

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS E
AMBIENTAIS – PPGCIFA**

ADRIENE DE OLIVEIRA AMARAL

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CLONES DE SERINGUEIRA E SEU
POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES E BIOCONTROLE
DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS**

Manaus, Amazonas

2020

1 **ADRIENE DE OLIVEIRA AMARAL**

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

**DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CLONES DE SERINGUEIRA E SEU
POTENCIAL PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA E BIOCONTROLE DE FUNGOS
FITOPATOGÊNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Florestais e Ambientais da Universidade Federal
do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Florestais e Ambientais.

Orientadora: Jânia Lília da Silva Bentes Lima
Coorientadora: Ana Francisca Tibúrcia Amorim F. e Ferreira

Manaus, Amazonas
2020

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal do Amazonas

A485d Amaral, Adriene de Oliveira
Diversidade de fungos endofíticos de clones de seringueira e seu potencial para produção enzimática e biocontrole de fungos fitopatogênicos / Adriene de Oliveira Amaral . 2020
70 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Jânia Lilia da Silva Bentes Lima
Coorientadora: Ana Francisca Tibúrcia Amorim Ferreira e Ferreira
Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. biodiversidade. 2. antagonismo. 3. índice enzimático. 4. filogenia. I. Lima, Jânia Lilia da Silva Bentes. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

20

1
2 ADRIENE DE OLIVEIRA AMARAL
3
4

5
6 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CLONES DE SERINGUEIRA E O SEU
7 POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES E BIOCONTROLE DE
8 FUNGOS FITOPATOGÊNICOS

9
10
11 Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
12 em Ciências Florestais e Ambientais da Universidade
13 Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do
14 título de Mestre em Ciências Florestais e Ambientais,
15 área de concentração em Ciências Florestais e
16 Ambientais.
17
18

19
20
21 Aprovada em 10 de junho de 2020
22
23
24

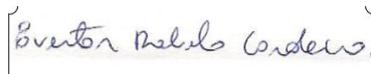
25
26
27 BANCA EXAMINADORA
28



29
30 Dr.^aJânia Lília da Silva Bentes Lima- Presidente
31 Universidade Federal do Amazonas - UFAM
32



33
34 Dr. Luiz Antonio de Oliveira- Membro
35 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA
36



37
38 Dr. Everton Rabelo Cordeiro – Membro
39 Embrapa Amazônia Ocidental - EMBRAPA

1 AGRADECIMENTOS

2
3 À Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade de cursar o mestrado.

4 À professora Jânia Lília da Silva Bentes Lima, pela orientação, paciência e acolhimento.

5 À professora Ana Tibúrcia Amorim F. e Ferreira, pela coorientação, paciência e amizade.

6 Aos meus pais Jorgete Amaral (*In memoriam*) e Joaquim Figueiredo, que não mediram
7 esforços para que a minha educação fosse a melhor que eles poderiam oferecer, por todo amor,
8 paciência e por sempre me apoiarem nas minhas decisões, eu os amo 3000.

9 Aos meus irmão e sobrinhos por toda demonstração de amor e carinho, vocês foram
10 essenciais para a minha sanidade mental nessa etapa.

11 Ao meu companheiro e amigo de todas as horas Will por todo apoio, amor e torcida durante
12 mais essa etapa da minha vida.

13 Ao meu amigo José Carlos Rodrigues pela convivência, pelos ótimos momentos de
14 descontração e lamentações, e por todo carinho e apoio.

15 Aos integrantes do laboratório de Microbiologia e Fitopatologia por todos os ensinamentos e
16 companheirismo nestes dois anos.

17 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela
18 bolsa de fomento – Código de financiamento 001.

19 A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito
20 obrigada!

21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

RESUMO

Fungos endofíticos são microrganismos que habitam os tecidos internos de plantas durante todo o seu ciclo de vida ou parte dele, sem causar dano aparente à hospedeira. Esses fungos estão presentes em todas as plantas já estudadas até o momento, e são utilizados no biocontrole de fungos fitopatogênicos, na produção de enzimas extracelulares e de metabólitos secundários de interesse biotecnológico. Estudos com espécies do gênero *Hevea* têm demonstrado uma grande diversidade de fungos endofíticos principalmente associados às folhas. O objetivo deste estudo foi investigar a diversidade de fungos endofíticos de clones de seringueira e o seu potencial para biocontrole de fitopatógenos e produção de enzimas extracelulares. Os fungos foram isolados de folhas saudáveis de 3 clones de seringueira, a identificação molecular dos isolados foi feita pelo sequenciamento da região do rDNA (ITS). Os endófitos selecionados foram testados em ensaios de cultura dupla contra os fitopatógenos *C. cassiicola* e *Colletotrichum* sp. e avaliados quanto a produção de amilase, celulase, lipase e protease. As análises dos dados foram realizadas no software R. Foram isolados 269 fungos endofíticos pertencentes a 47 OTUs e 22 gêneros, sendo *Colletotrichum* e *Diaporthe* os mais abundantes nos três clones. Foi observado que o clone C44 apresentou maior riqueza e diversidade em relação aos demais. Dos fungos endofíticos selecionados para o teste de antagonismo, 85,29% inibiram o crescimento *C. cassiicola* e 95,09% inibiram o crescimento de *Colletotrichum* sp. Os isolados 158C e 1A (*Cophinforma atrovirens* e não identificado) apresentaram maior eficiência na inibição dos fitopatógenos testados. A síntese das enzimas foi positiva para lipase (69,6%), amilase (67,6%), celulase (33,3%) e protease (20,6% %). Os melhores índices enzimáticos foram observados para amilase e lipase, $IE \geq 2$. Com este estudo foi possível conhecer as comunidades de fungos endofíticos nos diferentes clones. O clone C44 apresentou maior diversidade e riqueza de espécies. Os isolados obtidos a partir dos clones de seringueira apresentaram um bom potencial antimicrobiano e enzimático, podendo ser amplamente testados na indústria, bem como atuarem no controle de fitopatógenos.

Palavras-chave: biodiversidade, antagonismo, índice enzimático

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that inhabit the internal tissues of plants throughout their life cycle or part of it, without causing apparent damage to the host. These fungi are present in all plants studied so far, and are used in the biocontrol of phytopathogenic fungi, in the production of extracellular enzymes and secondary metabolites of biotechnological interest. Studies with species of the genus *Hevea* have shown a great diversity of endophytic fungi mainly associated with leaves. The aim of this study was to investigate the diversity of endophytic fungi from rubber tree clones and their potential for biocontrol of phytopathogens and production of extracellular enzymes. The fungi were isolated from healthy leaves of 3 rubber tree clones, the molecular identification of the isolates was done by sequencing the rDNA region (ITS). The selected endophytes were tested in double culture assays against phytopathogens *C. cassiicola* and *Colletotrichum* sp. and evaluated for the production of amylase, cellulase, lipase and protease. Data analysis was performed using the R software. 269 endophytic fungi belonging to 47 OTUs and 22 genera were isolated, with *Colletotrichum* and *Diaporthe* being the most abundant in the three clones. It was observed that clone C44 presented greater wealth and diversity in relation to the others. Of the endophytic fungi selected for the antagonism test, 85.29% inhibited *C. cassiicola* growth and 95.09% inhibited the growth of *Colletotrichum* sp. Isolates 158C and 1A (*Cophinforma atrovirens* and unidentified) showed greater efficiency in inhibiting the phytopathogens tested. The enzyme synthesis was positive for lipase (69.6%), amylase (67.6%), cellulase (33.3%) and protease (20.6%). The best enzyme indices were observed for amylase and lipase, $IE \geq 2$. With this study it was possible to know the communities of endophytic fungi in the different clones. Clone C44 showed greater diversity and species richness. The isolates obtained from the rubber tree clones showed good antimicrobial and enzymatic potential, which can be extensively tested in the industry, as well as acting in the control of phytopathogens.

Words-Key: biodiversity, antagonism, enzyme index

SUMÁRIO

1		
2	1 INTRODUÇÃO	9
3	2 REFERENCIAL TEÓRICO	10
4	2.1 IMPORTÂNCIA DA SERINGUEIRA	10
5	2.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS	12
6	2.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO	14
7	2.4 POTENCIAL ENZIMÁTICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS	15
8	2.5 FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A ESPÉCIES DE <i>HEVEA</i> SPP.....	16
9	3 OBJETIVOS	19
10	4 MATERIAL E MÉTODOS	20
11	4.1 COLETA E ISOLAMENTOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS	20
12	4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	20
13	4.3 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	21
14	4.4 PCR E SEQUENCIAMENTO	21
15	4.5 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	22
16	4.6 ANÁLISES DE DIVERSIDADE E COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA.....	23
17	4.7 TESTE DE ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i>	24
18	4.8 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	24
19	5 RESULTADOS	26
20	5.1 ISOLAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA	26
21	5.2 COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	28
22	5.3 DIVERSIDADE DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	33
23	5.4 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE FITOPATÓGENOS.....	34
24	5.5 PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES.....	37
25	6 DISCUSSÃO	40
26	6.1 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CLONES DE SERINGUEIRA	40
27	6.2 INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE FITOPATÓGENOS	43
28	6.3 PRODUÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES	45
29	7 CONCLUSÃO	46
30	ANEXOS	48
31	REFERÊNCIAS	60

1 1 INTRODUÇÃO

2 A seringueira (*Hevea brasiliensis*) é uma árvore perene decídua da família Euphorbiaceae,
3 nativa de regiões tropicais da América do Sul, especialmente da Amazônia e áreas adjacentes
4 (Priyadarshan, 2017). As espécies desse gênero são consideradas importantes devido a produção de
5 látex, principal fonte de borracha natural no mundo (Chandrasekhar *et al.*, 2007). Diversos estudos
6 com *H. Brasiliensis* demonstram uma grande diversidade de fungos endofíticos, incluindo classes e
7 espécies novas (Chaverri e Gazis, 2011; Gazis *et al.*, 2012; Gazis e Chaverri, 2010a), e que estes
8 constituem um grupo de microrganismos de interesse para obtenção de novas moléculas com
9 potencial biotecnológico (Rodríguez, Gonzalez e Rodríguez Giordano, 2016).

10 Os fungos endofíticos são microrganismos que colonizam os tecidos internos das plantas sem
11 causar dano aparente (Schulz e Boyle, 2005). As árvores tropicais possuem grande diversidade de
12 fungos endofíticos que são amplamente distribuídos nos seus tecidos, e sua comunidade é
13 influenciada por fatores como composição florística do ambiente, condições ambientais e da distância
14 geográfica entre os sítios (Vaz *et al.*, 2018).

15 Os fungos endofíticos podem desenvolver uma relação simbiótica mutualista com a
16 hospedeira, onde os fungos fornecem proteção contra patógenos e herbívoros, bem como maior
17 resistência contra fatores abióticos que causam estresse na planta, e a planta por sua vez fornece
18 abrigo e nutrientes aos fungos endofíticos (Backman e Sikora, 2008; Yu *et al.*, 2018). Nesse contexto,
19 estudos têm demonstrado que fungos endofíticos são capazes de reduzir o crescimento de
20 fitopatógenos, produzindo moléculas de efeito antagônico (González-Teuber, 2016), sendo
21 considerados uma alternativa para uso no controle biológico e/ou redução do uso de produtos
22 químicos nas culturas, uma vez que os fungicidas quando usados incorretamente podem se tornar
23 tóxicos ao meio ambiente, prejudicar a saúde humana, além do alto custo de aquisição (Rathod *et al.*,
24 2013). Os mecanismos envolvidos no controle biológico de fitopatógenos por fungos endofíticos
25 incluem antibiose, competição por nutrientes e espaço, indução de resposta de defesa e
26 micoparasitismo (Zhang *et al.*, 2014).

27 Além dos benefícios às hospedeiras contra fatores bióticos e abióticos, os fungos endofíticos
28 também têm sido explorados para síntese de metabólitos secundários e enzimas, para produção de
29 novos produtos naturais com aplicações que compreendem desde a agricultura até a remediação
30 ambiental, biomedicina, energia e biocatálise (Chapla, Biasetto e Araujo, 2013). Esses
31 microrganismos tem capacidade para produzir numerosas enzimas extracelulares, como amilases,
32 celulasas, lacases, pectinases e proteinases (Sunitha *et al.*, 2012), e esta capacidade faz parte do seu

1 mecanismo para suplantar as respostas de defesa da hospedeira contra a invasão microbiana e/ou para
2 obter nutrientes do solo (Tan e Zou, 2010).

3 Estudos que visem a produção de enzimas por fungos endofíticos são de suma importância,
4 pois fornecem informações sobre o potencial biotecnológico desses microrganismos, além do
5 entendimento do papel funcional desses microrganismos na planta hospedeira (Svedese *et al.*, 2012).
6 Este trabalho teve como objetivo explorar as comunidades de fungos endofíticos foliares de três
7 clones de *Hevea* sp. e avaliar o potencial para biocontrole de fungos fitopatogênicos e produção de
8 enzimas extracelulares.

9 **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

10 2.1 Importância da seringueira

11 A seringueira pertence à família Euphorbiaceae, uma grande família com cerca de 300 gêneros
12 e 7.500 espécies (Priyadarshan, 2017). Dentro desta família destaca-se o gênero *Hevea*, composto por
13 11 espécies: *H. brasiliensis*, *H. guianensis*, *H. benthamiana*, *H. pauciflora*, *H. spruceana*, *H.*
14 *microphyla*, *H. rigidifolia*, *H. nitida*, *H. camporum*, *H. camargoana*, e *H. paludosa* que são as
15 principais fontes de borracha natural do mundo. O gênero *Hevea* ocupa toda a bacia do rio Amazonas,
16 estendendo-se também ao sul e ao norte do Brasil, Bolívia, Peru, Colômbia, Equador, Venezuela,
17 Guiana Francesa, Guiana e Suriname (Wicherley, 1992).

18 A seringueira ocupa um papel importante na economia mundial, pois é a principal fonte de
19 borracha natural (Nair, 2010; Wicherley, 1992). A borracha é obtida a partir de exsudatos de plantas
20 tropicais (borracha natural) ou derivado de petróleo e gás natural (borracha sintética). Na natureza a
21 borracha é sintetizada em 7 famílias: Euphorbiaceae, Apocynaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae,
22 Moraceae, Papaveraceae e Sapotaceae (Pallardy e Pallardy, 2008). No entanto, a principal fonte de
23 borracha natural no mundo nos dias atuais advém da seringueira, mais precisamente da espécie *Hevea*
24 *brasiliensis*, que é a espécie que mais produz látex de boa qualidade dentro do gênero *Hevea*
25 (Priyadarshan, 2017).

26 A borracha natural é considerada matéria-prima industrial essencial para produção de mais de
27 50.000 produtos (Priyadarshan, 2017). É usada para fabricar produtos fortes e resistentes, materiais
28 elásticos e resilientes, condutores e não condutores de eletricidade, amortecedores, montagem de
29 motores e outras máquinas, mangueiras para transportar gases e líquidos, artigos de vestuário para
30 proteger da chuva, artigos esportivos, cimentos, tintas, plásticos, produtores farmacêuticos, e, o mais
31 importante, fabricação de pneus, que é o ponto de venda de borracha mais importante e de uso
32 mundial (Hirata, Kondo e Ozawa, 2014).

