

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS CASCAVEL
CENTRO DE CIENCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM ENGENHARIA AGRÍCOLA
RECURSOS HÍDRICOS E SANEAMENTO AMBIENTAL

FUNGOS ENDOFÍTICOS DE SOJA: DIVERSIDADE E PROSPECÇÃO ENZIMÁTICA

ANDRESSA CAROLINE FLORES

CASCAVEL – PARANÁ - BRASIL

2022

ANDRESSA CAROLINE FLORES

FUNGOS ENDOFÍTICOS DE SOJA: DIVERSIDADE E PROSPECÇÃO ENZIMÁTICA

Tese submetida à banca examinadora como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola, área de concentração: Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *campus* Cascavel.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciane Sene

CASCADEL – PARANÁ - BRASIL

2022

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste¹

Flores, Andressa Caroline
FUNGOS ENDOFÍTICOS DE SOJA: DIVERSIDADE E PROSPECÇÃO
ENZIMÁTICA / Andressa Caroline Flores; orientadora Luciane
Sene. -- Cascavel, 2022.
78 p.

Tese (Doutorado Campus de Cascavel) -- Universidade
Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Exatas e
Tecnológicas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola,
2022.

1. endossimbiontes. 2. enzimas. 3. celulase. 4. xilanase.
I. Sene, Luciane, orient. II. Título.

¹ Revisor de português, inglês e normas: Prof. Dr. José Carlos da Costa, em 08 de dezembro de 2022.

ANDRESSA CAROLINE FLORES

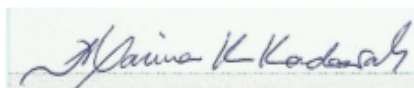
FUNGOS ENDOFÍTICOS DE SOJA: DIVERSIDADE E PROSPECÇÃO ENZIMÁTICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, linha de pesquisa Saneamento Ambiental, APROVADA pela seguinte banca examinadora:



Orientadora – Luciane Sene

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Campus Cascavel (UNIOESTE)



Marina Kimiko Kadowaki

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Campus Cascavel (UNIOESTE)



Ravelly Casarotti Orlandelli

Universidade Estadual de Maringá – (UEM)



Simone Damasceno Gomes

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Campus Cascavel (UNIOESTE)



Silvia Renata Machado Coelho

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Campus Cascavel (UNIOESTE)

Cascavel, 15 de setembro de 2022.

BIOGRAFIA

Andressa Caroline Flores, nascida em 10 de setembro de 1987, é natural do município de Toledo-PR. Durante a graduação em Ciências Biológicas - licenciatura (2005-2008), pela Universidade Paranaense, foi bolsista de projeto de Iniciação Científica por dois anos sob orientação da professora Dra. Izabel Aparecida Soares, através do qual participou de várias pesquisas na área de Microbiologia com fungos de potencial biotecnológico. No ano seguinte iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada pela Universidade Estadual de Maringá, obtendo o título de Mestre em Interações Orgânicas em 2011, sob orientação do professor Dr. Edmar Clemente (*in memoriam*) e coorientação do professor Dr. João Alencar Pamphile (*in memoriam*), tendo defendido a dissertação intitulada: “Metabólitos secundários do fungo endófito *Phomopsis longicolla* isolado de *Trichilia elegans* A. JUSS subsp. *elegans*: caracterização química e avaliação das atividades antimicrobiana e inseticida. No mesmo ano, ingressou na Indústria Farmacêutica Prati Donaduzzi (2011-2018), onde desempenhou cargos de analista pleno de laboratório e gestora de projetos laboratoriais. Em 2019, ingressou no curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná como bolsista (CAPES), sob orientação da professora Dra. Luciane Sene.

*There is a driving force more powerful than
steam, electricity and atomic energy: the will.*

Albert Einstein

Dedico com todo o meu amor e gratidão:

à minha mãe Berenice,
ao meu pai Claudemir (*in memoriam*),
a meu esposo Tiago e aos meus filhos Caio e Isis.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pela vida e por ter me conduzido a trilhar esse caminho. Sem Ele, nada disso seria possível.

Ao meu esposo Tiago, que esteve e está comigo em todos os momentos. Meu maior incentivador, parceiro, minha força, que também se doou muito para essa tese acontecer. Que está ao meu lado, todos os dias, para que realizemos nossos sonhos.

À minha mãe, que sempre acreditou, sonhou e vislumbrou que eu poderia chegar até aqui.

Também aos meus familiares, meus sogros Loiva e Juarez, meus cunhados Valéria e Ivan e meu irmão Roger, pelo incentivo, apoio e suporte durante toda a caminhada.

À minha orientadora, professora Dra. Luciane Sene, por ter depositado sua confiança em mim e, principalmente, por toda a atenção e disponibilidade dedicada a esse trabalho. Sou eternamente grata pelo quanto aprendi, vivi e me desenvolvi durante esses anos de doutorado sob sua orientação.

Aos alunos de iniciação científica Allana G. Sanoto e Rodrigo A. T. Takaes, pela ajuda e contribuição durante os experimentos.

À professora Marina Kimiko Kadowaki e ao professor José Luis da Conceição Silva, pela parceria na identificação molecular dos fungos e ao professor Flávio Gurgacz, pela gentileza em aceitar a parceria no NEEA.

Aos servidores da UNIOESTE: Sircéia e Edison, pela ajuda em determinados processos que precisei durante os experimentos em laboratório.

Às minhas amigas Leticia e Thays, pelo companheirismo durante as disciplinas, pelos cafés, pelas conversas e risadas, contudo, pela grande amizade que tivemos e levaremos para a vida.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, coordenação, secretaria e professores, pelas oportunidades, direcionamentos e pelo constante aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

FUNGOS ENDOFÍTICOS DE SOJA: DIVERSIDADE E PROSPECÇÃO ENZIMÁTICA

RESUMO

FLORES, Andressa Caroline. **Fungos endofíticos de soja**: diversidade e prospecção enzimática. Orientadora: Dra. Luciane Sene. 2022. 78 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel – Paraná, 2022.

As plantas são habitadas por uma microbiota composta por microrganismos em condição endofítica e cada relação endófito-planta possui características peculiares e que variam conforme condições ambientais. Estudos relacionados à identificação das populações endofíticas associadas às espécies vegetais permitem utilizá-las como importantes ferramentas para obtenção de produtos biotecnológicos de interesse agrícola e industrial. O objetivo deste estudo foi o de isolar e identificar fungos endofíticos de plantas de soja, antes e após a aplicação do fungicida sistêmico composto por Trifloxistrobina + Protiocanazol na lavoura de soja, avaliar a sensibilidade dos isolados *in vitro* frente ao mesmo fungicida e avaliá-los quanto ao potencial biotecnológico de produção de enzimas. As plantas de soja utilizadas foram cultivadas no Núcleo Experimental de Engenharia Agrícola (NEEA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, região de Cascavel-PR. Foram coletadas folhas de plantas de soja, com 48 dias após semeadura (anterior à aplicação do fungicida) e com 62 dias (14 dias após a aplicação). Os fungos foram agrupados e classificados conforme aspectos morfológicos e microscópicos, identificados em nível de gênero e analisados de acordo com os índices de frequência de colonização (FC%) e de diversidade ecológica (*Simpson* (D e 1-D), *Shannon-Wiener* (H') e *Pielou* (e)). Um total de 259 fungos (122 antes do fungicida e 137 após aplicação do fungicida) foram obtidos que resultaram na identificação de 11 gêneros, dentre os quais *Diaporthe* e *Alternaria* foram os mais abundantes com FC de 38,6 e 25,5%, respectivamente. Os valores de frequência e diversidade demonstraram que não houve diferença significativa entre as duas coletas realizadas, revelando que a obtenção de fungos endofíticos cultiváveis a partir de plantas tratadas com defensivos químicos não foi afetada. Os fungos também foram testados *in vitro* quanto à sensibilidade ao fungicida nas concentrações de 0,2, 2,0 e 3,8 mg L⁻¹. Os resultados demonstraram que todos os fungos avaliados foram capazes de crescer na presença do fungicida no meio de cultivo sólido, em todas as concentrações testadas, com baixa sensibilidade na concentração de 0,2 mg L⁻¹. Somente quatro fungos apresentaram sensibilidade na concentração de 2,0 mg L⁻¹ e, mesmo na maior concentração (3,8 mg L⁻¹), os gêneros *Cladosporium*, *Bipolaris*, *Cadophora*, *Rhizoctonia* e *Alternaria* permaneceram demonstrando baixa sensibilidade ao fungicida. Os fungos isolados também passaram por triagem para detecção de produção das enzimas celulases (CMCases), xilanases, proteases e amilases em meio sólido e quantificação da atividade de xilanase em cultivo submerso, utilizando palha e bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Os ensaios em meio sólido demonstraram melhores resultados para xilanase com índice enzimático (IE) de 2,14 e para CMCase de 1,92. O cultivo submerso gerou melhores resultados utilizando 50% de palha com 50% de bagaço e foi capaz de induzir uma atividade de 383,63 U mL⁻¹ de xilanase. Com relação ao comportamento cinético da xilanase bruta produzida pelo fungo *Colletotrichum boninense*, o valor de pH ótimo encontrado foi de 5,0 e melhor faixa de temperatura entre 50 e 60 °C. Nas temperaturas de 40 e 50 °C a enzima preservou 87 e 76% de sua atividade quando incubada por 30 min. Os valores de K_m e de V_{Máx} encontrados frente ao xilano foram de 99,3 mg mL⁻¹ e 3.333 μmol mL⁻¹ min⁻¹, respectivamente.

Palavras-chave: endófito; enzimas; celulase; xilanase; fungicida; potencial biotecnológico.

ENDOPHYTIC FUNGI FROM SOYBEAN: DIVERSITY AND ENZYMATIC PROSPECTION

ABSTRACT

FLORES, Andressa Caroline. **Endophytic fungi from soybean**: diversity and enzymatic prospection. Advisor: Luciane Sene. 2022. 78 p. Thesis (PhD in Agricultural Engineering) – Western Paraná State University, Cascavel – Paraná, 2022.

Plants are inhabited by a microbiota composed of microorganisms in endophytic conditions and each endophyte-plant relation displays peculiar characteristics that vary according to environmental conditions. Studies related to the identification of endophytic populations associated with plant species allow using them as important tools for obtaining biotechnological products of agricultural and industrial interest. The objective of this study was to isolate and identify endophytic fungi from soybean plants, before and after fungicide application composed by Trifloxystrobin + Prothioconazole in the soybean crops, evaluate the sensitivity of the isolates *in vitro* against the same fungicide and also evaluate them regarding the biotechnological potential of enzyme production. The soybean plants used were cultivated at the Experimental Nucleus of Agricultural Engineering (NEEA) of the Western Paraná State University, in Cascavel, Paraná, Brazil. The leaves of soybean plants were collected at 48 days after sowing (prior to fungicide application) and at 62 days (14 days after application). The fungi were grouped and classified according to morphological and microscopic aspects, identified at the genera level and analyzed according to indexes such colonization frequency (FC%) and ecological diversity (*Simpson (D e 1-D)*, *Shannon-Wiener (H')* and *Pielou (e)*). A total of 259 fungi (122 before the fungicide and 137 after the fungicide application) were obtained, which resulted in the identification of 11 genera, among which *Diaporthe* and *Alternaria* were the most abundant with FC of 38.6 and 25.5%, respectively. The frequency and diversity values showed that there was no significant difference between the two harvests carried out, revealing that the attainment of cultivable endophytic fungi from plants treated with chemical pesticides was not affected. The fungi were also tested *in vitro* for sensitivity to the fungicide at concentrations of 0.2, 2.0 and 3.8 mg L⁻¹. The results showed that all the fungi evaluated were able to grow in the presence of the fungicide in the solid culture medium, in all of the tested concentrations, with low sensitivity at the concentration of 0.2 mg L⁻¹. Only four fungi showed sensitivity at the concentration of 2.0 mg L⁻¹ and, even at the highest concentration (3.8 mg L⁻¹), the genera *Cladosporium*, *Bipolaris*, *Cadophora*, *Rhizoctonia* and *Alternaria* remained showing low sensitivity to the fungicide. The isolated fungi also underwent screening in order to detect the production of cellulase enzymes (CMCases), xylanases, proteases and amylases in solid media and quantify the xylanase activity in submerged cultivation, utilizing straw and sugarcane bagasse as substrate. Assays in solid media showed better results for xylanase with an enzyme index (IE) of 2.14 and for CMCCase of 1.92. The submerged cultivation generated better results using 50% straw with 50% bagasse and was able to induce an activity of 383.63 U mL⁻¹ of xylanase. Regarding the kinetic behavior of the crude xylanase produced by the fungus *Colletotrichum boninense*, the optimal pH value found was 5.0 and the best temperature range was between 50 and 60 °C. At temperatures of 40 and 50 °C the enzyme preserved 87 and 76% of its activity when incubated for 30 min. The K_m and V_{Max} values found against xylan were 99.3 mg mL⁻¹ and 3,333 μmol mL⁻¹ min⁻¹, respectively.

Keywords: endophyte; enzymes; cellulase; xylanase; fungicide; biotechnological potential.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE QUADROS	12
LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Microrganismos endofíticos	17
3.2 Fungos endofíticos	19
3.2.1 Fungos endofíticos em soja.....	19
3.2.2 Fungos e resistência a fungicidas.....	22
3.3 Aplicações dos fungos endofíticos.....	24
3.3.1 Fungos endofíticos na produção de enzimas.....	24
3.3.1.1 Celulases	25
3.3.1.2 Xilanases.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Origem e coleta das amostras.....	31
4.2 Isolamento dos fungos endofíticos	32
4.3 Determinação da frequência e diversidade endofítica	32
4.4 Sensibilidade dos fungos isolados ao fungicida.....	33
4.5 Identificação taxonômica dos fungos.....	34
4.6 Prospecção enzimática	35
4.6.1 Triagem para atividade enzimática em cultivo em meio sólido	35
4.6.1.1 CMCases	35
4.6.1.2 Xilanases.....	35
4.6.1.3 Proteases	36
4.6.1.4 Amilases.....	36
4.6.1.5 Cálculo de índice enzimático	36
4.7 Triagem para atividade enzimática em cultivo submerso.....	37

4.8	Quantificação de proteínas.....	38
4.9	Avaliação do uso de biomassa lignocelulósica como substrato	38
4.10	Cinética enzimática	39
4.10.1	Efeito do pH na atividade e estabilidade da xilanase	39
4.10.2	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da xilanase	40
4.10.3	Parâmetros cinéticos	40
4.11	Análise estatística	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Isolamento e identificação dos fungos endofíticos	42
5.2	Determinação dos índices de diversidade endofítica	47
5.3	Sensibilidade dos fungos isolados ao fungicida.....	49
5.4	Prospecção enzimática	51
5.4.1	Triagem para atividade enzimática em cultivo sólido	51
5.4.2	Triagem para atividade enzimática em cultivo submerso.....	55
5.4.3	Atividade Enzimática	57
5.4.4	Isolamento e Identificação dos fungos endofíticos.....	58
5.4.5	Avaliação da biomassa lignocelulósica como substrato indutor	58
5.4.6	Efeito do pH na atividade e estabilidade de xilanase	60
5.4.7	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade de xilanase	62
5.4.8	Determinação dos parâmetros cinéticos.....	64
6	CONCLUSÕES	66
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
	REFERÊNCIAS	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação da frequência de colonização dos isolados endofíticos dentro de cada gênero identificado, nas duas coletas avaliadas: antes e após a aplicação do fungicida	45
Tabela 2	Avaliação dos índices de diversidade aplicados à obtenção de isolados endofíticos de soja antes e após a aplicação do fungicida Trifloxistrobina + Protiokonazol .	47
Tabela 3	Percentual de inibição do crescimento (PIC) dos isolados endofíticos avaliados na presença do fungicida no meio de cultivo (sólido) em 3 diferentes concentrações	49
Tabela 4	Detecção inicial de formação de halos de degradação enzimática nos ensaios em placas com meio sólido	52
Tabela 5	Valores das medições das colônias, dos halos de degradação enzimática e do IE dos fungos endofíticos nos quatro ensaios realizados em meio sólido	54
Tabela 6	Conteúdo de proteínas, atividade enzimática e específica dos fungos selecionados em cultivo submerso utilizando xilano e CMC como fonte de carbono.....	58
Tabela 7	Conteúdo de proteínas, atividade enzimática e específica <i>C. boninense</i> em cultivo submerso utilizando palha e bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Micrografias que demonstram a presença de microrganismos endofíticos nos tecidos vegetais.....	18
Figura 2	Principais enzimas celulolíticas na degradação da celulose.....	27
Figura 3	Resultado da ação de enzimas endo-xilanases e β -xilosidases na cadeia principal do xilano.....	28
Figura 4	Área de cultivo da soja.....	31
Figura 5	Emergência dos fungos endofíticos a partir dos fragmentos foliares.....	32
Figura 6	Comparação do percentual de colonização antes e depois da aplicação do fungicida na área plantada de soja.....	44
Figura 7	Formação dos halos de degradação enzimática dos isolados endofíticos selecionados na triagem em meio sólido.....	53
Figura 8	Avaliação preliminar do desempenho da produção enzimática em cultivo submerso.....	56
Figura 9	Atividade enzimática em cultivo submerso.....	57
Figura 10	Produto da PCR analisado em gel de agarose 1% em tampão Tris-EDTA, corado com brometo de etídio e visualizados sob luz UV.....	58
Figura 11	Produção de xilanase por <i>C. boninense</i> utilizando bagaço e palha de cana-de-açúcar como fonte de carbono.....	59
Figura 12	Efeito do pH na atividade de xilanase.....	61
Figura 13	Efeito da temperatura na atividade de xilanase.....	62
Figura 14	Efeito da temperatura na estabilidade da xilanase.....	63
Figura 15	Gráfico de Lineweaver-Burk (1934) da atividade de xilanase em função da concentração de substrato (variação entre 3 e 50 mg mL ⁻¹).....	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Levantamento de estudos envolvendo fungos endofíticos de soja.....	21
Quadro 2	Exemplos de produtos comerciais, ingredientes ativos e doses dos fungicidas recomendados para a cultura da soja.....	23
Quadro 3	Identificação ao nível de gênero, com base nos aspectos morfológicos macro e microscópicos das colônias dos isolados endofíticos obtidos das plantas de soja.....	43

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

AER	Atividade Enzimática Relativa
BDA	Batata-dextrose-ágar
BSA	Albumina de soro bovino
CMC	Carboximetilcelulose
DMI	Inibidores de desmetilação C-14
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA_r	Ácido desoxirribonucleico ribossomal
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
K_M	Constante de Michaelis-Menten
ITS	Espaçador interno transcrito
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Parte por milhão
<i>Primers</i>	Oligonucleotídeos
QOI	Inibidores da quinona oxidase
Rpm	Rotações por minuto
U	Unidade enzimática
UV	Ultra-violeta
V_{Máx}	Velocidade Máxima
μmol	Micromolar

1 INTRODUÇÃO

Semelhante à microbiota que habita o organismo humano e dos animais, estima-se que todas as plantas são habitadas internamente por comunidades diversas de microrganismos. Essa interação microrganismo-planta é influenciada direta e indiretamente por fatores bióticos e abióticos do ambiente circundante (atmosfera e solo). Os microrganismos chamados de endófitos ou endofíticos incluem fungos, leveduras, bactérias e até mesmo vírus, nematoides e protozoários. Entretanto, fungos e bactérias são os microrganismos mais estudados e descritos nessa interação.

Fungos filamentosos são muito comuns nessa relação, pois podem receber proteção, nutrição e garantia de disseminação, em troca da sua atividade metabólica, liberada no interior dentro da planta, conferindo-lhe diversos benefícios.

O estudo de fungos endofíticos vem atraindo o interesse, por sua aplicabilidade industrial e agrícola, uma vez que os isolados fúngicos podem vir a se tornar ferramentas biológicas, atuando como vetores genéticos, agentes de controle biológico e produtores biológicos de enzimas e de compostos bioativos (metabólitos secundários) de interesse comercial.

Essa bioprospecção tem demonstrado aplicabilidade também no desenvolvimento de processos fermentativos, na seleção de microrganismos capazes de produzir enzimas hidrolíticas (CMCases e xilanases), importantes na degradação da biomassa lignocelulósica e muito visadas em bioprocessos como o de produção de biocombustíveis.

No caso de plantas agrícolas como a soja, a obtenção de isolados endofíticos permite acessar um rico campo de espécies, com potenciais biotecnológicos diversos e diferentes dos que são isolados em condições não-endofíticas.

Além disso, quando se estuda comunidades endofíticas de culturas importantes como soja, milho, trigo, arroz, feijão e algodão, entre outros, é preciso considerar o uso de defensivos agrícolas nas lavouras com o objetivo de controlar as principais doenças que comprometem e inviabilizam a produção e a produtividade das culturas, no entanto, a interação do uso desses agroquímicos com a microbiota endofítica ainda é pouco discutida.

Considerando também a relevância da soja para a economia do país, torna-se importante conhecer mais sobre a sua composição microbiana endofítica para compreender mais sobre os fatores relacionados à saúde e ao crescimento da própria cultura, o que contribui para o desenvolvimento de soluções e estratégias biológicas alternativas, visando melhorar os processos agrícolas e industriais.

Em outro espectro, na busca por novas fontes de produção de enzimas, os fungos endofíticos têm demonstrado, ao longo dos anos, ser uma opção interessante. Enzimas viáveis para as indústrias devem apresentar estabilidade operacional, maior atividade, seletividade e atenderem a requisitos físico-químicos para uma produção aprimorada. Por isso, a identificação de novas cepas fúngicas que demonstrem boa produção enzimática atrai o interesse das indústrias de enzimas.

Uma das principais formas de otimização e diminuição de custos de produção enzimática em escala industrial é a utilização de subprodutos da atividade agroindustrial, como, por exemplo, a biomassa lignocelulósica. Por ser uma rica fonte de polímeros que podem ser hidrolizados em açúcares fermentescíveis, essa biomassa composta por resíduos que incluem palhas, bagaços, cascas, hastes, caules, farelos, madeiras decíduas, coníferas ou de plantas herbáceas, são interessantes fontes de carbono para o crescimento de microrganismos e produção de insumos de valor comercial.

O bagaço e a palha da cana-de-açúcar são exemplos de biomassas lignocelulósicas derivadas dos processos da indústria sucroalcooleira e são constituídos por celulose (~45%), hemicelulose (~32%) e lignina (~17%). No Brasil, na safra 2020/21, segundo a CONAB (2021) foram produzidos cerca de 650 milhões de toneladas de cana-de-açúcar. Isso corresponde a, aproximadamente, 180 milhões de toneladas de bagaço e cerca de 108 milhões de toneladas de palha produzidas.

Devido à alta quantidade gerada, esse tipo de subproduto é um grande desafio para o meio ambiente, quando não aproveitados e descartados de forma inadequada causando poluição ambiental. Mesmo que a maior parte da palha gerada fique no campo como forragem para o solo e o bagaço seja levado para as caldeiras para geração de energia (térmica e elétrica), que abastece o próprio o setor, o que sobra pode ainda ser utilizado em vários outros processos (VANDENBERGHE *et al.*, 2022).

O objetivo deste estudo foi o de isolar e identificar fungos endofíticos de plantas de soja, avaliar a diversidade endofítica antes e após a aplicação do fungicida Trifloxistrobina + Prothioconazol na lavoura e avaliar a sensibilidade *in vitro* dos fungos na presença do fungicida no meio de cultivo. Além disso, avaliar e selecionar fungos endofíticos com potencial de produção de enzimas e avaliar o uso de biomassas lignocelulósicas provenientes do processamento da cana-de-açúcar como substrato.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolar e identificar fungos endofíticos de plantas de soja e avaliá-los quanto à diversidade endofítica e ao potencial de produção enzimática.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar fungos endofíticos a partir das folhas da planta de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), cultivada na área experimental (NEEA), pertencente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, localizada na região da cidade de Cascavel-PR;
- Avaliar o efeito da utilização do fungicida composto por Trifloxistrobina + Protioconazol no cultivo da soja sobre a frequência e diversidade dos fungos endofíticos obtidos;
- Avaliar a sensibilidade *in vitro* dos fungos endofíticos frente ao fungicida;
- Avaliar o potencial enzimático dos fungos endofíticos e o perfil cinético das enzimas que apresentarem maior atividade;
- Realizar identificação taxonômica em nível de gênero e por técnica molecular (sequenciamento da região ITS 1 e 4 do DNAr) dos fungos que se apresentarem como mais promissores na produção enzimática.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microrganismos endofíticos

Essencialmente, a definição de endófito refere-se a qualquer microrganismo (geralmente fungos e bactérias) que habita os tecidos internos das plantas sem causar doenças (Figura 1). A maioria das plantas possuem endófitos que promovem o crescimento e a saúde das plantas, muitas vezes, assim que as sementes germinam (WHITE *et al.*, 2019).

