

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
PROGRAMA POSTGRADO EM CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

**DIVERSIDADE E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO
GUARANÁ (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)**

BLENDIA NAARA SANTOS DA SILVA

MANAUS
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
PROGRAMA POSTGRADO EM CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

BLEND A NAARA SANTOS DA SILVA

**DIVERSIDADE E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO
GUARANÁ (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical – Universidade Federal do Amazonas (UFAM), em regime de dupla-titulação com o Programa de Doctorado en Ciencias de Recursos Naturales – Universidad de La Frontera (UFRO), como parte dos requisitos para obtenção de dupla titulação como Doutora em Agronomia Tropical e em Ciencias de Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Jânia Lilia da Silva Bentes Lima (UFAM)

Orientador: Prof. Dr. Cledir Rodrigues Santos (UFRO)

Co-orientadora: Profa. Dra. Paola Durán (UFRO)

MANAUS
2019

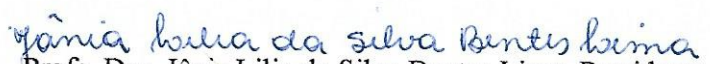
BLENDA NAARA SANTOS DA SILVA

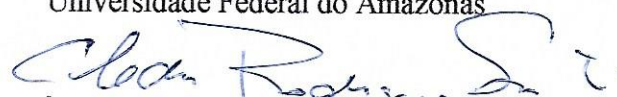
**DIVERSIDADE E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS DO GUARANÁ (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)**


Tese apresentada ao Programa de PósGraduação em Agronomia Tropical – Universidade Federal do Amazonas (UFAM), em regime de dupla-titulação com o Programa de Doctorado en Ciencias de Recursos Naturales – Universidad de La Frontera (UFRO), como parte dos requisitos para obtenção de dupla titulação como Doutora em Agronomia Tropical e em Ciencias de Recursos Naturais.

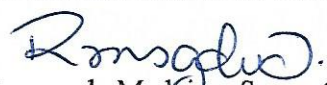
Aprovada em 18 de março de 2019

BANCA EXAMINADORA

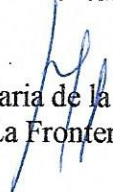

Prof. Dra. Jânia Lilia da Silva Bentes Lima, Presidente
Universidade Federal do Amazonas


Prof. Dr. Cledir Rodrigues Santos, Membro
Universidad de La Frontera - UFRO/Temuco - Chile


Prof. Dr. José Odair Pereira, Membro
Universidade Federal do Amazonas


Prof. Dra. Rozana de Medeiros Sousa Galvão, Membro
Universidade Federal do Amazonas


Prof. Dra. Paola Andrea Duram Cuelvas, Membro
Universidad de La Frontera - UFRO/Temuco – Chile


Prof. Dra. Maria de la Luz Mora Gil, Membro
Universidad de La Frontera - UFRO/Temuco – Chile

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586d Silva, Blenda Naara Santos da
Diversidade e atividade biológica de fungos endofíticos do guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) / Blenda Naara Santos da Silva. 2019
92 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Jânia Lilia da Silva Bentes Lima
Orientador: Cledir Rodrigues Santos
Coorientadora: Paola Andrea Durán Cuevas
Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas.

1. comunidade microbiana. 2. enzimas. 3. antraquinonas. 4. antagonismo. 5. *Colletotrichum guaranicola*. I. Lima, Jânia Lilia da Silva Bentes II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedicatória

Ao meu amado pai, por cuidar de mim em todos os momentos e me vigiar agora que se
encontra além das fronteiras da vida.
A minha amada mãe por mostrar como ser forte e corajosa,
mesmo nos momentos mais difíceis.
A minha filha e meu irmão pelo amor e carinho.

Dedico.

Agradecimentos

A **Deus** pelos livramentos e bênçãos no decorrer da minha vida. Toda honra e glória ao meu Pai amado.

A minha mãe **Maria Rita Santos da Silva**, por todo apoio em minha vida acadêmica e pessoal. Sem ela eu jamais cruzaria as fronteiras da ciência e os desafios impostos pela vida cotidiana.

A minha orientadora **Dra. Jânia Lilia da Silva Bentes Lima**, por acreditar em mim, nunca deixar faltar nada necessário aos experimentos, sempre estar disposta a ajudar e atender as minhas solicitações, por me defender, me guiar e me orientar pelos tortuosos caminhos da pós-graduação.

A meu orientador **Dr. Cledir Rodrigues Santos**, pelos conselhos tão valiosos que levarei para toda vida, pelas oportunidades durante meu período no Chile, pelas orientações durante a escrita de artigo, pelos conselhos para aprimoramento dos meus experimentos e por acreditar que eu posso ir além do doutorado. Sou grata por cuidar de tudo antes da minha chegada ao Chile. Eu e minha família seremos eternamente agradecidos por esse gesto tão importante que marcou nossa chegada em terras distantes.

A minha co-orientadora **Dra. Paola Durán** pelas orientações, conversas e conselhos durante os experimentos realizados em seu laboratório, sou muito agradecida.

A colega **Ana Tibúrcia**, pelas análises de diversidade, pela ajuda despendida na interpretação dos gráficos gerados e direcionamento na discussão desses dados, sou muito grata.

Aos meus colegas de laboratório **Raquel, Victória e Daniel**, pela amizade, conversas e toda ajuda nos experimentos.

Aos meus amigos **Mariannys, Jéssica e Emmanuel** pela amizade, momentos de distração e conversas quando eu mais precisei.

Ao **Nonato** por toda a valiosa ajuda durante o período acadêmico, pela companhia, amizade, conversas e momentos de devaneios.

A **CAPES** pela concessão de bolsa durante o Doutorado no Brasil e no Chile.

Sumário

1.	Introdução geral.....	1	
2.	Referências bibliográficas.....	3	
DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS NO GUARANÁ			
(<i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i>) DA AMAZÔNIA			6
3.	Introdução.....	9	
4.	Material e métodos.....	10	
4.1.	Material vegetal.....	10	
4.2.	Isolamento dos fungos endofíticos	11	
4.3.	Biologia molecular	12	
4.4.	Análises de composição e diversidade.....	12	
5.	Resultados	12	
5.1.	Composição taxonômica.....	13	
5.2.	Análises de Diversidade	16	
6.	Discussão.....	18	
6.1.	Composição taxonômica	19	
6.2.	Diversidade da comunidade microbiana	21	
7.	Conclusão.....	23	
8.	Referências bibliográficas.....	23	
9.	Material Suplementar	28	
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GUARANÁ (<i>Paullinia</i>			
<i>cupana</i> var. <i>sorbilis</i>) DA AMAZÔNIA.....			35
10.	Introdução.....	38	
11.	Material e Métodos.....	39	
11.1.	Caracterização morfológica	40	
11.2.	Biologia molecular	40	
11.3.	Espectrometria de massa por MALDI-TOF	41	
11.4.	Antraquinonas	41	
11.5.	Enzimas hidrolíticas	41	
11.6.	Antagonismo.....	41	
11.7.	Análise de dados	42	
12.	Resultados.....	42	
12.1.	Identificação dos endófitos de guaraná.....	42	
12.2.	Antraquinonas	44	

12.3. Enzimas	51
12.4. Antagonismo.....	51
13. Discussão.....	51
13.1. Antraquinonas	53
13.2. Enzimas	55
13.1. Antagonismo.....	58
14. Conclusão.....	60
15. Referências bibliográficas.....	60
16. Material Suplementar	67
17. Conclusão geral.....	92

Resumo

Fungos endofíticos vivem no interior dos tecidos da planta hospedeira sem causar nenhum sintoma aparente. A complexa relação entre a microbiota e o hospedeiro depende de fatores abióticos e bióticos, que determinam o tipo de relação estabelecida, resultando em interações positivas, neutras ou negativas. Em relações positivas, endófitos aumentam a resistência da planta contra patógenos, principalmente por meio da antibiose, umas das estratégias de antagonismo mais empregadas por endófitos. Esse mecanismo de defesa, está vinculado a produção de metabólitos secundários, os quais são altamente requeridos para fins biotecnológicos. As enzimas e as antraquinonas, por exemplo, são bioativos, amplamente relacionadas a fungos filamentosos. São compostos que possuem preferência na área industrial pois possuem maior estabilidade, menor custo de produção e melhor relação quantidade/tempo. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi determinar a composição da microbiota e a diversidade existente em plantas de guaraná, e avaliar se tais microrganismos são capazes de produzir metabólitos secundários e antagonizar o principal patógeno da cultura. Os fungos foram isolados partir de folhas e sementes saudáveis de genótipos suscetíveis (BRS300) e tolerantes (BRS871) a antracnose e superbrotamento, localizadas nos municípios de Manaus e Maués, no estado do Amazonas – Brasil. Isolados representantes de grupos morfológicos, foram identificados por caracterização morfológica, biologia molecular e perfil proteômico. Os endófitos foram testados quanto: a atividade antagônica *in vitro* contra o fitopatógeno *Colletotrichum guaranicola*, e a produção de antraquinonas e enzimas – amilase, celulase, pectinase, protease e lipase. A microbiota do guaraná era composta por 26 gêneros, como *Aspergillus*, *Bionectria*, *Clonostachys*, *Nigrospora*, *Phomopsis*, *Pestalotiopsis* e *Talaromyces*, anteriormente relacionados a bioproteção de plantas. Contudo a houve maior predominância de membros de *Colletotrichum* e *Fusarium*, relacionados ao endofitismo de muitas plantas, mais também, patógenos de importantes culturas. A diversidade foi maior no município de Manaus e no genótipo suscetível, possivelmente relacionado a melhor performance do hospedeiro. As antraquinonas foram produzidas por diferentes isolados, fortemente vinculadas as espécies utilizadas no biocontrole efetivo de patógenos. As análises enzimáticas revelaram endófitos promissores, especialmente a espécies *Fusarium concolor*, *Simplicillium lanosoniveum* e *Phomopsis phaseoli*. O antagonismo contra o *Colletotrichum guaranicola* resultou na obtenção de isolados fúngicos capazes de inibir seu crescimento *in vitro*. Os resultados desse estudo arquitetam a base para o início de novas pesquisas a partir dos diferentes compostos encontrados nos microrganismos do guaraná, representando uma fonte de bioativos para uso futuro nas áreas medicinal, agrônômica e industrial. Além disso, o entendimento da estrutura da comunidade endofítica bem como os fatores que influenciam sua diversidade servirão como base para estudos futuros que visam o incremento de produtividade e o manejo de doenças na cultura do guaraná.

Resumen

Los hongos endofíticos viven en el interior de los tejidos de la planta hospedadora sin causar ningún síntoma aparente. La compleja relación entre la microbiota y el hospedador depende de factores abióticos y bióticos, que determinan el tipo de relación establecida, resultando en interacciones positivas, neutras o negativas. En relaciones positivas, los endófitos aumentan la resistencia de la planta contra patógenos, principalmente por medio de la antibiosis, unas de las estrategias de antagonismo más empleadas por endófitos. Este mecanismo de defensa, está vinculado a la producción de metabolitos secundarios, los cuales son altamente requeridos para fines biotecnológicos. Las enzimas y las antraquinonas, por ejemplo, son bioactivas, ampliamente relacionadas con los hongos filamentosos. Son compuestos que poseen preferencia en el área industrial pues poseen mayor estabilidad, menor costo de producción y mejor relación cantidad / tiempo. De este modo, el objetivo de este trabajo fue determinar la composición de la microbiota y la diversidad existente en las plantas de guaraná, y evaluar si tales microorganismos son capaces de producir metabolitos secundarios y antagonizar el principal patógeno de la cultura. Los hongos fueron aislados de hojas y semillas sanos de genotipos susceptibles (BRS300) y tolerantes (BRS871) a antracnosis y superbrotamiento, localizadas en los municipios de Manaus y Maués, en el estado de Amazonas - Brasil. Aislados representantes de grupos morfológicos, fueron identificados por caracterización morfológica, biología molecular y perfil proteómico. Los endófitos se probaron como: la actividad antagónica *in vitro* contra el fitopatógeno *Colletotrichum guaranicola*, y la producción de antraquinonas y enzimas - amilasa, celulasa, pectinas, proteasa y lipasa. La microbiota del guaraná estaba compuesta por 26 géneros, como *Aspergillus*, *Bionectria*, *Clonostachys*, *Nigrospora*, *Phomopsis*, *Pestalotiopsis* y *Talaromyces*, anteriormente relacionados con la bioprotección de plantas. Sin embargo, hubo mayor predominio de miembros de *Colletotrichum* y *Fusarium*, relacionados con el endofitismo de muchas plantas, más también, patógenos de importantes culturas. La diversidad fue mayor en el municipio de Manaus y en el genotipo susceptible, posiblemente relacionado con el mejor desempeño del hospedador. Las antraquinonas fueron producidas por diferentes aislados, fuertemente vinculadas a las especies utilizadas en el biocontrol efectivo de patógenos. Los análisis enzimáticos revelaron endófitos prometedores, especialmente las especies *Fusarium concolor*, *Simplicillium lanosoniveum* y *Phomopsis phaseoli*. El antagonismo contra el *Colletotrichum guaranicola* resultó en la obtención de aislados fúngicos capaces de inhibir su crecimiento *in vitro*. Los resultados de este estudio plantean la base para el inicio de nuevas investigaciones a partir de los diferentes compuestos encontrados en los microorganismos del guaraná, representando una fuente de bioactivos para uso futuro en las áreas medicinal, agronómica e industrial. Además, el entendimiento de la estructura de la comunidad endofítica así como los factores que influyen su diversidad servirán como base para estudios futuros que apunten al incremento de productividad y el manejo de enfermedades en la cultura del guaraná.

1. Introdução geral

O guaraná (*Paullinia cupana* Kunth), espécie nativa da região Amazônica, é altamente cafeinado, com ampla e difundida utilização nas áreas farmacêuticas, cosméticas, alimentícias e, principalmente, na indústria de bebidas de refrigerantes (MARQUES et al., 2018; SCHIMPL et al., 2013). A guaranaicultura tem importância econômica e social no Brasil, principal produtor de guaraná no mundo. O estado do Amazonas é o terceiro maior produtor da cultura no país, entretanto o aumento da produtividade da espécie na região é limitada pela alta incidência de doenças fúngicas na cultura, causadas por *Colletotrichum guaranicola* (antracnose) e *Fusarium decemcellulare* (superbrotamento) (MARQUES et al., 2018; TRICAUD; PINTON; DOS SANTOS PEREIRA, 2016).

O controle dos principais patógenos do guaranazeiro tem sido realizado pelo plantio de cultivares tolerantes e aplicação de fungicidas (ARAÚJO et al., 2005). Entretanto, outros meios podem ser empregados no manejo da doença, como o uso de fungos endofíticos, uma vez que a presença de endófitos na planta antecede ao ataque de invasores e permite a melhor defesa contra esses organismos. O aumento da resistência da planta hospedeira ocorre por meio da ativação do sistema de defesa da planta e/ou produção de metabólitos secundários pelo endófito (BUSBY; RIDOUT; NEWCOMBE, 2016; CARD et al., 2016; LATZ et al., 2018).

Contudo, a relação endófito-planta é complexa, e depende do envolvimento de fatores abióticos, bióticos, bem como dos genótipos do próprio endófito e do hospedeiro, resultando em interações que incluem o mutualismo, comensalismo e parasitismo (HARDOIM et al., 2015; PETRINI, 1991; ZAKARIA; AZIZ, 2018). Mudanças fisiológicas da planta, seja por seu estágio de maturidade ou se submetidas a alterações nutricionais e ambientais, bem como interações com outros organismos, podem desencadear a atividade patogênica de endófitos quando o hospedeiro não é capaz de limitar seu crescimento (DE SILVA et al., 2017; PHOTITA et al., 2004; PILLAI, 2017; ZAKARIA; AZIZ, 2018).

HURST (2017) esclarece, que indiretamente a planta seleciona microrganismos, quando submetida ao estresse, e essa relação pode ser positiva ou negativa, resultando no estabelecimento de microrganismos, que terminam por impactar a comunidade microbiana e a fisiologia da planta.

Quando a relação planta-endófito é positiva, o antagonismo de patógenos ocorre por antibiose, competição ou micoparasitismo. A antibiose, produção de metabólitos secundários, é uma das estratégias mais bem empregadas por endófitos, e pode ter ação antifúngica, antibacteriana, inseticida, nematicida e antiviral (CHOWDHURY et al., 2017; KHAN et al., 2018; LI et al., 2012; LIU et al., 2016). A secreção de compostos possibilita o aumento da defesa do endófito, permitindo a competição por espaço e nutrientes, e da resistência da planta, por meio do antagonismo direto ou indireto (LATZ et al., 2018; LUGTENBERG; CARADUS; JOHNSON, 2016)

Além dos benefícios proporcionados ao hospedeiro, os diferentes bioativos são de grande valor e possuem diversos usos no meio biotecnológico, nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, medicinais e têxtil. As enzimas microbianas, ganham preferência de uso devido a facilidade de manipulação e estabilidade a condições adversas (GOPINATH et al., 2017; MUSZEWSKA et al., 2017). Como o uso de amilases e celulases, comumente obtidas a partir dos fungos *Aspergillus* e *Penicillium*, os quais têm sua atividade enzimática otimizada para maior produção das enzimas (WANG et al., 2016; VAISHNAV et al. 2018).

Outros compostos secundários produzidos por microrganismos, são as antraquinonas, recentemente associadas a diferentes fungos endofíticos, que possibilitou a descoberta de novos compostos e sua utilização para fins biotecnológicos (GESSLER; EGOROVA; BELOZERSKAYA, 2013; HE et al., 2017; KHAMTHONG et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2011). No entanto, nem sempre as antraquinonas são benéficas, também classificadas como micotoxinas, podem ser altamente cancerígenas, se ingeridas a partir de produtos contaminados. Portanto, a identificação de fungos micotóxicos é importante afim de evitar futuros prejuízos (VARGA et al., 2011; VIEGAS et al., 2018).

Desse modo, estudos que abordam a composição da comunidade microbiana associada as suas atividades biológicas são tão importantes, pois permitem esclarecimentos sobre a ecologia da planta e sua microbiota associada a fim de gerar informações necessárias para que futuros esforços sejam empregados com o propósito de melhorar a produção e manejo de doenças em plantas de elevado valor comercial como o guaranazeiro. Além disso, os compostos secundários produzidos por fungos, como enzimas e antraquinonas, possuem elevada aplicabilidade para fins industriais, possibilitando a descoberta de novas fontes produtoras de bioativos. Logo, o objetivo desse estudo foi avaliar a composição e diversidade microbiana de fungos endofíticos do

guaraná e elucidar se tais microrganismos são capazes de realizar atividades biológicas voltadas ao antagonismo e a produção de metabólitos.

2. Referências bibliográficas

- BUSBY, P. E.; RIDOUT, M.; NEWCOMBE, G. Fungal endophytes: modifiers of plant disease. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 645–655, abr. 2016.
- CARD, S. et al. Deciphering endophyte behaviour: the link between endophyte biology and efficacious biological control agents. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 8, p. fiw114, ago. 2016.
- CHOWDHURY, N. S. et al. Cytotoxic naphthoquinone and aza-anthraquinone derivatives from an endophytic *Fusarium solani*. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 4, p. 1173–1177, abr. 2017.
- DE ARAÚJO, J. C. A. et al. Avaliação de fungicidas no controle da antracnose do guaranazeiro. In: **Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SEMINÁRIO SOBRE PESQUISAS COM O GUARANAZEIRO NA AMAZÔNIA, 1., 2005, Manaus. Anais... Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2005. p. 69-72.
- DE SILVA, D. D. et al. Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 3, p. 155-168, 2017.
- GESSLER, N. N.; EGOROVA, A. S.; BELOZERSKAYA, T. A. Fungal anthraquinones. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 85–99, mar. 2013.
- GOPINATH, S. C. B. et al. Biotechnological processes in microbial amylase production. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–9, fev. 2017.
- HE, K. Y. et al. New chlorinated xanthone and anthraquinone produced by a mangrove-derived fungus *Penicillium citrinum* HL-5126. **Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 7, p. 823–827, jul. 2017.
- HURST, G. D. D. Extended genomes: symbiosis and evolution. **Interface Focus**, v. 7, n. 5, p. 20170001, out. 2017.
- KHAMTHONG, N. et al. Bioactive polyketides from the sea fan-derived fungus *Penicillium citrinum* PSU-F51. **Tetrahedron**, v. 68, p. 8245–8250, 2012.
- KHAN, N. et al. Endophytic *Fusarium solani*: A rich source of cytotoxic and antimicrobial naphthaquinone and aza-anthraquinone derivatives. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 970–976, jan. 2018.
- LATZ, M. A. C. et al. Endophytic fungi as biocontrol agents: elucidating mechanisms in disease suppression. **Plant Ecology & Diversity**, p. 1–13, nov. 2018.
- LI, X.-J. et al. Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus associated with *Melia azedarach*, and their antifungal, antifeedant, and toxic activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 13, p. 3424–3431, abr. 2012.
- LIU, Y.-H. et al. Antimicrobial and antitumor activity and diversity of endophytic fungi from traditional Chinese medicinal plant *Cephalotaxus hainanensis* Li. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, 2016.
- LUGTENBERG, B. J. J.; CARADUS, J. R.; JOHNSON, L. J. Fungal endophytes for sustainable crop production. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 12, p. 194, dez. 2016.
- MARQUES, L. L. M. et al. *Paullinia cupana*: a multipurpose plant – a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19 set. 2018.
- MUSZEWSKA, A. et al. Fungal lifestyle reflected in serine protease repertoire. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9147, dez. 2017.

OLIVEIRA, M. N. et al. Novel anthraquinone derivatives produced by *Pestalotiopsis guepinii*, an endophytic of the medicinal plant *Virola michelii* (Myristicaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 5, p. 993–996, maio 2011.

PHOTITA, W. et al. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? **Fungal Diversity**, v. 16, p. 131–140, 2004.

PILLAI, T. G. Pathogen to endophytic transmission in fungi-a proteomics approach. **SOJ Microbiology & Infectious Disease**, v. 5, n. 3, p. 1–5, 2017.

SCHIMPL, F. C. et al. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 14–31, 28 out. 2013.

TRICAUD, S.; PINTON, F.; DOS SANTOS PEREIRA, H. Saberes e práticas locais dos produtores de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis*) do médio Amazonas: Duas organizações locais frente à inovação. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi: Ciências Humanas**, 2016.

VAISHNAV, N. et al. *Penicillium*: The next emerging champion for cellulase production. **Bioresource Technology Reports**, 2018.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section Flavi. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 57–80, jun. 2011.

VIEGAS, C. et al. Sterigmatocystin in foodstuffs and feed: aspects to consider. **Mycology**, p. 1–15, 2018.

WANG, Shihui et al. Characterization of a starch-hydrolyzing α -amylase produced by *Aspergillus niger* WLB42 mutated by ethyl methanesulfonate treatment. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 1, 2016.

ZAKARIA, L.; AZIZ, W. N. W. Molecular identification of endophytic fungi from banana leaves (*Musa* spp.). **Tropical life sciences research**, v. 29, n. 2, p. 201–211, jul. 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
PROGRAMA POSTGRADO EM CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

Capítulo 1

DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS NO GUARANÁ
(*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) DA AMAZÔNIA

MANAUS
2019

Resumo

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) é espécie vegetal nativa da Amazônia. Destaca-se por apresentar propriedades medicinais e estimulantes, sendo o pó do guaraná o principal produto exportado e responsável por movimentar a economia em Maués, principal produtor no estado do Amazonas. Atualmente o estado do Amazonas ocupa a 3ª posição no rank brasileiro de exportação, e dentre os fatores que limitam a expansão da cultura destacam-se a ocorrência de doenças de origem fúngica como antracnose (*Colletotrichum guaranicola*) e superbrotamento (*Fusarium decemcellulare*). Diversos estudos têm demonstrado a importância de fungos endofíticos associados a planta hospedeira no combate à fitopatógenos, herbivoria e a estresses abióticos, além de serem um reservatório de novas moléculas com potencial biotecnológico. Assim, no presente estudo comparamos a distribuição e a diversidade de fungos endofíticos associados as folhas e sementes de guaranazeiro, coletados em genótipos resistentes e suscetíveis a antracnose e superbrotamento, oriundas de Maués e Manaus. A diversidade de fungos endofíticos encontrada foi maior na folha (7.441 indivíduos) que na semente (73 indivíduos), refletida em uma composição taxonômica dominante de membros do filo Ascomycota (67%) e Basidiomycota (0,3%). A abundância relativa dos táxons encontrados sugere uma estruturação das comunidades pelo genótipo e localização geográfica. O genótipo suscetível apresentou maior diversidade de fungos. A partir dos nossos resultados mais estudos poderão ser feitos para elucidar os mecanismos envolvidos na interação de microrganismos associados ao guaranazeiro.

Palavras-chave: fungos filamentosos, composição taxonômica, genótipo e localização geográfica.

Abstract

Guaraná (*Paullinia cupana* var. *Sorbilis*) is a plant species native to the Amazon. It stands out for presenting medicinal and stimulating properties, being the guarana powder the main exported product and responsible for moving the economy in Maués, the main producer in the state of Amazonas. Currently, the state of Amazonas occupies the 3rd place in the Brazilian export rank, and among the factors limiting the expansion of the culture, there are the occurrence of fungal diseases such as anthracnose (*Colletotrichum guaranicola*) and *Fusarium decemcellulare*. Several studies have demonstrated the importance of endophytic fungi associated to the host plant in the fight against phytopathogens, herbivory and abiotic stresses, besides being a reservoir of new molecules with biotechnological potential. Thus, in the present study, we compared the distribution and diversity of endophytic fungi associated with guaraná leaves and seeds, collected in resistant and susceptible genotypes to anthracnose and superbrushing, from Maués and Manaus. The diversity of endophytic fungi found was higher in leaf (7,441 individuals) than in seed (73 individuals), reflected in a dominant taxonomic composition of members of the phylum Ascomycota (67%) and Basidiomycota (0.3%). The relative abundance of the taxa found suggests a structuring of the communities by genotype and geographic location. The susceptible genotype presented greater diversity of fungi, among them, suggesting that, in an indirect way, the endophytic microorganisms may contribute to the resistance in guaraná. From our results more studies could be done to elucidate the mechanisms involved in the interaction of microorganisms associated with guaraná.

Keywords: filamentous fungi, taxonomic composition, genotype and geographic location.

3. Introdução

A floresta Amazônica é uma região amplamente diversa e centro de origem do guaraná (*Paullinia cupana*), planta com distintas propriedades medicinais e estimulantes. Tais propriedades contribuíram para o aumento da demanda pela produção de suas sementes, parte comercial, onde encontra-se elevada quantidade de cafeína e outros taninos (HECKMAN; WEIL; DE MEJIA, 2010).

O cultivo de guaraná teve início no estado do Amazonas, no município de Maués, distante 250 km da capital do estado, Manaus. O plantio também foi incentivado durante muitos anos em outros estados como Acre, Pará, Rondônia e Bahia. Na década de 1980, Maués representava o pólo de produção de guaraná no Brasil, gerando significativa renda por meio das indústrias de bebidas, cosméticas e farmacêuticas (MARQUES et al., 2018).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), atualmente, as plantações de guaraná ocupam uma área de 15 mil hectares no Brasil, distribuídas principalmente nos estados da Bahia (6.500 ha) e Amazonas (8.113 ha). O Amazonas apesar de possuir maior área cultivada tem baixa produção $501,507 \text{ ton}\cdot\text{ha}^{-1}$, a maior produção é obtida da Bahia com $862,135 \text{ ton}\cdot\text{ha}^{-1}$ e Rondônia com $705,755 \text{ ton}\cdot\text{ha}^{-1}$ (IBGE, 2018).

A limitação da cultura, entre outros fatores, está relacionada principalmente a incidência da antracnose (*Colletotrichum guaranicola* Albuquerque) e superbrotamento (*Fusarium decemcellulare* Brick) (GARCIA; NASCIMENTO FILHO, 1999) que afetam significativamente os plantios do Amazonas, onde o clima tropical, com temperatura e pluviosidade média de $27 \text{ }^\circ\text{C}$ e 2.100 mm , respectivamente (CLIMATE-DATA, 2018), favorecem o estabelecimento de uma enorme biodiversidade de microrganismos.

Recentes estudos têm demonstrado a importância de microrganismos associados à planta, dentre eles, os fungos endofíticos destacam-se por suas múltiplas interações com seu hospedeiro e por serem um potencial reservatório de novas moléculas e compostos bioativos. Durante a interação mutualística planta-fungo, os endófitos auxiliam numa melhor resposta de defesa do hospedeiro em situações de estresse abiótico e biótico, aumentando a aquisição de nutrientes, tolerância à seca, metais pesados e calor (BERG, 2015; HANEY et al., 2015; YANG; KLOEPPER; RYU, 2009). Além disso, diminuem os ataques por herbivoria e fitopatógenos, por meio da ativação de vias metabólicas e produção direta de ativos metabólicos que protegem a planta, favorecendo maior produção de biomassa vegetal. Em troca, as plantas fornecem nutrientes essenciais aos

fungos endofíticos e produzem hormônios e aminoácidos específicos que modulam a microbiota, recrutando grupos taxonômicos específicos (TOJU et al., 2014; VANDENKOORNHUYSE et al., 2015).

No entanto, nem sempre a interação com endófitos resulta em efeitos positivos ao hospedeiro. Tais organismos podem antagonizar fitopatógenos, facilitar a doença ou ter efeito neutro (BUSBY; RIDOUT; NEWCOMBE, 2016; RAGHAVENDRA; NEWCOMBE, 2013). Os efeitos positivos, neutros ou negativos, dependem do ambiente e das diferentes combinações entre genótipos do hospedeiro e do endófito bem como das interações com outros organismos (AHLHOLM et al., 2002; WÄLI et al., 2006).

O entendimento dos fatores que direcionam a microbiota do guaranazeiro é de interesse, afim de elucidar como estes microrganismos se estruturam em nichos específicos. Além disso, as interações simbióticas entre fungos endofíticos e o guaranazeiro foram pouco exploradas (SIA et al., 2013; SILVA et al., 2018), representando, uma fonte de novas informações que serão uteis futuramente no incremento de produção e proteção da cultura. Desse modo, objetivou-se identificar a composição taxonômica existente e comparar a diversidade de fungos cultiváveis entre os genótipos e localidades do guaranazeiro.

4. Material e métodos

4.1. Material vegetal

As folhas e os frutos saudáveis de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), oriundos dos genótipos suscetível (BRS300) e tolerante (BRS871) a antracnose e ao superbrotamento, foram coletados nos campos experimentais da Embrapa Amazônia Ocidental localizada nos municípios de Manaus (MAO) e Maués (MBZ), no estado do Amazonas – Brasil, no mês de novembro, em 2014. A coleta foi realizada a partir de cinco plantas de cada clone em cada local, totalizado 20 plantas oriundas de 4 amostras: MAO300 (município Manaus e cultivar BRS300), MAO871 (Manaus e BRS871), MBZ300 (Maués e BRS300) e MBZ871 (Maués e BRS871). O material vegetal foi identificado, armazenado em sacos de papel e acondicionado em caixa com gelo para transporte até o Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

4.2. Isolamento dos fungos endofíticos

Os fungos endofíticos de folhas foram isolados de acordo com o protocolo proposto por Souza et. al. (2004). Amostras foliares de 5 cm foram submetidas à desinfestação superficial (álcool 70% -1 min.; NaCl 2% - 1min.; álcool 70% - 30 seg. e três lavagens em água destilada esterilizada). Para o controle da assepsia, 50 µl da água da última lavagem foram plaqueadas em meio de cultura BDA. Foram eliminadas as bordas dos fragmentos desinfestados, obtendo amostras de 0,5 cm², depositados em placas de Petri com BDA (Batata Dextrose Ágar) (Kasvi[®]), Sabouraud (Merck) e Czapek (DifcoTM), acrescidos de Cloranfenicol 250 mg. L⁻¹ (Amresco[®]). Em cada meio de cultura foram depositados 100 fragmentos obtidos de uma única planta, totalizando 300 fragmentos por planta.

Para o isolamento de fungos endofíticos de sementes, foram utilizadas 25 sementes de cada amostra, totalizando 100 sementes. Os frutos foram lavados em água corrente e o arilo removido, seguido de desinfestação superficial (álcool a 70% - 2 min., NaClO 3% - 5 min., álcool 70% - 30 seg. e três lavagens em água destilada esterilizada). O controle da assepsia foi o mesmo descrito para as folhas. Foram depositadas cinco sementes equidistantes, em placas com BDA acrescida de Cloranfenicol (250 mg. L⁻¹). As placas foram mantidas em temperatura de 28 °C sem luz e após 48 horas os fragmentos de hifas foram transferidos para novas placas de Petri com BDA para individualização das colônias.