1 A borracha ganhou notoriedade na economia nacional a partir das explorações dos seringais
2 nativos da Amazônia no ano de 1841 (Gasparotto e Pereira, 2012). Nesse período o Brasil era o
3 principal produtor dessa *commodity*, sendo responsável por 98% da produção mundial (Costa *et al.*,
4 2001). No entanto, essa realidade mudou quando Alexander Wickham coletou 70.000 sementes da
5 região do rio Tapajós no Alto Amazonas e transportou a coleção para o Jardim Botânico Kew em
6 1876, onde somente 2700 sementes germinaram e destas, um total de 1911 mudas foram enviadas
7 para o Jardim Botânico do Ceilão (Sri Lanka). Do Ceilão, as mudas foram enviadas para numerosas
8 localidades na Malásia e outras localidades da Ásia (Gonçalves, Cardoso e Ortolani, 1990).

9 No final da segunda década do século XX, as plantações dos britânicos no sudoeste asiático
10 passaram a oferecer borracha natural ao mercado internacional em escala crescente e com preços
11 menores que o do Brasil, derrubando os preços internacionais e levando à estagnação econômica da
12 região amazônica que não tinha como competir com a produção asiática (Duarte Jr., 2015).

13 No Brasil, os primeiros plantios comerciais de seringueira iniciaram em 1927 na cidade de
14 Fordlândia no Pará e em 1934 em Belterra PA, sob o comando de Henry Ford (Gonçalves, Cardoso
15 e Ortolani, 1990). No entanto, as plantações de seringueira na Amazônia em sua grande maioria foram
16 dizimadas pelo fungo *Pseudocercospora ulei* (Hora Júnior *et al.*, 2014), patógeno altamente
17 ameaçador devido a sua alta disseminação, capacidade de causar danos severos e seu difícil controle
18 (Gasparotto e Pereira, 2012). No ano de 1937, a companhia Ford iniciou os programas de cruzamentos
19 e enxertia de copas objetivando combinar alta produção e resistência ao mal das folhas, através do
20 manejo silvicultural e genético combinados (Costa *et al.*, 2001).

21 Devido ao insucesso dos plantios de seringueira na Amazônia, foram iniciados plantios de
22 seringueira fora do seu habitat natural, em São Paulo nos anos de 1917 e 1940, e na Bahia no ano de
23 1926 (Gonçalves, Cardoso e Ortolani, 1990). Nesses locais a heveicultura é favorecida pelo clima
24 impróprio ao desenvolvimento do patógeno *P. ulei*, causador da doença conhecida como mal das
25 folhas, funcionando como zonas de escape da doença (Gasparotto e Pereira, 2012; Rivano *et al.*,
26 2016).

27 A produção de borracha natural ocorre principalmente no sudeste da Ásia (92%), África (6%)
28 e América Latina (2%). Os principais países produtores são: Tailândia (37% da produção mundial),
29 Indonésia, Malásia, Índia, China, Vietnã, Sri Lank, Brasil, Libéria, Costa do Marfim, Filipinas,
30 Camarões, Nigéria, Camboja, Guatemala, Mianmar, Gana, República Democrática do Congo, Gabão,
31 Bangladesh, Laos e Nova Guiné (Priyadarshan, 2017). O Brasil contribui com cerca de 1% da
32 produção mundial de borracha, sendo o Estado de São Paulo responsável por 60% dessa produção

1 (Leal, Ramos e Pereira, 2018), enquanto que os estados de Mato Grosso , Minas Gerais, Goiás, Rio
2 de Janeiro, Espírito Santo e Bahia correspondem com o restante da produção do país (Rivano *et al.*,
3 2016). Esses cultivos comerciais de seringueira são viabilizados por meio de clones altamente
4 produtivos e com resistência parcial ao *P. ulei* (Leal, Ramos e Pereira, 2018).

5 2.2 Fungos endofíticos

6 O termo endofítico foi descrito pela primeira vez por De Bary (1866), e refere-se a qualquer
7 microrganismo que habita o interior de uma planta, sendo distinto dos epífitos que vivem na superfície
8 das plantas (Carroll, 1988). Os endofíticos são conceituados como todos os microrganismos que
9 habitam órgãos vegetais que, em algum momento da sua vida, podem colonizar os tecidos internos
10 da planta sem causar danos aparentes ao hospedeiro (Petrini, 1991). Os fungos endofíticos tendem a
11 permanecer estéreis na planta e somente emergem para esporular na senescência da hospedeira ou
12 quando a planta está estressada (Stone, Polishook e White, 2004).

13 Geralmente, ocorre uma grande diversidade de fungos endofíticos nos tecidos das plantas,
14 principalmente nas folhas que podem abrigar até um isolado por 2 mm² de tecido foliar, enquanto que
15 as espécies de plantas em suas áreas nativas podem ser habitadas por milhares de espécies (Arnold *et*
16 *al.*, 2003; Herre *et al.*, 2007). Levando em consideração a alta diversidade de fungos endofíticos e a
17 probabilidade de que pelo menos duas espécies de fungos são específicas do hospedeiro por espécie
18 de planta, existiria no mínimo entre 500.000 e 600.000 espécies endófitas, assumindo que existam
19 entre 250.000 e 300.000 espécies de plantas em todo o mundo (Schmit e Mueller, 2007).

20 Em geral, apenas dois grupos de fungos endofíticos são reconhecidos: os Clavicipitáceos e os
21 não-Clavicipitáceos (Carroll, 1988). Os endófitos do grupo Clavicipitáceos compreendem os gêneros
22 de ascomicetos *Epicloe* e *Balansia* e seus anamorfos *Neotyphodium* e *Ephelis* (Schulz e Boyle, 2005),
23 formam infecções intercelulares e sistêmicas, quase que exclusivamente com as gramíneas, sua
24 transmissão é vertical, ou seja, as plantas maternas transmitindo os fungos para os seus descendentes
25 por meio de sementes (Rodriguez *et al.*, 2009). Os fungos endofíticos pertencentes a esse grupo
26 geralmente aumentam a biomassa das plantas, conferem tolerância à seca e produzem substâncias
27 químicas tóxicas para os animais diminuindo a herbivoria (Clay, 1988).

28 Os fungos endofíticos do grupo não-Clavicipitáceos são altamente diversificados, sendo
29 representados, em sua maioria, por uma ampla gama de espécies de várias famílias pertencentes ao
30 filo Ascomycota com papéis ecológicos diversos e muitas das vezes mal compreendido (Rodriguez
31 *et al.*, 2009). Vários fungos desse grupo têm demonstrado estabelecer mutualismo com suas plantas

1 hospedeiras, conferindo-lhes benefícios como tolerância a estresses bióticos e abióticos, aquisição de
2 nutrientes e aumento do crescimento e produtividade (Arnold *et al.*, 2003).

3 Os fungos endofíticos foliares de árvores lenhosas são adquiridos do meio ambiente, sendo
4 transmitidos horizontalmente por meio de esporos que são liberados de folhas senescentes ou caídas,
5 os quais podem ser disseminados por herbívoros e/ou por agentes abióticos como a chuva e o vento
6 (Rodríguez *et al.*, 2009), e colonizam folhas recém molhadas formando uma comunidade
7 diversificada de fungos endofíticos (Saikkonen, 2007; Herre *et al.*, 2005). Os fungos endofíticos que
8 colonizam os tecidos foliares são incapazes de serem dispersados para outras partes da planta, o que
9 torna a vida útil e o tempo de geração desses fungos limitados pela vida útil das folhas da hospedeira
10 (Saikkonen, 2007).

11 As espécies fúngicas que são comumente isoladas de tecidos vegetais sadio pertencem aos
12 filos Glomeromycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e fungos mitospóricos (Guo, Huang
13 e Wang, 2008; Gunatilaka, 2006). No entanto, os fungos endofíticos que são mais comumente
14 isolados pertencem ao filo Ascomycota, geralmente em sua fase anamórfica (Schulz *et al.*, 1999).
15 Apesar da grande diversidade dos fungos endofíticos, sua população pode estar sendo subestimada,
16 uma vez que os métodos utilizados para isolar e cultivar esses fungos podem ser seletivos; alguns
17 endófitos não são cultiváveis; outros apresentam crescimento muito lento e acabam sendo superados
18 por aqueles de crescimento mais rápido; fungos com baixa frequência e/ou raros podem não ser
19 capturados pelo tamanho da amostragem, devido a sua baixa taxa de infecção nos tecidos das planta
20 ou sua ocorrência irregular (Moricca e Ragazzi, 2008).

21 Segundo Kharwar *et al.*, (2008) a maior diversidade de fungos endofíticos está concentrada
22 nos tecidos foliares e após a coleta do material vegetal, este deve ser processado o mais rápido
23 possível, para evitar alterações na taxa de recuperação dos endófitos que são causadas por fatores
24 relacionados ao período de estocagem do material (Costa, Peixoto e Gusmão, 2015). Quanto a
25 fragmentação do material vegetal para recuperação dos endófitos é recomendada que este seja
26 triturado ou o tamanho dos fragmentos seja reduzido (Gamboa, Laureano e Bayman, 2003). Com
27 relação ao meio de cultura para o isolamento de fungos endofíticos, os meios contendo o extrato de
28 malte são os mais utilizados. No entanto, os meios BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e AO (Aveia e Agar)
29 constituem meios de cultura utilizados com sucesso no isolamento de fungos endofíticos (Bernstein
30 e Carroll, 1977; Ferreira Rodrigues, 1994).

31 Mais da metade dos fungos endofíticos cultivados em meios micológicos comuns não
32 produzem conídio ou esporos, por este motivo a identificação através de técnicas morfológicas

1 comuns não são indicadas para esses fungos, devendo ser feita identificação molecular com base na
2 sequência da região do espaçador interno transcrito (ITS) da subunidade do grande gene rRNA, as
3 sequências dessa região têm sido utilizadas como código de barras universal para discriminar gêneros
4 de fungos (Corrêa *et al.*, 2014; Schoch *et al.*, 2012).

5 2.3 Fungos endofíticos como agentes de controle biológico

6 As doenças de plantas, causadas por fungos, bactérias, nematoides, vírus e protozoários tem
7 grande efeito na agricultura, resultando em perdas diretas na produção, que tem efeito acentuado
8 como consequência do aquecimento global (Suryanarayanan, Rajulu e Vidal, 2016; Oerke, 2006).

9 A aplicação de produtos químicos (pesticidas e fungicidas) para controlar microrganismos na
10 agricultura pode render um efeito substancial sobre as perdas, contudo essa abordagem pode não ser
11 favorável ao meio ambiente, especialmente nos países em desenvolvimento (Maxmen, 2013). Além
12 do mais, o uso contínuo de agentes químicos resulta no aumento da resistência de pragas e patógenos
13 (Chow, Rahman e Ting, 2018). Nesse cenário, busca-se métodos de controle alternativos para esses
14 fitopatógenos afim de diminuir as perdas na produção de forma segura e eficaz, como alternativa o
15 controle biológico pode ser uma abordagem viável, uma vez que faz uso de organismos que
16 apresentam capacidade de inibir ou suprimir o crescimento de outros organismos (Card *et al.*, 2016).

17 A interação dos fungos endofíticos com a planta hospedeira que surge como uma alternativa
18 interessante para a adaptação das plantas devido à grande quantidade desses microrganismos, sua
19 diversidade, onipresença e ampla gama de funções ecológicas que desempenham no ecossistema
20 natural, o que os tornam um valioso de agentes de controle biológico (Chadha *et al.*, 2015). A
21 promoção na saúde das plantas hospedeiras devido a interação com fungos endofíticos reflete, ainda
22 uma aplicação significativa em agricultura sustentável de baixo insumo com alta produtividade
23 (Mapelli *et al.*, 2013).

24 As interações entre a planta e os fungos endofíticos podem variar de mutualista a antagonista,
25 dependendo de fatores como o tipo de transmissão, idade da planta, nutrição, condições ambientais,
26 aleloquímicas, entre outras (Saikkonen, Saari e Helander, 2010). Essa interação é caracterizada ainda
27 como “antagonista balanceada”, que é um estado de equilíbrio entre virulência fúngica e o mecanismo
28 de defesa da planta (Moricca e Ragazzi, 2008).

29 Os fungos endofíticos habitam um nicho ecológico semelhante aquele ocupado por
30 fitopatógenos, isso os possibilita protegerem a planta do ataque de fitopatógenos através de
31 competição de nicho ecológico (colonização rápida), e nutrição (esgotamento dos limitados substratos
32 disponíveis), de modo que nenhum estaria disponível para o desenvolvimento do patógeno (Berg *et*

1 *al.*, 2005; Pal e Gardener, 2006). Além dessas, os endófitos utilizam o hiperparasitismo e predação,
2 onde o patógeno é atacado diretamente por um endófito que o mata, como no caso do *Trichoderma*
3 que tem a capacidade de parasitar as hifas do patógeno *Rhizoctonia Solani* (Tripathi *et al.*, 2008).

4 Os fungos endofíticos também são capazes de produzir fumigantes e compostos
5 antimicrobianos que inibem o crescimento de fitopatógenos (Mishra *et al.*, 2014). Herre *et al.* (2005),
6 sugerem que grande parte da defesa do hospedeiro observada pode ser resultado dos endófitos
7 fúngicos estarem “guardando o seu território” de usurpadores em potencial.

8 Muitos estudos têm mostrado que os fungos endofíticos tem potencial como agentes de
9 controle biológico. Em um estudo que buscou investigar a dinâmica de interação entre endófito e
10 patógeno em dendê, demonstrou que os endófitos (*Diaporthe phaseolorum*, *Trichoderma asperellum*
11 e *Penicillium citrinum*) foram capazes de superar o patógeno *Ganoderma boninense* em ensaios *in*
12 *vivo* (Chow, Rahman e Ting, 2018). Rocha *et al.* (2011) identificaram 13 fungos endofíticos que
13 apresentaram atividade inibitória contra o *P. ulei in vitro*. Em um estudo realizado por González-
14 Teuber (2016) os fungos endofíticos foliares de *Embothrium coccineum* foram capazes de inibir o
15 crescimento de patógenos fúngicos em ensaios de confronto *in vitro*.

16 2.4 Potencial enzimático de fungos endofíticos

17 Os fungos endofíticos estão sendo cada vez mais estudados por serem um grupo de
18 microrganismos que podem fornecer fontes para novos metabólitos secundários com atividades
19 biológicas úteis. Uma série de princípios ativos foi isolada e caracterizada a partir de endófitos e
20 muitos deles são anticancerígenos, antioxidantes, antifúngicos, antibacterianos e antivirais (Rathod
21 *et al.*, 2013; Sette *et al.*, 2006).

22 Os fungos endofíticos apresentam uma alta capacidade para produzir enzimas extracelulares,
23 e.g amilases, celulasas, lacases, lipases, pectinases e proteinases, que são essenciais nos processos de
24 biodegradação e hidrólise, que são mecanismos importantes contra infecção fitopatogênica e na
25 retirada de nutrientes das plantas hospedeiras pelos endófitos (Sunitha *et al.*, 2012; Fouda *et al.*,
26 2015). O modo de nutrição e a natureza diversa dos substratos que os diferentes grupos ecológicos de
27 fungos exploram para o crescimento ajudam na sua capacidade de empregar um conjunto
28 diversificado de enzimas extracelulares (Suryanarayanan *et al.*, 2012).

