

---

**Ciências Biológicas**

---

**THAYS NEIGRI SILVA**

**RELAÇÃO ENTRE OS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE  
*ACALYPHA* E *COLOCASIA* E AS FORMIGAS-  
CORTADEIRAS**

THAYS NEIGRI SILVA

RELAÇÃO ENTRE OS FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *ACALYPHA* E  
*COLOCASIA* E AS FORMIGAS-CORTADEIRAS

Orientador: Prof. Dr. ODAIR CORREA BUENO

Co-orientador: Dra. MANUELA DE OLIVEIRA RAMALHO SANCHEZ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Biociências da Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -  
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau  
de bacharela e licenciada em Ciências  
Biológicas.

Rio Claro  
2018

S586r Silva, Thays Neigri  
Relação entre os fungos endofíticos de Acalypha e Colocasia e as  
formigas-cortadeiras / Thays Neigri Silva. -- Rio Claro, 2018  
31 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura -  
Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Instituto de Biociências, Rio Claro  
Orientador: Odair Correa Bueno  
Coorientadora: Manuela de Oliveira Ramalho Sanchez

1. Micodiversidade. 2. Isolamento de Culturas. 3. Identificação  
Molecular. 4. Primer ITS. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de  
Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

*Dedico esse trabalho à minha mãe, pela paciência, carinho e incentivo.*

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo e mais nada, agradeço a Deus, Pai cuidadoso e protetor que percorreu comigo a caminhada até aqui. Pelo amor sempre presente, misericórdia e fidelidade. Pelos ensinamentos, duras correções e persistência, sou intensamente grata. Não fosse assim, jamais atingiria tal linha de chegada. Nunca estive só.

Dedico meus agradecimentos ao Prof. Dr. Odair Correa Bueno pela orientação, suporte, correções e incentivos. À minha co-orientadora Dra. Manuela Ramalho que em meio aos desafios de defesa de tese, maternidade e mudança de país, permaneceu me apoiando e incentivando, de sorriso aberto, sem nunca me deixar desamparada. A todos os professores, alunos e funcionários do Centro de Estudo de Insetos Sociais e do Instituto de Biociências que, de alguma forma, possibilitaram a realização desse trabalho. À Thais, Bianca, Nathalia e Syndell, pela alegria que acrescentaram aos meus dias e por me mostrar o lado da cidade que desconhecia. Mayara, por toda a ajuda, conversas inspiradoras e conselhos sinceros. Daiane e Amanda pelas comilanças comemorativas que viraram tradição e por toda ajuda e sugestões em relação à pesquisa.

Agradeço à minha mãe Alice, fonte de carinho e dedicação de toda uma vida. Pela doçura, zelo, abraços e puxões de orelha. Exemplo de mãe e amiga que merece todas as honras por tamanha lealdade e perseverança. Espero um dia ser assim, tão boa mãe para os meus filhos. À toda minha família, tios e primos, agradeço pelas orações, apoio e afeto. Pelos encontros, festas juninas e almoços que me traziam de volta para casa. À minha tia Marli, Camila, Laertte, Victor, Caju e Alício, um agradecimento especial. Sou grata à minha avó Zezé (*in memoriam*) que me incentivou a estudar e vibrou de orgulho a cada passo que eu firmei, por menor que este fosse. Levo comigo seu exemplo de fibra e garra, pelo que viveu até o fim.

De São Paulo, aos meus amigos Letícia, Lilian, Fernando, Bárbara e Pedro, que estiveram comigo durante o Grande Tormento, sempre prontos em ajudar, e que nunca me deixaram, apesar de distantes. E também aos preciosos que tive a graça de encontrar em Rio Claro: Juliana, pela amizade e parceria durante esses 5 anos, e Sam, pela companhia e sinergia com a jardinagem, cafés da tarde, boas músicas e o que mais a vida nos reservar. Agradeço também aos meus colegas de turma do CBI 2014 que viveram comigo diversas sensações: as de insegurança e dúvida e as de diversão e superação. A todos que participaram de alguma maneira da minha caminhada nessa etapa acadêmica, agradeço.

Por fim, agradeço à Unesp pelo ambiente e oportunidade e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Pensava que nós seguíamos caminhos já feitos, mas parece que não os há. O  
nosso ir faz o caminho. (LEWIS, 2009)

## RESUMO

As plantas possuem interações simbióticas com diversos micro-organismos e muitas delas com fungos endofíticos. Essa simbiose se torna ainda mais complexa quando envolve as formigas-cortadeiras. Vários estudos mostraram que existe uma grande quantidade de fungos endofíticos nas plantas que essas formigas cortam, e que alguns desses fungos não são bem-vindos dentro do ninho. Os fungos endofíticos que chegam ao interior do ninho por meio das folhas cortadas ainda são pouco conhecidos, assim como suas relações com as formigas-cortadeiras e com o fungo mutualista. As formigas-cortadeiras revelam preferência por folhas de *Acalypha wilkesiana* e não mostram interesse por folhas de *Colocasia esculenta* variedade *esculenta*. Neste trabalho, buscou-se identificar a micodiversidade de endofíticos presentes nas folhas de *A. wilkesiana* 'Marginata', de *A. wilkesiana* 'Musaica' e de folhas jovens e senescentes do taro *C. esculenta* var. *esculenta*, utilizando técnicas de cultivo microbiológico e de biologia molecular. Foram isolados 112 fungos endofíticos, agrupados em 68 morfoespécies das quais 24 foram identificadas molecularmente, utilizando a região ITS. Dos gêneros encontrados, a maioria é citada como fitopatogênicos ou como possíveis agentes para o controle biológico de doenças. Os dados obtidos revelam que há uma diferença na diversidade entre as comunidades de fungos das plantas estudadas, o que sugere que a preferência das formigas-cortadeiras por certos tipos foliares pode estar relacionada com a comunidade de fungos endofíticos. Para um resultado conclusivo, entretanto, já está sendo conduzida a identificação dos isolados restantes.

**Palavras-chave:** Micodiversidade; Isolamento de Culturas; Identificação Molecular; Primer ITS.

## ABSTRACT

Plants have symbiotic interactions with several microorganisms, including endophytic fungi. This symbiosis becomes even more complex when it involves leaf-cutting ants. Many studies revealed that there are a lot of endophytes in the plants that ants cut and that some of them are not welcome inside the nest. Little is known about the endophytic fungi that reach the interior of the nest through leaf fragments and their relationships with leaf-cutting ants and with the mutualistic fungus. The leaf-cutting ants show preference for *Acalypha wilkesiana* leaves and show no interest in leaves of *Colocasia esculenta* var. *esculenta*. This study aimed to isolate and identify the endophytic micodiversity present in foliar tissues of *A. wilkesiana* 'Marginata', *A. wilkesiana* 'Musaica' and young and senescent leaves of *C. esculenta* var. *esculenta*, using methods of microbiological culture and molecular techniques. A total of 112 endophytic fungi were isolated, grouped into 68 morphospecies of which 24 were molecularly identified using the ITS region. Most of the genera found are cited as phytopathogenic or as possible agents for biological control of diseases. The obtained data reveal that there is a difference in diversity among the fungi communities of the studied plants, suggesting that the preference of leaf-cutting ants by certain leaf types may be related to the endophytic fungi community. For a conclusive result, however, identification of the remaining isolates is already being conducted.