Os fungos endofíticos foram quantificados e separados em grupos morfológicos com base nas características das colônias e estruturas reprodutivas (BARNETT; HUNTER, 1972; CARMICHAEL, 1980; PITT; HOCKING, 2009; SUTTON, 1980) Para manter a maior uniformidade genética, foram obtidas culturas monoconidiais de representantes dos grupos morfológicos (TAKASHIO 1974). Todos os isolados monoconidiais foram preservados usando os métodos Castellani e depositados na Colección Chilena de Cultivos Tipo (CCCT) localizada na Universidad de La Frontera em Temuco (Chile) em 2017.

4.3. Biologia molecular

A extração de rDNA foi realizada a partir de culturas monospóricas com uma semana de incubação a 28 °C, com kit de extração Wizard® Genomic DNA Purification Kit Protocol. O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8% utilizando marcador de peso molecular Lambda DNA (PROMEGA) de 50 ng, e os fragmentos foram visualizados e fotodocumentados (Loccus Biotecnologia Molecular Imaging Transilluminator). A razão 260/280 referente a qualidade e concentração do rDNA foram obtidas em espectrofotômetro Nanodrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific), e a concentração final ajustada para 30 ng.µL⁻¹.

A amplificação do DNA genômico seguiu o protocolo do *kit* Ge Healthcare Illustra™ PureTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads. Os *primers* utilizados foram os oligonucleotídeos da Invitrogen™ ITS1 (5' TTCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White et al., 1990) para estudo da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*). A região foi amplificada com uso dos reagentes do *kit*, acrescidos de 2 µL de DNA, 2 µL de cada *primer* e 21 µL de água ultrapura para completar o volume final da reação de 25 µL.

A PCR seguiu as seguintes condições: temperatura de desnaturação de 96 °C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos 94 °C por 30s, 50 °C por 30s, e 72 °C por 90s e extensão final de 72 °C por quatro minutos. A purificação dos produtos da PCR foi realizada de acordo com o protocolo do *kit* PCR Illustra GFX 96.

Os fragmentos de DNA foram sequenciados nas direções senso e antissenso por eletroforese capilar em sequenciador automático (ABI 3500). Os eletroferogramas gerados foram editados com auxílio do programa SeqAssem 2007/2008. As sequências geradas foram comparadas com sequências de ITS depositadas no GenBank - National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). As análises filogenéticas foram realizadas no programa MEGA v 6.1 (TAMURA et al. 2013) e editadas no programa iTOL (LETUNIC e BORK, 2016).

4.4. Análises da composição e diversidade da microbiota

As análises de composição taxonômica foram feitas utilizando a matriz de Abundância Relativa (AR) de gêneros, posteriormente agrupadas em OTUs (Unidade Taxonômica Operacional). Os gráficos com a composição taxonômica dos gêneros foram feitos utilizando os pacotes do R Phyloseq (MCMURDIE; HOLMES, 2013) e ggplot

(WICKHAM, 2017). A proporção de OTUs únicas e compartilhadas entre os genótipos da planta, locais amostrados e meio de cultura, foi dada a partir de diagramas interativos de Venn no Jveen (BARDOU et al., 2014).

As análises de diversidade de fungos endofíticos foram calculadas pelo programa RStudio versão 1.1.463 implementado no Programa R versão 3.5.1 (R core Team, 2018), utilizando a abundância relativa dos táxons encontrados nas amostras. A diversidade alfa, que analisa a diversidade dentro de cada amostra, foi estimada por genótipo (BRS300 e BRS871) e origem geográfica (Manaus e Maués), utilizando a série de Hill, que leva em consideração o número efetivo de gêneros para calcular a riqueza ($q = 0$), diversidade Shannon ($q = 1$) e diversidade Simpson ($q = 2$) no pacote iNEXT (HSIEH; MA; CHAO, 2016).

5. Resultados

A quantidade de fungos endofíticos cultiváveis do guaranazeiro revelou um grande número de indivíduos associados às duas cultivares. Como resultados da coleta de campo foram isolados 7.441 endófitos a partir de folhas de guaranazeiro, e 74 de sementes, distribuídos de acordo com a Tabela 1. Nos meios de cultura testados, o maior número de fungos foi obtido no meio Czapek (2.791 isolados), seguido do BDA (2.643) e por último Sabouraud (2.080).

Tabela 1. Número de isolados de fungos endofíticos obtidos de plantas de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*), cultivares BRS300 e BRS871, coletados nos municípios de Manaus e Maués - AM, Brasil.

Folhas			
Local de coleta	Cultivares		BRS871
	BRS300		
Manaus	1.533		1.947
Maués	2.721		1.240
Total	4.254		3.187
Sementes			
Manaus	19		11
Maués	23		20
Total	43		31

5.1. Composição taxonômica

A microbiota endofítica do guaraná, revelou 67% (5.012) do total de fungos inserido no filo *Ascomycota*, com membros das classes *Sordariomycetes* (55%), *Dothideomycetes* (8%) e *Eurotiomycetes* (4%). O filo *Basidiomycota* representou 0,3% (22) dos endófitos, com membros exclusivos na classe *Agaricomycetes*.

As famílias com maior abundância relativa (AR) foram *Nectriaceae* (17%), *Glomerellaceae* (16%), *Apiosporaceae* (8%), *Diaporthaceae* (7%) e *Botryosphaeriaceae* (7%). Dentro de 15 famílias estão distribuídos 26 gêneros, dispostos na figura 1. De modo geral, a composição taxonômica do guaraná possuía duas OTUs dominantes, ou seja, com elevado AR, *Colletotrichum* (16%) e *Fusarium* (15%). Outras 12 OTUs demonstraram AR variando entre 1 a 7,8%, e foram consideradas como taxa frequentes, típicas ou comuns, perfazendo metade dos isolados de guaraná (45,85%). As outras 14 OTUs restantes, com AR < 1% foram consideradas raras. A obtenção de fungos endofíticos raros como, *Daldinia*, *Hypoxylon*, *Lentinus*, *Neopestalotiopsis* e *Tinctoporellus* sugere que os procedimentos de isolamento e amostragem foram adequadamente empregados.

A distribuição dos gêneros de acordo com os genótipos da planta e os municípios de coleta encontra-se na figura 1A. Nas folhas obtidas de MAO300 quatro OTUs prevaleceram sobre as demais, *Fusarium* (9%), *Guignardia* (9%), *Nigrospora* (9%) e *Colletotrichum* (8%). Em MBZ300 apenas *Colletotrichum* (25%) e *Fusarium* (29%), formaram o grupo de indivíduos predominantes. No genótipo BRS871 oriundo de Maués os gêneros *Nigrospora* (30%), *Fusarium* (14%), *Bionectria* (10%), *Phomopsis* (10%) e *Colletotrichum* (8%) demonstraram maiores valores de AR. Um número menor de OTUs prevaleceu em MAO871, apenas *Colletotrichum* (17%) e *Guignardia* (8%).

A comunidade endofítica foliar é composta 22 OTUs, onde 8 OTUs foram encontradas em ambos os genótipos e municípios, *Bionectria*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis* e *Phomopsis*. O maior número de OTUs únicas foi encontrado em MBZ300 (5) e MAO300 (2). Na amostra MAO871 nenhuma OTU única foi observada e apenas uma OTU, *Phyllosticta*, foi exclusivamente obtida de MBZ871 (Figura suplementar 1 A).

Em relação ao meio de cultura usado para o isolamento, no meio BDA foi encontrado o maior número de OTUs únicas (*Hypoxylon*, *Mycoleptodiscus*, *Neopestalotiopsis*, *Phyllosticta*, *Pseudopestalotiopsis* e *Talaromyces*). Os meios Czapek e Sabouraud proporcionaram a obtenção de duas OTUs únicas (*Peroneutypa* e *Tinctoporellus*) (Figura 1b). Três OTUs (*Colletotrichum*, *Fusarium* e *Penicillium*) foram obtidas das quatro amostras (MAO300, MAO871, MBZ300 e MBZ871) nos três diferentes meios de cultura utilizados. O maior número de OTUs únicas foi isolado em meio BDA no município de Maués (4), e no genótipo BRS300 (5) (Figura suplementar 2A e B).

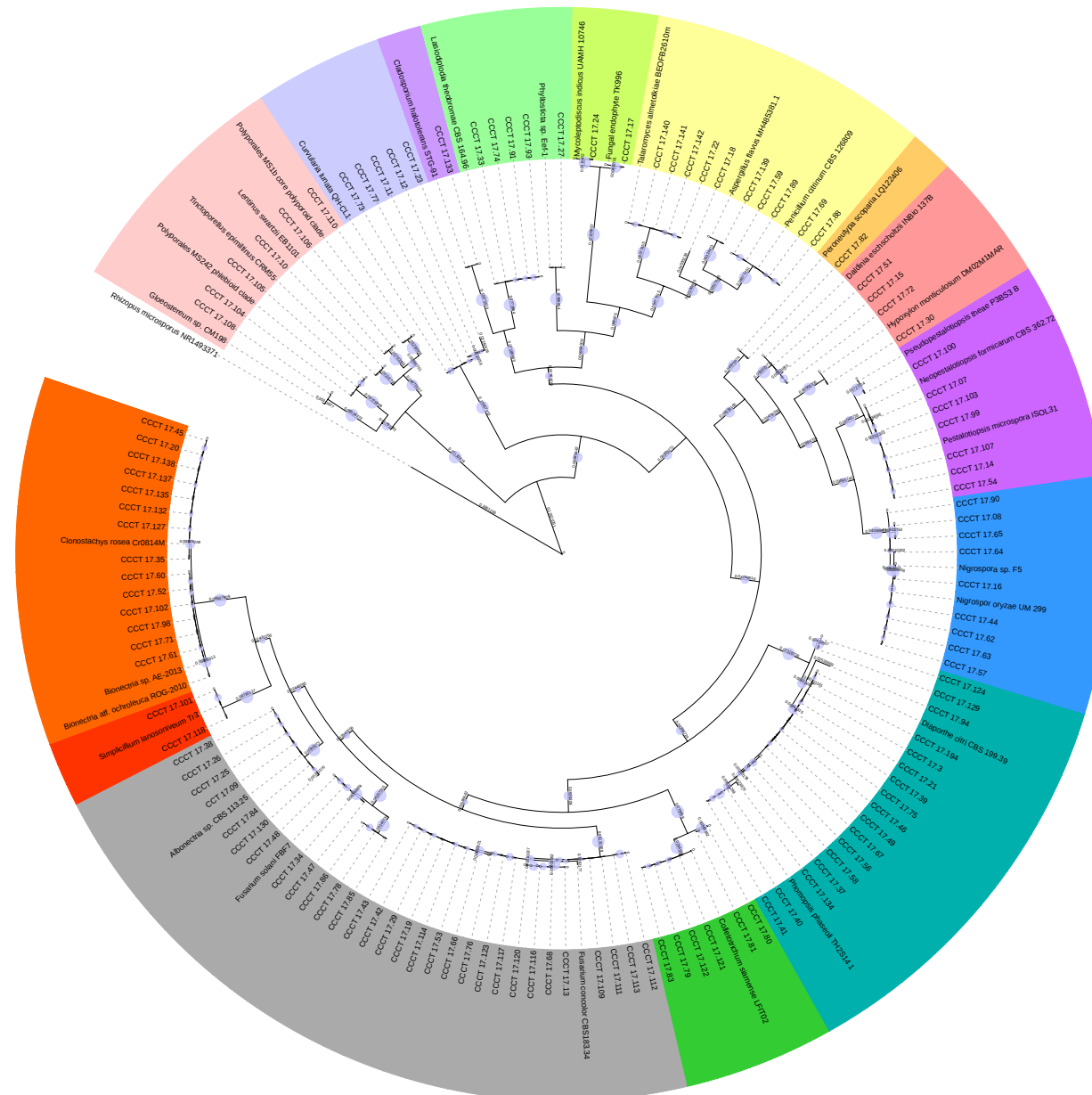
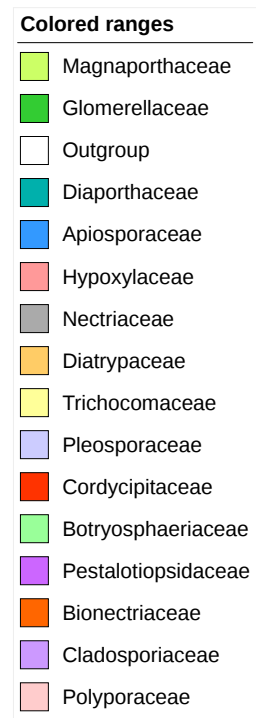


Figura 1. Análise filogenética pelo método de máxima verossimilhança dos fungos endofíticos de guaraná inferidos a partir do agrupamento de rDNA da região ITS1 e ITS4 (Bootstrap =1000 réplicas).

As sementes oriundas do genótipo MBZ300 estavam colonizadas principalmente por *Colletotrichum* (22%), *Clonostachys* (17%), *Fusarium* (13%), *Talaromyces* (13%), *Bionectria* (9%), *Phomopsis* (9%) e *Simplicillium* (9%). Em MAO300, outro grupo apresentou elevado AR, *Fusarium* (47%), *Clonostachys* (21%), *Aspergillus* (11%) e *Bionectria* (11%). Na cultivar BRS871 as OTUs sobressalentes foram *Fusarium* (15%) em MBZ871, e *Cladosporium* (19%) e *Fusarium* (10%) em MAO871.

A comunidade microbiana de sementes possuía maior número de OTUs únicas em Maués, nas amostras MBZ300 (3) e MBZ871 (2). Em Manaus, MAO300 e MAO871, uma OTU foi exclusivamente obtida em cada amostra, *Aspergillus* e *Cladosporium*, respectivamente. Apenas uma OTU (*Fusarium*) foi isolada em todos os genótipos e municípios estudados. Na cultivar suscetível observou-se maior quantidade total de OTUs, 9 e 6, presentes nas amostras MBZ300 e MAO300, respectivamente (Figura suplementar 1B).

5.2. Análises de Diversidade

A alfa diversidade gerada pelas curvas de rarefação utilizada na comparação entre os órgãos vegetais, apontou a folha com maior riqueza ($q = 0$), ou seja, com maior número de gêneros. O índice Shannon ($q = 1$) relacionado aos gêneros únicos e abundantes, e Simpson ($q = 2$), sensível somente aos gêneros abundantes, apontaram as sementes com maior homogeneidade. Estes resultados são suportados pelas curvas de extrapolação, onde na semente não foi observado nenhum aumento de diversidade nos parâmetros $q = 0,1,2$ (Figura 3a). Entre os meios de cultura (Figura 3b), o BDA foi determinado com maior riqueza ($q = 0$) quando comparado ao Czapek e Sabouraud. Entretanto, os parâmetros $q = 1$ e 2 apontaram que os três meios de cultura não diferem entre si. Entre os municípios, Maués possuía maior riqueza ($q = 0$). Não foram observadas diferenças nos outros índices estudados ($q = 1,2$) (Figura 3c). As cultivares BRS300 e BRS871 se difeririam em apenas uma medida, onde o genótipo BRS300 expressou maior número de taxa ($q = 0$). Tais resultados, gerados pelas curvas de rarefação foram observados quando os genótipos foram analisados em conjunto, ou seja, quando os genótipos de folhas não foram separados dos genótipos de sementes (Figura 3d), entretanto, quando foram analisados separadamente, os padrões de diversidade mudaram (Figura 2c).

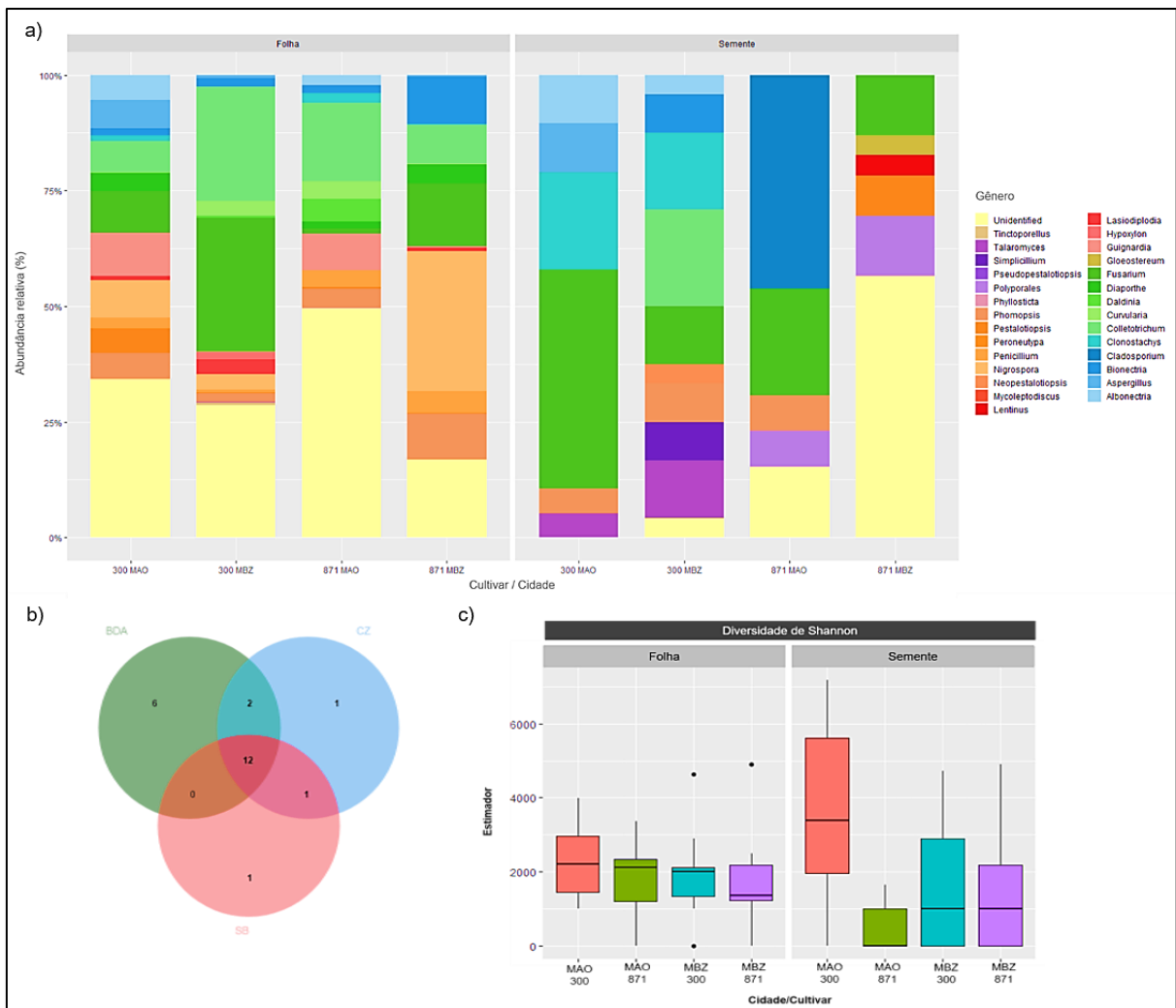


Figura 2. Composição taxonômica de folhas e sementes de guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) das cultivares suscetível (BRS300) e tolerante (BRS871) oriundas dos municípios de Manaus (MAO) e Maués (MBZ) AM - Brasil (a), Diagrama de Venn dos endófitos foliares isolados nos meios de cultura BDA, Czapek e Sabouraud (b), e Boxplot do índice de diversidade de Shannon (c).

Os dados gerados pelos índices de diversidade analisados por meio de BoxPlots apontaram que, independentemente da localidade geográfica e da origem do material vegetal coletado, o genótipo BRS300 era o mais diverso (Figura 2c).

Nas folhas os índices de diversidade estabeleceram um padrão, Shannon e Simpson apontaram MAO como mais diversa. O índice de riqueza identificou MBZ com maior número de gêneros. Nas sementes, dentro do genótipo BRS300, os índices de Shannon e riqueza apontaram MAO com maior diversidade. Porém, dentro do genótipo BRS871, a amostra MBZ demonstrou maior diversidade (Figura Suplementar 2 A e B).

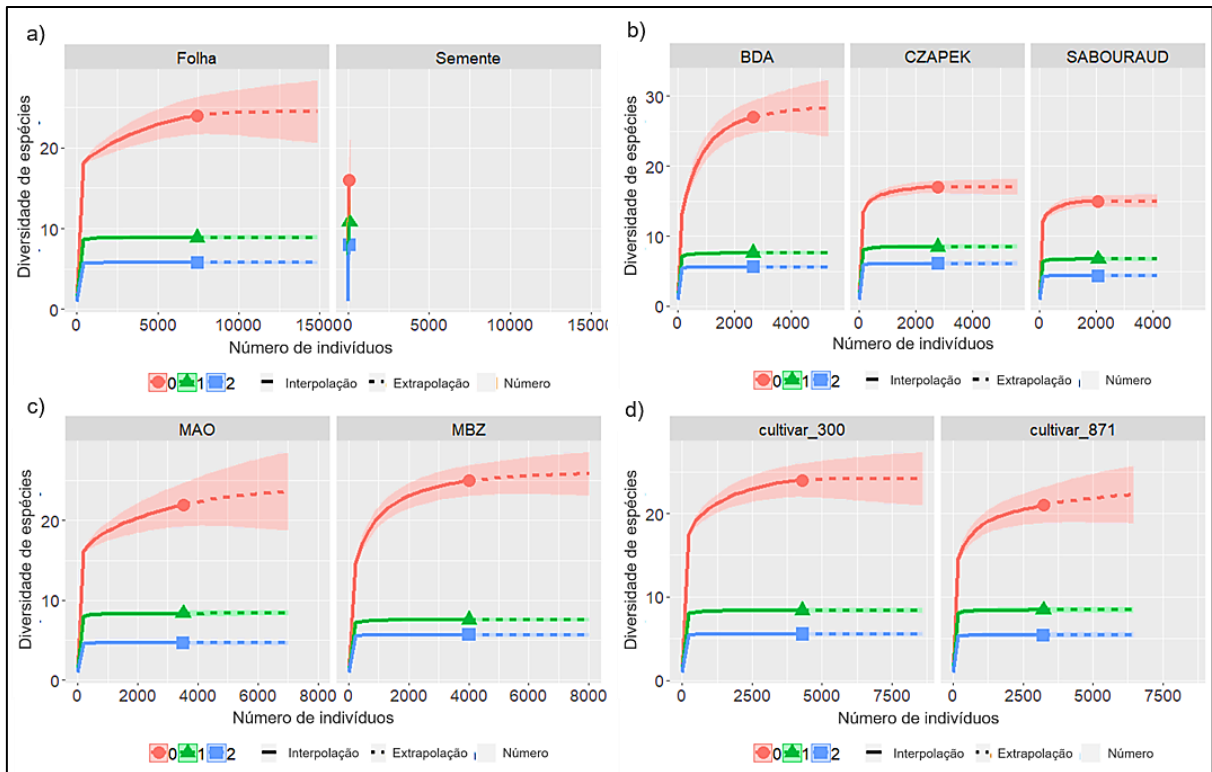


Figura 3. Curvas de rarefação e extrapolação de folhas e sementes (a), meios de cultura (b), municípios de Manaus (MAO) e Maués (MBZ) (c) e das cultivares suscetível (BRS300) e tolerante (BRS871) (d), oriundas do guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) AM - Brasil.

6. Discussão

Avaliamos a diversidade e a composição taxonômica de fungos endofíticos obtidos de folhas e sementes de guaranzeiro oriundos de duas cultivares, ambas diferindo quanto resistência/suscetibilidade a antracnose e ao superbrotamento, consideradas as principais doenças desta cultura. Comparamos as cultivares dentro de uma escala regional, que engloba as cidades de Manaus e Maués, sendo esta última considerada o centro de origem do guaranzeiro.

O isolamento nos meios de cultura utilizados, resultou na maior densidade de fungos em Czapek e a maior diversidade em meio a base de batata BDA. Diferente dos resultados encontrados por Sia et al. (2013). Os autores obtiveram melhores resultados quanto à incidência e diversidade de endófitos de guaraná em Mandioca Dextrose Ágar (MDA) quando comparados ao meio BDA. Os meios de cultura relatados em nosso estudo não diferiram nas medidas de diversidade consideradas mais confiáveis ($q \geq 1$) (CHAO et al., 2014). Entretanto, o BDA proporcionou a obtenção de 6 gêneros exclusivamente obtidos nesse meio de cultura. Além disso, esse meio é considerado

universal, rico em glicose, utilizada para o desenvolvimento da maioria dos fungos filamentosos (ALFENAS; MAFIA, 2016)

6.1. Composição taxonômica

A composição taxonômica do guaraná é composta principalmente pelo filo *Ascomycota*, que também prevalece em outras espécies vegetais (CARROLL, 1988; RAJAMANIKYAM et al., 2017). As OTUs obtidas da folhas e sementes resultaram no relato pela primeira vez de 11 gêneros em comunidades endofíticas de *P. cupana* (*Clonostachys*, *Curvularia*, *Gloeostereum*, *Hypoxylon*, *Lentinus*, *Neopestalotiopsis*, *Nigrospora*, *Peroneutypa*, *Phyllosticta*, *Simplicillium* e *Tinctoporellus*), pois tratam-se de nichos pouco explorados, onde provavelmente há ocorrência de espécies novas, ainda não relatadas na literatura. Estudos posteriores, com abordagem *multilocus* poderão comprovar essa hipótese.

A identificação dos táxons revelou a associação entre hospedeiro e gêneros com funções ecológicas benéficas. Entre os 14 gêneros com número de isolados acima de 100, encontram-se táxons utilizados para controle biológico e promoção de crescimento. Por exemplo, *Clonostachys rosea* MpA e MpB e *Bionectria* sp. 6.21 relatados por Salamone, Gundersen e Inglis, (2018) e Melo et al., (2014). Tais cepas possuem atividade antagonista contra fitopatógenos por meio de micoparasitismo e produção de metabólitos secundários que auxiliaram na rompimento e degradação da parede celular. A estirpe *Penicillium simplicissimum* GP17-2 foi relatado Hossain et al. (2007) com capacidade de induzir o sistema de defesa da planta-hospedeira pela ativação de múltiplos sinais químicos. O gênero *Nigrospora*, típico no genótipo resistente, foi relatado por Srinon et al. (2006) com a função antagonista às cepas patogênicas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* e *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. A OTU *Talaromyces*, comumente encontrada na cultivar suscetível, foi estudada por Naraghi (2012). Os autores verificaram que *T. flavus* TF-Po-V-50 promoveu desenvolvimento e aumento da biomassa das plantas de algodão e batata.

A microbiota do guaranazeiro é heterogênea, variando em distribuição e abundância dos gêneros de acordo com os genótipos e municípios. Em Maués, por exemplo, os endófitos dominantes da comunidade foliar do genótipo resistente são compostos por cinco membros, diferente do observado no mesmo genótipo, em Manaus, onde apenas dois membros são dominantes. Além disso, apenas 7% (1 OTU), e 36% (8 OTUs) dos gêneros foram obtidos de todas as amostras em sementes e folhas,

respectivamente. Tais resultados sugerem que a estruturação da microbiota fúngica de organismos cultiváveis no guaraná é direcionada tanto pela genética da planta hospedeira bem como pela localização geográfica.

O guaraná apresentou elevada dominância de *Colletotrichum* e *Fusarium*, conhecidos como organismos bem estabelecidos, com diferentes tipos de *lifestyle*. Ambos têm sido amplamente associados ao endofitismo em diferentes plantas (PRUSKY et al., 2013; CHANG et al., 2014; DE SILVA, 2017), mas também são importantes patógenos de uma ampla gama de hospedeiros, como pimenta, soja, alfafa e muitos outros (EKEN; DEMIRCI, 2000; YANG, 2012; TOZZE et al. 2009).

Vários estudos, demonstram que gêneros/espécies de fungos patogênicos ou parasitas são encontrados como endófitos. Nessa situação, os endófitos são patógenos latentes que infectam a planta, e persistem em uma fase dormente sem causar sintomas no hospedeiro (PETRINI, 1991). Os sintomas e sinais da doença aparecem rapidamente em resposta as mudanças fisiológicas da planta, seja por seu estágio de maturidade ou quando submetidas a alterações nutricionais e ambientais. O estresse abiótico ou biótico pode desencadear a atividade patogênica de endófitos quando o hospedeiro não é capaz de limitar seu crescimento (VERHOEFF, 1974; POTTHITA et al. 2004, DE SILVA et al., 2017). Sugerindo que membros endofíticos de *Colletotrichum* e *Fusarium* poderiam ser patógenos latentes no guaraná.

Nas folhas, ambos os gêneros foram observados com elevada AR em Maués, origem da dispersão do guaraná, e em BRS300, cultivar suscetível a antracnose e ao superbrotamento. Nas sementes, membros de *Fusarium* foram dominantes em todas as amostras, independente do genótipo e localidade. Por outro lado, indivíduos de *Colletotrichum* somente foram obtidos a partir de sementes de MBZ300. Sugerindo que os endófitos de *Fusarium* eventualmente sofrem transmissão vertical no guaraná. Passando sucessivamente pelas gerações e aumentando sua presença na próxima geração de mudas (SHADE; JACQUES; BARRET, 2017; SHAHZAD et al., 2018). E os endófitos de *Colletotrichum* são majormente adquiridos via transmissão horizontal. Por tanto, influenciados pelo meio ambiente e localização geográfica.

Endófitos de *Colletotrichum* e *Fusarium* estão estreitamente relacionados com os patógenos da antracnose e superbrotamento, e alguns membros podem ter passado por modificações, relacionadas a pressão ecológica sofrida com o estabelecimento de monocultivos do guaranazeiro no Amazonas e condições climáticas favoráveis, como umidade e temperatura extremamente adequadas a multiplicação de microrganismos. O

período em que todo processo de modificação endófito-patógeno ocorreu, ou seja, o produto do processo co-evolutivo, foi formada em um prazo geológico extremamente curto, como demonstrado por SOUSA, (2004). O autor sugeriu uma recente domesticação das populações de guaraná e dispersão oriunda de Maués, datada pouco mais de 600 anos atrás.

O processo de domesticação, que implicou em cultivos monoclonais de guaraná partindo de Maués e estendendo-se pela região Amazônica (MARQUES et al., 2018), possivelmente, provocou uma “disbiose”, ou seja, um desequilíbrio nas comunidades microbianas, gerando a modificação de alguns membros a uma fase patogênica, com já observada nas espécies *Colletotrichum magna* (FREEMAN; RODRIGUEZ, 1993), *Fusarium graminearum* (LOFGREN et al., 2018) e *Lasiodiplodia* sp. (SLIPPERS et al., 2013).

Tais resultados sugerem que membros de *Colletotrichum* e *Fusarium*, poderiam representar patógenos latentes. Contudo a microbiota endofítica que compõe o guaraná foi formada também por outros gêneros como *Aspergillus*, *Bionectria*, *Clonostachys*, *Nigrospora*, *Phomopsis*, *Pestalotiopsis* e *Talaromyces*, anteriormente relacionados a bioproteção de plantas. Desse modo, estudos futuros poderiam verificar como esses endófitos influenciam a planta, afim de elucidar os tipos de interações que ocorrem, positivas, negativas ou neutras, e se tais interações podem ser manipuladas em favor do aumento da produção e proteção do guaraná.

6.2. Diversidade da comunidade microbiana

A diversidade entre as localidades geográficas, variou de acordo com o material vegetal e genótipos, possivelmente relacionada a quantidade mais robusta de fungos amostrados nas folhas. Entretanto, a diversidade entre genótipos, revelou o genótipo suscetível com maiores índices, e não variou entre folhas e sementes, nem entre os municípios estudados. Sugerindo que a diversidade microbiana do guaraná é influenciada tanto pelo genótipo como pela localização geográfica.

Nossos resultados são consistentes com estudos prévios, como o estudo de CHRISTIAN et al. (2016), onde os autores demonstraram que mesmo em face de perturbações como aplicação de fungicidas e presença de pragas, os fatores mais determinantes da comunidade endofítica de *Ageratina altissima* foram a localidade e a cultivar. HOFFMAN e ARNOLD (2008) ao analisar a abundância, diversidade, composição de espécies e afinidade relativa com o hospedeiro de duas espécies arbóreas

constaram que a comunidade de endófitos diferia em função da localidade e espécie do hospedeiro. Resultados similares foram observados na microbiota endofítica de *Elymus mollis*, *Ammophila arenaria* e *Ammophila breviligulata*, diferindo da comunidade microbiana do solo, que era influenciada estritamente por fatores ambientais, e não pela cultivar ou localização (DAVID, SEABLOOM e MAY, 2015).