29 As atividades enzimáticas extracelulares de fungos endofíticos ainda desempenham um papel
30 fundamental na degradação de polissacarídeos e proteínas durante a senescência das plantas (Fouda,
31 Hassan, S. E. D., *et al.*, 2015), e pode implicar em uma estratégia de resistência da planta hospedeira

1 contra microrganismos patogênicos, e por outro lado, melhorar o estado nutricional das plantas (Lee,
2 Tan e Ting, 2014; Choi, Hodgkiss e Hyde, 2005).

3 Os fungos endofíticos tem potencial para produzirem um arsenal de biocatalizadores uma vez
4 que infectam os tecidos das plantas (folhas, caules, raízes, etc.), sobrevivem nesses tecidos e alguns
5 deles continuam a sobreviver nos tecidos senescentes como saprófitos, funcionando assim como
6 degradadores pioneiros (Choi, Hodgkiss e Hyde, 2005). Devido a esse estilo de vida os fungos
7 endofíticos têm que necessariamente elaborar uma variedade de enzimas para que durante a infecção
8 possa romper as barreiras do hospedeiro, combater as substâncias químicas de defesa das plantas para
9 sobreviver nos tecidos vegetais, e para degradar as paredes celulares de tecidos vegetais durante a
10 senescência para assim continuarem como saprófitos (Sun, Guo e Hyde, 2011; Fouda *et al.*, 2015).

11 O papel funcional dos endófitos pode estar relacionado com o tipo de enzimas que eles
12 produzem, por isso é importante testar a capacidade desses microrganismos quanto à sua produção
13 enzimática (Choi, Hodgkiss e Hyde, 2005). Se eles são parasitas fracos ou patógenos latentes, eles
14 podem produzir pectinase e protease (Brett, 1990; Reddy, 1997), enquanto que se forem mutualistas
15 provavelmente produzirão xilanase, mananase e celulase (Pointing, 1999).

16 Os microrganismos endofíticos são a fonte preferencial de enzimas em aplicações industriais,
17 essencialmente devido ao seu crescimento rápido e baixo custo em comparação com as enzimas
18 extraídas de animais e plantas (Laxman *et al.*, 2005). Cerca de 60% das enzimas industriais usadas
19 atualmente são de origem fúngica (Ostergaard e Olsen, 2010); sendo utilizadas em grande escala nas
20 mais diversas indústrias, compreendendo indústrias de tecidos (celulases), detergentes (proteases e
21 lipases), de alimentos (amilases, pectinases, proteases e celulases) e de couro (proteases e lipases)
22 (Nielsen e Oxenboll, 1998; Suryanarayanan *et al.*, 2012).

23 2.5 Fungos endofíticos associados de *Hevea* spp.

24 A pesquisa com endófitos se intensificou nos últimos anos, incluindo a catalogação das espécies
25 ao estudo da interação entre endófito/planta (Hyde e Soyong, 2008; Rodriguez *et al.*, 2009; Tao *et*
26 *al.*, 2008). No entanto, os estudos com endofíticos estão mais voltados para plantas medicinais com
27 intuito de descobrir novos compostos (Mitchell *et al.*, 2008). Alguns estudos feitos com espécies
28 tropicais comprovaram que os endófitos destas espécies constituem uma assembleia ecológica rica
29 em espécies de fungos e, portanto, devem ser mais enfatizados na busca de novas espécies,
30 metabólitos e na compreensão do seu papel na natureza (Arnold e Lutzoni, 2007; Saikkonen, 2007;
31 Gazis e Chaverri, 2010).

1 O maior estudo feito com fungos endofíticos de seringueira ocorreu no Peru, sendo conduzido
2 em espécies silvestres de seringueira, e esse estudo demonstrou que embora haja uma maior
3 frequência de colonização de fungos endofíticos nas folhas de seringueira (90%) em relação aos
4 tecidos do alburno (60%), a diversidade desses fungos é maior nos tecidos do alburno. Os fungos
5 endofíticos isolados nesse trabalho, em sua grande maioria, pertencem ao filo Ascomycota (97%),
6 mais comumente isolado, seguido dos filios Basidiomycota (1%) e Zygomycota (2%). Os gêneros
7 predominantes foram *Pestalotiopsis*, *Trichoderma* e *Penicillium* (Gazis e Chaverri, 2010a).

8 Gazis e Chaverri (2015) em um estudo com centenas de fungos endofíticos de árvores
9 pertencentes ao gênero *Hevea*, realizado em árvores nativas e de plantações, demonstraram que as
10 espécies nativas possuem uma alta diversidade de espécies fúngicas benéficas que podem contribuir
11 para a proteção das hospedeiras contra patógenos. Foram realizados testes de antagonismo *in vitro*
12 contra *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, onde os endófitos fúngicos selecionados de árvores
13 silvestres tiveram um efeito inibitório superior (30-50%) quando comparado com os endófitos de
14 árvores de plantação.

15 Rocha *et al.* (2011) isolaram fungos endofíticos foliares de clones de seringueira pertencentes
16 a uma plantação na Bahia, sendo este o primeiro relato de fungos endofíticos isolados de uma
17 plantação cultivada de *Hevea*. Esse trabalho demonstrou que o extrato de cultura liofilizadas de onze
18 fungos endofíticos foliares pertencentes a 7 gêneros (*Fusarium*, *Phomopsis*, *Giberella*, *Myrothecium*,
19 *Microsphaeropsis* e *Pestalotiopsis*) apresentaram uma alta atividade inibitória na germinação de
20 conídios de *P. ulei*, tornando-os candidatos promissores para o controle biológico.

21 Déon *et al.* (2012) investigaram a presença de *Corynespora cassiicola* entre fungos
22 endofíticos de seringueira em uma plantação que não tinha o histórico da doença, foram encontrados
23 apenas quatro isolados identificados como *C. cassiicola* e apenas três desses isolados foram capazes
24 de induzir sintomas com diferentes intensidades na cultivar, portanto, *C. cassiicola* está presente na
25 América do Sul como endofítico, podendo evoluir no seu estilo de vida, tornando-se saprofítico ou
26 até potencialmente patogênico.

27 Vaz *et al.* (2018) em um estudo multiescalar de comunidades fúngicas cultiváveis da
28 endosfera foliar de *H. brasiliensis* na Amazônia oriental obteve um total de 210 isolados, onde a
29 espécie *Colletotrichum* sp. 1 foi a mais abundante em ambas as áreas estudadas, seguida dos gêneros
30 *Clonostachys* sp. 1 e *Trichoderma* sp. 1. A composição da comunidade fúngica apresentou diferença
31 entre as regiões estudadas, sendo a fonte fúngica local o fator principal que contribuiu para essa
32 diferença. Em um estudo de Araújo *et al.* (2018), onde foi amostrado a diversidade dos fungos

1 endofíticos cultiváveis de *H. guianensis* presentes nas folhas, caules e raízes foi isolado apenas 92
2 fungos, compostos majoritariamente pelo filo Ascomycota (96,73%). Nesse trabalho, o caule das
3 árvores de *H. guianensis* apresentaram a maior riqueza e diversidade de fungos, apesar de a maior
4 frequência desses fungos serem encontrada nas folhas, esses resultados corroboram com o resultado
5 encontrado por Gazis e Chaverri (2010). O gênero *Colletotrichum* sp. foi o gênero mais representativo
6 nesse estudo, sendo mais abundante nas folhas; o segundo gênero mais abundante nas folhas foi o
7 *Penicillium* seguido de *Diaporthe*.

8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

1 **3 OBJETIVOS**

2 3.1 OBJETIVO GERAL

3 Estudar as comunidades de fungos endofíticos foliares de três clones de *Hevea* spp. e avaliar o
4 potencial para biocontrole de fungos fitopatogênicos e produção de enzimas extracelulares.

5 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

6 1) Estudar a diversidade de fungos endofíticos de seringueira associados a folhas de três clones de
7 *Hevea* spp.

8 2) Investigar o potencial de antagonismo in vitro de fungos endofíticos de *Hevea* spp. contra
9 *Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum* sp.

10 3) Avaliar a produção de amilase, celulase, lipase e protease pelos fungos endofíticos de *Hevea* spp.

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1 4 MATERIAL E MÉTODOS

2 4.1 Coleta e isolamento de fungos endofíticos

3 A coleta do material vegetal foi realizada em um plantio de seringueira na Embrapa Amazônia
4 Ocidental, 02°53'49.1" S e 59°59'07.3" W, localizada na Rodovia AM-010, Km 29, município de
5 Manaus – AM. Três indivíduos adultos dos clones CPAA C 06 (*H. pauciflora* x *H. rigidifolia*), 44
6 (*H. Pauciflora* (CNS AM 7745) x *H. Rigidifolia* (CNS AM 8105)) e 45 (*H. guianensis* var. *marginata*
7 x *H. pauciflora* Baldwin) foram amostrados aleatoriamente. Foram selecionados 20 folíolos sem
8 danos visíveis de cada clone para isolamento dos fungos endofíticos. Após a lavagem em água
9 corrente, foram retirados cinco fragmentos de 1 cm², de cada folíolo e estes foram submetidos a
10 desinfestação superficial em álcool etílico a 70% por 30 s, hipoclorito de sódio a 1,5% por 2 min
11 seguido de três lavagens com água destilada. Como forma de controle negativo do procedimento de
12 desinfestação, uma alíquota de 100 µl de água destilada utilizada na esterilização foi plaqueada em
13 placas de petri contendo BDA (200g Batata, 17g Dextrose, 17g Ágar, 1L água destilada) e incubadas
14 por 48 horas a ±26° C.

15 Em câmara de fluxo laminar foram removidas as bordas dos fragmentos foliares
16 desinfestados, e cinco fragmentos de 0,5 cm² foram depositados de forma equidistante em placas de
17 petri contendo o meio de cultura ágar-água (17 g de ágar; 1 L de água destilada). As placas foram
18 mantidas em câmara B.O.D. por 24 a 48 horas. Após o crescimento micelial dos fungos, estes foram
19 repicados para placas de petri contendo meio de cultura BDA suplementado com antibiótico
20 cloranfenicol 250 mg. L⁻¹, e mantidos em temperatura ambiente (± 26 °C) sob iluminação constante
21 para induzir a produção de esporos.

22 Para manter a uniformidade genética, foram obtidas culturas monospóricas de cada isolado de
23 acordo com a metodologia de Choi, Hyde e Ho (1999). Os 269 (99 do clone C44, 86 do C06 e 84 do
24 C44) isolados obtidos foram preservados em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA inclinado
25 e pelo método Castellani (Castellani, 1968), em temperatura ambiente (± 26 °C).

26 4.2 Caracterização morfológica dos fungos endofíticos

27 Os isolados foram agrupados em morfotipos de acordo com as características macroscópicas
28 das colônias, como coloração e aspecto do micélio, para posteriores ensaios biológicos. Para
29 observação de estruturas reprodutivas foram preparados microcultivos e as lamínulas contendo os
30 fragmentos dos fungos foram coradas com lactofenol e azul de algodão (1%) e observadas sob
31 objetiva de 40X em microscópio Zeiss (Humber, 1994).

1 4.3 Extração do DNA genômico

2 O DNA genômico foi obtido a partir de culturas monospóricas com dez dias cultivo em placas de
3 petri contendo BDA, seguindo o protocolo fenol clorofórmio (Doyle e Doyle, 1987). O micélio de
4 cada isolado foi removido da superfície da colônia com o auxílio de uma espátula estéril, macerado
5 com nitrogênio líquido, homogeneizado com detergente CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio) e
6 incubado à 65° C por 30 minutos. O DNA genômico foi extraído com clorofórmio e álcool isoamílico
7 na proporção de 24:1, precipitado com isopropanol, e lavado com etanol 75%. A ressuspensão foi
8 feita com água ultrapura (30 µL).

9 A concentração e a qualidade dos DNAs extraídos foram determinadas em espectrofotômetro
10 Nanodrop® 2000c (Thermo Fisher Scientific) através da razão 260/280 nm, e em gel de agarose
11 (0,8%), usando como referência o marcador de peso fago lambda de 10 ng (PROMEGA). A
12 concentração final dos DNAs foi ajustada para 10 µg/µl e estes foram armazenados em freezer -20°
13 C para posterior uso.

14 4.4 PCR e Sequenciamento Sanger

15 A reação em cadeia de polimerase foi realizada para amplificação da região genômica parcial
16 do espaçador interno transcrito do rDNA (ITS), que é considerado o código de barras universal para
17 identificação molecular de fungos (Schoch *et al.*, 2012). As amplificações por PCR foram realizadas
18 para um volume final de 12 µl, contendo 1 µl de DNA, 2,4 µl de tampão incolor Go Taq® Flexi (5X),
19 0,8 µl de MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 0,5 µl de cada iniciador (10 µM), (ITS1F-
20 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' / ITS4R-5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') (White *et al.*
21 1990), 0,12 µl da enzima Go Taq® DNA polimerase (Promega) e 6,18 µl de água ultrapura. Para
22 excluir a possibilidade de contaminação dos reagentes foram preparados controles negativos,
23 substituindo o DNA pela água ultrapura utilizada no preparo da reação.

24 A reação de PCR foi realizada em termociclador Byosystem (MG96G) e as condições
25 utilizadas para amplificação consistiram em um ciclo inicial a 94° C por 5 min, 40 ciclos de 95° C / 1
26 min de desnaturação, 53° C / 1 min para anelamento, e 72° C / 1 min para extensão, seguido de 72°
27 C / 5 minutos para extensão final e repouso a 4° C (Gazis e Chaverri, 2010). Os amplicons gerados
28 foram verificados em gel de agarose (1%) corados com Gel Red™ (Biotium), usando marcador de
29 peso molecular de 100 pares de base (Sinapse Biotecnologia).

30 Os produtos de PCR foram purificados com polietilenoglicol (PEG 20%) seguindo o protocolo
31 descrito por Dunn e Blattner (1987). Em seguida foi realizada a reação de sequenciamento com o kit
32 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific) para um volume final de 10

1 μl , sendo 1,8 μL do Tampão 5x, 0,4 μL da enzima BigDye, 0,2 μL do primer Foward (5 μM), 5,6 μL
2 de água Milli-Q e 2 μL de DNA. As condições da reação de sequenciamento foram 95 °C / 1 min, 35
3 ciclos de 95 °C / 20 s, 55 °C / 20 s, 60 °C / 2 min e 4 °C / ∞ . Os produtos da PCR foram precipitados
4 com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e etanol (EtOH) e ressuspensos em 10 μL de
5 formamida Hi-Di. A leitura dos produtos obtidos nas reações de sequenciamento foi efetuada
6 utilizando o sequenciador automático ABI 3130, da Applied Biosystems, de acordo com orientações
7 do fabricante.

8 4.5 Identificação e análises filogenéticas

9 Os eletroferogramas gerados a partir do sequenciamento Sanger foram analisados com o
10 programa SeqAssem® (Hepperle, 2004). As sequências foram alinhadas com o algoritmo ClustalW
11 (Thompson *et al.*, 1997) implementado no Programa MEGA7 (Kumar, Stecher, & Tamura 2016), e
12 estas variaram de 400 a 600 pares de base (pb). As sequências foram submetidas a análise comparativa
13 com sequências de material de referência depositadas no NCBI (National Center for Biotechnological
14 Information) utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). As sequências
15 de referência do banco de dados que exibiram a maior identidade em relação às sequências obtidas
16 dos fungos endofíticos de seringueira foram utilizadas para as análises filogenéticas.