Petrini (1991) definiu microrganismos endofíticos como organismos que vivem dentro dos tecidos vegetais por pelo menos parte de seu ciclo de vida, sem induzir nenhum sintoma aparente de doença na planta hospedeira em condições normais, mas que podem se tornar patogênicos quando a planta hospedeira está em desequilíbrio ou com recursos limitados. Essa definição traduz o que mais tarde foi descrito como endofitismo transitório (WANI *et al.*, 2015).

A associação de endófitos transitórios é de curta duração e sazonal e, portanto, eles compartilham apenas sinais fisiológicos, e sua diversidade varia com a mudança nos parâmetros fisiológicos da planta hospedeira e em relação às diferentes condições ambientais (BOTELLA; DIEZ, 2011).

Já o endofitismo sistêmico, proposto inicialmente por Mostert, Crous e Petrini (2000), refere-se àqueles que habitam intimamente a organização da planta, normalmente coevoluem com a mesma e compartilham uma relação simbiótica profunda em que a planta hospedeira é fortalecida pela existência dessa interação e não se verifica sintoma visível de doença em nenhum estágio.

Estima-se que microrganismos sistêmicos estão tão intimamente ligados à planta que não é possível o seu cultivo em condições laboratoriais. Nesse caso, o avanço de ferramentas de metagenômica possibilita o estudo da comunidade endofítica como um todo avaliando a diversidade genética de amostragens independentes de cultivo (WANI *et al.*, 2015).

Como os endófitos sistêmicos estão simbioticamente associados à planta hospedeira, sua transmissão para a próxima geração seria geralmente vertical, ou seja, por meio de sementes e/ou propágulos vegetativos, enquanto que os endófitos transitórios são transmitidos horizontalmente, via esporos ou pela entrada por aberturas naturais (hidatódios, estômatos) ou provocadas (enzimas hidrolíticas, fissuras e ferimentos) (SCHARDL *et al.*, 1991; SAIKKONEN *et al.*, 1998; MORICCA; RAGAZZI, 2008).

Dentre as vantagens que os microrganismos endofíticos podem vir a conferir às plantas, estão: o aumento dos nutrientes e de sua biodisponibilidade para as plantas, a defesa das plantas contra patógenos, insetos e herbívoros, o aumento da tolerância ao estresse salínico e à seca e a promoção do crescimento vegetal pela produção de compostos bioativos e fitormônios (WHITE *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2015; PRIETO *et al.*, 2017; VERMA; WHITE, 2018).

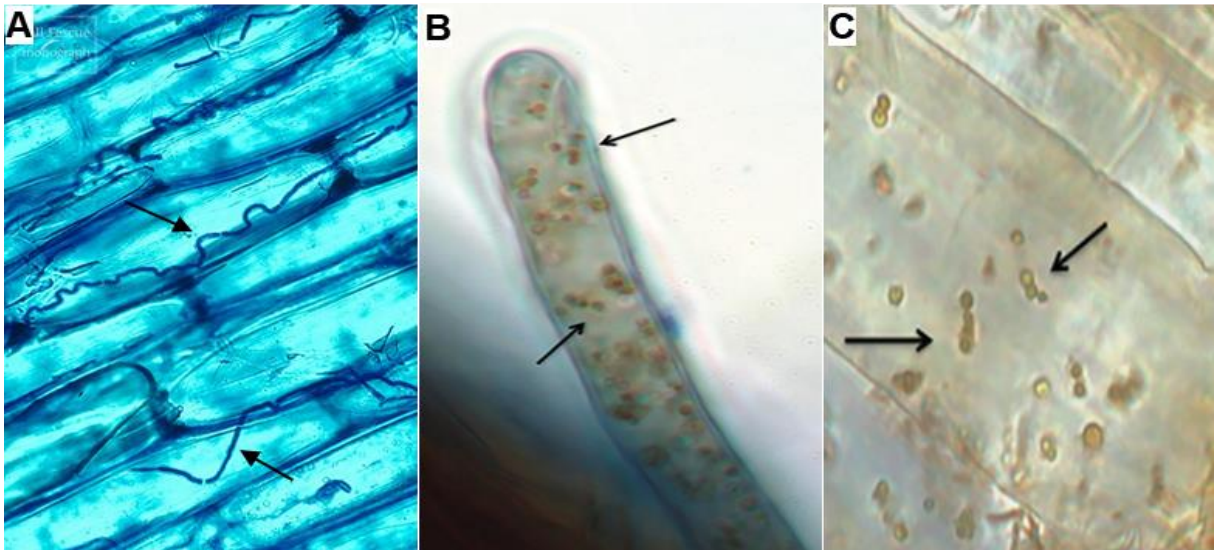


Figura 1 Micrografias que demonstram a presença de microrganismos endofíticos nos tecidos vegetais. A) Fungo endofítico *Neotyphodium coenophialum* isolado de uma gramínea do gênero *Festuca* (CHRISTENSEN; BENNETT; SCHMID, 2002); B) e C) Bactéria endofítica do gênero *Pseudomonas* no interior de pelos radiculares e no parênquima radicular de *Cynodon dactylon* (WHITE *et al.*, 2019).

O endofitismo é um fenômeno ecológico que tem sido estudado por caminhos diferentes e pode ser dividido em duas linhas de pesquisa: bioprospecção e interação microrganismo-planta. A bioprospecção de endófitos tem sido amplamente descrita e elucidada, no entanto, o estudo da interação, devido sua complexidade, ainda requer investigações mais aprofundadas e detalhadas (WANI *et al.*, 2015).

As interações microrganismo-planta são onipresentes e de natureza diversa onde cada planta é um complexo ecossistema. Essas interações exibem grande plasticidade fenotípica que podem ir do mutualismo ao antagonismo dependendo da biocomunicação entre eles e das condições ambientais (SCHULZ; BOYLE, 2005).

O estudo da microbiota vegetal visa decifrar não somente a diversidade estrutural, mas também funcional das comunidades microbianas associadas às mais variadas plantas dos mais variados habitats (GUPTA *et al.*, 2021).

3.2 Fungos endofíticos

Os fungos, desde há muito tempo, têm sido reconhecidos como componentes importantes nos ecossistemas atuando basicamente como decompositores de matéria orgânica. Porém, existe uma complexidade e uma variedade muito maior nas interações fúngicas dentro desses ecossistemas (BACON; WHITE, 2000).

Fungos endofíticos podem ser filamentosos e, também, leveduras que colonizam o tecido vegetal sadio de uma planta e permanecem ali vivendo em condição endossimbionte. Em virtude de poderem apresentar uma relação neutra de mutualismo, comensalismo ou parasitismo latente com o seu hospedeiro, têm despertado cada vez mais o interesse de pesquisadores em estudar o comportamento dos organismos envolvidos, os fatores de indução e expressão gênica, os efeitos no ambiente e os produtos dessa relação (GUPTA; WHITE; KULKARNI, 2020).

A bioprospecção de fungos endofíticos utiliza métodos dependentes de cultivo e, portanto, que abrangem somente parte da comunidade endofítica. Contudo, ainda é conveniente realizar estudos que promovam isolamento, caracterização e identificação (bioquímica ou genética) dos endófitos, pois, embora existam limitações, as técnicas dependentes de cultivo, trazem vários benefícios que permitem cultivar, purificar e preservar cepas fúngicas obtidas das amostras ambientais de diferentes *habitats* naturais (GUPTA *et al.*, 2021).

Como exemplo, menciona-se a produção de enzimas (protease, xilanase, amilase e CMCase) e promotores de crescimento vegetal como o indol-3-ácido acético pelas espécies fúngicas endofíticas *Daldinia eschscholtzii*, *Diaporthe phaseolorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Trichoderma koningii* e *T. erinaceum* isoladas de plantas medicinais, relatada por Suebrasri *et al.* (2020). Sravani *et al.* (2020) descrevem a capacidade de fungos endofíticos da família Hypocreales na proteção de sua planta hospedeira ao ataque de insetos, pela liberação de peramina, que previne o ataque de nematoides e de outros parasitas.

3.2.1 Fungos endofíticos em soja

O Brasil é considerado uma das principais potências mundiais em produção de soja, com produção de 124 milhões de toneladas na safra 2021/2022 (CONAB, 2022). Muito usada na alimentação humana e animal, a soja (*Glycine max* A. Merrill) é uma das mais importantes oleaginosas cultivadas no mundo, sendo de extrema importância econômica e agrícola. É uma planta leguminosa com sementes proteicas de elevado teor de óleo, capaz

de fixar nitrogênio atmosférico pela simbiose com bactérias nitrificantes - rizóbios (GONÇALVES, 2016).

Essa associação com bactérias fixadoras de nitrogênio já demonstra a suscetibilidade da planta de soja em associar-se com microrganismos para obter benefícios. O primeiro estudo científico encontrado nas bases de pesquisa que menciona isolamento de fungos endofíticos de soja pertence aos autores Miller e Roi (1982) que isolaram fungos a partir de folhas, vagens e sementes no estado do Mississippi (EUA).

Pimentel *et al.* (2006) foram o primeiro grupo a publicar bioprospecção de fungos endofíticos de soja cultivada no Brasil, a partir de folhas e fragmentos caulinares cultivados em gleissolo, comparando o número de isolados em plantas coletadas no campo e em casa de vegetação. Impullitti e Malvick (2013), em Minnessota (EUA), também publicaram isolamento de fungos endofíticos de soja, porém, com foco na comparação e eficiência de dois métodos diferentes de isolamento. em Buenos Aires, Russo *et al.*(2016) isolaram exemplares de fungos endofíticos em variedades de soja e de milho (Tabela 1).

Stuart, Stuart e Pimentel (2018) avaliaram a diversidade e riqueza da população de fungos endofíticos de soja sob efeito de herbicidas e inseticidas utilizados na cultura, comparando com a população fúngica endofítica isolada de soja orgânica sem uso de qualquer biocida. Farouk, Attia e El-Katatny (2020) trabalharam com isolamento de fungos endofíticos de plantas de soja cultivadas na cidade de Minia no Egito, com interesse em testar qualitativamente a produção de enzimas como CMCases, xilanases e amilases. Batzer e Mueller (2020) avaliaram a diversidade de fungos endofíticos de soja em Iowa - Estados Unidos, entre os anos de 2015 e 2017 com diferentes cultivares, avaliando não somente o isolamento foliar, mas também caulinar e em sementes, na presença e ausência do fungicida sistêmico Carboxamida + Estrobilurina (Priaxor® BASF).

Quadro 1 Levantamento de estudos envolvendo fungos endófitos de soja

Nº de isolados	Nº de gêneros	Gêneros encontrados	Parte da planta	Estádio da Planta	Utilização de fungicida	Localização	Autores
57	5	<i>Alternaria, Diaporthe, Phoma, Phaseolorum, Fusarium</i>	Folhas, vagens e sementes	R2/R3	Não mencionado	Mississippi, EUA	Miller; Roy (1982)
16	12	<i>Alternaria, Bipolaris, Cladosporium, Colletotrichum, Curvularia, Epicoccum, Glomerella, Nigrospora, Penicillium, Phomopsis, Pleospora, Stemphylium</i>	Folhas	R2/R3 R4/R5	Não mencionado	Buenos Aires, Argentina	Larran <i>et al.</i> (2002)
297	11	<i>Alternaria, Cladosporium, Curvularia, Drechslera, Scopulariopsis, Acremonium, Aspergillus, Colletotrichum, Fusarium, Paecilomyces, Penicillium</i>	Folhas e caules	R2	Nenhum	Paraná, Brasil	Pimentel, <i>et al.</i> (2006)
31	16	<i>Alternaria, Aspergillus, Phomopsis, Bipolaris, Nectria, Nigrospora, Fusarium, Penicillium, Phoma, Botryotrichum</i>	Folhas	Não mencionado	Não mencionado	Não mencionado	Bernardi-Wenzel <i>et al.</i> (2012)
228	12	<i>Alternaria, Cladosporium, Davidella, Diaporthe, Epicoccum, Fusarium, Phialophora, Phoma, Phomopsis, Plectosphaerella, Verticillium, Trichoderma</i>	Caules	R2/R3	Não mencionado	Minessotta, EUA	Impullitti; Malvick (2013)
271	26	<i>Alternaria, Ampelomyces, Cercospora, Chaetomium, Cladosporium, Cochliobolus, Colletotrichum, Coniothyrium, Coprinellus, Curvularia, Diaporthe, Fusarium, Gibberella, Guignardia, Leptosphaeria, Leptospora, Macrophomina, Myrothecium, Neofusicoccum, Nigrospora, Peyronellaea, Pestalotiopsis, Phoma, Phomopsis, Saccharicola, Stagonosporopsis</i>	Folhas e raízes	R2	Nenhum	Minas Gerais, Brasil	Fernandes <i>et al.</i> (2015)
11	9	<i>Alternaria, Arthrinium, Aspergillus, Clonostachys, Curvularia, Fusarium, Macrophomina, Scopulariopsis, Trichoderma</i>	Folhas, caules e raízes	R2/R3	Não mencionado	Buenos Aires, Argentina	Russo <i>et al.</i> (2016)
1783	31	<i>Alternaria, Aspergillus, Acremonium, Aureobasidium, Bipolaris, Bleptosporium, Penicillium, Chaetomium, Cladosporium, Colletotrichum, Drechslera, Epicoccum, Fusarium, Geotrichum, Harpoglyphum, Idriella, Micelia sterilia, Nigrospora, Paecilomyces, Pestalotiopsis, Phoma, Pyricularia, Rhizoctonia, Sclerotium, Stemphylium, Scopulariopsis, Scytalidium, Trichoderma, Trichophyton, Tricothecium, Verticillium</i>	Folhas	V4 e R4	Nenhum	Paraná, Brasil	Stuart, Stuart e Pimentel <i>et al.</i> (2018)
10	5	<i>Aspergillus, Fusarium, Nigrospora, Trichoderma, Dark sterile mycelia</i>	Folhas, caules e raízes	Não mencionado	Não mencionado	Minia, Egito	Farouk; Attia; El-Katatny (2020)
1791	10	<i>Alternaria, Colletotrichum, Diaporthe, Fusarium, Nigrospora, Didymella, Epicoccum, Coniothyrium, Bipolaris, Plectosphaerella</i>	Folhas, caules e sementes	R5	Carboxamida + Estrobilurina	Iowa, EUA	Batzer; Mueller (2020)

Fonte: Levantamento realizado nas principais bases de dados científicos (*Web of Science, Scielo, Science direct e Pubmed*).

3.2.2 Fungos e resistência a fungicidas

Dentre as principais práticas de manejo para o controle de doenças na cultura da soja, a utilização de fungicidas químicos ainda é frequente. Historicamente, os primeiros fungicidas aplicados em partes aéreas tiveram como alvo biológico o fungo fitopatogênico causador do oídio (*Erysiphe diffusa*), após surto epidêmico nos anos de 1996 e 1997. Desde então, houve a intensificação da utilização de fungicidas, principalmente após a incidência da ferrugem asiática, doença provocada pelo fungo patógeno *Phakopsora pachyrhizi*, introduzida no Brasil em 2001 (GODOY *et al.*, 2017).

Outras doenças que podem interferir na produtividade da soja também são controladas por fungicidas como a mancha alvo (*Corynespora cassiicola*), a antracnose (*Colletotrichum truncatum*), o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e a mela (*Rhizoctonia solani* AG1) (EMBRAPA SOJA, 2013).

O tratamento mais recomendado aos produtores rurais é a aplicação direta nas sementes com a finalidade de controlar os patógenos transmitidos pela semente e permitir a germinação das mesmas além de protegê-las dos fungos do solo (HENNING *et al.*, 1994). Porém, a maioria das combinações de fungicidas indicadas para o tratamento de sementes reduz a nodulação e a fixação biológica de nitrogênio (CAMPO; HUNGRIA, 2000). A maior frequência de efeitos negativos do tratamento de sementes com fungicidas ocorre em solos com baixa população de *Bradyrhizobium* spp. Por esse motivo, muitos agricultores optam por não tratar as sementes e realizar a aplicação do fungicida na lavoura por meio de pulverização nas partes aéreas (EMBRAPA SOJA, 2013).

Os principais fungicidas aplicados na soja por pulverização podem ser visualizados na Tabela 2. Dentre os principais e mais utilizado está o fungicida Fox® (Trifloxistrobina + Protiocanazol - 150 + 175 g L⁻¹) de ação mesostêmica e sistêmica aplicado também nas culturas de algodão, feijão e milho. É indicado para o controle de algumas das doenças mais frequentes em soja como a ferrugem-asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), oídio (*Microsphaera diffusa*), cretamento-foliar (*Cercospora kikuchii*), septoriose (*Septoria glycines*), antracnose (*Colletotrichum truncatum*), mela (*Rhizoctonia solani*), e mancha-alvo (*Corynespora cassiicola*) (BAYER, 2020).

Quadro 2 Exemplos de produtos comerciais, ingredientes ativos e doses dos fungicidas recomendados para a cultura da soja

Nome comercial	Ingredientes ativos	Dose recomendada (L- kg p.c./ha)
Aproach Prima	Picoxistrobina + ciproconazol	0,3
Ativum	Piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiroxade	0,8
Audaz/Aumenax	Oxicloreto de cobre + fluxapiroxade	1,2
Blavity	Protioconazol + fluxapiroxade	0,3
Cronnos	Mancozebe + picoxistrobina + tebuconazol	2,5
Elatus	Azoxistrobina + benzovindiflupir	0,2
Fezan Gold	Tebuconazol + clorotalonil	2,5
Fox	Trifloxistrobina + protioconazol	0,4
Fox Xpro	Bixafen + protioconazol + trifloxistrobina	0,5
Fusão	Metominostrobinina + tebuconazol	0,725
Nativo	Trifloxistrobina + tebuconazol	0,5
Orkestra SC	Piraclostrobina + fluxapiroxade	0,35
Sphere Max	Trifloxistrobina + ciproconazol	0,2
Vessarya	Picoxistrobina + benzovindiflupir	0,6

Legenda: p.c.= produto comercial.

Fonte: Godoy *et al.* (2021).

Estima-se que a aplicação de qualquer fungicida químico sobre plantas de soja vai resultar em efeitos deletérios sobre a população de fungos, sejam eles causadores de doenças ou não. Entretanto, são escassos os estudos que avaliam esse efeito, o particularmente, sobre a população de fungos endofíticos.

Adicionalmente, o manejo incorreto tem promovido um aumento no número de fungos resistentes aos principais fungicidas (CHINELATO, 2019), além da contaminação do meio ambiente pelo uso intensivo desses agroquímicos, muitas vezes persistentes no solo e tóxicos para os demais organismos vivos. A possibilidade iminente de acidentes ambientais com o uso de grandes quantidades desses compostos químicos a cada safra, oportuniza o estudo de fungos também como soluções sustentáveis na biorremediação de áreas contaminadas (SIM; CHEN; TING, 2019).

O uso de endófitos é uma abordagem ambientalmente sustentável e versátil na biorremediação. Os endófitos podem ser utilizados após isolamento a partir de suas plantas hospedeiras ou mesmo dentro da associação com as plantas, acelerando o processo de fitorremediação. A colaboração entre a planta e o microrganismo endofítico pode desempenhar uma sinergia fundamental na degradação de contaminantes perigosos (STEPNIEWSKA; KUZNIAR, 2013).

Melhorias podem ser feitas nos endófitos para apurar sua eficácia na remoção e degradação de poluentes. O estudo dessas estratégias levaria à compreensão dos mecanismos usados pelos endófitos na biorremediação (SIM; CHEN; TING, 2019).

3.3 Aplicações dos fungos endofíticos

Os microrganismos endofíticos de um modo geral são potencialmente úteis na agricultura e na indústria (alimentícia, farmacêutica, química etc.). Tanto os microrganismos como os produtos do seu metabolismo (primário ou secundário) são importantes ferramentas biotecnológicas utilizadas em diversos processos, atuando como vetores para introdução de genes de interesse em plantas (POLONIO *et al.*, 2016a; BAJAJ *et al.*, 2018), como agentes inibidores de pragas e patógenos (HALLMANN; SIKORA, 1996; BRUM *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2018), na promoção de crescimento vegetal (GREETATORN *et al.*, 2019; SHAH *et al.*, 2019) e na tolerância a estresses abióticos (HAMAYUN *et al.*, 2017; RIPA *et al.*, 2019), como fontes de produção de substâncias bioativas ou de interesse comercial (STROBEL *et al.*, 2004, SPECIAN *et al.*, 2012; FLORES *et al.*, 2013; POLONIO *et al.*, 2016b), como produtores de enzimas (ORLANDELLI *et al.*, 2015; ALBERTO *et al.*, 2016; FELBER *et al.*, 2019) e, até mesmo, como agentes fermentadores em processos biológicos no aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais (BHUMIKA *et al.*, 2016; MAROLDI *et al.*, 2018).

Na agricultura, os estudos relacionados a microrganismos endofíticos em plantas de importância econômica abrem um campo de possibilidades de ganho de produtividade dessas culturas. Esse “ganho” pode ocorrer a partir de pelo menos duas diferentes aplicações: inoculação ou engenharia genética. A inoculação seria da própria espécie endofítica, (previamente estudada) nas sementes de grandes culturas para que essa espécie habite de forma endossimbionte e promova os benefícios. A outra forma se dá pelo melhoramento genético de sementes a partir da transferência de genes de interesse do genoma do endófito para o genoma da planta (SINGH *et al.*, 2016; GUPTA; WHITE; KULKARNI, 2020).

As vantagens da inoculação de endófitos já estudados é a de que eles podem vir a reduzir a necessidade de fertilizantes inorgânicos e fungicidas para o cultivo. Esses microrganismos atuam como bioestimulantes para a planta (KUMAR; RADHAKRISHNAN, 2020). Alguns endófitos também são capazes de produzir sideróforos e hormônios vegetais, como: auxinas, citocininas, ácido abscísico, etileno e giberelinas, essenciais para regular a germinação das sementes, o crescimento e o desenvolvimento da planta (FIRAKOVA; STURDIKOVA; MUCKOVA, 2007; WHITE *et al.*, 2018).

3.3.1 Fungos endofíticos na produção de enzimas

As enzimas têm um enorme potencial em diversos setores industriais, como: farmacêutico, alimentício, bebidas, detergentes, processamento de couro e papel e celulose.

Durante décadas, as enzimas foram isoladas de animais e plantas. A produção de enzimas microbianas se tornou necessária para os setores industriais devido ao seu desempenho superior e a possibilidade de trabalhar sob uma ampla gama de condições físicas e químicas variadas (SINGH *et al.* 2016).

Muitos microrganismos como bactérias, leveduras e fungos têm sido explorados para a produção de enzimas. A produção de enzimas industriais por bactérias vem sendo estudada há muito tempo. Na biotecnologia, algumas dezenas de espécies de fungos são exploradas comercialmente por sua capacidade de produção de enzimas (CORRÊA *et al.*, 2014).

As enzimas microbianas são de grande importância no desenvolvimento de vários bioprocessos em escala industrial com possibilidade em uma ampla variedade de indústrias, incluindo celulose, papel, couro, detergentes, têxteis, produtos farmacêuticos, alimentos, bebidas, química, ração animal e biocombustíveis (SINGH; SINGH; PANDEY, 2019).

Diferentemente das enzimas vegetais e animais, as de origem microbiana podem ser produzidas em fermentadores, em que as condições de cultivo podem ser controladas. Aliado a isso, existe uma vasta biodiversidade de microrganismos possíveis habitando os mais variados ambientes, inclusive aqueles de condições extremas e hostis (SAID; PIETRO, 2004).

Os fungos *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* são exemplos já conhecidos como produtores de enzimas por atuarem em uma ampla gama de condições, como pH, temperatura, osmolaridade e pressão extremas (BHADRA *et al.*, 2022). Além disso, enzimas fúngicas são secretadas extracelularmente e diferentes substratos de menor custo podem vir a ser empregados (GOPINATH *et al.*, 2017).

3.3.1.1 Celulases

A celulose pode ser hidrolisada por um complexo enzimático produzido por fungos, bactérias, protozoários e moluscos. Entre os complexos enzimáticos de fungos, o mais estudado é o conjunto de enzimas hidrolíticas composto pelas endo- β -1,4-glicanases que hidrolisam as ligações glicosídicas ao acaso na fibra de celulose; as exo- β -1,4-glicanases ou celobiohidrolases que agem nas extremidades reductoras e não-reductoras de polímeros gerados pela ação das endoglicanases, liberando celobiose; as β -1,4-glicosidases (celobiasas) que hidrolisam oligossacarídeos e celobiose à glicose (DILLON, 2004; GUTIÉRREZ-ROJAS; MORENO-SARMIENTO; MONTOYA, 2015).

As regiões de menor organização das microfibrilas de celulose são conhecidas como amorfas e são exatamente os locais de ação das endoglicanases. A ação resulta na diminuição do grau de polimerização das microfibrilas, disponibilizando substratos para ação das exoglicanases. Em seguida, entram em ação as β -glicosidases que hidrolisam os dímeros

de glicose, celobiose e pequenos oligossacarídeos. Esse mecanismo enzimático pode ser visualizado na Figura 2 (DILLON, 2004).