No presente estudo, o genótipo suscetível e, de modo geral, o município de Manaus, foram observados com maior diversidade. Resultados semelhantes foram observados em sementes e raízes de guaraná estudados por Silva et al. (2018). Os autores relacionaram a riqueza do genótipo suscetível com a vulnerabilidade do hospedeiro a infecções microbianas. Também relataram maior diversidade em Manaus, correlacionada a grande quantidade de inóculo que o plantio recebia por estar localizado próximo a uma área urbana, diferente do cenário encontrado em Maués, localizado em uma área rural.

Os genótipos abordados nesse estudo possuem algumas características semelhantes. Ambos foram originalmente selecionados de progênies situadas no município de Maués, com propagação clonal por enraizamento de estacas, produtividade média anual de sementes ($1,49 \text{ kg.planta}^{-1}$ e $1,55 \text{ kg.planta}^{-1}$) e teores de cafeína similares (3,92% e 4,04%) (DE ARRUDA et al., 2007; GARCIA; NASCIMENTO FILHO, 1999). No entanto, se distinguem quanto à adaptação a condições diversas. Curiosamente, o genótipo suscetível observado neste estudo com maior diversidade, foi relatado em outros trabalhos com melhor enraizamento de estacas (DE ARRUDA et al., 2007), menor taxa de mortalidade (ALBERTINO et al., 2012) e maior rendimento da produção (kg/planta) mesmo com o aumento da competição por nutrientes (planta/area^2) (PLÁCIDO; MOREIRA; MORAES, 2015).

Trabalhos mais recentes demonstram que a microbiota de plantas tem papel fundamental na adaptação do hospedeiro. Devido a dinâmica mudança genética dos microrganismos, que permite o ajustamento e a sobrevivência da planta providenciando o tempo necessário para a adaptação do hospedeiro a condições adversas (ROSENBERG; ZILBER-ROSENBERG, 2018). Tais estudos levantam o questionamento sobre influência da comunidade microbiana no desempenho e adaptação entre os genótipos estudados. O melhor entendimento de como a variação genética do hospedeiro afeta a comunidade microbiana associada a diferentes municípios deverá ser recompensada em futuros esforços para incorporar a biologia dentro da ecologia evolucionária e ciência da agricultura.

7. Conclusão

A microbiota do guaraná é formada por 26 gêneros de fungos endofíticos, constituída primordialmente por *Colletotrichum* e *Fusarium*. A diversidade foi maior na cultivar suscetível BRS300 e no município de Manaus. Os principais direcionadores da composição da comunidade microbiana e diversidade no guaranazeiro são o genótipo e a localização geográfica. Evidenciada pela diferença de endófitos dominantes nas unidades amostrais, presença da grande quantidade de OTUs exclusivamente encontradas em determinadas amostras, e padrões de diversidade.

8. Referências bibliográficas

AHLHOLM, J. U. et al. Environmental conditions and host genotype direct genetic diversity of *Venturia ditricha*, a fungal endophyte of birch trees. **Evolution**, v. 56, n. 8, p. 1566–1573, 1 ago. 2002.

ALBERTINO, S. M. F. et al. Enraizamento de estacas de cultivares de guaranazeiro com adubação de plantas matrizes. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 47, n. 10, p. 1449–1454, 2012.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2016.

BARDOU, P. et al. Jvonn: an interactive Venn diagram viewer. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 1, p. 293, 29 ago. 2014.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. **Illustrated genera of imperfect fungi.**, 3rd ed, 1972.

BERG, G. Beyond borders: investigating microbiome interactivity and diversity for advanced biocontrol technologies. **Microbial biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 5–7, jan. 2015.

BUSBY, P. E.; RIDOUT, M.; NEWCOMBE, G. Fungal endophytes: modifiers of plant disease. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 645–655, 8 abr. 2016.

CARMICHAEL, J. W. et al. **Genera of Hyphomycetes**. 1980.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, n. 1, p. 2–9, 1 fev. 1988.

CHAO, A. et al. Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: A framework for sampling and estimation in species diversity studies. **Ecological Monographs**, 2014.

CLIMATE-DATA.ORG. **CLIMATE-DATE**. Disponível em: <<https://pt.climate-data.org/america-do-norte/estados-unidos-da-america/missouri/amazonia-125713/>>. Acesso em: 23 fev. 2019.

CHANG, J. et al. Biology of foliar and root infection of potato plants by *Colletotrichum coccodes* in Australia. In: **PHYTOPATHOLOGY**. 3340 Pilot Knob Road, ST PAUL, MN 55121 USA: Amer Phytopathological Soc, 2014. p. 24-24.

CHRISTIAN, N. et al. Plant host and geographic location drive endophyte community composition in the face of perturbation. **Microbial ecology**, v. 72, n. 3, p. 621-632, 2016.

DAVID, A. S.; SEABLOOM, Eric W.; MAY, Georgiana. Plant host species and geographic distance affect the structure of aboveground fungal symbiont communities, and environmental filtering affects belowground communities in a coastal dune ecosystem. **Microbial ecology**, v. 71, n. 4, p. 912-926, 2016.

DE ARRUDA, M. R. et al. Enraizamento de estacas herbáceas de guaranazeiro em diferentes substratos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 236-241, 2007.

DE SILVA, D. D. et al. Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 3, p. 155-168, 2017.

EKEN, C.; DEMIRCI, E. First report of *Colletotrichum truncatum* on alfalfa in Turkey. **Plant Disease**, v. 84, n. 1, p. 100-100, 2000.

FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, R. J. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. **Science**, 1993.

GARCIA, T. .; NASCIMENTO FILHO, F. J. DO. **O cultivo do guarana no amazonas**. Manaus, Amazonas: [s.n.].

HANEY, C. H. et al. Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. **Nature Plants**, v. 1, n. 6, p. 15051, 11 maio 2015.

HARDOIM, P. R. et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 1 set. 2015.

HECKMAN, M. A.; WEIL, J.; DE MEJIA, E. G. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, p. R77-R87, 1 abr. 2010.

HOFFMAN, M. T.; ARNOLD, A. Elizabeth. Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. **Mycological research**, v. 112, n. 3, p. 331-344, 2008.

HOSSAIN, M. M. et al. The plant growth-promoting fungus *Penicillium simplicissimum* gp17-2 induces resistance in *Arabidopsis thaliana* by activation of multiple defense signals. **Plant and Cell Physiology**, v. 48, n. 12, p. 1724-1736, 17 out. 2007.

HSIEH, T. C.; MA, K. H.; CHAO, A. iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). **Methods in Ecology and Evolution**, v. 7, n. 12, p. 1451-1456, dez. 2016.

IBGE, LPSA **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. 2018.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 1, p. 242–245, jul. 2016.

LOFGREN, L. A. et al. *Fusarium graminearum*: pathogen or endophyte of North American grasses? **New Phytologist**, 2018.

MARQUES, L. L. M. et al. *Paullinia cupana*: a multipurpose plant – a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19 set. 2018.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61217, abr. 2013.

NARAGHI, Laleh et al. Biocontrol agent *Talaromyces flavus* stimulates the growth of cotton and potato. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 31, n. 4, p. 471-477, 2012.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. Boston, MA: Springer US, 2009.

PETRINI, Orlando. Fungal endophytes of tree leaves. In: **Microbial ecology of leaves**. Springer, New York, NY, 1991. p. 179-197.

PLÁCIDO, C. G.; MOREIRA, A.; MORAES, L. A. C. Spacing and plant density in the yield components, nutritional status, and soil fertility of guarana varieties grown in humid tropical Amazon. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 46, n. 12, p. 1551–1565, 4 jul. 2015.

PRUSKY, Dov et al. Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 155-176, 2013.

RAGHAVENDRA, A. K. H.; NEWCOMBE, G. The contribution of foliar endophytes to quantitative resistance to *Melampsora* rust. **New Phytologist**, v. 197, p. 909–918, 2013.

RAJAMANIKYAM, M. et al. Endophytic fungi as novel resources of natural therapeutics. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, n. 1, 2017.

ROSENBERG, E.; ZILBER-ROSENBERG, I. The hologenome concept of evolution after 10 years. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 78, dez. 2018.

SALAMONE, A. L.; GUNDERSEN, B.; INGLIS, D. A. *Clonostachys rosea*, a potential biological control agent for *Rhizoctonia solani* AG-3 causing black scurf on potato. **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n. 9, p. 895–900, 2 set. 2018.

SHADE, A.; JACQUES, M.-A.; BARRET, M. Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. **Current Opinion in Microbiology**, v. 37, p. 15–22, jun. 2017.

SHAHZAD, R. et al. What Is There in Seeds? Vertically Transmitted Endophytic Resources for Sustainable Improvement in Plant Growth. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 24, 2018.

SIA, E. et al. Endophytic fungi from the Amazonian plant *Paullinia cupana* and from *Olea europaea* isolated using cassava as an alternative starch media source. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 579, 2013.

SILVA, F. DE A. et al. Diversity of cultivable fungal endophytes in *Paullinia cupana* (Mart.) Ducke and bioactivity of their secondary metabolites. **PloS one**, v. 13, n. 4, p. e0195874, 12 abr. 2018.

SLIPPERS, Bernard et al. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriales*: a systematic and evolutionary framework. **Studies in Mycology**, v. 76, p. 31-49, 2013.

MELO, I. S. et al. Mycoparasitic nature of *Bionectria* sp. strain 6.21. **Journal of Plant Protection Research**, v. 54, n. 4, 2014.

SOUSA, A. Q. L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 3, 2004.

SRINON, W. et al. Efficacies of antagonistic fungi against *Fusarium* wilt disease of cucumber and tomato and the assay of its enzyme activity. **Journal of Agricultural Technology**, v. 2, n. 2, p. 191-201, 2006.

SUTTON, B. C. The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. **The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata**. 3rd ed 1980.

TAKASHIO, M. Single-spore and single-cell cultures of fungi. Two new methods particularly useful in the isolation of fungal spores and cells. In **Annales de microbiologie**, v. 125, n. 1, p. 45, jan, 1974.

TAMURA, Koichiro et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TOJU, H. et al. Assembly of complex plant–fungus networks. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 5273, 20 dez. 2014.

TOZZE JR, H. J. et al. First report of *Colletotrichum boninense* causing anthracnose on pepper in Brazil. **Plant Disease**, v. 93, n. 1, p. 106-106, 2009.

VANDENKOORNHUYSE, P. et al. The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**, v. 206, n. 4, p. 1196–1206, 1 jun. 2015.

VERHOEFF, K. Latent infections by fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 12, n. 1, p. 99-110, 1974.

WÄLI, P. R. et al. Susceptibility of endophyte-infected grasses to winter pathogens (snow molds). **Canadian Journal of Botany**, v. 84, n. 7, p. 1043–1051, jul. 2006.

WHITE, Thomas J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990

WICKHAM, H. et al. Ggplot2: elegant graphics for data analysis. **Journal of personality and social psychology**, v. 77, p. 1121, 2017.

YANG, J.; KLOPPER, J. W.; RYU, C.-M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 1, p. 1–4, 1 jan. 2009.

YANG, H.-C.; HAUDENSHIELD, J. S.; HARTMAN, G. L. First report of *Colletotrichum chlorophyti* causing soybean anthracnose. **Plant disease**, v. 96, n. 11, p. 1699-1699, 2012.

9. Material Suplementar

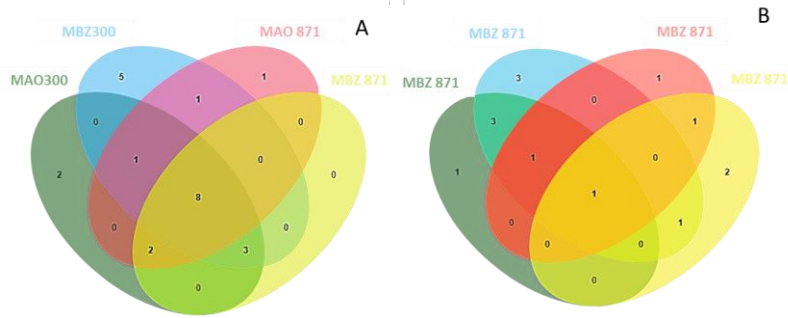


Figura suplementar 1. Quantidade de isolados endofíticos obtidos de folhas A e sementes B distribuídos nos genótipos suscetível BRS300 e resistente BRS871, oriundos dos municípios Manaus (Mao) e Maués (MBZ) Amazonas- Brasil.

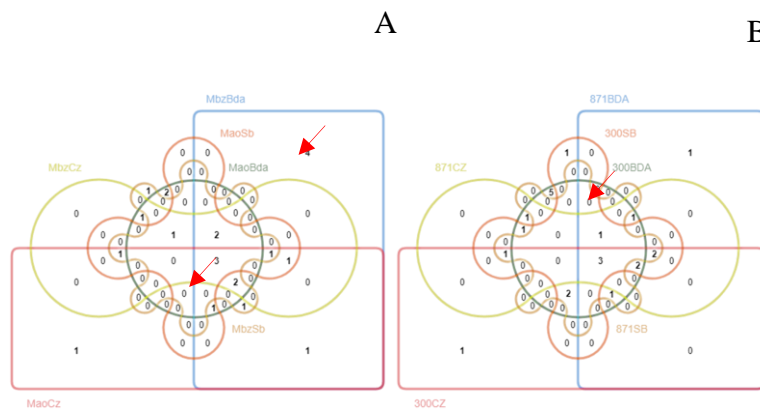


Figura suplementar 2. Quantidade de isolados endofíticos de folhas de guaraná *Paullinia cupana* var. *sorbilis* em diferentes meios de culturas distribuídos nos genótipos suscetível BRS300 e resistente BRS871, nos municípios Manaus (Mao) e Maués (MBZ).

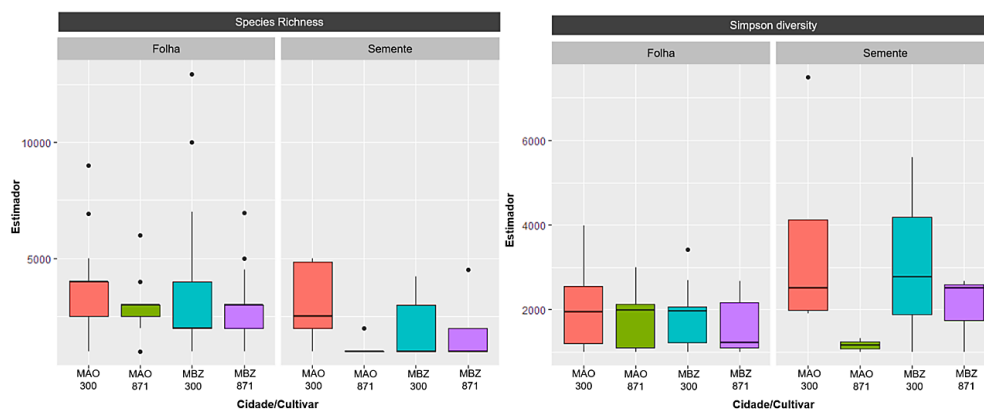


Figura suplementar 3. Índices de riqueza e Simpson demonstrando a diversidade em folhas e sementes dos genótipos BRS 300 e BRS871 oriundos dos municípios Manaus e Maués.

Tabela suplementar 1. Identificação de fungos endofíticos de guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) coletados de folhas e sementes originados dos genótipos suscetível BRS300 e resistente BRS871 a antracnose, localizados nos municípios de Manaus e Maués – Amazonas/ Brasil.

Código CCCT	Material Vegetal	Município	Cultivar	Gênero	Código CCCT	Material Vegetal	Município	Cultivar	Gênero
CCCT 17.09	Folha	Manaus	BRS300	<i>Albonectria</i> sp.	CCCT 17.68	Folha	Manaus	BRS300	<i>Fusarium</i> sp.
CCCT 17.25	Folha	Manaus	BRS300	<i>Albonectria</i> sp.	CCCT 17.117	Semente	Maués	BRS300	<i>Fusarium</i> sp.
CCCT 17.26	Folha	Manaus	BRS300	<i>Albonectria</i> sp.	CCCT 17.32	Folha	Maués	BRS871	<i>Fusarium</i> sp.
CCCT 17.38	Folha	Manaus	BRS300	<i>Albonectria</i> sp.	CCCT 17.34	Folha	Maués	BRS871	<i>Fusarium</i> sp.
CCCT 17.84	Folha	Manaus	BRS300	<i>Albonectria</i> sp.	CCCT 17.48	Folha	Maués	BRS871	<i>Fusarium</i> sp.
CCCT 17.126	Semente	Manaus	BRS300	<i>Albonectria</i> sp.	CCCT 17.47	Folha	Maués	BRS871	<i>Fusarium</i> sp.
CCCT 17.130	Semente	Manaus	BRS300	<i>Albonectria</i> sp.	CCCT 17.78	Folha	Maués	BRS871	<i>Fusarium</i> sp.
CCCT 17.125	Semente	Maués	BRS300	<i>Albonectria</i> sp.	CCCT 17.85	Folha	Manaus	BRS871	<i>Fusarium</i> sp.
CCCT 17.97	Folha	Maués	BRS300	<i>Aspergillus</i> sp.	CCCT 17.86	Folha	Maués	BRS871	<i>Fusarium</i> sp.
CCCT 17.139	Semente	Manaus	BRS300	<i>Aspergillus</i> sp.	CCCT 17.123	Semente	Manaus	BRS300	<i>Fusarium</i> sp.
CCCT 17.87	Folha	Maués	BRS300	<i>Aspergillus</i> sp.	CCCT 17.108	Semente	Maués	BRS871	<i>Gloeostereum</i> sp.
CCCT 17.55	Folha	Maués	BRS871	<i>Aspergillus</i> sp.	CCCT 17.30	Folha	Maués	BRS300	<i>Hypoxylon</i> sp.
CCCT 17.70	Folha	Maués	BRS871	<i>Aspergillus</i> sp.	CCCT 17.33	Folha	Maués	BRS871	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
CCCT 17.95	Folha	Maués	BRS300	<i>Aspergillus</i> sp.	CCCT 17.91	Folha	Maués	BRS300	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
CCCT 17.50	Folha	Manaus	BRS300	<i>Aspergillus</i> sp.	CCCT 17.93	Folha	Maués	BRS871	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
CCCT 17.61	Folha	Maués	BRS871	<i>Bionectria</i> sp.	CCCT 17.74	Folha	Manaus	BRS300	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
CCCT 17.71	Folha	Manaus	BRS300	<i>Bionectria</i> sp.	CCCT 17.106	Semente	Maués	BRS871	<i>Lentinus</i> sp.
CCCT 17.98	Folha	Maués	BRS871	<i>Bionectria</i> sp.	CCCT 17.24	Folha	Manaus	BRS300	<i>Mycoleptodiscus</i> sp.
CCCT 17.52	Folha	Manaus	BRS871	<i>Bionectria</i> sp.	CCCT 17.99	Folha	Maués	BRS300	<i>Neopestalotiopsis</i> sp.
CCCT 17.60	Folha	Maués	BRS871	<i>Bionectria</i> sp.	CCCT 17.17	Folha	Manaus	BRS871	NI
CCCT 17.102	Semente	Maués	BRS300	<i>Bionectria</i> sp.	CCCT 17.92	Folha	Manaus	BRS300	NI
CCCT 17.60	Folha	Maués	BRS871	<i>Bionectria</i> sp.	CCCT 17.64	Folha	Manaus	BRS300	<i>Nigrospora</i> sp.
CCCT 17.102	Semente	Maués	BRS300	<i>Bionectria</i> sp.	CCCT 17.65	Folha	Maués	BRS871	<i>Nigrospora</i> sp.
CCCT 17.35	Folha	Manaus	BRS300	<i>Bionectria</i> sp.	CCCT 17.16	Folha	Manaus	BRS300	<i>Nigrospora</i> sp.

Continuação

CCCT 17.133	Semente	Manaus	BRS871	<i>Cladosporium</i> sp.	CCCT 17.57	Folha	Manaus	BRS300	<i>Nigrospora</i> sp.
CCCT 17.20	Folha	Maués	BRS871	<i>Clonostachys</i> sp.	CCCT 17.62	Folha	Maués	BRS871	<i>Nigrospora</i> sp.
CCCT 17.45	Folha	Manaus	BRS300	<i>Clonostachys</i> sp.	CCCT 17.90	Folha	Maués	BRS300	<i>Nigrospora</i> sp.
CCCT 17.127	Semente	Maués	BRS300	<i>Clonostachys</i> sp.	CCCT 17.08	Folha	Manaus	BRS300	<i>Nigrospora</i> sp.
CCCT 17.132	Semente	Manaus	BRS300	<i>Clonostachys</i> sp.	CCCT 17.44	Folha	Manaus	BRS300	<i>Nigrospora</i> sp.
CCCT 17.135	Semente	Manaus	BRS300	<i>Clonostachys</i> sp.	CCCT 17.63	Folha	Maués	BRS871	<i>Nigrospora</i> sp.
CCCT 17.137	Semente	Manaus	BRS300	<i>Clonostachys</i> sp.	CCCT 17.06	Folha	Maués	BRS871	<i>Penicillium</i> sp.
CCCT 17.138	Semente	Maués	BRS300	<i>Clonostachys</i> sp.	CCCT 17.28	Folha	Maués	BRS300	<i>Penicillium</i> sp.
CCCT 17.31	Folha	Maués	BRS300	<i>Colletotrichum</i> sp.	CCCT 17.59	Folha	Maués	BRS871	<i>Penicillium</i> sp.
CCCT 17.80	Folha	Maués	BRS300	<i>Colletotrichum</i> sp.	CCCT 17.69	Folha	Manaus	BRS300	<i>Penicillium</i> sp.
CCCT 17.81	Folha	Manaus	BRS871	<i>Colletotrichum</i> sp.	CCCT 17.88	Folha	Manaus	BRS300	<i>Penicillium</i> sp.
CCCT 17.79	Folha	Maués	BRS300	<i>Colletotrichum</i> sp.	CCCT 17.89	Folha	Maués	BRS300	<i>Penicillium</i> sp.
CCCT 17.83	Folha	Manaus	BRS300	<i>Colletotrichum</i> sp.	CCCT 17.96	Folha	Manaus	BRS871	<i>Penicillium</i> sp.
CCCT 17.121	Semente	Maués	BRS300	<i>Colletotrichum</i> sp.	CCCT 17.18	Folha	Maués	BRS871	<i>Penicillium</i> sp.
CCCT 17.122	Semente	Maués	BRS300	<i>Colletotrichum</i> sp.	CCCT 17.82	Folha	Manaus	BRS300	<i>Peroneutypa</i> sp.
CCCT 17.23	Folha	Maués	BRS871	<i>Curvularia</i> sp.	CCCT 17.07	Folha	Manaus	BRS871	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
CCCT 17.73	Folha	Manaus	BRS871	<i>Curvularia</i> sp.	CCCT 17.14	Folha	Manaus	BRS300	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
CCCT 17.11	Folha	Maués	BRS300	<i>Curvularia</i> sp.	CCCT 17.54	Folha	Maués	BRS871	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
CCCT 17.12	Folha	Maués	BRS300	<i>Curvularia</i> sp.	CCCT 17.103	Semente	Maués	BRS300	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
CCCT 17.77	Folha	Manaus	BRS871	<i>Curvularia</i> sp.	CCCT 17.107	Semente	Maués	BRS871	<i>Pestalotiopsis</i> sp.
CCCT 17.15	Folha	Maués	BRS300	<i>Daldinia</i> sp.	CCCT 17.37	Folha	Manaus	BRS300	<i>Phomopsis</i> sp.
CCCT 17.51	Folha	Maués	BRS300	<i>Daldinia</i> sp.	CCCT 17.40	Folha	Manaus	BRS300	<i>Phomopsis</i> sp.
CCCT 17.72	Folha	Manaus	BRS871	<i>Daldinia</i> sp.	CCCT 17.41	Folha	Maués	BRS300	<i>Phomopsis</i> sp.
CCCT 17.194	Folha	Manaus	BRS871	<i>Diaporthe</i> sp.	CCCT 17.46	Folha	Maués	BRS871	<i>Phomopsis</i> sp.
CCCT 17.36	Folha	Manaus	BRS300	<i>Diaporthe</i> sp.	CCCT 17.49	Folha	Manaus	BRS300	<i>Phomopsis</i> sp.
CCCT 17.21	Folha	Manaus	BRS871	<i>Diaporthe</i> sp.	CCCT 17.67	Folha	Manaus	BRS871	<i>Phomopsis</i> sp.
CCCT 17.39	Folha	Manaus	BRS300	<i>Diaporthe</i> sp.	CCCT 17.94	Folha	Maués	BRS300	<i>Phomopsis/ Diaporthe</i>
CCCT 17.56	Folha	Maués	BRS871	<i>Diaporthe</i> sp.	CCCT 17.75	Folha	Manaus	BRS300	<i>Phomopsis/ Diaporthe</i>

Continuação

CCCT 17.58	Folha	Maués	BRS871	<i>Diaporthe</i> sp.	CCCT 17.124	Semente	Maués	BRS300	<i>Phomopsis/ Diaporthe</i>
CCCT 17.19	Folha	Maués	BRS300	<i>Fusarium</i> sp.	CCCT 17.129	Semente	Maués	BRS300	<i>Phomopsis/ Diaporthe</i>
CCCT 17.29	Folha	Maués	BRS300	<i>Fusarium</i> sp.	CCCT 17.131	Semente	Manaus	BRS300	<i>Phomopsis/ Diaporthe</i>
CCCT 17.42	Folha	Maués	BRS300	<i>Fusarium</i> sp.	CCCT 17.134	Semente	Manaus	BRS871	<i>Phomopsis/ Diaporthe</i>
CCCT 17.43	Folha	Maués	BRS300	<i>Fusarium</i> sp.	CCCT 17.27	Folha	Manaus	BRS871	<i>Phyllosticta/ Guignardia</i>
CCCT 17.53	Folha	Maués	BRS871	<i>Fusarium</i> sp.	CCCT 17.104	Semente	Maués	BRS871	<i>Polyporales*</i>
CCCT 17.66	Folha	Manaus	BRS300	<i>Fusarium</i> sp.	CCCT 17.105	Semente	Maués	BRS871	<i>Polyporales*</i>
CCCT 17.76	Folha	Maués	BRS871	<i>Fusarium</i> sp.	CCCT 17.110	Semente	Manaus	BRS871	<i>Polyporales*</i>
CCCT 17.109	Semente	Manaus	BRS871	<i>Fusarium</i> sp.	CCCT 17.100	Folha	Maués	BRS300	<i>Pseudopestalotiopsis</i> sp.
CCCT 17.111	Semente	Manaus	BRS300	<i>Fusarium</i> sp.	CCCT 17.101	Semente	Maués	BRS300	<i>Simplicillium</i> sp.
CCCT 17.112	Semente	Manaus	BRS300	<i>Fusarium</i> sp.	CCCT 17.118	Semente	Maués	BRS300	<i>Simplicillium</i> sp.
CCCT 17.113	Semente	Manaus	BRS300	<i>Fusarium</i> sp.	CCCT 17.22	Folha	Maués	BRS300	<i>Talaromyces</i> sp.
CCCT 17.114	Semente	Manaus	BRS300	<i>Fusarium</i> sp.	CCCT 17.140	Semente	Maués	BRS300	<i>Talaromyces</i> sp.
CCCT 17.116	Semente	Maués	BRS300	<i>Fusarium</i> sp.	CCCT 17.141	Semente	Maués	BRS300	<i>Talaromyces</i> sp.
CCCT 17.120	Semente	Maués	BRS871	<i>Fusarium</i> sp.	CCCT 17.142	Semente	Manaus	BRS300	<i>Talaromyces</i> sp.
CCCT 17.13	Folha	Maués	BRS300	<i>Fusarium</i> sp.	CCCT 17.10	Folha	Maués	BRS300	<i>Tinctoporellus</i> sp.

NI – Não identificado, * Identificado ao nível de Ordem

Tabela suplementar 2. Distribuição e quantificação da composição taxonômica de fungos endofíticos de guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) coletados de folhas e sementes originados dos genótipos suscetível BRS300 e resistente BRS871 a antracnose, localizados nos municípios de Manaus e Maués.

Genótipos	Municípios						Total Geral
	Manaus			Mausés			
	BRS 300	BRS 871	Total	BRS 300	BRS 871	Total	
FOLHA	1533	1947	3480	2721	1240	3961	7441
<i>Ascomycota</i>	1009	982	1991	1926	1032	2958	4949
<i>Amphisphaeriales</i>	81	7	88	7	1	8	96
<i>Pestalotiopsidaceae</i>	81	7	88	7	1	8	96
<i>Neopestalotiopsis</i>				2		2	2
<i>Pestalotiopsis</i>	81	7	88	3	1	4	92
<i>Pseudopestalotiopsis</i>				2		2	2
<i>Botryosphaeriales</i>	155	159	314	90	13	103	417
<i>Botryosphaeriaceae</i>	155	159	314	90	13	103	417
<i>Guignardia</i>	141	157	298	4	4	8	306
<i>Lasiodiplodia</i>	14		14	86	9	95	109
<i>Phyllosticta</i>		2	2				2
<i>Diaporthales</i>	147	109	256	52	175	227	483
<i>Diaporthaceae</i>	147	109	256	52	175	227	483
<i>Diaporthe</i>	60	29	89		51	51	140
<i>Phomopsis</i>	87	80	167	52	124	176	343
<i>Eurotiales</i>	129	69	198	30	63	93	291
<i>Trichocomaceae</i>	129	69	198	30	63	93	291
<i>Aspergillus</i>	94		94	15	4	19	113
<i>Penicillium</i>	35	69	104	14	59	73	177
<i>Talaromyces</i>				1		1	1
<i>Glomerellales</i>	103	332	435	673	105	778	1213
<i>Glomerellaceae</i>	103	332	435	673	105	778	1213
<i>Colletotrichum</i>	103	332	435	673	105	778	1213
<i>Hypocreales</i>	264	138	402	841	297	1138	1540
<i>Bionectriaceae</i>	41	75	116	51	129	180	296

Continuação

<i>Bionectria</i>	22	34	56	51	127	178	234
<i>Clonostachys</i>	19	41	60		2	2	62
<i>Nectriaceae</i>	223	63	286	790	168	958	1244
<i>Albonectria</i>	83	42	125	4		4	129
<i>Fusarium</i>	140	21	161	786	168	954	1115
<i>Magnaporthales</i>	1		1				1
<i>Magnaporthaceae</i>	1		1				1
<i>Mycoleptodiscus</i>	1		1				1
<i>Pleosporales</i>	3	73	76	85	2	87	163
<i>Pleosporaceae</i>	3	73	76	85	2	87	163
<i>Curvularia</i>	3	73	76	85	2	87	163
<i>Xylariales</i>	126	95	221	148	376	524	745
<i>Apiosporaceae</i>	124		124	92	376	468	592
<i>Nigrospora</i>	124		124	92	376	468	592
<i>Diatrypaceae</i>	2		2				2
<i>Peroneutypa</i>	2		2				2
<i>Hypoxylaceae</i>		95	95	56		56	151
<i>Daldinia</i>		95	95	12		12	107
<i>Hypoxylon</i>				44		44	44
<i>Basidiomycota</i>				17		17	17
<i>Polyporales</i>				17		17	17
<i>Polyporaceae</i>				17		17	17
<i>Tinctoporellus</i>				17		17	17
Não Identificado	524	965	1489	778	208	986	2475
SEMENTE	19	11	30	23	20	43	73
<i>Ascomycota</i>	19	10	29	23	4	27	56
<i>Amphisphaeriales</i>				1	1	2	2
<i>Pestalotiopsidaceae</i>				1	1	2	2
<i>Pestalotiopsis</i>				1	1	2	2
<i>Capnodiales</i>		6	6				6
<i>Cladosporiaceae</i>		6	6				6

Continuação

<i>Cladosporium</i>		6	6			6	
<i>Diaporthales</i>	1	1	2	2		2	4
Diaporthaceae	1	1	2	2		2	4
<i>Phomopsis</i>	1	1	2	2		2	4
<i>Eurotiales</i>	3		3	3		3	6
Trichocomaceae	3		3	3		3	6
<i>Aspergillus</i>	2		2				2
<i>Talaromyces</i>	1		1	3		3	4
<i>Glomerellales</i>				5		5	5
Glomerellaceae				5		5	5
<i>Colletotrichum</i>				5		5	5
<i>Hypocreales</i>	15	3	18	12	3	15	33
Bionectriaceae	4		4	6		6	10
<i>Bionectria</i>				2		2	2
<i>Clonostachys</i>	4		4	4		4	8
Cordycipitaceae				2		2	2
<i>Simplicillium</i>				2		2	2
Nectriaceae	11	3	14	4	3	7	21
<i>Albonectria</i>	2		2	1		1	3
<i>Fusarium</i>	9	3	12	3	3	6	18
Basidiomycota		1	1		5	5	6
<i>Agaricales</i>					1	1	1
Cyphellaceae					1	1	1
<i>Gloeostereum</i>					1	1	1
<i>Polyporales</i>		1	1		4	4	5
Polyporaceae					1	1	1
<i>Lentinus</i>					1	1	1
Não Identificado		1	1		3	3	4
<i>Polyporales</i>		1	1		3	3	4
Não Identificado					11	11	11
Total Geral	1552	1958	3510	2744	1260	4004	7514

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
PROGRAMA POSTGRADO EM CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

Capítulo 2

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO GUARANÁ
(*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) DA AMAZÔNIA

MANAUS
2019

Resumo

Fungos endofíticos são prolíferos produtores de bioativos e representam uma fonte para descoberta de novas substâncias, empregadas para diferentes fins industriais, nos setores alimentício, têxtil, medicinal, etc. Além disso, a secreção de compostos secundários tem sido exitosamente utilizada na inibição de bactérias e fungos fitopatogênicos, quando aplicados empregadas por organismos considerados agentes de controle biológico. Desse modo, este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de endófitos obtidos do guaraná (*Paullinia cupana var sorbilis*) quanto a produção de antraquinonas e enzimas, e determinar a capacidade antagonista contra o patógeno *Colletotrichum guaranicola*. Os fungos foram identificados por meio de análises macro- e micromorfológica, dados moleculares e MALDI-TOF. As atividades biológicas foram testadas com substratos específicos para avaliação de enzimas e antraquinonas. O método de cultura pareada foi adotado para inspeção da capacidade antagonista dos isolados endofíticos. A identificação polifásica resultou na nomeação a nível de espécie de 108 isolados, distribuídos em 26 gêneros e 35 espécies. As antraquinonas foram produzidas por várias espécies, como *Albonectria rigidiuscula*, *Clonostachys rosea*, *Colletotrichum gigasporium*, *Fusarium solani*, *Nigrospora oryzae*, *Penicillium citrinum*, *Pestalotiopsis microspora* e *Simplicillium lanosoniveum*. Todas as espécies fúngicas abordadas nesse estudo foram capazes de produzir pelo uma das enzimas testadas, com ênfase especial a *Fusarium concolor*, *Simplicillium lanosoniveum* e *Phomopsis phaseoli*, melhores produtores de celulase, protease e amilase, respectivamente. O antagonismo por meio de antibiose foi observado principalmente por endófitos obtidos de folhas, maiormente oriundos do genótipo suscetível à antracnose BRS300. De 138 endófitos testados, 14 isolados fúngicos, foram capazes de causar depleção do patógeno, especialmente membros de *P. citrinum* e *F. concolor* demonstraram habilidade de inibir o patógeno *in vitro*. Os resultados desse estudo são a base para o início de novas pesquisas a partir dos diferentes compostos encontrados nos microrganismos do guaraná, prolíferos produtores de bioativos, representando uma nova fonte de substâncias para uso futuro nas áreas medicinal, agrônômica e industrial.