17 As filogenias foram construídas para cada gênero e/ou espécie usando o método estatístico
18 *Neighbor joining* 1000 replicações no programa MEGA7. Além destas, para os dois filos mais
19 abundantes, Ascomycota e Basidiomycota foram feitas filogenias separadas. O melhor modelo de
20 evolução de nucleotídeos sob o critério de informação de Akaike (AIC) para cada conjunto de dados
21 foi estimado a partir da análise feita no software ModelTest 3.7 (Posada, 2008). O melhor modelo de
22 acordo com o critério AIC para a árvore de Ascomycota foi GTR+I+G. As árvores geradas foram
23 enraizadas com isolados de referência e isolados do presente estudo. A espécie escolhida com
24 outgroup para a árvore de isolados de Ascomycota foi *Fomitopsis subtropical* (número de acesso
25 KR605787.1) e HEV228J, e para Basidiomycota foi *Xylaria cubensis* (número de acesso
26 AB625420.1) e HEV268N. A estabilidade dos cladogramas formados foi avaliada de acordo com o suporte
27 da análise de bootstrap (1000 permutações). A visualização das árvores filogenéticas foi feita com o
28 software FigTree v1.4.3 disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>. A edição das árvores foi
29 realizada no programa Inkscape. As sequências obtidas dos isolados endofíticos desse estudo foram
30 depositadas no GenBank sob os números de acesso MT470446 - MT470693 para ITS (Tabela S1 em
31 anexo).

1 4.6 Análises de diversidade e composição taxonômica

2 As análises de diversidade e composição taxonômica dos endofíticos foram realizadas com base
3 em uma matriz de abundância das espécies e/ou gêneros. As sequências ITS dos isolados passaram
4 por um agrupamento genérico numérico com base na porcentagem de similaridade entre elas, a este
5 agrupamento dá-se o nome de OTU (*Operational taxonomic unit*) (Tabela S2). Sequências que
6 apresentaram similaridade maior ou igual a 98% foram consideradas como membros da mesma OTU,
7 enquanto que sequências abaixo desse valor foram consideradas como OTUs diferentes.

8 A composição taxonômica dos endofíticos dentro de cada clone, incluindo os níveis de filo, classe,
9 ordem, família, gênero e espécies foram explorados através de gráficos de barras feitos com o pacote
10 ggplot2 (Wickham, 2016) no Rstudio versão 1.2.5042 (RTeam, 2020).

11 A riqueza e a diversidade de fungos endofíticos dentro de cada clone (CPAA C06, C44 e C45) de
12 *Hevea* spp. foram mensuradas através da diversidade alfa, que é a diversidade média de espécies em
13 locais ou habitats em escala local. Para tal foi utilizado a estimativa de curvas de predição
14 (extrapolação) e rarefação (interpolação) baseadas nos números de Hill, que são estimativas empíricas
15 que tendem a ser uma função crescente do esforço de amostragem e são usados para caracterizar a
16 diversidade taxonômica filogenética ou funcional (Chao *et al.*, 2014).

17 Hill (1973) integrou riqueza de espécies e abundância em uma classe de medidas que atualmente
18 é chamada de números de Hill ou número efetivo de espécies, estes números representam um grupo
19 matematicamente diversificado de índices que diferem entre si pelo expoente q . Uma estrutura de
20 amostragem unificada para modelos de extrapolação e rarefação de riqueza de espécies (qD , quando
21 $q = 0$) para dados baseados em indivíduos (abundância) e baseados em amostras (incidência) foi usada
22 para ampliar as medidas de diversidade de táxons incorporando a abundância relativa (para qualquer
23 qD , $q > 0$), onde $q = 1$ para o exponencial do índice de entropia de Shannon Wiener e $q = 2$ para o
24 inverso do índice de concentração de Simpson (Chao *et al.*, 2014). O índice de Shannon Wiener avalia
25 a riqueza e abundância das espécies, com 0 indicando uma comunidade com apenas uma espécie e
26 um valor alto indicando comunidades com muitas espécies (HILL, 1973), enquanto que o índice de
27 diversidade de Simpson estima a probabilidade de dois indivíduos selecionados aleatoriamente de
28 uma comunidade pertencerem a mesma espécie (Simpson, 1949). As análises foram realizadas
29 usando os pacotes Vegan (Oksanen *et al.*, 2019) e iNEXT (Hsieh, Ma e Chao, 2020) no software R.

30 Ainda, para comparar as assembleias de fungos entre os clones foi preparado o diagrama de Venn,
31 neste diagrama é possível observar quantas OTUs foram exclusivas de cada clone (C06, C44 e C45)
32 e as que foram compartilhadas entre eles (Bardou *et al.*, 2014).

1 4.7 Teste de antagonismo *in vitro*

2 Para o teste de antagonismo *in vitro* foram selecionados 102 isolados endofíticos obtidos dos
3 três clones de seringueira (CPAA C06, C44 e C45), e foram avaliados quanto à inibição de
4 crescimento micelial dos fitopatógenos *C. cassiicola* e *Colletotrichum sp.*, que são patógenos de
5 plantas economicamente importantes, especialmente nas regiões tropicais onde afetam uma grande
6 variedade de plantas hospedeiras (Sutton, 1992; Bragança et al., 2016). Foi utilizado o método de
7 culturas pareadas em placas de petri de 9 cm de diâmetro contendo meio BDA, o ensaio foi realizado
8 conforme descrito por Dennis e Webster, (1971). As placas foram mantidas em temperatura de $\pm 26^\circ$
9 C durante 2 a 3 semanas. O controle consistiu de placas contendo um disco de cultura do fitopatógeno
10 e um disco de meio BDA. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

11 A avaliação foi realizada a cada 48 horas até que a colônia na placa controle atingisse 50% de
12 seu crescimento. O diâmetro das colônias foi medido com o auxílio de um paquímetro digital e a
13 inibição do crescimento (%) do patógeno em relação ao endófito foi determinado pela fórmula (Lee,
14 Tan e Ting, 2014):

$$15 \quad \text{Inibição (\%)} = \left[\frac{(R - r)}{R} * 100 \right]$$

16 Onde:

17 R = crescimento radial do patógeno na placa controle;

18 r = crescimento radial do patógeno em culturas pareadas.

19 Os dados obtidos foram testados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilks e
20 homocedasticidade das variâncias através do teste de Levene ($p > 0,05$). Os grupos foram comparados
21 através de uma análise de variância (ANOVA) para identificar diferenças significativas entre eles,
22 seguida pelo teste de comparação de médias de Duncan (5%). As análises foram realizadas usando
23 o pacote *Agricolae* no programa RStudio.

24 4.8 Determinação das atividades enzimáticas

25 Foi avaliado a capacidade de síntese das enzimas amilase, celulase, lipase e protease de 102
26 isolados endofíticos. Inicialmente os isolados foram cultivados em placas com meio de cultura BDA
27 e mantidos a temperatura de 26° C durante sete dias para posterior uso nos testes enzimáticos. Destas
28 colônias foram retirados apenas um disco de micélio de 5 mm de diâmetro que foi depositado no
29 centro de uma placa de petri de 90 mm de diâmetro contendo o meio de cultura específico para cada
30 enzima e, posteriormente foram incubados em B.O.D à 25° C durante cinco a sete dias.

1 A atividade amilolítica foi avaliada pelo crescimento dos fungos em meio de Dextrose, Extrato
2 de levedura e Peptona (GYP) esterilizado (dextrose 10,0 g; extrato de levedura 0,1 g; peptona 0,5 g;
3 ágar 15 g; água destilada 1 L, pH final = 6) suplementado com 2 g de amido solúvel. Após o período
4 de incubação as placas foram lavadas com 20 ml da solução de lugol (1% de iodo; 2% de iodeto de
5 potássio; água destilada 100 ml). Esta solução reage com o amido, resultando em uma cor preto-
6 azulada escura devido à interação entre o iodo e a estrutura de espiral do polissacarídeo. Após 10
7 minutos, nas áreas onde o amido foi degradado pelas amilases foi possível observar uma zona clara
8 indicando a presença de amilase (Novo *et al.*, 2015).

9 Para a produção de celulase, os isolados foram cultivados em meio GYP suplementado com
10 0,5% de Carboxi-metil-celulose. Para a avaliação, foram adicionados 20 ml da solução de vermelho
11 congo 0,2% (0,2 g de vermelho congo; 100 ml de água destilada) durante 20 minutos, e
12 posteriormente lavadas com NaCl (1M) por 15 min. Este corante tem a propriedade de se ligar a
13 cadeias polissacarídicas e ao lavar as colônias é perceptível um descoloramento na região onde a
14 celulose foi hidrolisada observado por uma zona clara ao redor da colônia (Benoliel *et al.*, 2013).

15 A produção de lipase foi detectada pelo crescimento dos isolados em meio Peptona-Ágar
16 (peptona 10g; NaCl 5,0 g; CaCl₂.2H₂O 0,1g; ágar 15g; água destilada 1 L; pH=6,0) complementado
17 com 1% de Tween 20. A presença de lipase positiva pelos fungos foi observada após o período de
18 incubação pela presença de cristais de cálcio e/ou formação de uma área clara ao redor das colônias
19 fúngicas (Sobral, Melo e Souza, 2017).

20 A atividade da enzima protease foi detectada em meio leite-ágar (leite desnatado 10g; ágar
21 15g). Após a incubação, um halo translúcido ao redor das colônias indicava a presença de protease.

22 O delineamento do experimento foi inteiramente casualizado (DIC) com 102 tratamentos
23 (diferentes isolados) e três repetições, sendo a unidade experimental constituída por uma placa de
24 petri contendo um disco do micélio do fungo endofítico em meio específico. A avaliação foi realizada
25 pela tomada da medida do halo formado ao redor das colônias, indicando a síntese das enzimas de
26 interesse. O índice enzimático (IE) foi calculado de acordo com a fórmula (Florencio, Couri e Farinas,
27 2012):

$$IE = \frac{R}{r}$$

29 Onde, R corresponde ao diâmetro do halo e r o diâmetro da colônia. Os fungos com $IE \geq 2$
30 são considerados bons produtores da enzima de interesse, os isolados com IE abaixo de 2, mas acima
31 de 1 são considerados produtores moderados, e os com $IE \leq 1$ são considerados produtores fracos
32 (Hankin e Anagnostakis, 1975). Os IEs das OTUs foram submetidos à uma análise de variância

1 (ANOVA), seguida do teste de Duncan com significância de 0,05. Para demonstrar o índice
2 enzimático de cada OTU, foi construído um heatmap no software R com o pacote *Pheatmap*.

3 **5 RESULTADOS**

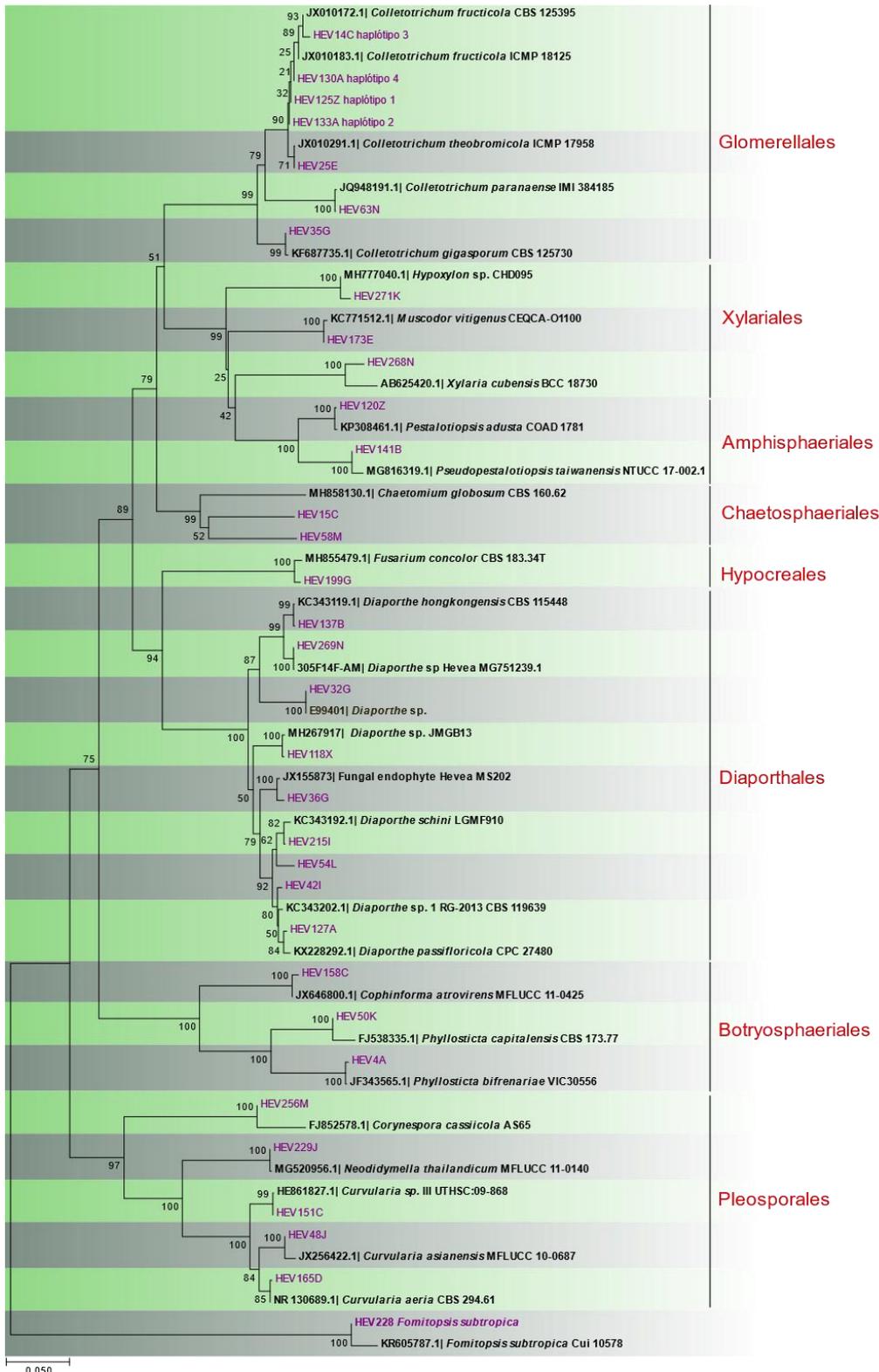
4 5.1 Isolamento e Análise Filogenética

5 Um total de 269 fungos endofíticos foram obtidos de 300 fragmentos de folíolos
6 assintomáticos dos clones CPAA C06 (86 isolados), C44 (84 isolados) e C45 (99 isolados) de *Hevea*
7 sp., em um plantio localizado na Embrapa Amazônia Ocidental, Amazonas, Brasil. A maioria dos
8 isolados obtidos não produziram estruturas que permitissem a identificação em nível de gênero, e
9 foram agrupados em morfotipos de acordo com suas características morfológicas para seleção de
10 isolados representantes para os ensaios biológicos