A produção de celulases por microrganismos tem sido descrita como do tipo induzida, sendo a própria celulose a substância indutora. Entretanto, a produção de celulases sofre repressão catabólica quando há presença de concentrações de glicose acima de 0,1%. Também não há secreção de celulases na presença de amido e glicerol. Portanto, a produção de celulase em nível industrial requer atenção e cuidado quanto ao desenvolvimento dos processos, os quais devem considerar a escolha dos substratos (fonte de carbono) e aditivos e o controle dos parâmetros como temperatura, pH, fontes de nitrogênio e o uso de surfactantes (ABRAHÃO-NETO *et al.*, 1995; DILLON, 2004).

A atividade celulolítica pode ser encontrada em uma ampla variedade de bactérias e fungos. Os gêneros de fungos mais reconhecidos como agentes de decomposição da matéria orgânica em geral e da celulose em particular, pertencem aos gêneros *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Orpinomyces* e *Anaeromyces*, *Chaetomium*, *Helotium*, *Neurospora*, *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Poria*, *Schizulapium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Pae-cilomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Especificamente, estudos recentes têm mostrado que os fungos pertencentes ao Filo *Ascomycota* dominam, tanto em abundância quanto em atividade, a comunidade microbiana responsável pela decomposição dos resíduos celulósicos (LYND *et al.*, 2002; TIAN *et al.*, 2009; WILSON, 2011; GUTIÉRREZ-ROJAS; MORENO-SARMIENTO; MONTROYA, 2015).

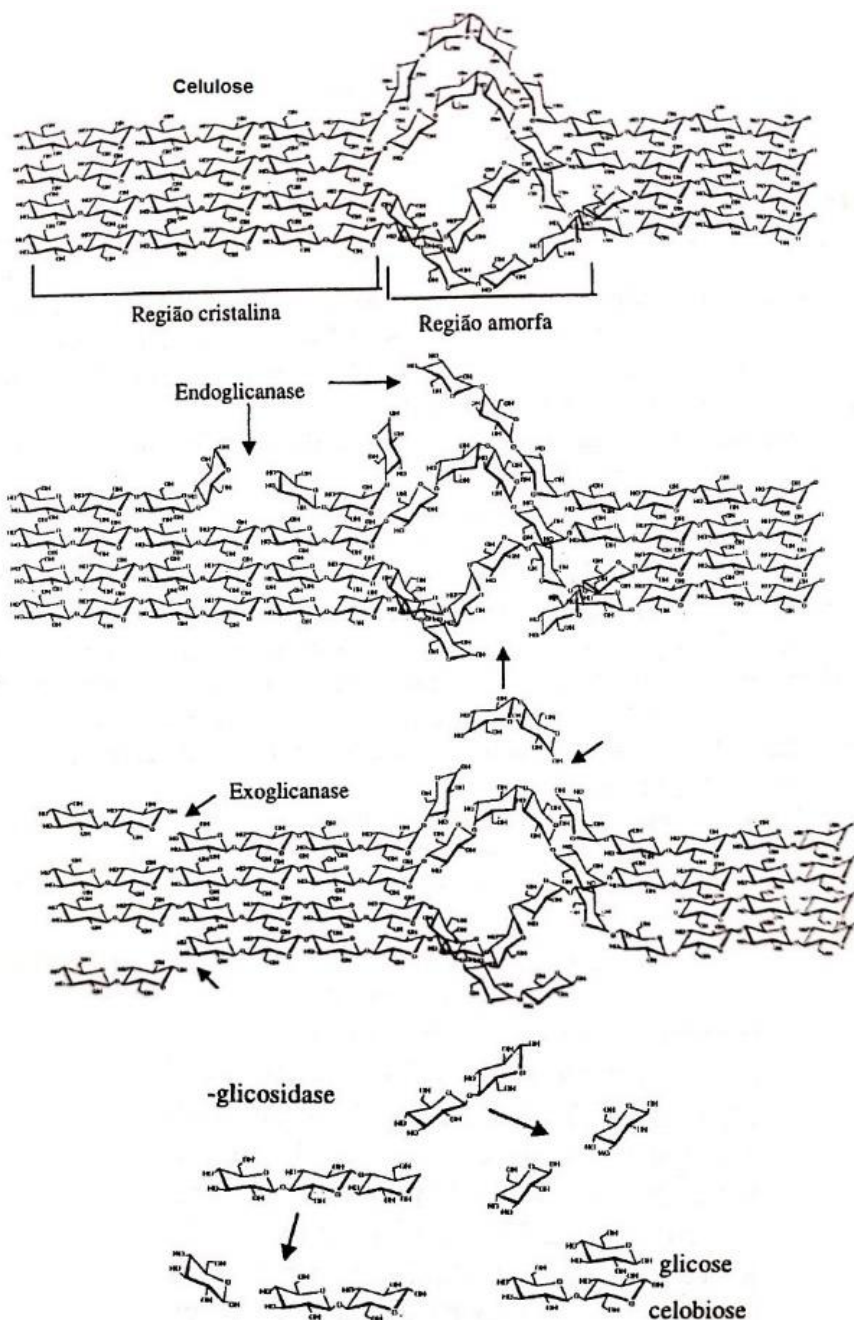


Figura 2 Principais enzimas celulolíticas na degradação da celulose.

Fonte: Dillon (2004).

Fungos endofíticos também vêm sendo relatados como bons produtores de celulases, como é o caso do estudo de Felber *et al.* (2019) que avaliaram a produção de endoglucanases em fungos endofíticos de *Vitis Labrusca* L.; Goldbeck *et al.* (2013) que obtiveram produção de celulases por *Cladosporium cadosporioides*, endófito de *Costus igneus* (planta medicinal); Amirita *et al.* (2012) com *Acremonium strictum*, endófito isolado do bioma brasileiro usando diferentes substratos; Devi, Prabakaran e Wahab (2012) avaliaram os *Colletotrichum* sp. e *Alternaria* sp., obtendo bons resultados de produção para esses endófitos isolados da planta medicinal *Centella asiática*.

As celulasas possuem ampla aplicação industrial, atuando no descoramento e amaciamento de tecidos, na produção de rações animais, em processos de reciclagem e reaproveitamento de papel, na liberação de aromas na indústria alimentícia e na hidrólise da biomassa vegetal lignocelulósica (DILLON, 2004).

A aplicação na hidrólise da biomassa lignocelulósica vem ganhando destaque pois, tem sido visada pelas biorrefinarias que produzem o etanol de segunda geração (2G). O processo para a obtenção de etanol 2G, produzido a partir de materiais lignocelulósicos, envolve quatro etapas básicas: pré-tratamento, hidrólise (enzimática ou ácida), fermentação e destilação. Quando o processo de hidrólise escolhido é o enzimático, utilizam-se celulasas para obtenção de uma conversão eficiente dos açúcares a etanol (SILVA; QUEIROZ, 2009; OGEDA; PETRI, 2010; JOSHI; SHUKLA; SHUKLA, 2011).

3.3.1.2 Xilanases

O xilano de plantas terrestres é um heteropolissacarídeo composto de resíduos de xilose unidos por ligações do tipo β -1,4. A cadeia lateral do polímero determina a solubilidade, conformação física e a reatividade da molécula de xilano com os componentes hemicelulósicos e, portanto, influenciam grandemente no modo e extensão da sua clivagem enzimática (FILHO, 2004; WIPUSAREE *et al.*, 2011).

Por se tratar de um heteropolissacarídeo, a conversão enzimática do xilano a seus componentes monoméricos requer a participação sinérgica de várias enzimas, algumas atuando sobre a cadeia principal e outras sobre as ramificações. As endo- β -D-xilanases agem aleatoriamente na cadeia principal do xilano resultando em xilano oligossacarídeos de cadeia menor (Figura 3).

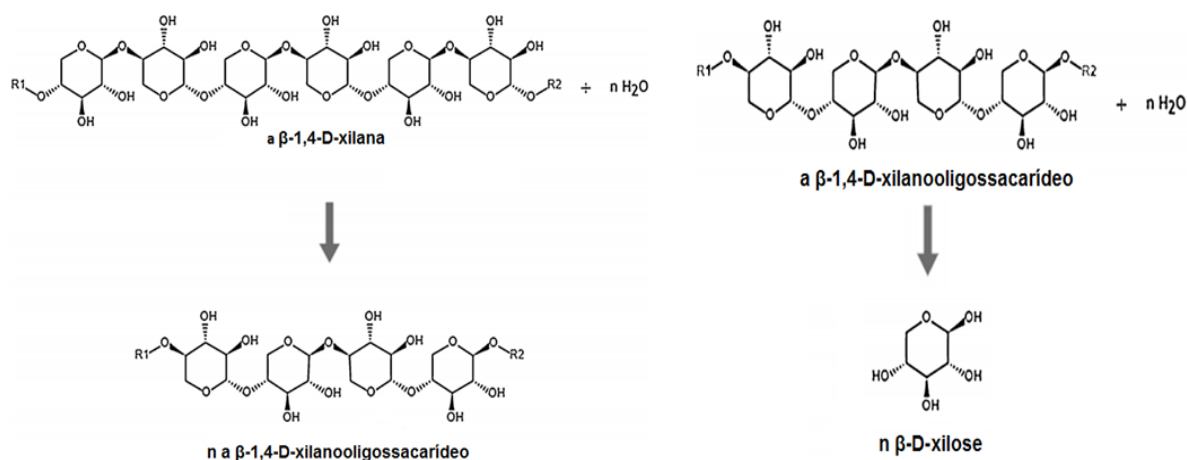


Figura 3 Resultado da ação de enzimas endo-xilanases e β -xilosidases na cadeia principal do xilano.

Fonte: Adaptado de METACYC (2018).

A atividade das endo-xilanases contribui para atuação de outras enzimas do complexo xilanolítico, como, por exemplo, clivando porções internas da cadeia principal do xilano liberando substrato para atuação das β -xilosidases que atuam sobre os fragmentos (xilanoligossacarídeos) e sobre as extremidades não redutoras da molécula principal, conforme representado na Figura 3 (DEKKER, 1985; FILHO, 2004, WANG *et al.*, 2017).

Todos os fungos produzem diversas enzimas e são capazes de produzir xilanases que degradam os polissacarídeos da parede celular vegetal para o amaciamento da região de penetração em decorrência da degradação parcial de estruturas da parede celular. Por esta razão, fungos filamentosos têm sido descritos como bons produtores de xilanases devido à liberação extracelular dessas enzimas, algumas espécies com produção em maior quantidade do que outros microrganismos e também por produzirem várias outras enzimas auxiliares que são necessárias para remover as ramificações da molécula de xilano (HALTRICH *et al.*, 1996; WIPUSAREE *et al.*, 2011).

A biossíntese da xilanase em fungos e bactérias pode ser do tipo induzida, em nível molecular e por repressão catabólica, fenômenos complexos e que variam de acordo com cada organismo. Em muitos casos, as xilanases constitutivas degradam o xilano a xilooligossacarídeos, os quais são transportados para dentro da célula por uma enzima permease e induzem outros genes de xilanases. As β -xilosidases, que também podem ser produzidas constitutivamente ou por indução, convertem a xilobiose em xilose e pode, m subsequentemente, transglicolisá-las a XylB1-2Xyl e GlcB1-2Xyl. Esses componentes são absorvidos e agem como indutores adicionais de genes codificadores de enzimas xilanolíticas (THOMSON, 1993; FILHO, 2004).

Exemplos de fungos produtores de xilanases são: *Acrophialophora nainiana* isolado na região central do Brasil (XIMENES *et al.*, 1999; SALLES *et al.*, 2000), *Aspergillus niger* (SRIDEVI *et al.*, 2011), *Alternaria alternata* como endófito da planta *Croton oblongifolius* (WIPUSAREE *et al.*, 2011) e os endófitos da soja *Aspergillus terreus* e *Trichoderma harzianum* isolados por Farouk, Attia e El-katatny (2020).

Nas últimas décadas, enzimas xilanolíticas produzidas por microrganismos, em especial por fungos filamentosos, têm despertado o interesse por seu potencial biotecnológico em diversos processos industriais, como: alimentos, papel, biocombustíveis e solventes, entre outros. Um exemplo a ser destacado é o uso de xilanases no branqueamento da polpa de celulose para a produção de papel que vem substituindo de 20% a 30% o uso de alvejantes clorados para atingir a coloração branca e de alto brilho (qualidade exigida pelo mercado de papel). Outras empresas investem 100% no biobranqueamento com o intuito de agregar valor e consciência ambiental tornando as polpas de celulose “chlorine-free” (BAJPAI, 1999; SRIDEVI *et al.*, 2011; KUMAR; RANI, 2019).

O uso das xilanases dentro do conceito de biorrefinarias pode viabilizar o aproveitamento ou valorização de resíduos provenientes do processo de obtenção do xilitol e do etanol de segunda geração. A fração hemicelulósica, após processo de hidrólise (pré-tratamento), libera açúcares fermentescíveis como a xilose, que podem ser utilizados na produção de xilitol e etanol por diferentes microrganismos (PRAKASHAM; SREENIVAS-RAO; HOBBS, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem e coleta das amostras

Os fungos endofíticos foram isolados de folhas de plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivadas sob manejo convencional (uso de defensivos agrícolas), na área de produção comercial de soja do Núcleo Experimental de Engenharia agrícola (NEEA), pertencente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná - *campus* Cascavel, localizado na BR 467, km 17 (24°54'01.0"S 53°32'00.5"W) durante a safra 2020/2021. O solo dessa área é classificado como latossolo vermelho distroférico, com relevo plano e textura argilosa.

Em uma área de aproximadamente 1 hectare plantado, 23 unidades de plantas de soja foram marcadas aleatoriamente (com auxílio de fitas e placas), conforme Figura 1. A coleta das folhas foi realizada em dois momentos: i) 3 folhas aos 48 dias após semeadura e antes da aplicação do fungicida Trifloxistrobina 150 g L⁻¹ + Protiocanazol - 150 g L⁻¹ (Fox®, Bayer); ii) 3 folhas (nas mesmas plantas demarcadas) aos 62 dias após semeadura e 14 dias após a aplicação do fungicida.

As folhas foram coletadas sem marcas, arranhaduras ou ferimentos, armazenadas em sacos plásticos etiquetados e transportadas dentro de caixas térmicas até o laboratório de Enzimologia e Tecnologia de Fermentações da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* Cascavel-PR.

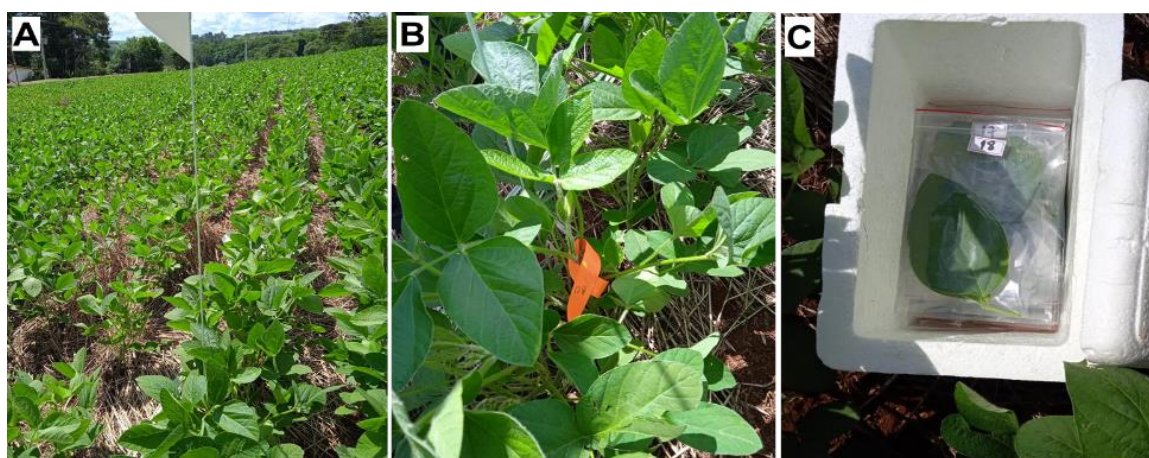


Figura 4 Área de cultivo da soja. A) Demarcação das plantas com placas; B) com fitas e C) acondicionamento das folhas coletadas para o transporte até o laboratório.

4.2 Isolamento dos fungos endofíticos

No laboratório, as folhas passaram por procedimento de desinfestação (ARAÚJO *et al.*, 2010), com lavagem em água corrente e solução Tween 80 (0,01%), para a remoção dos resíduos (poeira, solo, microrganismos epifíticos e outros contaminantes) e secas em papel toalha. Para desinfecção, dentro de câmara asséptica, as folhas foram mergulhadas sequencialmente em frascos contendo: etanol 70% por 1 min, hipoclorito de sódio (NaOCl) 3% por 3 min e etanol 70% por 30 s e, por fim, enxaguadas em água destilada estéril.

Em placas de Petri, contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar, microgranulado, marca Merck), ajustado para pH 6,8 e com adição do fármaco antibiótico Amoxicilina ($100\mu\text{g mL}^{-1}$) para impedir o crescimento bacteriano, foram inoculados 3 fragmentos (5-7 mm) recortados do limbo da folha com auxílio de bisturi esterilizado. As placas foram incubadas a 28 °C e observadas diariamente por 7 dias.

As colônias emergentes a partir dos fragmentos foliares (Figura 1) foram inoculadas em novas placas contendo meio BDA e levadas novamente para estufa a 28 °C por mais 7 dias. Esse procedimento foi realizado até a obtenção de colônias puras. Os isolados foram mantidos sob refrigeração (4 °C) armazenados em placas de Petri e tubos de ensaio com tampa e crescidos em meio BDA novo periodicamente.

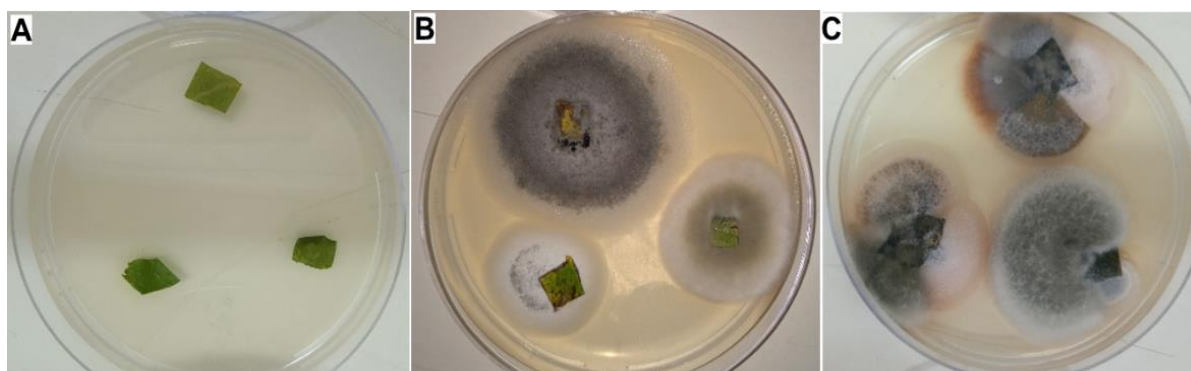


Figura 5 Emergência dos fungos endofíticos a partir dos fragmentos foliares. A) Fragmentos recém inoculados na placa com meio BDA; B) Emergência de um fungo por fragmento; C) emergência de dois ou mais fungos por fragmento).

4.3 Determinação da frequência e diversidade endofítica

O número de colônias fúngicas, que emergiram dos fragmentos foliares de ambas as coletas, foi computado para cálculo o da frequência de colonização (FC%), relacionado ao percentual de emergência de fungos por planta antes (AF) e depois (DF) da aplicação do

fungicida na lavoura e frequência relativa (FR%) e absoluta (FA%), referente ao percentual de isolados dentro de cada gênero identificado e o percentual de cada gênero em relação ao total de isolados obtidos, respectivamente. Para avaliar os índices ecológicos de diversidade, foram calculados os índices de Simpson ($D = \sum P_i^2$), de Shannon-Wiener ($H' = -\sum P_i \log P_i$) e de Pielou ($e = H'S$) (ODUM, 1983; URAMOTO; WALDER; ZUCCHI, 2005).

4.4 Sensibilidade dos fungos isolados ao fungicida

Exemplares de cada fungo endofítico isolado foram avaliados quanto à resistência ao fungicida, por meio do cultivo em meio Ágar Sabouraud Dextrose, composto por (g L⁻¹): dextrose (40,0), peptona (10,0) e ágar (20,0), em pH 5,6, esterilizado em autoclave, a 121 °C, por 15 min.

Com base na concentração original do fungicida (Trifloxistrobina = 150 g L⁻¹ + Protioconazol = 175 g L⁻¹), que totaliza 325 g L⁻¹ de ingrediente ativo, foram preparadas duas soluções estoque (SE) em água destilada estéril, nas diluições de 1:100 e 1:1000. As três concentrações testadas no meio foram: 0,2, 2,0 e 3,8 mg L⁻¹, obtidas por meio de adição de quantidades adequadas das soluções estoque.

Após a solidificação do meio, discos de micélio de 5 mm foram inoculados no centro das placas de Petri com o meio acrescido do fungicida em triplicata para cada uma das concentrações. As placas foram incubadas a 28°C por até 7 dias. O controle foi realizado inoculando os fungos em meio sem fungicida.

As medições do diâmetro das colônias foram realizadas observando-se diariamente o crescimento dos fungos nas placas controle. Aqueles de crescimento mais rápido foram medidos antes de atingirem a borda da placa e os demais foram medidos somente no sétimo dia. Foi calculado o percentual de inibição do crescimento micelial (PIC) baseado no que foi descrito por Menten *et al.* (1976), comparando-se o crescimento radial de cada tratamento com o de sua testemunha, conforme fórmula:

$$\text{PIC (\%)} = \left(\frac{\text{cresc.radial testemunha} - \text{cresc.radial tratamento}}{\text{cresc.radial testemunha}} \right) * 100 \quad (1)$$

4.5 Identificação taxonômica dos fungos

Todos os fungos isolados foram agrupados em morfogrupos e cada morfogrupo foi descrito conforme seu aspecto morfológico, como coloração e textura do micélio, variações no formato, elevação e borda das colônias. Também foram realizados microcultivos para visualização das estruturas microscópicas (somáticas e reprodutivas), nos quais os fungos foram inoculados em cubos de meio BDA sobre lâminas de vidro, cobertos com lamínula e incubados dentro de placas de Petri esterilizadas a 28 °C, por 3 dias. As lamínulas com fragmentos das estruturas do fungo foram fixadas em lâminas com uma gota de lactofenol e visualizadas em microscópio óptico com sistema de captura de imagens (marca Olympus).

As informações obtidas de forma macro e microscópica dos fungos foram utilizadas para a identificação taxonômica em nível de gênero utilizando guias e manuais para identificação de fungos de soja (HENNING *et al.*, 2014; HENNING, 2015) e atlas para identificação de fungos de solo e sementes (WATANABE, 2010).

O fungo endofítico com maior destaque nos ensaios de atividade enzimática foi submetido à identificação taxonômica em nível de espécie por meio de sequenciamento das regiões *Internal Transcribed Spacer* (ITS) do DNA ribossomal do fungo, conforme metodologia descrita por White *et al.* (1990). O DNA do fungo foi extraído a partir da colônia de placa de BDA e a região ITS do DNA ribossomal foi amplificada utilizando *primers* iniciadores universais ITS1 (5'- CCGTAGGTGAACCTGCGG-3' forward) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' reverse).

O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1% em tampão Tris-EDTA, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV. O sequenciamento dos produtos amplificados da região ITS1 e ITS4 do fungo foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Alvorada - RS, Brasil) e as sequências determinadas foram comparadas com outras sequências depositadas no banco de dados do Centro Nacional de Informações em Biotecnologia (NCBI/GenBank) utilizando a ferramenta básica de alinhamento local *BLAST*.

4.6 Prospecção enzimática

4.6.1 Triagem para atividade enzimática em cultivo em meio sólido

Os morfogrupos foram submetidos a ensaios para detectar o potencial de produção de algumas enzimas. As enzimas avaliadas foram: CMCase, xilanase, protease e amilase. Fungos filamentosos em geral são descritos como bons produtores dessas enzimas e o teste em cultivo com meio sólido possibilita uma triagem inicial.

