

Trabalho de Formatura

Curso de Graduação em Engenharia Ambiental

ACERVO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS AO MARACUJÁ (*Passiflora incarnata*): PRESERVAÇÃO E POTENCIAL DE BIOCONTROLE CONTRA FITOPATÓGENOS

Fernanda Correia Alves

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Derlene Attili de Angelis

Rio Claro (SP)

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Geociências e Ciências Exatas
Câmpus de Rio Claro

FERNANDA CORREIA ALVES

ACERVO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS AO
MARACUJÁ (*Passiflora incarnata*): PRESERVAÇÃO E POTENCIAL
DE BIOCONTROLE CONTRA FITOPATÓGENOS

Trabalho de Formatura apresentado ao Instituto de
Geociências e Ciências Exatas - Câmpus de Rio Claro,
da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Filho, para obtenção do grau de Engenheiro
Ambiental.

Rio Claro – SP

2022

A474a Alves, Fernanda Correia

Acervo de fungos endofíticos associados ao maracujá (*Passiflora incarnata*): preservação e potencial de biocontrole contra fitopatógenos / Fernanda Correia Alves. -- Rio Claro, 2022
41 f.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Ambiental) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro
Orientadora: Derlene Attili de Angelis

1. Microbiologia. 2. Controle biológico. 3. Fungos endofíticos. 4. Fitopatógenos. 5. Agricultura sustentável. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

FERNANDA CORREIA ALVES

ACERVO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS AO
MARACUJÁ (*Passiflora incarnata*): PRESERVAÇÃO E POTENCIAL
DE BIOCONTROLE CONTRA FITOPATÓGENOS

Trabalho de Formatura apresentado ao Instituto de
Geociências e Ciências Exatas - Câmpus de Rio Claro,
da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Filho, para obtenção do grau de Engenheiro
Ambiental.

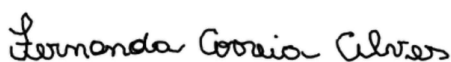
Comissão Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Derlene Attili de Angelis (Orientadora)

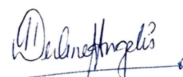
Dr^ª. Simone Possedente de Lira

Msc. Vítor Rodrigues Marin

Rio Claro, 16 de dezembro de 2022



Fernanda Correia Alves
Aluna



Derlene Attili de Angelis
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho à minha mãe Leiliane por todo incentivo e por sempre acreditar e confiar na minha capacidade, tornando possível o meu ingresso em uma universidade pública. Agradeço a minha família, meus avós, tios e tias pelo suporte e apoio fornecido nesse período.

A família que construí durante a minha jornada na universidade, a república Cabeças pelas experiências, momentos incríveis e companheirismo desde o meu primeiro dia de ingresso. A república RAWR que me acolheu e me agregou, construí laços de amizade para a vida toda. A república Pança, que foi lugar de aconchego e paz, sendo muito importante na fase final da graduação. Aos meus colegas de turma e amigos, pelas aventuras, conversas, alegrias e momentos que fizeram parte da minha rotina. Também, ao meu namorado Paulo pelo companheirismo, que agregou leveza e positividade ao meu dia a dia.

À minha orientadora Derlene Attili de Angelis, pela oportunidade e por compartilhar o seu conhecimento e experiência comigo. As integrantes da equipe LMA, em especial à Natália e à Carol que me ensinaram muito e acompanharam o desenvolvimento deste projeto, foi maravilhoso fazer parte desta equipe.

Agradeço à Pró Reitoria de Pesquisa da Unesp pelo financiamento. Por fim, agradeço à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, por me proporcionar uma formação de qualidade e oportunidades que jamais imaginei viver.

RESUMO

A espécie *Passiflora incarnata*, conhecida popularmente por maracujazeiro, destaca-se na indústria farmacológica mundial auxiliando no tratamento da ansiedade, distúrbios do sono e transtornos nervosos. O setor de fitoterápicos constitui uma significativa parcela do mercado do agronegócio; a utilização de plantas medicinais encontra-se em destaque no mercado farmacêutico nacional e internacional. Este cenário explica e justifica a importância de pesquisas que envolvam o mercado econômico, as formas de cultivo e a sua obtenção desses fármacos. Os fungos endofíticos geralmente habitam o interior dos tecidos vegetais, de onde conseguem desempenhar funções relevantes para a planta aumentando, por exemplo, a sobrevivência das mudas, ao propiciar resistência a vários patógenos e a condições abióticas adversas. Os fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* utilizados nesse trabalho, foram selecionados porque atacam os cultivos de *P. incarnata* prejudicando a produtividade dos cultivos e, conseqüentemente, a produção final do medicamento. A conscientização sobre os impactos causados pelo uso de defensivos agrícolas despertou o interesse por alternativas como a aplicação de defensivos biológicos, que apresentam resultados satisfatórios com produção segura e sustentável. A área tem recebido atenção e investimento, atendendo ao segundo Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS), pois gera estratégias que podem minimizar o uso de agentes tóxicos. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram purificar, preservar e revelar a atividade antagonista dos fungos endofíticos isolados da folha de *P. incarnata* frente aos fitopatógenos citados, e confirmar a patogenicidade dos mesmos. Dentre os 50 fungos triados, 44 apresentaram tempo de crescimento adequado (7 dias) para a realização dos testes de antagonismo. Os ensaios revelaram 5 endofíticos promissores na inibição dos fitopatógenos testados. O fungo filamentoso *T. longibrachiatum* (LMA 1684) inibiu o crescimento de *F. solani*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* e *X. axonopodis* pv. *passiflorae* 51%, 76%, 55% e 88%, respectivamente. Enquanto, os fungos endofíticos FNEC 1 (LMA 1731), FNEC 2 (LMA 1608) e *Chaetomium* complexo *globosum* (LMA 1793) inibiram o crescimento da bactéria fitopatogênica *X. axonopodis* em um percentual de 95%, 74% e 66%, respectivamente. O fungo *Fusarium* sp. (LMA 1722) inibiu o crescimento de *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* e *X. axonopodis* pv. *passiflorae* 60%, 61% e 59%, respectivamente. O teste de patogenicidade evidenciou a virulência expressa pelos fitopatógenos que causam as doenças nos hospedeiros vegetais e os sintomas se assemelham aos citados na literatura. Este trabalho representa um ponto

inicial para o desenvolvimento de um produto de controle biológico. Desse modo, os 5 endofíticos promissores no teste de antagonismo constituem uma importante contribuição desse estudo para futuros estudos de interesse para a bioeconomia do agronegócio.

Palavras-chaves: Fungos endofíticos. Controle biológico. Fitopatógenos. Agricultura sustentável.

ABSTRACT

The species *Passiflora incarnata*, popularly known as passion fruit, stands out in the world pharmacological industry helping in the treatment of anxiety, sleep disorders and nervous disorders. The herbal medicine sector constitutes a significant portion of the agribusiness market; the use of medicinal plants is highlighted in the national and international pharmaceutical market. This scenario explains and justifies the importance of research involving the economic market, the forms of cultivation and obtaining these drugs. Endophytic fungi generally inhabit the interior of plant tissues, from where they can perform relevant functions for the plant, increasing, for example, the survival of seedlings, by providing resistance to various pathogens and adverse abiotic conditions. The phytopathogens *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* used in this work, were selected because they attack *P. incarnata* crops, harming the productivity of the crops and, consequently, the final production of the medicine. The awareness of the impacts caused by the use of agricultural defensives has awakened interest in alternatives such as the application of biological defensives, which present satisfactory results with safe and sustainable production. The area has received attention and investment, meeting the second sustainable development goals (SDG), as it generates strategies that can minimize the use of toxic agents. Thus, the objectives of this work were to purify, preserve and reveal the antagonistic activity of the endophytic fungi isolated from the leaf of *P. incarnata* against the aforementioned phytopathogens, and to confirm their pathogenicity. Among the 50 fungi screened, 44 showed adequate growth time (7 days) to perform the antagonism tests. The assays revealed 5 promising endophytes in the inhibition of the phytopathogens tested. The filamentous fungus *T. longibrachiatum* (LMA 1684) inhibited the growth of *F. solani*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* and *X. axonopodis* pv. *passiflorae* 51%, 76%, 55% and 88%, respectively. While, the endophytic fungi FNEC 1 (LMA 1731), FNEC 2 (LMA 1608) and *Chaetomium complex globosum* (LMA 1793) inhibited the growth of phytopathogenic bacteria *X. axonopodis* in a percentage of 95%, 74% and 66%, respectively. The fungus *Fusarium* sp. (LMA 1722) inhibited the growth of *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* and *X. axonopodis* pv. *passiflorae* 60%, 61% and 59%, respectively. The pathogenicity test showed the virulence expressed by the phytopathogens that cause diseases in plant hosts and the symptoms are similar to those mentioned in the literature. This work represents a starting point for the development of a biological control

product. Thus, the 5 promising endophytes in the antagonism test constitute an important contribution of this study for future studies of interest to the bioeconomy of agribusiness.

Keywords: Endophytic fungi. Biological control. Phytopathogens. Sustainable Agriculture.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	10
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1	AGRONEGÓCIO E CULTIVO DE MARACUJÁ (<i>Passiflora incarnata</i>)	10
3.2	FITOPATÓGENOS E FUNGOS ENDOFÍTICOS	12
3.3	CONTROLE BIOLÓGICO	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1	REATIVAÇÃO	17
4.2	PURIFICAÇÃO	17
4.2.1	Cultura monospórica e caracterização macroscópica	17
4.3	CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA	18
4.3.1	Microcultivo	18
4.4	PRESERVAÇÃO	18
4.5	TESTE DE PATOGENICIDADE	19
4.6	TESTE DE ANTAGONISMO	20
4.6.1	Teste de Antagonismo com Fungos	21
4.6.2	Teste de antagonismo contra <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	23
5	RESULTADOS	24
5.1	REATIVAÇÃO	24
5.2	TESTE DE PATOGENICIDADE	25
5.3	TESTE DE ANTAGONISMO	28
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Passiflora incarnata*, conhecida popularmente por maracujazeiro, é uma planta nativa da América do Norte, região sudeste dos Estados Unidos, e cultivada em outras regiões de clima temperado, quente e tropical, como na América do Sul. A espécie destaca-se na indústria farmacológica mundial devido às suas propriedades sedativa, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, cicatrizante e terapêutica, auxiliando no tratamento da ansiedade, distúrbios do sono e transtornos nervosos, entre outros (CENTROFLORA, 2018).

Em 2008, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) lançou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, com o principal objetivo de inserir e regulamentar os fitomedicamentos no Sistema Único de Saúde (SUS), e cumprir as diretrizes da Política Nacional, assegurando o uso desses fitoterápicos com maiores evidências de eficácia, segurança e qualidade (BRASIL, 2010). Observou-se um crescimento representativo no número de programas de fitoterapia no SUS, o que abre espaço para mais projetos de pesquisa na área. Em 2016 o Ministério da Saúde aplicou R\$ 3,4 milhões na compra de insumos, materiais, contratação de mão de obra e capacitação de profissionais, e na compra de equipamentos para a distribuição dos fitoterápicos no SUS, o que mostra uma iniciativa em ampliar o acesso a medicina fitoterápica por parte do governo federal (BRASIL, 2016).