**Key words:** Micodiversity; Culture Isolation; Molecular Identification; ITS Primer.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Etapas do banho sequencial para esterilização externa. Etanol 70% (A e C), hipoclorito 3-5% (B) e água deionizada estéril (D e E).....15
- Figura 2** – Fungos endofíticos isolados da planta *Acalypha wilkesiana* 'Marginata'.....19
- Figura 3** – Fungos endofíticos isolados da planta *Acalypha wilkesiana* 'Musaica'.....19
- Figura 4** – Endofíticos isolados de plantas jovens de *Colocasia esculenta* variedade *esculenta*.....20
- Figura 5** – Endofíticos isolados de plantas senescentes de *Colocasia esculenta* variedade *esculenta*.....20
- Figura 6** – Placas com alíquotas da água deionizada não contaminada da lavagem final do processo de esterilização dos fragmentos vegetais de *Acalypha wilkesiana* 'Musaica' (A), *Acalypha wilkesiana* 'Marginata' (B), *Colocasia esculenta* variedade *esculenta* jovem (C) e *Colocasia esculenta* variedade *esculenta* senescente (D).....21
- Figura 7** – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR para a região ITS dos fungos endofíticos da planta *Acalypha wilkesiana* 'Marginata'.....22

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Identificação molecular dos fungos endofíticos da planta *Acalypha wilkesiana*.....22

**Tabela 2** – Identificação molecular dos fungos endofíticos da planta *Colocasia esculenta* variedade *esculenta*.....23

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1** – Porcentagem dos fungos endofíticos isolados.....18

**Gráfico 2** – Diagrama de Venn e o número total de endofíticos isolados de cada tipo foliar.....23

## SUMÁRIO

|            |                                                                                               |           |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                        | <b>11</b> |
| <b>2</b>   | <b>OBJETIVO.....</b>                                                                          | <b>14</b> |
| <b>3</b>   | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                | <b>15</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Coleta, Isolamento, Cultivo e Purificação das Culturas.....</b>                            | <b>15</b> |
| <b>3.2</b> | <b>Extração do DNA, Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), Eletroforese e Purificação.....</b> | <b>16</b> |
| <b>3.3</b> | <b>Sequenciamento e Análise das Sequências.....</b>                                           | <b>17</b> |
| <b>4</b>   | <b>RESULTADOS.....</b>                                                                        | <b>18</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Isolamento dos Fungos Endofíticos.....</b>                                                 | <b>18</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Amplificação da Região ITS por PCR.....</b>                                                | <b>21</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Identificação dos Isolados.....</b>                                                        | <b>22</b> |
| <b>5</b>   | <b>DISCUSSÃO.....</b>                                                                         | <b>24</b> |
| <b>6</b>   | <b>CONCLUSÕES.....</b>                                                                        | <b>27</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                       | <b>28</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Assim como diversos seres vivos, as plantas mantêm interações simbióticas com uma série de micro-organismos. Sabe-se que algumas destas simbioses podem garantir o sucesso ou afetar a distribuição da população do hospedeiro, além de provocar interferências na composição de comunidades estabelecidas próximas a ele. Tais interações contribuem também com funções vitais do mesmo, já que podem ter evoluído estabelecendo uma relação indispensável com o passar dos anos (HAJEK ; ST LEGER, 1994; GILBERT ; STRONG, 2007).

Existe uma grande diversidade de fungos simbióticos e muitos vivem em interação com as plantas, visto que a colonização terrestre e consequente evolução das plantas só foi possível devido a essa associação (PIROZYNSKI ; MALLOCH, 1975). Os fungos simbióticos podem estar associados às partes foliares das plantas, os chamados endofíticos, associados às algas, compondo os líquens, ou ainda associados à raízes de algumas plantas, denominadas micorrizas. Particularmente, os fungos endofíticos são extremamente diversos em folhas de plantas tropicais (ARNOLD et al., 2000). Dessa forma, interagem com as populações herbívoras que se alimentam da planta hospedeira, como as formigas-cortadeiras (VAN BAEL et al., 2009).

As formigas dos gêneros *Atta* Fabricius, 1804 e *Acromyrmex* Mayr, 1865, da tribo Attini, conhecidas como formigas-cortadeiras, realizam intensa atividade de corte às plantas, que acarreta em prejuízos consideráveis e, por isso, são consideradas importantes pragas agrícolas na América Latina (WETTERER et al., 1998). Essas espécies mantêm uma relação mutualística com o fungo basidiomiceto *Leucoagaricus gongylophorus*, cultivado no interior do formigueiro, o qual serve como alimento para as formigas. As operárias realizam os processos para a manutenção do jardim de fungo, fornecendo fragmentos vegetais frescos e fazendo o controle de organismos indesejados (HERVEY et al., 1977).

A diversidade dos fungos endofíticos que entram no ninho através das folhas ainda não é amplamente conhecida, assim como as interações simbióticas com as formigas-cortadeiras e com o jardim de fungo. Essa relação pode ser benéfica ou não, atuando como agentes patogênicos, ou ainda agindo como transeuntes neutros (VAN BAEL et al., 2009). Nessa linha de pesquisa, Van Bael e seus colaboradores (2009) verificaram que, apesar de *Atta colombica* Guérin-Méneville, 1844 não dar preferência

ao corte de folhas de *Merremia umbellata* contaminadas ou não com o endofítico *Glomerella cingulata*, as formigas despendem muito tempo para remoção dos contaminantes, e isso reduz significativamente a quantidade desses organismos que entra no formigueiro.

As formigas-cortadeiras, apesar de oportunistas, revelam preferência por algumas dicotiledôneas, incluindo espécies de acalifa, como a *Acalypha wilkesiana*, já que podem complementar sua nutrição a partir de líquidos extraídos diretamente da folha (NAGAMOTO et al., 2009; PAUL ; ROCES, 2003). Pertencente à família Euphorbiaceae, essa espécie se caracteriza como arbustiva, semi-lenhosa e perene, utilizada amplamente para fins de ornamentação, uma vez que, apresentam folhas de formato e coloração variada (LORENZI ; SOUZA, 2001). Existem vários cultivos com diferentes formas e cores das folhas e algumas cultivares apresentam maior atratividade para as formigas-cortadeiras do que outras da mesma espécie. Por exemplo, a cultivar 'Marginata', que possui folhas verdes acobreadas com margem em tom variante de rosa claro a carmesim, apresenta maior atratividade para as formigas-cortadeiras do que a 'Musaica', que possui folhas manchadas de verde, vermelho e laranja (GILMAN, 1999). Por outro lado, folhas do taro *Colocasia esculenta* var. *esculenta*, Araceae de importância econômica por ser uma cultura alimentar em vários países, não exercem atratividade ou até mesmo repelência para as formigas-cortadeiras, apresentando certa diferença entre folhas novas e senescentes (SANTOS, 2011; Amanda Carlos, comunicação pessoal). É importante salientar, entretanto, que formigas-cortadeiras são insetos oportunistas e que na ausência de recursos alimentares melhores, são capazes de cortar o taro e incorporá-lo ao jardim de fungo (DUMKE, 2002).

A partir da década de 70, com o advento da técnica de PCR e o contínuo avanço tecnológico, as técnicas moleculares vem se tornando mais acessíveis e podem ser utilizadas como excelentes ferramentas para estudos de interações simbióticas. Recentemente, Pringle e Moreau (2017), utilizando Sequenciamento de Nova Geração (NGS), analisaram a estrutura de comunidades bacterianas e fúngicas envolvidas na simbiose das formigas com plantas neotropicais e verificaram que muitos deles são partilhados por ambos indivíduos, e que essas diversas trocas microbianas afetam as interações entre a formiga e a planta, podendo moldar a evolução dessas simbioses.

Dessa forma, a proposta de verificar a presença, identificar e analisar as características dos fungos endofíticos associados à essas plantas se torna altamente relevante, uma vez que esses dados podem contribuir para o esclarecimento dessa complexa simbiose que envolve a formiga, a planta, o jardim de fungo e os endofíticos. Assim, a microbiologia fúngica interna dessas plantas podem revelar informações importantes sobre os hábitos das formigas e do jardim de fungo, bem como sinalizar um possível controle de qualidade na escolha das folhas pelas formigas.