4.6.1.1 CMCases

Para detectar a presença de atividade celulolítica, foi utilizado o meio de cultura CMC-ágar (KALIM; ALI, 2016) com modificações, composto por (g L⁻¹): extrato de levedura (3,0), peptona (1,0), NaCl (1,5), NaNO₃ (1,0), KH₂PO₄ (1,0), MgSO₄ (0,3), carboximetilcelulose (CMC) (10,0), ágar (20,0) e água destilada em quantidade suficiente para completar o volume. O pH foi ajustado para 5,5 e o meio autoclavado e envasado em placas de Petri. Os fungos foram inoculados em triplicata e incubados em estufa a 28 °C por 60 h e a 50 °C nas últimas 12 h, pois o choque térmico favorece a revelação do halo de degradação. Logo após, as placas foram retiradas da estufa e coradas com corante vermelho Congo (0,5%) por 10 min. Em seguida, foram lavadas abundantemente com solução de NaCl 1 M. O halo de degradação aparece como uma zona mais clara ao redor da colônia.

4.6.1.2 Xilanases

Para detectar a presença de atividade xilanolítica, foi utilizado o meio xilano-ágar (KALIM; ALI, 2016) com modificações, composto por (g L⁻¹): extrato de levedura (3,0), peptona (1,0), NaCl (1,5), NaNO₃ (1,0), KH₂PO₄ (1,0), MgSO₄ (0,3), xilano de *beechwood* (marca Carbosynth) (5,0), ágar (20,0) e água destilada em quantidade suficiente para completar o volume. O pH foi ajustado para 5,5 e o meio foi autoclavado e envasado em placas de Petri. Os fungos foram inoculados em triplicata e incubados em estufa a 28 °C por 60 h e a 50 °C nas últimas 12 h. Após o crescimento, as placas foram coradas com corante vermelho Congo (0,5%) por 10 min e lavadas com solução de NaCl 1 M. O halo de degradação se apresenta como uma zona amarelada ao redor da colônia.

4.6.1.3 Proteases

Para o ensaio de atividade proteolítica, foi utilizado o meio 1% ágar-leite desnatado descrito por Abdelmoteleb et. al. (2017) que requer a preparação de uma solução estoque a 10% (p/v) de leite desnatado em pó e água destilada, autoclavada separadamente do restante do meio. O meio restante contém (g L⁻¹): extrato de carne (1,5), glicose (1,0), ágar (18,0) e água destilada em quantidade suficiente para completar o volume. A solução estoque de leite desnatado foi então misturada ao meio a uma concentração final de 1%, ainda quente, e envasado nas placas. Os fungos foram inoculados em triplicata e incubados em estufa a 28°C por 72 h. O halo de degradação aparece sem a necessidade de reveladores como uma zona transparente ao redor da colônia.

4.6.1.4 Amilases

Para o ensaio de atividade amilolítica, foi utilizado o meio 2% amido (KHOKHAR; MUKHTAR; MUSHTAQ, 2011) adaptado, contendo (g L⁻¹): NaNO₃ (1,0), KH₂PO₄ (1,0), MgSO₄ (0,5), FeSO₄ (0,01), amido solúvel (20,0), ágar (20,0) e água destilada em quantidade suficiente para completar o volume. O pH foi ajustado para 5,5 e o meio foi autoclavado e envasado em placas. Os fungos foram inoculados em triplicata e incubados em estufa a 28 °C por 72 h. Após o crescimento, foram corados com solução iodo 1% em iodeto de potássio 2% por 10 min e lavados com solução de NaCl 1 M. O halo de degradação se revela como uma zona clara ao redor da colônia.

4.6.1.5 Cálculo de índice enzimático

Todas as medições do diâmetro das colônias e dos halos formados para todas as enzimas testadas foram realizadas com auxílio de paquímetro digital (marca Profiel) e utilizadas para o cálculo de Índice Enzimático (IE) conforme equação:

$$\text{Índice Enzimático (IE)}: \frac{\text{Diâmetro do halo (mm)}}{\text{Diâmetro da colônia (mm)}} \quad (2)$$

Os dados brutos foram expressos por médias \pm desvio padrão e analisadas estatisticamente por meio de análise de variância e teste Tukey, a 5% de significância, utilizando o *software* estatístico Minitab versão 21.2.

4.7 Triagem para atividade enzimática em cultivo submerso

Os fungos foram previamente crescidos em meio BDA (5 dias) e o inóculo foi composto por 5 discos (5 mm) de micélio inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100mL de meio líquido e incubados em incubadora *shaker*, com agitação a 96 rpm, temperatura de 28 °C e tempo de 240 h.

A composição do meio líquido utilizado (BURLACU; CORNEA; ISRAEL-ROMING, 2016) foi (g L⁻¹): peptona (2,0), MgSO₄ (0,05), CaCl₂ (0,005), NaNO₃ (0,005), FeSO₄ (0,009), ZnSO₄ (0,002), MnSO₄ (0,012), KCl (0,23), KH₂PO₄ (0,23), Carboximetilcelulose (5,0) para os fungos com potencial para produção de CMCase e xilano de *beechwood* (5,0) para aqueles com potencial para xilanase.

Foram coletadas amostras (2,5 mL) do meio de cultivo nos tempos: 48, 96, 144, 192 e 240 horas. As alíquotas foram centrifugadas a 2000 rpm por 20 min e o sobrenadante foi utilizado para determinação de açúcares redutores pelo protocolo descrito por Miller (1959), com adaptação, que consistiu na adição de 1 mL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) nos tubos de ensaio, contendo amostra seguido de fervura a 100 °C por 5 min. Após resfriamento, foram adicionados 3 mL de água destilada aos tubos e realizada a leitura em comprimento de onda de 540 nm, em espectrofotômetro UV-VIS (600 plus – marca FEMTO). Os resultados foram obtidos utilizando-se curva padrão de glicose ou xilose.

Para determinar a atividade de CMCase foi adicionado 0,5 mL do extrato enzimático bruto e 0,5 mL do substrato (CMC 1% preparado em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0), em tubos de ensaio que foram incubados em banho termostático a 40 °C por 10 min. A reação foi finalizada com adição de 1 mL de DNS e, em seguida, foi determinada a quantidade de açúcares redutores liberados pela enzima, pelo método de Miller (1959).

Para excluir a quantidade de açúcar redutor que já estava presente no extrato enzimático bruto, foram utilizados brancos para cada amostra, que consistiam em tubos contendo apenas o substrato sem amostra. Os brancos passaram por todos os processos juntamente com os tubos das amostras e receberam 0,5 mL do extrato enzimático bruto somente após a adição de 1 mL de DNS, sendo levados imediatamente à fervura para que não houvesse qualquer reação. A quantidade de açúcares redutores detectados nos brancos foi descontada dos valores obtidos nas amostras.

Como resultado esperado, considerou-se uma unidade de CMCase correspondente à quantidade de enzima que liberou 1 µmol de açúcar redutor como equivalente de glicose por minuto e por mililitro de mistura de reação, nas condições de ensaio especificadas, que pode ser expressa em µmol mL⁻¹ min⁻¹ ou U mL⁻¹.

Para a atividade de xilanase, foi adicionado 0,5 mL do extrato enzimático bruto e 0,5 mL do substrato xilano (xilano de *beechwood* 0,6%, preparado em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,3), em tubos de ensaio que foram incubados em banho termostático a 40 °C por 10 min. Nesse ensaio também foram utilizados brancos para excluir a quantidade de açúcares já presentes no extrato enzimático bruto. A reação foi finalizada com a adição de 1 mL do reagente DNS e realizada a determinação de açúcares redutores liberados pela enzima (MILLER, 1959).

Semelhante ao ensaio de atividade de CMCase, entende-se que uma unidade de xilanase corresponde à quantidade de enzima que liberou 1 μmol de açúcar redutor como equivalente de xilose por minuto e por mililitro de mistura de reação nas condições de ensaio especificadas que pode ser expressa em $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ou U mL^{-1} .

4.8 Quantificação de proteínas

A concentração de proteína nos extratos brutos foi estimada pelo método de Bradford (1976), utilizando curva-padrão construída com albumina sérica bovina (BSA). A atividade específica foi expressa em unidades de enzima por mg de proteína total obtida (U mg^{-1}) e a atividade específica em $\text{U mg proteína}^{-1}$.

4.9 Avaliação do uso de biomassa lignocelulósica como substrato

Para realização desse ensaio, foram utilizados bagaço e palha de cana-de-açúcar provenientes da safra 2019/20, doados respectivamente pela Usina Pederneiras localizada na cidade de Tietê, SP e pela Usina Santa Lúcia, localizada na cidade Araras, SP e gentilmente cedidos para este estudo pela Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP). Tanto a palha quanto o bagaço foram inicialmente triturados em moinho de facas e peneirados em peneira granulométrica (tamis) de 20 mesh e secos em estufa a 50 °C antes do uso.

O meio de cultivo teve como base o mesmo meio líquido utilizado nos ensaios anteriores, descrito por Burlacu, Cornea e Israel-Roming (2016), substituindo a fonte de carbono (CMC ou xilano) por 1% de biomassa lignocelulósica nas seguintes proporções: 100% bagaço, 75% de bagaço + 25% de palha, 50% de bagaço + 50% de palha, 25% de bagaço + 75% de palha e 100% palha.

O fungo selecionado para ser utilizado neste ensaio foi o que demonstrou melhores resultados, quando avaliado em meio líquido contendo CMC e xilano. O fungo foi previamente

crescido em meio BDA por 5 dias e 5 discos (5 mm) de micélio foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio líquido com as combinações de resíduos já mencionadas. Os frascos foram incubados em incubadora *shaker* com agitação a 96 rpm, temperatura de 28°C e tempo de 6 dias. Foram coletadas amostras (2,5 mL) da porção líquida nos tempos: 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. As alíquotas foram centrifugadas e o sobrenadante utilizado para a avaliação da atividade das enzimas (CMCase e xilanase), conforme metodologia já descrita.

4.10 Cinética enzimática

Para a obtenção da enzima para a realização dos ensaios de avaliação dos parâmetros cinéticos (efeito do pH, temperatura e concentração de substrato), o meio de cultivo utilizado foi o meio líquido com 50% bagaço + 50% palha, conforme descrito na seção 4.9 deste trabalho, sob as condições de temperatura e agitação mencionadas, sendo a coleta realizada a cada 24 h, durante um período de 144 h.

4.10.1 Efeito do pH na atividade e estabilidade da xilanase

Para avaliar o efeito do pH na atividade da xilanase, incubou-se 0,5 mL do extrato enzimático bruto com 0,5 mL de substrato xilano de *beechwood* 0,6%, preparado em tampão McIlvaine (1921), com dez diferentes valores de pH (3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0). A reação ocorreu em banho termostático na temperatura de 40 °C por 10 min. Em seguida, a reação foi interrompida e realizada a quantificação de açúcares redutores (MILLER, 1959) para determinação da atividade enzimática.

Para avaliar a estabilidade da enzima nos diferentes pHs, foi incubado 0,5 mL do extrato enzimático com 0,5 mL de tampão McIlvaine (1921), em cada um dos diferentes pHs, na ausência de substrato, na temperatura de 25 °C, em banho termostático, durante 40 min.

Após esse tempo, adicionou-se 0,5 mL de substrato (xilano 0,6% em tampão McIlvaine em cada valor de pH) aos tubos, que foram incubados a 40 °C por 10 min para que ocorresse a reação enzimática. Em seguida, realizou-se a análise de açúcares redutores.

A partir dos resultados obtidos, avaliou-se a estabilidade da enzima no pH ótimo, mantendo-se o tubo com a mistura de reação a 4°C por 24 h. Passado esse tempo, a amostra foi submetida ao ensaio de atividade enzimática residual.

4.10.2 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da xilanase

A atividade enzimática da xilanase em função da temperatura foi avaliada incubando-se 0,5 mL de extrato enzimático bruto com 0,5 mL de substrato xilano (xilano de *beechwood* 0,6%, preparado em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,3), em cinco diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60 e 70 °C), em banho termostático por 10 min. Em seguida, realizou-se a quantificação de açúcares redutores (MILLER, 1959) e determinação da atividade enzimática.

Para determinar a estabilidade da enzima frente à temperatura, incubou-se 0,5 mL do extrato bruto enzimático em 0,5 mL de tampão 0,05 M, pH 5,3 (sem substrato), nas temperaturas de 40, 50, 60 e 70 °C, nos tempos de 30 e 60 min, comparando-se com a atividade inicial (tempo 0). As amostras então foram retiradas do banho e imediatamente colocadas em banho de gelo por 5 min. Na sequência, os tubos foram incubados na temperatura de 40 °C, adicionando 0,5 mL de substrato xilano 0,6% para a realização da reação enzimática por 10 min. Logo após, realizou-se a quantificação de açúcares redutores e determinação da atividade enzimática.

4.10.3 Parâmetros cinéticos

Para determinação dos parâmetros cinéticos da xilanase, a reação foi realizada incubando-se 0,5 mL do extrato enzimático bruto com 0,5 mL de substrato xilano de *beechwood*, preparado em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,3, em uma faixa de concentração de 3 a 50 mg mL⁻¹. Os tubos foram incubados a 40 °C por 10 min e, em seguida, procedeu-se a dosagem de açúcares redutores pelo método de DNS para determinação da atividade enzimática.

As constantes cinéticas (K_m e $V_{Máx}$) foram determinadas pelo método gráfico de Lineweaver-Burk (1934), plotando-se $1/S$ versus $1/V$.

4.11 Análise estatística


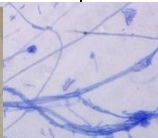
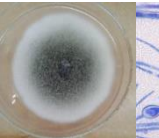



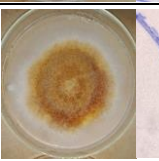

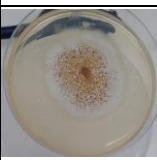
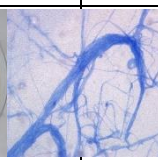
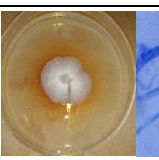
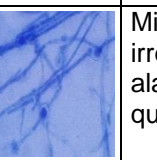

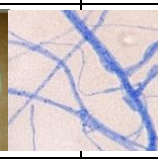
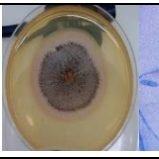


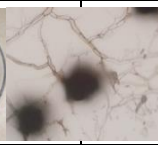
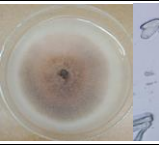
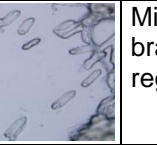

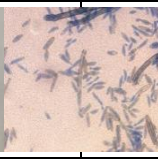
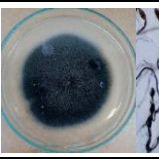

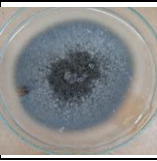

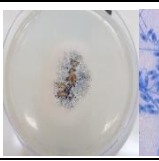
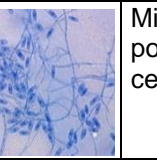
Os dados brutos foram analisados estatisticamente por meio de análise de variância e teste Tukey, a 5% de significância, utilizando o *software* estatístico Minitab versão 21.2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e identificação dos fungos endofíticos

O isolamento de fungos endofíticos das 23 plantas de soja avaliadas resultou, inicialmente, em 259 fungos isolados que emergiram a partir dos fragmentos foliares incubados em meio BDA. Desse total, 122 isolados foram obtidos a partir da coleta realizada antes da aplicação do fungicida (Trifloxistrobina + Protioconazol) e 137 isolados foram obtidos na coleta realizada 14 dias após a aplicação. Os 259 isolados foram agrupados conforme semelhanças morfológicas e resultaram nos seguintes gêneros identificados: *Aspergillus*, *Diaporthe*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Cladosporium*, *Bipolaris*, *Cadophora*, *Rhizoctonia*, *Colletotrichum* e *Alternaria* (Quadro 3).

Quadro 3 Identificação ao nível de gênero, com base nos aspectos morfológicos macro e microscópicos das colônias dos isolados endofíticos obtidos das plantas de soja

M1 (A4P2F1) <i>Aspergillus</i>	Micélio amarelo escuro com contorno branco, formato elevado, circular textura aveludada.			M10 (A8P5F3.3) <i>Cadophora</i>			Micélio verde com borda branca, elevado, circular e aveludado.
M3 (A14P2F3) <i>Diaporthe</i>	Micélio branco, filamentoso, aspecto "cotony/woolly" (lã de ovelha).			M11 (A4P5F3.3) <i>Rizhoctonia</i>			Micélio marrom amarelado com borda branca, margem, irregular, aveludado.
M4 (A1P3F1) <i>Trichoderma</i>	Micélio branco com muitos pontos marrons centrais, forma circular, plana e textura levemente cremosa.			M12 (A5P3F1.2) <i>Colletotrichum</i>			Micélio branco, margem irregular, com uma zona alaranjada ao redor da colônia que escurece o meio de cultura.
M6 (A6P5F2) <i>Fusarium</i>	Micélio branco levemente rosado, com uma zona alaranjada ao redor da colônia que escurece o meio de cultura.			M13 (A9P2F1) <i>Colletotrichum</i>			Borda branca e centro com muitos pontos pretos que dá o tom cinza, circular, plana, margem inteira e regular.
M7 (A13F5F1.2) <i>Macrophomina</i>	Micélio escuro, filamentoso, aveludado			M14 (A10P4F2) <i>Trichoderma</i>			Micélio marrom com borda branca, circular, plana, margem regular.
M8 (A6P4F1) <i>Cladosporium</i>	Micélio verde escuro acinzentado, superfície elevada e rugosa.			M15 (A15P5F3.2) <i>Alternaria</i>			Micélio verde escuro com borda branca, circular, margem regular, aveludado.
M9 (A22P4F1) <i>Bipolaris</i>	Micélio cinza escuro elevado, com uma fina borda branca, formato circular.			M17 (A7P4F2) <i>Diaporthe</i>			Micélio branco, com muitos pontos pretos e gotículas ao centro alaranjadas

Fonte: A autora.

A frequência de colonização (FC%) entre as plantas amostradas (P1 a P23) demonstrou que, em média, 35% das plantas apresentaram FC% acima de 100. Isso significa que o número de isolados obtidos em algumas plantas foi maior que o número de fragmentos incubados, ou seja, em ambas as coletas, houve casos em que dois ou mais fungos saíram do mesmo fragmento (Figura 6). Além disso, 52% das plantas tiveram FC% maior após a aplicação do fungicida (Tabela 1). Foi possível observar também que em duas plantas (P16 e P19) não houve emergência de fungos em nenhum dos fragmentos incubados na primeira coleta (AF), ocorrendo emergência somente nos fragmentos da coleta após a aplicação do fungicida.

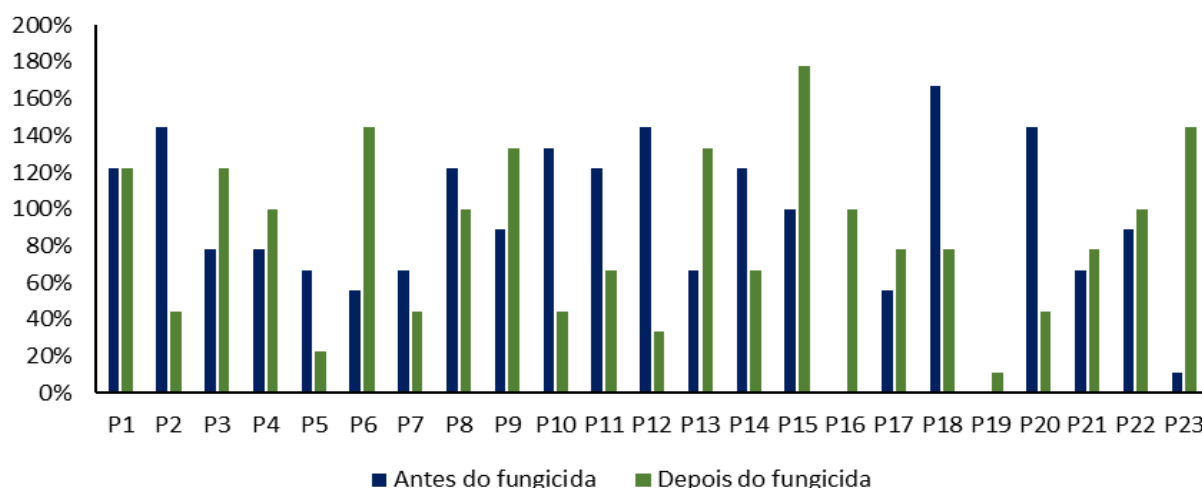


Figura 6 Comparação do percentual de colonização antes e depois da aplicação do fungicida na área plantada de soja.

Ainda em relação aos números obtidos do isolamento antes e depois da aplicação do fungicida sobre o cultivo da soja, os resultados demonstraram que o número de isolados obtidos na segunda coleta não sofreu influência da ação do fungicida. Do total de 259 isolados em ambas as coletas, foram obtidos 137 isolados após a aplicação do fungicida em comparação com os 122 isolados da primeira coleta realizada antes da aplicação. Na Tabela 1 estão demonstrados os resultados em percentual da frequência de colonização relativa (FCR%) dos isolados endofíticos em cada gênero e a frequência de colonização absoluta (FCA%) do número obtido, em cada gênero em relação ao total de fungos isolados.

Tabela 1 Avaliação da frequência de colonização dos isolados endofíticos dentro de cada gênero identificado, nas duas coletas avaliadas: antes e após a aplicação do fungicida

Gênero	Total de isolados/gênero	FCA%	Nº isolados antes do fungicida		Nº isolados após o fungicida	
				FCR%		FCR%
<i>Diaporthe</i>	100	38,6%	63	51,6%	37	27,0%
<i>Alternaria</i>	66	25,5%	24	19,7%	42	30,7%
<i>Trichoderma</i>	27	10,4%	12	9,8%	15	10,9%
<i>Colletotrichum</i>	23	8,9%	10	8,2%	13	9,5%
<i>Fusarium</i>	15	5,8%	3	2,5%	12	8,8%
<i>Cladosporium</i>	10	3,9%	6	4,9%	4	2,9%
<i>Macrophomina</i>	6	2,3%	0	0,0%	6	4,4%
<i>Cadophora</i>	5	1,9%	0	0,0%	5	3,6%
<i>Bipolaris</i>	4	1,5%	2	1,6%	2	1,5%
<i>Rhizoctonia</i>	2	0,8%	1	0,8%	1	0,7%
<i>Aspergillus</i>	1	0,4%	1	0,8%	0	0,0%

Os gêneros *Diaporthe*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Colletotrichum* e *Fusarium* foram os mais abundantes com percentual maior que 5% do total de isolados endofíticos somados nas duas coletas realizadas. *Diaporthe* e *Alternaria* por sua vez são os gêneros predominantes representando 38,6% e 25,5%, respectivamente. Porém, com percentuais diferentes obtidos entre as coletas: *Diaporthe* foi mais abundante antes da aplicação do fungicida com 51,6% e reduzida a 27% na coleta após o fungicida, diferentemente do gênero *Alternaria* que teve 19,7% de frequência de colonização antes do fungicida e aumentou para 30,7% após a aplicação do fungicida.

Os gêneros *Macrophomina* e *Cadophora* não foram encontrados na primeira coleta e só foram obtidos a partir da segunda coleta, mesmo após a aplicação do fungicida, resultando em 4,4 e 3,6% do total de isolados.

Fernandes *et al.* (2015), semelhantemente a este estudo, realizaram o isolamento de fungos endofíticos de soja, comparando a diversidade de isolados das folhas e das raízes em soja cultivada na ausência de defensivos agrícolas (orgânica), em área experimental da Universidade Federal de Viçosa – MG. Dos 229 isolados (187 = folhas e 42 = raízes) foram identificados 40 gêneros, sendo que os mais abundantes isolados das folhas foram do gênero *Phoma* (29%) e *Colletotrichum* (12%) e nas raízes, majoritariamente, o gênero *Fusarium* com 79% dos 42 isolados.

Batzer e Mueller (2020) também estudaram endofíticos de folhas e caules da soja e o impacto do uso de fungicida (Priaxor® - BASF) em soja cultivada em Iowa nos EUA, usando diferentes cultivares, durante as safras de 2015, 2016 e 2017. Em comparação com os resultados deste estudo, eles também obtiveram abundância do gênero *Alternaria*, seguido de *Colletotrichum* e *Diaporthe* e, também, puderam observar que não houve diminuição

significativa na frequência endofítica e na diversidade dos gêneros com a aplicação do fungicida, corroborados pelos resultados desta pesquisa.

Importantes características a serem consideradas no processo de isolamento são a presença, ausência e abundância dos fungos endofíticos nas plantas. Larran *et al.* (2002) isolaram 16 espécies diferentes de fungos endofíticos de soja e obtiveram como resultados frequências de colonização de 70% para a espécie *Alternaria alternata*, seguido de 15% para *Glomerella cingulata* e as demais variando somente entre 0,4% e 5,5%, demonstrando diversidade de espécies obtidas de um mesmo hospedeiro vegetal, mas somente algumas são abundantes e contrastam com as demais.