Palavras-chave: antraquinonas, enzimas, antagonismo.

Abstract

Endophytic fungi are prolific bioactive producers and represent a source for the discovery of new substances, used for different industrial purposes, in the food, textile and medical sectors. In addition, the secretion of secondary compounds are successfully used in the inhibition of phytopathogenic bacteria and fungi when applied by organisms considered as biological control agents. The objective of this work was to evaluate the capacity of endophytes obtained from guaraná (*Paullinia cupana* var *sorbilis*) for the production of anthraquinones and enzymes, and to determine the antagonistic capacity against the pathogen *Colletotrichum guaranicola*. The fungi were identified by means of macro- and micromorphological analyzes, molecular data and MALDI-TOF. The biological activities were tested with specific substrates to evaluate enzymes and anthraquinones. The paired culture method was adopted to inspect the antagonistic capacity of the endophytic isolates. The polyphase identification resulted in the species-level naming of 108 isolates, distributed in 26 genera and 35 species. Anthraquinones were produced by several species, such as *Albonectria rigidiuscula*, *Clonostachs rosea*, *Colletotrichum gigasporium*, *Fusarium solani*, *Nigrospora oryzae*, *Penicillium citrinum*, *Pestalotiopsis microspora* and *Simplicillium lanosoniveum*. All the fungi species studied in this study were able to produce by one of the enzymes tested, with special emphasis on *Fusarium concolor*, *Simplicillium lanosoniveum* and *Phomopsis phaseoli*, the best producers of cellulase, protease and amylase, respectively. Antibiotic antagonism was observed mainly by endophytes obtained from leaves, mostly from the BRS300 anthracnose susceptible genotype. Of 138 endophytes tested, 14 fungal isolates were able to cause depletion of the pathogen, especially members of *P. citrinum* and *F. concolor* demonstrated an ability to inhibit the pathogen *in vitro*. The results of this study are the basis for the beginning of new research from the different compounds found in guarana microorganisms, prolific bioactive producers, representing a new source for future use in the medicinal, agronomic and industrial areas.

Keywords: anthraquinones, enzymes, antagonism.

10. Introdução

Os fungos endofíticos são capazes de sobreviver em vários habitats, adaptando-se a diferentes mudanças ambientais. Sua estratégia ecológica está relacionada a secreção de metabólitos secundários, que pode aumentar a resistência da planta hospedeira contra adversidades (MUSZEWSKA et al., 2017). Esses compostos, são estruturas únicas, inseridas em múltiplos grupos químicos, como quinonas, alcaloides, enzimas, terpenoides, flavonoides e esteroides (CARD et al., 2016).

Quinonas são constituídas por um amplo conjunto de dicetonas cíclicas, onde estão inseridas as antraquinonas, o maior grupo de compostos naturais quinólicos encontrados em líquens, plantas e fungos. As antraquinonas fúngicas conferem pigmentação amarela, laranja e marrom aos micélios e basidiomas. São aplicadas em microeletrônicos como condutores e na indústria têxtil, para pigmentação de fibras naturais e sintéticas (GESSLER; EGOROVA; BELOZERSKAYA, 2013).

Dentro do grupo das antraquinonas, destacam-se as aflatoxinas (AFs), devido aos efeitos deletérios causados a seres humanos e animais (BLOUNT, 1961, SEYEDMOUSAVI et al., 2015) e as esterigmatocistinas (ST), por serem importantes micotoxinas com atividade imunotóxica e imunomoduladora (VIEGAS et al., 2018). Ambas são comumente associadas as espécies de *Aspergillus*, e ameaçam a segurança alimentar global devido a contaminação de inúmeros alimentos (ALSHANNAQ; YU, 2017).

Entretanto, as antraquinonas fúngicas não exibem somente efeitos deletérios, mas também possuem propriedades antimicrobianas, inseticidas, nematicidas, citotóxicas e antivirais. Membros dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Phomopsis*, por exemplo, são excelentes produtores desse composto, capazes de exercer o biocontrole de bactérias e fungos patogênicos (FATEMA et al., 2018; GESSLER; EGOROVA; BELOZERSKAYA, 2013).

O uso de microrganismos como agentes de controle biológico (BCA) testados em laboratório, frequentemente perdem sua capacidade de limitar a doença quando em condições de campo, sobretudo devido a influência dos fatores ambientais (CARD et al., 2016). Avanços nesse âmbito, demonstraram que o genoma do hospedeiro interage com o BCA, onde a planta juntamente com sua microbiota associada, agem como uma unidade de seleção em evolução (ROSENBERG; ZILBER-ROSENBERG, 2018). Desse modo, a

utilização de endófitos adaptados ao hospedeiro, pode minimizar algumas das restrições enfrentadas pelos BCAs tradicionais (CARD et al., 2016; LATZ et al., 2018).

As estratégias de microrganismos antagonísticos incluem antibiose, competição, indução de resistência e micoparasitismo. Fungos endofíticos tem a antibiose, secreção de bioativos, como estratégia antagonística mais bem-sucedida, pois estão inseridos no interior dos tecidos do hospedeiro sem nenhum ou pouco contato com o patógeno (CARD et al., 2016). Antagonizando indiretamente, por meio da sinalização química e ativação de defesas da planta, ou diretamente, por meio da secreção de compostos de baixo peso molecular que podem agir diretamente contra o invasor ou ser translucados pela planta até o sítio de infecção, atingindo herbívoros, bactérias ou fungos (LATZ et al., 2018).

O êxito no uso de endófitos está associado a ampla capacidade desses organismos em produzir compostos antimicrobianos, como enzimas hidrolíticas (MOUSA; RAIZADA, 2016; MOUSA; SCHWAN; RAIZADA, 2016), que permitem a degradação de macromoléculas, utilizadas para seu desenvolvimento. Como amilases e celulasas, utilizadas para conversão de nutrientes em fontes de energia para esporulação e lise de polissacarídeos presentes na parede celular vegetal afim de facilitar sua entrada na planta (GOPINATH et al., 2017; MUSZEWSKA et al., 2017).

As enzimas microbianas são altamente requisitadas pelas indústrias alimentícias, farmacêuticas, medicinais, cosméticas e têxtil. A produção de enzimas por microrganismos é favorecida, devido a facilidade da manipulação de expressão enzimática em micróbios recombinantes, estabilidade a condições extremas, baixo custo de produção em curto período de tempo, e isolamento de grande quantidade do composto (GOPINATH et al., 2017; MUSZEWSKA et al., 2017).

Os fungos endofíticos têm sido amplamente reportados na literatura como prolíferos produtores de metabólitos secundários, largamente empregados no controle biológico e setor biotecnológico para diferentes fins industriais (MOUSA; RAIZADA, 2016; MOUSA; SCHWAN; RAIZADA, 2016; GOPINATH et al., 2017; FATEMA et al., 2018). Desse modo, este trabalho teve como objetivo avaliar se endófitos do guaranzeiro produzem antraquinonas e enzimas, e antagonizam *Colletotrichum guaranicola*.

11. Material e Métodos

Nesse estudo, utilizou-se 134 fungos, obtidos de folhas e sementes saudáveis coletadas a partir dos genótipos suscetível (BRS300) e tolerante (BRS871) a antracnose e ao superbrotamento, oriundas dos campos experimentais da Embrapa Amazônia

Ocidental localizada nos municípios de Manaus (MAO) e Maués (MBZ), no estado do Amazonas – Brasil. Os métodos de isolamento, caracterização morfológica preliminar e identificação molecular da região ITS foram descritos anteriormente no capítulo 1.

11.1. Caracterização morfológica

A análise macro- e micromorfológica dos endófitos foi realizada em meios específicos previamente descritos na literatura para cada gênero. A morfologia de *Aspergillus* foi observada em meio Malte Extrato Ágar (MEA) à 25 °C/ 7 dias e Czapek Ágar Autolisado de Levedura (CYA) à 25 °C e à 37 °C, ambos avaliados após 7 dias (DA SILVA et al., 2015). A macro e micromorfologia de *Talaromyces* foi determinada em CYA e MEA, respectivamente, ambos à 25 °C/ 7 dias no escuro (YILMAZ et al., 2012). Os gêneros *Fusarium* e *Clonostachys* foram caracterizados de acordo com Leslie e Summerell (2007) e Moreira et al. (2016). A macro e micromorfologia de ambos os gêneros foram avaliadas em meio de cultura BDA e Spezieller Nährstoffarmer Ágar (SNA) à 25°C/ 7 dias e à 25 °C por 7-20 dias no escuro, respectivamente.

Todos os outros gêneros foram cultivados em meio BDA à 25 °C sem fotoperíodo. A macromorfologia foi determinada após 7 dias, pela coloração (MUNSELL COLOR, 1975) e diâmetro da colônia. A frente e o reverso das colônias foram fotodocumentadas com câmera Nikon Coolpix P510. A micromorfologia, após 15 a 30 dias, foi observada, mensurada e fotografada usando a câmera Axiocam ERc5s (Carl Zeiss Microscopy) acoplada ao microscópio óptico de luz (Primo Star, Carl Zeiss) e processadas pelo Zen Imaging Software versão Zen 2012 (blue edition) Service Pack 1.

11.2. Biologia molecular

A extração, amplificação da região ITS, purificação da PCR e sequenciamento foram descritas no capítulo anterior. As regiões gênicas amplificadas foram β -tubulina BT2 Fw (5'-AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT-3'), BT2 (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3') (GLASS; DONALDSON, 1995), calmodulina CAL-228F (GAG TTC AAG GAG GCC TTC TCC C-3'), CAL-737R (5'-CAT CTT TCT GGC CAT CAT GG-3'), região D1/D2 NL-1 m (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3'), NL-4 m (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG-3') (O'DONNELL, 1993) e fator de

elongação 1- α EF1-728F (5'-CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG-3') e EF1-986R (5'-TAC TTG AAG GAA CCT TAC C-3') (CARBONE; KOHN, 1999).

11.3. Espectrometria de massa por MALDI-TOF

Os perfis proteicos em MALDI-TOF foram analisados na Unidade de Proteômica do Scientific and Technological Bioresource Nucleus BIOREN-UFRO, da Universidade de La Frontera (UFRO), localizada no Chile (Temuco) de acordo com Silva et al. (2015).

11.4. Antraquinonas

Os endófitos foram inoculados em meio sólido Yeast Extract Sucrose YES (20g de extrato de levedura (Difco), 200g sucrose, 20g ágar e 1000ml de água) e incubados a 25 °C/ 7dias sem fotoperíodo. A avaliação foi realizada por vapor de amônia, para isso as placas foram colocadas de cabeça para baixo e uma gota (0.2 ml) de solução de amônia a 25% foi colocada na tampa da placa de Petri. A produção de micotoxina foi confirmada quando a coloração do reverso mudou para rosa ou marrom (SAITO; MACHIDA, 1999).

11.5. Enzimas hidrolíticas

A análise semi-quantitativa das enzimas extracelulares foi avaliada em triplicatas de endófitos crescidos em placas de Petri contendo meio de cultura com substratos específicos para cada enzima acrescidos de 250 mg de Clorafenicol[®]/L e incubados à 25 °C em BOD sem fotoperíodo. O inóculo fúngico consistiu de um disco de aproximadamente 5 mm Ø removido da borda da colônia, previamente cultivada em BDA/ 7 dias. A cada 24 horas de crescimento o diâmetro do halo de hidrólise foi mensurado (mm) com paquímetro digital para os testes de protease (VALENTE; SANTOS; LIMA, 2002) e lipase (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975). Nos testes de amilase, pectinase (VALENTE; SANTOS; LIMA, 2002) e celulase (KASANA et al., 2008), a medição foi realizada ao final de 3-7 dias de incubação. A atividade hidrolítica foi estimada pela fórmula estabelecida por Stamford; Araújo; Stamford, (1998), onde: Índice enzimático (IE) = Diâmetro do halo de hidrólise/Diâmetro da colônia.

11.6. Antagonismo

O antagonismo foi avaliado pelo método de cultura pareada entre endófitos e o fitopatógeno *Colletotrichum guaranicola* (I02) obtido de folhas de guaraná com sintomas

típicos de antracnose. O ensaio de antagonismo consistiu no pareamento entre patógeno e endófito, dispostos em pólos equidistantes da placa de Petri com BDA. Os fungos pareados permaneceram a 25 °C durante 14 dias. O teste foi realizado em triplicata. O controle consistiu do plaqueamento somente do patógeno. A inibição do crescimento micelial (ICM) foi calculada pela fórmula $[(R_c - R_i) / R_c] \times 100$, onde R_i é o crescimento do patógeno pareado com o endófito e R_c é o crescimento do patógeno sem a presença do endófito (LAHLALI; HIJRI, 2010).

11.7. Análise de dados

Os eletroferogramas gerados pelos dados de análise molecular foram editados no programa SeqAssem 2007/2008. As sequências geradas foram comparadas com aquelas depositadas no GenBank - National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências obtidas e utilizadas para a construção das árvores filogenéticas estão disponíveis na tabela suplementar 3. As análises filogenéticas foram realizadas no programa MEGA v 6.1 (TAMURA et al. 2013).

Os dados gerados pelas análises enzimáticas e antagonismo, foram submetidos a análise de variância. Quando F foi significativo ($p < 0.05$) os resultados foram avaliados através dos testes Scott-Knot e Tukey, respectivamente, no programa Statistical Package for the Social Sciences - IBM SPSS v. 21.1.

O cladograma com atividades biológicas foi baseado na taxonomia do NCBI obtida por meio do programa phyloT, e a conversão dos resultados gerados pelas análises de metabólitos secundários, antagonismo e dados de origem foram convertidos em números binários e códigos de cores disponibilizados pelo programa iTOL (LETUNIC; BORK, 2016).

12. Resultados

12.1. Identificação dos endófitos de guaraná

A morfologia dos endófitos de guaraná foi analisada em condições adequadas para observação de suas principais características. Isolados como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*, foram cultivados em condições previamente recomendadas na literatura, o que possibilitou a melhor comparação dos caracteres. A micromorfologia de cerca de 56% dos isolados não pode ser efetivamente mensurada, devido à ausência de estruturas reprodutivas. Os caracteres fotodocumentados auxiliaram na confirmação dos resultados

gerados pelas análises posteriores. As imagens de alguns fungos estão disponíveis na Figura 3.

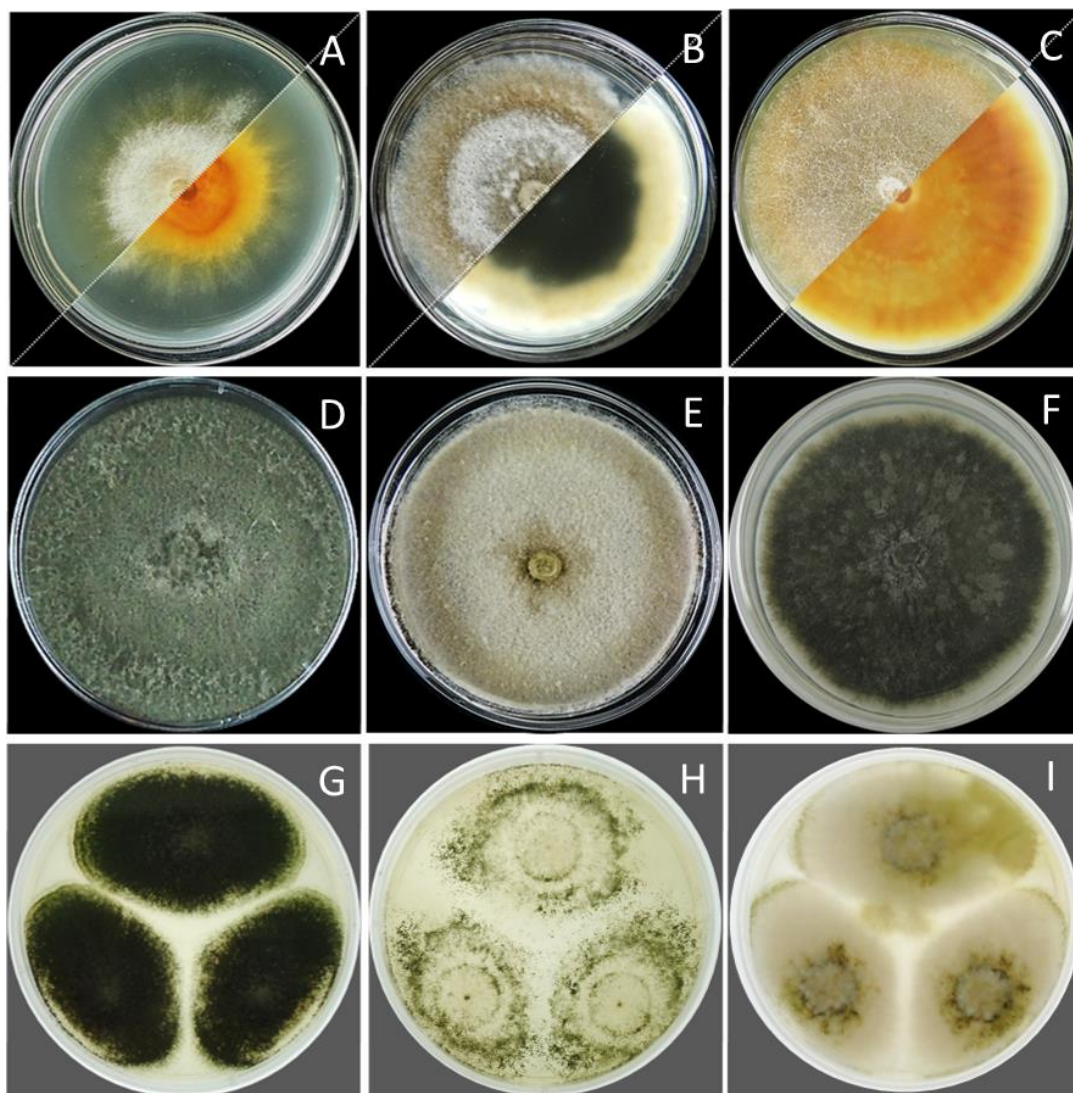


Figura 4. Fungos endofíticos de guaraná *Paullinia cupana* var *sorbilis*. Imagens das colônias fúngicas demonstrando as diferenças fenotípicas frente/ reverso de: *Lentinus swartzii* (A), *Diaporthe phaseolorum* (B) e *Fusarium solani* (C). Frente de fungos extremamente pigmentados no reverso: *Lasiodiplodia theobromae* (D), *Daldinia eschscholtzii* (E), *Phyllosticta ericarum* (F). Endófitos de *Aspergillus flavus* em meio CYA37, MEA25 e CYA25, (G), (H) e (I), respectivamente.

Os resultados obtidos do sequenciamento da região ITS possibilitaram a identificação de diferentes das espécies fúngicas distribuídas nos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Endófitos como *Daldinia eschscholtzii*, *Hypoxylon monticulosum*, *Lentinus swartzii*, *Mycoleptodiscus indicus*, *Pestalotiopsis microspora*, *Simplicillium lanosoniveum* e *Tinctoporellus epimiltinus*, tiveram alta cobertura com as sequências depositadas no NCBI. Entretanto, a região ITS forneceu dados insuficientes para diferenciação de algumas espécies. Desse modo, isolados como *Albonectria rigidiuscula*, *Aspergillus sydowii*, *Bionectria byssicola*, *Colletotrichum gigasporum*, *Fusarium*

concolor e *Penicillium citrinum*, foram sequenciados com outras regiões gênicas mais informativas para esses gêneros. Apesar do uso de múltiplas regiões, alguns isolados como CCCT 17.17, membros da ordem *Pleoporales*, *Nigrospora* sp. e principalmente endófitos de *Diaporthe* e *Phomopsis*, demonstraram baixa cobertura, impossibilitando a resolução de gêneros/espécies.

Representantes de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Fusarium* e *Penicillium* foram submetidos as análises em MALDI-TOF ICMS. O banco de dados SARAMIS™ não forneceu espectros relevantes no presente estudo. Porém, a caracterização morfológica e biologia molecular possibilitaram a posterior identificação dos *clusters* obtidos das análises em MALDI-TOF ICMS.

A identificação polifásica, pelas análises macro- e micromorfológica, dados moleculares e MALDI-TOF está listada na Tabela 2. Essas análises forneceram dados importantes sobre os fungos endofíticos de guaraná auxiliando a nomeação a nível de espécie de 108 isolados, distribuídos em 26 gêneros e 35 espécies. Possibilitando a correta identificação dos isolados fúngicos testados quanto a capacidade de produzir metabólitos secundários e antagonismo contra o patógeno *C. guaranicola*. Os testes das atividades biológicas estão descritos abaixo, e os dados resultantes disponibilizados na Figura 4.

12.2. Antraquinonas

Os compostos derivados de antraquinona revelados no teste de Saito e Machido foram produzidos por aproximadamente 30 endófitos pertencentes a várias espécies, como *A. rigidiuscula*, *Clonostachs rosea*, *Colletotrichum gigasporium*, *Fusarium solani*, *Nigrospora oryzae*, *P. citrinum*, *P. microspora* e *Simplicillium lanosoniveum*. Todos eles foram capazes de modificar a coloração no reverso da colônia em meio YES exposto a vapor de amônia. Dentro no gênero *Aspergillus*, os isolados *A. pseudonomius* CCCT17.87, *A. sydowii* CCCT 17.55/ CCCT 17.95/ CCCT 17.70 e *A. versicolor* CCCT17.50 foram positivos.

A separação em dois grupos, gêneros diversos e *Aspergillus*, foi realizada devido à grande quantidade de *Aspergillus* spp. associados a antraquinonas classificadas como micotoxinas, danosas à saúde humana. Diferente das antraquinonas procedentes de outros gêneros, as quais possuem aplicações biotecnológicas, na agroindústria e medicina (KHAN et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2011; KHAMTHONG et al., 2012; CHOWDHURY et al., 2017).

Tabela 2. Comparação de diferentes abordagens para identificação de fungos endofíticos de *Paullinia cupana* var *sorbilis* provenientes do Amazonas/ Brasil.

Código CCCT	Análise macro e microscópica	Identificação Molecular	Região gênica	Análise MALDI-TOF	Identificação final
CCCT 17.06	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium citrinum</i>	β -Tub	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
CCCT 17.07	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	ITS	NI	<i>Pestalotiopsis microspora</i>
CCCT 17.08	NI	<i>Nigrospora oryzae</i>	ITS	NI	<i>Nigrospora oryzae</i>
CCCT 17.09	NI	<i>Albonectria rigidiuscula</i>	ITS/ β -Tub	NI	<i>Albonectria rigidiuscula</i>
CCCT 17.10	NI	<i>Tinctoporellus epimiltinus</i>	ITS	ND	<i>Tinctoporellus epimiltinus</i>
CCCT 17.11	NI	<i>Curvularia lunata</i>	ITS	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Curvularia lunata</i>
CCCT 17.12	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Curvularia lunata</i>	ITS	ND	<i>Curvularia lunata</i>
CCCT 17.13	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium polyphialidicum</i>	ITS	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium polyphialidicum</i>
CCCT 17.14	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	ITS	ND	<i>Pestalotiopsis microspora</i>
CCCT 17.15	NI	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	ITS	ND	<i>Daldinia eschscholtzii</i>
CCCT 17.16	NI	<i>Nigrospora</i> sp.	ITS/ β -Tub	NI	<i>Nigrospora</i> sp.*
CCCT 17.17	NI	NI	ITS/ β -Tub	ND	NI
CCCT 17.18	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium rolfsii</i>	ITS	<i>Penicillium rolfsii</i>	<i>Penicillium rolfsii</i>
CCCT 17.19	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium concolor</i>	ITS/ β -Tub	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium concolor</i>
CCCT 17.20	NI	<i>Clonostachs rosea</i>	ITS	ND	<i>Clonostachs rosea</i>
CCCT 17.21	NI	<i>Diaporthe</i> sp.	ITS/ D1/D2	ND	<i>Diaporthe</i> sp.
CCCT 17.22	NI	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	ITS	ND	<i>Talaromyces amestolkiae</i>
CCCT 17.23	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp.	ITS		<i>Curvularia</i> sp.
CCCT 17.24	NI	<i>Mycoleptodiscus indicus</i>	ITS	ND	<i>Mycoleptodiscus indicus</i>
CCCT 17.25	NI	<i>Albonectria rigidiuscula</i>	ITS/ β -Tub	ND	<i>Albonectria rigidiuscula</i>
CCCT 17.26	NI	<i>Albonectria rigidiuscula</i>	ITS/ β -Tub	ND	<i>Albonectria rigidiuscula</i>
CCCT 17.27	NI	<i>Phyllosticta ericarum</i>	ITS/ TEF1- α	ND	<i>Phyllosticta ericarum</i>
CCCT 17.28	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium citrinum</i>	ITS	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
CCCT 17.29	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium concolor</i>	ITS/ TEF1- α	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium concolor</i>
CCCT 17.30	NI	<i>Hypoxylon monticulosum</i>	ITS	NI	<i>Hypoxylon monticulosum</i>
CCCT 17.31	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Colletotrichum gigasporum</i>	ITS/ β -Tub	ND	<i>Colletotrichum gigasporum</i>

Continuação

CCCT 17.32	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	ITS	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>
CCCT 17.33	NI	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	ITS	NI	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
CCCT 17.34	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	ITS/ TEF1- α	ND	<i>Fusarium solani</i>
CCCT 17.35	NI	<i>Bionectria pseudochroleuca</i>	ITS/ β -Tub	NI	<i>Bionectria pseudochroleuca</i>
CCCT 17.36	NI	<i>Diaporthe citri</i>	ITS	ND	<i>Diaporthe citri</i>
CCCT 17.37	NI	<i>Phomopsis phaseoli</i>	ITS	ND	<i>Phomopsis phaseoli</i>
CCCT 17.38	NI	<i>Albonectria rigidiuscula</i>	ITS	NI	<i>Albonectria rigidiuscula</i>
CCCT 17.39	NI	<i>Diaporthe</i> sp.	ITS/ D1/D2	<i>Diaporthe</i> sp.	<i>Diaporthe</i> sp.
CCCT 17.40	NI	<i>Phomopsis phaseoli</i>	ITS	ND	<i>Phomopsis phaseoli</i>
CCCT 17.41	NI	<i>Phomopsis phaseoli</i>	ITS	NI	<i>Phomopsis phaseoli</i>
CCCT 17.42	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium concolor</i>	ITS/ TEF1- α	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium concolor</i>
CCCT 17.43	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium concolor</i>	ITS/ TEF1- α	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium concolor</i>
CCCT 17.44	<i>Nigrospora</i> sp.	<i>Nigrospora oryzae</i>	ITS	NI	<i>Nigrospora oryzae</i>
CCCT 17.45	NI	<i>Clonostachs rosea</i>	ITS	ND	<i>Clonostachs rosea</i>
CCCT 17.46	NI	<i>Phomopsis phaseoli</i>	ITS/ TEF1- α / D1/D2	NI	<i>Phomopsis phaseoli</i>
CCCT 17.47	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	ITS/ TEF1- α	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>
CCCT 17.48	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>	ITS	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>
CCCT 17.49	NI	<i>Phomopsis phaseoli</i>	ITS	NI	<i>Phomopsis phaseoli</i>
CCCT 17.50	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus versicolor</i>	CAL	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>
CCCT 17.51	NI	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	ITS	NI	<i>Daldinia eschscholtzii</i>
CCCT 17.52	NI	<i>Bionectria byssicola</i>	ITS/ β -Tub	NI	<i>Bionectria byssicola</i>
CCCT 17.53	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium concolor</i>	ITS/ TEF1- α	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium concolor</i>
CCCT 17.54	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	ITS	NI	<i>Pestalotiopsis microspora</i>
CCCT 17.55	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus sydowii</i>	CAL	<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Aspergillus sydowii</i>
CCCT 17.56	NI	<i>Diaporthe</i> sp.	ITS/ D1/D2	ND	<i>Diaporthe</i> sp.
CCCT 17.57	NI	<i>Nigrospora</i> sp.	ITS/ β -Tub	ND	<i>Nigrospora</i> sp.
CCCT 17.58	NI	<i>Diaporthe</i> sp.	ITS/ D1/D2	ND	<i>Diaporthe</i> sp.
CCCT 17.59	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium citrinum</i>	ITS	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>