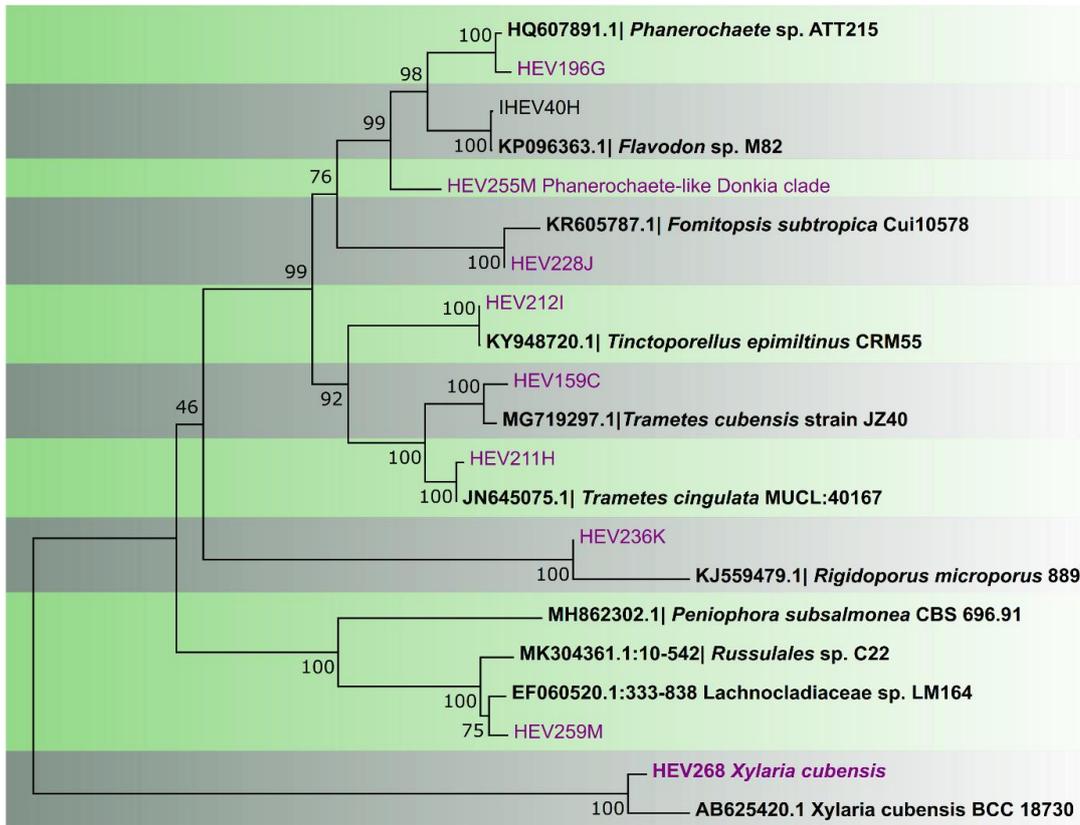
11 Para estabelecer a relação evolutiva de cada isolado, ou seja, uma concisa identificação, foram
12 construídas 21 árvores filogenéticas (dados não mostrados) baseadas no sequenciamento da região
13 ITS do rDNA, e estas foram sumarizadas, separando os táxons entre os filos Ascomycota (Figura 1)
14 e Basidiomycota (Figura 2). A árvore apenas com os isolados pertencentes ao filo Ascomycota
15 formou clados distintos com 18 gêneros (3 não identificados), distribuídos dentro de 9 ordens (1 não
16 identificada). Dentro da espécie *Colletotrichum fructicola*, os isolados foram divididos em 4
17 haplótipos de acordo com mutações pontuais observadas nas posições 22, 474 e 475 no alinhamento
18 das sequências (Haplótipo 1: 22/C, 474/G, 475/-; Haplótipo 2: 22/C, 474/A, 475/-; Haplótipo: 22/C,
19 474/A, 475/C; Haplótipo 4: 22/T, 474/A, 475/C).

20 Alguns isolados não foram identificados em virtude de serem táxons novos, inéditos neste
21 trabalho e ainda sem classificação taxonômica publicada. Neste contexto, dentro da ordem
22 Chaetosphaeriales os isolados HEV58M e HEV15C tiveram um baixo suporte estatístico (Figura 1),
23 o que demonstra que estes são dois gêneros novos. Além destes, dentro da ordem Diaporthales, os
24 isolados HEV269N, HEV32G, HEV118X, HEV36G, HEV54L e HEV42I representam 6 novas
25 espécies endofíticas dentro de *Hevea* sp. (Figura 1).

26 Na árvore de isolados pertencentes ao filo Basidiomycota (Figura 2), foi observado a formação
27 de clados distintos com 8 gêneros (2 não identificados) pertencentes a 2 ordens, Polyporales e
28 Russulales. Os isolados HEV196G e HEV255M são 2 espécies novas pertencentes ao gênero
29 *Phanerochaete*, enquanto que o isolado HEV259M pertencente a classe Russulales, é um possível
30 gênero novo.



1
2 **Figura 1.** Árvore filogenética *Neighbor joining* baseada no sequenciamento da região ITS do rDNA
3 de fungos endofíticos pertencentes ao filo Ascomycota, isolados de diferentes clones de *Hevea* sp. A
4 barra de escala mostra o número de substituições por sítio e os valores do suporte de bootstrap com
5 1000 repetições são exibidos nos nós. A árvore foi enraizada com os outgroups da espécie *Fomitopsis*
6 *subtropica*. Isolados em roxo representam os isolados deste estudo e isolados em preto representam
7 as seqüências de referências.



1

0.050

2 **Figura 2.** Árvore filogenética *Neighbor joining* baseada no sequenciamento da região ITS do rDNA
 3 de fungos endofíticos pertencentes ao filo Basidiomycota, isolados de diferentes clones de *Hevea* sp.
 4 A barra de escala mostra o número de substituições por sítio e os valores do suporte de bootstrap com
 5 1000 repetições são exibidos nos nós. A árvore foi enraizada com os outgroups da espécie *Xylaria*
 6 *cubensis*. Isolados em roxo representam os isolados deste estudo e isolados em preto representam as
 7 sequências de referência.

8 5.2 Composição taxonômica dos fungos endofíticos

9 Um total de 47 unidades taxonômicas operacionais (OTUs) foram identificadas, pertencendo
 10 a 2 filos, 3 classes, 11 ordens, 18 famílias, e 26 gêneros (Tabela 1). Dos 269 isolados identificados,
 11 cinco (N.I 1, 2, 3, 4 e 5) não corresponderam a nenhuma espécie em particular, sendo classificados
 12 como não identificados. Um total de 11% das sequências correspondeu a espécies raras, com um
 13 único representante presente nas amostras (*singletons*). A maioria dos isolados são membros do filo
 14 Ascomycota (95%) e apenas 4,98% corresponderam ao filo Basidiomycota.

Tabela 1. Lista de identificação das OTUs e classificação taxonômica dos fungos endofíticos isolados de clones de *Hevea* spp.

OTU	Espécies	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	N
1	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h1	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	Glomerellaceae	<i>Colletotrichum</i>	12
2	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	Glomerellaceae	<i>Colletotrichum</i>	89
3	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h3	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	Glomerellaceae	<i>Colletotrichum</i>	3
4	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	Glomerellaceae	<i>Colletotrichum</i>	60
5	<i>Colletotrichum gigasporum</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	Glomerellaceae	<i>Colletotrichum</i>	3
6	<i>Colletotrichum paranaense</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	Glomerellaceae	<i>Colletotrichum</i>	1
7	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Glomerellales	Glomerellaceae	<i>Colletotrichum</i>	1
8	<i>Cophinforma atrovirens</i>	Ascomycota	Dothideomycetes	Botryosphaeriales	Botryosphaeriaceae	<i>Cophinforma</i>	2
9	<i>Corynespora cassiicola</i>	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Corynesporascaceae	<i>Corynespora</i>	4
10	<i>Cucurbitaria berberidis</i>	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Cucurbitariaceae	<i>Cucurbitaria</i>	1
11	<i>Curvularia aerea</i>	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Curvularia</i>	1
12	<i>Curvularia asianensis</i>	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Curvularia</i>	1
13	<i>Curvularia sp. V</i>	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Pleosporaceae	<i>Curvularia</i>	2
14	<i>Diaporthe C.f. passifloricola</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Diaporthe</i>	1
15	<i>Diaporthe hongkongensi</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Diaporthe</i>	2
16	<i>Diaporthe schini</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Diaporthe</i>	4
17	<i>Diaporthe sp. 1</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Diaporthe</i>	17
18	<i>Diaporthe sp. 2</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Diaporthe</i>	4
19	<i>Diaporthe sp. 3</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Diaporthe</i>	1
20	<i>Diaporthe sp. 4</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Diaporthe</i>	8
21	<i>Diaporthe sp. 5</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Diaporthe</i>	1
22	<i>Diaporthe sp. 6</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Diaporthe</i>	13
23	<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Diaporthe</i>	1
24	<i>Fomitopsis subtropica</i>	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Fomitopsidaceae	<i>Fomitopsis</i>	1
25	<i>Fusarium concolor</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Fusarium</i>	1

Continuação Tabela 1.

OTU	Espécies	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	N
26	<i>Flavodon sp.1</i>	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Irpicaceae	<i>Flavodon</i>	1
27	<i>Hypoxylon sp. 1</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Hypoxylaceae	<i>Hypoxylon</i>	1
28	<i>Multiguttulispora sympodialis</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Chaetosphaerialis	Chaetosphaeriaceae	<i>Multiguttulispora</i>	1
29	<i>Muscodor sp. 1</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Xylariaceae	<i>Xylaria</i>	1
30	<i>Neodidymella thailandicum</i>	Ascomycota	Dothideomycetes	Pleosporales	Didymellaceae	<i>Neodidymella</i>	1
31	<i>Pestalotiopsis adusta</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Sporocadaceae	<i>Pestalotiopsis</i>	1
32	<i>Phanerochaete sp. 1</i>	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Phanerochaetaceae	<i>Phanerochaete</i>	1
33	<i>Phanerochaete sp. 2</i>	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Phanerochaetaceae	<i>Phanerochaete</i>	1
34	<i>Phanerochaete sp. 3</i>	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Phanerochaetaceae	<i>Phanerochaete</i>	1
35	<i>Phyllosticta bifrenariae</i>	Ascomycota	Dothideomycetes	Botryosphaeriales	Phyllostictaceae	<i>Phyllosticta</i>	1
36	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	Ascomycota	Dothideomycetes	Botryosphaeriales	Phyllostictaceae	<i>Phyllosticta</i>	12
37	<i>Pseudopestalotiopsis sp. 1</i>	Ascomycota	Sordariomycetes	Xylariales	Xylariaceae	<i>Pseudopestalotiopsis</i>	1
38	<i>Rigidoporus microporus</i>	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Meripilaceae	<i>Rigidoporus</i>	2
39	<i>Tinctoporellus epimiltinus</i>	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Polyporaceae	<i>Tinctoporellus</i>	1
40	<i>Trametes cingulata</i>	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	1
41	<i>Trametes cubensis</i>	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	Polyporaceae	<i>Trametes</i>	2
42	N.I 1	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	N.I 1	N.I 1	1
43	N.I 2	Ascomycota	Sordariomycetes	N.I 2	N.I 2	N.I 2	1
44	N.I 3	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	N.I 3	N.I 3	1
45	N.I 4	Ascomycota	Sordariomycetes	Diaporthales	N.I 4	N.I 4	1
46	N.I 5	Basidiomycota	Agaricomycetes	Polyporales	N.I 5	N.I 5	1
47	<i>Xylaria cubensis</i>	Ascomycota	Ascomycetes	Xylariales	Xylariaceae	<i>Xylaria</i>	1

N: número de isolados pertencentes a cada OTU.

N.I: não identificado

1 Dentro do filo Ascomycota, 27 OTUs pertencem à classe Sordariomycetes, que foi dominante
2 em todos os clones, e 9 OTUs são da classe Dothideomycetes (Figura 3A). No filo Basidiomycota,
3 11 OTUs pertencem a classe Agaricomycetes. A composição taxonômica foi similar nos clones C06
4 e C45, enquanto que uma maior diversidade de Dothideomycetes foi observada no clone C44.

5 Os isolados pertencem a 11 ordens (Figura 3B), sendo Glomerellales (63,60%) a mais
6 abundante, seguida de Diaporthales (18,77%), Botryosphaeriales (5,74%), Polyporales (4,59%),
7 Pleosporales (3,83%), Xilaryales (1,15%), Amphisphaeriales (0,77%), e Chaetosphaerialis,
8 Hypocreales Russulales e uma ordem não identificada representam 0,38% cada. Algumas ordens
9 foram especificamente encontradas em determinados clones, como Xylariales (clone C44),
10 Hypocreales (clone C06) e Russulales (C45).

11 A composição taxonômica por família (Figura 3C) mostrou que cinco famílias não foram
12 identificadas, possivelmente por corresponderem a espécies novas. De forma análoga à composição
13 por ordem, foi observado que a família Glomerellaceae foi dominante em todos os clones, com maior
14 destaque nos clones C06 e C45, seguida das famílias Diaporthaceae e Phyllostictaceae.

15 Os gêneros mais abundantes foram *Colletotrichum* (62,45%), seguido de *Diaporthe* (19,70%),
16 e *Phyllosticta* (4,83%), enquanto que os demais gêneros compreenderam 13,01% de todos os isolados
17 (Figura 3D). Alguns gêneros conhecidos como fitopatógenos, incluindo patógenos de *Hevea* foram
18 isolados, como exemplo *Corynespora*, *Curvularia*, *Phyllosticta* e *Diaporthe*. Dos 5 gêneros não
19 identificados, 3 pertencem ao clone C44, e o restante são do clone C06 (N.I 5) e C45 (N.I 3).

20 Quanto ao número de OTUs dentro de cada clone, 20 foram obtidas do clone C06, 26 do C44
21 e 18 do C45, destas, 6 OTUs (*C. fructicola* h1, *C. fructicola* h2, *C. fructicola* h4, *Diaporthe* sp. 1,
22 *Diaporthe* sp. 2 e *Diaporthe* sp. 6) foram detectadas nos três clones. O clone C 06 compartilhou 2
23 OTUs (*Rigidoporus microporus* e *Colletotrichum gigasporum*) com o C 44 e apenas 1 OTU
24 (*Colletotrichum* C.f *fructicola* h3) com o C 45, enquanto o clone C 44 compartilhou 2 OTUs
25 (*Corynespora cassiicola* e *Curvularia* sp. V) com o clone C 45. Das OTUs exclusivas de cada clone,
26 foram isoladas 16 do clone C44, 11 do C06 e 9 do C45, conforme demonstrado no diagrama de Venn
27 (Figura 4).