É possível notar que gêneros que possuem espécies amplamente relatadas como fitopatógenos têm sido isolados como endófitos, como é o caso de *Macrophomina phaseolina*, um conhecido fitopatógeno, benéfico para outras plantas e o *Colletotrichum* um gênero comum de causadores de doenças de plantas, descrito e avaliado como endofítico de outras plantas sem manifestar doença (ADELEKE *et al.*, 2022). Azevedo (2014) relatou que isolados do gênero *Guinardia* são morfologicamente muito semelhantes ao patogênico *Guignardia citricarpa* e diferiam apenas em relação às bainhas dos conídios e cor da colônia em diferentes meios de cultivo.

Neste estudo, os fungos obtidos dos gêneros *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium*, *Macrophomina*, *Rhizoctonia*, e *Cadophora* já são conhecidos por possuírem espécies relatadas como patógenos, inclusive da própria soja. Já os gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Cladosporium* não são essencialmente patógenos de plantas e podem ser encontrados também no solo ou em locais de armazenamento de grãos e sementes (HENNING, 2015). Ou seja, os patógenos identificados podem ter sido isolados em condição endofítica antes da manifestação da doença ou em modo latente. Alguns autores citam que muitos fungos endofíticos são presumivelmente evoluídos a partir de fungos fitopatogênicos, permanecendo assintomáticos por muitos anos ou gerações e só se tornam parasitas quando seus hospedeiros estão em desequilíbrio ou senescência (DESHMUKH *et al.*, 2006; KOGEL; FRANKEN; HÜCKELHOVEN, 2006). Adicionalmente, White *et al.* (2019) descrevem que alguns endófitos são microrganismos que alternam entre uma fase de vida livre nos solos e uma fase endofítica e que outros são disseminados pelas sementes.

Algo importante a salientar é que os estudos dos endófitos, nas últimas décadas, sugerem que a planta hospedeira é capaz de identificar o microrganismo endofítico mutualístico (benéfico) daqueles que agem como patógenos. Isso ocorre por meio de comunicações complexas desencadeadas pelas respostas imunes da planta hospedeira e de sinalizações emitidas pelo próprio endófito (LIU *et al.*, 2019).

5.2 Determinação dos índices de diversidade endofítica

Embora os resultados tenham demonstrado não haver diferença significativa entre as coletas antes e depois da aplicação do fungicida, observa-se que todos os índices da coleta após a aplicação são maiores que os índices calculados antes da utilização do fungicida (Tabela 2). A riqueza dos gêneros foi diferente entre as duas coletas realizadas pois, o gênero *Aspergillus* só foi obtido na primeira coleta e os gêneros *Macrophomina* e *Cadophora* só foram obtidos na segunda coleta resultando em uma riqueza de 9 gêneros antes da aplicação do fungicida e 10 após a aplicação do fungicida.

Em relação ao índice de *Shannon-Wiener* (H'), os valores obtidos foram de 1,480 (antes da aplicação do fungicida) e 1,854 (após o fungicida). Obter um valor menor que o valor teórico de H' máximo significa que a distribuição de isolados entre os gêneros é heterogênea e tende para a dominância de uma ou mais espécies. O índice de *Shannon-Wiener* (H') considera indivíduos escolhidos ao acaso em uma comunidade, sendo relativamente independentes do tamanho da amostra e confere peso maior às espécies raras (ocorrência menor que 5%). Contudo, comparando-se os valores antes e depois do fungicida, observa-se que o valor de H' após o fungicida está mais próximo do seu $H_{\text{máx}}$, demonstrando maior presença de gêneros dominantes do que antes do fungicida.

Tabela 2 Avaliação dos índices de diversidade aplicados à obtenção de isolados endofíticos de soja antes e após a aplicação do fungicida Trifloxistrobina + Protiokonazol

Índices	Antes do fungicida	Após o fungicida
Total de indivíduos (N)	122	137
Riqueza de gêneros (S)	9	10
<i>Simpson</i> (D)	0,325	0,200
<i>Simpson</i> (1-D)	0,675	0,800
<i>Shannon-Wiener</i> (H')	1,480	1,854
H' máximo	2,197	2,303
<i>Pielou</i> (e)	0,673	0,805

Os valores obtidos para o índice de *Simpson* (D): 0,325 e 0,200, demonstram alta diversidade dos gêneros nas duas coletas pois, quanto menor é valor de D, maior é a diversidade da amostra. Entretanto, alguns autores optam por avaliar o valor de 1-D por se tratar de um valor mais intuitivo e de melhor interpretação (URAMOTO; WALDER; ZUCCHI, 2005). Nesse caso, a escala varia de 0 a 1, em que 0 representa nenhuma diversidade e 1 determina alta diversidade. Neste estudo, os valores obtidos foram de 0,675 e 0,800, sendo possível perceber que ambas as coletas demonstraram alta diversidade e que a coleta após o fungicida foi relativamente mais diversa que antes do fungicida.

Por fim, o índice de *Pielou* (e) avalia a equitabilidade de isolados entre os gêneros. A escala de interpretação também varia de 0 a 1, em que 0 representa igualdade ou ausência de dominância e 1 alta dominância. Os valores obtidos foram de 0,673 e 0,805, que sugerem presença de dominância de alguns gêneros sobre outros, validando a dominância dos gêneros *Diaporthe* e *Alternaria* principalmente na coleta após o fungicida.

Xiao-Xuan *et al.* (2022) obtiveram resultados semelhantes ao avaliarem a diversidade de fungos endofíticos isolados de *Scutellaria baicalensis*, uma planta medicinal chinesa, e, também, obtiveram alta diversidade com valores de $D= 0,29$ e $H'= 1,51$, em que o gênero *Alternaria* foi mais abundante. Ming *et al.* (2022) encontraram diversidade $1-D$ de 0,89 no isolamento de fungos endofíticos de folhas de *Coptis chinensis* e H' de 2,447, em que os gêneros *Colletotrichum* e *Fusarium* foram dominantes.

Semelhantemente a este estudo, Fernandes *et al.* (2015) também avaliaram os índices de diversidade nos fungos endofíticos isolados de folhas e raízes de soja, cultivadas sem utilização de defensivos agrícolas. Foram obtidos valores de $1-D= 0,876$, $H'= 2,777$ e $e= 0,752$, no isolamento realizado a partir das folhas. Pode-se observar que os valores obtidos neste estudo corroboram os obtidos por Fernandes *et al.* (2015), reafirmando a alta diversidade endofítica que habita as plantas de soja e a presença de gêneros com maior dominância sobre os demais.

A diversidade de endófitos associados às plantas também pode variar temporal e espacialmente (EK-RAMOS *et al.*, 2013). Gonçalves (2016) afirma que mesmo as plantas que crescem em condições ambientais semelhantes não abrigam os mesmos endófitos. Esse “recrutamento” diferencial de endófitos foi observado em outros estudos de populações endofíticas de plantas que crescem no mesmo local, como o estudo de Ulrich, Stauber e Ewald (2008), em que, ao estudarem a diversidade de endófitos em quatro clones de álamo, notaram que os clones abrigavam populações endofíticas distintas.

Já o estudo metagenômico de microbiomas associados a raízes de arroz, usando plantas cultivadas sob condições controladas em campo, demonstrou que a composição dos consórcios microbianos varia entre aqueles que habitam o interior das raízes (endosfera), a superfície das raízes (rizoplano) e os arredores entre os capilares (rizosfera). Esses resultados sugerem que uma microbiota central pode ser recrutada de ambientes microbianos diversos (LEBEIS, 2014).

Há décadas, existe a necessidade de decifrar a complexa diversidade estrutural e funcional da riqueza de espécies, que desafiam as metodologias analíticas convencionais. Portanto, para suprir a lacuna na compreensão das comunicações microbianas como um todo, a nova era de técnicas de sequenciamento de próxima geração e abordagens moleculares modernas podem decifrar a composição e a função da comunidade microbiana endofítica de forma mais ampla (GUPTA *et al.*, 2021).

5.3 Sensibilidade dos fungos isolados ao fungicida

Este ensaio teve como objetivo avaliar o crescimento dos fungos endofíticos na presença do mesmo fungicida utilizado no cultivo das plantas de soja coletadas para este estudo (Trifloxistrobina + Protiocanazol). Para isso, foram utilizadas 3 concentrações diferentes (0,2, 2,0 e 3,8 mg mL⁻¹), dissolvidas em meio BDA, em triplicata, nas quais os fungos foram medidos e o percentual de inibição do crescimento (PIC) foi calculado frente à placa controle de cada fungo avaliado (Tabela 3).

Tabela 3 Percentual de inibição do crescimento (PIC) dos isolados endofíticos avaliados na presença do fungicida no meio de cultivo (sólido) em 3 diferentes concentrações

Código	Gêneros	(Trifloxistrobina 150 + Protiocanazol 175 g L ⁻¹)		
		0,2 mg L ⁻¹	2,0 mg L ⁻¹	3,8 mg L ⁻¹
M1 (A4P2F1)	<i>Aspergillus</i>	30,31 ^{abc}	51,49 ^{ab}	
M3 (A14P2F3)	<i>Diaporthe</i>	5,56 ^e	40,01 ^{abc}	54,85 ^{ab}
M6 (A6P5F2)	<i>Fusarium</i>	26,85 ^{abc}	43,91 ^{abc}	42,64 ^{cd}
M7 (A13P5F1.2)	<i>Macrophomina</i>	8,33 ^e	37,56 ^{abc}	59,05 ^a
M8 (A6P4F1)	<i>Cladosporium</i>	8,58 ^e	7,73 ^c	0,00 ^f
M9 (A22P4F1)	<i>Bipolaris</i>	22,11 ^{cd}	18,03 ^{bc}	34,39 ^d
M10 (A8P5F3.3)	<i>Cadophora</i>	25,71 ^{bc}	43,76 ^{abc}	45,86 ^{bc}
M11 (A4P5F3.3)	<i>Rhizoctonia</i>	24,56 ^{bc}	33,90 ^{abc}	47,30 ^{bc}
M12 (A5P3F1.2)	<i>Colletotrichum</i>	38,81 ^a	68,42 ^a	
M13 (A9P2F1)	<i>Colletotrichum</i>	29,94 ^{abc}	39,62 ^{abc}	
M14 (A10P4F2)	<i>Trichoderma</i>	3,72 ^e	68,01 ^a	
M15 (A15P5F3.2)	<i>Alternaria</i>	10,46 ^{de}	10,71 ^c	19,60 ^e
M17 (A7P4F2)	<i>Diaporthe</i>	36,32 ^{ab}	71,44 ^a	

Nota: Letras diferentes correspondem a médias estatisticamente diferentes, a 5% de significância no teste Tukey, em cada ensaio.

Os resultados obtidos demonstram que todos os fungos endofíticos avaliados foram capazes de crescer na presença do fungicida. Na concentração menor (0,2mg L⁻¹) inclusive, todos os fungos tiveram percentual de inibição menor que 50%, indicando baixa sensibilidade ao fungicida na concentração testada.

Dessa forma, todos os fungos foram então avaliados na concentração de 2,0 mg L⁻¹ (10 vezes maior). Nessa concentração, somente 4 fungos (38%) apresentaram inibição ≥ 50% e pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Trichoderma* e *Diaporthe*. Os demais fungos menos sensíveis foram testados também na concentração de 3,8 mg L⁻¹.

Quando expostos à concentração maior (3,8 mg L⁻¹), apenas 2 fungos apresentaram inibição ≥ 50%: *Diaporthe* e *Macrophomina*. Os fungos *Cladosporium*, *Bipolaris*, *Cadophora*, *Rhizoctonia* e *Alternaria* demonstraram ser os menos sensíveis à presença do fungicida no meio de cultivo sólido.

Oliveira, Souza e Martins (2003) avaliaram a sensibilidade de fungos do gênero *Alternaria* e *Sclerotinia* na presença de dois fungicidas sistêmicos (Azoxistrobina e Propiconazol), utilizando também três concentrações diferentes, em placas de Petri com meio BDA, nas concentrações de 62,5, 125 e 187,5 ppm. O fungicida Azoxistrobina também não foi capaz de inibir significativamente o crescimento micelial do fungo *Alternaria*.

Santos e Silva (2014) mencionam que o controle químico ainda é o método mais utilizado no meio agrícola e de forma intensiva, mas o seu uso também está relacionado a várias desvantagens, como: resistência microbiana, contaminação ambiental, contaminação do produtor e um elevado custo.

Dessa maneira, a descoberta de microrganismos que possam vir a ser utilizados na inibição dos microrganismos fitopatógenos é uma alternativa que vem ganhando espaço e pode reduzir a utilização desses fitossanitários na agricultura (SOUSA; SOARES; GARRIDO, 2009).

O monitoramento da resistência aos fungicidas é importante para o manejo integrado de doenças e permite evitar custos desnecessários com aplicações excessivas e contaminação ambiental (BAYER, 2020). Para o caso dos endofíticos, a descoberta de fungos resistentes aos fungicidas permite que estejam presentes no interior da planta atuando em prol do seu desenvolvimento e possibilita a seleção de espécies para a biorremediação.

A combinação de Protioconazol, do grupo dos Inibidores da Desmetilação C-14 (DMI) e Trifloxistrobina, uma estrobirulina pertencente ao grupo dos inibidores da Quinona Oxidase (QOI), é um produto classificado como extremamente tóxico, muito perigoso e altamente persistente ao meio ambiente (BAYER, 2020).

Portanto, os fungos endofíticos obtidos neste estudo, que demonstraram baixa sensibilidade ao fungicida (*Cladosporium*, *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cadophora*, *Rhizoctonia*), possuem também potencial para serem avaliados quanto à capacidade de degradação desse composto visando à biorremediação de solos impactados pelo uso prolongado ou até mesmo devido a acidentes ambientais causados por esse agroquímico.

Alguns autores têm relatado experimentos *in vitro*, avaliando fungos endofíticos que apresentaram baixa sensibilidade a fungicidas na biodegradação desses compostos. É o caso de Escudero-Leyva *et al.* (2022) que avaliaram isolados do gênero *Trichoderma* frente aos fungicidas azoxistrobina, clorotalonil, ciproconazol e trifloxistrobina. A remoção foi de até 89% para clorotalonil, 46,4% para ciproconazol e 33,1% para trifloxistrobina.

Latz *et al.* (2020), em seus estudos *in vitro* e em campo, na Dinamarca, identificaram dois isolados endofíticos do trigo (*Penicillium olsonii* e *Acremonium alternatum*) com potencial para implementação desses fungos em estratégias integradas de manejo de doenças, por sua tolerância ao fungicida composto por protioconazol e ação antagonista (antifúngica) ao fungo

Septoria tritici (sin. (*Mycosphaerella graminicola*), causador da doença septoriose (mancha salpicada da folha de trigo).

5.4 Prospecção enzimática

5.4.1 Triagem para atividade enzimática em cultivo sólido

Foram utilizados exemplares dos 14 gêneros endofíticos isolados, previamente crescidos em meio BDA e inoculados em triplicata em novas placas com meio sólido específico para avaliação da produção de diferentes enzimas. Dos 14 fungos, 11 apresentaram atividade positiva para CMCCase, xilanase e protease e somente 5 fungos apresentaram atividade positiva para amilase. Os fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Cadophora*, *Colletotrichum* e *Alternaria* demonstraram potencial de produção para todas as enzimas testadas, enquanto o fungo do gênero *Macrophomina* apresentou potencial apenas para amilase (Tabela 4).

Em relação à produção das enzimas degradadoras de biomassa lignocelulósica (CMCase e xilanase), os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Rizhoctonia* demonstraram atividade somente para CMCCase, os gêneros *Fusarium* e *Bipolaris* somente para xilanase e os fungos *Diaporthe*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Cadophora*, *Fusarium*, *Colletotrichum* (M13), *Trichoderma* (M14), *Alternaria* e *Diaporthe* foram positivos tanto para CMCCase quanto para xilanase (Tabela 4).

Tabela 4 Detecção inicial de formação de halos de degradação enzimática nos ensaios em placas com meio sólido

Código interno	Gênero	Presença/ausência de halo de degradação			
		Xilanase	CMCase	Protease	Amilase
M1 (A4P2F1)	<i>Aspergillus</i>	-	+	+	-
M3 (A14P2F3)	<i>Diaporthe</i>	+	+	-	-
M4 (A1P3F1)	<i>Trichoderma</i>	+	+	+	+
M6 (A6P5F2)	<i>Fusarium</i>	+	-	+	-
M7 (A13P5F1.2)	<i>Macrophomina</i>	-	-	-	+
M8 (A6P4F1)	<i>Cladosporium</i>	+	+	+	-
M9 (A22P4F1)	<i>Bipolaris</i>	+	-	-	-
M10 (A8P5F3.3)	<i>Cadophora</i>	+	+	+	+
M11 (A4P5F3.3)	<i>Rhizoctonia</i>	-	+	+	-
M12 (A5P3F1.2)	<i>Colletotrichum</i>	+	+	+	+
M13 (A9P2F1)	<i>Colletotrichum</i>	+	+	+	-
M14 (A10P4F2)	<i>Trichoderma</i>	+	+	+	-
M15 (A15P5F3.2)	<i>Alternaria</i>	+	+	+	+
M17 (A7P4F2)	<i>Diaporthe</i>	+	+	+	-

Os resultados dos ensaios em meio sólido foram expressos em Índice Enzimático (IE), que consiste na razão obtida da divisão entre os valores de medição do diâmetro dos halos formados (mm) pelos valores de medição do diâmetro das colônias (mm). Na Figura 7 são apresentadas as imagens dos halos de degradação dos três fungos com maior IE para cada um dos ensaios realizados.

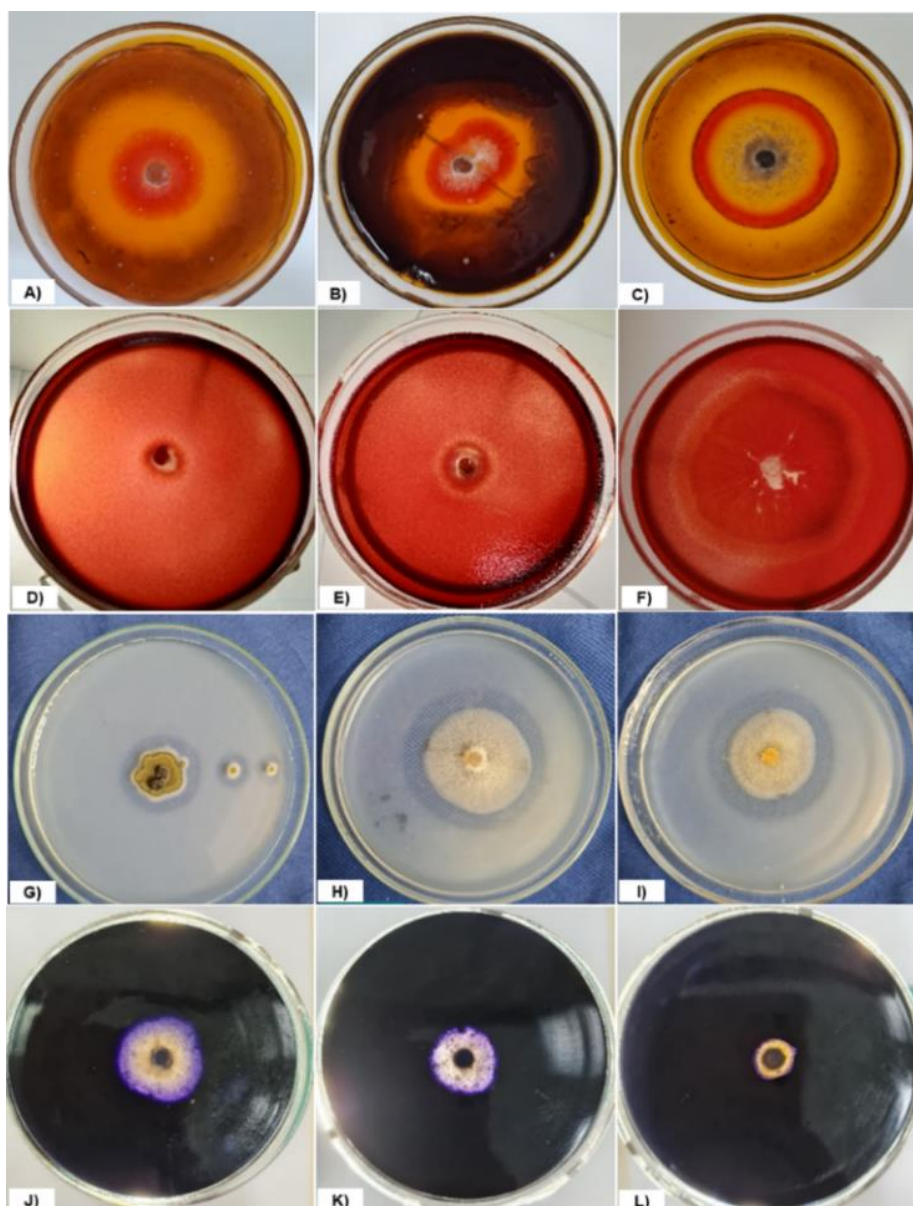


Figura 7 Formação dos halos de degradação enzimática dos isolados endofíticos selecionados na triagem em meio sólido. A-C) triagem xilanolítica: *Fusarium*, *Colletotrichum* (M12-A5P3F1.2) e *Bipolaris*; D-F) triagem celulolítica: *Colletotrichum* (M13-A9P2F1), *Colletotrichum* (M12-A5P3F1.2) e *Diaporthe* (M3-A14P2F3); (G-I) triagem proteolítica: *Cladosporium*, *Fusarium* e *Trichoderma* (M4-A1P3F1); J-L) triagem amilolítica: *Cadophora*, *Alternaria* e *Colletotrichum* (M12-A5P3F1.2).

Em virtude do cálculo para índice enzimático considerar não somente o tamanho da zona de degradação, mas também o próprio tamanho da colônia, valores de IE iguais a 1,0 referem-se à ausência de formação de halo, valores acima de 1,0 são halos que já podem ser considerados e valores superiores a 2,0 demonstram boas zonas de degradação pois, representam o dobro da medida da colônia. No caso de valores de IE menores que 1,0 (como foi encontrado no ensaio de atividade amilolítica), esse valor significa que a zona de

degradação revelada é menor que o tamanho da colônia e permite ser observada somente pelo fundo da placa.

Tabela 5 Valores das medições das colônias, dos halos de degradação enzimática e do IE dos fungos endofíticos nos quatro ensaios realizados em meio sólido

Código interno	Xilanase			CMCase		
	Diâmetro colônia (mm)	Diâmetro halo (mm)	IE	Diâmetro colônia (mm)	Diâmetro halo (mm)	IE
M1 (A4P2F1)	45,00 ± 3,00	0,00 ± 0,00	0,00 ^c	56,33 ± 3,23	65,1 ± 4,21	1,16 ^c
M3 (A14P2F3)	32,46 ± 1,52	36,2 ± 1,25	1,11 ^b	53,93 ± 6,10	71,7 ± 7,71	1,32 ^{bc}
M4 (A1P3F1)	27,87 ± 2,29	34,5 ± 1,53	1,24 ^b	31,60 ± 0,78	36,2 ± 2,00	1,14 ^c
M6 (A6P5F2)	19,91 ± 1,96	42,6 ± 2,11	2,14 ^a	34,60 ± 4,06	0,0 ± 0,00	0,00 ^d
M7 (A13P5F1.2)	46,82 ± 1,59	0,00 ± 0,00	0,00 ^c	54,07 ± 1,53	0,0 ± 0,00	0,00 ^d
M8 (A6P4F1)	11,62 ± 6,85	19,7 ± 9,72	1,30 ^b	4,27 ± 1,11	4,5 ± 1,11	1,05 ^c
M9 (A22P4F1)	39,66 ± 0,66	52,1 ± 1,90	1,31 ^b	44,87 ± 7,24	0,0 ± 0,00	0,00 ^d
M10 (A8P5F3.3)	29,40 ± 0,61	32,1 ± 1,33	1,09 ^b	30,37 ± 6,79	34,4 ± 5,99	1,14 ^c
M11 (A4P5F3.3)	52,53 ± 4,00	0,00 ± 0,00	0,00 ^c	55,00 ± 2,17	73,0 ± 2,00	1,33 ^{bc}
M12 (A5P3F1.2)	21,30 ± 0,71	27,7 ± 4,46	1,31 ^b	13,37 ± 2,84	21,0 ± 0,40	1,62 ^{ab}
M13 (A9P2F1)	23,61 ± 2,27	29,3 ± 2,66	1,24 ^b	9,80 ± 0,62	18,8 ± 2,75	1,92 ^a
M14 (A10P4F2)	22,31 ± 1,40	27,0 ± 1,54	1,21 ^b	26,10 ± 4,89	31,0 ± 4,45	1,20 ^c
M15 (A15P5F3.2)	35,29 ± 2,41	42,4 ± 2,31	1,20 ^b	21,33 ± 2,51	27,0 ± 3,01	1,27 ^{bc}
M17 (A7P4F2)	18,39 ± 3,82	25,3 ± 2,39	1,23 ^b	27,40 ± 6,77	31,4 ± 6,26	1,16 ^c

Código interno	Protease			Amilase		
	Diâmetro colônia (mm)	Diâmetro halo (mm)	IE	Diâmetro colônia (mm)	Diâmetro halo (mm)	IE
M1 (A4P2F1)	61,10 ± 8,48	74,0 ± 6,43	1,22 ^{bc}	34,03 ± 1,00	0,0 ± 0,00	0,00 ^d
M3 (A14P2F3)	43,93 ± 7,51	0,0 ± 0,00	0,00 ^e	42,57 ± 1,29	0,0 ± 0,00	0,00 ^d
M4 (A1P3F1)	36,67 ± 2,32	48,2 ± 1,91	1,32 ^{ab}	30,17 ± 1,20	10,5 ± 1,46	0,35 ^c
M6 (A6P5F2)	35,27 ± 2,05	47,1 ± 2,19	1,33 ^{ab}	16,97 ± 5,86	0,0 ± 0,00	0,00 ^d
M7 (A13P5F1.2)	74,67 ± 5,37	0,0 ± 0,00	0,00 ^e	54,77 ± 8,87	20,4 ± 3,67	0,38 ^c
M8 (A6P4F1)	15,83 ± 2,83	22,1 ± 2,72	1,41 ^a	6,27 ± 0,15	0,0 ± 0,00	0,00 ^d
M9 (A22P4F1)	58,83 ± 0,81	0,0 ± 0,00	0,00 ^e	42,63 ± 2,16	0,0 ± 0,00	0,00 ^d
M10 (A8P5F3.3)	46,83 ± 1,01	54,3 ± 1,60	1,16 ^{cd}	28,67 ± 4,30	30,8 ± 3,66	1,10 ^a
M11 (A4P5F3.3)	69,03 ± 4,67	78,1 ± 5,06	1,13 ^{cd}	46,97 ± 3,29	0,0 ± 0,00	0,00 ^d
M12 (A5P3F1.2)	29,03 ± 1,53	36,3 ± 1,30	1,25 ^{bc}	23,07 ± 2,40	10,7 ± 1,70	0,46 ^{bc}
M13 (A9P2F1)	33,93 ± 2,67	41,4 ± 5,43	1,28 ^{bc}	23,70 ± 1,31	0,0 ± 0,00	0,00 ^d
M14 (A10P4F2)	43,50 ± 1,57	50,0 ± 2,48	1,15 ^{cd}	21,53 ± 1,00	0,0 ± 0,00	0,00 ^d
M15 (A15P5F3.2)	40,47 ± 1,79	42,4 ± 1,56	1,05 ^d	26,73 ± 0,59	19,0 ± 3,23	0,71 ^b
M17 (A7P4F2)	30,57 ± 2,48	38,1 ± 2,90	1,25 ^{bc}	27,67 ± 2,71	0,0 ± 0,00	0,00 ^d

Nota: Cada valor representa a média das triplicatas ± o desvio padrão. Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes dentro de cada ensaio, conforme teste Tukey, a 5% de significância.