A ANVISA (2019), alertou que o uso de agroquímicos em plantas medicinais pode levar a riscos para saúde do usuário de medicamentos fitoterápicos e influenciar no tratamento, por causar alterações no perfil dos constituintes secundários dos fitoterápicos. A ocorrência de resíduos de agroquímicos em plantas medicinais e consequentemente em fitoterápicos promove preocupação nas agências reguladoras como a ANVISA. Relata-se que, a presença dessas substâncias pode ocasionar neurotoxicidade, hepatotoxicidade e carcinogênese.

O conceito de agricultura sustentável implica no manejo adequado dos recursos naturais, evitando a degradação do ambiente de forma a permitir a satisfação das necessidades humanas das gerações atuais e futuras. A busca por produtos naturais está presente como uma alternativa viável ao combate de doenças e patógenos, permitindo a elaboração de estratégias que possibilitem a degradação desses compostos por organismos na natureza (MEDEIROS *et al.* 2018).

Os fungos endofíticos produzem compostos de interesse biotecnológico, tendo potencial para contribuir no âmbito do desenvolvimento sustentável. Esses compostos desempenham funções

para o hospedeiro vegetal, contribuem para a proteção das plantas e diminuem a utilização de agroquímicos através da utilização dos compostos bioativos e metabólitos secundários, que podem ser utilizados em estratégias de biocontrole (RAO, 2020).

Neste contexto, o Laboratório de Microbiologia Ambiental/ LMA-Táxon, do Centro de Estudos Ambientais (CEA) da UNESP Rio Claro conta com linhagens fúngicas isoladas das folhas de *Passiflora incarnata* por Silva (2017), e preservadas pelo método de Castellani (CASTELLANI, 1939). Os fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* (LMA 1803), *Fusarium oxysporum* (LMA 1805), *Fusarium solani* (LMA 1800) foram isolados do maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) e cedidos pelo Instituto Biológico de São Paulo e a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (LMA 2128) foi cedida pelo Laboratório de Microbiologia da UNESP Rio Claro. Estes microrganismos, representam recursos genéticos significativos para bioprospecção e aplicação biotecnológica.

Nesse contexto, foram avaliadas 50 linhagens buscando potenciais antagonistas contra os fitopatógenos citados anteriormente. Esses patógenos geram inúmeros prejuízos no setor agrícola e a busca pelo manejo sustentável dos mesmos é urgente. Portanto, nesse trabalho foram exploradas as potencialidades dos fungos endofíticos no controle biológico contra os fitopatógenos mencionados.

2 OBJETIVOS

- Reativar, purificar e caracterizar 50 isolados de *P. incarnata*;
- Preservar os isolados purificados pelo método de Castellani;
- Avaliar a patogenicidade dos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* (LMA 1803), *Fusarium oxysporum* (LMA 1805), *Fusarium solani* (LMA 1800) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (LMA 2128);
- Avaliar o potencial de antagonismo dessas 50 linhagens fúngicas frente aos fitopatógenos mencionados nesse estudo;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 AGRONEGÓCIO E CULTIVO DE MARACUJÁ (*Passiflora incarnata*)

No Brasil o agronegócio ocupa um papel essencial na economia, geração de empregos e renda. A produção de *commodities* coloca o país em destaque no comércio internacional,

proporcionando investimentos do governo, que busca incentivar a expansão de novas tecnologias para o mercado. Em 2019 com a pandemia causada pela Covid-19, o agronegócio continuou em crescimento significativo e o setor alcançou diversos recordes no ano de 2020 (MACHADO, 2021).

O crescente desenvolvimento traz preocupações de ordem ambiental em função dos impactos provocados por esse setor; podemos destacar o consumo excessivo de água, a aplicação de agroquímicos e fertilizantes sintéticos. Os impactos ambientais, com destaque aos provenientes da utilização de agroquímicos, causam contaminação do solo, do ar e das águas, prejudicando direta e indiretamente a flora, a fauna e causando intoxicação em humanos (GOMES, 2019).

O uso intensivo dos agroquímicos acumulam gradativamente no solo e na biota, com a possibilidade de contaminar águas superficiais e subterrâneas (GOMES, 2019). Os efeitos provocados pelo cultivo convencional e a utilização indiscriminada dos agroquímicos podem ser irremediáveis a longo prazo, sendo essencial a busca por tecnologias sustentáveis e métodos que envolvam a utilização de insumos agrícolas alternativos no controle de pragas (MIGUEL, 2021).

O setor de fitoterápicos constitui um importante parcela do mercado do agronegócio; a utilização de plantas medicinais está em destaque no mercado farmacêutico nacional e internacional, desse modo, se tornou essencial a realização de pesquisas que envolvam o mercado econômico, as formas de cultivo e a sua utilização (SILVA, 2020).

O uso de plantas com fins medicinais é difundido entre populações ancestrais em todas as regiões do Brasil (MIRANDA; UHLMANN, 2021). O desenvolvimento e produção de fitoterápicos cresce gradativamente em detrimento das propriedades benéficas no tratamento de doenças. Dessarte, sistematizar esse conhecimento popular em prol de políticas de saúde pública certificando suas propriedades, é desejável.

Em 2016, o Ministério da Saúde estimou que, em dois anos, houve um aumento de 160% na procura de fitoterápicos, de maneira que a oficialidade e fiscalização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e a inserção no receituário do Sistema Único de Saúde (SUS) foi recebida de forma positiva pela população (OLIVEIRA, 2018).

Na perspectiva do setor privado da indústria farmacêutica, os fitoterápicos também ocupam um espaço significativo e apresentam lucratividade. A empresa Natulab, que se dedica à produção de medicamentos fitoterápicos, suplementos alimentares e medicamentos isentos de prescrição, anunciou investimento nesse setor de 57 milhões de reais em 2020. Deste modo, o investimento gerou frutos como o crescimento da companhia, aumento de sua produção e o desenvolvimento de

medicamentos como o “Seakalm”, produzido com compostos ativos da *Passiflora incarnata* (SENA, 2021).

Durante a pandemia da COVID-19, o setor de vitaminas e calmantes naturais se destacou principalmente nos 12 meses após seu início, quando a demanda por calmantes naturais cresceu 51% de acordo com a empresa (SENA, 2021). Pesquisas recentes constataram que a população brasileira, forçada a mudar seu estilo de vida em função da COVID-19, procurou alternativas para tratar os transtornos de ansiedade, insônia e estresse que se intensificaram nessa fase. As plantas mais procuradas para tratamento de tais sintomas tem sido *Passiflora* e *Valeriana*, conhecidas como “calmantes naturais”. Ambas possuem, eficiência comprovada em pesquisas, e encontram-se regularizadas pela ANVISA, para comercialização e consumo seguro (PESSOLATO *et al*, 2021).

A *Passiflora incarnata*, originária da América do Norte e nativa do sudeste dos Estados Unidos é conhecida como maracujá-vermelho ou flor-da-paixão. O gênero *Passiflora* abrange em torno de 400 a 530 espécies vegetais, inseridas nas características de plantas trepadeiras herbáceas, lenhosas e perenes (BRASIL, 2015).

O maracujá-vermelho tem significativa importância no mercado mundial, devido às suas variadas formas de utilização. Pode ainda ser utilizada de forma individual ou em combinações, o mercado global de seus compostos ativos e extratos foi estimado em 2,55 bilhões de dólares em 2018. Seus efeitos bioativos no sistema nervoso e suas propriedades relaxantes promovem diversas utilidades nos setores de alimentos, bebidas e fármacos (SPECIALTY, 2019). Além disso, o cultivo das espécies da *P. incarnata* proporciona empregos no campo e na indústria, e gera renda aos pequenos produtores advindos da agricultura familiar (VELTRI, 2017).

Muitas espécies do gênero *Passiflora* apresentam ação sedativa e tranquilizante devido à presença de flavonoides, metabólitos secundários de grande aplicação para a produção de fitoterápicos (RAFAELLI *et al.*, 1997; TONIN, 2010; MIRODDI *et al.*, 2013). Sendo assim, as plantas são fontes importantes de compostos bioativos naturais e geram grande número de fármacos.

3.2 FITOPATÓGENOS E FUNGOS ENDOFÍTICOS

Houve um aumento na ocorrência de pragas e doenças de modo proporcional ao crescimento do comércio global e às mudanças climáticas, que criam condições favoráveis para a

disseminação de pragas e doenças de plantas (FAO, 2017). Dessa maneira, os fitopatógenos por diversas vezes prejudicam o desenvolvimento e comercialização das plantas. Sendo assim, essencial protegê-las para alcançar e manter a segurança alimentar e a fonte de renda para os diversos trabalhadores do setor agrícola.

Os fitopatógenos utilizados nesse trabalho foram selecionados porque atacam os cultivos de *P. incarnata*, prejudicando a produção final do medicamento. O fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, por exemplo, encontra-se em quase todas as áreas produtoras de maracujá. Entretanto sabe-se que tem uma ampla gama de hospedeiros, tais como a mangueira (*Mangifera indica* L.), o abacateiro (*Persea americana* Mill.), o mamoeiro (*Carica papaya* L.), o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), *Spondias* spp., *Citrus* spp., dentre outras. A espécie fúngica *Fusarium oxysporum*, coloniza o maracujá amarelo, o maracujá-roxo (*Passiflora edulis* Sims), *Passiflora ligularis* Juss., curuba ou maracujá-banana (*Passiflora mollissima* Bailey) e maracujá-de-cheiro (*Passiflora foetida* L.). O fungo *Fusarium solani* é fitopatógeno de toda a família *Passifloraceae*, assim como o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), o tomateiro (*Lycopersicon esculentum* L.), o aspargo (*Asparagus officinalis* L.), as cucurbitáceas e a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (VIANA *et al.*, 2003).

O quadro 1 apresenta as doenças causadas por esses fitopatógenos e os respectivos sintomas.

Quadro 1 - Doenças causadas por fitopatógenos de cultivares de maracujá, seus respectivos sintomas e macromorfologia.

Fitopatógeno	Doença	Sintomas	Macromorfologia
<i>Fusarium oxysporum</i>	Murcha ou fusariose	Murcha da parte aérea. Impossibilitada de receber água e nutrientes, tende à falência de todos os órgãos, seguida de morte.	
<i>Fusarium solani</i>	Podridão-fusariana	Infecciona a raiz principal e evolui para o colo, ou o inverso. Esfacela o tecido no local da casca, destrói os vasos e causa murcha, amarelecimento e seca da folhagem.	
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnose	Afeta todos os órgãos da parte aérea da planta, necrosa o centro da lesão, acarreta queda das folhas, podendo levar a seca parcial da planta. Quando atinge o fruto a ação do patógeno fermenta e apodrece a polpa, inviabilizando a comercialização do mesmo.	
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>	Mancha-bacteriana	Induz a pequenas lesões e necrose. Ocorre seca das folhas e, posteriormente, a desfolha. A bactéria pode atingir os feixes vasculares e se propagar por todos os tecidos da planta, provocando a seca e até a morte. O patógeno pode penetrar a polpa, contaminando as sementes e promovendo a sua fermentação	

Fonte: (VIANA *et al.*, 2003; PERUCH; SCHROEDER, 2018) adaptado pela autora.