## 2 OBJETIVO

O presente estudo objetivou isolar, identificar e verificar a distribuição da biodiversidade de fungos endofíticos presentes no interior dos tecidos das folhas de duas cultivares de *Acalypha wilkesiana*, 'Marginata' e 'Musaica', e de folhas jovens e senescentes do taro *Colocasia esculenta* variedade *esculenta*, espécies de plantas comumente encontradas em trabalhos de atratividade alimentar com formigas-cortadeiras, utilizando técnicas de microbiologia e de biologia molecular.

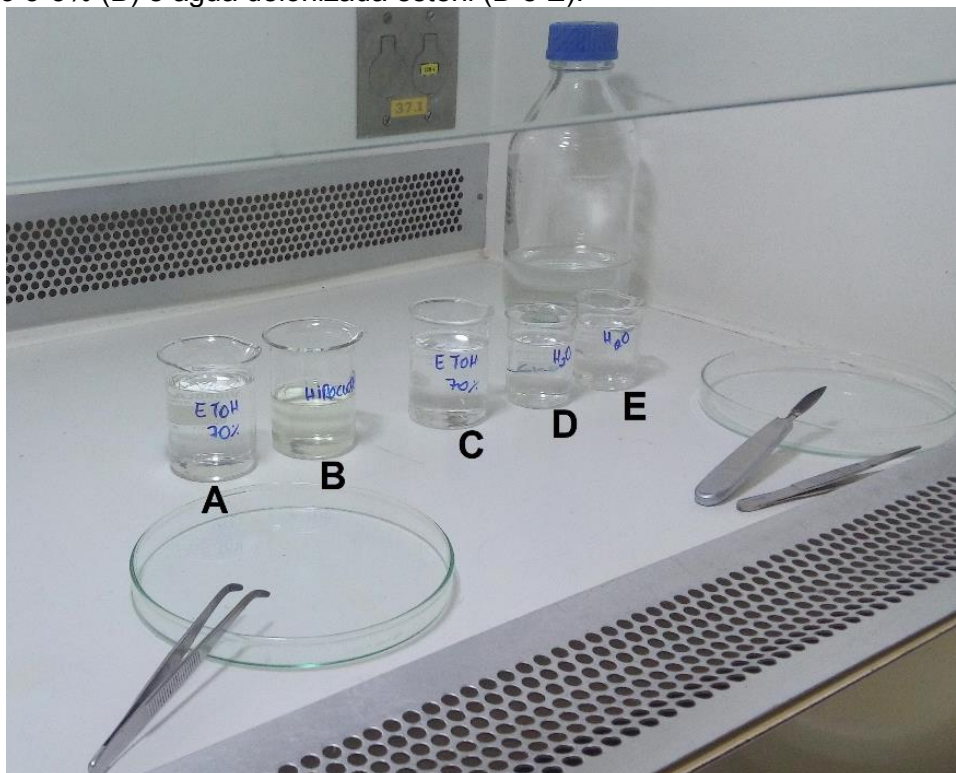
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta, Isolamento, Cultivo e Purificação das Culturas

Indivíduos de *A. wilkesiana* 'Marginata', *A. wilkesiana* 'Musaica' e de *C. esculenta* var. *esculenta* foram mantidos em vasos de cerca de 20 L, em local de pouco sol e muita umidade no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp), Rio Claro, SP.

Foram coletados 3 ramos de 4 indivíduos de cada um dos grupos experimentais. Após a coleta, o material vegetal recolhido foi lavado em água deionizada e seccionados em segmentos de 4 cm de comprimento. A esterilização externa do material vegetal se deu por imersão sequencial em etanol 70% (v/v) durante 5 min, hipoclorito (3-5% cloro ativo) durante 3 min, etanol 70% (v/v) durante 30 s, e duas vezes em água deionizada estéril (1 min em cada imersão) (Figura 1).

**Figura 1** – Etapas do banho sequencial para esterilização externa. Etanol 70% (A e C), hipoclorito 3-5% (B) e água deionizada estéril (D e E).



Fonte: Thays Neigri Silva

Após a remoção do excesso de água, as folhas foram cortadas em segmentos quadrados de 0,5 cm de lado com o auxílio de bisturi estéril e, em seguida, transferidos para Placa de Petri contendo meio de cultura de Batata Dextrose Ágar (BDA). As

placas foram incubadas em B.O.D a 25 °C no Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudo de Insetos Sociais (UNESP - RC) e observadas diariamente. Uma vez detectado o crescimento de fungos endofíticos, estes foram repicados até a obtenção de culturas puras. Para confirmar que o processo de esterilização externa foi bem-sucedido, alíquotas da água deionizada, utilizada na lavagem final, foram plaqueadas pelo método de espalhamento em placa, em meio BDA e incubadas a 25 °C (ARAUJO et al., 2002). As culturas puras foram analisadas macroscopicamente de acordo com suas características físicas e separadas em grupos de morfoespécies. Assim, de cada grupo morfológico, um espécime foi destinado à análise de identificação molecular.

### **3.2 Extração do DNA, Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), Eletroforese e Purificação**

A extração de DNA foi realizada seguindo o método CTAB (Cetiltrimetil Brometo de Amônio) para fungos filamentosos adaptado de Möller et al. (1992) e Gerardo et al. (2004). Cada grupo morfológico foi identificado molecularmente por meio da amplificação e sequenciamento da região espaçadora transcrita interna (ITS) do DNA nuclear ribossomal utilizando os primers ITS1-F (forward: 5' – CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA – 3') (GARDES ; BRUNS, 1993), e ITS4 (reverse: 5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') (WHITE et al., 1990).

Para a reação de PCR, foram utilizados microtubulos de 0,2 mL, nos quais adicionou-se 2 µL de DNA extraído (1:10), 5 µL de tampão GoTaq 5X Reaction Buffer, 4 µL de dNTPs (1,25 mM cada), 1 µL de cada primer 10 uM, 0,2 µL de GoTaq DNA polimerase (5U/ µL), 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 µL de BSA (10 mg/mL) e ajustando-se o volume final da reação para 25 µL com água Milli-Q® estéril. A reação foi conduzida em termociclador Veriti™ 96 Well da Applied Biosystems de acordo com o seguinte programa: 94 °C por 10 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 1 min, anelamento a 52 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, e extensão final a 72 °C por 10 min.

Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% em TBE 1X com solução de Loading Dye e Gel Red (1:1), observando sob luz ultravioleta. Foi utilizado na eletroforese o marcador molecular de 1000 pares de bases Gene Ruller DNA Ladder da Thermo Scientific. A purificação da PCR foi realizada com o Kit Wizard® SV da Promega de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

### 3.3 Sequenciamento e Análise das Sequências

Foi realizada a medição da concentração e da pureza das amostras de ácido nucleico no espectrofotômetro NanoDrop® Lite da Thermo Scientific e a reação de sequenciamento foi realizada fazendo uso do kit de reagentes denominado BigDye® Terminator (v3.1) da Applied Biosystems, de acordo com as recomendações do fabricante. A leitura das sequências foi feita pelo sequenciador automático 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As sequências foram editadas no software Bioedit Sequence Alignment Editor Copyright 1997-2011 (HALL, 1999) e alinhadas com a ferramenta ClustalW (HIGGINS et al., 1992). Para a confirmação da infecção por endofíticos, as sequências de nucleotídeos obtidas foram submetidas ao programa Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (National Center for Biotechnology Information - NCBI) e comparadas no GenBank com outras sequências similares.

Um Diagrama de Venn foi gerado através do aplicativo online Jvenn com a lista dos endofíticos identificados de cada tecido foliar (BARDOU et al., 2014).

