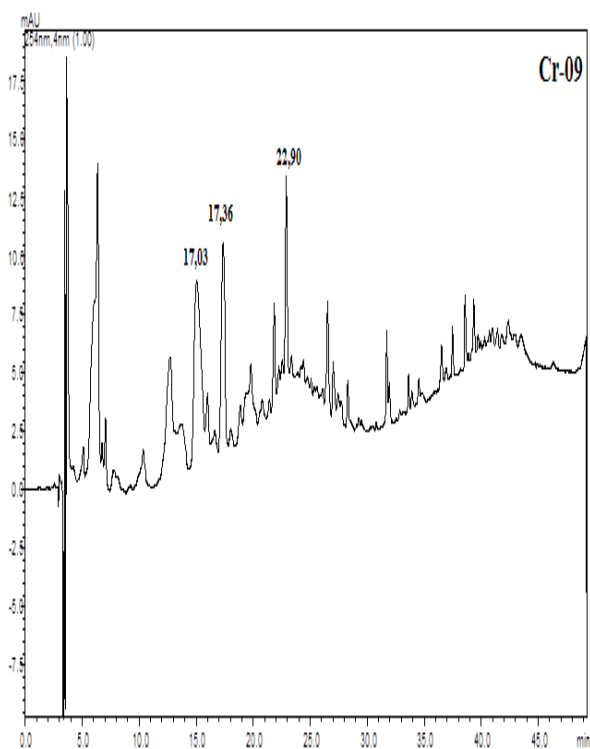
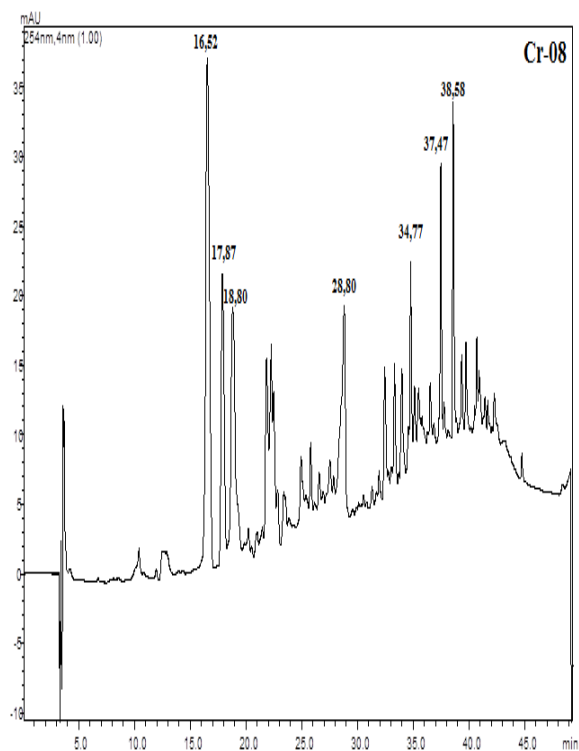


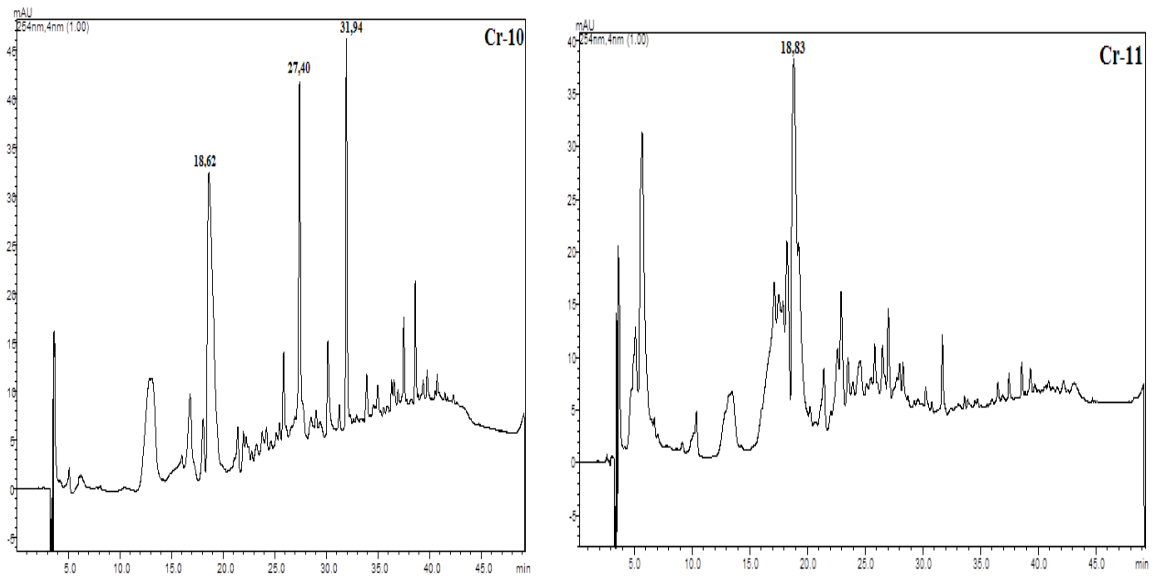
Figura S6. Cromatogramas dos extratos brutos obtido dos fungos endofíticos (VANUZA, 2018).