As plantas fornecem uma grande variedade de nichos para o crescimento e proliferação de diversos microrganismos colonizadores como os fungos e bactérias, que podem competir pelos recursos disponíveis ou formar comunidades coexistentes estáveis por meio da cooperação mútua. Os microrganismos simbiossiontes atuam de maneira distinta em espécies vegetais, ora atuando como patógenos e neutralistas, ora associativos intermediados por moléculas sinalizadoras (SCHULZ; BOYLE; SIEBER, 2006).

O microbioma endofítico pode atuar na proteção do hospedeiro vegetal mediante características genéticas e bioquímicas que propiciam a produção de enzimas e metabólitos secundários (LIU *et al.*, 2020). Os fungos endofíticos geralmente habitam o interior dos tecidos vegetais; dessa relação podem desempenhar funções relevantes para o vegetal, estimulando fatores

de crescimento e a redução dos sintomas de doenças. Também aumentam a sobrevivência das mudas, fornecendo resistência a vários patógenos e condições abióticas adversas (RAO, 2020).

Estudos sugerem a transferência horizontal de genes entre reinos e entre organismos filogeneticamente distintos, expostos às forças seletivas compartilhadas do ambiente vegetal. Os microrganismos endofíticos podem modificar as respostas do hospedeiro vegetal ao estresse ambiental em pelo menos três vias: alterando a aptidão de genótipos de plantas individuais, a expressão de características de plantas relacionadas à aptidão e a força ou direção de mudanças naturais (TRIVEDI *et al.*, 2020).

A interação dos endofíticos no ecossistema tem desempenhado um papel importante para aplicações agrícolas, farmacêuticas e alimentícias, como fontes promissoras para o desenvolvimento econômico (ZHAO *et al.*, 2010; SUDHA *et al.*, 2016). Desse modo, são estudados para serem utilizados na introdução de características benéficas na planta, que gera, uma gama de possibilidades de interesse biotecnológico e de bioprospecção.

3.3 CONTROLE BIOLÓGICO

Smith (1919) cunhou o termo “controle biológico” definindo como a “supressão de populações de insetos pela ação de seus inimigos naturais ou introduzidos”, através do seu estudo utilizando fungos entomopatogênicos no controle de insetos predadores. Atualmente o termo abrange várias vertentes que envolvem a bioprospecção, conservação e valoração dos agentes antagonistas. Por meio de análises no campo da biotecnologia e estratégias que envolvem a seleção dos organismos vivos, de acordo com as suas características ecológicas, é possível revelar organismos que podem contribuir com a proteção dos cultivos e o desenvolvimento vegetal.

A ação de organismos vivos no controle de pragas como insetos, fungos, bactérias, nematoides, entre outros, é conhecida e aplicada há milhares de anos. Ademais, as pesquisas e a busca por esses organismos têm se intensificado recentemente. No Brasil, a Seção de Controle Biológico de Pragas (SCBP) do instituto biológico foi criada em 1970, pelo Decreto-lei nº 52.478, porém, já se falava sobre controle biológico desde 1924 no país (GONÇALVES, 1996). Em qualquer ecossistema o controle biológico ocorre de forma natural, sem a manipulação e controle humano. Porém, a introdução de microrganismos biocontroladores pode facilitar o controle de doenças e potencializar o crescimento e o desenvolvimento vegetal de forma sustentável (ECKSTEIN, *et al.* 2020).

A agricultura convencional que utiliza agroquímicos para o controle de pragas e doenças, favorece a resistência dos fitopatógenos, além de outros inúmeros problemas de ordem ambiental e de toxicidade em humanos. No cultivo de plantas medicinais, os desafios enfrentados são ainda maiores. Recomenda-se que os insumos utilizados no cultivo dessas plantas não causem interferência nas propriedades terapêuticas dos fitoterápicos, sendo assim, a agricultura orgânica constitui uma alternativa viável de plantio (ANVISA, 2019).

A área tem recebido atenção e investimento, atendendo ao segundo Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS), pois gera estratégias que podem minimizar o uso de agentes tóxicos tornando a agricultura sustentável. O cenário dos defensivos agrícolas está se adaptando para alternativas como os defensivos biológicos, os chamados “biopesticidas”, “biofertilizantes”. No geral os bioinsumos, apresentam resultados satisfatórios em relação à agricultura com produção segura e sustentável (BETTIOL, 2003). De acordo com os dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), em 2019 a produção de produtos biológicos para o controle de pragas e doenças agrícolas movimentou R\$464,5 milhões, com crescimento de 70% em relação a 2017 que movimentou R\$ 262,4 milhões (BRASIL, 2019).

No contexto da redução da utilização de agroquímicos, estão sendo desenvolvidos vários métodos e estratégias de biocontrole para o manejo das doenças de plantas. Dessa forma, os fungos antagonistas desempenham funções significativas no controle dos fitopatógenos e são utilizados como agentes de biocontrole mundialmente. Os gêneros, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pichia*, *Pythium*, *Talaromyces*, *Verticillium* e *Trichoderma* são reconhecidos por compreenderem espécies antagonicas (THAMBUGALA *et al.*, 2020).

O controle de fitopatógenos, a promoção de crescimento vegetal e a síntese de vitaminas e aminoácidos no interior da planta hospedeira, corroboram para aumentar a produtividade das plantas medicinais e de outras culturas de interesse estratégico mundial. Para tal há grande incentivo do mercado em revelar novos microrganismos endofíticos para potencializar a produção (RAO *et al.*, 2017).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os fungos endofíticos deste trabalho foram isolados das folhas de *P. incarnata* coletadas no campo experimental da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas - CPMA, localizado no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual

de Campinas - CPQBA/Unicamp, em Paulínia-SP e em áreas de cultivo pertencentes ao Grupo Centroflora S/A, em Botucatu – SP, por SILVA (2017). Posteriormente, o acervo de trabalho foi depositado no Laboratório de Microbiologia – LMA/Táxon Ambiental (UNESP - Rio Claro), e preservados pelo método de Castellani (CASTELLANI, 1939).

4.1 REATIVAÇÃO

Foi realizada a triagem de cinquenta (50) fungos para compor o acervo de trabalho, em concordância com as identificações preliminares, e dados citados no trabalho realizado por Silva (2017). Portanto, para a triagem dos fungos, foram priorizados os endofíticos que obtiveram resultados promissores em estudos anteriores na produção de biomoléculas, pigmentação e exsudatos.

As linhagens foram reativadas utilizando placas de Petri (90x15 mm) contendo o meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA) em uma cabine de segurança biológica para microrganismos (Classe II, A1). Utilizando alça em L esterilizada, foram inoculados 4 cubos do material preservados em criotubos pelo método Castellani, em placas com meio BDA. Em seguida as linhagens foram incubadas em BOD (Biological Oxygen Demand) a 27°C no escuro, por até 7 dias.

O crescimento dos fungos foi observado de forma macroscópica, utilizando estereomicroscópio e foi observado o crescimento, pigmentação do meio de cultura e produção de exsudatos. A formação de exsudatos ocorre em decorrência de condições nutricionais e ambientais, sendo assim, indicativos da produção de enzimas e substâncias decorrentes do metabolismo secundário dos fungos filamentosos (HUTWIMMER *et al.*, 2010).

4.2 PURIFICAÇÃO

4.2.1 Cultura monospórica e caracterização macroscópica

Para a verificação da viabilidade e obtenção de linhagens axênicas, foi utilizada o método de cultivo monospórico (MELLO; REIS; SILVA, 2011). A técnica foi realizada para excluir potenciais contaminações das linhagens estudadas, a seguir: 1) transferência de uma alçada de esporos ou de micélio para 1 mL de água destilada esterilizada em microtubos e homogeneizada

manualmente; 2) 100 µL para Câmara de Neubauer e contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC); 3) diluição da suspensão até que cada 100µL contivesse até 5 esporos; 4) Espalhamento de 100µL sobre a superfície do meio de cultura sólido (BDA); 5) Incubação em BOD, 27°C, por 48h; 6) Transferência de uma colônia isolada para outra placa seguida de incubação por 7 dias. Por fim, as culturas axênicas foram observadas no estereoscópio e caracterizadas quanto à morfologia.

4.3 CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA

4.3.1 Microcultivo

Uma identificação preliminar foi realizada utilizando-se a técnica de microcultivo adaptada de Nugent *et al.*, (2006), a qual permitiu a observação e caracterização microscópica de hifas e, quando presentes, estruturas reprodutivas em microscópio óptico.

Para tal utilizou-se culturas fúngicas com 7 dias de crescimento em placa de Petri com BDA, lâmina, lamínula estéril e lâmina de bisturi, a qual serviu para obter os 4 cubos de ágar que foram colocados sobre a superfície do meio. Com a alça de inoculação foram realizadas raspagens da colônia fúngica e o micélio foi transferido para os cubos da placa do microcultivo. Uma lamínula foi cuidadosamente posicionada sobre o cubo, de forma que o crescimento fúngico ocorresse no lado inferior da mesma. O crescimento foi acompanhado por estereomicroscópio e quando constatada a produção de estruturas reprodutivas, a lamínula foi utilizada para o preparo de uma montagem úmida em lâmina estéril, corada com lactofenol azul de algodão e/ou glicerina. Em seguida, as lâminas foram observadas e fotodocumentadas em microscópio óptico, sob ampliação 40, 100, 400 e 1000 vezes.

4.4 PRESERVAÇÃO

Após a purificação, os fungos filamentosos foram preservados de acordo com o método de Castellani, garantindo a estruturação do acervo (CASTELLANI, 1939). Desse modo, as colônias de fungos endofíticos foram cortadas em cubos e transferidas para vacuettes esterilizados com 6

mL de água destilada autoclavada, em duplicata. Por fim, foram armazenados em refrigerador a 4°C.