28

29

30

31

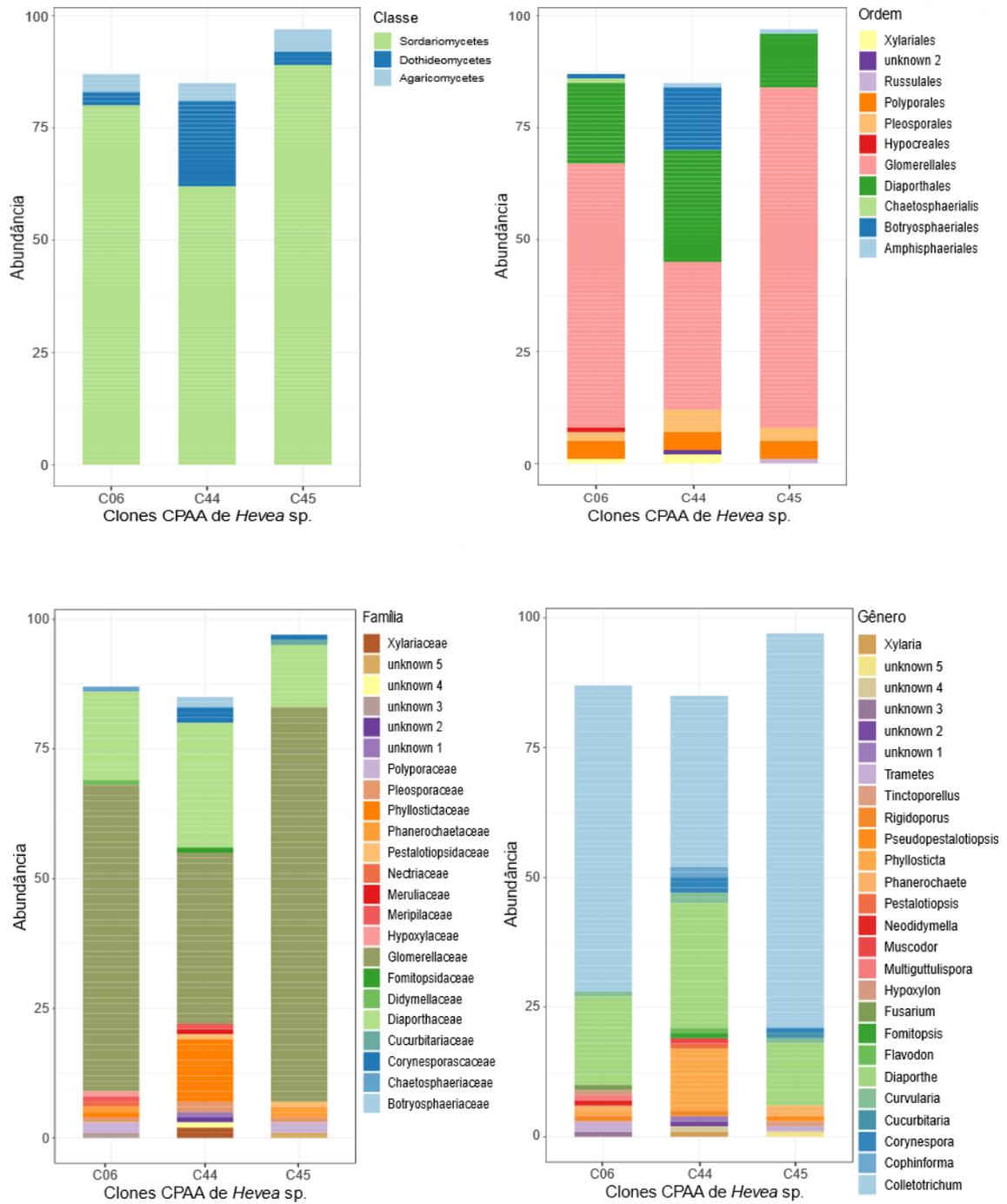


Figura 3. Composição taxonômica em diferentes níveis e abundância dos fungos endofíticos isolados de clones de *Hevea* spp. Níveis taxonômicos: (A) Classe, (B) Ordem, (C) Família e (D) Gênero.

1
2
3
4
5

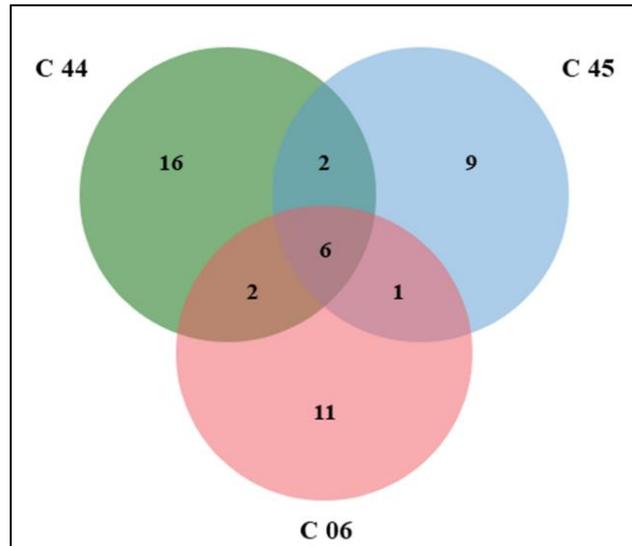


Figura 4. Diagrama de Venn formado a partir das OTUs dos fungos endofíticos isolados de diferentes clones de *Hevea* spp. Os números representam a quantidade de OTUs encontradas em cada clone distinto (C06, C44 e C45). Os números dentro da sobreposição de forma contêm as OTUs compartilhadas entre os clones.

1
2
3
4
5
6

7 5.3 Diversidade de fungos endofíticos

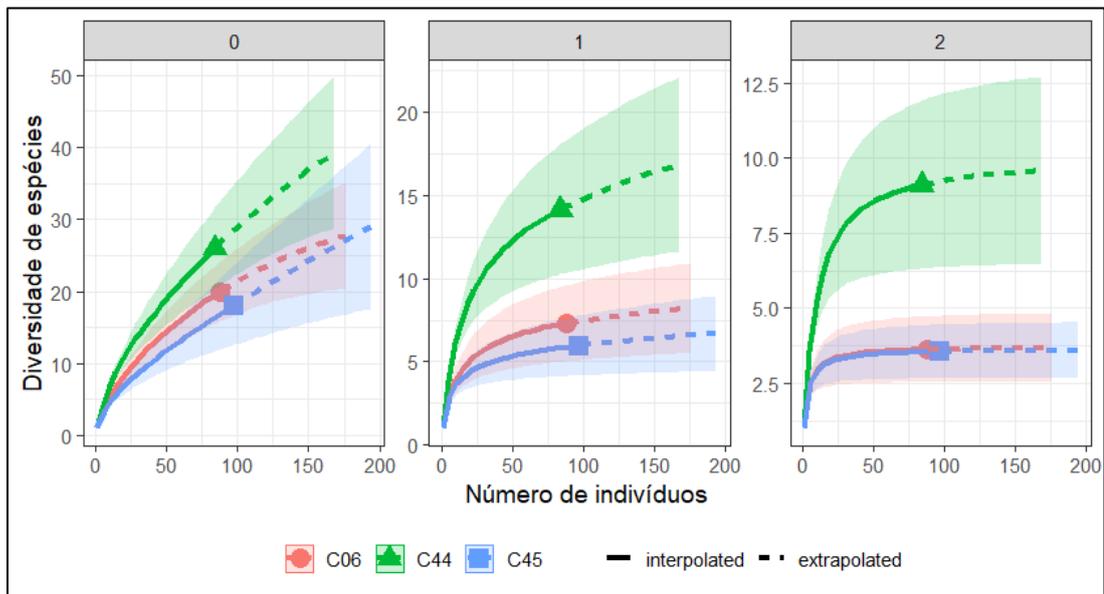
8 A comparação da diversidade dos fungos endofíticos isolados dos três clones de seringueira
9 mostrou que o clone C44 apresentou maiores valores de diversidade de espécies em todos as medidas
10 de diversidade testadas. A riqueza de espécies maior no clone C44 ($q_0=26$) demonstra que neste clone
11 foi isolado um maior número de espécies diferentes do que nos demais clones amostrados.

12 No índice de Shannon o valor de diversidade foi $q_1=14,15$, enquanto que os clones C06 e C45
13 tiveram valores similares ($q_1=7,30$ e $q_1=5,97$), expressando maior diversidade de fungos endofíticos
14 no clone C44 e menor diversidade no clone C45 (Tabela 2). O índice de dominância de Simpson foi
15 alto para todos os clones, sendo maior no clone C44, isso indica que esses clones são dominados por
16 poucas espécies de fungos. O clone C06 apresenta 59% de sua abundância representada por
17 *Colletotrichum* C.f *fruticola* h2 e h4, enquanto *Colletotrichum* C.f *fruticola* h2 e *Phyllosticta*
18 *capitalensis* compreendem 38,8% em C44 e *Colletotrichum* C.f *fruticola* h4 e h2 perfazem 71,1%
19 da abundância em C45.

20 **Tabela 2.** Medidas de diversidade alfa (Riqueza, Shannon e Simpson) das comunidades de fungos
21 endofíticos em clones de *Hevea* spp.

Clones	No. de isolados	Riqueza (q_0)	Shannon (q_1)	Simpson (q_2)
C06	86	20	7,30	3,63
C44	84	26	14,15	9,11
C45	99	18	5,97	3,55

1 A curva de rarefação para riqueza de espécies (q_0) dos clones estudados demonstra um aumento
 2 contínuo, indicando que nem toda a diversidade foi capturada (Figura 5). As curvas para riqueza e
 3 índices de diversidade confirmam as tendências de diversidade de espécies apresentadas acima, onde
 4 o clone C45 apresenta menor riqueza de espécies, no entanto a sua curva possui um aumento contínuo
 5 indicando uma clara tendência ao aumento de riqueza se o tamanho da amostragem aumentasse. O
 6 clone C06, apresenta valores intermediários de riqueza de espécies e formato de curva plana, o que
 7 indica uma tendência a não aumentar significativamente a riqueza caso a amostragem fosse maior,
 8 no entanto, o clone C44 demonstra os valores mais altos de diversidade com uma curva acentuada
 9 para riqueza de espécies, demonstrando que o número de espécies aumentaria de acordo com a
 10 amostragem. As curvas de rarefação para os índices de diversidade de Shannon (q_1) e Simpson (q_2)
 11 são pouco dependentes do esforço amostral, portanto mesmo com o aumento da amostragem o valor
 12 dos índices não teria uma mudança significativa.



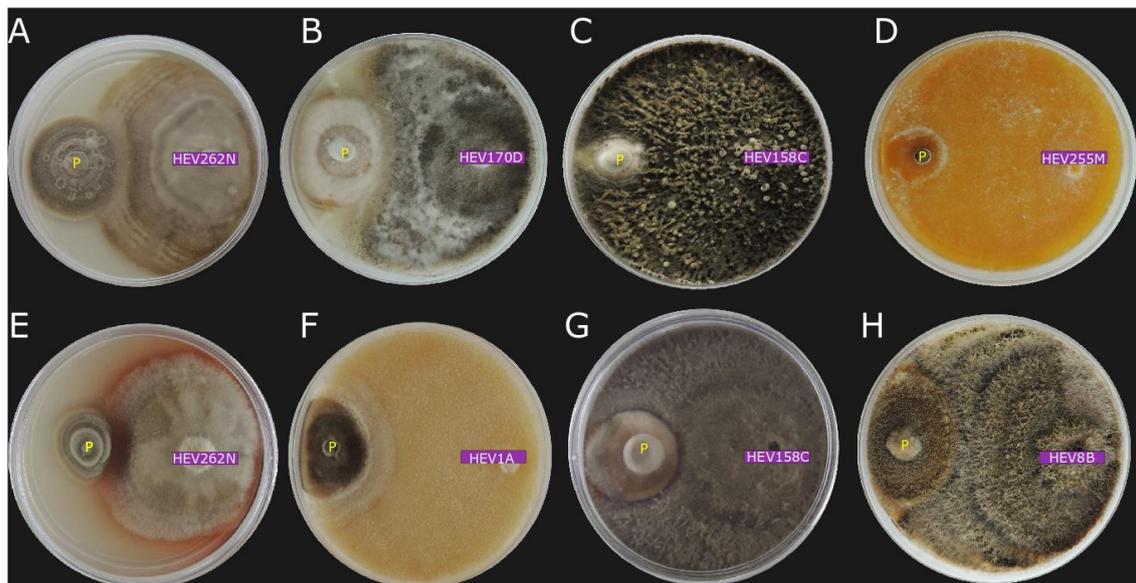
13 **Figura 5** Curva de rarefação (linha sólida) e extrapolação (linha tracejada) com intervalos
 14 de confiança de 95% (áreas sombreadas) para os dados de fungos endofíticos mostrando a
 15 riqueza e índices de diversidade baseados nos clones hospedeiros CPAA C06, C44 e C45
 16 de *Hevea* sp. As curvas comparam o valor de riqueza de espécies (0), diversidade de
 17 Shannon (1) e dominância de Simpson (2) de fungos endofíticos nos clones de seringueira.
 18

19 4.2 Inibição do crescimento micelial de *C. cassiicola* e *Colletotrichum* sp.

20 Os fungos endofíticos isolados de diferentes clones de *Hevea* sp. foram colocados para
 21 confrontar os fitopatógenos *Colletotrichum* sp. e *C. cassiicola* em um ensaio de cultura pareada
 22 (Figura 6). Com 4 dias de ensaio alguns antagonistas começaram a inibir o crescimento dos fungos
 23 patogênicos. O teste de cultura pareada com o patógeno *Colletotrichum* sp., mostrou que a maioria
 24 dos fungos endofíticos (95%) de seringueira foram capazes de inibir o crescimento do patógeno *in*

1 *vitro*. Somente 5 isolados pertencentes aos gêneros *Pestalotiopsis*, *Phyllosticta*, *Cucurbitaria*, *Xylaria*
 2 e um gênero não identificado não inibiram o crescimento do patógeno na placa teste em relação a
 3 controle. A porcentagem de inibição para este patógeno variou de 1,05 a 66,40% (Tabela S3).

4 As médias das OTUs foram comparadas para verificar o táxon com maior porcentagem de
 5 inibição para *Colletotrichum* sp. (Tabela 3). O fungo endofítico *Cophinforma atrovirens* (HEV158C;
 6 OTU 8) obteve o maior potencial para inibir *Colletotrichum* sp. (Figura 6C), seguido dos fungos
 7 *Phanerochaete* sp. 3 (HEV255M; OTU 34) e uma espécie não identificada (HEV1A, OTU 42), com
 8 porcentagens de inibição de 66,40%, 61,30%, e 53,51%, a porcentagem de inibição dessas OTUs não
 9 diferiram ($p>0,05$) entre si. As OTUs que obtiveram maior potencial para inibição do patógeno
 10 *Colletotrichum* sp. compreenderam apenas um isolado.