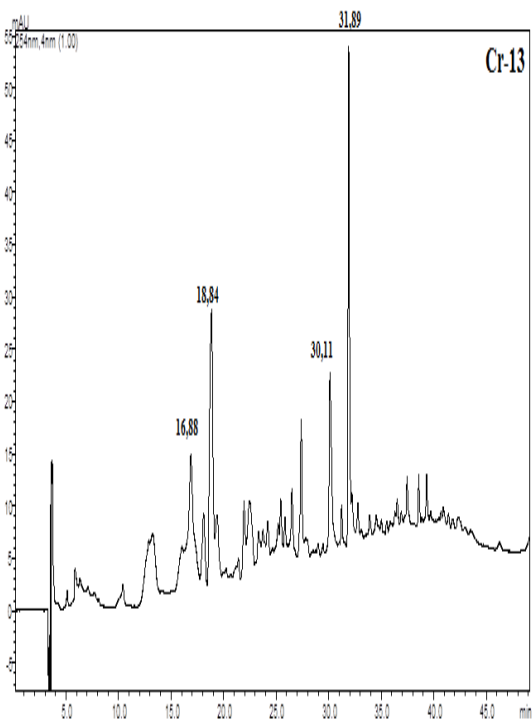
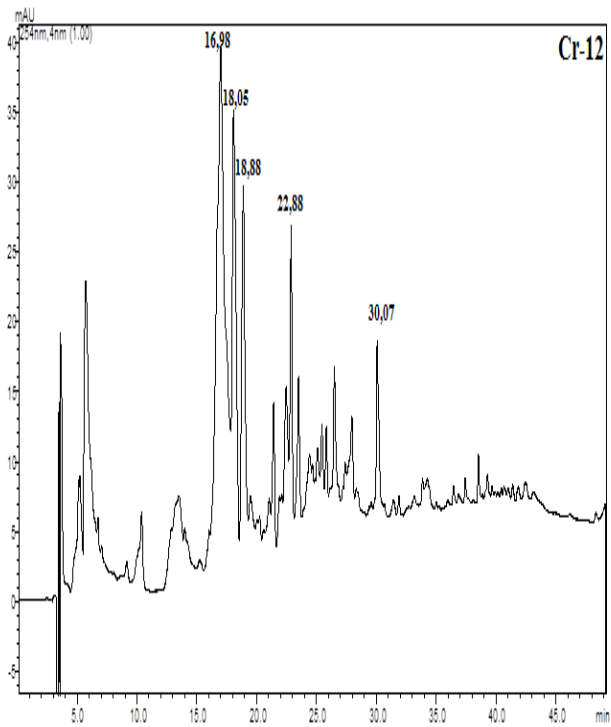
Continuação Figura S6