4.5 TESTE DE PATOGENICIDADE

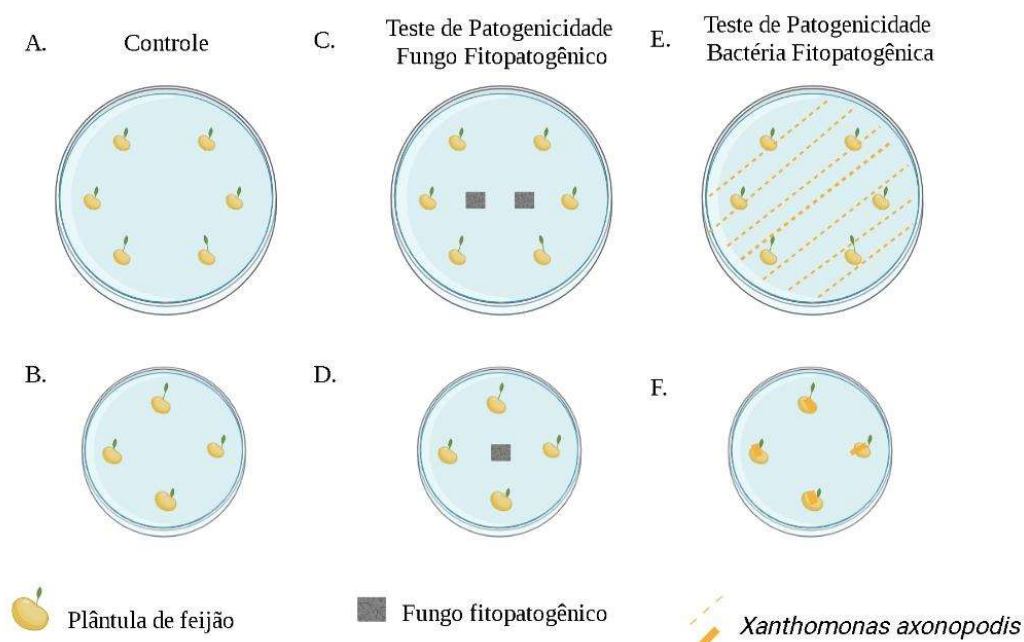
Para confirmar a virulência das linhagens fitopatogênicas utilizadas neste trabalho, foi realizado o teste de patogenicidade adaptado de Patekoski e Zottarelli (2009). Para tal, foram utilizados grãos de feijão comercial, escolhido por apresentar susceptibilidade a doenças fúngicas e pelo rápido desenvolvimento do ciclo fenológico. Ademais, os fitopatógenos aqui avaliados, tem natureza polífagas, resultando na infecção de diversas culturas, inclusive de feijão.

Inicialmente, foi feita a desinfecção das sementes seguindo o método de Stone; Polishook; White (2004) imersão em água destilada por 1 minuto; 2) em etanol 70% por 1 minuto 3) em hipoclorito de sódio 3% por 30 segundos 4) imersão em água destilada por 3 vezes, sendo que 100µL do último banho foi plaqueada em BDA, como controle.

Após a desinfecção os grãos foram acondicionados em câmara úmida e incubadas em BOD a 27° para germinação. Os grãos foram observados e umedecidos com água destilada autoclavada e após emissão da radícula (~ 0,5 cm) foram transferidas para as placas do teste de patogenicidade.

Os testes de patogenicidade foram realizados em meio sólido Ágar Água, sob 2 métodos de disposição do fitopatógeno e plântulas (Figura 1). O método 1, de acordo com a Figura 1, 6.A, 6.C e 6.E, foi realizado a partir de 4 plântulas nas placas de Petri 90x15mm e um cubo (1 cm²) do fitopatógeno ao centro, o controle foi incubado sem o fitopatógeno. O método 2, de acordo com a Figura 1, 6.B, 6.D e 6.F, foi realizado a partir de 6 plântulas em placas de Petri 150x15mm e dois cubos (1cm²) do fitopatógeno, o controle foi incubado sem a presença do fitopatógeno. Os dois métodos foram realizados em duplicata, por 10 dias, em 27°C na BOD. Ao final do experimento, os sintomas e crescimento (em cm) das plântulas foram avaliados.

Figura 1 - Teste de patogenicidade em plântulas de feijão com os fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* (LMA 1803), *Fusarium oxysporum* (LMA 1805), *F. solani* (LMA 1800) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (LMA 2128). A. Placa 150x15mm Controle; B. Placa 90x15mm Controle; C. e D. Disposição das plântulas e do fitopatógeno fúngico; E. Disposição das plântulas e espalhamento do fitopatógeno bacteriano; F. Disposição das plântulas contendo cortes infectados pelo fitopatógeno bacteriano.



Fonte: Elaborada no pela autora (2022).

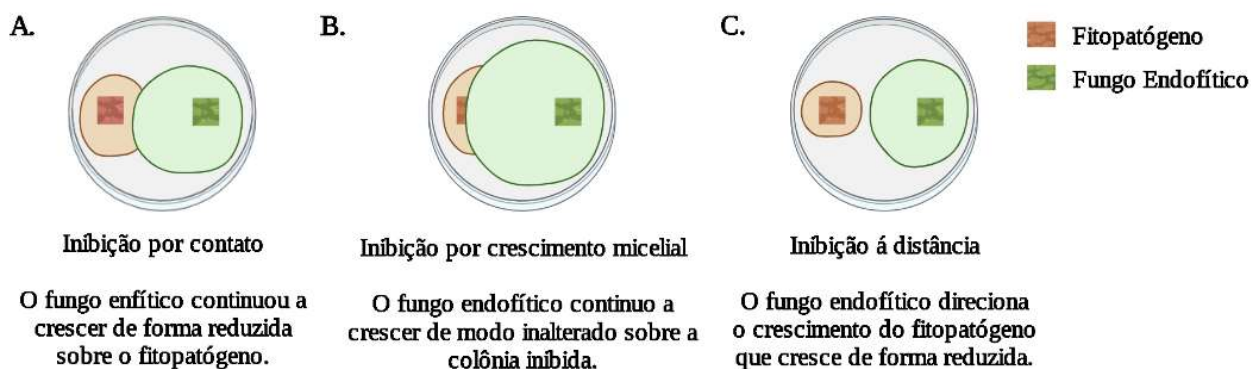
4.6 TESTE DE ANTAGONISMO

O teste de antagonismo teve como objetivo selecionar as linhagens promissoras no controle biológico contra os fitopatógenos da *Passiflora*. Através deste método foi possível avaliar o modo de ação entre fitopatógeno e antagonista, mediante cultura pareada. Nas etapas do teste foram utilizadas placas de Petri de 90 mm, com o meio de cultura BDA. Os fungos endofíticos e os fitopatógenos foram cultivados individualmente por 7 dias, 26°C em BOD, e posteriormente foram inoculados no teste de antagonismo.

De acordo com Badalyan (2002), há três tipos de atuação antagonista em relação ao patógeno 1) crescimento do micélio de um microrganismo sobre outro; 2) inibição por contato, quando o micélio de um microrganismo termina na linha do crescimento do outro; e 3) quando ocorre inibição à distância, ou seja, uma espécie não cresce na presença da outra.

Existem amplas interações entre os fungos endofíticos antagonistas e fitopatógenos. Durante as etapas dos testes foi possível observá-las, o que possibilitou avaliar a inibição fitopatogênica. A Figura 2 ilustra as formas de inibição presentes, e como foram analisadas qualitativamente.

Figura 2 - Formas de inibição dos fungos endofíticos contra os fitopatógenos analisados qualitativamente. A) Inibição por contato. B) Inibição por crescimento micelial. C) Inibição à distância.



Fonte: Elaborada no BioRender, Wheeler e Hocking (1993), adaptado pela autora (2022).

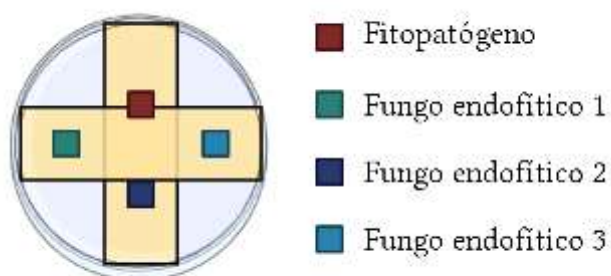
4.6.1 Teste de Antagonismo com Fungos

1º Etapa do teste de antagonismo

Para o teste, placas com meio de cultura BDA foram cortadas em formato de cruz (+), com 2 cm de largura cada faixa, e a inoculação de três cubos de 0,5 cm retirados das placas com 7 dias de crescimento e sendo dispostas como mostrado na figura 2 e também foi inoculado um cubo contendo o fitopatógeno no centro de uma faixa (+). Após esse processo as placas foram incubadas a 27°C por 7 dias e o crescimento dos microrganismos foram acompanhados por observação pelo estereomicroscópio. Através da observação, foi feita uma análise qualitativa das placas de antagonismo representadas na figura 3, considerando a inibição contra os fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *F. solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Desse modo, foi possível analisar se houve inibição dos fitopatógenos por parte dos endofíticos e como a mesma ocorreu.

Neste teste, pode-se selecionar os fungos endofíticos que inibiram ao menos 1 fitopatógeno para a 2ª etapa de avaliação do teste de cultura pareada.

Figura 3 - Teste de antagonismo com a técnica de cultura pareada em sinal positivo +.

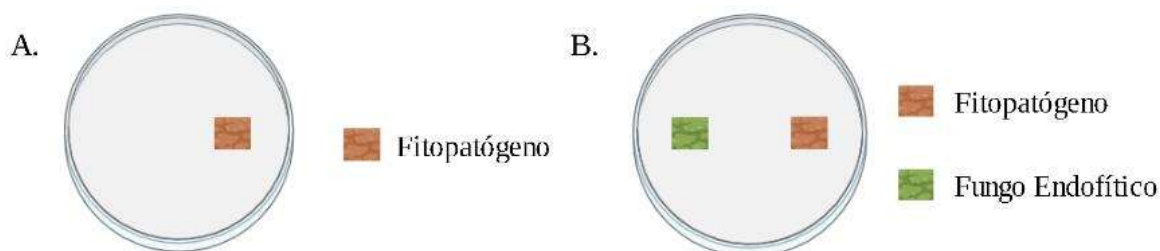


Fonte: Elaborada no BioRender, pela autora (2022)

2º Etapa do teste de antagonismo

A 2ª etapa foi realizada com os fungos que apresentaram potencial inibição contra os fitopatógenos, a disposição da placa de controle e de antagonismo pareado estão representadas na Figura 4.

Figura 4 - A. Placa controle, e B. Placa do teste de antagonismo.



Fonte: Elaborada no BioRender, pela autora (2022).

Para analisar e quantificar a interação competitiva foi medido o crescimento do fitopatógeno, utilizando o software de domínio público ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). Através da fórmula abaixo foi possível calcular o percentual de inibição do fitopatógeno (TOGHUEO *et al.*, 2016).

$$I = (1 - MT \div MC) \times 100$$

Sendo as variáveis:

I = Índice de inibição em porcentagem;

MT = Média da área da triplicata aferido o crescimento radial do patógeno na presença do fungo antagonista em cm²;

MC = Média da área da triplicata do patógeno no controle em cm².

Mediante a realização da 2ª etapa foi possível confirmar e selecionar os endofíticos mais promissores, individualmente. Assim, essa etapa foi analisada de forma quantitativa e qualitativa de acordo com os critérios estabelecidos na 1ª etapa, resultando no percentual de inibição contra os fitopatógenos testados.

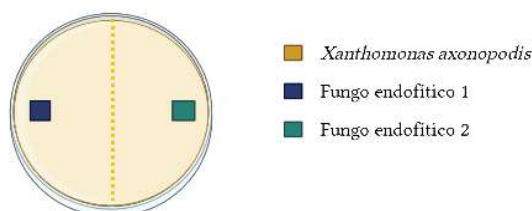
4.6.2 Teste de antagonismo contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*

1º Etapa do teste de antagonismo

Foi realizado o teste de antagonismo contra o fitopatógeno bacteriano, utilizando-se placas com meio de cultura BDA, inoculando-se a bactéria *Xanthomonas axonopodis* na parte central da placa em linha vertical, e 2 isolados endofíticos nas extremidades laterais com a distância de 2 cm das bordas centralizados (Figura 5), seguindo metodologia adaptada de Chen *et al.*, (2018).