Dentre as quatro enzimas avaliadas, a triagem xilanólítica foi a que apresentou o maior IE (2,14), com o fungo do gênero *Fusarium*. Na triagem celulolítica o melhor foi o fungo do gênero *Colletotrichum* (M13- A9P2F1) com índice de 1,92 e na atividade proteolítica foi o fungo *Cladosporium* com índice de 1,41. Como mencionado, a triagem amilolítica não revelou zonas de degradação consideravelmente maiores que as colônias e, portanto, o maior índice encontrado foi para o fungo *Cadophora* com IE de apenas 1,10.

Farouk, Attia e El-katatny (2020) também avaliaram fungos endofíticos de soja em ensaio de placas, a partir de diferentes partes da planta (folha, caule e raiz), para detecção de halos de degradação para CMCase (CMCase) e xilanase e obtiveram resultados semelhantes, com IE máximo de 1,72 para xilanase (*Trichoderma harzianum*) e 1,75 para CMCase (*Fusarium oxysporum*). Robl *et al.* (2013) obtiveram resultados relevantes também na detecção em placas de produção de xilanases com fungos endofíticos do gênero *Penicillium*, *Aspergillus*, *Diaporthe* e *Fusarium*.

As proteases são enzimas que hidrolisam as ligações peptídicas de proteínas e são visadas industrialmente para serem utilizadas em detergentes, indústria de couro, alimentícia, farmacêutica e processos de biorremediação (CORREA *et al.*, 2014). Orlandelli *et al.* (2015) avaliaram a atividade proteolítica de fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum* Sw. e obtiveram uma incidência de 28,57% dos isolados positivos para protease. Semelhante aos resultados obtidos nesta pesquisa com *Cladosporium* na triagem proteolítica (IE de 1,41), Djamel, Ali e Nelly (2009) relataram atividade proteolítica significativa com cepas de *Penicillium* utilizando o mesmo método (hidrólise da caseína do leite).

As amilases por sua vez, quebram amido, glicogênio e outros polissacarídeos complexos em açúcares solúveis (SARANRAJ *et al.*, 2010). Embora os resultados obtidos não se demonstraram promissores, vários estudos descrevem produção de amilases por fungos endofíticos (MARIA; SRIDHAR; RAVIRAJA, 2005; AYOB; SIMARANI, 2016; FOU DA *et al.*, 2015; JAGANNATH *et al.*, 2021). Farouk, Attia e El-katatny (2020) também avaliaram atividade amilolítica, em que obtiveram alto IE de 3,00 somente para o fungo *Nigrospora* sp. enquanto para *Fusarium oxysporum* o IE máximo foi de 1,10 e *Aspergillus terreus* IE = 1,27, demonstrando também baixa efetividade para produção amilolítica.

Com base nos resultados obtidos nesse primeiro ensaio, foram selecionados os fungos com melhor desempenho nas atividades xilanolítica e celulolítica para a continuidade do estudo enzimático, tendo em vista o grande interesse atual por enzimas hidrolíticas degradadoras da biomassa lignocelulósica, visando o aproveitamento de resíduos agroindustriais.

5.4.2 Triagem para atividade enzimática em cultivo submerso

Estudos como o de Sridevi e Charya (2011), que também isolaram e avaliaram fungos com potencial para produção de xilanases, relatam que, na triagem em placas, o tamanho dos halos de degradação nem sempre revelam os fungos com maior produção enzimática e que, portanto, sugere-se avaliar o desempenho também em meio líquido para, assim, determinar quais fungos de fato são melhores produtores.

Dessa forma, os três melhores fungos da triagem xilanólica em placas, M6 (*Fusarium*), M9 (*Bipolaris*) e M12 (*Colletotrichum*) e os três melhores da triagem celulolítica, M13 e M12 (ambos do gênero *Colletotrichum*) e M11 (*Rizhooctonia*) foram avaliados em testes preliminares sob cultivo submerso, durante 240 h, com coleta de amostras a cada 48 h, utilizando xilano e CMC como fonte de carbono e substrato indutor nos cultivos para xilanase e CMCCase, respectivamente. Os resultados foram expressos em açúcares redutores presentes no meio extracelular, avaliados pelo método de DNS (Figura 8).

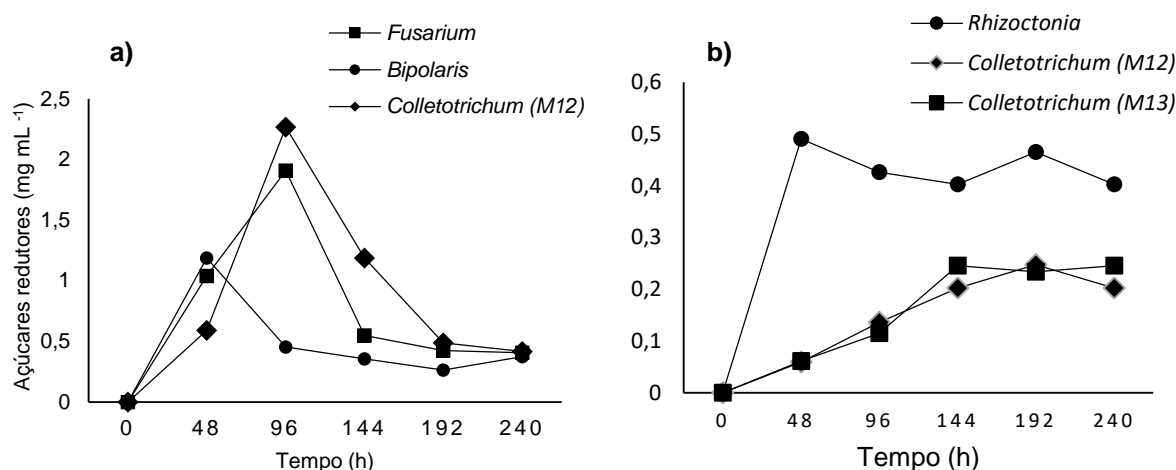


Figura 8 Avaliação preliminar do desempenho da produção enzimática em cultivo submerso. Fungos produtores de xilanase (Gráfico a) e fungos produtores de CMCCase (Gráfico b).

A maior concentração de açúcares redutores presentes nas amostras dos cultivos submersos com fungos produtores de xilanase foi obtida com 96 h e produzida pelo fungo do gênero *Colletotrichum* (M12-A5P3F1.2), com valor de 2,26 mg mL⁻¹. O fungo M6 pertencente ao gênero *Fusarium* demonstrou perfil semelhante, porém, com concentração máxima de 1,18 mg mL⁻¹, demonstrando que mesmo tendo sido o melhor na triagem em meio sólido, o fungo M12 é o que obteve destaque quando submetido ao cultivo submerso. Já o fungo do gênero *Bipolaris* atingiu uma concentração de açúcares de 1,18 mg mL⁻¹ em 48 h, porém, observou-se queda na concentração a partir desse tempo.

Em relação aos fungos produtores de CMCCase, a maior concentração de açúcares foi de 0,490 mg mL⁻¹ em 48 h com o fungo *Rizhooctonia*, que havia se revelado o terceiro melhor como produtor de CMCCase em meio sólido. Os fungos M12 e M13 (ambos do gênero *Colletotrichum*) demonstraram valores de concentração semelhantes entre si, porém, com valor máximo de apenas 0,243 mg mL⁻¹.

A queda observada na concentração de açúcares redutores tanto nos cultivos em meio contendo xilano como CMC pode estar relacionada ao consumo de açúcar pelo metabolismo do próprio fungo, em virtude do crescimento micelial (BHADRA *et al.*, 2022).

5.4.3 Atividade Enzimática

A partir dos resultados dos testes preliminares, os fungos M12 (*Colletotrichum*), M6 (*Fusarium*) e M11 (*Rhizoctonia*) foram selecionados e novamente cultivados em meio submerso tal qual descrito no item anterior, dessa vez com coletas a cada 24 h, para quantificação da atividade enzimática.

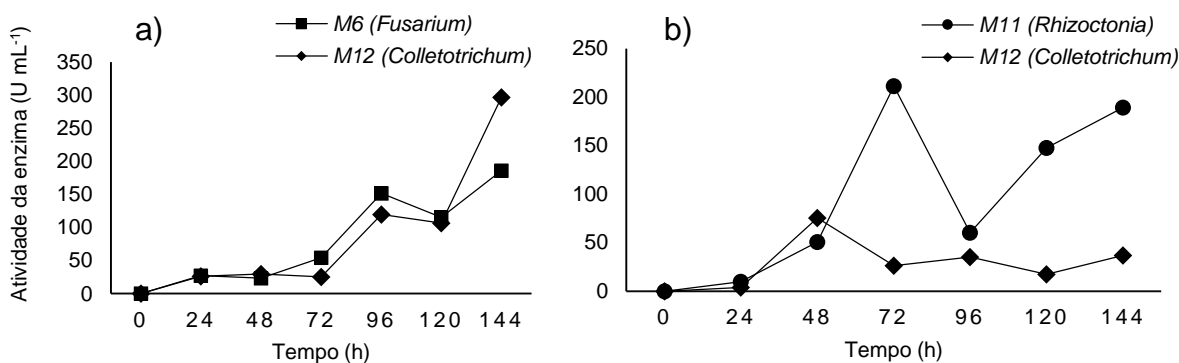


Figura 9 Atividade enzimática em cultivo submerso. Atividade de xilanase (Gráfico a) e atividade de CMCCase (Gráfico b).

Como pode ser observado na Figura 9, os resultados para a quantificação da atividade enzimática revelaram o fungo M12 (*Colletotrichum*) como melhor produtor de xilanase com 296,65 U mL⁻¹ em 144 h e mantiveram o fungo M11 (*Rhizoctonia*) como melhor produtor de CMCCase com valor de 211,11 U mL⁻¹ em 72 h (Tabela 6).

Os resultados obtidos se assemelham aos de Ja'afaru (2013), avaliando fungos isolados de solo, madeira em decomposição e serragem, com potencial para produção de CMCases e xilanases e obtendo valores de 312 U mL⁻¹ (*Aspergillus ustus*) e 338 U mL⁻¹ (*Trichoderma viride*) para atividade de xilanase e 195 e 221 U mL⁻¹ para os mesmos fungos, respectivamente, na atividade de CMCCase.

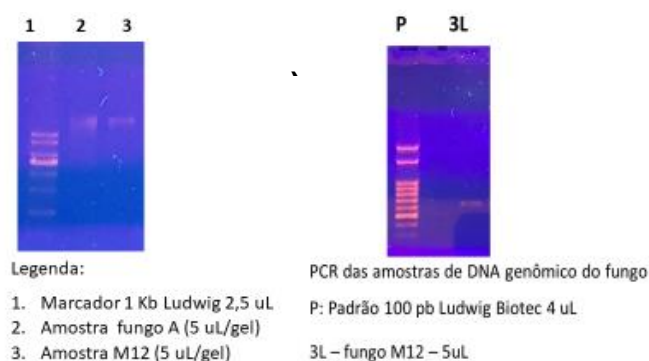
Sridevi e Charya (2011) encontraram também valores como estes para fungos do gênero *Fusarium* (240 U mL⁻¹), *Rhizoctonia* (249 U mL⁻¹) e *Penicillium* (264 U mL⁻¹) com destaque também para espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* com 369 e 495 U mL⁻¹, respectivamente.

Tabela 6 Conteúdo de proteínas, atividade enzimática e específica dos fungos selecionados em cultivo submerso utilizando xilano e CMC como fonte de carbono

Enzima	Fungo	Proteína (mg mL ⁻¹)	Atividade Enzimática (U mL ⁻¹)	Atividade específica (U mg proteína ⁻¹)
xilanase	M6 (144h)	0,22	186,20	846,36
	M12 (144h)	0,25	296,65	1186,60
CMCase	M11 (72h)	0,20	211,11	1055,55
	M12 (48h)	0,24	75,26	313,58

5.4.4 Isolamento e Identificação dos fungos endofíticos

De acordo com os resultados anteriores, o fungo selecionado foi o fungo sob código interno M12-A5P3F1.2, por ter sido o melhor produtor de xilanase e produtor de CMCase (Tabela 6). Conforme as sequências obtidas das regiões ITS1 e ITS4, a espécie correlacionada foi *Colletotrichum boninense* (Figura 10).



Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
Colletotrichum boninense strain CGMCC 3.15124 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal...	Colletotrichum b...	974	974	99%	0.0	98.38%
Colletotrichum boninense isolate LS1 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene a...	Colletotrichum b...	970	970	99%	0.0	98.20%
Colletotrichum boninense isolate LL20 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene...	Colletotrichum b...	970	970	99%	0.0	98.20%
Colletotrichum boninense strain JL7 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene an...	Colletotrichum b...	968	968	100%	0.0	98.03%
Colletotrichum boninense isolate YB15 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed...	Colletotrichum b...	968	968	99%	0.0	98.20%
Colletotrichum boninense isolate SM7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed s...	Colletotrichum b...	968	968	99%	0.0	98.20%
Colletotrichum boninense isolate GY4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed s...	Colletotrichum b...	968	968	99%	0.0	98.20%
Colletotrichum boninense isolate HRY1006-5.6 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal tran...	Colletotrichum b...	968	968	99%	0.0	98.20%
Colletotrichum boninense isolate HRY1006-5.3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal tran...	Colletotrichum b...	968	968	99%	0.0	98.20%

Figura 10 a) Produto da PCR analisado em gel de agarose 1% em tampão Tris-EDTA, corado com brometo de etídio e visualizados sob luz UV. b) Constatação da espécie identificada (NCBI/BLAST).

5.4.5 Avaliação da biomassa lignocelulósica como substrato indutor

O ensaio foi realizado com o fungo identificado como *Colletotrichum boninense* avaliando duas biomassas de cana-de-açúcar (bagaço e palha) como fonte de carbono, no período de 144 h e em diferentes proporções (tratamentos). O gráfico para xilanase

(Figura 11) indica um perfil ascendente da produção enzimática em todos os tratamentos, sendo que o melhor desempenho foi com a mistura de 50% de bagaço e 50% de palha, em que a amostra de 144 h revelou o maior valor de atividade de xilanase de 383,63 U mL⁻¹. Esse resultado foi superior inclusive aos resultados predecessores, quando foi utilizado o xilano como substrato (296,65 U mL⁻¹) e, portanto, mostrou que as biomassas são bons indutores da biossíntese da enzima xilanase.

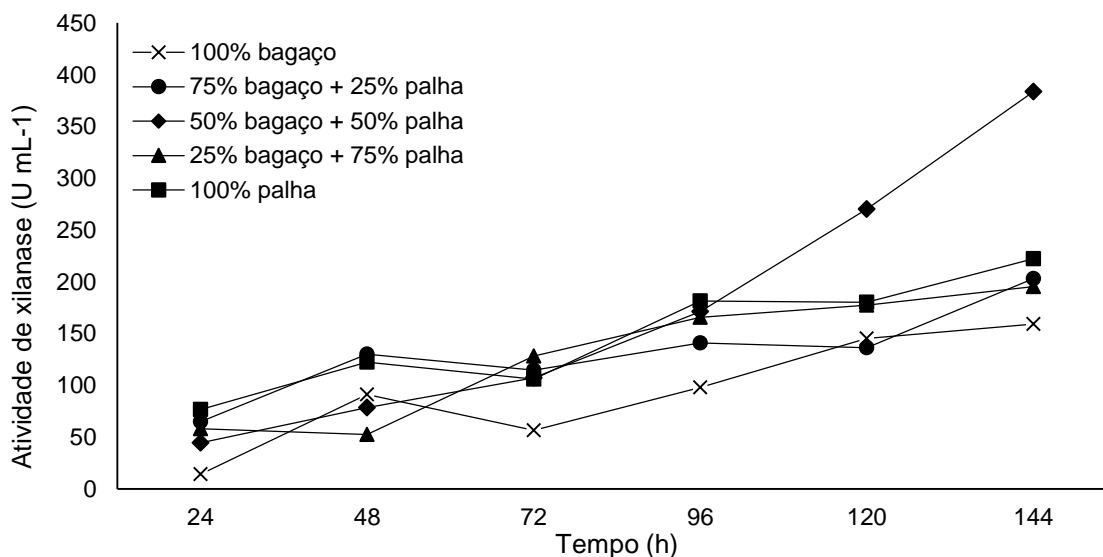


Figura 11 Produção de xilanase por *C. boninense* utilizando bagaço e palha de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

Na produção de CMCCase, não houve diferença significativa entre as diferentes preparações, inclusive demonstrando valores de atividade inferiores aos obtidos anteriormente com CMC (Tabela 4). Portanto, bagaço e palha de cana-de-açúcar, neste caso, não se mostraram bons indutores da biossíntese de CMCCase para esse fungo (Tabela 7).

Tabela 7 Conteúdo de proteínas, atividade enzimática e específica *C. boninense* em cultivo submerso utilizando palha e bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono

Substrato indutor	Proteínas (mg mL ⁻¹)	Xilanase (U mL ⁻¹)	Atividade específica		
			de xilanase (U mg proteína ⁻¹)	de CMCCase (U mg proteína ⁻¹)	
			CMCase (U mL ⁻¹)		
100% bagaço	0,38	159,28 ^{ab}	419,16	71,83 ^a	189,03
75% bagaço + 25% palha	0,50	203,12 ^{ab}	406,24	45,88 ^a	91,76
50% bagaço + 50% palha	0,45	383,63 ^a	852,51	88,92 ^a	197,60
25% bagaço + 75% palha	0,46	195,52 ^{ab}	425,04	33,86 ^a	73,61
100% palha	0,46	222,44 ^{ab}	483,57	29,11 ^a	63,28

Nota: Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes dentro de cada ensaio, conforme teste Tukey à 5% de significância.

Devido ao elevado número de usinas que processam a cana-de-açúcar, resíduos desse processamento, como a palha e o bagaço, tornam-se alvo de inúmeras pesquisas buscando alternativas para o seu melhor aproveitamento. Correa *et al.* (2014) mencionam inclusive que cultivos utilizando diferentes resíduos agroindustriais vêm demonstrando ser uma forma adequada para o cultivo de fungos endofíticos devido ao seu caráter indutor na atividade enzimática.

Colletotrichum sp. e *Alternaria* sp., isolados como endófito da planta *Centella asiática*, foram descritos como bons produtores de CMCase. quando cultivados em palha de arroz e farelo de trigo em fermentação em estado sólido (DEVI; PRABAKARAN; WAHAB, 2012). Wipusaree *et al.* (2011) também avaliaram atividade de xilanase em *Aternaria alternata* e obtiveram 402,13 U mL⁻¹, utilizando 2% de farelo de arroz no meio de cultivo.

Marques *et al.* (2018) avaliaram fungos endofíticos em substrato contendo uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1) e encontraram valores de atividade de CMCase para o fungo *Cladosporium cladosporioides* de 88,51 U g⁻¹ de substrato e para *Trichoderma viridae* (64,56 U). Ainda sobre o mesmo estudo, com o fungo *Phomopsis stipata* obtiveram valores de 83,44 e 694,33 U g⁻¹ de substrato para CMCase e xilanase, respectivamente, apresentando perfil muito semelhante com o encontrado neste trabalho com o fungo M12 (88,92 e 383,63 U mL⁻¹ para CMCase e xilanase, respectivamente).

Graciano *et al.* (2020) conseguiram aumentar a produção de xilanase de uma linhagem termofílica de *Aspergillus fumigatus* utilizando 6,5% de palha de milho no meio de cultivo, atingindo 530 U mL⁻¹.

Em virtude do melhor desempenho do fungo endofítico *C. boninense*. em relação à atividade de xilanase na condição de cultivo submerso com palha/bagaço (50-50%), essa foi considerada a condição ideal de cultivo para produção de xilanase para dar sequência à avaliação dos parâmetros cinéticos desta enzima.

5.4.6 Efeito do pH na atividade e estabilidade de xilanase

O efeito do pH na atividade de xilanase, utilizando extrato enzimático bruto, foi avaliado na faixa de pH de 3,5 a 8,0. A atividade enzimática apresentou maior valor (295,40 U mL⁻¹) no pH 5,0, indicando ser este o pH ótimo, no qual os resíduos dos aminoácidos essenciais à catálise se encontram em estado de ionização favorável. Acima do pH ótimo a atividade enzimática seguiu em queda gradativa à medida que os valores pHs foram aumentando (Figura 6).

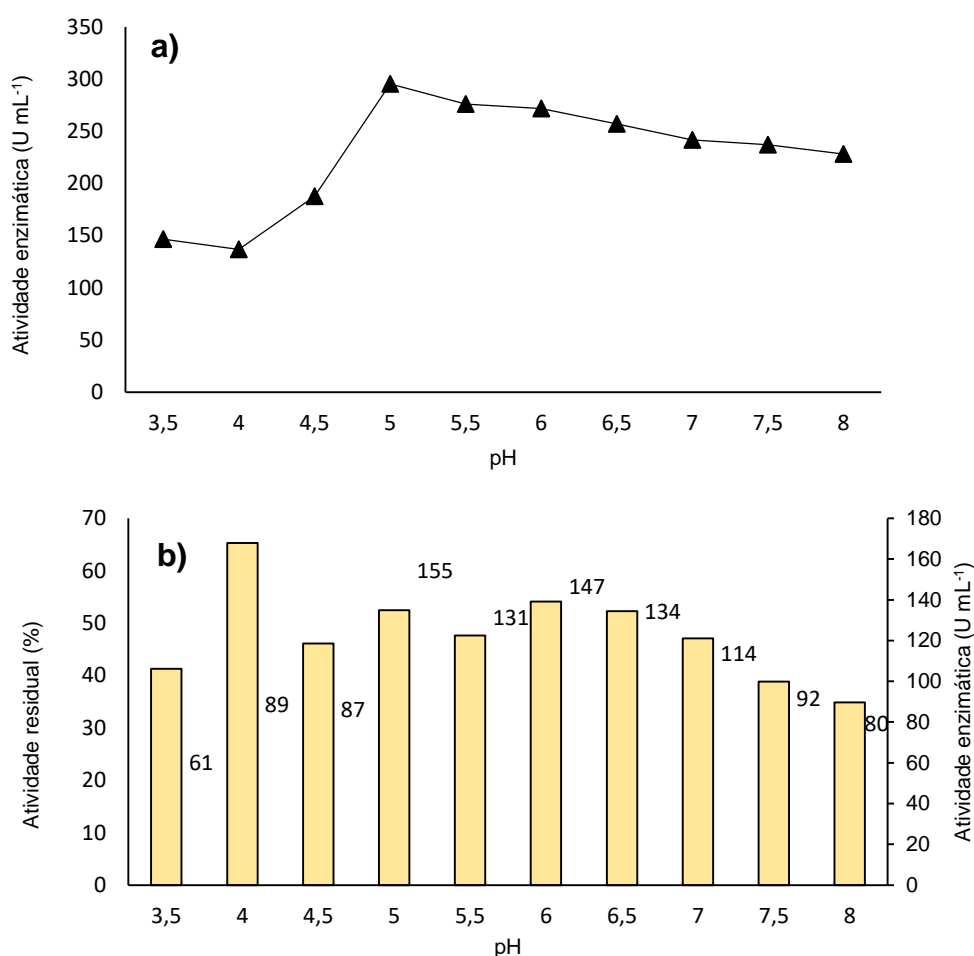


Figura 12 Efeito do pH na atividade de xilanase (Gráfico a) e atividade residual do efeito do pH na estabilidade de xilanase (Gráfico b).