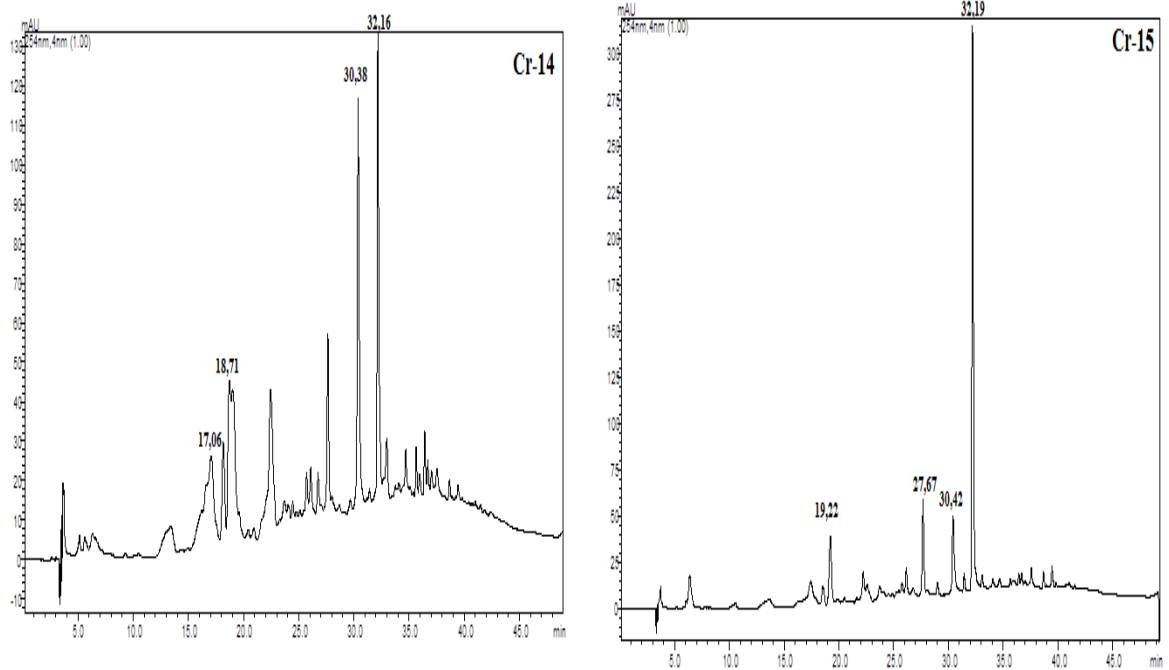


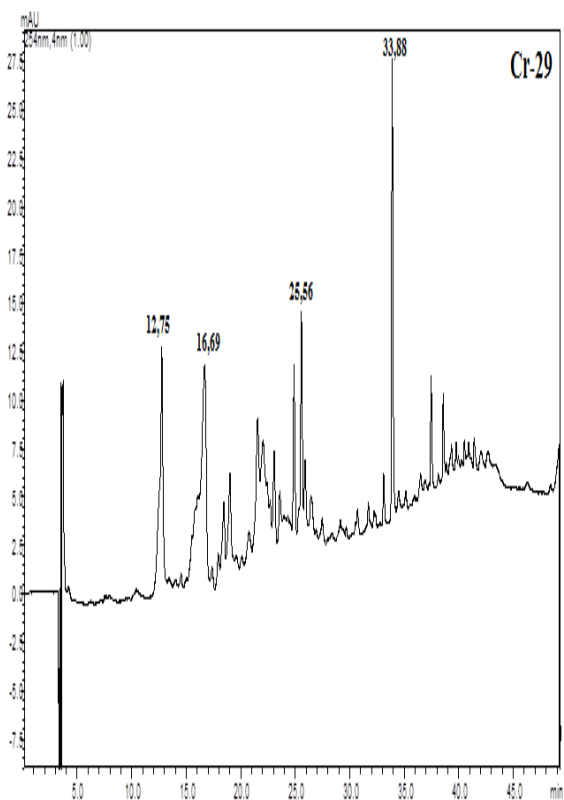
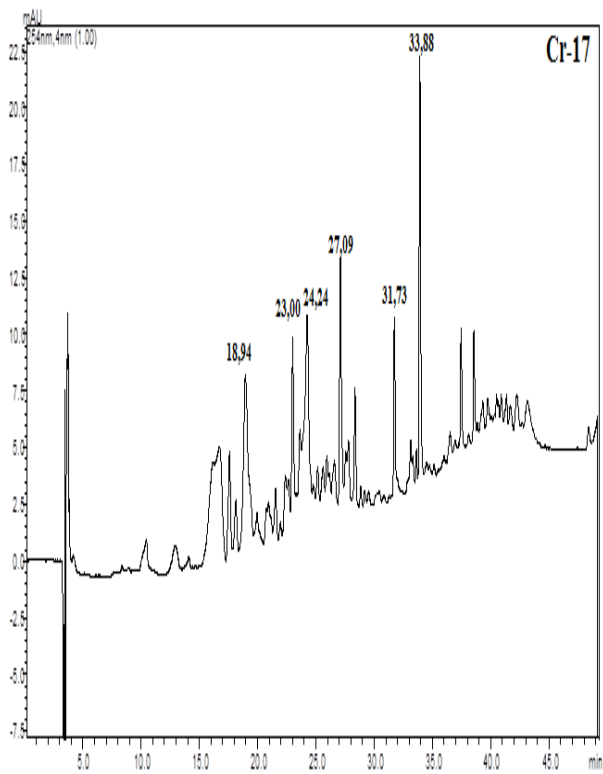
Continuação Figura S6