## 4 RESULTADOS

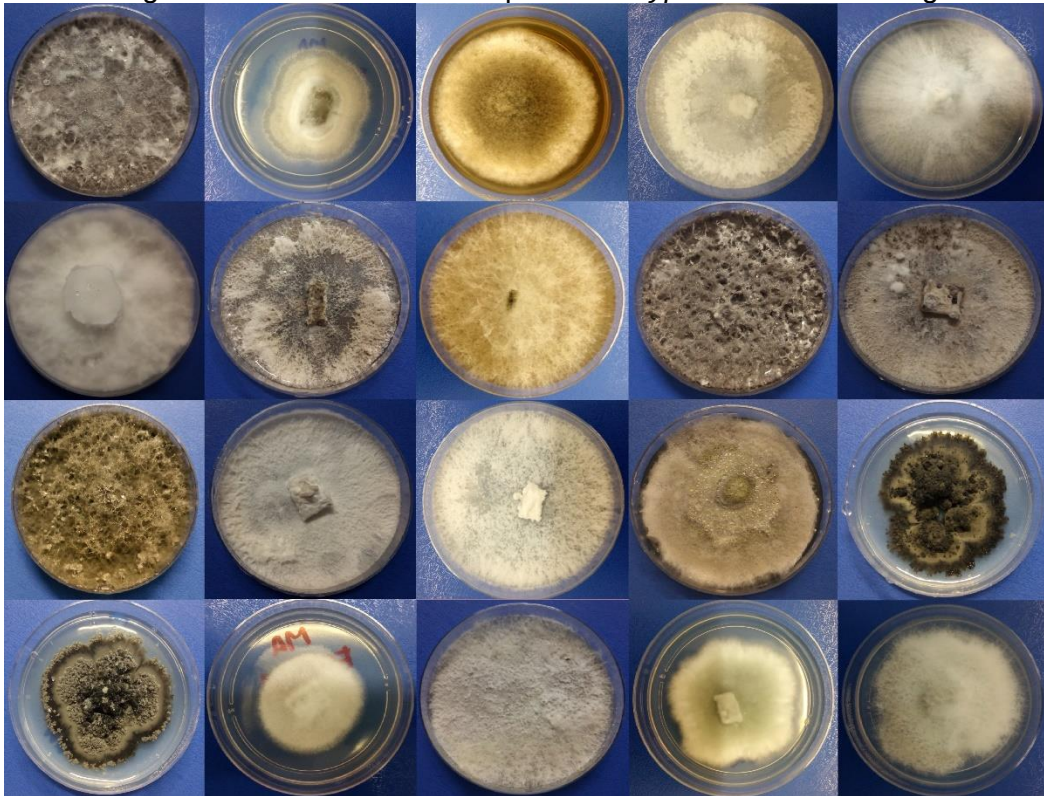
### 4.1 Isolamento dos Fungos Endofíticos

Ao todo, foram isolados 112 fungos endofíticos por meio de técnicas de microbiologias (Gráfico 1) e destes, 36 culturas puras são provenientes das folhas de *A. wilkesiana* 'Marginata' (Figura 2), 46 da cultivar 'Musaica' (Figura 3), 7 de espécimes jovens de *C. esculenta* var. *esculenta* (Figura 4) e 23 de indivíduos senescentes da mesma espécie (Figura 5).