11 **Figura 6.** Ensaio de culturas pareadas entre os fitopatógenos *Colletotrichum* sp. (A-D) e
 12 *Corynespora cassiicola* (E-F) contra os isolados obtidos de clones de *Hevea* sp. A letra
 13 “P” representa o patógeno e em roxo são os diferentes isolados endofíticos de *Hevea* sp.
 14 testados.
 15

16 Para *C. cassiicola*, os resultados mostraram que 81,3% dos fungos endofíticos foram capazes
 17 de inibir o seu crescimento na cultura pareada, com uma porcentagem de inibição variando de 2,89 a
 18 44,32% em comparação com as placas controle (Tabela S3). O teste de comparação de médias entre
 19 as OTUs mostrou que a OTU 42 (N.I 1) (Fig.6H), seguida da OTU 8 (*C. atrovirens*) (Fig.6G) e 20
 20 (*Diaporthe* sp. 4) foram as que apresentaram maiores porcentagens de inibição em relação as demais,
 21 com inibição de 44,32, 32,18 e 25,27% (Tabela 3), não diferindo significativamente entre si ($p>0,05$).
 22 A OTU 20 (*Diaporthe* sp. 4) compreende 8 isolados, dos quais 4 foram testados neste ensaio
 23 (HEV172A, HEV8B, HEV177E, HEV36G), e o isolado HEV8B obteve a maior porcentagem

1 (43,71%) (Fig.6H) contra *C. cassiicola* da OTU 8. Dezesesseis isolados de diferentes gêneros
 2 (*Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Trametes*, *Phyllosticta*, *Neodidymella*, *Cucurbitaria*, *Hypoxyylon* e 3
 3 gêneros não identificados) não inibiram o crescimento do patógeno (Figura S3).

4 **Tabela 3.** Porcentagem de inibição do ensaio de cultura pareada entre os
 5 fitopatógenos *Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum* sp. contra os isolados
 6 obtidos de clones de *Hevea* spp.

OTU	Espécie	<i>Corynespora cassiicola</i>		<i>Colletotrichum</i> sp.	
		% de inibição		% de inibição	
1	<i>Colletotrichum</i> C.f. <i>fructicola</i> h1	14,31	bcd	39,19	bcd
2	<i>Colletotrichum</i> C.f. <i>fructicola</i> h2	14,18	bcd	21,87	defgh
3	<i>Colletotrichum</i> C.f. <i>fructicola</i> h3	0,00	d	16,31	defgh
4	<i>Colletotrichum</i> C.f. <i>fructicola</i> h4	12,30	bcd	27,86	defg
5	<i>Colletotrichum</i> <i>gigasporum</i>	22,41	bcd	26,35	defgh
6	<i>Colletotrichum</i> <i>paranaense</i>	5,65	cd	1,71	gh
7	<i>Colletotrichum</i> <i>theobromicola</i>	21,26	bcd	12,98	defgh
8	<i>Cophinforma</i> <i>atrovirens</i>	32,18	ab	66,40	a
9	<i>Corynespora</i> <i>cassiicola</i>	1,50	cd	30,16	cdef
10	<i>Cucurbitaria</i> <i>berberidis</i>	0,00	d	0,00	h
12	<i>Curvularia</i> <i>asianensis</i>	9,46	bcd	13,04	defgh
13	<i>Curvularia</i> sp. V	12,03	bcd	8,27	efgh
14	<i>Diaporthe</i> C.f. <i>passifloricola</i>	13,75	bcd	25,46	bcd
15	<i>Diaporthe</i> <i>hongkongensi</i>	14,16	bcd	29,66	defgh
16	<i>Diaporthe</i> <i>schini</i>	22,60	bcd	31,65	cde
17	<i>Diaporthe</i> sp. 1	20,61	bcd	25,25	defgh
18	<i>Diaporthe</i> sp. 2	21,86	bcd	20,63	defgh
20	<i>Diaporthe</i> sp. 4	25,27	abc	30,43	cdef
21	<i>Diaporthe</i> sp. 5	19,84	bcd	23,52	defgh
22	<i>Diaporthe</i> sp. 6	9,16	bcd	22,74	defgh
23	<i>Diaporthe</i> <i>terebinthifolii</i>	20,02	bcd	38,98	bcd
24	<i>Fomitopsis</i> <i>subtropica</i>	10,73	bcd	12,82	defgh
26	<i>Flavodon</i> sp.1	1,28	d	24,73	defgh
27	<i>Hypoxyylon</i> sp. 1	0,00	d	10,08	efgh
30	<i>Neodidymella</i> <i>thailandicum</i>	0,00	d	4,46	fgh
31	<i>Pestalotiopsis</i> <i>adusta</i>	7,31	cd	0,00	h
34	<i>Phanerochaete</i> sp. 3	18,25	bcd	61,30	ab
36	<i>Phyllosticta</i> <i>capitalensis</i>	0,00	d	6,03	efgh
38	<i>Rigidoporus</i> <i>microporus</i>	15,79	bcd	20,52	defgh
41	<i>Trametes</i> <i>cubensis</i>	0,00	d	19,26	defgh
42	N.I 1	44,32	a	53,51	abc
43	N.I 2	8,21	cd	0,00	h
44	N.I 3	0,00	d	9,47	efgh
45	N.I 4	0,00	d	5,45	efgh
46	N.I 5	0,00	d	1,05	h
47	<i>Xylaria</i> <i>cubensis</i>	3,34	cd	0,00	h

7 Teste de média de Duncan

8 Médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%

9 Números em negrito representam os valores de maior porcentagem de inibição (p<0,05)

1 Quando o crescimento dos patógenos foi comparado em ambas placas, controle e teste,
2 verificou-se que 63,75% dos fungos endofíticos inibiram significativamente ($p < 0,05$) o crescimento
3 de *C. cassiicola*, e para *Colletotrichum* sp., 87,25% dos isolados endofíticos inibiram ($p < 0,05$) o
4 crescimento deste patógeno (dados não mostrados). Ainda, a porcentagem de inibição para *C.*
5 *cassiicola* e *Colletotrichum* sp., não foi influenciada ($Df_{99,2}$, $F=1,69$, $p=0,18$; $Df_{99,2}$, $F=0,73$; $p=0,48$)
6 pelos clones hospedeiros (CPAA C06, C44 e C45) neste trabalho.

7 O teste de cultura pareada mostrou que o isolado *C. atrovirens* (HEV158C) foi o endofítico
8 mais competitivo para *Colletotrichum* sp. e uma espécie não identificada (HEV1A) foi a mais
9 competitiva para *C. cassiicola*, demonstrando que esses isolados têm potencial para o controle
10 biológico desses fitopatógenos.

11 4.3 Produção de enzimas extracelulares

12 Os 102 fungos endofíticos de clones de seringueira foram testados para a produção das
13 enzimas amilase, lipase e protease. Os resultados mostraram que 89,21% dos isolados foram positivos
14 para pelo menos uma das enzimas testadas, contudo 11 isolados pertencentes aos gêneros
15 *Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Cophinforma*, *Phanerochaete*, *Curvularia*, *Corynespora* e um gênero não
16 identificado não secretaram nenhuma das enzimas investigadas. Somente quatro isolados secretaram
17 todas as enzimas avaliadas: *C. C.f fructicola* (HEV129A), *Diaporthe* sp. 6 (HEV239K), *Diaporthe*
18 sp. 1 (HEV253K) e *Hypoxyton* sp. 1 (HEV51K) (Tabela S3). Para as análises estatísticas, os 102
19 isolados investigados neste estudo foram agrupados nas suas respectivas OTUs, e as médias foram
20 comparadas por OTU, conforme mencionado no ensaio da inibição. O IE de cada isolado é mostrado
21 na tabela em anexo (Tabela S3).

22 A lipase foi detectada em 69,6% dos isolados, e o índice enzimático (IE) para essa enzima
23 variou de 1,10 a 4,14, indicando que esses fungos tiveram produção enzimática de moderada a alta
24 de acordo com os valores dos índices (Tabela S3). A OTU 9 (*C. cassiicola*) obteve o melhor resultado
25 para produção de lipase, seguido da OTU 15 (*D. hongkongensi*) e OTU 6 (*C. paranaense*), não
26 apresentando diferenças significativas entre elas ($p > 0,05$) (dados não mostrados). A OTU 9
27 compreende 4 isolados (HEV256M, HEV244L, HEV80Q e HEV39H) e todos foram testados para
28 produção enzimática, dentre eles, o isolado HEV244L (*C. cassiicola*) apresentou um alto índice para
29 essa enzima (IE=4,14), sendo este valor o máximo de atividade lipolítica. enquanto a atividade mais
30 baixa para essa enzima foi reportada pela OTU 21 (*Diaporthe* sp. 5) com IE de 1,11.

31 A atividade amilolítica foi verificada em 67,6% dos fungos endofíticos testados e o seu IE
32 variou de 1,15 a 3,30 (Tabela S3). O máximo de atividade amilolítica foi identificada na OTU 3 (*C.*

1 C.f. *fructicola* h3) com IE de 2,88, seguido da OTU 41 (*Trametes cubensis*) e OTU 1 (C. C.f.
 2 *fructicola* h1) com IEs de 2,20 e 2, não apresentando diferença significativa ($p>0,05$). A OTU 3
 3 corresponde a 3 isolados e somente 1 (HEV14C) foi testado neste ensaio. A OTU 1 é representada
 4 por 12 isolados e somente 2 (HEV89R e HEV170D) foram usados para produção enzimática, destes,
 5 o isolado HEV170D apresentou o maior IE (2,88). Os dois isolados (HEV159C e 59M) da OTU 41
 6 (*T. cubensis*) foram utilizados neste ensaio e ambos secretaram amilase. O isolado C. C.f. *fructicola*
 7 h2 (HEV17D) pertencente a OTU 2 foi que apresentou máxima atividade amilolítica (3,30).

8 Trinta e quatro fungos endofíticos testados (33,3%) produziram celulase, com IE de 1,07 a
 9 1,94 entre os isolados. A OTU 14 (*D. C.f. passifloricola*), OTU 23 (*D. terebinthifolli*) e OTU 27
 10 (*Hypoxylon* sp. 1) apresentaram os maiores índices enzimáticos, com 1,83, 1,82 e 1,54, sem diferença
 11 significativa entre ambos ($p>0,05$). As OTUs que apresentaram os mais altos valores de IE
 12 compreendem apenas 1 isolado cada. O fungo com a mais alta atividade celulolítica foi C. C.f.
 13 *fructicola* h2 (HEV44I) com IE de 1,94, este isolado pertence à OTU 2 que compreende 89 isolados,
 14 dos quais 25 foram testados para produção de enzimas (tabela S3).

Índice Enzimático (IE) dos fungos endofíticos de <i>Hevea</i> sp.				
Amilase	Celulase	Lipase	Protease	Identificação dos isolados
2	1.12	1.16	0	OTU1 <i>Colletotrichum C.f. fructicolah1</i>
1.66	1.29	1.29	1.1	OTU2 <i>Colletotrichum C.f. fructicolah2</i>
2.88	0	1.5	0	OTU3 <i>Colletotrichum C.f. fructicolah3</i>
1.39	1.33	1.24	1.18	OTU4 <i>Colletotrichum C.f. fructicola h</i>
1.71	1.23	1.76	0	OTU6 <i>Colletotrichum paranaense</i>
1.45	0	1.2	0	OTU7 <i>Colletotrichum theobromicola</i>
1.26	1.15	2.2	1.12	OTU9 <i>Corynespora cassicola</i>
0	0	1.62	1.12	OTU10 <i>Cucurbitaria berberidis</i>
1.69	1.12	0	0	OTU12 <i>Curvularia asianensis</i>
0	1.83	1.44	0	OTU14 <i>Diaporthe C.f. passifloricola</i>
0	1.42	1.76	1.08	OTU15 <i>Diaporthe hongkongensis</i>
1.19	0	1.27	0	OTU16 <i>Diaporthe schini</i>
1.36	1.22	1.17	1.07	OTU17 <i>Diaporthesp. 1</i>
1.19	0	0	0	OTU18 <i>Diaporthesp. 2</i>
1.34	1.11	1.36	0	OTU20 <i>Diaporthesp. 4</i>
0	0	1.11	0	OTU21 <i>Diaporthe sp. 5</i>
1.31	1.17	1.27	1.07	OTU22 <i>Diaporthesp. 6</i>
1.26	1.82	0	0	OTU23 <i>Diaporthe terebinthifolii</i>
1.76	1.23	0	1.12	OTU24 <i>Fomitopsis subtropica</i>
0	0	1.3	0	OTU25 <i>Fusarium concolor</i>
0	0	0	1.07	OTU26 <i>Flavodonsp. 1</i>
1.46	1.54	1.29	1.08	OTU27 <i>Hypoxylon sp. 1</i>
1.52	0	0	0	OTU30 <i>Neodidymella thailandicum</i>
0	0	1.2	1.08	OTU31 <i>Pestalotiopsis adusta</i>
1.45	0	1.56	0	OTU36 <i>Phyllosticta capitalensis</i>
1.51	0	0	1.07	OTU38 <i>Rigidoporus microporus</i>
2.2	0	0	1.06	OTU41 <i>Trametes cubensis</i>
1.6	1.13	1.27	0	OTU43 N.I_2
0	1.11	1.45	0	OTU44 N.I_3
1.27	0	0	0	OTU45 N.I_4
0	1.33	1.24	0	OTU46 N.I_5
1.24	0	1.26	1.09	OTU47 <i>Xylaria cubensis</i>

15 **Figura 7.** Heatmap com a produção enzimática de Amilase, Celulase, Lipase e protease dos
 16 fungos endofíticos de *Hevea* sp. Valores na figura representam o índice enzimático (IE).

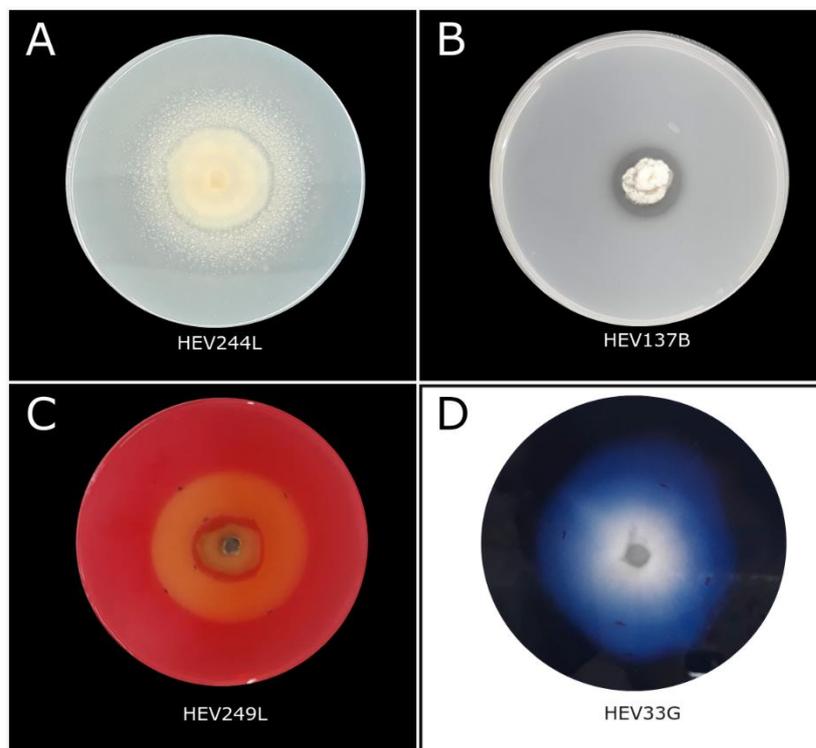
17 IE \geq 2: bons produtores de enzima; $2 < \text{IE} > 1$: produtores moderados; IE \leq 1: produtores fracos. (Hankin e Anagnostakis, 1975).