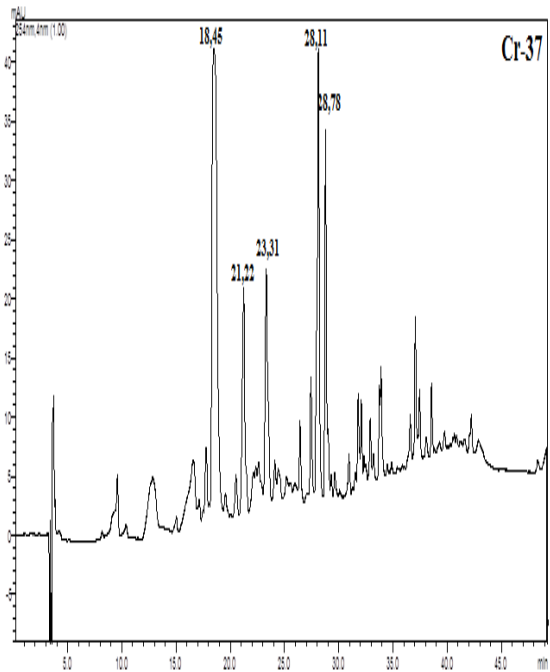
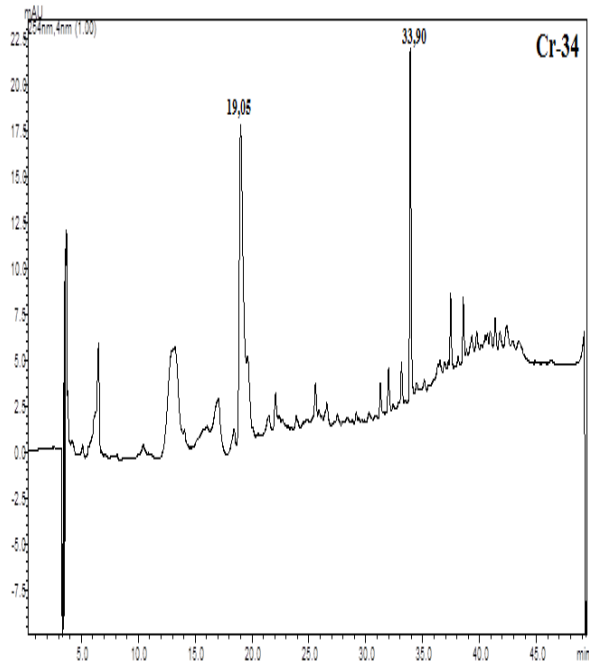