Xilanases produzidas por bactérias e actinomicetos são eficientes em uma faixa mais ampla de pH e temperatura, porém as xilanases fúngicas mesmo com faixas de pH mais restritas (4-6) e temperaturas abaixo de 50 °C podem apresentar maior rendimento e liberação extracelular (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002; NAIR; SINDHU; SHASHIDHAR, 2008).

Xilanases produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp, e *Fusarium* sp. também são relatadas atuando melhor em pH 5,0 (KRISANA *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2015). Já para os fungos endofíticos *Pestalotiopsis* sp., *Acremonium* sp., *Aspergillus chlamydosporus*, *Aspergillus* sp. e *Fusarium* sp. a maior atividade de xilanase e protease foi em pH 9,0.

A avaliação da estabilidade das enzimas ao pH é importante para definir em qual processo industrial sua utilização será mais adequada. Porém, a exposição da enzima a determinados pHs por tempos prolongados, pode afetar drasticamente a sua atividade (RAGHAV *et al.*, 2022). Bhadra *et al.* (2022) citam que enzimas utilizadas para diversas aplicações biotecnológicas devem possuir estabilidade ao pH com atividade ótima para executar suas funções de forma eficiente.

No presente estudo, as amostras, quando submetidas ao ensaio de estabilidade frente ao pH (Figura 12), demonstraram uma tendência de aumento da estabilidade até o pH 6,0, com 54% de atividade residual nesse pH e queda gradual da estabilidade na faixa de pH 6,5 – 8,0. No seu pH ótimo, ou seja, pH 5,0, a enzima preservou 52% de sua atividade, enquanto que no pH 8,0 apresentou a menor atividade residual (35%).

Vitolo e Filho (1998) afirmam que o pH de máxima estabilidade de uma enzima nem sempre coincide com o pH de máxima atividade, ou seja, torna-se imprescindível não somente a determinação do pH ótimo como também da faixa de pH em que a enzima se mantém mais estável.

Benedetti *et al.* (2013) avaliaram o perfil de estabilidade, em relação ao pH, sobre a atividade da xilanase produzida por *Aspergillus niger* e observaram que a enzima se apresenta estável em uma faixa de pH de 4,5 a 6,0, com atividade residual superior a 70%

5.4.7 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade de xilanase

O efeito da temperatura na atividade da xilanase foi avaliado nas temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 70 °C. A faixa de temperatura ótima encontrada para a atividade de xilanase foi entre 50 e 60 °C (198,22 e 194,40 U mL⁻¹), conforme se observa na Figura 13. Nos valores extremos de temperatura a enzima adquiriu uma conformação menos estável, resultando em queda de sua atividade catalítica.

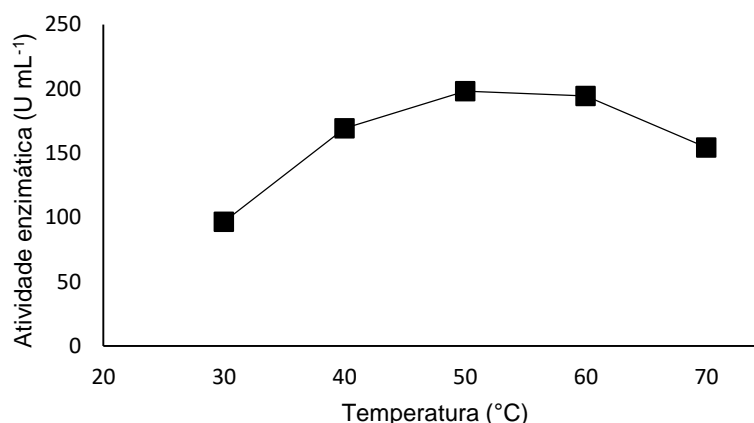


Figura 13 Efeito da temperatura na atividade de xilanase.

Vitolo e Filho (1998) afirmam que a temperatura afeta as enzimas da seguinte forma: à medida que a temperatura aumenta a atividade enzimática também aumenta e a estabilidade cai. Quando a temperatura atinge determinado valor, a desnaturação proteica ocorre, conseqüentemente perde-se atividade. Sendo assim, é importante determinar a

temperatura ótima para obter a melhor atividade, aliada à avaliação da termoestabilidade dessa enzima.

Para avaliar a estabilidade frente à temperatura, as amostras foram incubadas por 30 e 60 min nas temperaturas de 40 a 70 °C e comparadas com a atividade inicial, conforme Figura 14. É possível observar, para todas as temperaturas avaliadas, queda da atividade enzimática à medida em que se aumentou o tempo de incubação. Essa queda foi nitidamente mais acentuada nas temperaturas de 60 °C e 70 °C. A máxima atividade residual (87%) foi observada a 40 °C no tempo de 30 min, decrescendo para 81% no tempo de 60 min, o que demonstra que a enzima é termolábil, perdendo sua atividade catalítica mesmo quando submetida a condições brandas durante curtos períodos de tempo. Na sua temperatura ótima: 50 °C, observaram-se atividades residuais de 76 e 71%, nos tempos de 30 e 60 min, respectivamente.

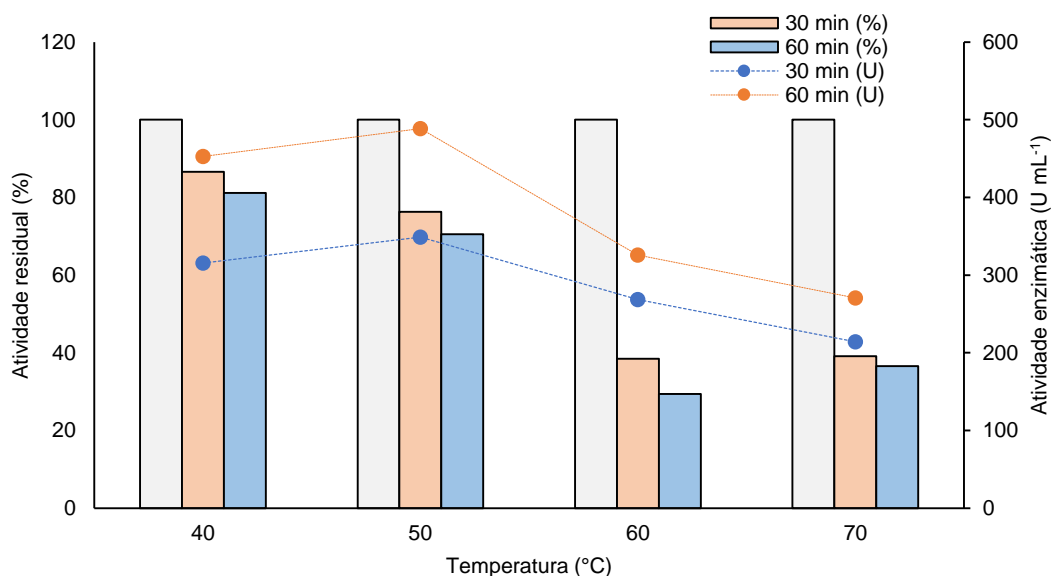


Figura 14 Efeito da temperatura na estabilidade da xilanase.

Os dados de atividade e estabilidade são muito úteis no *screening* de enzimas adequadas para um determinado processo. Heinen *et al.* (2014) detectaram atividade ótima para xilanase purificada de *Fusarium heterosporum* a uma temperatura de 50 °C e verificaram que a enzima foi estável dentro de uma faixa de temperatura de 50 a 55 °C por 15 min, com meia-vida em 45 °C de 53 min. Lopes, Valeri e Pessoa-Júnior (2013) avaliaram xilanases de *Aspergillus niger* e detectaram atividade ótima também a 50 °C.

A xilanase produzida pelo fungo endófito *Aspergillus terreus* isolado de *Memora peregrina* apresenta termoestabilidade a 55 °C (SORGATTO *et al.* 2012). Wipusaree *et al.* (2011) relataram que a xilanase produzida por *Alternaria alternata* isolada de *Croton oblongifolius* se mostrou termoestável até 40 °C.

Lopes, Valeri e Pessoa-Júnior (2013) avaliaram a viabilidade do uso de xilanases purificadas produzidas por *Trichoderma* sp. na fermentação de pães, em que o processo ocorre na faixa de 25 a 36° C. Neste caso, a temperatura ótima detectada foi em 50 °C, entretanto, na temperatura desejada (36 °C) a atividade residual ainda se manteve em 60%, demonstrando potencial para o uso em alguns processos fermentativos da indústria alimentícia.

Benedetti *et al.* (2013) avaliaram xylanase de *Aspergillus niger* em que a mesma apresentou boa estabilidade térmica a 40 e 50 °C, com preservação de 80 a 90% de sua atividade por meia hora, e sua meia-vida, a 60 °C, foi de 30 minutos.

Nesta pesquisa, a meia-vida também foi calculada obtendo-se nas temperaturas de 40 e 50 °C tempos de meia-vida de 107 e 77 min, respectivamente, demonstrando similaridade aos valores encontrados por Benedetti *et al.* (2013). Já nas temperaturas de 60 e 70 °C, a meia-vida foi de 22 min.

A meia-vida de xilanase produzida por *C. boninense* encontrada neste estudo nas temperaturas de 40 e 50°C, em comparação com outros autores, foi superior a de xilanases de *Aspergillus tamarii* (GOUDA; ABDEL-NABY, 2002) que resultou em 50 min, e *Acrophialophora nainiana* (CARDOSO; FERREIRA-FILHO, 2003) de 60 min.

5.4.8 Determinação dos parâmetros cinéticos

O comportamento cinético da xilanase foi avaliado frente à variação da concentração de seu substrato, xilano de *beechwood*, na faixa de 3 a 50 mg mL⁻¹. Aplicando-se o método de linearização proposto por Lineaweaver-Burk, estabeleceu-se a equação $1/V = f(1/S)$ a partir da qual foram calculados os parâmetros cinéticos K_m e $V_{Máx}$ (Figura 15).

Os valores de K_m e de $V_{Máx}$, obtidos experimentalmente, foram 99,3 mg mL⁻¹ e 3.333 µmol mL⁻¹ min⁻¹, respectivamente. O alto valor de K_m sugere que a enzima requer alta concentração de substrato para alcançar metade de sua velocidade máxima e, portanto, baixa especificidade pelo substrato.

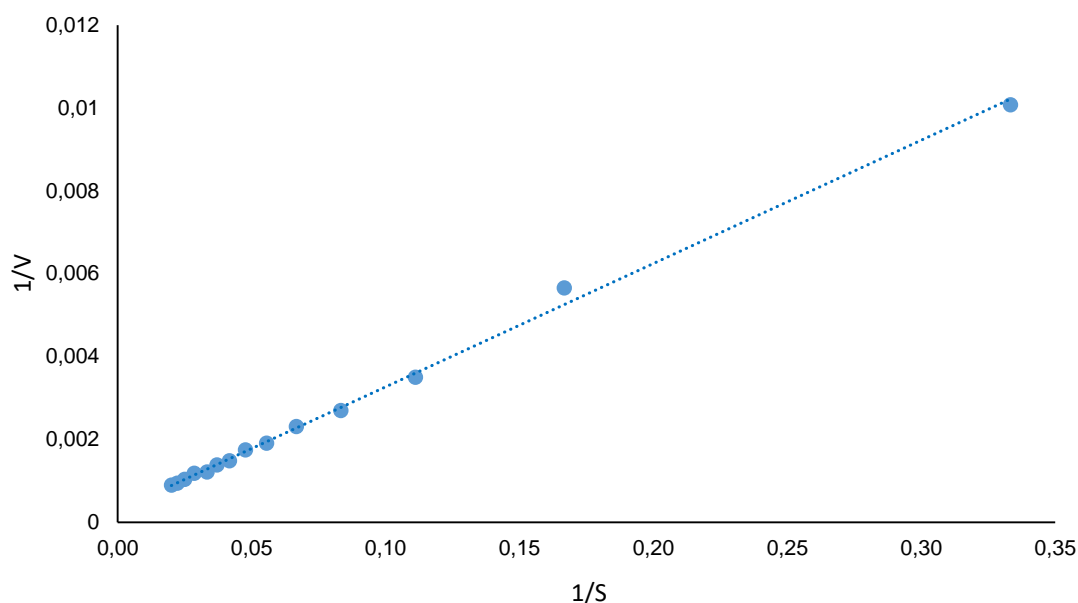


Figura 15 Gráfico de Lineweaver-Burk (1934) da atividade de xilanase em função da concentração de substrato (variação entre 3 e 50 mg mL⁻¹).

Lunkes (2015) encontrou $V_{\text{máx}}$ de 1.000 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ com K_m de 1,56 mg mL⁻¹ para xilanase purificada de *Penicillium crustosum*. Lopes, Valeri e Pessoa-Júnior (2013) encontram para *Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp. valores de $V_{\text{máx}}$ de 6,9 e 29,8 U g⁻¹, respectivamente, e K_m de 2,07 e 3,31 g L⁻¹ para os dois fungos. Conforme Kocabas, Güder e Ozben (2015), o K_m de xilanasas fúngicas pode variar entre 0,1 e 12,5 mg mL⁻¹ e, segundo Knob *et al.* (2013), o $V_{\text{máx}}$ pode variar de 0,1 a 10.000 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$.

No caso do gênero *Colletotrichum*, que foi o produtor da xilanase avaliada neste ensaio, o estudo de Carli *et al.* (2016) avaliou uma endo-xilanase termoestável e halotolerante produzida por *C. graminicola*, que demonstrou $V_{\text{máx}}$ de 481,3 U mg⁻¹ e K_m de 3,7 mg mL⁻¹.

Uma possível explicação para o valor de K_m obtido neste estudo ter sido maior que os valores relatados por outros autores, pode estar relacionada à composição do xilano de *beechwood* utilizado, que apresenta uma pureza de apenas 70% e presença de outros produtos do processo de hidrólise (glicose, arabinose, lignina), alguns deles podendo ter atuado como inibidores.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a aplicação do fungicida Trifloxistrobina + Protioconazol na lavoura de soja não afetou a obtenção de isolados endofíticos e não resultou em diferença significativa em número de isolados, frequência, riqueza e diversidade de gêneros entre uma coleta e outra.

Os fungos do gênero *Alternaria* e *Diaporthe* foram os gêneros dominantes mesmo na coleta após a aplicação do fungicida. Os índices ecológicos (*Simpson*, *Shannon-Wiener* e *Pielou*) demonstraram haver alta diversidade de gêneros e baixa equitabilidade, o que reafirma a dominância de alguns gêneros sobre outros.

Em relação à sensibilidade dos fungos isolados na presença do fungicida no meio de cultivo sólido, observou-se que os fungos não são sensíveis ao fungicida na menor concentração testada (0,2 mg L⁻¹), com inibição de crescimento abaixo de 50%, 4 fungos apresentaram sensibilidade na concentração de 2,0 mg L⁻¹ e os gêneros *Cladosporium*, *Bipolaris*, *Cadophora*, *Rhizoctonia* e *Alternaria* permaneceram demonstrando baixa sensibilidade ao fungicida, mesmo na maior concentração testada (3,8 mg L⁻¹).

Em relação à prospecção endofítica, todos os gêneros identificados demonstraram potencial para produção de uma ou mais das enzimas testadas com destaque para os valores obtidos para atividade de xilanase, produzida principalmente pelo fungo *Colletotrichum boninense* (296,65 U mL⁻¹).

Adicionalmente, foi possível obter resultados superiores de 383,63 U mL⁻¹, com a utilização da palha somada ao bagaço da cana-de-açúcar como substratos indutores da xilanase, o que pode representar diminuição de custos de processos industriais de produção de enzimas. A xilanase bruta apresentou baixa termoestabilidade, mostrando-se adequada somente para processos industriais convencionais em baixa temperatura, porém, pouco adequada para processos contínuos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora os resultados obtidos sejam promissores, existem muitos desafios ainda para que seja implementado com sucesso o uso de endófitos na agricultura. Ainda que as pesquisas recentes estejam identificando os vários benefícios que os endófitos podem conferir aos seus hospedeiros vegetais, as práticas agrícolas convencionais ainda são muito necessárias. A agricultura atual ainda depende fortemente de fungicidas e altos níveis de fertilizantes químicos. Contudo, o controle biológico e o uso de inoculantes já é uma realidade e o estudo dos endófitos pode contribuir ainda mais para o desenvolvimento de soluções sustentáveis para a agricultura.

Além disso, estudos como este promovem, não somente a avaliação de diferentes fontes de enzimas hidrolíticas, mas também a oportunização do uso, aproveitamento e destinação de resíduos agroindustriais. Os resultados obtidos contribuem cada vez mais para a exploração de novas oportunidades de bioprospecção microbiana e enzimática a partir de fontes tão disponíveis e de amplo acesso como são as plantas.

REFERÊNCIAS

- ABDELMOTELEB, A.; TRONCOSO-ROJAS, R.; GONZALEZ-SOTO, T.; GONZÁLEZ-MENDOZA, D. Antifungal Activity of Autochthonous *Bacillus subtilis* Isolated from *Prosopis juliflora* against Phytopathogenic Fungi. **Mycobiology**, v. 45, n. 4, p. 385-391, 2017.
- ABRAHÃO-NETO, J. ROSSINI, C. H. B.; EL-GOGARY, S.; HENRIQUE-SILVA, F. CRIVELLARO, O.; EL-DORRY, H. Mitochondrial function in mediate cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. **Biochemistry**, v. 34, p. 10456-19462, 1995.
- ADELEKE, B. S.; AYILARA, M. S.; AKINOLA, S. A.; BABALOLA, O. O. Biocontrol mechanisms of endophytic fungi. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 32, n. 46, p. 1-17, 2022.
- ALBERTO, R. N.; COSTA, A. T.; POLONIO, J. C.; SANTOS, M. S.; RHODEN, S. A.; AZEVEDO, J. L. *et al.* Extracellular enzymatic profiles and taxonomic identification of endophytic fungi isolated from four plant species. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, 2016.
- AMIRITA, A.; SINDHU, P.; SWETHA, J.; VASANTHI, N. S.; KANNAN, K. P. Enumeration of endophytic fungi from medicinal plants and screening of extracellular enzymes. **World Journal of Science and Technology**, v. 2, p. 13-19, 2012.
- ARAÚJO, W.; AZEVEDO, J. L.; L.; LACAVA, P. T.; MARCON, J.; LIMA, A. O. S.; SOBRAL, J. K. *et al.* Isolamento de microrganismos endofíticos. *In: Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos*. Piracicaba: Copiadora "Luiz de Queiroz", 2010, p.83-92.
- AYOB, F.W.; SIMARANI, K. Endophytic filamentous fungi from a *Catharanthus roseus*: identification and its hydrolytic enzymes. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, p. 273– 278, 2016.
- AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from brazilian tropical hosts and their biotechnological applications. *In: KHARWAR, R.; UPADHYAY, R.; DUBEY, N.; RAGHUWANSHI, R. Microbial diversity and biotechnology in food security*. New Delhi: Springer, 2014. p.17-22.
- BACON, C. W.; WHITE, J. (Ed.). **Microbial endophytes**. Boca Raton: CRC Press, 2000.
- BAJAJ, R. R.; HUANG, Y.; GEBRECHRISTOS, S.; MIKOLAJCZYK, B.; BROWN, H.; PRASAD, R. *et al.* Transcriptional responses of soybean roots to colonization with the root endophytic fungus *Piriformospora indica* reveals altered phenylpropanoid and secondary metabolism. **Scientific Reports**, v. 8, 2018.
- BAJPAI, P. Application of enzymes in the pulp and paper industry. **Biotechnology Progress**, v. 14, 1999.
- BATZER, J. C.; MUELLER, D. S. Soybean fungal endophytes *alternaria* and *diaporthe* spp. are differentially impacted by fungicide application. **Plant Disease**, v.104, p. 52-59, 2020.
- BAYER, FOX®. **Trifloxistrobina 150 g/L; Protiocozazol 175 g/L**. Bula de produto comercial, 2020. Disponível em: <<https://www.agro.bayer.com.br/essenciais-do-campo/protECAodecultivos/fox>>. Acesso em: 19.08.2022.

BENEDETTI, A. C. E. P.; COSTA, E. D.; ARAGON, C. C.; SANTOS, A. F.; GOULART, A. J.; ATTILLI-ANGELI, D. *et al.* Low-cost carbon sources for the production of a thermostable xylanase by *aspergillus niger*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 25-31, 2013.

BERNARDI-WENZEL J.; SIQUEIRA, A. L.; GONÇALVES, F. A.; HEIN, D. P. R.; SILVEIRA, J. A.; ROMANI, S. Isolamento e atividade antagonística de fungos endofíticos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 86-96, set.-dez., 2012.

BHADRA, F.; GUPTA, A.; VASUNDHARA, M.; REDDY, M. S. Endophytic fungi: a potential source of industrial enzyme producers. **3 Biotech**, v. 12, n. 86, p. 1-17, 2022.

BHUMIKA, N.; BHALKARA, P. A.; BEDEKARA, S. D.; SANJAY P. G. Solid state fermentation of soybean waste and an up-flow column bioreactor for continuous production of camptothecine by an endophytic fungus *Fusarium oxysporum*. **RSC Advances**, v. 6, 2016.

BOTELLA, L.; DIEZ, J. J. Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. **Fungal Diversity**, v. 47, p. 9-18, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRUM, M. C. P.; ARAÚJO, W. L.; MAKI, C. S.; AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from *Vitis labrusca* L. (Niagara Rosada) and its potential for the biological control of *Fusarium oxysporum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 4, p. 4187-4197, 2012.

BURLACU, A.; CORNEA, C. P.; ISRAEL-ROMING, F. Screening of xylanase producing microorganisms. **Research Journal of Agricultural Science**, v. 48 n. 2, 2016.

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. **Compatibilidade no uso de inoculantes e fungicidas no tratamento de sementes de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 31 p. (Boletim de Pesquisa n. 4).

CARDOSO, O. A. V.; FERREIRA-FILHO, E. X. Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *acrophialephora nainiana*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, n. 2, p. 309-314, 2003.

CARLI, S.; MELEIRO, L. P.; ROSA, J. C.; MORAES, L. A. B.; JORGE, J. A.; MASUI, D. C.; FURRIEL, R. P. M. A novel thermostable and halotolerant xylanase from *Colletotrichum graminicola*, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, n. 1, p. 508-517, 2016.

CHINELATO, G. Fungicidas da cultura da soja que já apresentaram resistência e alternativas de controle. *In: Lavoura10, Aegro*. Website. Disponível em: <https://blog.aegro.com.br/fungicidas-da-cultura-da-soja/>. 2019. Acesso em: 21 set. 2020.

CHRISTENSEN, M.; BENNETT, R.; SCHMID, J. Growth of *Epichloë/Neotyphodium* and p-endophytes in leaves of *Lolium* and *Festuca* grasses. **Mycological Research**, v. 106, n. 1, p. 93-106, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, Brasília, DF, v. 9, Safra 2021/22, n. 11, 2022.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar**, Brasília, DF, v. 7 - Safra 2020/21, n. 2 - Segundo levantamento. p. 1-64. 2021.

CORRÊA, R. C. G.; RHODEN, S. A.; MOTA, T. R.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A.; SOUZA, C.G.M. *et al.* Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, p. 1467-1478, 2014.

DEKKER, R. F. H. Biodegradation of hemicellulose. *In*: HIGUCHI, T. **Biosynthesis and biodegradation of wood components**. Tokyo: Academic Press, 1985. p. 505-533.

DESHMUKH, S.; HUCKELHOVEN, R.; SCHAFER, P.; IMANI, J.; SHARMA, M.; WEISS, M. *et al.* The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. **Agricultural Sciences**, v. 103, n. 49, p. 18450-18457, 2006.