**Gráfico 1** – Porcentagem dos fungos endofíticos isolados.

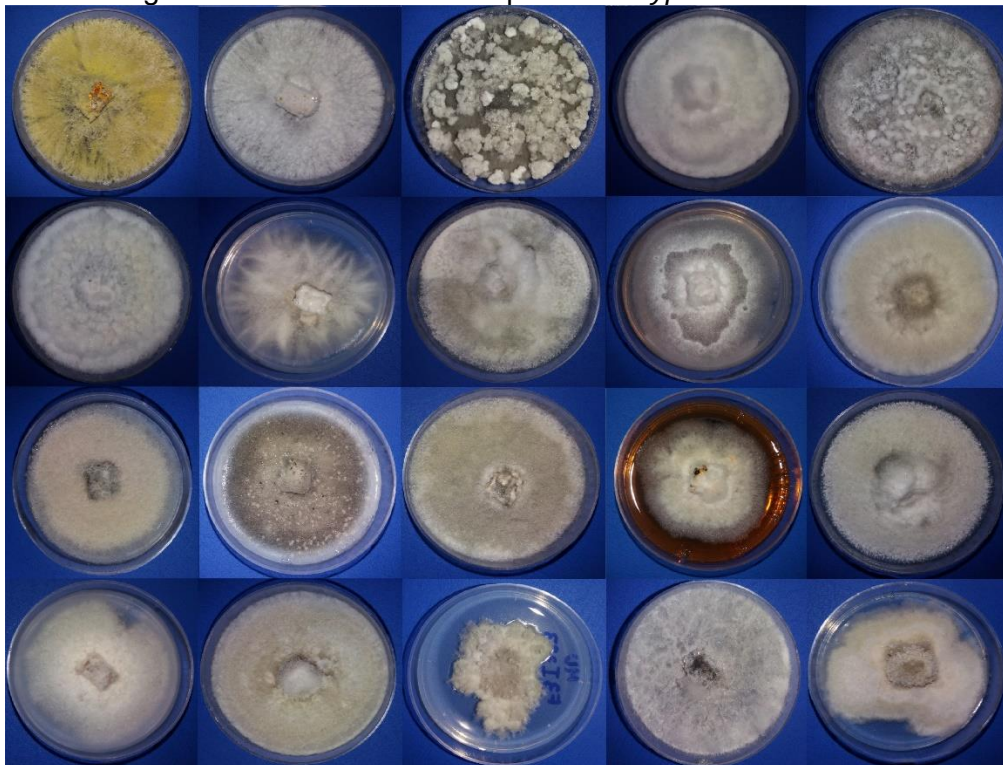


**Figura 2** – Fungos endofíticos isolados da planta *Acalypha wilkesiana* 'Marginata'.



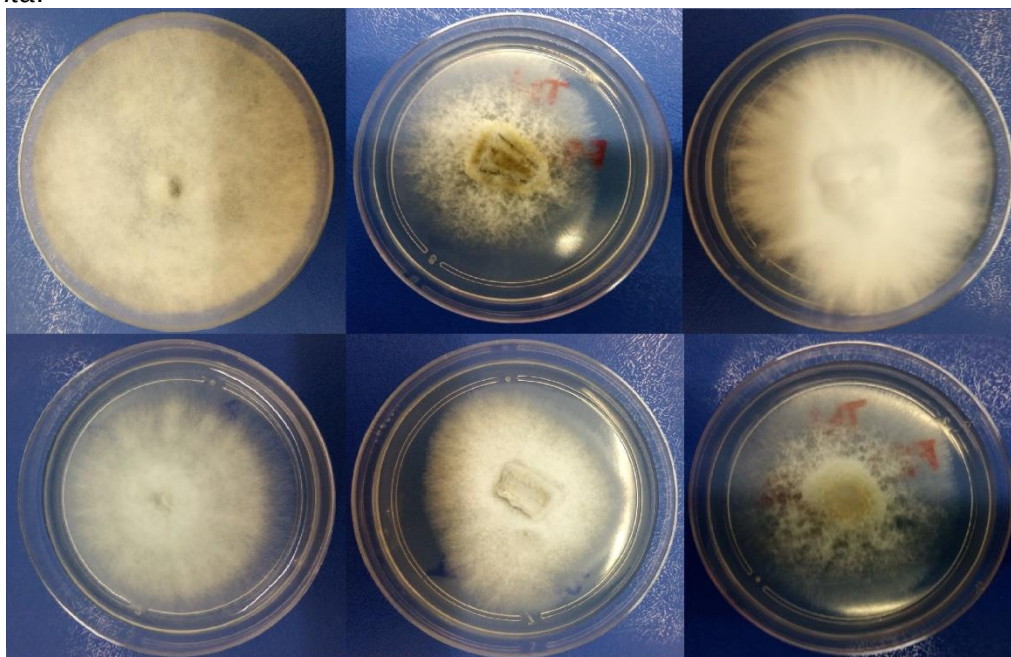
Fonte: Thays Neigri Silva

**Figura 3** – Fungos endofíticos isolados da planta *Acalypha wilkesiana* 'Musaica'.



Fonte: Thays Neigri Silva

**Figura 4** – Endofíticos isolados de plantas jovens de *Colocasia esculenta* variedade *esculenta*.



Fonte: Thays Neigri Silva

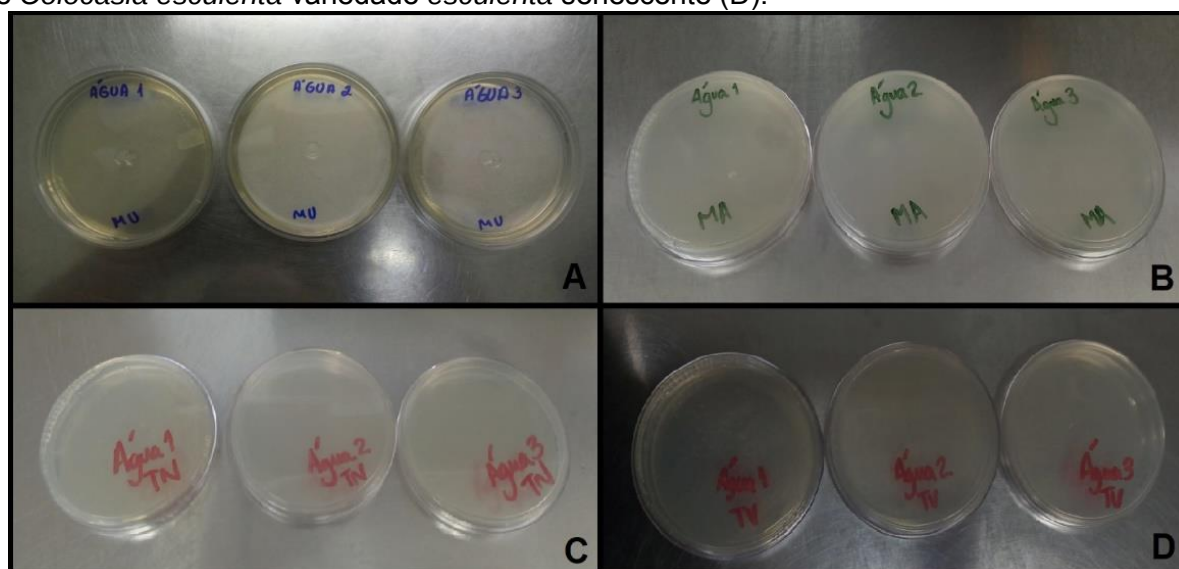
**Figura 5** – Endofíticos isolados de plantas senescentes de *Colocasia esculenta* variedade *esculenta*.



Fonte: Thays Neigri Silva

Os fungos cultivados se confirmam como endofíticos pela ausência de contaminação no controle, utilizando as alíquotas de água deionizada da lavagem final do processo de esterilização externa (Figura 6).

**Figura 6** – Placas controle com alíquotas da água deionizada não contaminada da lavagem final do processo de esterilização dos fragmentos vegetais de *Acalypha wilkesiana* ‘Musaica’ (A), *Acalypha wilkesiana* ‘Marginata’ (B), *Colocasia esculenta* variedade *esculenta* jovem (C) e *Colocasia esculenta* variedade *esculenta* senescente (D).



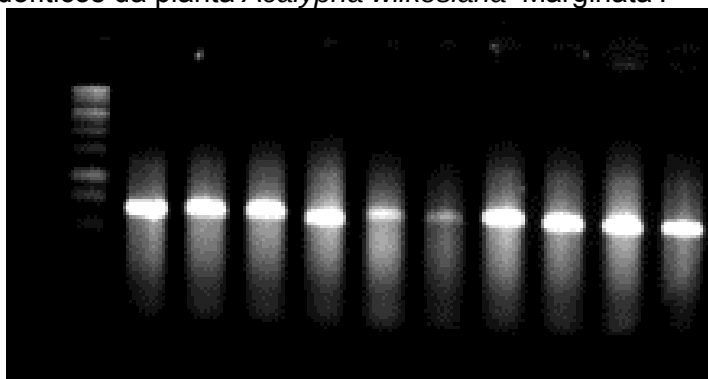
Fonte: Thays Neigri Silva

Após o processo de agrupamento das culturas puras em morfoespécies, foi realizada a identificação molecular de 29 morfotipos de endofíticos isolados de *A. wilkesiana* ‘Marginata’, 21 da cultivar ‘Musaica’, 5 oriundos de indivíduos jovens de *C. esculenta* var. *esculenta* e 13 de indivíduos senescentes da mesma espécie.

## 4.2 Amplificação da Região ITS por PCR

Os produtos amplificados por PCR para os fungos endofíticos foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos amplificados da região ITS apresentaram aproximadamente 500 pares de base (Figura 7).

**Figura 7** – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR para a região ITS dos fungos endofíticos da planta *Acalypha wilkesiana* ‘Marginata’.



Fonte: Thays Neigri Silva

### 4.3 Identificação dos Isolados

Após aplicação da metodologia molecular, foram obtidas até o momento, 24 sequências consenso (F e R juntas), 4 originárias de *A. wilkesiana* ‘Marginata’, 11 da cultivar ‘Musaica’, 1 de espécimes jovens de *C. esculenta* var. *esculenta* e 8 de indivíduos senescentes da mesma espécie.

Através da comparação das sequências ITS com sequências depositadas no GenBank, por meio do programa BLASTn, foi possível identificar a maioria dos isolados de fungos endofíticos ao nível de gênero, sendo possível em alguns casos indicar a espécie mais provável (Tabela 1 e 2).

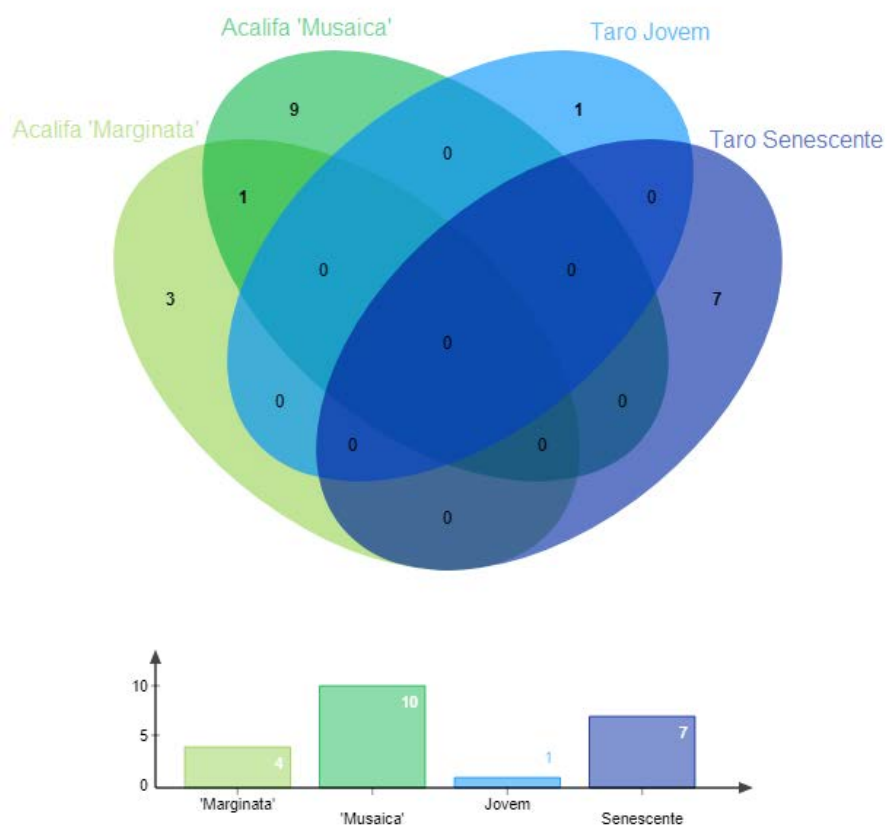
**Tabela 1** – Identificação molecular dos fungos endofíticos da planta *Acalypha wilkesiana*.