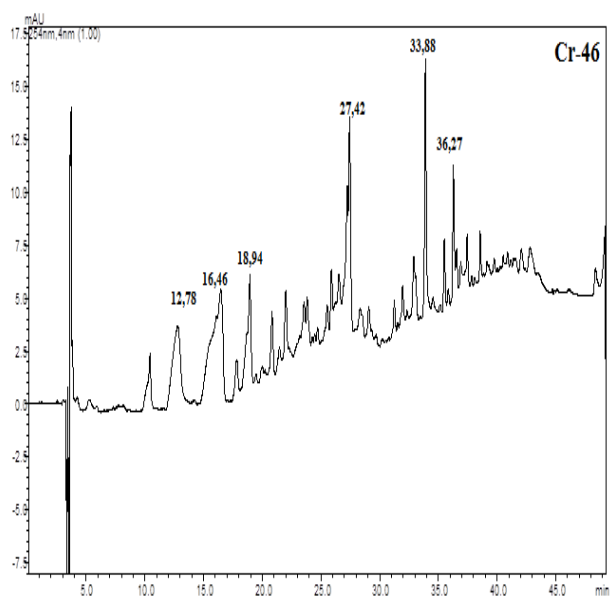
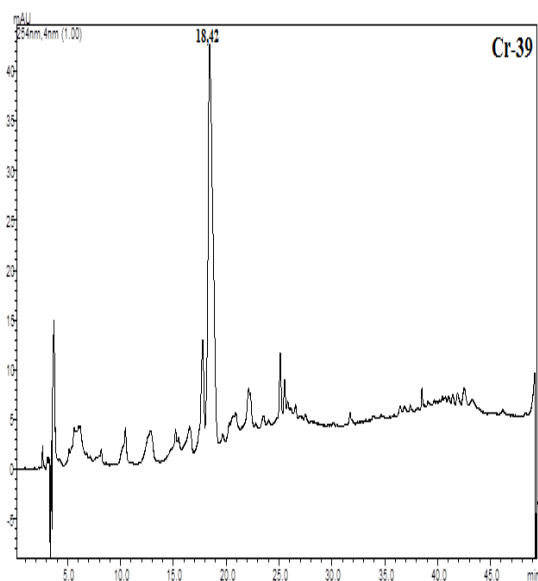
Continuação Figura S6





Continuação Figura S6





Fonte: elaboração do próprio autor

Tabela S1: Média do confronto direto de fungos endofíticos com o fitopatógeno *Fusarium oxysporum* em 2 e 7 dias.

Tratamentos	2 dias	Tratamentos	7 dias
	Médias ¹ (mm)		Médias ¹ (mm)
Controle	67,00 c	Controle	78,33 e
Cr-4	28,00 a	Cr-1	72,33 d
Cr-7	34,23 a	Cr-2	52,77 b
Cr-8	50,00 b	Cr-3	47,66 a
Cr-9	37,10 a	Cr-5	47,99 a
Cr-16	62,00 c	Cr-6	48,88 a
Cr-17	61,00 c	Cr-10	68,33 b
Cr-18	46,44 b	Cr-11	47,77 a
Cr-19	43,03 b	Cr-12	46,22 a
Cr-20	52,77 b	Cr-13	62,33 c
Cr-21	38,67 a	Cr-14	59,33 c
Cr-22	39,33 a	Cr-15	60,11 c
Cr-23	42,77 b	Cr-26	53,11 b
Cr-24	47,47 b	Cr-29	49,22 a
Cr-25	47,23 b	Cr-34	63,22 c
Cr-27	53,67 b	Cr-39	68,22 d
Cr-28	36,37 a	Cr-41	75,33 e
Cr-30	33,77 a	Cr-46	55,88 b
Cr-31	38,55 a	Cr-47	63,22 c
Cr-32	47,44 b	Cr-48	61,77 c
Cr-33	48,55 b	Cr-49	55,77 b
Cr-35	38,44 a	Cr-51	48,00 a
Cr-36	47,11 b	Cr-52	48,00 a
Cr-37	45,89 b	Cr-53	46,77 a
Cr-38	49,11 b		
Cr-40	77,57 d		
Cr-42	75,89 d		
Cr-43	45,33 b		
Cr-44	54,44 b		
Cr-45	49,11 b		
Cr-50	75,33 d		
CV (%) ²	18,53	CV (%) ²	5,08

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. ²CV = Coeficiente de variação.

Tabela S2. Média do confronto direto de fungos endofíticos com o fitopatógeno *Bipolarisoryzae* em 2 e 7 dias.