Continuação

CCCT 17.60	NI	<i>Bionectria byssicola</i>	ITS/ β -Tub	NI	<i>Bionectria byssicola</i>
CCCT 17.61	NI	<i>Bionectria aff. ochroleuca</i>	ITS	NI	<i>Bionectria aff. ochroleuca</i>
CCCT 17.62	NI	<i>Nigrospora oryzae</i>	ITS	ND	<i>Nigrospora oryzae</i>
CCCT 17.63	NI	<i>Nigrospora oryzae</i>	ITS	ND	<i>Nigrospora oryzae</i>
CCCT 17.64	<i>Nigrospora sp.</i>	<i>Nigrospora oryzae</i>	ITS	NI	<i>Nigrospora oryzae</i>
CCCT 17.65	NI	<i>Nigrospora oryzae</i>	ITS	ND	<i>Nigrospora oryzae</i>
CCCT 17.66	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Fusarium concolor</i>	ITS/ TEF1- α	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Fusarium concolor</i>
CCCT 17.67	NI	<i>Phomopsis phaseoli</i>	ITS	NI	<i>Phomopsis phaseoli</i>
CCCT 17.68	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Fusarium polyphialidicum</i>	ITS	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Fusarium polyphialidicum</i>
CCCT 17.69	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	ITS	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
CCCT 17.70	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus sydowii</i>	CAL	<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Aspergillus sydowii</i>
CCCT 17.71	NI	<i>Bionectria aff. ochroleuca</i>	ITS	NI	<i>Bionectria aff. ochroleuca</i>
CCCT 17.72	NI	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	ITS	NI	<i>Daldinia eschscholtzii</i>
CCCT 17.73	<i>Curvularia sp.</i>	<i>Curvularia sp.</i>	ITS	ND	<i>Curvularia sp.</i>
CCCT 17.74	NI	<i>Lasiodiplodia sp.</i>	ITS/ TEF1- α	NI	<i>Lasiodiplodia sp.</i>
CCCT 17.75	NI	<i>Phomopsis/Diaporthe</i>	ITS/ D1/D2	ND	<i>Phomopsis/Diaporthe</i>
CCCT 17.76	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Fusarium concolor</i>	ITS/ TEF1- α	ND	<i>Fusarium concolor</i>
CCCT 17.77	<i>Curvularia sp.</i>	<i>Curvularia lunata</i>	ITS	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Curvularia lunata</i>
CCCT 17.78	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Fusarium solani</i>	ITS	ND	<i>Fusarium solani</i>
CCCT 17.79	NI	<i>Colletotrichum siamense</i>	ITS/ β -Tub	<i>Colletotrichum sp.</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>
CCCT 17.80	NI	<i>Colletotrichum gigasporum</i>	ITS/ β -Tub	<i>Colletotrichum sp.</i>	<i>Colletotrichum gigasporum</i>
CCCT 17.81	NI	<i>Colletotrichum gigasporum</i>	ITS/ β -Tub	<i>Colletotrichum sp.</i>	<i>Colletotrichum gigasporum</i>
CCCT 17.82	NI	<i>Peroneutypa scoparia</i>	ITS	NI	<i>Peroneutypa scoparia</i>
CCCT 17.83	<i>Colletotrichum sp.</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>	ITS/ β -Tub	<i>Colletotrichum sp.</i>	<i>Colletotrichum siamense</i>
CCCT 17.84	NI	<i>Albonectria rigidiuscula</i>	ITS/ β -Tub	NI	<i>Albonectria rigidiuscula</i>
CCCT 17.85	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Fusarium solani</i>	ITS/ TEF1- α	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Fusarium solani</i>
CCCT 17.86	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Fusarium solani</i>	ITS	ND	<i>Fusarium solani</i>
CCCT 17.87	<i>Aspergillus sp.</i>	<i>Aspergillus pseudonomius</i>	CAL	<i>Aspergillus pseudonomius</i>	<i>Aspergillus pseudonomius</i>
CCCT 17.88	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	ITS	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>

Continuação

CCCT 17.89	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium citrinum</i>	ITS	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
CCCT 17.90	NI	<i>Nigrospora camelliae-sinensis</i>	ITS/ β -Tub	ND	<i>Nigrospora camelliae-sinensis</i>
CCCT 17.91	NI	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	ITS	NI	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
CCCT 17.92	NI	ND	-	ND	ND
CCCT 17.93	NI	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	ITS	NI	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
CCCT 17.94	NI	<i>Phomopsis/Diaporthe</i>	ITS/ D1/D2	ND	<i>Phomopsis/Diaporthe</i>
CCCT 17.95	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus sydowii</i>	CAL	<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Aspergillus sydowii</i>
CCCT 17.96	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium citrinum</i>	β -Tub	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
CCCT 17.97	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus flavus</i>	CAL	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
CCCT 17.98	NI	<i>Bionectria</i> aff. <i>ochroleuca</i>	ITS	NI	<i>Bionectria</i> aff. <i>ochroleuca</i>
CCCT 17.99	NI	<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	ITS	ND	<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>
CCCT 17.100	NI	<i>Pseudopestalotiopsis theae</i>	ITS	ND	<i>Pseudopestalotiopsis theae</i>
CCCT 17.101	NI	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>	ITS	ND	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>
CCCT 17.102	NI	<i>Bionectria byssicola</i>	ITS/ B-Tub	ND	<i>Bionectria byssicola</i>
CCCT 17.103	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	ITS	ND	<i>Pestalotiopsis microspora</i>
CCCT 17.104	NI	<i>Polyporales</i>	ITS/ TEF1- α	ND	<i>Polyporales</i>
CCCT 17.105	NI	<i>Polyporales</i>	ITS/ TEF1- α	ND	<i>Polyporales</i>
CCCT 17.106	NI	<i>Lentinus swartzii</i>	ITS	ND	<i>Lentinus swartzii</i>
CCCT 17.107	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	ITS	NI	<i>Pestalotiopsis microspora</i>
CCCT 17.108	NI	<i>Gloeostereum incarnatum</i>	ITS/ D1/D2	NI	<i>Gloeostereum incarnatum</i>
CCCT 17.109	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium concolor</i>	ITS/ TEF1- α	ND	<i>Fusarium concolor</i>
CCCT 17.110	NI	<i>Polyporales</i>	ITS/ TEF1- α	ND	<i>Polyporales</i>
CCCT 17.111	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium concolor</i>	ITS/ TEF1- α	ND	<i>Fusarium concolor</i>
CCCT 17.112	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium concolor</i>	ITS/ TEF1- α	ND	<i>Fusarium concolor</i>
CCCT 17.113	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium concolor</i>	ITS/ TEF1- α	ND	<i>Fusarium concolor</i>
CCCT 17.114	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium concolor</i>	ITS/ TEF1- α	ND	<i>Fusarium concolor</i>
CCCT 17.116	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium concolor</i>	ITS/ TEF1- α	ND	<i>Fusarium concolor</i>
CCCT 17.117	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium polyphialidicum</i>	ITS	NI	<i>Fusarium polyphialidicum</i>

Continuação

CCCT 17.118	NI	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>	ITS	ND	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>
CCCT 17.120	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium concolor</i>	ITS/ TEF1- α	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium concolor</i>
CCCT 17.121	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Colletotrichum siamense</i>	ITS/ β -Tub	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Colletotrichum siamense</i>
CCCT 17.122	NI	<i>Colletotrichum siamense</i>	ITS/ TEF1- α / β -Tub	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Colletotrichum siamense</i>
CCCT 17.123	NI	<i>Fusarium</i> sp.	ITS/ TEF1- α / β -Tub	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.
CCCT 17.124	NI	<i>Diaporthe/Phomopsis</i>	ITS/ D1/D2	ND	<i>Diaporthe/Phomopsis</i>
CCCT 17.125	NI	<i>Albonectria</i> sp.	TEF1- α	ND	<i>Albonectria</i> sp.
CCCT 17.126	NI	<i>Albonectria</i> sp.	TEF1- α	NI	<i>Albonectria</i> sp.
CCCT 17.127	NI	<i>Clonostachs rosea</i>	ITS	NI	<i>Clonostachs rosea</i>
CCCT 17.129	NI	<i>Diaporthe/Phomopsis</i>	ITS/ D1/D2	ND	<i>Diaporthe/Phomopsis</i>
CCCT 17.130	NI	<i>Albonectria rigidiuscula</i>	ITS	NI	<i>Albonectria rigidiuscula</i>
CCCT 17.131	NI	<i>Diaporthe/Phomopsis</i>	ITS/ D1/D2	NI	<i>Diaporthe/Phomopsis</i>
CCCT 17.132	NI	<i>Clonostachs rosea</i>	ITS	NI	<i>Clonostachs rosea</i>
CCCT 17.133	NI	<i>Cladosporium halotolerans</i>	ITS/ β -Tub	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium halotolerans</i>
CCCT 17.134	NI	<i>Diaporthe/Phomopsis</i>	ITS/ D1/D2	ND	<i>Diaporthe/Phomopsis</i>
CCCT 17.135	NI	<i>Clonostachs rosea</i>	ITS	NI	<i>Clonostachs rosea</i>
CCCT 17.137	NI	<i>Clonostachs rosea</i>	ITS	NI	<i>Clonostachs rosea</i>
CCCT 17.138	NI	<i>Clonostachs rosea</i>	ITS	NI	<i>Clonostachs rosea</i>
CCCT 17.139	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus flavus</i>	ITS	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
CCCT 17.140	NI	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	ITS	ND	<i>Talaromyces amestolkiae</i>
CCCT 17.141	NI	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	ITS	ND	<i>Talaromyces amestolkiae</i>
CCCT 17.142	NI	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	ITS	NI	<i>Talaromyces amestolkiae</i>
CCCT 17.194	NI	<i>Diaporthe citri</i>	ITS	<i>Diaporthe</i> sp.	<i>Diaporthe citri</i>

NI – não identificado, ND – não determinado.

12.3. Enzimas

Todos os fungos endofíticos de guaraná foram testados quanto a produção de enzimas extracelulares. Cerca de 97% dos isolados foram capazes de demonstrar atividade enzimática nos meios sólidos utilizados. Os endófitos obtidos de folhas e sementes, foram capazes de hidrolisar amido 68% e 74%, carboximetilcelulose (CMC) 75% e 47%, pectina cítrica 5% e 0%, gordura do leite 40% e 76%, e óleo Tween 66% e 76%, respectivamente. Membros de *Aspergillus* e *Penicillium* foram amplamente correlacionados a produção de diferentes enzimas. Todas as espécies fúngicas abordadas nesse estudo foram capazes de produzir pelo uma das enzimas testadas. Todas as enzimas foram secretadas pelos isolados *Albonectria rigidiuscula* CCCT 17.26, *Fusarium polyphialidicum* CCCT 17.68, *Nigrospora oryzae* CCCT 17.44, *Penicillium citrinum* CCCT17.89 e *Pestalotiopsis microspora* CCCT 17.14.

12.4. Antagonismo

O antagonismo de *Colletotrichum guaranicola* I02 foi observado principalmente por endófitos obtidos de folhas, maiormente oriundos do genótipo suscetível à antracnose BRS300. De 138 endófitos testados, 14 isolados fúngicos, foram capazes de causar depleção do patógeno nas condições avaliadas (*A. sydowii* CCCT 17.55/ CCCT 17.70, *A. rigidiuscula* CCCT 17.84, *A. versicolor* CCCT 17.50, *C. lunata* CCCT 17.11, *F. concolor* CCCT 17.53, *P. citrinum* CCCT 17.59 /CCCT 17.88/ CCCT 17.96/ CCCT 17.06. CCCT 17.28/ CCCT 17.89/ CCCT 17.69 e *T. amestolkiae* CCCT 17.141). No presente estudo, somente os fungos que causaram antagonismo por meio de antibiose foram considerados. As zonas inibitórias (mm) mais expressivas foram observadas exclusivamente por endófitos de crescimento lento. Porém, esse padrão não foi observado pelos endófitos que proporcionaram maiores índices de Inibição do Crescimento Micelial (ICM).

13. Discussão

A caracterização morfológica dos fungos cultiváveis permitiu a melhor distinção entre os isolados fúngicos pela coloração e taxa de crescimento, corroborando com a identificação daqueles que esporularam em meio de cultura. No entanto, um elevado número de fungos foi classificado como *Mycelia sterilia*. Alguns isolados não produziram, e outros perderam a capacidade de formar esporos, como membros de

Nigrospora, que inicialmente produziram esporos, o que possibilitou a separação inicial dos gêneros (descrita no cap. anterior).

Contudo, após sucessivos repiques, os isolados perderam a capacidade de produzir conídios dentro das condições observadas. Essa incapacidade, sob condições de laboratório, significa que o crescimento estava metabolicamente desfavorável para formação de estruturas sexuais (SUN; GUO, 2012). Característica comumente relatada na literatura, onde mais de 50% do total de fungos endofíticos normalmente não esporulam nos substratos empregados (SARMA et al., 2018; SELIM et al., 2018). Contudo, a biologia molecular possibilitou o reconhecimento principalmente de isolados estéreis que não puderam ser classificados em nenhuma colocação taxonômica baseados na morfologia (SUN; GUO, 2012).

Várias espécies foram determinadas pela região ITS, conhecida como código de barras dos fungos por ser uma região altamente polimórfica, de fácil amplificação, com informação genética que permite a distinção intraespecífica e interespecífica de muitos membros dos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Contudo, a região ITS apresenta limitações para identificação de fungos como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma*, e diferentes regiões, mais informativas normalmente são utilizadas para a determinação desses fungos (RAJA et al., 2017). Membros de *Colletotrichum*, por exemplo, devem ser cautelosamente diferenciados entre espécies por meio do sequenciamento ITS. Devido à alta taxa de erro (>86%) encontrada com dados baseados somente nessa região (CROUCH; CLARKE; HILLMAN, 2009).

Desse modo, outros *locus* mais informativos, como β -tubulina e calmodulina, utilizados nesse estudo, são úteis na resolução de espécies desses grupos. Entretanto, alguns endófitos, mesmo com elevada qualidade da sequência de rDNA, demonstraram baixa cobertura quando comparados as sequências depositadas no GenBank, sugerindo a presença de novos relatos. O sequenciamento de outras regiões gênicas poderá corroborar com essa hipótese.

As análises de MALDI-TOF ICMS resultaram em dados similares aos observados pelo sequenciamento do rDNA. No entanto, alguns espectros de espécies fúngicas, identificados pelas análises anteriores, não corresponderam aos espectros de referência arquivados no banco de dados SARAMIS™. Essa incompatibilidade pode estar conectada a origem geográfica e/ou dos substratos das espécies fúngicas utilizadas como referências, oriundas de Coleções Europeias e fungos obtidos de esponjas marinhas e produtos alimentícios (PASSARINI et al., 2013). Desse modo, a inserção de novos

espectros oriundos de fungos endofíticos de guaraná no banco de dados SARAMIS™ irá possibilitar maior cobertura de *clusters* e poderá facilitar a identificação por meio da análise gerada pelo MALDI-TOF ICMS em trabalhos futuros.

13.1. Antraquinonas

As antraquinonas são substâncias orgânicas derivadas do antraceno e compõe o grupo de pigmentos naturais quinoides encontrados nos micélios e corpos de frutificação dos fungos. O efeito das antraquinonas está estreitamente vinculado a sua natureza química e a quantidade do composto, que pode ser benéfica ou nociva. Recentemente, muitas pesquisas têm demonstrado os efeitos antimicrobianos, anticancerígenos e antioxidantes desse grupo (GESSLER et al. 2013; FOUILLAUD et al. 2016). Contudo, desde a década de 60 as antraquinonas têm sido atribuídas aos efeitos deletérios, causados principalmente por diferentes espécies de *Aspergillus* (BLOUNT, 1961).

No presente estudo, utilizou-se a metodologia publicada por Saito e Machida, criada na década de 90, para identificação rápida de aflatoxinas (AFs) em estirpes de *Aspergillus*, devido a importância das micotoxinas e grandes prejuízos relacionados a produção de grãos (SAITO; MACHIDA, 1999). No entanto, apesar de possuir confiabilidade comparável à cromatografia, com 0% de falso positivo, quando as bases bioquímicas do teste de Saito e Machida foram analisadas, a cromatografia revelou antraquinonas intermediárias dos padrões de biossíntese de AF, ou seja, o teste também revela outras substâncias químicas, inseridas no grupo das antraquinonas (ABBAS et al., 2004a).

Três espécies de *Aspergillus* produziram antraquinonas, por meio das condições testadas, sugerindo a ocorrência de AFs e/ou esterigmatocistina (ST). Anteriormente, foi evidenciado que a espécie *A. pseudonomius* é capaz de produzir quatro tipos de aflatoxinas: AFB₁ (VARGA et al., 2011), AFB₂, AFG₁ e AFG₂ (MASSI et al., 2014). Entretanto, as espécies *A. sydowii* e *A. versicolor*, não produziram nenhuma das AFs citadas acima em trabalhos anteriores (HASHIM 2011, JURJEVIC et al., 2012). Porém, são prolíferas produtoras de ST, substância precursora de AFB₁, que necessita dos mesmos genes e enzimas utilizados para bioconversão de aflatoxina (JURJEVIC et al., 2012; VIEGAS et al., 2018). Contudo, essas espécies não estão somente ligadas a produção de antraquinonas danosas. Alguns isolados de *A. versicolor*, por exemplo, possuem habilidade de secretar averufin, substância que causa depleção em inúmeros patógenos (KAWAI et al., 1984; Xu et al., 2015).

Os endófitos de *A. flavus* CCCT 17.139 e CCCT 17.97 não revelaram reação química em nosso estudo, contudo *A. flavus* juntamente com *A. parasiticus* e *A. nominus*, são as principais espécies causadoras de contaminações de alimentos (WEE; DAY; LINZ, 2016). Essa diferença entre isolados fúngicos aflatoxigênicos e não-aflatoxigênicos é modulada por muitos fatores, incluindo a genética do fungo, interação com a planta hospedeira, histórico da cultura e seu manejo, composição do solo, e fatores abióticos, como temperatura e umidade relativa (ABBAS et al., 2004b). Futuramente, os isolados CCCT 17.139 e CCCT 17.97 poderão ser testados quanto capacidade de suprimir fungos toxigênicos, como demonstrado anteriormente, com cepas não-aflatoxigênicas de *A. flavus*, capazes de reduzir a contaminação quando aplicados diretamente em sementes e no solo, considerados efetivos agentes de biocontrole de *A. flavus* aflatoxigênicos (ACCINELLI et al. 2009,2018; ZANON et al. 2018).

O biocontrole de patógenos, também tem sido associado a secreção de antraquinonas por fungos diferentes do grupo *Aspergillus*. Nesse estudo, os endófitos *Fusarium solani*, *Nigrospora oryzae*, *Penicillium citrinum* e *Phomopsis* sp., anteriormente foram relatados como excelentes secretores de antraquinonas (CHOWDHURY et al., 2017; HE et al., 2017; KHAMTHONG et al., 2012; KHAN et al., 2018), sugerindo que os endófitos de guaraná podem ter a mesma capacidade produtiva e efeitos antimicrobianos. As aza-antraquinonas secretadas por *F. solani* CARE-1 e AURE-4, por exemplo, possuem atividades citotóxicas e antibacterianas, resultando na indução de apoptose ou necrose de células cancerígenas, e estímulo da respiração celular e oxidação das bactérias (CHOWDHURY et al., 2017; KHAN et al., 2018). As penicillantraninas A e B, antraquinonas-citrina raramente encontradas na natureza, e outros tipos de antraquinonas, obtidas dos endófitos *P. citrinum* PSU-F51 e HL-5126, isolados de algas marinhas e manguezal, demonstraram atividade antibactericida e antifúngica contra *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Candida albicans* (KHAMTHONG et al., 2012; HE et al., 2017).

Outro microrganismo, constantemente utilizado no biocontrole de fungos e bactérias é a *C. rosea*, capaz de produzir TMC-151-policetídeo, epipolysulfanyldioxopiperazines, peptaibols e glisopreninas (CARD et al., 2016; FATEMA et al., 2018). Em nosso estudo, todos os isolados dessa espécie revelaram produção de antraquinonas. Apesar da espécie não ser identificada como produtora desse composto na literatura, possui o gene *pk1* capaz de biosintetizar antraquinonas. Recentemente, Fatema et al. (2018) ao analisar as funções dos genes policetídeos (PK)

em *C. rosea* IK726 WT durante o antagonismo e micoparasitismo contra *Botrytis cinerea* e *F. graminearum*, observaram que *pks1*, *pks2* e *pks12* foram fortemente induzidos durante a secreção de pigmentos amarelos. Os autores sugeriram que tais pigmentos estariam conectados a biossíntese de compostos semelhantes a asperthicin, um tipo de antraquinona anteriormente reportado em *A. nidulans*, onde sabe-se que o gene *pks1* está envolvido na síntese desse composto.

Recentemente, distintos gêneros foram associados a síntese de antraquinonas, como por exemplo, *Phomopsis* sp. PSU-MA214, de onde foi isolado pela primeira vez 2 novos compostos, juntamente com os conhecidos macrosporin e tetrahydroaltersolanol B&C (KLAIKLAY et al., 2012). Um novo derivado de antraquinona também foi obtido de *Pestalotiopsis guepinii* LISB 68, denominado guepinone, e outros relatadas anteriormente como isossulocrina e cloroissosulocrina (OLIVEIRA et al., 2011).

Endófitos possuem potencial biotecnológico, para produção de múltiplos compostos, como enzimas e antibióticos (MARIA; SRIDHAR; RAVIRAJA, 2005; CARRIM; BARBOSA; VIEIRA, 2006; CORRÊA et al., 2014). Desse modo, é importante que testes de toxidez sejam realizados a fim de evitar possíveis contaminações com tais organismos que causam sérios problemas à saúde de animais e humanos. Além disso, acredita-se que as micotoxinas exercem papel fundamental eliminando outros microrganismos na competição por espaço e nutrientes (BRÄSE et al., 2009). Assim, os isolados de guaraná positivos no teste químico aplicado poderão ser testados contra diferentes patógenos futuramente afim de elucidar o potencial antagônico e a relação com as antraquinonas. E também, testes mais específicos poderão ser realizados para identificação dos derivados de antraquinona relatados pelos endófitos abordados nesse estudo.

13.2. Enzimas

A produção de múltiplas enzimas faz parte dos mecanismos químicos que os endófitos precisam para superar as barreiras impostas pelo hospedeiro e obter nutrientes indispensáveis para seu desenvolvimento. A amilase, por exemplo, observada nesse estudo, presente na maioria dos endófitos, está associada à conversão do amido em glicose, usadas como fonte energia para esporulação e crescimento (SCHMOLL, 2018). Alguns tipos de proteases estão envolvidos na interação fungo-planta, podendo ser utilizadas para aquisição de nutrientes a partir de fontes ricas em proteínas ou escapar do sistema imune do hospedeiro (MUSZEWSKA et al., 2017). E as lipases liberam ácidos

graxos livres que são utilizados como fonte de carbono auxiliando no processo de colonização inicial (FENG et al., 2009).

Afora das funções ecológicas, algumas espécies destacam-se quanto a produção de enzimas altamente requisitadas para confecção de produtos farmacêuticos, medicinais e alimentícios. Nesse estudo, os valores do índice enzimático (IE) diferiram entre espécies, variando entre endófitos mais e menos produtivos. A atividade amilolítica máxima foi observada pelas estirpes *A. sydowii* CCCT 17.95, *P. citrinum* CCCT 17.59, *Pseudopezalotiopsis theae* CCCT 17.100 e especialmente por *Phomopsis phaseoli* CCCT 17.40. As amilases microbianas de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., são comumente usadas para produção de amilase industrial devido à alta tolerância a acidez associada a elevada capacidade de evitar contaminação com bactérias (SOUZA; MAGALHÃES, 2010). As espécies *A. niger* e *A. terreus*, por exemplo, são as mais utilizadas para fins têxtil, alimentício, farmacêutico e indústria de papéis (AHLHOLM et al., 2002; SETHI et al., 2016; WANG et al., 2016; GOPINATH et al., 2017). Todavia, fungos do *Phomopsis* são pouco correlacionados as aplicações tecnológicas de suas enzimas. Os isolados de *Phomopsis* estudados por Sobagaiah et al. (2013) não foram capazes de hidrolisar amido, mas os endófitos *P. theicola* TCS10 e *P. phyllanticolla* TMS1 obtidos de diferentes plantas medicinais produziram tanto amilase como celulase (TOGHUEO et al., 2017).

A produção de celulase foi proeminente em *A. sydowii* CCCT 17.55, *A. versicolor* CCCT 17.50, *Bionectria byssicola* CCCT 17.52, *P. citrinum* CCCT 17.89, *Peroneutypa scoparia* CCCT 17.82 e principalmente em *Fusarium concolor* CCCT 17.109. Corroborando com esse estudo, espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* foram relatadas anteriormente com elevado IE. Como por exemplo, *P. velutinum* IK- 51, *P. waskmanii* IK- 50 e *A. niger* 1005 descritas com elevada produção celulósica (KHOKHAR; MUKHTAR; MUSHTAQ, 2011) e endófitos de *Fusarium oxysporum* Ci 16 e *Fusarium solani* Ci 24 com maior IE quando comparado a outros indivíduos do mesmo gênero (SUNITHA, DEVI e SRINIVAS 2013). Tais fungos, poderão ter sua produção enzimática otimizada no futuro afim de alcançar atividade máxima se submetidas à temperatura de 28 °C, pH 5.6, em meio suplementado com 2% de CMC e com íons metálicos, principalmente HgCl₂ que reforçam a produção dessa enzima, tal como descrito por Dar et al. (2013). Endófitos de *Peroneutypa scoparia* não foram relatados na literatura em ensaios enzimáticos, e estudos para otimização de celulase poderiam ser realizados afim de utilizá-lo como fonte dessa enzima. Isolados de

Bionectria secretam celulasas e quitinasas, as quais estão associadas ao micoparasitismo (MELO et al., 2014), mas fungos desse gênero foram pouco reportados em bioprocessos celulósicos industriais. No entanto, tais endófitos são efetivos degradadores de Poliuretano Poliéster (PUR), plástico amplamente utilizado na indústria e fabricação, degradado por serinas, um tipo enzimas do grupo protease (RUSSELL et al., 2011).

A elevada atividade proteolítica foi quantificada em *Albonectria rigidiuscula* CCCT 17.84, *B. byssicola* CCCT 17.102, *Cladosporium halotolerans* CCCT 17.133, *Clonostachys rosea* CCCT 17.128, e principalmente por *Simplicillium lanosoniveum* CCCT 17.118. O potencial biotecnológico de *Cladosporium* sp. FGCC/BLS2 foi demonstrado por Saxena et al. (2017). Os autores selecionaram o fungo com maior IE em placas de Petri, e após cultivo em meio submerso, a maior atividade enzimática foi evidenciada após 120 h à 40 °C com 1,5% de caseína tamponado a pH 7,0. O fungo *C. rosea* é considerado um eficaz organismo entomopatogênico, micoparasitário e nematófago, tais capacidades estão associadas, entre outros fatores, a produção de serina protease que exerce importante papel durante o controle biológico (LI et al., 2006; ZOU et al., 2010; IQBAL et al., 2018). O micoparasitismo de *S. lanosoniveum* S-599 também está associado a essa enzima (VIVAS et al., 2018). A maior secreção de proteases pode ser induzida por choque térmico (SAXENA et al., 2017). Desse modo, estudos futuros poderão otimizar a produção de proteases, a quais possuem aplicação extensiva em produtos farmacêuticos, sabão em pó, seda, alimentos e gerenciamento de resíduos (SOUZA et al., 2015).

A maior capacidade de secretar lipase foi observada em *A. flavus* CCCT 17.139, *Colletotrichum gigasporum* CCCT 17.80, *Pestalotiopsis microspora* CCCT 17.107 e *P. phaseoli* CCCT 17.67. As espécies *Aspergillus* e *Colletotrichum* são reconhecidas pela elevada atividade lipolítica, e têm sido empregadas em diversos setores, como no tratamento de efluentes, produção de biodiesel, síntese de aromas, produção de omega 3, 6 e 9, etc (SANDE et al., 2017; MEHTA; GROVER; GUPTA, 2018). A espécie *P. microspora* é uma excelente degradadora de PUR, amplamente interligado a secreção de serinas. Porém, poucos relatos foram encontrados sobre as atividades lipolíticas de isolados *P. microspora* e *P. phaseoli* (BHARDWAJ; GUPTA; TIWARI, 2012; RUSSELL et al., 2011). Lane et al. (2006) e Sunitha; Devi e Srinivas (2013) observaram que membros de *Pestalotiopsis* e *Phomopsis* produziram lipase embora tenham sido quantificados com baixo IE.

A pectinase foi produzida por *A. rigidiuscula* CCCT 17.26, *F. polyphialidicum* CCCT 17.68, *Nigrospora oryzae* CCCT 17.44, *P. citrinum* CCCT 17.89 e *P. microspore* CCCT 17.14. Atualmente, a maioria das enzimas pectinolíticas comerciais são produzidas por fungos, com maior destaque a membros de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, usadas em indústrias de suco de frutas e produção de vinho (BENOIT et al., 2012; HEERD et al., 2012). A espécie *P. citrinum*, por exemplo, pode ter máxima produção de poligalacturonase, um tipo de pectinase, após 8 dias à 30°C, pH 5.5 com 1.5% de extrato de levedura como fonte de carbono (EL-BATAL; OSMAN; SHAIMA, 2013). *Pestalotiopsis* sp. e *Fusarium* spp., estudados por Ferreira et al. (2018), diferiram na capacidade de produzir a enzima, somente fungos de *Fusarium* exibiam atividade pectinolítica. Por outro lado, os endófitos *F. oxysporum* Ci 16, *F. chlamydosporum* Ci 19, *Pestalotiopsis* sp. Ac 34 e *N. sphaerica* Ci23 demonstraram elevada capacidade de secretar pectinases (SUNITHA; DEVI; SRINIVAS, 2013).

O isolamento de diferentes fungos é importante para estudos de screening que visam a produção de enzimas de interesse comercial. Nossa busca inicial de fungos promissores foi realizada em temperatura, pH e fontes de carbono e nitrogênio considerados adequados para maioria dos fungos filamentosos (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975; VALENTE; SANTOS; LIMA, 2002; KASANA et al., 2008). Entretanto, a otimização da capacidade enzimática varia entre e dentro das espécies. Sendo assim a produção das enzimas testadas poderá futuramente superar aos resultados obtidos nesse estudo, se colocados em condições adequadas como revisadas por (CORRÊA et al., 2014; GOPINATH et al., 2017).

O estudo detalhado e o planejamento de experimentos para obter a melhor configuração e otimização da produção de enzimas envolve três principais fatores: tempo de incubação, pH e substrato, os quais poderão ser avaliados em fermentação submersa ou semi-sólida para adequação de secreção de enzimas pelos endófitos de guaraná, com ênfase especial a *Fusarium concolor* CCCT 17.109, *Simplicillium lanosoniveum* CCCT 17.118 e *Phomopsis phaseoli* CCCT 17.40, melhores produtores de celulase, protease e amilase, respectivamente.

13.1. Antagonismo

Os endófitos de guaraná capazes de antagonizar por meio da antibiose foram encontrados principalmente nas folhas e no genótipo suscetível à antracnose BRS300, relatados no capítulo anterior como mais diversos, onde há uma complexa comunidade

microbiana, formada com membros de diferentes gêneros. Esse ambiente competitivo pode ter instigado a colonização e proliferação de endófitos com aparato genético/químico/físico capazes de prevalecer sobre outros organismos e efetivar seu estabelecimento, especialmente por meio da secreção de metabólitos antagônicos, uma das estratégias mais observadas por fungos endofíticos (FONSECA; INÁCIO, 2006; PRIOR; FEIGE; BEGEROW, 2017).

As estratégias podem variar de um mecanismo a outro (competição, antibiose e/ou micoparasitismo) e são extremamente dependentes da relação estabelecida entre os organismos envolvidos. Nesse estudo, alguns isolados foram considerados positivos e outros, com a mesma identificação taxonômica, foram negativamente associados a antibiose, adotando outras estratégias de defesa. A variação de atividade antagônica intraespecífica está vinculada a especificidade da interação endófito-patógeno. Além disso, a plasticidade fenotípica, variação genética intraespecífica, silenciamento de genes relevantes devido as condições favoráveis de temperatura e meio de cultivo, bem como a diferença de gatilhos de ativação do antagonismo, poderiam explicar as diferenças observadas (BILLS et al., 2009; PRIOR; FEIGE; BEGEROW, 2017).

Os endófitos positivamente ligados a antibiose estão inseridos em espécies como *Aspergillus* e *Albonectria*, reconhecidas como prolíferas secretoras de compostos bioativos vinculadas as atividades antimicrobianas contra uma ampla gama de patógenos (LI et al., 2012; PANG et al., 2017). A liberação de substâncias tóxicas e/ou enzimas, amilase, celulase e protease, previamente observadas, podem estar associadas a ação antagônica desses endófitos. Em nosso estudo, o isolado *F. concolor*, embora tenha formado zona de inibição < 5mm, causou menor crescimento do patógeno (ICM). Similar aos nossos resultados, o endófito *Fusarium fujikori* WF5 formou halo de inibição de 3 mm (MOUSA et al., 2015). Os autores demonstraram a inibição do patógeno *F. graminearum* por meio da quebra dramática de hifas e redução de crescimento, sugerindo o modo de ação fungicida e fungistático *in vitro* de seus compostos metabólicos após a extração e purificação.

Os endófitos *A. sydowii* e *P. citrinum*, formaram maior zona de inibição contra *C. guaranicola*, possivelmente interligada a atividade enzimática, previamente observada, que sugere associação com a lise celular do patógeno e estratégia de sobrevivência dos endófitos, afim de suprimir o crescimento lento, observado em culturas axênicas com 3,4 mm/dia e 2,8 mm/dia, respectivamente. Isolados de *P. citrinum* são excelentes produtores de compostos secundários. Como observado pela cepa *P. citrinum* VFI-51, que produz

lipase, protease, β -1,3-glucanase e a micotoxina chamada citrinina, responsáveis pela redução de 75% da doença causada por *Macrophomina phaseolina* no sorgo e indução da motilidade contra bactérias (PARK et al., 2008) e fitopatógenos: *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia minor* e *Botrytis cinerea* (SREEVIDYA; GOPALAKRISHNAN, 2016).