Após esse processo, as placas foram incubadas a 27°C por 7 dias e o desenvolvimento dos microrganismos foi acompanhado por observação pelo estereomicroscópio. Ao final da avaliação qualitativa, foi registrado se houve inibição contra o fitopatógeno e como inibiu, de acordo com os critérios estabelecidos.

Figura 5- Teste de antagonismo com a bactéria *X. axonopodis*, centralizada na placa em linha vertical. Dois isolados antagonistas lateralmente.



Fonte: Elaborado no BioRender, pela autora (2021)

2º Etapa do teste de antagonismo

A segunda etapa do teste de antagonismo com a *Xanthomonas axonopodis* LMA 2128, evidenciou a ação dos fungos endofíticos de forma individual. Os microrganismos cresceram por 7 dias, após esse período, transferiu-se um cubo de 1 cm² contendo o fungo endofítico e uma alçada da bactéria fitopatogênica utilizada em linha vertical. Com o objetivo de obter-se o controle, foi necessária a preparação de placas de controle sem o fungo antagonista. As placas de controle contendo o fitopatógeno e as placas do teste de antagonismo foram incubadas a 27°C, por 7 dias. A figura 6 retrata a disposição dos microrganismos na placa contendo meio de cultura BDA.

Figura 6 - Placa do teste de antagonismo contendo o fungo endofítico e a bactéria fitopatogênica.



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Para quantificar a interação antagonista foi avaliado o crescimento do fitopatógeno, utilizando o software ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). Os cálculos de inibição foram calculados pela fórmula já citada anteriormente (TOGHUEO *et al.*, 2016).

5 RESULTADOS

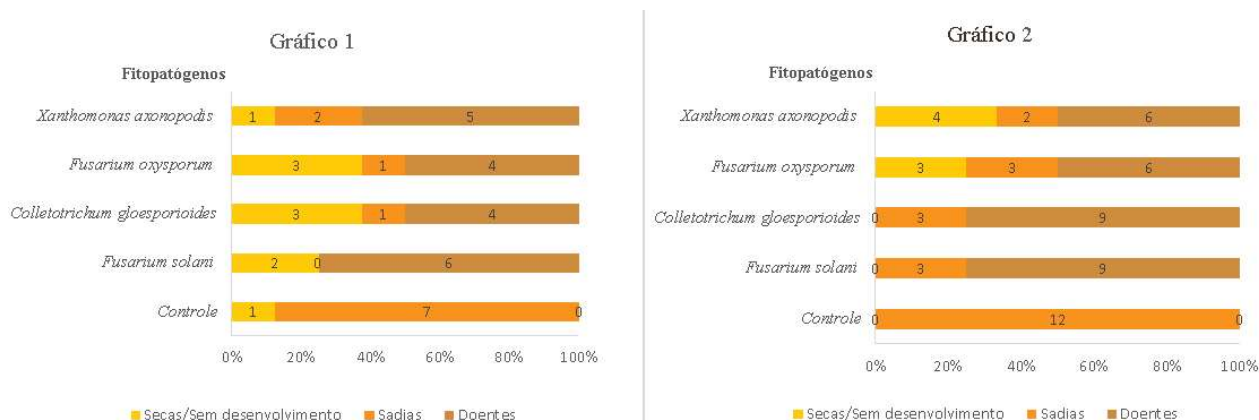
5.2 REATIVAÇÃO

A partir da triagem das 50 linhagens de fungos endofíticos, 44 foram selecionadas para o teste de antagonismo, pois 6 delas apresentaram tempo de crescimento superior a 7 dias, e acabaram não sendo consideradas interessantes para o estudo.

5.3 TESTE DE PATOGENICIDADE

O teste de patogenicidade revelou o potencial dos fitopatógenos estudados nesse trabalho. A figura 7 apresenta a quantidade e porcentagem de plântulas secas, sadias e doentes nos dois métodos utilizados. No método 1 (Gráfico 1) foram testadas 8 plântulas por fitopatógeno estudado e a mesma quantidade para controle, enquanto, no método 2 (Gráfico 2) foram testadas 12 plântulas por fitopatógeno e a mesma quantidade para controle. No caso das plântulas que secaram e não se desenvolveram, o consumo do meio de cultura, esgotando a fonte que mantinha as plântulas vivas foi levado em consideração.

Figura 7 - Resultado do teste de patogenicidade em plântulas de feijão. Contagem e porcentagem de plântulas secas/sem desenvolvimento, sadias e doentes. Gráfico 1 (método 1): 8 plântulas por fitopatógeno e controle. Gráfico 2 (método 2): 12 plântulas por fitopatógeno e controle.



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

De acordo com as informações da Figura 7 foi possível determinar a porcentagem de contaminação dos ensaios e utilizou-se as plântulas sadias do controle para comparação (Figura 8). Desse modo, todas as placas que continham o fitopatógeno, apresentaram maior porcentagem (>50%) de plântulas doentes. O fitopatógeno *Fusarium solani* promoveu alto índice de infecção nos dois métodos utilizados, provavelmente em decorrência do seu grau de virulência; dessa maneira, não foi observada a presença de plântulas sadias. Ademais, os outros fitopatógenos testados também apresentaram maioria de plântulas doentes e sintomas semelhantes aos citados na literatura por Viana (2003) e Peruch e Schroeder (2018).

Figura 8 - Plântulas de feijão saudáveis para controle com 10 dias de incubação.



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

O fitopatógeno *Fusarium oxysporum* ocasionou murcha na parte aérea da planta e falência vegetal. A figura 9 mostra como a plântula de feijão foi afetada.

Figura 9 - Plântulas de feijão com 10 dias de incubação afetadas pelo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* (LMA 1805).



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

O fitopatógeno *Fusarium solani* (LMA 1800) causador da doença “podridão-fusariana” esfacelou o tecido vegetal e causou murcha, seca e amarelecimento da folhagem (Figura 10).

Figura 10 - Plântulas de feijão com 10 dias de incubação afetadas pelo fitopatógeno *Fusarium solani* (LMA 1800).



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

O fungo fitopatogênico *Colletotrichum gloesporioides* (LMA 1803) é o causador da doença antracnose, causou necrose (Figura 11).

Figura 11 - Plântula de feijão com 10 dias de incubação afetada pelo fitopatógeno *Colletotrichum gloesporioides* (LMA 1803).



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

A linhagem *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (LMA 2128) acarretou pequenas lesões e necrose na parte aérea da plântula (Figura 12).

Figura 12 - Plântula de feijão com 10 dias de incubação afetada pelo fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae* (LMA 2128).



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

O teste de patogenicidade com as plântulas de feijão confirmou a capacidade de infecção dos fitopatógenos utilizados neste trabalho que, como evidenciado na figura 7, foram capazes de afetar mais de 50% das plântulas. Assim, o controle resultou em uma base comparativa que apresentou somente plântulas sadias (Figura 8) e uma baixa porcentagem de secas e sem desenvolvimento. Apesar da diferença do tamanho das placas e quantidade de plântulas nos métodos utilizados, os mesmos foram coerentes quanto aos resultados.

5.4 TESTE DE ANTAGONISMO

1º Etapa

Na primeira etapa do teste de antagonismo foram testados 44 fungos contra os fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. Os resultados foram avaliados de forma qualitativa e considerando-se a forma de inibição contra o fitopatógeno. Os endofíticos que não demonstraram modo de ação significativo de inibição, foram classificados com “SI” (sem inibição).

Os endofíticos que apresentaram alguma forma de inibição foram classificados de acordo com os tipos de inibição demonstradas, sendo elas: 1) IM (Inibição Mútua): 2 ou mais microrganismos inibiram o crescimento do fitopatógeno em uma placa; 2) ID (Inibição à Distância): o fungo endofítico direciona e inibe o crescimento do fitopatógeno que cresce de forma

reduzida; 3) IC (Inibição por Contato): o fungo endofítico continuou a crescer de modo reduzido sobre o fitopatógeno; 4) ICM (Inibição por crescimento micelial): o fungo endofítico continuou a crescer de forma inalterada sobre a colônia inibida. Os resultados mais promissores estão apresentados no Quadro 2 a seguir:

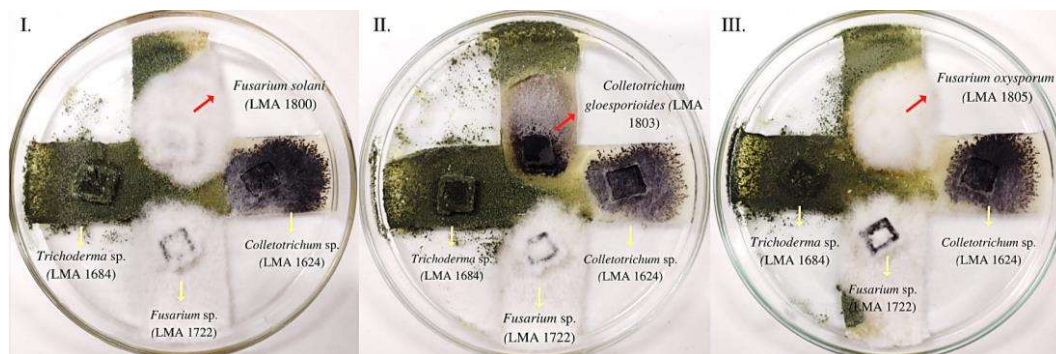
Quadro 2 - Resultado da 1ª etapa do teste de antagonismo. SI: Sem inibição; IM: Inibição mútua; ID: Inibição à distância; IC: Inibição por contato; ICM: Inibição por crescimento micelial. FNEC = fungo não esporulante claro.

Fungos Endofíticos	Fitopatógenos			
	<i>F. solani</i>	<i>C. gloesporioides</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>X. axonopodis</i>
<i>T. longibrachiatum</i>	IM	IM	IM	IC
<i>Fusarium</i> sp.	IM	IM	IM	ICM
<i>Colletotrichum</i> sp.	IM	IM	IM	SI
FNEC 1	IC	IC	IC	ICM
<i>Diaporthe</i> sp.	SI	SI	SI	IC
FNEC 2	SI	SI	SI	IC
<i>Chaetomium</i> sp.	SI	SI	SI	IC

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

A figura 13 evidencia os resultados qualitativos obtidos nas placas I, II e III com 7 dias de crescimento. Os antagonistas *Trichoderma longibrachiatum* (LMA 1684), *Fusarium* sp. (LMA 1722) e *Colletotrichum* sp. (LMA 1624) demonstraram IM contra os fitopatógenos *Fusarium solani* (LMA 1800), *Colletotrichum gloesporioides* (LMA 1803) e *Fusarium oxysporum* (LMA 1800). Desse modo, os endofíticos citados foram selecionados para a segunda etapa do teste de antagonismo.