| Cultivar    | Código Linhagem | Identificação               |
|-------------|-----------------|-----------------------------|
| ‘Marginata’ | MA_F2I1R3       | <i>Coniothyrium</i> sp.     |
|             | MA_F1I2R3       | <i>Nemania</i> sp.          |
|             | MA_F1I3R3       | <i>Nigrospora</i> sp. 1     |
|             | MA_F2I4R3       | <i>Phomopsis</i> sp. 1      |
| ‘Musaica’   | MU_F1I3R1       | <i>Alternaria alternata</i> |
|             | MU_F2I3R1       | <i>Cochiliobolus</i> sp.    |
|             | MU_F3I2R3       | <i>Colletotrichum</i> sp.   |
|             | MU_F4I4R1       | <i>Curvularia</i> sp. 1     |
|             | MU_F3I4R1       | <i>Curvularia</i> sp. 1     |
|             | MU_F3I3R2       | <i>Diaporthe</i> sp.        |
|             | MU_F1I2R2       | <i>Nigrospora</i> sp. 1     |
|             | MU_F4I4R3       | <i>Pestalotiopsis</i> sp. 1 |
|             | MU_F1I4R3       | <i>Pestalotiopsis</i> sp. 2 |
|             | MU_F2I1R1       | <i>Phomopsis</i> sp. 2      |
|             | MU_F4I2R2       | <i>Phomopsis</i> sp. 3      |

**Tabela 2** – Identificação molecular dos fungos endofíticos da planta *Colocasia esculenta* var. *esculenta*.

| Idade da Planta   | Código Linhagem | Identificação                |
|-------------------|-----------------|------------------------------|
| <b>Jovem</b>      | TN_F2I1R2       | <i>Hypoxyylon investiens</i> |
| <b>Senescente</b> | TV_F3I1R1       | <i>Fusarium</i> sp. 1        |
|                   | TV_F1I1R1       | <i>Fusarium</i> sp. 1        |
|                   | TV_F1I2R1       | <i>Fusarium</i> sp. 2        |
|                   | TV_F4I1R1       | <i>Nigrospora</i> sp. 2      |
|                   | TV_F2I2R3       | <i>Nigrospora</i> sp. 3      |
|                   | TV_F1I4R1       | <i>Xylaria</i> sp. 1         |
|                   | TV_F1I4R3       | <i>Xylaria</i> sp. 2         |
|                   | TV_F1I3R2       | <i>Xylaria</i> sp. 3         |

**Gráfico 2** – Diagrama de Venn e o número total de endofíticos isolados de cada tipo foliar.



## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisados pela primeira vez os endófitos presentes em duas espécies vegetais, a saber: *A. wilkesiana* (duas cultivares diferentes) e *C. esculenta* var. *esculenta* (idades distintas). Os isolados identificados neste trabalho são do filo Ascomycota e, em sua maioria, da classe Sordariomycetes. No geral, os gêneros encontrados apresentam relatos na literatura como fitopatógenos ou como possíveis agentes para o controle biológico de doenças.

Dos fungos encontrados na cultivar 'Marginata' de *A. wilkesiana*, o gênero *Coniothyrium* sp. é relatado na literatura por apresentar componentes antibióticos, antifúngicos e herbicidas (KROHN et al., 1994). Estes compostos apresentaram efeitos inibitórios contra o fungo *Microbotryum violaceum* e as bactérias *Escherichia coli* e *Bacillus megaterium*, o que atraiu a atenção de muitos pesquisadores para o táxon (SUN et al., 2012). Outro gênero identificado dessa cultivar foi *Nemania* sp. que é reconhecido por suas espécies saprófitas, habitantes de madeira em estágios avançados de decomposição (JU ; ROGERS, 2002).

Identificada em amostras de *A. wilkesiana* 'Musaica', a espécie *Alternaria alternata*, já reportada para o gênero, é um patógeno de plantas cujos sintomas típicos são manchas foliares pequenas, circulares, de coloração marrom clara, rodeadas por um halo marrom escuro. Esse fungo saprófito ataca principalmente tomateiros causando grandes perdas pós-colheita (GANGADEVI et al., 2008; AKHTAR et al., 1994).

O gênero *Colletotrichum*, da família Glomerellaceae, abriga centenas de espécies que causam doenças, dentre as quais se destaca a antracnose, de grande importância econômica (CANNON et al., 2012). Da mesma forma, o gênero *Diaporthe*, telemórfico de *Phomopsis* (mitospórico), encontrado em ambas cultivares, tem sido frequentemente relatado como endófito, saprófito e fitopatógeno de uma ampla gama de hospedeiros. Algumas espécies do gênero são responsáveis por doenças conhecidas como a queima da haste e da vagem, cancro e podridão de sementes da soja, tendo assim relevância econômica (GOMES et al., 2013; SANTOS et al., 2011).

Além desses, outro gênero caracterizado da cultivar 'Musaica' de acalifa foi *Pestalotiopsis*. Amplamente distribuído no globo, o gênero abriga muitas espécies com conídios típicos da família Amphisphaeriaceae. Algumas espécies são

fitopatógenas que causam uma variedade de doenças, incluindo morte de rebentos, manchas foliares, clorose severa, podridão da fruta e várias doenças que acometem as safras após a colheita (MAHARACHCHIKUMBURA et al., 2014). Além disso, é sabido que alguns isolados do gênero sintetizam moléculas bioativas variadas de interesse para a indústria farmacêutica (STROBEL et al., 2002). Por isso, esse fungo tem atraído a atenção de pesquisadores como fonte promissora de novos medicamentos, além de ser um possível agente controlador de doenças nas plantas já que possui algumas propriedades antifúngicas (TEJESVI et al., 2007).

Fungos do gênero *Curvularia* são amplamente distribuídos ao redor do mundo, podendo estar associados a espécies vegetais, na forma saprofítica, endofítica ou como parasita. Espécies desse gênero atacam principalmente as poáceas e são responsáveis por diversas doenças em plantas cultivadas, causando principalmente manchas foliares (MOURÃO et al., 2017). O gênero também já foi reportado como causador de lesões cutâneas e dermatites em humanos e animais (BONDUEL et al., 2001; ANTONIASSI et al., 2010).

Os metabólitos secundários de isolados de *Nigrospora* sp., gênero comum a ambas cultivares da acalifa e ao taro senescente, possuem importância farmacológica e já foram reportados com atividades antifúngicas importantes contra fitopatógenos, sendo cotado como possível agente para o controle biológico de doenças de plantas (KAYSER et al., 2001; ZHAO et al., 2012).

A espécie *Hypoxylon investiens*, isolada de indivíduos jovens de taro, ocorre em ambientes terrestres e aquáticos e seus constituintes químicos possuem atividades biológicas, como antifúngica e citotóxica, promissoras (SILVA, 2016).

Em relação aos endófitos isolados do taro *C. esculenta* var. *esculenta* em estágio senescente, o táxon *Fusarium* sp., pertencente à família Nectriaceae, ocorre especialmente na região tropical e subtropical e está relacionado à doenças de grande importância econômica como a podridão-radicular-vermelha em soja e a podridão do caule em café (MICHEREFF et al., 2005). Esse gênero é muito diverso e já foi associado tanto à cormos de taro quanto às formigas-cortadeiras (JACKSON ; GOLLIFER, 1975; BRIDGE et al., 1983; RODRIGUES et al., 2008). Também encontrado em indivíduos de taro, o gênero *Xylaria* sp. é comumente listado como endofítico e saprófito (HAWKSWORTH, 2001). Uma grande diversidade de metabólitos secundários é relacionada com esse gênero, sendo que alguns

apresentam bioatividades antifúngicas e antioxidantes de interesse comercial (CAFÊU et al., 2005; LIU et al., 2007).