O *Colletotrichum guaranicola* causa antracnose nas folhas de guaraná em qualquer estágio da planta e trata-se de um patógeno de difícil controle na região Amazônica. Nesse estudo demonstramos que alguns membros de *P. citrinum* e *F. concolor* podem inibir o patógeno *in vitro*. Ambos, poderão ser futuramente testados para verificar a capacidade de inibição do patógeno na planta afim de elucidar o potencial desses endófitos em campo. Além disso, todos os fungos endofíticos capazes de produzir substâncias antifúngicas em meio agarizado possivelmente representam uma fonte de substâncias antagonistas, as quais poderão ser identificadas futuramente e testadas contra outros patógenos. Afinal os mecanismos de antagonismo e defesa fúngica, por meio de produção de ativos biológicos permite a descoberta de novos e potentes metabólitos úteis na agroindústria (GLOER, 2007).

14. Conclusão

Os fungos endofíticos oriundos do guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) são prolíferos produtores de metabólitos secundários, capazes de antagonizar o principal patógeno da cultura. As antraquinonas foram produzidas por diferentes isolados, fortemente vinculadas as espécies utilizadas no biocontrole efetivo de patógenos. As análises enzimáticas revelaram endófitos promissores, especialmente a espécie *Fusarium concolor*, *Simplicillium lanosoniveum* e *Phomopsis phaseoli*, que poderão ter sua capacidade enzimática otimizada para fins biotecnológicos. O antagonismo contra o *Colletotrichum guaranicola* resultou na obtenção de isolados fúngicos capazes de inibir seu crescimento *in vitro*, que poderão ser testados *in planta* em ensaios futuros. Os resultados desse estudo arquitetam a base para o início de novas pesquisas a partir dos diferentes compostos encontrados nos microrganismos do guaraná, representando uma fonte de bioativos para uso futuro nas áreas medicinal, agrônômica e industrial.

15. Referências bibliográficas

ABBAS, H. K. et al. Cultural methods for aflatoxin detection. **Journal of Toxicology - Toxin Reviews**, v. 23, n. 2–3, p. 295–315, jan. 2004a.

ABBAS, H. K. et al. Comparison of cultural and analytical methods for determination of aflatoxin production by Mississippi Delta *Aspergillus* isolates. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 193–199, mar. 2004b.

ACCINELLI, C. et al. Use of a granular bioplastic formulation for carrying conidia of a non-aflatoxigenic strain of *Aspergillus flavus*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 3997–4004, set. 2009.

ACCINELLI, C. et al. Biological control of aflatoxin production in corn using non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* administered as a bioplastic-based seed coating. **Crop Protection**, v. 107, p. 87–92, maio 2018.

AHLHOLM, J. U. et al. Environmental conditions and host genotype direct genetic diversity of *Venturia ditricha*, a fungal endophyte of birch trees. **Evolution**, v. 56, n. 8, p. 1566–1573, 1 ago. 2002.

ALSHANNAQ, A.; YU, J. H. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 6, p. 632, jun. 2017.

BENOIT, I. et al. Degradation of different pectins by fungi: correlations and contrasts between the pectinolytic enzyme sets identified in genomes and the growth on pectins of different origin. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 321, jul. 2012.

BHARDWAJ, H.; GUPTA, R.; TIWARI, A. Microbial population associated with plastic degradation. Open Access Scientific Reports. **Open Access Scientific Reports**, v. 1, n. 5, 2012.

BILLS, G. F. et al. Discovery of the parnafungins, antifungal metabolites that inhibit mRNA polyadenylation, from the *Fusarium larvarum* complex and other Hypocrealean fungi. **Mycologia**, v. 101, n. 4, p. 449–772, 2009.

BLOUNT, W. P. Turkey X Disease. **Journal of British Turkey Federation**, v. 8, n. 52, p. 52–61, 1961.

BRÄSE, S. et al. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. **Chemical reviews**, v. 109, n. 9, p. 3903–90, set. 2009.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A Method for designing primer sets for speciation studies in filamentous Ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553, maio 1999.

CARD, S. et al. Deciphering endophyte behaviour: the link between endophyte biology and efficacious biological control agents. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 8, p. fiw114, ago. 2016.

CARRIM, A. J. I.; BARBOSA, E. C.; VIEIRA, J. D. G. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 353–359, 2006.

CHOWDHURY, N. S. et al. Cytotoxic naphthoquinone and azaanthraquinone derivatives from an endophytic *Fusarium solani*. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 4, p. 1173–1177, abr. 2017.

CORRÊA, R. C. G. et al. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467–1478, out. 2014.

CROUCH, J. A.; CLARKE, B. B.; HILLMAN, B. I. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored

graminicolous *Colletotrichum* group. **Mycologia**, v. 101, n. 5, p. 648–656, set. 2009.

DA SILVA, F. C. et al. Use of a polyphasic approach including MALDI-TOF MS for identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from food commodities in Brazil. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 2119–2129, 15 dez. 2015.

DAR, R. A. et al. Isolation, purification and characterization of carboxymethyl cellulase (CMCase) from endophytic *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin. v. 1, n. 4, p. 91–96, 2013.

EL-BATAL, A. I.; OSMAN, E. M.; SHAIMA, I. A. M. Optimization and characterization of polygalacturonase enzyme produced by gamma irradiated *Penicillium citrinum*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 336–347, 2013.

FATEMA, U. et al. Functional analysis of polyketide synthase genes in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 15009, dez. 2018.

FENG, J. et al. Analysis of a *Blumeria graminis* -Secreted lipase reveals the importance of host epicuticular wax components for fungal adhesion and development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, n. 12, p. 1601–1610, dez. 2009.

FERREIRA, F. L. et al. Sugarcane bagasse as a source of carbon for enzyme production by filamentous fungi. **Hoehnea**, v. 45, n. 1, p. 134–142, jan. 2018.

FONSECA, Á.; INÁCIO, J. Phylloplane Yeasts. In: **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006. p. 263–301.

FOUILLAUD, M. et al. Anthraquinones and derivatives from marine-derived fungi: structural diversity and selected biological activities. **Marine Drugs**, v. 14, n. 4, p. 64, mar. 2016.

GESSLER, N. N.; EGOROVA, A. S.; BELOZERSKAYA, T. A. Fungal anthraquinones. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 85–99, mar. 2013.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323–30, abr. 1995.

GLOER, J. B. Applications of fungal ecology in the search for new bioactive natural products. In: **Environmental and Microbial Relationships**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 257–283.

GOPINATH, S. C. B. et al. Biotechnological processes in microbial amylase production. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–9, fev. 2017.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597, maio 1975.

HASHEM, M. Isolation of mycotoxin-producing fungi from fishes growing in aquacultures. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 862–872, dez. 2011.

HE, K. Y. et al. New chlorinated xanthone and anthraquinone produced by a mangrove-derived fungus *Penicillium citrinum* HL-5126. **Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 7, p. 823–827, jul. 2017.

HEERD, D. et al. Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. in solid-state fermentation: A comparative study. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 2, p. 102–110, abr. 2012.

IQBAL, M. et al. Comparative evolutionary histories of fungal proteases reveal gene gains in the mycoparasitic and nematode-parasitic fungus *Clonostachys rosea*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 18, n. 1, p. 171, dez. 2018.

JURJEVIC, Z.; PETERSON, S. W.; HORN, B. W. *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus dNA sequence based phylogeny. **IMA Fungus**, v. 3, n. 1, p. 59–795, jun. 2012.

KASANA, R. C. et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 503–507, nov. 2008.

KAWAI, K. et al. Averufin, an anthraquinone mycotoxin possessing a potent uncoupling effect on mitochondrial respiration. **Applied and environmental microbiology**, v. 47, n. 3, p. 481–3, mar. 1984.

KHAMTHONG, N. et al. Bioactive polyketides from the sea fan-derived fungus *Penicillium citrinum* PSU-F51. **Tetrahedron**, v. 68, p. 8245–8250, 2012.

KHAN, N. et al. Endophytic *Fusarium solani*: A rich source of cytotoxic and antimicrobial naphthaquinone and aza-anthraquinone derivatives. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 970–976, jan. 2018.

KHOKHAR, I.; MUKHTAR, I.; MUSHTAQ, S. Comparative studies on the amylase and cellulase production of *Aspergillus* and *Penicillium*. **J. Appl. Sci. Environ.**, v. 15, n. 4, p. 657–661, 2011.

KLAIKLAY, S. et al. Anthraquinone derivatives from the mangrove-derived fungus *Phomopsis* sp. PSU-MA214. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 4, p. 738–742, dez. 2012.

LAHLALI, R.; HIJRI, M. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. **FEMS Microbiology Letters**, n. 311, p. 152–159, 2010.

LANE, R. et al. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 649–655, 2006.

LATZ, M. A. C. et al. Endophytic fungi as biocontrol agents: elucidating mechanisms in disease suppression. **Plant Ecology & Diversity**, p. 1–13, nov. 2018.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 1, p. 242–245, jul. 2016.

LI, J. et al. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 925–929, abr. 2006.

LI, X.-J. et al. Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus associated with *Melia azedarach*, and their antifungal, antifeedant, and toxic activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 13, p. 3424–3431, abr. 2012.

MARIA, G. L.; SRIDHAR, K. R.; RAVIRAJA, N. S. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. **Journal of Agricultural technology**, v. 1, p. 67-80, 2005.

MASSI, F. P. et al. Brazil nuts are subject to infection with B and G aflatoxin-producing fungus, *Aspergillus pseudonomius*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 186, p. 14–

21, set. 2014.

MEHTA, A.; GROVER, C.; GUPTA, R. Purification of lipase from *Aspergillus fumigatus* using Octyl Sepharose column chromatography and its characterization. **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 857–866, out. 2018.

MELO, I. S. et al. Mycoparasitic nature of *Bionectria* sp. strain 6.21. **Journal of Plant Protection Research**, v. 54, n. 4, 2014.

MOREIRA, G. M. et al. Multilocus phylogeny of *Clonostachys* subgenus *Bionectria* from Brazil and description of *Clonostachys chloroleuca* sp. nov. **Mycological Progress**, v. 15, n. 10–11, p. 1031–1039, 5 out. 2016.

MOUSA, W. K. et al. An endophytic fungus isolated from finger millet (*Eleusine coracana*) produces anti-fungal natural products. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1157, out. 2015.

MOUSA, W. K.; RAIZADA, M. N. Natural Disease Control in Cereal Grains. In: **Encyclopedia of Food Grains**. 2016. p. 257–263.

MOUSA, W.; SCHWAN, A.; RAIZADA, M. Characterization of antifungal natural products isolated from endophytic fungi of finger millet (*Eleusine coracana*). **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1171, set. 2016.

MUNSELL COLOR. Munsell Soil Color Charts. In: **Munsell Color**. 1975.

MUSZEWSKA, A. et al. Fungal lifestyle reflected in serine protease repertoire. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9147, dez. 2017.

O'DONNELL, K. Fusarium and its Near Relatives. In: **The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics**. Wallingford: CAB International, 1993. p. 225–236.

OLIVEIRA, M. N. et al. Novel anthraquinone derivatives produced by *Pestalotiopsis guepinii*, an endophytic of the medicinal plant *Virola michelii* (Myristicaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 5, p. 993–996, maio 2011.

PANG, X. et al. Metabolites from the plant endophytic fungus *Aspergillus* sp. CICC 400735 and their anti-HIV activities. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 10, p. 2595–2601, out. 2017.

PARK, S.-Y. et al. Citrinin, a mycotoxin from *Penicillium citrinum*, plays a role in inducing motility of *Paenibacillus polymyxa*. 2008.

PASSARINI, M. R. Z. et al. Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Drumacidon reticulatum*. **Archives of Microbiology**, v. 195, n. 2, p. 99–111, fev. 2013.

PRIOR, R.; FEIGE, A.; BEGEROW, D. Antagonistic activity of the phyllosphere fungal community. **Sydowia**, v. 69, p. 183–98, 2017.

RAJA, H. A. et al. Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. **Journal of natural products**, v. 80, n. 3, p. 756–770, 2017.

ROSENBERG, E.; ZILBER-ROSENBERG, I. The hologenome concept of evolution after 10 years. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 78, dez. 2018.

RUSSELL, J. R. et al. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 17, p. 6076–6084, set. 2011.

- SAITO, M.; MACHIDA, S. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. **Mycoscience**, v. 40, n. 2, p. 205–208, abr. 1999.
- SANDE, D. et al. Production of omega 3, 6, and 9 fatty acids from hydrolysis of vegetable oils and animal fat with *Colletotrichum gloeosporioides* lipase. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 537–545, nov. 2017.
- SARMA, P. et al. Diversity of endophytic fungi associated with the medicinally important aromatic plant *Gaultheria fragrantissima*. **Studies in Fungi**, v. 3, n. 1, p. 309–320, 2018.
- SAXENA, J. et al. Isolation and characterization of neutral proteases producing soil fungus *Cladosporium* sp. PAB2014 Strain FGCC/BLS2: process optimization for improved enzyme production. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 76, p. 707–713, 2017.
- SCHMOLL, M. Regulation of plant cell wall degradation by light in *Trichoderma*. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 10, 2018.
- SELIM, K. A. et al. Antiviral and antioxidant potential of fungal endophytes of egyptian medicinal plants. **Fermentation**, v. 4, p. 49, 2018.
- SETHI, B. K. et al. Production of α -amylase by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using pearl millet and its structural characterization. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 639, maio 2016.
- SEYEDMOUSAVI, S. et al. *Aspergillus* and aspergilloses in wild and domestic animals: A global health concern with parallels to human disease. **Medical Mycology**, v. 53, n. 8, p. 765–797, 2015.
- SILVA, F. C. al. Use of a polyphasic approach including MALDI-TOF MS for identification of *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from food commodities in Brazil. **Annals of microbiology**, v. 65, n. 4, p. 2119-2129, 2015.
- SOBAGIAH, V. et al. Screening and assay of extracellular enzymes in *Phomopsis azadirachtae* causing die-back disease of neem. 2013.
- SOUZA, P. M. DE et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015.
- SOUZA, P. M. DE; MAGALHÃES, P. DE O. E. Application of microbial α -amylase in industry - a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850–861, out. 2010.
- SREEVIDYA, M.; GOPALAKRISHNAN, S. *Penicillium citrinum* VFI-51 as biocontrol agent to control charcoal rot of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 19, p. 669–674, 2016.
- STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 382–385, out. 1998.
- SUN, X.; GUO, L. D. Endophytic fungal diversity: Review of traditional and molecular techniques. **Mycology**, 2012.
- SUNITHA, V. H.; DEVI, D. N.; SRINIVAS, C. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2013.

TAMURA, Koichiro et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TOGHUEO, R. M. K. et al. Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Cananga odorata*. **South African Journal of Botany**, v. 109, p. 146–153, mar. 2017.

VALENTE, L.; SANTOS, I.; LIMA, N. Implementação de técnicas para avaliação do potencial degradativo de compostos naturais por fungos. In: VALENTE, L.; SANTOS, I.; LIMA, N. (Eds.). **Ecologia dos Fungos**. Braga: Micoteca da Universidade do Minho, 2002. p. 67–82.

VARGA, J.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section Flavi. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 57–80, jun. 2011.

VIEGAS, C. et al. Sterigmatocystin in foodstuffs and feed: aspects to consider. **Mycology**, p. 1–15, 2018.

VIVAS, J. M. S. et al. Antagonism of fungi with biocontrol potential of papaya black spot caused by *Asperisporium caricae*. **Australian Journal of Crop Science**, v. 12, n. 5, p. 827–833, maio 2018.

WANG, S. et al. Characterization of a starch-hydrolyzing α -amylase produced by *Aspergillus niger* WLB42 mutated by ethyl methanesulfonate treatment. **International Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2016.

WEE, J.; DAY, D. M.; LINZ, J. E. Effects of zinc chelators on aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. **Toxins**, v. 8, n. 6, 2016.

XU, L. et al. Antibacterial and antifungal compounds from marine fungi. **Marine Drugs**, v. 13, n. 6, p. 3479–3513, jun. 2015.

YILMAZ, N. et al. Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. **Persoonia**, v. 29, p. 39–54, dez. 2012.

ZANON, M. S. A.; CLEMENTE, M. P.; CHULZE, S. N. Characterization and competitive ability of non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolated from the maize agro-ecosystem in Argentina as potential aflatoxin biocontrol agents. **International journal of food microbiology**, v. 277, p. 58–63, jul. 2018.

ZOU, C. G. et al. Expression of a serine protease gene prCIs up-regulated by oxidative stress in the fungus *Clonostachys rosea*: Implications for fungal survival. **PLOS ONE**, v. 5, n. 10, p. e13386, out. 2010.

16. Material Suplementar

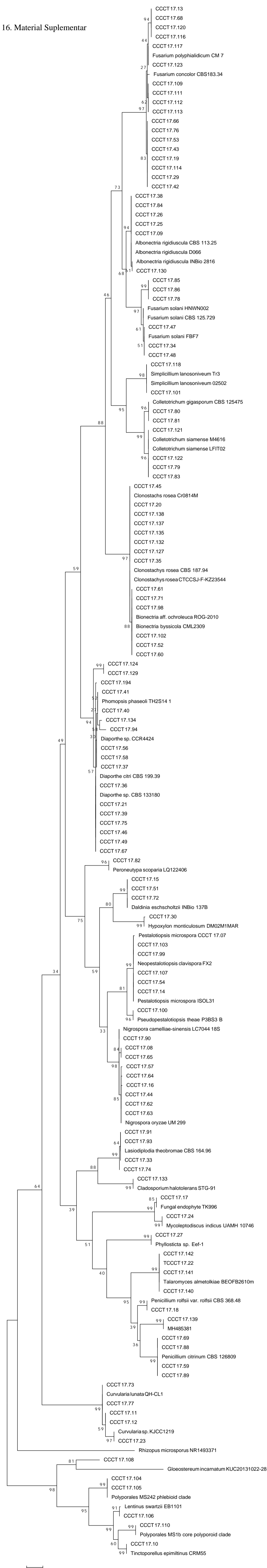


Figura suplementar 4. Análise filogenética pelo método de máxima verossimilhança de fungos endofíticos do guaraná baseada na região ITS1 e ITS4 do rDNA.

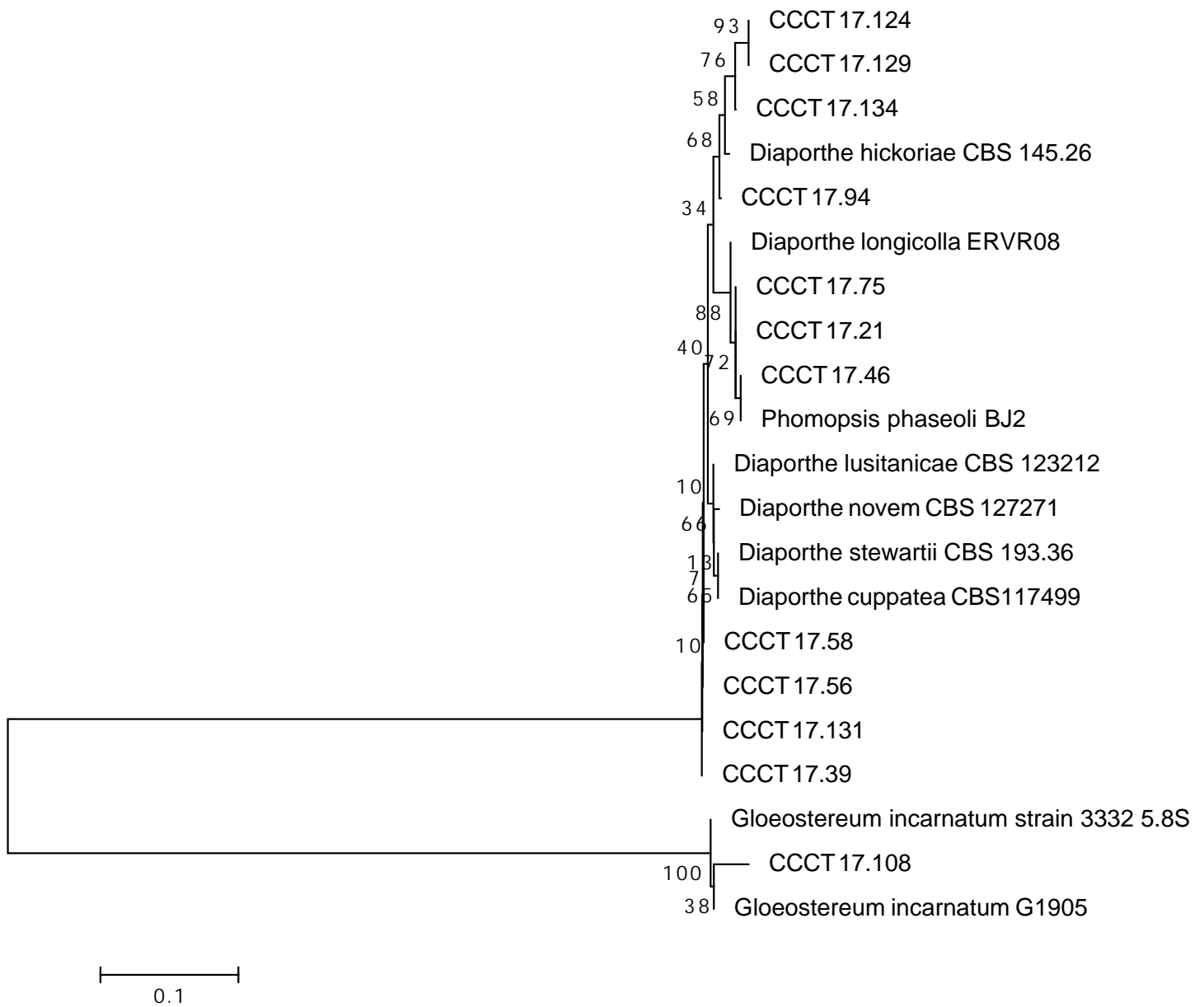


Figura suplementar 5. Análise filogenética pelo método de máxima verossimilhança de fungos endofíticos do guaraná baseada na região Large Subunit do rDNA.

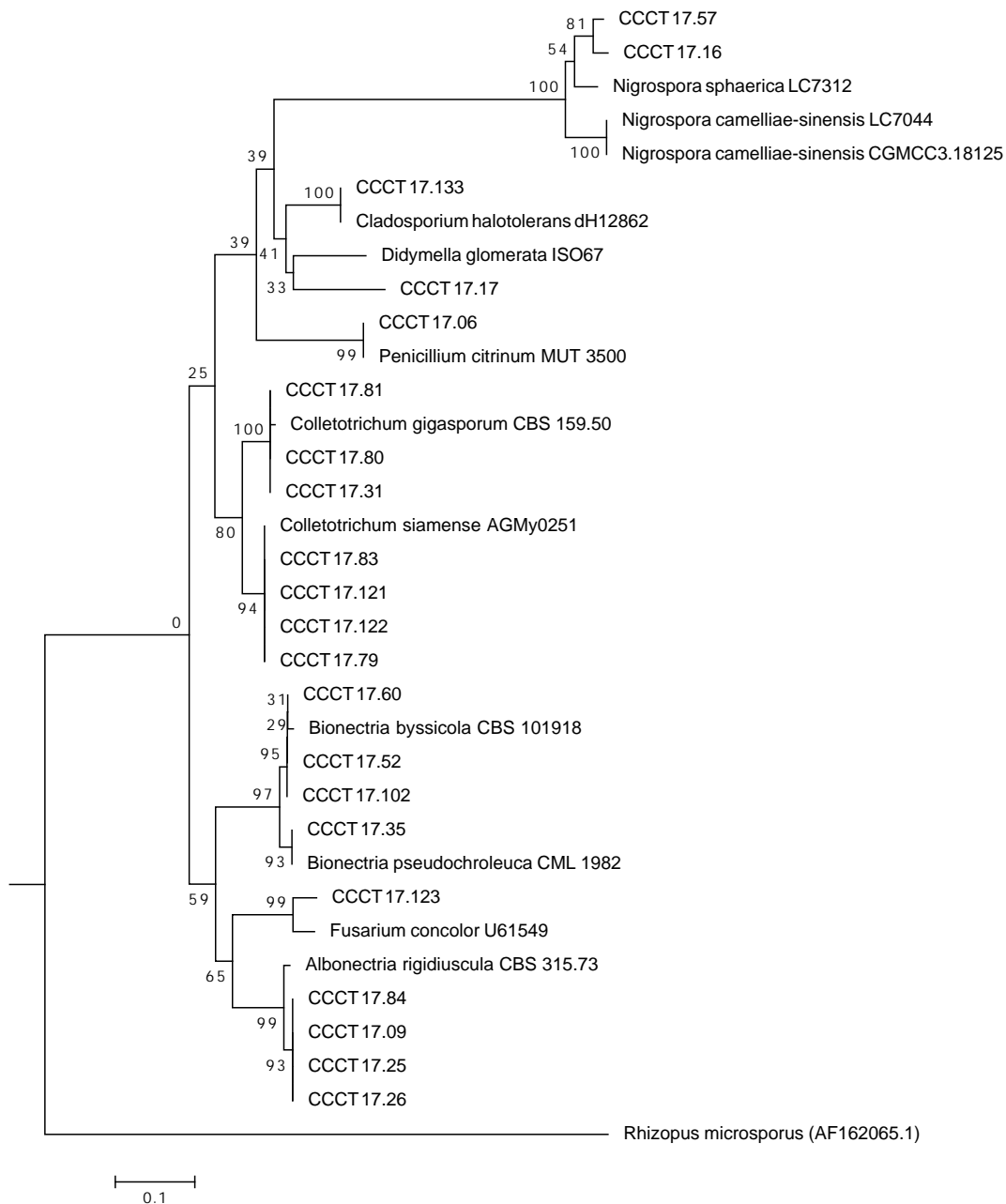


Figura suplementar 6. Análise filogenética pelo método de máxima verossimilhança de fungos endofíticos do guaraná baseada na região β -tubulina do rDNA.

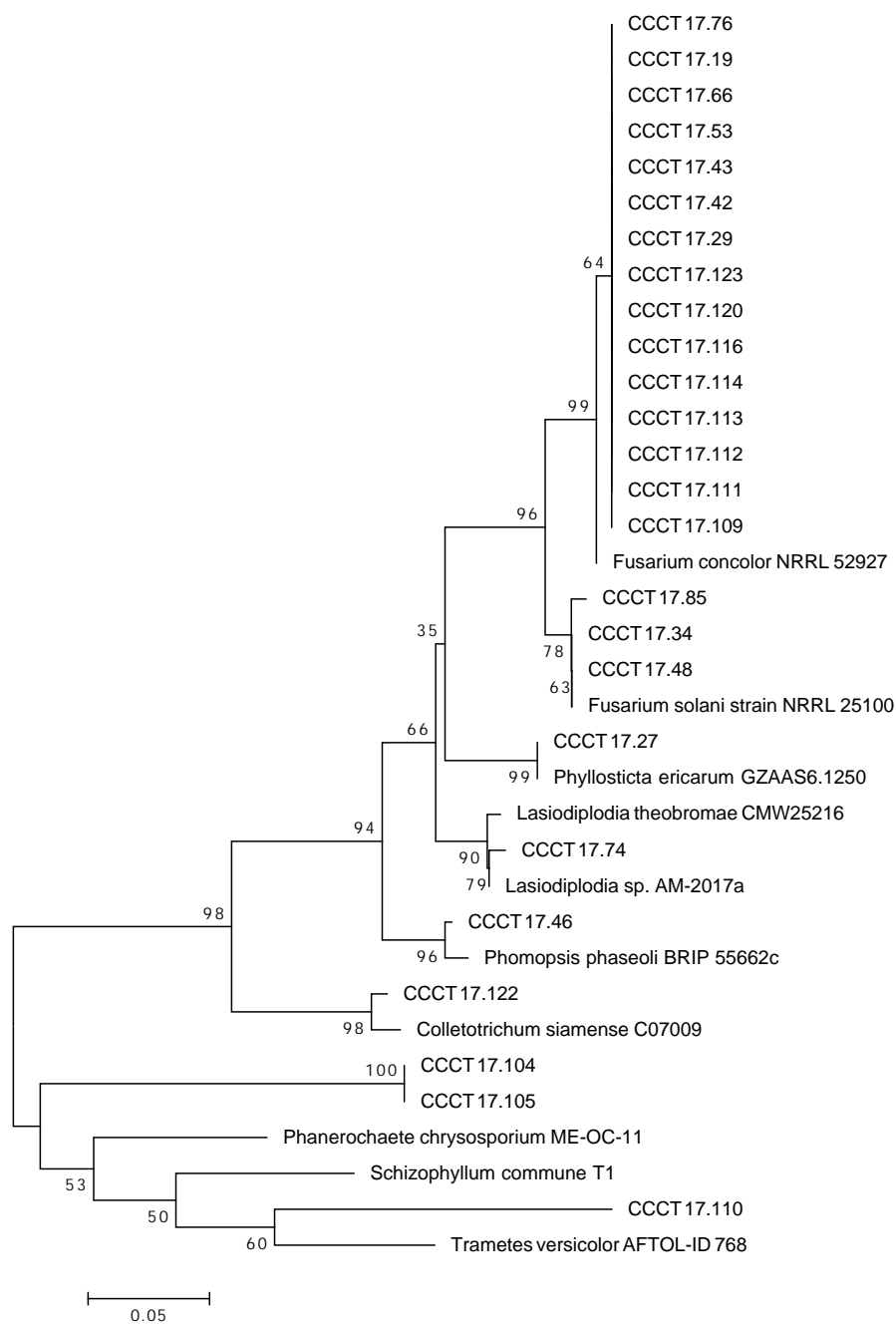


Figura suplementar 7. Análise filogenética pelo método de máxima verossimilhança de fungos endofíticos do guaraná baseada na região fator de elongação 1 α do rDNA.

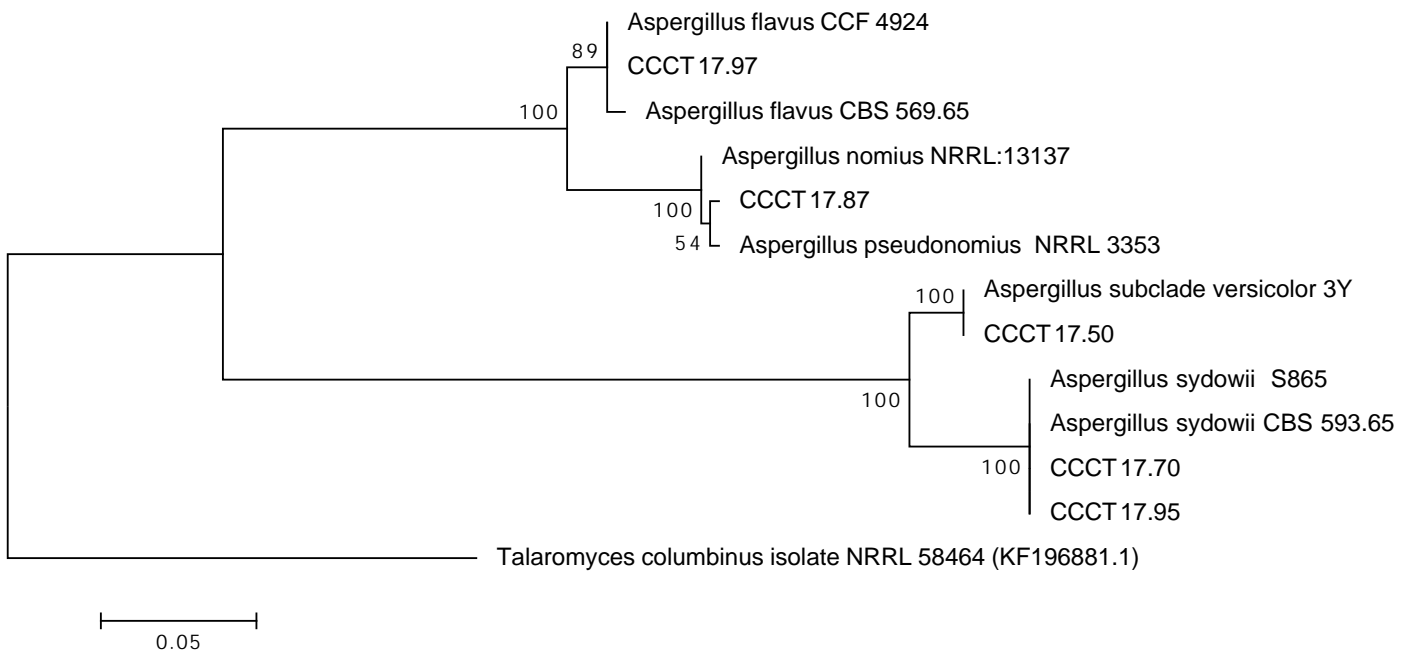


Figura suplementar 8. Análise filogenética pelo método de máxima verossimilhança de fungos endofíticos do guaraná baseada na região calmodulina do rDNA.