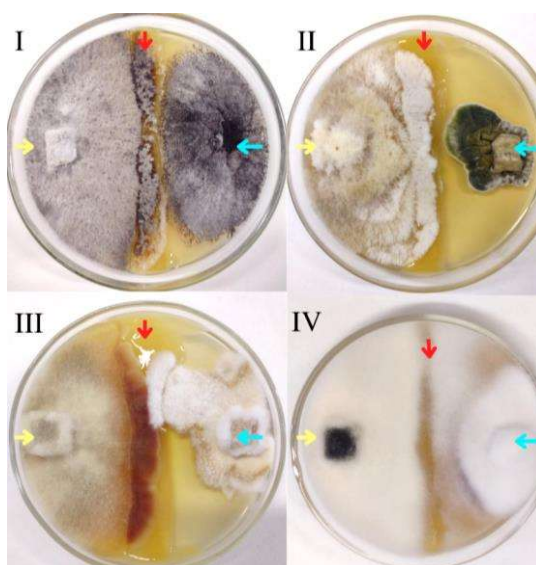
Figura 13 - Placas da primeira etapa do teste de antagonismo com 7 dias de crescimento. Placa I. Fitopatógeno: *F. solani* (LMA 1800), Endofíticos: *T. longibrachiatum* (LMA 1684), *Fusarium* sp. (LMA 1722), *Colletotrichum* sp. (LMA 1624); . Placa II. Fitopatógeno: *C. gloesporioides* (LMA 1803), Endofíticos: *Trichoderma* sp. (LMA1684), *Fusarium* sp. (LMA 1722), *Colletotrichum* sp. (LMA 1624); . Placa III. Fitopatógeno: *F. oxysporum* (LMA 1800), Endofíticos: *Trichoderma* sp. (LMA1684), *Fusarium* sp. (LMA 1722), *Colletotrichum* sp. (LMA 1624).



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

A figura 14 apresenta as formas de inibição dos fungos endofíticos contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* na primeira etapa do teste. Os resultados qualitativos da placa I, exprime que LMA 1731 continuou a crescer de forma inalterada sobre a colônia inibida. Entretanto, nas placas II, III e IV com os endofíticos LMA 1730, LMA 1793, LMA 1608 e LMA 1681 a forma de inibição foi por contato, de forma que, esses isolados cresceram de modo reduzido sobre do fitopatógeno.

Figura 14 - Placas da primeira etapa do teste de antagonismo com 7 dias de crescimento. Placa I- seta vermelha : *X. axonopodis* (LMA 2128), seta amarela: LMA 1731, seta azul: *Colletotrichum* sp. (LMA 1624); Placa II- seta vermelha : *X. axonopodis* (LMA 2128), seta amarela: *Diaporthe* sp. (LMA 1730) , seta azul: *Aspergillus versicolor* (LMA 1705); Placa III- seta vermelha : *X. axonopodis* (LMA 2128), seta amarela: *Chaetomium* sp. (LMA 1793), seta azul: LMA 1634; Placa IV- seta vermelha : *X. axonopodis* (LMA 2128), seta amarela: (LMA 1608), seta azul: *Fusarium* sp. (LMA 1681).

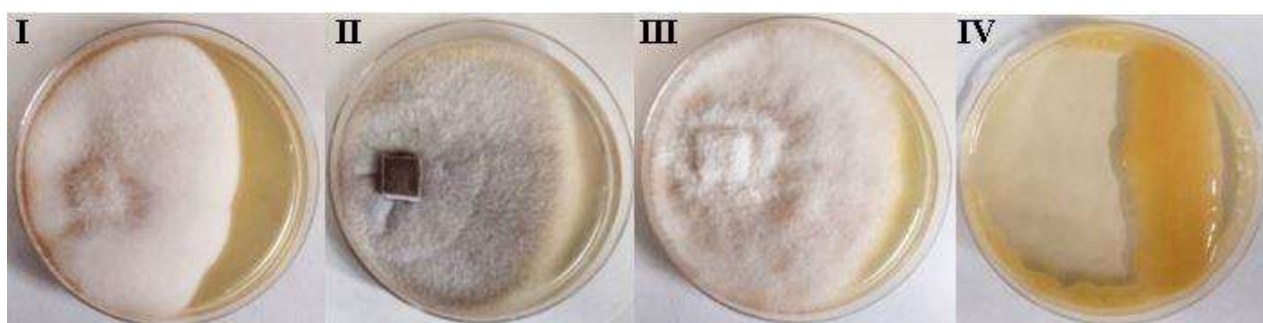


Fonte: Elaborada pela autora (2022)

2º Etapa

A segunda etapa do teste de antagonismo foi realizada com os endofíticos que inibiram o crescimento de pelo menos 1 fitopatógeno no primeiro ensaio. Desse modo, para um resultado quantitativo, foi calculado o percentual de inibição contra os fitopatógenos utilizando como base comparativa o crescimento dos mesmos nas placas de controle. A Tabela 1, apresenta a porcentagem de inibição dos endofíticos promissores avaliados.

Figura 15 - Placas de controle com 7 dias de crescimento. Placa I: Fitopatógeno *F. solani* (LMA 1800). Placa II: Fitopatógeno *C. gloesporioides* (LMA 1803). Placa III: Fitopatógeno *F. oxysporum* (LMA 1800). Placa IV: Fitopatógeno *X. axonopodis* (LMA 2128).



Fonte: Elaborada pela autora (2022)

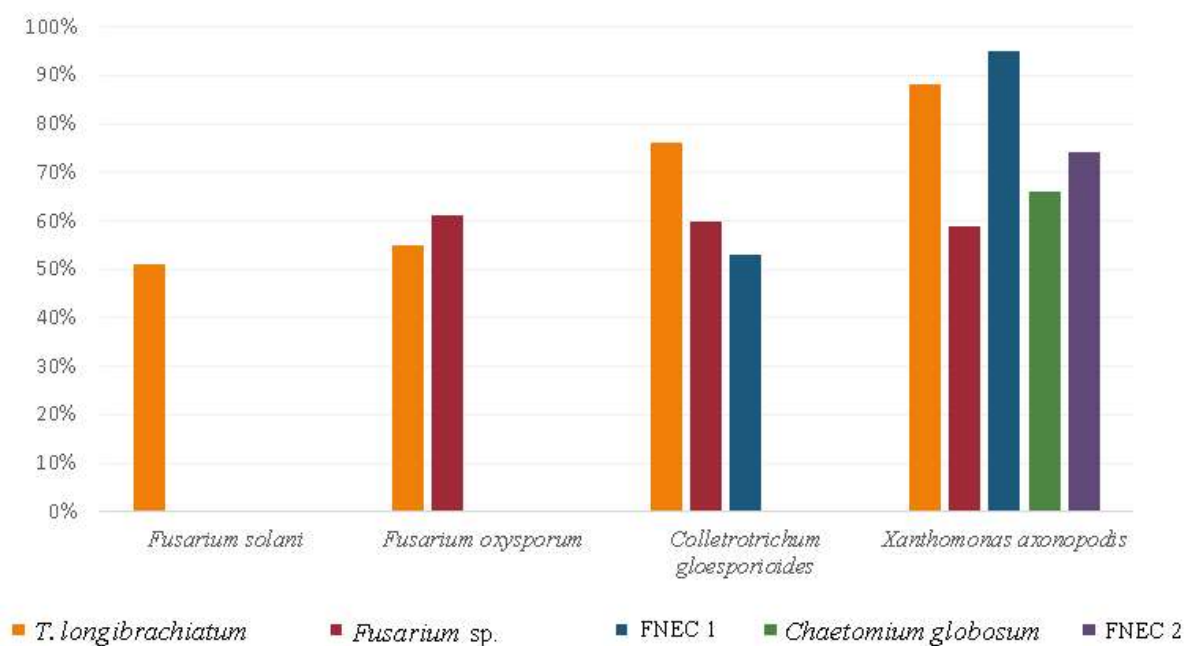
Tabela 1. Percentual de inibição dos isolados contra os fitopatógenos avaliados. SI = Sem Inibição. *T. longibrachiatum* (LMA 1684); *Fusarium* sp. (LMA 1722); *Colletotrichum* sp. (LMA 1624); *Diaporthe* sp. (LMA 1730); FNEC 1 (LMA 1731); *Chaetomium* complexo *globosum* (LMA 1793); FNEC 2 (LMA 1608). FNEC = fungo não esporulante claro.

Fungo Endofítico	Fitopatógenos			
	<i>F. solani</i>	<i>C. gloesporioides</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>X. axonopodis</i>
<i>T. longibrachiatum</i>	51%	76%	55%	88%
<i>Fusarium</i> sp.	38%	60%	61%	59%
FNEC 1	40%	53%	45%	95%
<i>Colletotrichum</i> sp.	27%	48%	39%	SI
<i>Diaporthe</i> sp.	SI	SI	SI	29%
<i>Chaetomium</i> sp.	SI	SI	SI	66%
FNEC2	SI	SI	SI	74%

Fonte: Elaborada pela autora (2022)

Por fim, obteve-se o gráfico (Figura 16) que apresenta os antagonistas promissores deste trabalho, isto é, os que inibiram o crescimento dos fitopatógenos em um percentual maior que 50%. Com o método do antagonismo pareado, foi possível calcular o percentual de inibição, e assim determinar os fungos que apresentaram resultados promissores no teste.

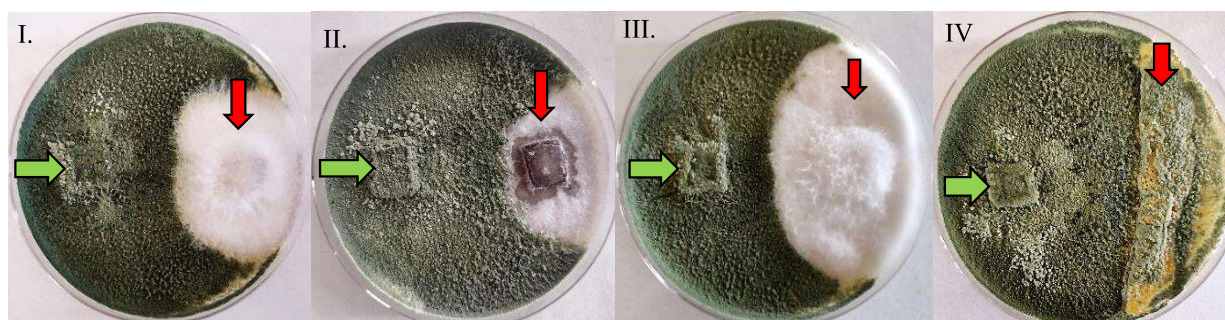
Figura 16 - Fungos antagonistas capazes de inibir o crescimento dos fitopatógenos acima de 50%. *T. longibrachiatum* (LMA 1684); *Fusarium* sp. (LMA 1722); FNEC 1 (LMA 1731); *Chaetomium complexo globosum* (LMA 1793); FNEC 2 (LMA 1608). FNEC = fungo não esporulante claro.