Tratamentos	2 dias	Tratamentos	7 dias
	Médias ¹ (mm)		Médias ¹ (mm)
Controle	45,66 b	Controle	64,44 d
Cr-4	30,55 a	Cr-1	43,11 a
Cr-7	33,66 a	Cr-2	65,55 d
Cr-8	29,00 a	Cr-3	44,66 a
Cr-9	34,55 a	Cr-5	49,55 b
Cr-10	54,00 b	Cr-6	47,77 a
Cr-16	34,33 a	Cr-11	43,44 a
Cr-17	42,00 b	Cr-12	47,23 a
Cr-18	32,55 a	Cr-13	54,00 b
Cr-19	37,44 a	Cr-14	53,11 b
Cr-20	38,99 a	Cr-15	53,44 b
Cr-24	48,66 b	Cr-21	43,00 a
Cr-27	53,67 b	Cr-22	42,22 a
Cr-28	33,22 a	Cr-23	45,66 a
Cr-30	49,88 b	Cr-25	46,22 a
Cr-31	41,77 b	Cr-26	41,11 a
Cr-32	45,33 b	Cr-29	49,11 b
Cr-33	43,88 b	Cr-34	58,00 c
Cr-35	42,00 b	Cr-39	58,44 c
Cr-36	40,00 a	Cr-41	75,22 e
Cr-37	35,88 a	Cr-47	58,11 c
Cr-38	42,11 b	Cr-48	62,33 d
Cr-40	71,22 c	Cr-49	48,11 a
Cr-42	77,55 c	Cr-51	51,66 b
Cr-43	38,66 a	Cr-52	52,66 b
Cr-44	45,66 b	Cr-53	44,55 a
Cr-45	44,88 b		
Cr-46	32,00 a		
Cr-50	72,88 c		
CV (%) ²	14,42	CV (%) ²	7,71

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. ²CV = Coeficiente de variação.

Tabela S3: Média do confronto direto de fungos endofíticos com o fitopatógenos*Curvularialunata* em 2 e 7 dias.

Tratamentos	2 dias	Tratamentos	7 dias
	Médias ¹ (mm)		Médias ¹ (mm)
Controle	48,11 f	Controle	65,55 d
Cr-4	29,77 b	Cr-1	50,66 b
Cr-7	28,77 b	Cr-2	54,66 c
Cr-8	21,00 a	Cr-3	45,33 a
Cr-9	31,66 c	Cr-5	48,33 b
Cr-16	32,22 c	Cr-6	45,44 a
Cr-17	36,33 d	Cr-10	51,88 b
Cr-18	36,22 d	Cr-11	42,88 a
Cr-20	36,22 d	Cr-12	47,00 b
Cr-24	49,44 f	Cr-13	47,55 b
Cr-27	50,66 f	Cr-14	55,33 c
Cr-28	32,88 c	Cr-15	58,55 c
Cr-30	46,00 e	Cr-19	35,55 a
Cr-31	34,11 c	Cr-21	43,55 a
Cr-32	41,66 e	Cr-22	46,66 b
Cr-33	43,88 e	Cr-23	46,22 b
Cr-35	37,66 d	Cr-25	46,66 b
Cr-36	40,44 e	Cr-26	41,00 a
Cr-37	29,66 b	Cr-29	48,77 b
Cr-38	45,11 e	Cr-34	51,44 b
Cr-40	73,55 g	Cr-39	58,44 c
Cr-42	77,00 g	Cr-41	74,77 e
Cr-43	43,88 e	Cr-46	56,22 c
Cr-44	54,44 f	Cr-47	58,55 c
Cr-45	45,44 e	Cr-48	62,88 c
Cr-50	78,11 g	Cr-49	51,77 b
		Cr-51	51,33 b
		Cr-52	45,44 a
		Cr-53	44,77 a
CV (%) ²	6,19	CV (%) ²	5,08

¹Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. ²CV = Coeficiente de variação.

Tabela S4: Porcentagem da germinação das sementes de alface frente aos fungos endofíticos.

Tratamentos	Germinação (%)	
	t (0)	t (3)
Controle	100	100
Cr-1	100	100
Cr-2	100	80
Cr-10	100	100
Cr-16	100	60
Cr-17	100	100
Cr-24	100	100
Cr-27	100	100
Cr-30	100	100
Cr-32	100	0
Cr-39	100	100
Cr-40	100	100
Cr-41	100	100
Cr-42	100	100
Cr-44	100	100
Cr-48	100	100
Cr-50	100	100

t=tempo de crescimento do endófito na placa antes de colocar a semente.