Tabela 4. Similaridade das sequências de fungos endofíticos e sequências oriundas do GenBank (NCBI).

Código CCCT	Região	Isolado GenBank	Cobertura (%)	Identidade (%)	Código NCBI	Identificação
Albonectria rigidiuscula CCCT 17.09	ITS	D066	100,0	99,8	KU377446.1	Albonectria rigidiuscula
Albonectria rigidiuscula CCCT 17.130	ITS	D066	100,0	100,0	KU377446.1	Albonectria rigidiuscula
Albonectria rigidiuscula CCCT 17.25	ITS	D066	100,0	99,8	KU377446.1	Albonectria rigidiuscula
Albonectria rigidiuscula CCCT 17.26	ITS	CBS 113.25	100,0	99,8	MH854804.1	Albonectria rigidiuscula
Albonectria rigidiuscula CCCT 17.38	ITS	INBio:2816C	100,0	99,8	KR534720.1	Albonectria rigidiuscula
Albonectria rigidiuscula CCCT 17.84	ITS	D066	100,0	99,8	KU377446.1	Albonectria rigidiuscula
Aspergillus flavus CCCT 17.139	ITS	MH485381	100,0	99,8	MH485381.1	Aspergillus flavus
Bionectria aff. ochroleuca CCCT 17.61	ITS	ROG-2010	100,0	100,0	HQ022466.1	Bionectria aff. ochroleuca
Bionectria aff. ochroleuca CCCT 17.71	ITS	ROG-2010	100,0	99,8	HQ022466.1	Bionectria aff. ochroleuca
Bionectria aff. ochroleuca CCCT 17.98	ITS	ROG-2010	100,0	99,8	HQ022466.1	Bionectria aff. ochroleuca
Bionectria byssicola CCCT 17.102	ITS	AE-2013	100,0	100,0	KF746152.1	Bionectria sp.
Bionectria byssicola CCCT 17.52	ITS	AE-2013	100,0	99,6	KF746152.1	Bionectria sp.
Bionectria byssicola CCCT 17.60	ITS	AE-2013	100,0	100,0	KF746152.1	Bionectria sp.
Bionectria pseudochroleuca CCCT 17.35	ITS	Papochf 04	100,0	100,0	HQ731632.1	Bionectria sp.
Cladosporium halotolerans CCCT 17.133	ITS	STG-91	100,0	100,0	MK265717.1	Cladosporium halotolerans
Clonostachys rosea CCCT 17.127	ITS	CBS 187.94	100,0	100,0	MH862458.1	Clonostachys rosea
Clonostachys rosea CCCT 17.132	ITS	CBS 187.94	100,0	100,0	MH862458.1	Clonostachys rosea
Clonostachys rosea CCCT 17.135	ITS	CBS 187.94	100,0	100,0	MH862458.1	Clonostachys rosea
Clonostachys rosea CCCT 17.137	ITS	CBS 187.94	100,0	100,0	MH862458.1	Clonostachys rosea
Clonostachys rosea CCCT 17.138	ITS	CBS 187.94	100,0	100,0	MH862458.1	Clonostachys rosea
Clonostachys rosea CCCT 17.20	ITS	Cr0814M	100,0	1000,0	KP670432.1	Clonostachys rosea
Clonostachys rosea CCCT 17.45	ITS	X136	100,0	1000,0	MK304073.1	Clonostachys rosea
Colletotrichum gigasporum CCCT 17.80	ITS	AHGB10_3A	100,0	99,6	MH267871.1	Colletotrichum sp.
Colletotrichum gigasporum CCCT 17.81	ITS	AHGB10_3A	100,0	99,6	MH267871.1	Colletotrichum sp.

Colletotrichum siamense CCCT 17.121	ITS	BH23	100,0	100,0	MH700456.1	Colletotrichum gloeosporioides
Colletotrichum siamense CCCT 17.122	ITS	LFIT02	100,0	100,0	MK299421.1	Colletotrichum siamense
Colletotrichum siamense CCCT 17.79	ITS	SC12e	100,0	100,0	MG461659.1	Colletotrichum gloeosporioides
Colletotrichum siamense CCCT 17.83	ITS	BH23	100,0	100,0	MH700456.1	Colletotrichum gloeosporioides
Curvularia lunata CCCT 17.11	ITS	E12	100,0	100,0	MH183196.1	Curvularia lunata
Curvularia lunata CCCT 17.12	ITS	CL16-754	100,0	100,0	MH845438.1	Curvularia lunata
Curvularia lunata CCCT 17.77	ITS	QH-CL1	100,0	100,0	KR815445.1	Curvularia lunata
Curvularia sp. CCCT 17.73	ITS	KJCC1219	100,0	100,0	MF038179.1	Curvularia sp.
Curvularia sp. CCCT 17.23	ITS	KJCC1219	100,0	100,0	MF038179.1	Curvularia sp.
Daldinia eschscholtzii CCCT 17.15	ITS	084_04_01	100,0	99,8	MK224454.1	Daldinia eschscholtzii
Daldinia eschscholtzii CCCT 17.51	ITS	INBio:137B	100,0	99,8	KU204494.1	Daldinia eschscholtzii
Daldinia eschscholtzii CCCT 17.72	ITS	INBio:137B	100,0	100,0	KU204494.1	Daldinia eschscholtzii
Diaporthe citri CCCT 17.194	ITS	CBS 199.39	99,0	99,4	KC343051.1	Diaporthe citri
Diaporthe citri CCCT 17.36	ITS	CBS 199.39	99,0	99,8	KC343051.1	Diaporthe citri
Diaporthe sp. CCCT 17.21	ITS	B16.795	100,0	99,2	MG870508.1	Diaporthe sp.
Diaporthe sp. CCCT 17.39	ITS	CBS 133180	99,0	99,2	NR_111862.1	Diaporthe sp.
Diaporthe sp. CCCT 17.56	ITS	CCR4424	100,0	99,6	MF070237.1	Diaporthe sp.
Diaporthe sp. CCCT 17.58	ITS	CCR4424	100,0	99,6	MF070237.1	Diaporthe sp.
Diaporthe/Phomopsis CCCT 17.124	ITS	TS-104	100,0	100,0	MG832524.1	Diaporthe lithocarpus
Diaporthe/Phomopsis CCCT 17.129	ITS	TS-104	100,0	100,0	MG832524.1	Diaporthe lithocarpus
Diaporthe/Phomopsis CCCT 17.131	ITS	CCR4423	100,0	100,0	MF070237.1	Diaporthe novem
Diaporthe/Phomopsis CCCT 17.134	ITS	ARIZ:PS0673	100,0	99,4	KU977877.1	Fungal sp.
Diaporthe/Phomopsis CCCT 17.75	ITS	B114.539	100,0	99,0	MG870469.1	Diaporthe sp.
Diaporthe/Phomopsis CCCT 17.94	ITS	LGMF1616	99,0	99,8	MG976419.1	Diaporthe sp.
Fungal sp. CCCT 17.17	ITS	TK996	100,0	99,8	KF436105.1	Fungal endophyte
Fusarium concolor CCCT 17.109	ITS	HCH-79	100,0	99,8	MK307655.1	Fusarium sp.

Fusarium concolor CCCT 17.111	ITS	E2124D	99,0	99,8	KT996027.1	Fungal sp.
Fusarium concolor CCCT 17.112	ITS	HCH-72	100,0	99,8	MK307656.1	Fusarium sp.
Fusarium concolor CCCT 17.113	ITS	HCH-72	100,0	99,8	MK307656.1	Fusarium sp.
Fusarium concolor CCCT 17.114	ITS	C6 MLB-2013	100,0	100,0	KC847983.1	Fusarium sp.
Fusarium concolor CCCT 17.116	ITS	ARIZ:P0305	100,0	100,0	KU978422.1	Fungal sp.
Fusarium concolor CCCT 17.120	ITS	CBS183.34	100,0	97,7	MH855479.1	Fusarium concolor
Fusarium concolor CCCT 17.19	ITS	C11 MLB-2013	100,0	100,0	KC847985.1	Fusarium sp.
Fusarium concolor CCCT 17.29	ITS	CBS183.34	100,0	97,7	MH855479.1	Fusarium concolor
Fusarium concolor CCCT 17.42	ITS	TK1791	100,0	100,0	KF435602.1	Fungal endophyte
Fusarium concolor CCCT 17.43	ITS	CBS183.34	100,0	97,9	MH855479.1	Fusarium concolor
Fusarium concolor CCCT 17.53	ITS	C6 MLB-2013	100,0	100,0	KC847983.1	Fusarium sp.
Fusarium concolor CCCT 17.66	ITS	CBS183.34	100,0	97,9	MH855479.1	Fusarium concolor
Fusarium concolor CCCT 17.76	ITS	C11 MLB-2013	100,0	100,0	KC847985.1	Fusarium sp.
Fusarium polyphialidicum CCCT 17.117	ITS	NRRL 13459	99,0	99,7	NR_144930.1	Fusarium polyphialidicum
Fusarium polyphialidicum CCCT 17.13	ITS	NRRL 13459	97,0	98,0	NR_144930.1	Fusarium polyphialidicum
Fusarium polyphialidicum CCCT 17.68	ITS	C11 MLB-2013	100,0	100,0	KC847985.1	Fusarium sp.
Fusarium solani CCCT 17.34	ITS	FBF7	100,0	100,0	MK317963.1	Fusarium solani
Fusarium solani CCCT 17.47	ITS	AJP08	100,0	99,0	MG976238.1	Fusarium solani
Fusarium solani CCCT 17.48	ITS	FBF7	100,0	100,0	MK317963.1	Fusarium solani
Fusarium solani CCCT 17.78	ITS	HHNDZ01	100,0	95,0	KT184393.1	Fusarium solani
Fusarium solani CCCT 17.85	ITS	HNWN002	100,0	95,0	MH153780.1	Fusarium solani
Fusarium solani CCCT 17.86	ITS	HHNDZ01	100,0	95,0	T184393.1	Fusarium solani
Fusarium sp. CCCT 17.123	ITS	HCH-79	100,0	99,0	MK307655.1	Fusarium sp.
Gloeostereum incarnatum CCCT 17.108	ITS	CM198	95,0	98,0	KJ831826.1	Gloeostereum sp.
Hypoxyton monticulosum CCCT 17.30	ITS	DM02M1MAR	100,0	99,8	MG747470.1	Hypoxyton monticulosum
Lasiodiplodia sp. CCCT 17.74	ITS	isolate 1	100,0	97,0	MG388093.1	Lasiodiplodia sp.

Lasiodiplodia theobromae CCCT 17.33	ITS	CBS 164.96	100,0	100,0	NR_111174.1	Lasiodiplodia theobromae
Lasiodiplodia theobromae CCCT 17.91	ITS	L1	100,0	100,0	MK542377.1	Lasiodiplodia theobromae
Lasiodiplodia theobromae CCCT 17.93	ITS	CBS 164.96	100,0	100,0	NR_111174.1	Lasiodiplodia theobromae
Lentinus swartzii CCCT 17.106	ITS	EB1101	100,0	99,3	KT956124.1	Lentinus swartzii
Mycoleptodiscus indicus CCCT 17.24	ITS	UAMH 10746	100,0	99,5	GU980698.1	Mycoleptodiscus indicus
Neopestalotiopsis clavispora CCCT 17.99	ITS	11G28	100,0	100,0	LC387826.1	Fungal sp.
Nigrospora camelliae-sinensis CCCT 17.90	ITS	LC7044	100,0	100,0	KX986095.1	Nigrospora camelliae-sinensis
Nigrospora oryzae CCCT 17.08	ITS	A302	100,0	100,0	MK247676.1	Nigrospora oryzae
Nigrospora oryzae CCCT 17.16	ITS	F5	100,0	100,0	EF564154.1	Nigrospora sp.
Nigrospora oryzae CCCT 17.44	ITS	F5	100,0	100,0	EF564154.1	Nigrospora sp.
Nigrospora oryzae CCCT 17.62	ITS	UM 299	100,0	99,0	JX966550.1	Nigrospora oryzae
Nigrospora oryzae CCCT 17.63	ITS	UM 299	100,0	99,6	JX966550.1	Nigrospora oryzae
Nigrospora oryzae CCCT 17.64	ITS	UM 299	100,0	99,8	JX966550.1	Nigrospora oryzae
Nigrospora oryzae CCCT 17.65	ITS	AQ14	100,0	100,0	MH884155.1	Nigrospora sp.
Nigrospora sp. CCCT 17.57	ITS	Herb-1450	100,0	99,8	KT289556.1	Fungal sp.
Penicillium citrinum CCCT 17.28	ITS	ercha5	100,0	100,0	MK288153.1	Penicillium citrinum
Penicillium citrinum CCCT 17.59	ITS	AHF6	100,0	100,0	MK530518.1	Penicillium citrinum
Penicillium citrinum CCCT 17.69	ITS	AHF6	100,0	100,0	MK530518.1	Penicillium citrinum
Penicillium citrinum CCCT 17.88	ITS	CBS 126809	100,0	100,0	MH864240.1	Penicillium citrinum
Penicillium citrinum CCCT 17.89	ITS	CBS 126809	100,0	100,0	MH864240.1	Penicillium citrinum
Penicillium rolfsii CCCT 17.18	ITS	CBS 368.48	100,0	100,0	MH856397.1	Penicillium rolfsii var. rolfsii
Peroneutypa scoparia CCCT 17.82	ITS	LQ122406	100,0	100,0		Peroneutypa scoparia
Pestalotiopsis microspora CCCT 17.07	ITS	ISOL31	100,0	99,8	MK120574.1	Pestalotiopsis microspora
Pestalotiopsis microspora CCCT 17.103	ITS	ISOL31	100,0	99,8	MK120574.1	Pestalotiopsis microspora
Pestalotiopsis microspora CCCT 17.107	ITS	ISOL31	100,0	100,0	MK120574.1	Pestalotiopsis microspora
Pestalotiopsis microspora CCCT 17.14	ITS	ISOL31	100,0	100,0	MK120574.1	Pestalotiopsis microspora

<i>Pestalotiopsis microspora</i> CCCT 17.54	ITS	Gangmei2	100,0	100,0	MG820124.1	<i>Pestalotiopsis microspora</i>
<i>Phomopsis phaseoli</i> CCCT 17.37	ITS	ISO8.1.1	100,0	100,0	KP133195.1	<i>Phomopsis phaseoli</i>
<i>Phomopsis phaseoli</i> CCCT 17.40	ITS	TH2S14	100,0	100,0	KX355829.1	<i>Phomopsis phaseoli</i>
<i>Phomopsis phaseoli</i> CCCT 17.41	ITS	TH2S14	100,0	100,0	KX355829.1	<i>Phomopsis phaseoli</i>
<i>Phomopsis phaseoli</i> CCCT 17.46	ITS	M31	100,0	99,6	MG748659.1	<i>Phomopsis phaseoli</i>
<i>Phomopsis phaseoli</i> CCCT 17.49	ITS	D002	100,0	99,4	KU377473.1	<i>Phomopsis phaseoli</i>
<i>Phomopsis phaseoli</i> CCCT 17.67	ITS	D002	100,0	99,0	KU377473.1	<i>Phomopsis phaseoli</i>
<i>Phyllosticta ericarum</i> CCCT 17.27	ITS	Eef-1	100,0	100,0	MK120854.1	<i>Phyllosticta</i> sp.
Polyporales CCCT 17.104	ITS	MS242	100,0	99,8	KJ831919.1	Polyporales 'phleboid clade'
Polyporales CCCT 17.105	ITS	MS242	100,0	99,8	KJ831919.1	Polyporales 'phleboid clade'
Polyporales CCCT 17.110	ITS	MS1b	100,0	100,0	KJ831907.1	Polyporales 'core polyporoid clade'
<i>Pseudopestalotiopsis theae</i> CCCT 17.100	ITS	P3BS3_B	100,0	100,0	MK120119.1	<i>Pseudopestalotiopsis theae</i>
<i>Simplicillium lanosoniveum</i> CCCT 17.101	ITS	Tr3	100,0	100,0	MG026635.1	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>
<i>Simplicillium lanosoniveum</i> CCCT 17.118	ITS	Tr3	100,0	100,0	MG026635.1	<i>Simplicillium lanosoniveum</i>
<i>Talaromyces amestolkiae</i> CCCT 17.140	ITS	BEOFB2610m	100,0	100,0	MH630052.1	<i>Talaromyces amestolkiae</i>
<i>Talaromyces amestolkiae</i> CCCT 17.141	ITS	BEOFB2610m	100,0	100,0	MH630052.1	<i>Talaromyces amestolkiae</i>
<i>Talaromyces amestolkiae</i> CCCT 17.142	ITS	BEOFB2610m	100,0	100,0	MH630052.1	<i>Talaromyces amestolkiae</i>
<i>Talaromyces amestolkiae</i> CCCT 17.22	ITS	BEOFB2610m	100,0	100,0	MH630052.1	<i>Talaromyces amestolkiae</i>
<i>Tinctoporellus epimiltinus</i> CCCT 17.10	ITS	CRM55	100,0	100,0	KY948720.1	<i>Tinctoporellus epimiltinus</i>
<i>Albonectria rigidiuscula</i> CCCT 17.84	BenA	6939	100	99,6	HM054098.1	<i>Albonectria rigidiuscula</i>
<i>Albonectria rigidiuscula</i> CCCT 17.09	BenA	6939	100	99,6	HM054098.1	<i>Albonectria rigidiuscula</i>
<i>Albonectria rigidiuscula</i> CCCT 17.25	BenA	6939	100	99,6	HM054098.1	<i>Albonectria rigidiuscula</i>
<i>Albonectria rigidiuscula</i> CCCT 17.26	BenA	CBS 315.73	100	98,8	KM232071.1	<i>Albonectria rigidiuscula</i>
<i>Aspergillus flavus</i> CCCT 17.97	CAL	CCF 4924	100	100	LT558731.1	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Aspergillus pseudonomius</i> CCCT 17.87	CAL	NRRL 3353	100	100	EF661529.1	<i>Aspergillus pseudonomius</i>

<i>Aspergillus sydowii</i> CCCT 17.55	CAL	S865	100	100	LT594404.1	<i>Aspergillus sydowii</i>
<i>Aspergillus sydowii</i> CCCT 17.70	CAL	S865	100	100	LT594404.1	<i>Aspergillus sydowii</i>
<i>Aspergillus sydowii</i> CCCT 17.95	CAL	S865	100	100	LT594404.1	<i>Aspergillus sydowii</i>
<i>Aspergillus versicolor</i> subclade CCCT 17.50	CAL	3Y	100	100	MH109158.1	<i>Aspergillus</i> subclade <i>versicolor</i>
<i>Bionectria byssicola</i> CCCT 17.102	Bt2b	HMAS 172156	100	99	HM054127.1	<i>Bionectria</i> sp.
<i>Bionectria byssicola</i> CCCT 17.52	BenA	HMAS 172156	100	100	HM054127.1	<i>Bionectria</i> sp.
<i>Bionectria byssicola</i> CCCT 17.60	BenA	CBS 101918	100	99	AF358150.1	<i>Bionectria byssicola</i>
<i>Bionectria pseudochroleuca</i> CCCT 17.35	Bt2b	CML 1982	100	100	KF871165.1	<i>Clonostachys pseudochroleuca</i>
<i>Cladosporium halotolerans</i> CCCT 17.133	BenA	dH12862	100	100	EF101422.1	<i>Cladosporium halotolerans</i>
<i>Colletotrichum gigasporum</i> CCCT 17.31	Bt2b	CBS 159.50	100	99	KF687867.1	<i>Colletotrichum gigasporum</i>
<i>Colletotrichum gigasporum</i> CCCT 17.80	BenA	COUFAL0008	100	99	KY021263.1	<i>Colletotrichum gigasporum</i>
<i>Colletotrichum gigasporum</i> CCCT 17.81	BenA	COUFAL0008	100	98	KY021263.1	<i>Colletotrichum gigasporum</i>
<i>Colletotrichum gigasporum</i> CCCT 17.83	BenA	AGMy0251	100	100	KX578818.1	<i>Colletotrichum siamense</i>
<i>Colletotrichum siamense</i> CCCT 17.121	Bt2b	AGMy0251	100	100	KX578818.1	<i>Colletotrichum siamense</i>
<i>Colletotrichum siamense</i> CCCT 17.122	EF1c/E F6	C07009	100	97	GU935840.1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
<i>Colletotrichum siamense</i> CCCT 17.122	BenA	AGMy0251	100	100	KX578818.1	<i>Colletotrichum siamense</i>
<i>Colletotrichum siamense</i> CCCT 17.79	Bt2b	AGMy0251	100	100	KX578818.1	<i>Colletotrichum siamense</i>
<i>Diaporthe</i> sp. CCCT 17.124	D1/D2	LC4164	100	100	KY011881.1	<i>Phomopsis</i> sp.
<i>Diaporthe</i> sp. CCCT 17.129	D1/D3	XJLYLW6-27	100	100	MH101515.1	<i>Phomopsis bougainvilleicola</i>
<i>Diaporthe</i> sp. CCCT 17.131	D1/D4	FL1423	100	100	JQ761037.1	<i>Sordariomycetes</i> sp.
<i>Diaporthe</i> sp. CCCT 17.39	D1/D2	FL1423	100	100	JQ761037.1	<i>Sordariomycetes</i> sp.
<i>Diaporthe</i> sp. CCCT 17.56	D1/D2	FL1423	100	100	JQ761037.1	<i>Sordariomycetes</i> sp.
<i>Diaporthe</i> sp. CCCT 17.58	D1/D2	CBS 123212	100	99	MH874803.1	<i>Diaporthe lusitanicae</i>

Diaporthe sp. CCCT 17.75	D1/D2	STRI:ICBG- TK1304	100	100	KF436125.1	Fungal endophyte
Diaporthe sp. CCCT 17.21	D1/D2	STRI:ICBG- TK1304	100	100	KF436125.1	Fungal endophyte
Diaporthe sp. CCCT 17.94	D1/D2	F1896	100	100	KU747834.1	Phomopsis sp.
Fungal sp. CCCT 17.17	BenA	ISO67	90	86	KY407791.1	Didymella glomerata
Fusarium concolor CCCT 17.109	TEF1- α	NRRL 52927	100	96	JF740869.1	Fusarium concolor
Fusarium concolor CCCT 17.111	TEF1- α	NRRL 52927	100	97	JF740869.1	Fusarium concolor
Fusarium concolor CCCT 17.112	TEF1- α	NRRL 52927	100	95	JF740869.1	Fusarium concolor
Fusarium concolor CCCT 17.113	TEF1- α	NRRL 52927	100	96	JF740869.1	Fusarium concolor
Fusarium concolor CCCT 17.114	TEF1- α	NRRL 52927	100	97	JF740869.1	Fusarium concolor
Fusarium concolor CCCT 17.116	TEF1- α	NRRL 52927	100	97	JF740869.1	Fusarium concolor
Fusarium concolor CCCT 17.120	TEF1- α	NRRL 52927	100	96	JF740869.1	Fusarium concolor
Fusarium concolor CCCT 17.123	TEF1- α	NRRL 52927	100	95	JF740869.1	Fusarium concolor
Fusarium concolor CCCT 17.123	BenA	BCCM/IHEM: 19748	100	94	KJ125965.1	Fusarium concolor
Fusarium concolor CCCT 17.29	TEF1- α	NRRL 52927	100	96	JF740869.1	Fusarium concolor
Fusarium concolor CCCT 17.42	TEF1- α	NRRL 52928	100	96	JF740869.2	Fusarium concolor
Fusarium concolor CCCT 17.43	TEF1- α	NRRL 52929	100	96	JF740869.3	Fusarium concolor
Fusarium concolor CCCT 17.53	TEF1- α	NRRL 52929	100	96	JF740869.3	Fusarium concolor
Fusarium concolor CCCT 17.66	TEF1- α	NRRL 52929	100	96	JF740869.3	Fusarium concolor
Fusarium concolor CCCT 17.76	TEF1- α	NRRL 52929	100	96	JF740869.3	Fusarium concolor
Fusarium concolor CCCT 17.19	TEF1- α	NRRL 52929	100	97	JF740869.3	Fusarium concolor
Fusarium solani CCCT 17.34	TEF1- α	NRRL 25100	100	100	JF740727.1	Fusarium solani
Fusarium solani CCCT 17.48	TEF1- α	NRRL 25100	96	99	JF740727.1	Fusarium solani
Fusarium solani CCCT 17.85	TEF1- α	NRRL 52778	96	95	JF740846.1	Fusarium solani
Gloeostereum incarnatum CCCT 17.108	D1/D2	ST3332	100	98	AF141637.1	Gloeostereum incarnatum
Lasiodiplodia sp. CCCT 17.74	TEF1- α	AM-2017a	87	99	KX528570.1	Lasiodiplodia sp.

Nigrospora camelliae-sinensis CCCT 17.90	Bt2b	LC7044	99	100	KY019600.1	Nigrospora camelliae-sinensis
Nigrospora sp. CCCT 17.57	BenA	LC7312	100	89	KY019618.1	Nigrospora sphaerica
Nigrospora sp. CCCT 17.16	BenA	LC7312	100	89	KY019618.1	Nigrospora sphaerica
Penicillium citrinum CCCT 17.06	BenA	MUT 3500	100	100	MH047317.1	Penicillium citrinum
Penicillium citrinum CCCT 17.96	BenA	MUT 3500	100	100	MH047317.1	Penicillium citrinum
Phomopsis phaseoli CCCT 17.46	TEF1- α	BRIP 55662c	61	89	KJ197245.1	Phomopsis phaseoli
Phomopsis phaseoli CCCT 17.46	D1/D2	ERV08	100	99	MK182365.1	Diaporthe longicolla
Phyllosticta ericarum CCCT 17.27	TEF1- α	GZAAS6.1250	88	99	KR025451.1	Phyllosticta ericarum
Polyporales sp. CCCT 17.104	TEF1- α	ME-OC-11	93	84	HQ188384.1	Phanerochaete chrysosporium
Polyporales sp. CCCT 17.105	TEF1- α	T1	97	83	X94913.2	Schizophyllum commune
Polyporales sp. CCCT 17.110	TEF1- α	AFTOL-ID 768	98	87	DQ028603.1	Trametes versicolor

6) **Tabela suplementar 4.** Macromorfologia de fungos endofíticos com descrição da coloração e diâmetro das colônias obtidas de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* provenientes do Amazonas/ Brasil.

Código CCCT	Condições de cultivo ¹	Coloração da colônia fúngica ²			Diâmetro da colônia (mm)
		Frente centro	Frente borda	Verso	
CCCT 17.101	BDA 25	Gley 1 White 8	Gley 1 White 8	Hue 2.5Y Olive Yellow 6.8	82
CCCT 17.102	BDA 25	Hue 2.5Y Pale Yellow 8.2	Hue 2.5Y White 8.1	Hue 2.5Y Yellow 8.6	41
CCCT 17.103	BDA 25	Hue 2.5Y Pale Yellow 8.3	Hue 2.5Y Pale Yellow 8.3	Hue 2.5Y Yellow 7.8	80
CCCT 17.104	BDA 25	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y White 8.1	85
CCCT 17.105	BDA 25	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y White 8.1	85
CCCT 17.106	BDA 25	Hue 2.5Y White 8.1	Hue 2.5Y Pale Yellow 8.3	Hue 2.5Y Yellow 7.6	33
CCCT 17.107	BDA 25	Hue 5Y Pale Yellow 7.3	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Pale Yellow 7.3	70
CCCT 17.108	BDA 25	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Pale Yellow 8.2	31
CCCT 17.109	BDA 25	Hue 7.5Y Pinkish White 8.2	Hue 7.5Y White 8.1	Hue 7.5Y Pink 7.3	75
CCCT 17.110	BDA 25	Hue 5.Y White 8.1	Hue 5.Y White 8.1	Hue 5.Y White 8.1	90
CCCT 17.111	BDA 25	Hue 5YR Pink 8.2	Hue 5YR Pinkish White 8.2	Hue 5YR Pink 8.4	85
CCCT 17.112	BDA 25	Hue 5YR Pink 8.2	Hue 5YR Pinkish White 8.2	Hue 5YR Pink 8.4	82
CCCT 17.113	BDA 25	Hue 5YR Pink 8.2	Hue 5YR Pinkish White 8.2	Hue 5YR Pink 8.4	42
CCCT 17.114	BDA 25	Hue 5YR Pink 8.2	Hue 5YR White 8.1	Hue 5YR Pink 8.4	80
CCCT 17.116	BDA 25	Hue 7.5Y Pinkish White 8.2	Hue 7.5Y White 8.1	Hue 7.5Y Pink 7.3	82
CCCT 17.117	BDA 25	Hue 5YR Pink 8.4	Hue 5YR Pink 8.2	Hue 5YR Pink 8.4	79
CCCT 17.118	BDA 25	Gley 1 White 8	Gley 1 White 8	Hue 2.5Y Olive Yellow 6.8	28
CCCT 17.120	BDA 25	Hue 5YR Pink 8.2	Hue 5YR Pinkish White 8.2	Hue 5YR Pink 8.4	84
CCCT 17.121	BDA 25	Gley 1 Light Grey 7	Gley 1 White 8	Gley 1 Gray 6	85
CCCT 17.122	BDA 25	Gley 1 White 8	Gley 1 White 8	Gley 1 Light Grey 7	83
CCCT 17.123	BDA 25	Hue 5YR White 8.1	Hue 5YR White 8.1	Hue 5YR Pinkish White 8.2	85

CCCT 17.124	BDA 25	Hue 2.5Y Light Gray 7.1	Hue 5y White 8.1	Hue 2.5Y Light Gray 7y1	30
CCCT 17.125	BDA 25	Hue7.5R Reddish Yellow 7.6	Hue 10R Pinkish White 8.2	Hue 7.5R Reddish Yellow 7.6	32
CCCT 17.126	BDA 25	Hue 2.5Y Pale Yellow 8.3	Hue 2.5Y White 8.1	Hue7.5R Reddish Yellow 7.6	40
CCCT 17.127	BDA 25	Hue 7.5YR White 8.1	Hue 7.5YR White 8.1	Hue 7.5YR Pinkish White 8.2	43
CCCT 17.129	BDA 25	Hue 7.5YR White 8.1	Hue 7.5YR White 8.1	Hue 7.5YR Pinkish White 8.2	43
CCCT 17.130	BDA 25	Hue 2.5Y Light Gray 7.1	Hue 5YR White 8.1	Hue 2.5Y Light Gray 7.1	85
CCCT 17.131	BDA 25	Hue 7.5YR Pink 8.4	Hue 5YR Pinkish Gray 6.2	Hue 5YR Dark Reddish Brown 3.4	39
CCCT 17.132	BDA 25	Hue 2.5Y Light Gray 7.1	Hue 2.5Y Gray 5.1	Hue 2.5Y Dark Olive Brown 3.3	83
CCCT 17.133	BDA 25	Hue 5YR White 8.1	Hue 5YR White 8.1	Hue 2.5Y Pale Yellow 8.2	41
CCCT 17.134	BDA 25	Hue 5Y Gray 5.1	Hue 5Y Olive Gray 4.2	Hue 5Y Black 2.5.1	22
CCCT 17.135	BDA 25	Hue 2.5Y Pale yellow 7.3	Hue 2.5Y White 8.1	Hue 2.5Y Pale yellow 7.3	70
CCCT 17.137	BDA 25	Hue 7.5YR Pinkish White 8.2	Hue 7.5YR White 8.1	Hue 7.5YR Pinkish White 8.2	42
CCCT 17.138	BDA 25	Hue 2.5Y White 8.1	Hue 2.5Y White 8.1	Hue 2.5Y Yellow 8.6	46
CCCT 17.139	BDA 25	Hue 7.5YR White 8.1	Hue 7.5YR White 8.1	Hue 7.5YR Pinkish White 8.2	36
CCCT 17.140	MEA 25	Hue 2.5Y White 8.1	Gley 1 Pale green 7.2	Hue 2.5Y Pale yellow 8.3	60
	CYA 25	Gley 1 Grayish green 5.2	Gley 1 Grayish green 5.2	Hue 2.5Y Pale yellow 8.3	60
	CYA 37	Gley 1 Pale green 7.2	Hue 2.5Y White 8.1	Hue 2.5Y Pale yellow 8.3	48
CCCT 17.141	MEA 25	Gley 1 Grayish green 5.2	Gley 1 light greenish gray 8.1	10R Red 5.8	48
	CYA 25	Gley 1 Pale green 7.2	Gley 1 White 8	10R Light red 6.6	42
CCCT 17.142	MEA 25	Gley 1 Grayish green 5.2	Gley 1 light greenish gray 8.1	10R Red 5.8	48
	CYA 25	Gley 1 Pale green 7.2	Gley 1 White 8	10R Light red 6.6	42
CCCT 17.29	MEA 25	Gley 1 Grayish green 5.2	Gley 1 light greenish gray 8.1	10R Red 5.8	48
	CYA 25	Gley 1 Pale green 7.2	Gley 1 White 8	10R Light red 6.6	42
CCCT 17.30	BDA 25	Hue 5YR Pink 8.2	Hue 5YR Pinkish White 8.2	Hue 5YR Pink 8.4	70