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

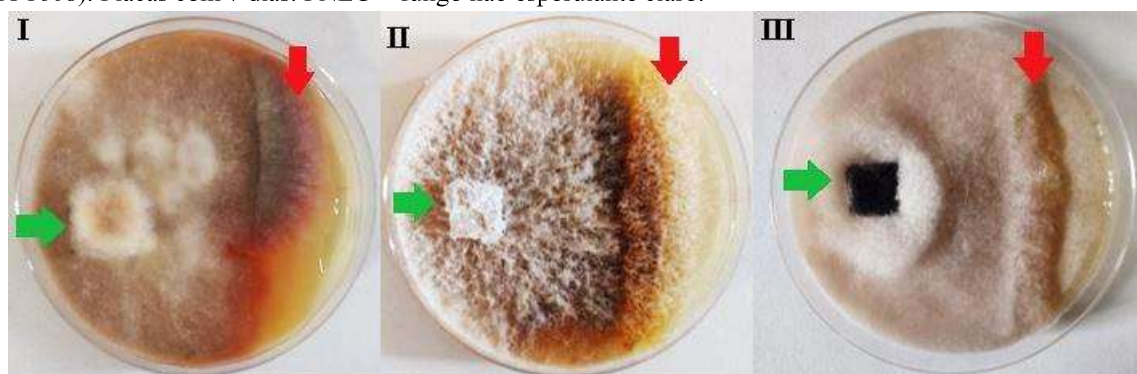
As avaliações do teste de antagonismo revelaram que o fungo *Trichoderma longibrachiatum* (LMA 1684) destacou-se por inibir o crescimento de todos fitopatógenos utilizados neste trabalho: *C. gloeosporioides* (LMA 1803), *F. oxysporum* (LMA 1805), *F. solani* (LMA 1800) e *X. axonopodis* (LMA 2128). A figura 17 apresenta os resultados qualitativos obtidos no teste de antagonismo pareado, pode-se observar que nas placas I, II e III houve inibição por contato, enquanto, na placa IV ocorreu inibição por crescimento micelial, o isolado LMA 1684 cresceu sobre a bactéria fitopatogênica *X. axonopodis*.

Figura 17 - Teste de antagonismo pareado. I, II, III e IV – Setas verdes: *T. longibrachiatum*; Seta vermelha, respectivamente: *F. solani*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* e *X. axonopodis*. Placas com 7 dias de crescimento.



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Figura 18 - Teste de antagonismo pareado. Seta vermelha (I, II, III): *X. axonopodis* (LMA 2128); I: Seta verde - *Chaetomium* sp. complexo *globosum* (LMA 1793); II: Seta verde - FNEC 1 (LMA 1731); III: Seta verde - FNEC 2 (LMA 1608). Placas com 7 dias. FNEC = fungo não esporulante claro.



Fonte: Elaborada pela autora (2022).

O isolado LMA 1793 pertencente ao gênero *Chaetomium* sp. - complexo *globosum*, inibiu em 66% o crescimento da bactéria fitopatogênica *X. axonopodis* (Tabela 1). A análise qualitativa evidenciou o crescimento do fungo sobre a mesma e sua bioatividade na produção de pigmentação (Figura 18). A linhagem LMA 1731, correspondente ao fungo não esporulante claro 1, inibiu o crescimento da bactéria em 95% (considerado um importante percentual de inibição), além do seu crescimento micelial, que avançou sobre a colônia bacteriana. O isolado LMA 1608 correspondente ao fungo não esporulante claro 2, inibiu o crescimento da *X. axonopodis* por contato em 74%, de forma que o fungo endofítico continuou a crescer de modo reduzido sobre o fitopatógeno.

6 DISCUSSÃO

Em 2019 com a pandemia causada pela covid-19, o agronegócio continuou em crescimento significativo. O setor alcançou diversos recordes no ano de 2020, o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea) em parceria com a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) calculou o avanço de 24,3% no PIB do setor, destacou-se também a participação de 26,1% no PIB total brasileiro (MACHADO, 2021).

Este trabalho demonstrou que é de interesse econômico que os fitopatógenos estudados sejam controlados, pois são capazes de provocar doenças em diversas espécies vegetais e posteriores perdas no cenário da agricultura. O teste de patogenicidade evidenciou a virulência expressa pelos fitopatógenos que causam as doenças nos hospedeiros vegetais e os sintomas se assemelham aos citados na literatura por Viana (2003) e Peruch; Schroeder (2018).

Assim, há grande demanda para investimentos em projetos que busquem revelar microrganismos endofíticos eficientes para o controle dos fitopatógenos, a fim de evitar perdas e menor produtividade das lavouras de culturas de interesse estratégico mundial (RAO et al., 2017). Das culturas endofíticas avaliadas neste trabalho, 5 revelaram atividade antagonista promissora, sendo capazes de biocontrolar os fitopatógenos *in vitro*, em porcentagens superiores a 50%. As linhagens LMA 1731 e LMA 1608 que apresentaram resultados significativos de inibição 95% e 74%, respectivamente contra *X. axonopodis*, estão sendo identificados por marcadores moleculares. No momento são mencionados como fungo não esporulante claro (FNEC).

Os endofíticos *Trichoderma longibrachiatum* (LMA 1684) e *Chaetomium* sp. (LMA 1793), isolados da folha de *P. incarnata* foram anteriormente reportados como responsáveis pela produção de flavonoides, uma classe de metabolito secundário de importância medicinal devido à elevada atividade antioxidante e anti-inflamatória, sendo assim, fontes promissoras de interesse da indústria farmacêutica (SILVA et al, 2020).

Os mecanismos de biocontrole do gênero *Trichoderma*, contra diferentes fitopatógenos, incluem principalmente: antibiose, competição por nutrientes e espaço, micoparasitismo e indução de resposta de defesa nas plantas. Nessas interações micoparasitárias, *Trichoderma* spp. age de forma eficaz na produção de enzimas como glucanase, quitinase e protease e vias de sinalização são iniciadas (MUKHOPADHYAY; KUMAR, 2020).

Dessa maneira, podemos dizer que o gênero *Trichoderma* revolucionou o cenário de controle biológico de fitopatógenos, tendo sido esse a base para o primeiro bioproduto disponibilizado no mercado brasileiro em 1987 (MORANDI; BETTIOL, 2009). A diversidade de suas espécies tem sido amplamente investigada para o controle de doenças e pragas, devido aos seus mecanismos de ação que envolvem uma série de biomoléculas benéficas para o vegetal. O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) registrou 21 produtos de controle biológico como biofungicidas à base de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma koningiopsis* e *Trichoderma stromaticum* (NASCENTE *et al.* 2019).

Conforme a bibliografia, o gênero *Trichoderma* é conhecido por sua capacidade de parasitar fungos e de sobreviver em condições adversas, pois podem produzir estruturas de resistência, enzimas extracelulares e degradadoras da parede celular de outros fungos (KONAPPA, *et al.* 2021). Pode-se afirmar que esse fungo além de ser potencial agente de controle biológico, também atua no crescimento, desenvolvimento do hospedeiro vegetal e tolerância a diferentes fatores abióticos (GHORBANPOUR, *et al.* 2018). Desse modo, a bioprospecção de espécies de *Trichoderma* pode levar ao surgimento de produtos com capacidade de melhorar as condições de produção de diferentes culturas.

Em relação aos antagonistas testados neste trabalho, *T. longibrachiatum* (LMA 1684) destacou-se por inibir o crescimento de todos os fitopatógenos, acima de 50%. Estudos mostraram que *T. longibrachiatum* possui atividade antagonista contra o fitopatógeno *F. oxysporum* e *F. solani* quando testado *in vitro*, promovendo a redução do crescimento micelial do fitopatógeno (OLIVEIRA *et al.*, 2021; HEWEDY *et al.*, 2020). Ademais, essa espécie foi considerada promissora no combate da doença “murcha” do grão de bico, causada por *F. oxysporum* e na produção de metabólitos voláteis com atividade microbiana (YONESI *et al.*, 2021). A eficiência de *T. longibrachiatum* também foi relatada na inibição *in vitro* do fitopatógeno *C. gloesporioides* (62%) que causa antracnose em diversos cultivos de interesse econômico, (SAVÍN-MOLINA *et al.*, 2021).

O gênero *Chaetomium* se destaca pela produção de vários tipos de metabólitos bioativos que desempenham um papel importante no biocontrole, sendo assim, descritos como eficazes no controle de fitopatógenos *in vitro* e *in vivo* (ADEL; MARWA, 2019). O fungo *Chaetomium* sp. complexo *globosum* LMA 1793, inibiu o crescimento de *X. axonopodis* em 66%, através de inibição por contato e produziu pigmentação.

De acordo com Marin (2019), os isolados da folha de *P. incarnata* apresentaram atividade antibacteriana contra a *X. axonopodis*, de maneira que, a análise dos extratos brutos do isolado *Chaetomium* sp. complexo *globosum* (LMA 1793) indicou a presença de substâncias responsáveis por atividades antibacteriana e antifúngica. Muitos antagonistas do gênero *Chaetomium* são capazes de secretar altos níveis das enzimas glucanase e celulasas, o que pode explicar seu potencial de biocontrole contra diferentes patógenos. Um estudo mostrou que quando o gene de resistência de *C. globosum* é induzido na célula hospedeira, a substância secretada tem efeito tóxico sobre a mesma (ZHANG, 2022).

Sabe-se que esses endofíticos são conhecidos por suas bioatividades, incluindo atividade antagonista contra os fitopatógenos. Dessa forma, este trabalho contribuiu para essas afirmações através de análises qualitativas e quantitativas de inibição utilizando os métodos descritos. Assim, os 5 endofíticos promissores no teste de antagonismo são fontes importantes de contribuição para o acervo de microrganismos de interesse para a bioeconomia e devem ser melhor explorados, futuramente.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho revela 5 novas linhagens antagonistas com potencial de aplicação no biocontrole dos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, representando um ponto inicial para o desenvolvimento de bioprodutos. Dentre os antagonistas, destaca-se o isolado *T. longibrachiatum* LMA 1684, com capacidade de inibição dos fitopatógenos acima de 50%.

Os demais isolados já purificados, preservados e depositados no acervo, constituem recursos genéticos a serem aplicados em outros projetos de pesquisa nas diversas áreas da biotecnologia. Por fim, o método utilizado é capaz de fornecer uma triagem eficiente, qualitativa e quantitativa, em estudos dessa natureza e corrobora para o desenvolvimento sustentável da agricultura.