DEVI, N. N.; PRABAKARAN, J. J.; WAHAB, F. Phytochemical analysis and enzyme analysis of endophytic fungi from *Centella asiatica*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. 1280-1284, 2012.

DILLON, A. J. P. CMCases. *In*: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 243-270.

DJAMEL, C.; ALI, T.; NELLY, C. Acid protease production by isolated species of *Penicillium*. **European Journal of Scientific Research**, v. 25 p. 469–477, 2009.

EK-RAMOS, M. J.; ZHOU, W.; VALENCIA, C. U.; ANTWI, J. B.; KALNS, L. L.; MORGAN, G. D. *et al.* A Spatial and Temporal Variation in Fungal Endophyte Communities Isolated from Cultivated Cotton (*Gossypium hirsutum*). **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. SOJA. **Tecnologias de produção de soja** - Região Central do Brasil 2014. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 265 p. (Sistemas de Produção n. 16). ISSN 2176-2902.

ESCUADERO-LEYVA, E.; ALFARO-VARGAS, P.; MUÑOZ-ARRIETA, R.; CHARPENTIER-ALFARO, C.; GRANADOS-MONTERO, M. M. *et al.* Tolerance and biological removal of fungicides by *Trichoderma* species isolated from the endosphere of wild Rubiaceae plants. **Frontiers Agronomy**, v. 3, 2022.

FAROUK, H. M.; ATTIA, E. Z.; EL-KATATNY, M. H. Hydrolytic enzyme production of endophytic fungi isolated from soybean (*Glycine max*). **J. Mod. Res.**, n. 2, p. 1-7, 2020.

FELBER, A. C.; SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; COSTA, A. T.; POLONIO, J. C.; MOURÃO, K. M. *et al.* Produção de endoglucanase por fungos endofíticos isolados de *Vitis Labrusca* L. utilizando casca de amendoim e serragem como substratos. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 3, p. 933-940, 2019.

FERNANDES, E. G.; PEREIRA, O. L.; SILVA, C. C.; BENTO, C. B. P.; QUEIROZ, M. V. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. **Microbiological Research**, v. 181 p. 84–92, 2015.

FILHO, E. X. F. Xilanases. *In*: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 137-148.

FIRAKOVA, S.; STURDIKOVA, M.; MUCKOVA, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia**, v. 62, p. 251–257, 2007.

FLORES, A. C.; PAMPHILE, J. A.; SARRAGIOTTO, M. H. CLEMENTE, E. Production of 3-nitropropionic acid by endophytic fungus *Phomopsis longicolla* isolated from *Trichilia elegans* A. JUSS ssp. *elegans* and evaluation of biological activity, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 923–932, 2013.

FOUDA, A. H.; HASSAN, S. E. D.; EID, A. M.; EWAIS, E. E. D. Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). **Annals of Agricultural Science**, v. 60, p. 95–104, 2015.

GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; LOPES, I. O. N.; MUHL, A. *et al.* **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2020/2021**: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 2021. (Circular técnica n. 174).

GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; SOARES, R. M.; MEYER, M. C.; COSTAMILAN, L. M.; ADEGAS, F. S. **Boas práticas para o enfrentamento da ferrugem-asiática da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2017. (Comunicado técnico n. 92).

GOLDBECK, R.; RAMOS, M. M.; PEREIRA, G. A. G.; MAUGERI-FILHO, F. Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian biome using different substrates. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 797-803, 2013.

GONÇALVES, H. V. **Avaliação de diversidade endofítica em plantas de soja (*Glycine max*) submetidas a condições de elevados CO₂ atmosférico e temperatura**. 2016. 73 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, MG, 2016.

GOPINATH, G.; KALEMLI-ÖZCAN, Ş.; KARABARBOUNIS, L.; VILLEGAS-SANCHEZ, C. Capital allocation and productivity in South Europe. **The Quarterly Journal of Economics**, v. 132, n. 4, p. 1915-1967, 2017.

GOUDA, M. K.; ABDEL-NABY, M. A. Catalytic properties of the immobilized *Aspergillus tamarii* xylanase. **Microbiological Research**, v. 157, n. 4, p. 275 - 281, 2002.

GRACIANO, L.; CANDIDO, K. T.; JACOMINI, D.; SIMIONI, B.; CHRIST, D.; KADOWAKI, M. K. *et al.* Uma xilanase termoestável de uma nova estirpe de *Aspergillus fumigatus* que apresenta elevada capacidade de hidrolisar hemicelulose a partir de palha de milho. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 69054-69077, 2020.

GREETATORN, T.; HASHIMOTO, S.; SARAPAT, S.; TITABUTR, P.; BOONKERD, N.; UCHIUMI, T.; TEAUMROONG, N. Empowering rice seedling growth by endophytic *Bradyrhizobium* sp. SUTN 9-2. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 68, p. 258-266, 2019.

GUPTA, R.; ANAND, G.; GAUR, R.; YADAV, D. Plant–microbiome interactions for sustainable agriculture: a review. **Physiology Molecular Biology Plants**, v. 27, n.1, p. 165–179, 2021.

GUPTA, S.; WHITE, J. F.; KULKARNI, M. G. An outlook on current and future directions in endophyte research. **South African Journal of Botany**, v. 134, p. 1-2, 2020.

GUTIÉRREZ-ROJAS, I.; MORENO-SARMIENTO, N.; MONTOYA, D. Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 32, n. 1, p. 1–12, 2015.

- HALLMANN, J.; SIKORA, R. A. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. **European Journal of plant pathology**, v. 102, n. 2, p. 155-162, 1996.
- HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. C. Production of fungal xylanase. **Bioresource Technology**, v. 58 p.137-161, 1996.
- HAMAYUN, M.; HUSSAIN, A.; KHAN, S. A.; KIM, H.-Y.; KHAN, A.L.; WAQAS, M. *et al.* Gibberellins producing endophytic fungus *Porostereum spadiceum* AGH786 rescues growth of salt affected soybean. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- HEINEN, P. R.; HENN, C; PERALTA, R. M.; BRACHT, A.; SIMÃO, R. C. G.; SILVA, J. L. C. *et al.* Xylanase from *Fusarium heterosporum*: Properties and influence of thiol compounds on xylanase activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 9, 2014.
- HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M. *et al.* **Manual de identificação de doenças de soja**. 5. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 76 p. (Documento 256).
- HENNING, A. A. **Guia prático para identificação de fungos mais frequentes em sementes de soja**. 1 ed. Brasília: Embrapa, 2015. 33 p.
- HENNING, A. A. CATTELAN, A. J.; KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA NETO, J. B.; COSTA, N. P. **Tratamento e inoculação de sementes de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 1994. 6 p. (Comunicado técnico, n. 54).
- IMPULLITTI, A. E.; MALVICK, D. K. Fungal endophyte diversity in soybean. **Journal of Applied Microbiology** v. 114, p. 1500-1506, 2013.
- JA'AFARU, M. I. Screening of fungi isolated from environmental samples for xylanase and cellulase production. **ISRN Microbiology**, A. 283423. p. 1-7, 2013.
- JAGANNATH, S.; KONAPPA, N.; LOKESH, A.; BHUVANESHWARI, D. T.; UDAYASHANKAR, A. C.; CHOWDAPPA, S. *et al.* Bioactive compounds guided diversity of endophytic fungi from *Baliospermum montanum* and their potential extracellular enzymes. **Analytical Biochemistry**, A. 227189932. 2021.
- JOSHI, G.; SHUKLA, A.; SHUKLA, A. Synergistic response of auxin and ethylene on physiology of *Jatropha curcas* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 23, p. 67-77, 2011.
- KALIM, B.; ALI, N. M. Optimization of fermentation media and growth conditions for microbial xylanase production. **3 biontech**, v. 6, n. 122, p. 3-7, 2016.
- KHOKHAR, I.; MUKHTAR, I.; MUSHTAQ, S. Isolation and Screening of amylolytic filamentous fungi. **J. Appl. Sci. Environ. Manage.**, v. 15, n.1, p. 203-206, 2011.
- KNOB, A.; BEITEL, S. M.; FORTKAMP, D.; TERRASAN, C. R. F.; ALMEIDA, A. F. Production, Purification, and Characterization of a Major *Penicillium glabrum* Xylanase Using Brewer's Spent Grain as Substrate. **BioMed Research International**, v. 2013, A. 728735, p. 1–8, 2013.
- KOCABAS, D. S.; GÜDER, S.; OZBEN, N. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 66-75, 2015.

KOGEL, K. H. FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 4, p. 358-363, 2006.

KRISANA, A. RUTCHADAPORN, S.; JARUPAN, G.; LILY, E.; SUTIPA, T.; KANYAWIM, K. Endo-1, 4- β -xylanase B from *Aspergillus cf. niger* BCC14405 isolated in Thailand: purification, characterization and gene isolation. **BMB Reports**, v. 38, n. 1, p. 17-23, 2005.

KUMAR, A.; RADHAKRISHNAN, E. K. **Microbial endophytes: functional biology and application**. 1. ed. Woodhead Publishing, 2020. 418 p.

KUMAR, N. V.; RANI, M. E. Microbial enzymes in paper and pulp industries for bioleaching application. *In: Research Trends of Microbiology*, India. MedDocs Ebook, 2019. 10 p.

LARRAN, S.; ROLLAN, C.; ÁNGELES, H. B.; ALIPPI, H. E.; URRUTIA, M. I. Endophytic fungi in healthy soybean leaves. **Investigación Agraria, Producción y Protección Vegetales**, v. 17, n. 1, p. 173-178, 2002.

LATZ, M. A. C.; JENSEN, B.; COLLINGE, D. B.; JORGENSEN, H. J. L. Identification of two endophytic fungi that control *Septoria tritici* blotch in the field, using a structured screening approach. **Biological Control**, v. 141, p. 104128, 2020.

LEBEIS, S. L. The potential for give and take in plant–microbiome relationships. **Frontiers in Plant Science**. v. 5, n. 287, p. 1-6, 2014.

LIU, Y.; XU, P.; YANG, F.; LI, M.; YAN, H.; LI, N.; ZHANG, X.; WANG, W. Composition and diversity of endophytic bacterial community in seeds of super hybrid rice ‘Shenliangyou 5814’ (*Oryza sativa* L.) and its parental lines. **Plant Growth Regulation volume**, v. 87, p. 257–266, 2019.

LOPES, A. M.; VALERI, A.; PESSOA-JÚNIOR, A. Comparison of kinetic characteristics of xylanases from *Aspergillus niger* and *Trichoderma* sp. with pH and temperature baking process parameters. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 19, p. 2640-2645, 2013.

LUNKES, J. C. **Purificação e caracterização bioquímica de xilanase-I produzida por *Penicillium crustosum* e sua aplicação**. 35 f. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, 2015.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN, Z. Y. L.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, n. 66, p. 506–77, 2002.

MARIA, G. L.; SRIDHAR, K. R.; RAVIRAJA, N. S. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of Southwest Coast of India. **Journal of Agricultural Technology**, v. 1, p. 67– 80, 2005.

MAROLDI, M. M. C.; VASCONCELLOS, V. M.; LACAVA, P. T.; FARINAS, C. S. Potential of mangrove-associated endophytic fungi for production of carbohydrases with high saccharification efficiency. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, p. 806–820, 2018.

MARQUES, N. P.; PEREIRA, J. C.; GOMES, E.; SILVA, R.; ARAÚJO, A. R.; FERREIRA, H. *et al.* Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation

using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 66-75, 2018.

MCILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**, v. 49, p. 183-186, 1921.

MENTEN, J. O. M.; MINUSSI, C. C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

METACYC. **Reaction: 3.2.1.37 Beta-xylosidase**. 2018. Disponível em: <https://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=REACTION&object=3.2.1.37-RXN>. Acesso em 16 set. 2020.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n.3, p.426-428, 1959.

MILLER, W. A.; ROY, K. W. Mycoflora of soybean leaves, pods, and seeds in Mississippi. **Canadian Journal of Botany**, v. 60, p. 2716-2723, 1982.

MING, Q.; HUANG, X.; GUO, L.; LIU, D.; QIN, L.; HE, Y. *et al.* Diversity of endophytic fungi in *Coptis chinensis* Franch. and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Folia Microbiologica**, v. 67, n. 6, p. 965-974, 2022.

MOREIRA, L. R. S.; CAMPOS, M. C.; SIQUEIRA, P. H. V. M.; SILVA, L. P.; RICART, C. A. O.; MARTINS, P. A. *et al.* Two β -xylanases from *Aspergillus terreus*: characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 46-52, 2013.

MORICCA, S. RAGAZZI, A. Fungal endophytes in mediterranean oak forests: a lesson from *discula quercina*. **Phytopathology**, v. 98, p. 380-386, 2008.

MOSTERT, L., CROUS, P. W.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. **Sydowia**, v. 52, n. 1, p. 46-58, 2000.

NAIR, S. G.; SINDHU, R.; SHASHIDHAR, S. Purification and biochemical characterization of two xylanases from *Aspergillus sydowii* SBS 45. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 149, n. 3, p. 229-243, 2008.

ODUM, E. P. **Basic ecology**. Nova Iorque: Saunders, 1983. 613 p.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, C. F.; SOUZA, L. A. S.; MARTINS, A. N. Sensibilidade 'in vitro' dos fungos *Alternaria* sp. e *Sclerotinia* sp. a fungicidas sistêmicos. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 2, n. 3, 2003.

ORLANDELLI, R. C.; ALMEIDA, T. T.; ALBERTO, R. N.; POLONIO, J. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Antifungal and proteolytic activities of endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, 2015.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. *In*: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer, 1991.

PIMENTEL, I. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; GABARDO, J.; STUART, R. M.; AZEVEDO, J. L. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* (L.) Merril) under different environmental conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 5, p. 705-711, 2006.

POLONIO, J. C.; POLLI, A. D.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. RNA applications for endophytic research. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 3, 2016a.

POLONIO, J. C.; RIBEIRO, A. S.; RHODEN, S. A.; SARRAGIOTTO, M. H.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. 3-Nitropropionic acid production by the endophytic *Diaporthe citri*: Molecular taxonomy, chemical characterization, and quantification under pH variation. **Fungal Biology**, v. 120, p. 600–1608, 2016b.

PRAKASHAM, R. S.; SREENIVAS RAO, R.; HOBBS, P. J. Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 3, n. 1, p. 8-36, 2009.

PRIETO, K. R.; ECHAIDE-AQUINO, F.; HUERTA-ROBLES, A.; VALERIO, H. P.; MACEDO-RAYGOZA, G.; PRADO, F. M. *et al.* Endophytic bacteria and rare earth elements; promising candidates for nutrient use efficiency in plants. *In*: HOSSAIN, M.; KAMIYA, T.; BURRITT, D.; TRAM, L. P.; FUJIWARA, T. **Plant Macronutrient Use Efficiency**. Cambridge: Academic Press, 2017. p. 285–302.

RAGHAV, D.; JYOTI, A.; SIDDIQUI, A. J.; SAXENA, J. Plant-associated endophytic fungi as potential bio-factories for extracellular enzymes: progress, challenges and strain improvement with precision approaches. **Journal Applied Microbiology**, v. 00, p. 1–24, 2022.

RIBEIRO, A. S.; POLONIO, J. C.; COSTA, A. T.; SANTOS, C. M.; RHODEN, S. A.; AZEVEDO, J. L. *et al.* Bioprospection of culturable endophytic fungi associated with the ornamental plant *pachystachys lutea*. **Current Microbiology**, v. 75, p. 588–596, 2018.

RIPA, F. A.; CAO, W. D.; TONG, S.; SUN, J. G. Assessment of plant growth promoting and abiotic stress tolerance properties of wheat endophytic fungi. **BioMed Research International**, A. 6105865, 2019.

ROBL, D.; DELABONA, P. S.; MERGEL, C. M.; ROJAS, J. D.; COSTA, P. S.; PIMENTEL, I. C. *et al.* The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC Biotechnology**, v. 13, n. 94, 2013.

RUSSO, M. L.; PELIZZA, S. A.; CABELLO, M. N.; STENGLEINC, S. A.; VIANNA, M. F.; SCORSETTI, A. C. Endophytic fungi from selected varieties of soybean (*Glycine max* L. Merr.) and corn (*Zea mays* L.) grown in an agricultural area of Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**. v. 48, n. 2, p. 154-160, 2016.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. 412 p.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, n. 1, p. 319-343, 1998.

SALLES, B. C.; CUNHA, R. B.; FONTES, W.; SOUSA, M. V.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of new xylanase from *Acrophialophora nainiana*. **Journal of Biotechnology**, v. 81, p. 199-204, 2000.

SANTOS, M. S. B.; SILVA, A. A. C. R. Sanidade de sementes de arroz, biocontrole, caracterização e transmissão de *Curvularia lunata* em semente-plântula de arroz. **Revista Ceres**, v. 61, n. 4, p. 511-517, 2014.

SARANRAJ, P.; SUMATHI, V.; REETHA, D.; STELLA, D. Decolourization and degradation of direct azo dyes and biodegradation of textile dye effluent by using bacteria isolated from textile dye effluent. **Journal of Ecobiotechnology**, v. 2, n. 7, p. 7–11, 2010.

SCHARDL, C. L.; LIU, J. S.; WHITE, J. F. FINKEL, R. A.; AN, Z.; SIEGEL, M. R. Molecular phylogenetic relationships of nonpathogenic grass mycosymbionts and clavicipitaceous plant pathogens. **Plant Systematics and Evolution**, v. 178, p. 27-41, 1991.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SHAH, S.; SHRESTHA, R.; MAHARJAN, S.; SELOSSE, M.-A.; PANT, B. Isolation and characterization of plant growth-promoting endophytic fungi from the roots of *Dendrobium moniliforme*. **Plants**, v. 8, n. 5, 2019.

SILVA, J. D.; QUEIROZ, A. C. **Análises de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2009. 235 p.

SIM, C. S. F.; CHEN, S. H.; TING, A. S. Y. Endophytes: emerging tools for the bioremediation of pollutants. **Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management**. Singapore, p. 189-217, 2019.

SINGH, M.; DOTANIYA, M.; MISHRA, A.; DOTANIYA, C.; REGAR, K.; LATA, M. Role of biofertilizers in conservation agriculture. In: **Conservation Agriculture**, Singapore, p. 113-134, 2016.

SINGH, R. S.; SINGH, T.; PANDEY, A. Microbial enzymes. An overview. **Advances in Enzyme Technology**, p. 1-40, 2019. ISBN 97804444641144.

SOARES, M. A.; LI, H.; BERGEN, M.; WHITE, J. F. Functional role of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* in enhancing growth and disease protection of invasive english ivy (*Hedera helix* L.). **Plant and Soil**, v. 405, p.107–123, 2015.

SORGATTO, M.; GUIMARÃES, N.; ZANOELO, F. F.; MARQUES, M. R.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C. *et al.* Purification and characterization of an extracellular xylanase produced by the endophytic fungus, *Aspergillus terreus*, grown in submerged fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 32, p. 8076-8084, 2012.

SOUSA, C. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S. Produção de mudas de tomateiro em substrato orgânico inoculado e incubado com estreptomicetos. **Bragantia**, v. 68, n. 1, p. 195-203, 2009.

SPECIAN, V.; SERRAGIOTO, M. H.; PAMPHILE, J. A.; CLEMENTE, E. Chemical characterization of bioactive compounds from the endophytic fungus *Diaporthe helianthi* isolated from *Luehea divaricata*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1174-1182, 2012.

SRAVANI, B.; RAGHAVENDRA, P.; CHANDRASEKHAR, Y.; REDDY, Y. V. M.; SIVASUBRAMANIAN, R.; VENKATESWARLU, K. *et al.* Immobilization of platinum-cobalt and platinum-nickel bimetallic nanoparticles on pomegranate peel extract-treated reduced

graphene oxide as electrocatalysts for oxygen reduction reaction. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 13, p. 7680-7690, 2020.

SRIDEVI, B.; CHARYA, M. A. S. Isolation, identification e screening of potential cellulase-free xylanase producing fungi. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 22, p. 4624-4630, 2011.

STEPNIEWSKA, Z.; KUZNIAR, A. Endophytic microorganisms - promising applications in bioremediation of greenhouse gases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 9589-9596, 2013.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

STUART, A. K. C.; STUART, R. M.; PIMENTEL, I. C. Effect of agrochemicals on endophytic fungi community associated with crops of organic and conventional soybean (*Glycine max* L. Merril). **Agriculture and Natural Resources** v. 52, p. 388-392, 2018.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33-64, 2002.

SUEBRASRI, T.; HARADA, H.; JOGLOY, S.; EKPRASERT, J.; BOONLUE, S. Auxin-producing fungal endophytes promote growth of sunchoke. **Rhizosphere**, v. 16, 2020.

THOMSON, J. A. Molecular biology of xylan degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 104, 1993.

TIAN, C.; BEESON, W. T.; LAVARONE, A. T.; SUN, J.; MARLETTA, M. A.; CATE, J. H. D. Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106 n. 22157, p. 62-66, 2009.

ULRICH, K.; STAUBER, T.; EWALD, D. *Paenibacillus* - a predominant endophytic bacterium colonising tissue cultures of woody plants. **Plant Cell, Tissues and Organ Culture**, v. 93, p. 347-351, 2008.

URAMOTO, K.; WALDER, J. M. M.; ZUCCHI, R. A. Análise quantitativa e distribuição de populações de espécies de *anastrepha* (Diptera: tephritidae) no campus Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. **Neotropical Entomology**. v. 34, n. 1, p. 033-039, 2005.

VANDENBERGHE, L. P. S.; VALLADARES-DIESTRA, K. K.; BITTENCOURT, G. A.; TORRES, L. A. Z.; VIEIRA, S.; KARP, S. G. *et al.* Beyond sugar and ethanol: the future of sugarcane biorefineries in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 167, 2022.

VERMA, S. K.; WHITE, J. F. Indigenous endophytic seed bacteria promote seedling development and defend against fungal disease in browntopmillet (*Urochloa ramosa* L.). **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, p. 764-778, 2018.

VITOLO, M.; FILHO, J. A. R. **Enzimas no contexto da síntese orgânica**. São Paulo: Autores, 1998. 84 p.

WANG, S.; DAI, G.; YANG, H.; LUO, Z. Lignocellulosic biomass pyrolysis mechanism: a state of the art review. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 62, p. 33-86, 2017.

WANI, Z. A.; ASHRAF, N.; MOHIUDDIN, T.; RIYAZ-UL-HASSAN, S. Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 99, n. 7, p. 2955-2965, 2015.

WATANABE, T. **Pictorial atlas of soil and seed fungi morphologies of cultured fungi and key to species**. 3. ed. CRC Press: Boca Raton, 2010. 397 p.

WHITE, J. F.; CRAWFORD, H.; TORRES, M. S.; MATTERA, R.; IRIZARRY, I.; BERGEN, M. A proposed mechanism for nitrogen acquisition by grass seedlings through oxidation of symbiotic bacteria. **Symbiosis**, v. 57, p. 161–171, 2012.

WHITE, J. F.; KINGSLEY, K. L.; VERMA, S. K.; KOWALSKI, K. P. Rhizophagy Cycle: An Oxidative Process in Plants for Nutrient Extraction from Symbiotic Microbes. **Microorganisms**, v. 6, n. 95, p. 1 - 20, 2018.

WHITE, J. F.; KINGSLEY, K. L.; ZHANG, Q.; VERMA, R.; OBI, N.; DVINSKIKH, S. *et al.* Review: endophytic microbes and their potential applications in crop management. **Pest Management Science**, v. 75, p. 2558–2565, 2019.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. *In*: INNIS, M.; GELFAND, D.; SNINSKY, J.; WHITE, T. (Ed.) **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. Cambridge: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WILSON, D. B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 259–63.73, 2011.

WIPUSAREE, N.; SIHANONTH, P.; PIAPUKIEW, J.; SANGVANICH, P.; KARNCHANATAT, A. Purification and characterization of a xylanase from the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from the Thai medicinal plant, *Croton oblongifolius* Roxb. **African Journal of Microbiological Research**, v. 5, n. 31, p. 5697-5712, 2011.

XIAO-XUAN, C.; LEI, W.; HUI-YONG, F.; YU-GUANG, Z.; CHUN-YAN, S. The cultivable endophytic fungal community of *Scutellaria baicalensis*: diversity and relevance to flavonoid production by the host. **Plant Signaling and Behavior**, v. 17, n. 1, 2022.

XIMENES, F. A. SOUSA, M. V.; PULS, J.; SILVA, F. G. JR, FILHO, E. X. F. *et al.* Purification and characterization of low-molecular-weight xylanase produced by *Acrophialophora nainiana*. **Current Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 18-21 1999.

YANG, W.; BAI, Y.; YANG, P.; LUO, H.; HUANG, H.; MENG, K. *et al.* A novel bifunctional GH51 exo- α -l-arabinofuranosidase/endo-xylanase from *Alicyclobacillus* sp. A4 with significant biomass-degrading capacity. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2015.