CCCT 17.31	BDA 25	Hue 5YR Pink 8.2	Hue 5YR Pinkish White 8.2	Hue 5YR Pink 8.4	62
CCCT 17.32	BDA 25	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Pale Yellow8.2	52
CCCT 17.33	BDA 25	Hue 5Y Pale Yellow 8.3	Hue 5Y Pale Yellow 8.3	Hue 5Y Pale Yellow 8.4	75
CCCT 17.34	BDA 25	Gley 1 Greenish Gray 6.1	Gley 1 Greenish Gray 6.1	Gley 1 Dark Greenish Gray 4.1	90
CCCT 17.35	BDA 25	Hue 5Y Pale Yellow 8.3	Hue 5Y Pale Yellow 8.3	Hue 5Y Pale Yellow 8.4	76
CCCT 17.36	BDA 25	2.5Y White 8.1	2.5Y White 8.1	5Y Pale yellow 8.3	39
CCCT 17.37	BDA 25	Hue 5Y White 8.1+ Hue 5Y Olive 5.3	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Olive 5.3	84
CCCT 17.38	BDA 25	Hue 2.5Y Pale Yellow 7.4	Hue 2.5Y Pale Yellow 7.4	Hue 2.5Y Dark Grayish Brown 4.2	89
CCCT 17.39	BDA 25	Hue10YR Very Pale Yellow 8.3	Hue10YR White 8.1	Hue10YR Yellowish Brown	47
CCCT 17.40	BDA 25	Hue 2.5Y Light Olive Brown 5.3	Hue 2.5Y Light Olive Brown 5.3	Hue 5Y Olive 5.3	89
CCCT 17.41	BDA 25	2.5Y White 8.1	2.5Y White 8.1	2.5Y Pale yellow 8.3	83
CCCT 17.42	BDA 25	Gley 1 White 8	Gley 1 White 8	Gley 1 White 8	90
CCCT 17.43	BDA 25	Hue 2.5Y Light Olive Brown 5.3	Hue 2.5Y Light Yellowish Brown 6.3	Hue 5Y Olive Gray 4.2	82
CCCT 17.44	BDA 25	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Pale Yellow 8.2	51
CCCT 17.45	BDA 25	Gley 1 Light Gray 7	Gley 1 Light Gray 7	Gley 1 Greenish Black2.5.1	90
CCCT 17.46	BDA 25	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Yellow 8.6	39
CCCT 17.48	BDA 25	Hue 2.5Y Light Olive Brown 5.3	Hue 2.5Y Light Yellowish Brown 6.3	Hue 5Y Olive Gray 4.2	85
CCCT 17.47	BDA 25	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Pale Yellow 8.2	88
CCCT 17.49	BDA 25	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Pale Yellow 8.3	73
CCCT 17.50 CCCT 17.51	BDA 25	Hue 2.5Y Light Olive Brown 5.3	Hue 2.5Y Light Yellowish Brown 6.3	Hue 5Y Olive Gray 4.2	85
CCCT 17.50	MEA 25	Gley 1 Grayish green 5.2	Hue 2.5Y White 8.1	Hue 2.5Y White 8.1	19
	CYA 25	Gley 1 Grayish green 5.2	Hue 5Y Pale Yellow 8.3	Hue 10YR Very pale brown 8.3	21
	CYA 37	Não cresceu			

CCCT 17.51	BDA 25	Hue 2.5Y 5.3 Light Olive Brown	Hue 2.5Y 5.3 Light Olive Brown	Hue 2.5Y Dark Grayish Brown 4.2	67
CCCT 17.53	BDA 25	Hue 2.5Y White 8.1	Hue 2.5Y White 8.1	Hue 2.5Y Pale Yellow 8.3	42
CCCT 17.54	BDA 25	Gley 1 White 8 + Gley 1 N 2.5 Black	Gley 1 White 8 + Gley 1 N 2.5 Black	Hue 2.5Y Pale Yellow 8.2 + Gley 1 N 2.5 Black	75
CCCT 17.55	BDA 25	Hue 5Y Pale Yellow 7.3	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Pale Yellow 7.3	82
CCCT 17.56	MEA 25	Gley 1 Grayish green 5.2	Gley 1 Grayish green 5.2	Hue 10YR Pale red 6.3	23
	CYA 25 CYA 37	Gley 1 Grayish green 5.2 Não cresceu	Hue 5Y Pale Yellow 8.3	Hue 5Y White 8.1	21
CCCT 17.57	BDA 25	Hue 2.5Y Pale Yellow 8.2	Hue 2.5Y White 8.1	Hue 2.5Y White 8.1	85
CCCT 17.58	BDA 25	Gley 1 White 8	Gley 1 White 8	Gley 1 White 8	85
CCCT 17.59 CCCT 17.60	BDA 25	Gley 1 Greenish Gray 6.1	Gley 1 White 8	Hue 2.5Y Olive Brown 4.4	85
CCCT 17.61	MEA 25	Gley 1 Pale green 8.2	Gley 1 White 8	Gley 1 White 8	29
	CYA 25	Gley 1 Grayish green 4.2	Gley 1 Grayish green 4.2	Hue 10YR Very Pale brown 8.2	21
CCCT 17.62	BDA 25	Hue 2.5Y White 8.1	Hue 2.5Y White 8.1	Hue 2.5Y Pale Yellow 8.3	44
CCCT 17.63	BDA 25	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y White 8.1	60
CCCT 17.64	BDA 25	Gley 1 Light Greenish Gray 7.1	Gley 1 Light Greenish Gray 7.1	Gley 1 Very Dark Gley 3	85
CCCT 17.65	BDA 25	Gley 1 Light Gray 7	Gley 1 Light Gray 7	Gley 1 Greenish Black2.5.1	90
CCCT 17.66	BDA 25	Gley 1 White 8	Gley 1 White 8	Hue 2.5Y Olive Brown 4.4	85
CCCT 17.56	BDA 25	Gley 1 Light Greenish Gray 8.1	Hue 5Y White 8.1	Gley 1 Greenish Black2.5.1	85
CCCT 17.67	BDA 25	Hue 5Y Pale Yellow 8.2	Hue 5Y Pale Yellow 8.2	Hue 5Y Pale Yellow 8.4	55
CCCT 17.68	BDA 25	Hue 5Y Pale Olive 6.4	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Olive 4.4	79
CCCT 17.69	BDA 25	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Pale Yellow 8.3	74
CCCT 17.70	MEA 25	Gley 1 Pale green 8.2	Gley 1 White 8	Gley 1 White 8	29
	CYA 25	Gley 1 Grayish green 4.2	Gley 1 Grayish green 4.2	Hue 10YR Very Pale brown 8.2	21
CCCT 17.71	MEA 25	Gley 1 Grayish green 5.2	Hue 2.5Y White 8.1	Hue 2.5Y Pale yellow 8.3	19

	CYA 25	Gley 1 Light gray 7	Gley 1 White 8	Hue 2.5Y Pale yellow 8.3	15
	CYA 37	Não cresceu			
CCCT 17.72	BDA 25	Hue 2.5Y White 8.1	Hue 2.5Y Pale yellow 8.2	Hue 2.5Y Pale yellow 8.3	55
CCCT 17.73	BDA 25	Gley 1 Greenish Gray 6.1	Gley 1 Greenish Gray 6.1	Gley 2 Very Dark Bluish Gray 3.1	65
CCCT 17.74	BDA 25	Gley 1 Greenish Gray 6.1	Gley 1 Greenish Gray 6.1	Gley 1 Black2.5	62
CCCT 17.75	BDA 25	Gley 1 White 8	Gley 1 White 8	Gley 1 Light Greenish Gray 8.1	85
CCCT 17.76	BDA 25	Gley 1 White 8 + Hue 5Y Light Olive Gray 6.2	Gley 1 White 8	Hue 5Y Pale Olive 6.3	48
CCCT 17.77	BDA 25	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Pale Yellow 8.3	84
CCCT 17.78	BDA 25	Gley 1 Light Greenish Gray 7.1	Gley 1 Light Greenish Gray 7.1	Gley 2 Very Dark Bluish Gray 3.1	74
CCCT 17.79	BDA 25	Hue 2.5Y Light Olive Brown 5.3	Hue 2.5Y Light Olive Brown 5.3	Hue 10YR Yellowish Brown 5.8	85
CCCT 17.80	BDA 25	Hue 2.5Y Pale Yellow 8.2	Gley 1 White 8	Hue 2.5Y Pale yellow 8.2	85
CCCT 17.81	BDA 25	Hue 5Y Olive 4.3	Hue 5Y Olive 4.3	Hue 5Y Olive 4.3	80
CCCT 17.82	BDA 25	Gley 2 Greenish Gray 6.1	Gley 1 White 8	Gley 2 Greenish Gray 5.1+Gley 1 White 8	66
CCCT 17.83	BDA 25	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Pale Yellow 8.4	33
CCCT 17.84	BDA 25	Gley 2 Greenish Gray 5.1	Gley 1 White 8.1	Gley 2 Bluish Gray 5.1	85
CCCT 17.85	BDA 25	Gley 1 Light Grey 7	Gley 1 White 8	Gley 1 Light Grey 7	15
CCCT 17.86	BDA 25	Hue 2.5Y Pale Yellow 7.3	Hue 2.5Y Pale Yellow 7.3	Hue 2.5Y Pale Yellow 7.4	73
CCCT 17.06	BDA 25	Gley 1 White 8	Gley 1 White 8	Gley 1 White 8	84
CCCT 17.07	MEA 25	Gley 1 Pale green 8.2	Gley 1 White 8	Gley 1 White 8	29
	CYA 25	Gley 1 Grayish green 4.2	Gley 1 Grayish green 4.2	Hue 10YR Very Pale brown 8.2	21
CCCT 17.08	BDA 25	Hue 5Y Pale Yellow 7.3	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Pale Yellow 7.3	83
CCCT 17.09	BDA 25	Gley 1 Light Greenish Gray 8.1	Hue 5Y White 8.1	Gley 1 Greenish Black2.5.1	84
CCCT 17.10	BDA 25	Gley 1 Greenish Gray 6.1	Gley 1 White 8	Gley 1 Greenish Gray 5.1	29

CCCT 17.11	BDA 25	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Pale Yellow 8.4	90
CCCT 17.12	BDA 25	Gley 1 Light Greenish Gray 7.1	Gley 1 Light Greenish Gray 7.1	Gley 2 Very Dark Bluish Gray 3.1	58
CCCT 17.13	BDA 25	Gley 1 Very Dark Grayish Green	Gley 1 Very Dark Grayish Green	Gley 1 Greenish Black 2.5.1	83
CCCT 17.14	BDA 25	5Y White 8.1	5Y White 8.1	5Y Pale yellow 8.3	85
CCCT 17.194	BDA 25	Hue 5Y Pale Yellow 8.2	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Pale Yellow 8.3	83
CCCT 17.15	BDA 25	Hue 5Y White 8.1+ Hue 5Y Olive 5.3	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Olive 5.3	84
CCCT 17.16	BDA 25	Gley 1 Greenish Gray 6.1	Gley 1 Greenish Gray 6.1	Gley 2 Very Dark Bluish Gray 3.1	65
CCCT 17.17	BDA 25	Gley 1 White 8	Gley 1 White 8	Hue 5Y Pale yellow 8.2	NO
CCCT 17.18	BDA 25	Gley 1 Gray 6	Gley 1 White 8	Gley 1 Dark greenish gray 4.1	86
CCCT 17.19	MEA 25	Hue 2.5Y White 8.1	Hue 2.5Y Pale yellow 8.2	Hue 2.5Y Yellow 8.2	85
	CYA 25	Gley 1 Light Greenish Gray 8.1	Gley 1 White 8	Hue 2.5Y Pale yellow 8.2	85
CCCT 17.20	BDA 25	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Pale Yellow 8.2	80
CCCT 17.21	BDA 25	Hue 5Y White 8.1	5Y White 8.1	Hue 5Y Yellow 8.6	42
CCCT 17.22	BDA 25	Hue 5Y Olive 5.4	Hue 5Y Pale yellow 7.3	Hue 5Y Olive 4.3	85
CCCT 17.23	BDA 25	Hue 5YR Pink 8.3	5YR White 8.1	Hue 5YR Pink 8.3	36
CCCT 17.24	BDA 25	Gley 1 Greenish black 2.5.1	Gley 1 Greenish black 2.5.1	Gley 1 Greenish black 2.5.1	85
CCCT 17.25	BDA 25	Hue 2.5Y Gray 6.1	Hue 2.5Y White 8.1	Hue 2.5Y Gray 6.1	81
CCCT 17.26	BDA 25	Hue 5YR Reddish brown 5.3	Hue 5YR Pink 8.4	Hue 5YR Reddish brown 5.3	38
CCCT 17.27	BDA 25	Hue 5YR Reddish brown 5.3	Hue 5YR Pink 8.4	Hue 5YR Reddish brown 5.3	28
CCCT 17.28	BDA 25	Gley 2 Very dark greenish gray 3.1	Gley 2 Very dark greenish gray 3.1	Gley 1 Greenish black 2.5.1	37
CCCT 17.87	MEA 25	Gley 1 Pale green 8.2	Gley 1 White 8	Gley 1 White 8	29
	CYA 25	Gley 1 Grayish green 4.2	Gley 1 Grayish green 4.2	Hue 10YR Very Pale brown 8.2	21
CCCT 17.88	MEA 25	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Pale Yellow 8.2	85

	CYA 25	Gley 1 Pale green 6.2	Gley 1 Grayish green 4.2	Gley 1 White 8	85
	CYA 37	Não cresceu			
CCCT 17.89	MEA 25	Gley 1 Pale green 8.2	Gley 1 White 8	Gley 1 White 8	29
	CYA 25	Gley 1 Grayish green 4.2	Gley 1 Grayish green 4.2	Hue 10YR Very Pale brown 8.2	21
CCCT 17.90	MEA 25	Gley 1 Pale green 8.2	Gley 1 White 8	Gley 1 White 8	29
	CYA 25	Gley 1 Grayish green 4.2	Gley 1 Grayish green 4.2	Hue 10YR Very Pale brown 8.2	21
CCCT 17.91	BDA 25	Hue 5Y Dark gray 4.1	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Dark gray 4.1	85
CCCT 17.92	BDA 25	Gley 1 Very dark gray 3	Gley 1 Dark gray 4	Gley 1 Black 2.5	90
CCCT 17.93	BDA 25	Hue 2.5Y White 8.1	Hue 2.5Y White 8.1	Hue 2.5Y Pale yellow 8.3	47
CCCT 17.94	BDA 25	Gley 1 Very dark gray 3	Gley 1 Very dark gray 3	Gley 1 Black 2.5	85
CCCT 17.95	BDA 25	Gley 1 Very dark greenish gray 3.1	2.5Y Very dark grayish brown 3.2	2.5Y Very dark grayish brown 3.2	75
825R3	MEA 25	Gley 1 Grayish green 5.2	Gley 1 Grayish green 5.2	Hue 2.5Y Pale yellow 8.3	23
CCCT 17.95	CYA 25	Gley 1 Grayish green 5.2	Hue 5Y Pale Yellow 8.3	Hue 2.5Y Pale yellow 8.3	21
	CYA 37	Não cresceu			
840R1	MEA 25	Gley 1 Pale green 8.2	Gley 1 White 8	Gley 1 White 8	29
CCCT 17.97	CYA 25	Gley 1 Grayish green 4.2	Gley 1 Grayish green 4.2	Hue 10YR Very Pale brown 8.2	21
849R2	MEA 25	Gley 1 Pale green 7.2	Gley 1 Pale green 7.2	Hue 2.5Y Pale yellow 8.3	74
CCCT 17.98	CYA 25	Hue 2.5Y Pale yellow 8.3	Hue 5Y White 8.1	Hue 2.5Y Pale yellow 8.3	77
	CYA 37	Gley 1 Grayish green 5.2	Gley 1 Grayish green 5.2	Hue 2.5Y Pale yellow 8.3	70
CCCT 17.99	BDA25	Hue 2.5Y White 8.1	Hue 2.5Y Pale yellow 8.2	Hue 2.5Y Pale yellow 8.3	75
CCCT 17.100	BDA 25	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y White 8.1	Hue 5Y Pale yellow 8.3	83
CCCT 17.101	BDA 25	Hue 2.5Y Pale yellow 8.3	Hue 2.5Y Pale yellow 8.3	Hue 2.5Y Pale yellow 8.4	80

¹ Cores da Carta de Munsell; ² BDA 25 - crescimento da colônia fúngica em meio de cultura Batata Dextrose Ágar à 25 °C/7dias, MEA 25 - Malte Extrato Ágar à 25 °C/7d, CYA 25 - Czapek Ágar Autolisado de Levedura à 25 °C/7d, CYA 37 – 25 °C/7d.

Tabela suplementar 5. Micromorfologia de fungos endofíticos de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* provenientes do Amazonas/ Brasil.

Fungos endofíticos*	Condições de cultivo	Conídios Comprimento (µm)	Conídios Largura (µm)
<i>Albonectria rigidiuscula</i>	SNA 25	7 -11 (8)	2 -3 (2)
<i>Aspergillus flavus</i>	MEA 25	3-4 (3)	4-5 (4)
<i>Aspergillus pseudonomius</i>	MEA 25	3-5 (4)	4-6 (5)
<i>Aspergillus sydowii</i>	MEA 25	2-3 (2,5)	2-5 (3)
<i>Aspergillus versicolor</i>	MEA 25	1 -2 (2)	2-4 (3)
<i>Bionectria aff. ochroleuca</i>	BDA 25	2-4 (3)	1-1 (1)
<i>Bionectria byssicola</i>	BDA 25	2-4 (3)	1-2 (1)
<i>Bionectria pseudochroleuca</i>	BDA 25	2-3 (2)	1-2(2)
<i>Cladosporium halotolerans</i>	BDA 25	1-5 (3)	1-2 (2)
<i>Clonostachs rosea</i>	BDA 25	2-3 (3)	1-1(1)
<i>Colletotrichum gigasporum</i>	BDA 25	8-11 (9)	3-4 (3)
<i>Colletotrichum siamense</i>	BDA 25	11-18 (15)	3-4 (3)
<i>Curvularia lunata</i>	BDA 25	8-10 (9)	3-6 (4)
<i>Daldinia eschscholtzii</i>	BDA 25	2-4 (3)	1-2(1)
<i>Fusarium concolor</i>	SNA 25	2-4 (3)	1-1 (1)
<i>Fusarium polyphialidicum</i>	SNA 25	3-6 (5)	1-2 (2)
<i>Fusarium solani</i>	SNA 25	5-13 (10)	2-3 (2)
<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	BDA 25	8-12 (9)	20 – 28 (25)
<i>Penicillium citrinum</i>	MEA 25	1-3 (2)	1-2 (2)
<i>Penicillium rolfsii</i>	MEA 25	2-3 (2)	1-2 (2)
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	BDA 25	3-4 (4)	10-12 (11)
<i>Simplicillium lanosoniveum</i>	BDA 25	1-2 (1)	1-1 (1)
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	MEA 25	2-3 (2)	1-2 (2)
<i>Tinctoporellus epimiltinus</i>	BDA 25	1-2 (1)	1-1 (1)

*exceto *Mycelia sterilia*.

Tabela suplementar 6. Índice enzimático de fungos endofíticos de folhas de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* – Amazonas/ Brasil.

Código CCCT	Índice enzimático (IE)					Código CCCT	Índice enzimático (IE)				
	Amilase	Celulase	Pectinase	Protease	Lipase		Amilase	Celulase	Pectinase	Protease	Lipase
CCCT 17.29	0,71 ^g			0,93 ^g	0,93 ^c	CCCT 17.53	0,61 ^g	1,14 ^c		0,94 ^g	
CCCT 17.30		1,22 ^b				CCCT 17.54	0,77 ^f	1,25 ^b			
CCCT 17.31		1,22 ^b			0,83 ^d	CCCT 17.55	1,15 ^c	1,67 ^a		0,82 ^h	0,90 ^c
CCCT 17.32	0,88 ^e	0,34 ^f				CCCT 17.56	0,16 ⁱ	0,78 ^d			0,83 ^d
CCCT 17.33		0,83 ^d				CCCT 17.57	0,39 ^h	1,32 ^b		0,99 ^f	0,91 ^c
CCCT 17.34	0,68 ^g	0,43 ^f			0,88 ^d	CCCT 17.58	0,65 ^g				0,83 ^d
CCCT 17.35	0,87 ^e	1,00 ^c		1,14 ^d	0,44 ⁱ	CCCT 17.59	1,20 ^c	1,34 ^b		1,00 ^f	
CCCT 17.36	0,35 ^h	1,01 ^c		0,98 ^f	0,82 ^d	CCCT 17.60	0,98 ^d	0,93 ^c			
CCCT 17.37	0,55 ^g	0,42 ^f			0,90 ^c	CCCT 17.61	0,59 ^g	1,08 ^c			
CCCT 17.38	0,97 ^d	1,18 ^c		0,98 ^f	0,70 ^f	CCCT 17.62	0,75 ^f				
CCCT 17.39					0,92 ^c	CCCT 17.63		0,96 ^c			0,94 ^c
CCCT 17.40	5,58 ^a				0,86 ^d	CCCT 17.64	0,55 ^g	1,12 ^c			0,85 ^d
CCCT 17.41	0,62 ^g	1,12 ^c			0,92 ^c	CCCT 17.65		1,11 ^c			0,68 ^f
CCCT 17.42	0,70 ^g	1,10 ^c		0,94 ^g	0,91 ^c	CCCT 17.66		1,01 ^c			0,98 ^b
CCCT 17.43	0,30 ^h	0,69 ^e		1,08 ^e	0,25 ^k	CCCT 17.67	0,89 ^e	1,12 ^c			1,00 ^b
CCCT 17.44	0,89 ^e	1,08 ^c	1,09 ^a	0,50 ^j	0,26 ^k	CCCT 17.68	0,66 ^g	1,04 ^c	1,08 ^a	0,90 ^g	0,71 ^f
CCCT 17.45	0,90 ^e	1,01 ^c			0,47 ^h	CCCT 17.69					
CCCT 17.46		0,83 ^d		0,05 ^l	0,89 ^c	CCCT 17.70	1,04 ^d	1,24 ^b		0,27 ^k	0,41 ⁱ
CCCT 17.47	0,88 ^e	0,99 ^c		1,02 ^f		CCCT 17.71		1,29 ^b		0,99 ^f	0,84 ^d
CCCT 17.48		1,00 ^c		1,03 ^f	0,85 ^d	CCCT 17.72	0,90 ^e	0,88 ^d			
CCCT 17.49				1,22 ^c	0,77 ^e	CCCT 17.73					0,34 ^j
CCCT 17.50	0,95 ^d	1,53 ^a				CCCT 17.74					0,55 ^g
CCCT 17.51	0,85 ^e	1,29 ^b			0,24 ^k	CCCT 17.75	0,12 ⁱ	1,01 ^c			0,93 ^c
CCCT 17.52	0,96 ^d	1,34 ^b				CCCT 17.76	0,66 ^g	1,03 ^c		0,95 ^g	0,93 ^c

Continuação

CCCT 17.77	0,32 ^h	0,97 ^c				CCCT 17.20		1,08 ^c		1,45 ^b	0,84 ^d
CCCT 17.78						CCCT 17.21	0,69 ^g	1,03 ^c		0,45 ^j	0,79 ^e
CCCT 17.79				0,77 ^e		CCCT 17.22	0,83 ^e	1,01 ^c			
CCCT 17.80				1,18 ^a		CCCT 17.23	0,74 ^f	0,38 ^f		0,66 ⁱ	0,36 ^j
CCCT 17.81		0,64 ^e		1,16 ^d	0,90 ^c	CCCT 17.24	0,51 ^g				0,68 ^f
CCCT 17.82	0,89 ^e	1,65 ^a				CCCT 17.25	0,97 ^d	0,74 ^e			0,68 ^f
CCCT 17.83		0,80 ^d		0,89 ^g	0,48 ^h	CCCT 17.26		0,67 ^e	1,14 ^a	0,94 ^g	0,87 ^d
CCCT 17.84				1,62 ^a	0,55 ^g	CCCT 17.27	0,86 ^e	0,41 ^f			0,49 ^h
CCCT 17.85	0,21 ⁱ	0,87 ^d		0,78 ^h	0,24 ^k	CCCT 17.28		1,33 ^b			
CCCT 17.86	0,26 ^h	1,11 ^c				CCCT 17.87	0,98 ^d	0,87 ^d			0,98 ^b
CCCT 17.06	1,02 ^d	1,10 ^c		0,06 ^l		CCCT 17.88					0,80 ^e
CCCT 17.07	1,02 ^d	0,89 ^d		0,98 ^f	0,73 ^f	CCCT 17.89	0,98 ^d	1,53 ^a	1,23 ^a	1,26 ^c	0,67 ^f
CCCT 17.08	0,15 ⁱ	0,14 ^g			0,74 ^e	CCCT 17.90		1,02 ^c		1,00 ^f	0,85 ^d
CCCT 17.09	1,03 ^d	0,71 ^e			0,69 ^f	CCCT 17.91					
CCCT 17.10	0,89 ^e			0,94 ^g		CCCT 17.92	0,93 ^e	1,09 ^c		0,89 ^g	0,51 ^g
CCCT 17.11	0,77 ^f	1,32 ^b				CCCT 17.93	0,93 ^e	1,06 ^c		0,27 ^k	
CCCT 17.12						CCCT 17.94					0,98 ^b
CCCT 17.13	1,05 ^d				0,46 ^h	CCCT 17.95	1,89 ^b	1,26 ^b			0,81 ^e
CCCT 17.14	0,77 ^f	0,62 ^e	1,08 ^a	0,73 ⁱ	0,90 ^c	CCCT 17.96	0,72 ^f				
CCCT 17.194		0,98 ^c			0,70 ^f	CCCT 17.97	0,97 ^d	1,06 ^c			
CCCT 17.15	0,81 ^f	0,88 ^d				CCCT 17.98	1,08 ^d	1,05 ^c		1,10 ^e	0,88 ^d
CCCT 17.16		1,35 ^b				CCCT 17.99	0,96 ^d				
CCCT 17.18	0,97 ^d	0,97 ^c		0,26 ^k		CCCT 17.100	1,22 ^c	1,07 ^c		1,14 ^d	

* Média de três repetições – Médias seguidas pela mesma letra na vertical não se diferem entre si pelo teste Scott Knott ($p < 0.05$). Os valores de índice enzimático representam a relação entre a média do halo de degradação e o diâmetro da colônia.

Tabela suplementar 7. Índice enzimático de fungos endofíticos de sementes de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* – Amazonas/ Brasil.

Código CCCT	Índice enzimático (IE)				
	Amilase	Celulase	Pectinase	Protease	Lipase
CCCT 17.101	0,92 ^b	0,90 ^c			
CCCT 17.102	0,90 ^b			1,49 ^b	
CCCT 17.103	0,97 ^b			1,02 ^g	
CCCT 17.104	0,46 ^d	0,33 ^e			
CCCT 17.105	0,15 ^e				
CCCT 17.106	0,80 ^c			1,17 ^e	
CCCT 17.107	0,77 ^c	0,97 ^c		0,95 ^g	1,01 ^a
CCCT 17.108	0,79 ^c			1,28 ^d	0,11 ^e
CCCT 17.109	0,83 ^c	2,23 ^a		1,05 ^g	0,90 ^a
CCCT 17.110	0,84 ^c			1,05 ^g	
CCCT 17.111				1,00 ^g	0,66 ^c
CCCT 17.112	0,90 ^b			0,98 ^g	0,68 ^c
CCCT 17.113		0,35 ^e		1,03 ^g	0,67 ^c
CCCT 17.114	0,52 ^d	1,03 ^c			0,91 ^a
CCCT 17.116	0,89 ^b			1,04 ^g	0,68 ^c
CCCT 17.117	0,43 ^d			0,91 ^h	0,90 ^a
CCCT 17.118	0,84 ^c			1,76 ^a	0,46 ^d
CCCT 17.120	0,91 ^b	0,32 ^e		1,03 ^g	0,65 ^c
CCCT 17.121		0,91 ^c		0,13 ^j	0,49 ^d
CCCT 17.122		1,01 ^c		0,99 ^g	0,76 ^b
CCCT 17.123				0,14 ^j	0,77 ^b
CCCT 17.124				1,03 ^g	0,82 ^b
CCCT 17.125	1,09 ^a				0,62 ^c
CCCT 17.126	1,11 ^a			1,52 ^b	0,55 ^d
CCCT 17.127	0,95 ^b	0,77 ^d		1,54 ^b	0,59 ^c
CCCT 17.129	0,67 ^c			0,73 ⁱ	0,91 ^a
CCCT 17.130					
CCCT 17.131		0,55 ^d		1,02 ^g	0,91 ^a
CCCT 17.132	0,67 ^c	1,01 ^d		1,15 ^e	0,44 ^d
CCCT 17.133	1,15 ^a	0,79 ^d		1,34 ^d	0,85 ^b
CCCT 17.134	0,14 ^e	0,25 ^e		1,16 ^e	0,96 ^a
CCCT 17.135	1,00 ^b	0,73 ^d		1,39 ^c	0,62 ^c
CCCT 17.137					
CCCT 17.17	0,83 ^c	0,86 ^c			0,58 ^c
CCCT 17.138	0,81 ^c	0,89 ^c		1,41 ^c	0,58 ^c
CCCT 17.139					1,01 ^a
CCCT 17.140	0,78 ^c			1,09 ^f	0,11 ^e
CCCT 17.141					0,90 ^a
CCCT 17.142	0,38 ^d	0,88 ^c		1,09 ^f	

* Média de três repetições – Médias seguidas pela mesma letra na vertical não se diferem entre si pelo teste Scott Knott ($p < 0.05$). Os valores de índice enzimático representam a relação entre a média do halo de degradação e o diâmetro da colônia.

Tabela suplementar 8. Antagonismo de fungos endofíticos de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* contra o patógeno *Colletotrichum guaranicola* após 14 dias.

Endófitos	Origem ¹	Média Ri ²	ICM ³	Halo (mm)
CCCT 17.59	F_MBZ871	64,1	18,48 ^{bcd}	10,18 ^a
CCCT 17.70	F_MBZ871	68,3	13,23 ^d	9,74 ^{ab}
CCCT 17.88	F_MBZ300	57,7	26,61 ^{abcd}	8,65 ^{ab}
CCCT 17.96	F_MAO871	64,9	17,41 ^{bcd}	5,52 ^{abc}
CCCT 17.50	F_MAO300	64,8	17,60 ^{bcd}	5,52 ^{bcd}
CCCT 17.06	F_MBZ871	64,9	17,52 ^{bcd}	5,14 ^{bcd}
CCCT 17.55	F_MBZ871	67,8	13,84 ^d	4,74 ^{cd}
CCCT 17.28	F_MBZ300	51,4	34,6 ^{ab}	4,23 ^{cd}
CCCT 17.53	F_MAO871	47,4	39,79 ^a	4,20 ^{cd}
CCCT 17.84	F_MAO300	65,6	16,68 ^{bcd}	3,66 ^d
CCCT 17.141	S_MBZ300	61,4	22,00 ^{abcd}	3,41 ^d
CCCT 17.89	F_MAO300	53,1	32,58 ^{abc}	3,27 ^d
CCCT 17.11	F_MBZ300	60,2	23,53 ^{abcd}	2,29 ^d
CCCT 17.69	F_MAO300	66,7	15,28 ^{cd}	1,41 ^d

¹ F = Folha, S = Semente, MAO = Manaus, MBZ = Maués, 300 = Cultivar suscetível à antracnose (BRS300), 871 = Cultivar resistente (BRS871); ² Ri = crescimento do patógeno pareado com o endófito; ³ Inibição do Crescimento Micelial (ICM) – Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tuckey ($p < 0.05$).

17. Conclusão geral

Os fungos endofíticos cultiváveis do guaraná que compõe a comunidade microbiana pertencem a 26 distintos gêneros, e a microbiota é primordialmente formada por membros de *Colletotrichum* e *Fusarium*. A diversidade foi maior na cultivar suscetível BRS300 e no município de Manaus. Tanto a composição como a diversidade são influenciadas pela localização geográfica e genótipo da planta. Os fungos são prolíferos produtores de enzimas, antraquinonas e 14 endófitos foram capazes de antagonizar o principal patógeno da cultura *in vitro*.