As formigas-cortadeiras exercem sua atividade de corte em uma grande variedade de plantas do meio ambiente. Sabe-se que a secreção da glândula mandibular de *Atta sexdens rubropilosa* é capaz de inibir a germinação de conídios de fungos fitopatogênicos, como evidenciado para *Botrytis cinérea*, e que essa capacidade de inibição é uma provável característica defensiva dessas formigas (MARSARO et al., 2001; RODRIGUES et al., 2008). Por outro lado, segundo Bittleston et al. (2010), alguns endofíticos parecem agir como um sistema imunológico adquirido de plantas, reduzindo a desfolhação de seus hospedeiros, afetando negativamente esse herbívoro.

O Diagrama de Venn mostra que cada tipo foliar possui uma comunidade endofítica distinta com exceção do táxon *Nigrospora* sp. 1, que é compartilhado pelas duas cultivares de *A. wilkesiana* (Gráfico 2). Tal fato pode se dar por uma possível simbiose entre o fungo e a espécie de planta que foi estabelecida com o tempo.

Os dados atuais sugerem que há uma diferença na diversidade entre as comunidades de fungos de *A. wilkesiana* e *C. esculenta* var *esculenta* e que essa diferença na micodiversidade de endofíticos pode estar relacionada com a preferência de corte das formigas-cortadeiras. Para resultados conclusivos, entretanto, é necessário a identificação dos isolados restantes, que já está sendo conduzida.

Estudos desse tipo possuem grande importância, uma vez que a descoberta de espécies novas de fungos endofíticos corrobora com o conhecimento sobre a micodiversidade e abre novas possibilidades biotecnológicas, haja vista o potencial de alguns metabólitos bioativos que são promissores economicamente. Além disso, estudos adicionais sobre essa interação entre o vegetal, os endofíticos, a formiga e o fungo mutualista são necessários para um melhor entendimento sobre as razões de escolha desses insetos por algumas plantas.

## **6 CONCLUSÕES**

Os fungos endofíticos isolados foram identificados molecularmente e, dos gêneros encontrados, muitos são citados na literatura como fitopatogênicos ou como possíveis agentes para o controle biológico de doenças. Os dados atuais sugerem que há uma diferença na diversidade entre as comunidades de fungos das plantas aqui estudadas, o que apoia a ideia de que a preferência das formigas-cortadeiras por certos tipos foliares pode estar relacionada com a comunidade de fungos endofíticos. Porém, para um resultado conclusivo, é necessário continuar a identificação dos isolados restantes, que já está sendo conduzida.

## REFERÊNCIAS

- AKHTAR, K.P.; MATIN, M.; MIRZA, J.H.; SHAKIR, A.S.; RAFIQUE, M. Some Studies on Post-Harvest Diseases of Tomato Fruits and their Chemical Control. **Pakistan Journal of Phytopathology**: An Official Publication of Pakistan Phytopathological Society, [S.l.], v. 6, n. 2, p. 125-129, 1994.
- ANTONIASI, N.A.B.; CORRÊA, A.M.R.; BECKER, C.; SANCHES, E.M.C.; FERREIRO, L.; DRIEMEIER, D. Feohifomicose cutânea causada por *Curvularia* sp. em um equino. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, n. 1, p. 73-76, 2010.
- ARAUJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.; AZEVEDO, J.L. Diversity of Endophytic Bacterial Populations and their Interaction with *Xylella fastidiosa* in Citrus Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.
- ARNOLD, A.E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G.S.; COLEY, P.D.; KURSAR, T.A. Are Tropical Fungal Endophytes Hyperdiverse? **Ecology Letters**, Hoboken, v. 3, n. 4, p. 267-274, 2000.
- BARDOU, P.; MARIETTE, J.; ESCUDIÉ, F.; DJEMIEL, C.; KLOPP, C. Jvenn: an interactive Venn diagram viewer. **BMC Bioinformatics**, Londres, v. 15, n. 1, p.293-299, 2014.  
Disponível em: <<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>>. Acesso em: 18 set. 2018.
- BITTLESTON, L.S.; BROCKMANN, F.; WCISLO, W.; VAN BAEL, S.A. Endophytic Fungi Reduce Leaf-Cutting Ant Damage to Seedlings. **Biology Letters**, Londres, v. 7, n. 1, p. 30-32, 2010.
- BONDUEL, M.; SANTOS, P.; TURIENZO, C.M.F.; CHANTADA, G.; PAGANINI, H. Atypical Skin Lesions Caused by *Curvularia* sp. and *Pseudallescheria boydii* in Two Patients After Allogeneic Bone Marrow Transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, Londres, v. 27, n. 12, p. 1311-1313, 2001.
- BRIDGE, J.; MORTIMER, J.J.; JACKSON, V.H. *Hirschmanniella miticausa* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae) and its Pathogenicity on Taro (*Colocasia esculenta*). **Revue de Nématologie**, Paris, v. 6, n. 2, p. 285-290, 1983.
- CAFÊU, M.C.; SILVA, G.H.; TELES, H.L.; BOLZANI, V.S.; ARAÚJO, A.R.; YOUNG, M.C.M.; PFENNING, L.H. Antifungal Compounds of *Xylaria* sp., an Endophytic Fungus Isolated from *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, São Paulo, SP, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.
- CANNON, P.F.; DAMM, U. JOHNSTON, P.R.; WEIR, B.S. *Colletotrichum* – Current Status and Future Directions. **Studies in mycology**, Amsterdam, v. 73, p. 181-213, 2012.
- DUMKE, V.R. **Crônicas da Natureza**: Saboreando Curiosidades Científicas. São Carlos: Rima, 2002.
- GARDES, M.; BRUNS, T.D. ITS Primers with Enhanced Specificity for Basidiomycetes - Application to the Identification of Mycorrhizae and Rusts. **Molecular Ecology**, Hoboken, v. 2, n. 2, p. 113-118, 1993.
- GERARDO, N.M.; MUELLER, U.G.; PRICE, S.L.; CURRIE, C.R. Exploiting a Mutualism: Parasite Specialization on Cultivars within the Fungus-Growing Ant Symbiosis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Londres, v. 271, n. 1550, p. 1791-1798, 2004.
- GANGADEVI, V.; SEHUMEENAL, S.; YOGESWARI, S.; RANI, G. Screening Endophytic Fungi Isolated from a Medicinal Plant, *Acalypha Indica* L. for Antibacterial Activity. **Indian Journal of Science and Technology**, Gandhinagar, v. 1, n. 5, p. 1-6, 2008.

GILBERT, G.S.; STRONG, D.R.; Fungal Symbionts of Tropical Trees. **Ecology**: Ecological Society of America, Washington, v. 88, p. 539-540, 2007.

GOMES, R.R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, S.I.R.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. *Diaporthe*: A Genus of Endophytic, Saprobic and Plant Pathogenic Fungi. **Persoonia**: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, Leida, v. 31, p. 1-41, 2013.

HALL, T.A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Londres, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAJEK, A.E.; ST. LEGER, R.J. Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. **Annual Review of Entomology**, California, v. 39, n. 1, p. 293-322, 1994.

HAWKSWORTH, D.L. The Magnitude of Fungal Diversity: The 1.5 Million Species Estimate Revisited. **Mycological Research**, [S.I.], v. 105, n. 12, p. 1422-1432, 2001.

HERVEY, A.; ROGERSON, C.T.; LEONG, I. Studies on Fungi Cultivated by Ants. **Brittonia**, Nova Iorque, v. 29, n. 2, p. 226-236, 1977.

HIGGINS, D.G.; BLEASBY, A.J.; FUCHS, R. Clustal V: Improved Software for Multiple Sequence Alignment. **Bioinformatics**, Oxford, v. 8, n. 2, p. 189-191, 1992.