REFERÊNCIAS

- ADEL K. M.; MARWA T. A. A. The use of *Chaetomium* taxa as biocontrol agents. Recent Developments on Genus *Chaetomium*. **Fungal Biology**, p. 251-266, 2019.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Análise de resíduos de agrotóxicos em fitoterápicos**. Brasília, 2019. 3º edição. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/medicamentos/fitoterapicos-dinamizados-e-especificos/informes/fitoterapicos/faq_agrotoxicos_fit_3ed_publicar_limpo.pdf. Acesso em: 1 set. 2022.
- BADALYAN, S. M; INNOCENTI, G.; GARIBYAN, N. G. Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathol.**, Mediterr, 2002.
- BETTIOL, W. Controle de doenças de plantas com agentes de controle biológico e outras tecnologias alternativas. **Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, 2003. p. 191-215.
- BETTIOL, W. GHINI. R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. **Métodos Alternativos de Controle Fitossanitária**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. p.79-95.
- BRASIL. **Mercado de biodefensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano**. MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). Brasília, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/feffmercado-de-biodefensivos-cresceem-mais-de-50-no-brasil>. Acesso em: 18 jan. 2022.
- BRASIL. **Ministério da Saúde libera R\$ 3,4 milhões para projetos de fitoterápicos**. Ministério da Saúde. Brasília, 2016. Disponível: <https://www.gov.br/saude/ptbr/assuntos/noticias/ministerio-da-saude-libera-r-3-4-milhoes-para-projetos-de-fitoterapicos> Acesso em: 19 jan. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Monografia da espécie *Passiflora incarnata* LINNAEUS (Maracujá vermelho)**. Brasília, 2015.
- BRASIL. **Resolução RDC nº. 10, de 09 de março de 2010**. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília, DF, 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine Hygiene Northbrook**, v.42, p.225-226, 1939.
- CENTROFLORA. ***Passiflora incarnata*: o guia eletrônico sobre o extrato que auxilia no combate da ansiedade, insônia, convulsões e histeria**. Botucatu: Grupo Centroflora, 2018.
- CHEN, L. et al. A comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight. **PLOS ONE**, [S.l], v. 13, n. 6, p. 1–22, 2018.
- ECKSTEIN, B. *et al.* Embrapa. Controle biológico de pragas da agricultura. 1º ed. Brasília, 2020.
- FAO, Food and Agriculture Organization, United Nations. **Plant Health and Food Security**. 2017.

GHORBANPOUR, A. *et al.* The effect of *Trichoderma harzianum* in mitigating low temperature stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. **Scientia Horticulturae**, v. 230, n. 2, p. 134-141, 2018.

GONÇALVES, L. Fatos históricos do controle biológico. **Floresta e Ambiente**, 1996. Disponível em: <https://www.floram.org/article/588e224be710ab87018b470f/pdf/floram-3-%C3%BAnico-96.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2022.

GOMES, S. G. Impactos da expansão do agronegócio brasileiro na conservação dos recursos naturais. Belo Horizonte: **Cadernos do Leste**. vol. 19, n. 19, 63-78 p, 2019.

HEWEDY, O. A. *et al.* Phylogenetic diversity of *Trichoderma* strains and their antagonistic potential against soil-borne pathogens under stress conditions. **Biology**, v. 9, n. 8, p. 189, 2020.

HUTWIMMER S. *et al.* Formation of exudate droplets by *Metarhizium anisopliae* and the presence of destruxins. **Mycologia Lawrence**, v. 102, n. 1, p. 1–10, 2010.

KONAPPA, N. *et al.* Exploring the potential role of *Trichoderma* as friends of plants foes for bacterial plant pathogens. **Biopesticides**, vol. 2, cap. 25, p. 383-399, 2021.

LIU *et al.*, 2020 - LIU, H. *et al.* Microbiome-Mediated stress resistance in plants. **Trends in Plant Science**, v. 25, n. 8, p. 733–743, 2020.

MACHADO, C. G. **Agronegócio brasileiro: importância e complexidade do setor**. Piracicaba, 14 jun. 2021. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada, USP. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/opiniaao-cepea/agronegocio-brasileiro-importancia-e-complexidade-do-setor.aspx>. Acesso em: 22 jun. 2022.

MARIN, V. R. **Fungos endofíticos de *Passiflora incarnata*: avaliação do potencial de ação contra bacteriose do maracujá**. 2019. Dissertação – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2019.

MEDEIROS, C. A. B. *et al.* Fome zero e agricultura sustentável: contribuições da Embrapa. **Embrapa**. Brasília, 2018. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/183521/1/Livro-Carlos-B-Medeiros-ODS-2-fome-zero-e-agricultura-sustentavel.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2022.

MELLO S. C. M; REIS A.; SILVA J. B. T. **Manual de curadores de germoplasma – Microorganismos: fungos filamentosos**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, 2011.

MIGUEL, E. S. *et al.* Saúde e alimentação saudável no âmbito do uso indiscriminado de agrotóxicos. In: CARMO, D. L. *et al.* (Org.). **Diálogos transdisciplinares em Agroecologia: projeto Café com Agroecologia**. Viçosa: FACEV, 2021. cap. 12, p. 169-182.

MIRANDA, K.V.L.; UHLMANN, L.A.C. **Uso de fitoterápicos na atualidade: uma revisão de literatura**, Tocantins, p. 1-4, 2021.

MIRODDI, M. *et al.* *Passiflora incarnata* L.: ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 791-804, 2013.

MORANDI, Marcelo Augusto Boechat; BETTIOL, Wagner. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. 2009.

MUKHOPADHYAY, R.; KUMAR, D. *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 1, p. 1-8, 2020.

NASCENTE, A. S. *et al.* **Trichoderma uso na agricultura**. Embrapa. 1º ed. Brasília, 2019.

NUGENT, L. K. *et al.* A revised method for the observation of conidiogenous structures in fungi. **Mycologist**, [S.l.], v. 20, n. 3, p. 111–114, 2006.

OLIVEIRA, G. **Tratamento com fitoterápicos aumenta na rede pública de saúde**. Agência Senado, nov. 2018. Disponível em: <https://www12.senado.leg.br/noticias/especiais/especial-cidadania/tratamento-com-fitoterapicos-aumenta-na-rede-publica-de-saude>. Acesso em: 20 jul. 2022.

OLIVEIRA, R. S. *et al.* A Biocontrol in vitro of *Trichoderma* spp. to pathogens *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporium* and, *Curvularia lunata*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 44, n. 1, 2021.

PATEKOSKI, K. S.; ZOTTARELLI C. L. A. Patogenicidade de *Pythium aphanidermatum* a alface cultivada em hidroponia e seu biocontrole com *Trichoderma*. **Pesquisa Agropecuária Brasil**, 2010.

PERUCH, L. A. M.; SCHROEDER, A. **Doenças fúngicas de parte aérea do maracujazeiro: sintomas, etiologia e controle**. Maracujazeiro-azedo: polinização, pragas e doenças. Cap. 4, 2018.

PESSOLATO, J.P. *et al.* Assessment of *Valerian* and *Passiflora* consumption during the pandemic COVID-19. **Brazilian Journal of Health Review**, v.4, n.2, p. 5589-5609, 2021.

RAFFAELLI, A. MONETI, G. MERCATI, G. TOJA, E. Mass spectrometric characterization of flavonoids in extracts from *Passiflora incarnata*. **Jornal of Chromatograf.**, v 777, p 223- 231, 1997.

RAO, H. C. Y.; KAMALRAJ, S.; JAYABASKARAN, C. Fascinating fungal endophytes associated with medicinal plants: Recent advances and beneficial applications. **Microbial Endophytes**, p.263–289, 2020.

RAO, H.C.Y, RAKSHITH, D., HARINI, B.P., SATISH, S., Antimicrobial Profiling and Molecular Identification of *Alternaria arborescens* CLB12, A Myco-endosymbiont Inhabiting *Combretum latifolium* Blume. **J. Biol. Act. Prod. Nat.**, p 1-9, 2017.

SAVÍN-MOLINA, Jonathan *et al.* Morphological characterization and biocontrol potential of *Trichoderma* species isolated from semi-arid soils. **Revista mexicana de fitopatología**, v. 39, n. 3, p. 435-451, 2021.

SCHULZ, B. J. E.; BOYLE, C. J. C.; SIEBER, T. N. **Microbial Root Endophytes**, Berlim, p 1-13, 2006.

SCHNEIDER, C.; RASBAND, W.; ELICEIRI, K. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, p. 671–675, 2012.

SENA, V. **Natulab investe R\$ 57 mi com aumento de buscas por passiflora e vitaminas**. Revista Exame, jul. 2021. Disponível em: <https://exame.com/negocios/natulab-investe-r-57-mi-com-aumento-em-busca-de-passiflora-e-vitaminas/>. Acesso em: 20 jul. 2022.

SILVA, M. H. R. *et al.* Endophytic fungi from *Passiflora incarnata*: an antioxidant compound source. **Archives of microbiology**, v. 202, n. 10, p. 2779-2789, 2020.

SILVA, M. H. R. **Fungos endofíticos associados à *Passiflora Incarnata* e avaliação de seu potencial biotecnológico**. 2017. Dissertação (mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista - Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro, 2017.

SILVA, W. W. A. Colônia (*Alpinia zerumbet*): um novo nicho para o agronegócio. **Business Journal**, v.2, n.2, p.13-21, 2020.

SINGH, J. S.; PANDEY, V. C.; SINGH, D. P. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. **Agriculture, Ecosystems & Environment**. p.339–353, 2011.

SMITH, H. S. On some phases of insect control by the biological method. **Journal of Economic Entomology**, v. 12, n. 47, p. 288-292, Ago. 1919. DOI: 10.1093/jee/12.4.2881.

SPECIALTY & CHEMICALS. **Passion Flower Extracts Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Organic, Conventional), By Application (Pharmaceutical, Nutraceutical, Personal Care, Food and Beverages), And Segment Forecasts, 2019 – 2025**. California, 2019.

STONE, J. K.; POLISHOOK, J. D.; WHITE, J. F. Endophytic Fungi. **Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods**, cap. 12, p. 241–270, 2014.

SUDHA, V. *et al.* Biological properties of Endophytic Fungi. **Braz. arch. biol. Technol**, Curitiba, v. 59, 2016.

THAMBUGALA, K. M. *et al.* Fungi vs. fungi in biocontrol: An overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 604-923, 2020.

TOGHUEO, R. M. K. *et al.* Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from Terminalia catappa against the causative agent of Common Bean Root Rot (*Fusarium solani*). **Biological Control**, v. 96, p. 8-20, 2016.

TONIN, F. B. **Propagação de *Passiflora incarnata* L. com o uso de estacas radiculares**. 2010. vii, 87 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2010.

TRIVEDI, P. *et al.* Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. **Nat Rev Microbiol**, cap. 18, p. 607–621, 2020.

VELTRI, ANA LUIZA AZANK. **Estudo de etnociências nas boas práticas agrícolas de plantas medicinais, aromáticas e condimentares no município de Botucatu, SP**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2017.

VIANA, F. M. P. *et al.* **Principais doenças do maracujazeiro na região nordeste e seu controle**. Embrapa Comunicado Técnico. Fortaleza, 2003.

WHEELER K. A.; HOCKING A. D. Interactions among xerophilic fungi associated with dried salted fish. **Journal Appl Bacteriol**, 1993.

YOUNESI, H. *et al.* Selection and control efficiency of *Trichoderma* isolates against *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris in Iran. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 116, p. 101-731, 2021.

ZHANG, J. *et al.* Isolation of Potato Endophytes and Screening of *Chaetomium globosum* Antimicrobial Genes. **Int. J. Mol. Sci.**, 2022.

ZHAO, J. *et al.* Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. **Formatex Research Center**, p 567-576, 2010.