JACKSON, G.V.H.; GOLLIFER, D.E. Disease and Pest Problems of Taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) in the British Solomon Islands. **PANS Pest Articles & News Summaries**, [S.I.], v. 21, n. 1, p. 45-53, 1975.

JU, Y.; ROGERS, J.D. The genus *Nemania* (Xylariaceae). **Nova Hedwigia**, Mannheim, v. 74, n. 1-2, p. 75-120, 2002.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; BERTELS, S.; SIEMS, K. Antileishmanial Activities of Aphidicolin and its Semisynthetic Derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 45, n. 1, p. 288-292, 2001.

KROHN, K.; MICHEL, A.; FLÖRKE, U.; AUST, H.-J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B. Biologically Active Metabolites from Fungi, 5. Palmarumycins C1 - C16 from *Coniothyrium* sp.: Isolation, Structure Elucidation, and Biological Activity. **Liebigs Annalen der Chemie**, Weinheim, v. 1994, n. 11, p. 1099-1108, 1994.

LEWIS, C.S. **Os quatro amores**. Brasil: Martins Fontes, 2009.

LIU, X.; DONG, M.; CHEN, X.; JIANG, M.; LV, X.; YAN, G. Antioxidant Activity and Phenolics of an Endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. **Food chemistry**, [S.I.], v. 105, n. 2, p. 548-554, 2007.

LORENZI, H.; SOUZA, H. Plantas ornamentais. **Instituto Plantarum**, São Paulo, 2001.

MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N.; HYDE, K.D.; GROENEWALD, J.Z.; XU, J.; CROUS, P.W. *Pestalotiopsis* Revisited. **Studies in Mycology**, Amsterdam, v. 79, p. 121-186, 2014.

MARSARO, A.L.Jr.; DELLA LUCIA, T.M.C.; BARBOSA, L.C.A.; MAFFIA, L.A.; MORANDI, M.A.B. Efeito de Secreções da Glândula Mandibular de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) Sobre a Germinação de Conídios de *Botrytis cinerea* Pers. Fr. **Neotropical Entomology**, Nova Iorque, v. 30, n. 3, p. 403-406, 2001).

MICHEREFF, S.J.; ANDRADE, D.E.G.T.; PERUCH, L.A.M.; MENEZES, M. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**, Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005.

MÖLLER, E.M.; BAHNWEG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H.H. A Simple and Efficient Protocol for Isolation of High Molecular Weight DNA from Filamentous Fungi, Fruit Bodies,

and Infected Plant Tissues. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, n. 22, p. 6115-6116, 1992.

MOURÃO, D.S.C.; SÁGIO, S.A.; SOUZA, M.R.; SANTOS, G.R. Identificação Morfológica e Molecular de *Curvularia* sp. Agente Causal da Mancha Foliar do Milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2017.

NAGAMOTO, N.S.; CARLOS, A.A.; MOREIRA, S.M.; VERZA, S.S.; HIROSE, G.L.; FORTI, L.C. Differentiation in Selection of Dicots and Grasses by the Leaf-Cutter Ants *Atta capiguara*, *Atta laevigata* and *Atta sexdens rubropilosa*. **Sociobiology: An International Journal on Social Insects**, Feira de Santana, v. 54, n. 1, p. 127-138, 2009.

PAUL, J.; ROCES, F. Fluid Intake Rates in Ants Correlate with their Feeding Habits. **Journal of Insect Physiology**, [S.l.], v. 49, n. 4, p. 347-357, 2003.

PIROZYNSKI, K.A.; MALLOCH, D.W. The Origin of Land Plants: A Matter of Mycotrophism. **Biosystems**, Amsterdam, v. 6, n. 3, p. 153-164, 1975.

PRINGLE, E.G.; MOREAU, C.S. Community Analysis of Microbial Sharing and Specialization in a Costa Rican Ant-Plant-Hemipteran Symbiosis. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Londres, v. 284, 20162770, 2017.

RODRIGUES, A.; BACCI, M.Jr., MUELLER, U.G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F.C. Microfungal "Weeds" in the Leafcutter Ant Symbiosis. **Microbial Ecology**, [S.l.], v. 56, n. 4, p. 604-614, 2008.

RODRIGUES, A.; CARLETTI, C.D.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C. Leaf-Cutting Ant Faecal Fluid and Mandibular Gland Secretion: Effects on Microfungi Spore Germination. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S.l.], v. 39, n. 1, p. 64-67, 2008.

SANTOS, A.P.B. A Beleza, a Popularidade, a Toxicidade e a Importância Econômica de Espécies de Aráceas. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 3, n. 3, p. 181-195, 2011.

SANTOS, J.M.; VRANDEIČIĆ K.; ĆOSIĆ, J.; DUVNJAK, T.; PHILLIPS, A.J.L. Resolving the *Diaporthe* Species Occurring on Soybean in Croatia. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, Leida, v. 27, p.9-19, 2011.

SILVA, A.D. **Bioprospecção do Fungo Endofítico *Hypoxylon investiens* Associado à Alga Marinha *Asparagopsis taxiformis*: Potencial Antifúngico, Anticolinesterásico e Antitumoral**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/137825>>. Acesso em: 19 set. 2018.

STROBEL, G.; FORD, E.; WORAPONGA, J.; HARPER, J.K.; ARIF, A.M.; GRANT, D.M.; FUNG, P.C. W.; CHAUD, R.M.W. Isopestacin, an Isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, Possessing Antifungal and Antioxidant Activities. **Phytochemistry**, [S.l.], v. 60, p. 179-183, 2002.

SUN, P.; HUO, J.; KURTÁN, T.; MÁNDI, A.; ANTUS, S.; TANG, H.; DRAEGER, S.; SHULZ, B.; HUSSAIN, H.; KROHN, K.; PAN, W.; YI, Y.; ZHANG, W. Structural and Stereochemical Studies of Hydroxyanthraquinone Derivatives from the Endophytic Fungus *Coniothyrium* sp. **Chirality**, Hoboken, v. 25, n. 2, p. 141-148, 2013.

TEJESVI, M.V.; KINI, K.R.; PRAKASH, H.S.; SUBBIAH, V.; SHETTY, H.S. Genetic Diversity and Antifungal Activity os Species os *Pestalotiopsis* isolated as Endophytes from Medicinal Plants. **Fungal Diversity**, [S.l.], v. 24, n. 3, p. 37-54, 2007

VAN BAELE, S.A.; FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; VALENCIA, M.C.; ROJAS, E.I.; WCISLO, W.T.; HERRE, E.A.; Two Fungal Symbioses Collide: Endophytic Fungi are not Welcome in Leaf-

Cutting Ant Gardens. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Londres, v. 276, n. 1666, p. 2419-2426, 2009.

VAN BAELE, S.A.; VALENCIA, M.C.; ROJAS, E.I.; GÓMEZ, N.; WINDSOR, D.M.; HERRE, E.A. Effects of Foliar Endophytic Fungi on the Preference and Performance of the Leaf Beetle *Chelymorpha Alternans* in Panama. **Biotropica**, Hoboken, v. 41, n. 2, p. 221-225, 2009.

WETTERER, J.K.; GRUNER, D.S.; LOPEZ, J.E. Foraging and Nesting Ecology of *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae) in a Costa Rican Tropical Dry Forest. **Florida Entomologist**, Florida, v. 81, n. 1, p. 61-67, 1998.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.D.; LEE, S.Y.; TAYLOR, J.W. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, Londres: Academic Press, 1990.

ZHAO, J.H.; ZHANG, Y.L.; WANG, L.W.; WANG, J.Y.; ZHANG, C.L. Bioactive Secondary Metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an Endophytic Fungus of the Medicinal Plant *Moringa oleifera* Lam. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seul, v. 28, n. 5, p. 2107-2112, 2012.