18

19

1 Para a atividade proteolítica, somente 20,6% dos isolados investigados foram capazes de
2 secretar esta enzima. A OTU 4 (*C. C.f. fructicola* h4) foi a que obteve maior IE (1,18), seguido da
3 OTU 24 (*Fomitopsis subtropica*) e OTU 9 (*C. cassiicola*) com 1,12 cada, as médias não tiveram
4 diferença significativa ($p>0,05$), demonstrando que possuem o potencial proteolítico similar. A OTU
5 4 apresenta 60 isolados, destes, 19 foram investigados quanto a capacidade de produzir enzimas
6 extracelulares (Tabela S3), o isolado HEV129A, pertencente a esta OTU foi o fungo endofítico com
7 maior atividade proteolítica com IE de 1,28.

8 Os isolados que produziram ao menos uma das enzimas testadas neste estudo foram
9 considerados bons a moderados produtores de acordo com o valor do Índice Enzimático,
10 demonstrando assim o potencial biotecnológico desses fungos (Figura 8).



11
12 **Figura 8.** Ensaio de produção enzimática dos fungos endofíticos
13 obtidos de três clones de *Hevea spp.* (A) Lipase; (B) Protease;
14 (C) Celulase; (D) Amilase.

1 **6 DISCUSSÃO**

2 6.1 Diversidade de fungos endofíticos de clones de seringueira

3 No presente estudo, foram comparadas as comunidades de fungos endofíticos encontradas nos
4 clones CAAP C06, C44 e C45 de *Hevea* spp. usando dados moleculares com o intuito de analisar a
5 diversidade fúngica presente nos clones. O primeiro trabalho realizado com fungos endofíticos de
6 clones de seringueira foi feito por Rocha *et al.* (2011), onde foi descrito o potencial biotecnológico
7 de 30 fungos isolados dos clones FX3864, CDC312 e MDF180, porém neste trabalho não foi avaliado
8 a diversidade desses fungos nos clones estudados, somente algumas espécies foram caracterizadas
9 taxonomicamente.

10 A diversidade de fungos endofíticos de clones de *Hevea* spp. foi avaliada em uma escala
11 regional, em um plantio localizado na Embrapa Amazônia Ocidental, Amazonas, Brasil. A
12 identificação molecular dos 269 isolados através da amplificação do gene ITS do rDNA revelou uma
13 grande diversidade dentro dos três clones amostrados. Destes, três são gêneros novos e 8
14 correspondem a espécies novas, descobertas nesse estudo, e que posteriormente serão elucidadas.
15 Resultados semelhantes aos encontrados neste estudo com o gênero *Hevea* foram feitos por Gazis *et*
16 *al.* (2012) e Chaverri e Gazis (2011). No primeiro estudo, trabalhando com fungos endofíticos de *H.*
17 *brasiliensis* no Peru, os autores descreveram uma nova classe de fungos chamada Xylonomycetes, a
18 qual não foi encontrada em nosso estudo. No segundo estudo, uma nova espécie do gênero
19 *Trichoderma* (*T. amazonicum*) foi descrita e isolada a partir de duas espécies dentro do gênero *Hevea*,
20 *H. brasiliensis* e *H. guianensis*. Estes estudos corroboram com a ideia de que, o gênero *Hevea* abriga
21 uma grande diversidade de fungos endofíticos, muitos dos quais ainda precisam ser estudados e
22 descrito, como os isolados encontrados neste trabalho.

23 A região do espaçador interno transcrito (ITS rDNA) foi escolhida por ser amplamente
24 utilizada em estudos filogenéticos de fungos e também por ser considerada o código de barras de
25 DNA (DNA barcode) de fungos (Schoch *et al.*, 2012). Alguns grupos taxonômicos não são
26 discriminados com eficiência através da região ITS, necessitando assim de outros genes *housekeeping*
27 para a sua completa identificação, o que explica que alguns isolados neste trabalho foram
28 identificados apenas a nível de gênero.

29 As comunidades de fungos endofíticos dos clones de *Hevea* sp. são pertencentes ao filo
30 Ascomycota, compreendendo 95% dos isolados, seguido do filo Basidiomycota que obteve
31 ocorrência mais baixa entre os isolados. A predominância do filo Ascomycota entre os fungos
32 endofíticos apresenta uma característica da micota endofítica (Stone, Polishook e White, 2004).

1 Inúmeros estudos com fungos endofíticos reportaram que os fungos endofíticos isolados pertencem
2 ao filo Ascomycota, com uma taxa de predominância maior que 90% (Fernandes *et al.*, 2015; Gazis
3 e Chaverri, 2010; Oono *et al.*, 2015). A classe mais abundante em todos os clones de *Hevea* spp. foi
4 Sordariomycetes, seguido da classe Dothideomycetes. Essas duas classes contém a maioria de
5 espécies endofíticas e juntas representam mais de 75% dos fungos endofíticos isolados (Arnold,
6 2007). Vaz *et al.* (2018) demonstraram que nas árvores de *H. brasiliensis* a maioria (85,23%) dos
7 fungos ascomicetos isolados foram da classe Sordariomycetes, seguido de Dothideomycetes (8,57%).

8 Os folíolos dos clones de seringueira estudados abrigam uma comunidade rica e diversa de
9 fungos endofíticos, dominada pelos gêneros *Colletotrichum* e *Diaporthe*, que são comumente
10 isolados como fungos endofíticos de diversas plantas hospedeiras. O gênero *Colletotrichum* foi o
11 mais abundante nos três clones de seringueira, resultados similares foram encontrados para
12 *Carapichea ipeacacanha*, onde *Colletotrichum* correspondeu a 61% dos fungos endofíticos isolados
13 nesta planta (Ferreira, Assis e Rosa, 2020); este gênero também foi o mais abundante em árvores de
14 *H. brasiliensis*, sendo responsável por 47,62% dos isolados obtidos (Vaz *et al.*, 2018). O mesmo
15 ocorreu com a espécie *H. guianensis*, onde 38% dos fungos endofíticos isolados pertencem ao gênero
16 *Colletotrichum* (Araújo *et al.*, 2018).

17 Apesar de na literatura o gênero *Colletotrichum* ser descrito como responsável por causar
18 doenças em uma infinidade de culturas, tem sido cada vez mais frequente isolar espécies desse gênero
19 de tecidos sadios e isso pode ser explicado pelo fato deste gênero compreender muitas espécies de
20 fungos patogênicos e não patogênicos e apresentarem, em geral, distribuição geográfica ampla e baixa
21 especificidade de hospedeiros, podendo estar presente em uma gama de espécies como um patógeno
22 latente (Agrios, 2004; Stone, Polishook e White, 2004; Vaz *et al.*, 2018; Vieira *et al.*, 2014). Além
23 da ampla distribuição e baixa especificidade de *Colletotrichum*, a abundância desse gênero nas
24 amostras de folíolos dos clones de seringueira pode ser devido ao ambiente e manejo desses clones,
25 sugerindo que hospedeiros oriundos de plantações estejam mais sujeitos a serem colonizados por
26 patógenos latentes que estejam disponíveis na vegetação circundante (reservatórios de espécies de
27 fungos) conforme demonstrado por Gazis e Chaverri (2015), que avaliaram a composição da
28 comunidade de fungos endofíticos em árvores nativas e plantadas de *H. brasiliensis* e constataram
29 que as árvores nativas de *Hevea* foram dominadas por fungos do gênero *Trichoderma* e
30 *Tolyocladium*, que são fungos antagonistas e entomopatogênicos, enquanto as seringueiras de
31 plantações foram dominadas por espécies de fungos potencialmente patogênicos como
32 *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Guignardia* e *Pestalotiopsis*.

1 O segundo gênero mais abundante nos folíolos de clones de seringueira foi o gênero
2 *Diaporthe*, que compreende um complexo de fungos telemorfos (*Diaporthe*) e anamorfos
3 (*Phomopsis*) (Pandey, Reddy e Suryanarayanan, 2003; Santos *et al.*, 2019). Estes fungos já foram
4 isolados como patógenos, saprofíticos e endófitos de diferentes plantas hospedeiras (Santos *et al.*,
5 2019). Fungos endofíticos deste gênero já foram isolados de tecidos sadio de *H. guianensis*, sendo o
6 segundo gênero mais abundante nessa espécie (Araújo *et al.*, 2018). No trabalho de Ribeiro *et al.*
7 (2018) este gênero foi o mais abundante, correspondendo 78% dos fungos endofíticos isolados de
8 *Pachystachys lutea* (nome vulgar: camarão amarelo). Os isolados deste gênero são usados como fonte
9 para produção de produtos naturais, dos quais a maioria é antifúngica (Santos *et al.*, 2018). Em um
10 estudo com a caracterização química de compostos bioativos do fungo endofítico *D. helianthi*
11 isolados de *Luehea divaricata* (nome vulgar: açoita cavalo) foi identificado um composto fenólico
12 (Tyrosol) que possui efeitos antimicrobianos contra bactérias humanas e fitopatogênicas (Specian *et*
13 *al.*, 2012).

14 Outras espécies pertencentes aos gêneros *Cucurbitaria*, *Flavodon*, *Fomitopsis*, *Fusarium*,
15 *Hypoxylon*, *Multiguttulispora*, *Muscodor*, *Neodidymella*, *Pestalotiopsis*, *Pseudopestalotiopsis*,
16 *Tinctoporellus* e *Xylaria* só foram isoladas uma vez, constituindo *singletons*. Essas espécies com
17 ocorrência única representam espécies raras, sendo responsáveis por aumentar a riqueza e diversidade
18 dos fungos endofíticos na planta hospedeira (Arnold e Lutzoni, 2007), além de representarem
19 componentes importantes das comunidades de fungos endofíticos capazes de produzir compostos
20 bioativos, sendo importantes para programas de bioprospecção (Ferreira *et al.*, 2015). Espécies de
21 *singletons* foram frequentes em outros estudos com comunidades de fungos endofíticos de *H.*
22 *brasiliensis* (Gazis e Chaverri, 2010b; Vaz *et al.*, 2018)..

23 As curvas de rarefação fornecem informações valiosas sobre a riqueza observada das espécies.
24 Os resultados da curva demonstraram claramente que a riqueza de espécies do clone C44 foi a mais
25 alta, com uma possível tendência de aumento contínuo à medida que a amostragem também
26 aumentasse. Os outros dois clones apresentaram uma riqueza de espécies mais baixa, com menor
27 diversidade, porém o clone C45 apresentou uma curva mais acentuada que o C06, demonstrando que
28 com o aumento das amostras a riqueza também seria maior para esse clone, podendo ser até maior
29 que a do C06 que apresenta a tendência de curva mais plana. O esforço amostral para capturar a
30 riqueza de fungos endofíticos geralmente não é suficiente, sendo este um padrão comum para estudos
31 com comunidades endofíticas devido à grande diversidade desses microrganismos. Padrões similares
32 foram encontrados nos estudos com comunidades de fungos endofíticos de plantas de *Ficus*

1 *benjamina*, *F. elástica* e *F. religiosa*, onde as curvas de rarefação revelaram amostragem incompleta
2 para capturar adequadamente a riqueza dos fungos endofíticos presentes nessas espécies (Solis *et al.*,
3 2015).

4 Os índices de diversidade de Shannon-Wiener confirmaram os resultados das curvas de
5 rarefação, demonstrando que o clone C44 apresentou a maior riqueza e C45 apresentou a mais baixa
6 riqueza de fungos endofíticos. O índice de Simpson foi alto para os clones, demonstrando que os
7 clones são dominados por poucas espécies de fungos. Resultado similar foi encontrado por Vaz *et al.*
8 (2018) para árvores de *H. brasiliensis*, onde as árvores do parque das Anavilhanas apresentaram
9 maior diversidade ($H' = 2,59$) em relação as árvores da floresta do Caxiuanã ($H' = 1,96$), no entanto o
10 índice de Simpson demonstrou que as árvores de ambos locais eram dominadas por poucas espécies.

11 A diversidade dos fungos endofíticos de seringueira foi observada em relação aos fungos
12 cultivados, no entanto os métodos baseados na cultura podem ser influenciados pelo tipo de meio de
13 cultivo, o tipo de amostragem, método de isolamento, adaptações fisiológicas dos fungos e, ainda,
14 alguns endófitos não são cultiváveis (Araújo *et al.*, 2018; Stone, Polishook e White, 2004). Neste
15 trabalho, o clone C44 apresentou maior diversidade apesar de ter o menor número de fungos obtidos
16 dos seus folíolos. A composição diversificada de espécies de fungos endofíticos entre hospedeiros da
17 mesma espécie pode estar relacionado a fatores como o clima, dispersão dos fungos, e a composição
18 da comunidade que circunda as árvores hospedeiras, estes fatores têm sido reportados como causas
19 que afetam as comunidades de fungos endofíticos nas plantas (Hanson *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2017;
20 Solis *et al.*, 2015). No entanto, neste estudos as árvores hospedeiras que foram coletados os folíolos
21 para isolamento dos endófitos pertencem ao mesmo ambiente, logo a comunidade que circundas as
22 árvores e as condições climáticas são semelhantes para todas as hospedeiras, isso sugere que a
23 variação na diversidade nos endófitos entre os clones esteja relacionada a influência de fatores
24 relacionados ao hospedeiro (características do genótipo) conforme demonstrado por Sun *et al.* (2012)
25 que revelou em seu trabalho com espécies hospedeiras de *Betula platyphylla*, *Quercos liaotungensis*
26 e *Ulmus macrocarpa* o seu efeito significativo na comunidade de fungos endofíticos, mostrando
27 30,1% de variância na composição endofítica explicada pelo hospedeiro. Outros trabalhos também
28 têm demonstrado que as plantas hospedeiras exercem forte influência na comunidade endofítica
29 (Solis *et al.*, 2015; Thomas *et al.*, 2019). Portanto, o hospedeiro pode estar influenciando na
30 composição de fungos endofíticos entre os clones e conseqüentemente na riqueza de espécies, tendo
31 em vista que os clones de seringueira são compostos por cruzamento de diferentes espécies de *Hevea*.

32 6.2 Inibição do crescimento micelial de *C. cassicola* e *Colletotrichum* sp.

1 Os isolados endofíticos reduziram o crescimento micelial de *C. cassiicola* em 44% e 66% para
2 *Colletotrichum sp.* A inibição foi direta, através da competição por espaço e nutrientes, e também
3 possível micoparasitismo pelo fungo *Xylaria cubensis* (HEV268N), indicado pelo crescimento do
4 fungo sobre a colônia do patógeno, não sendo observado a inibição por meio de antibiose neste
5 trabalho. É possível a presença diferentes mecanismos atuando de forma simultânea para suprimir o
6 desenvolvimento de outro fungo (Chow, Rahman e Ting, 2018; Martínez-Álvarez *et al.*, 2016), como
7 demonstrado no trabalho de Mejía *et al.* (2008), onde cinco isolados endofíticos inibiram o
8 crescimento de *Moniliophthora roreri* e *Phytophthora palmivora* por competição seguida de
9 antibiose. A inibição de *Ganoderma boninense*, pelo isolado endofítico de *Trichoderma sp.*
10 demonstrou exclusão competitiva seguido de micoparasitismo (Cheong *et al.*, 2017).

11 A taxa de crescimento entre os diferentes isolados endofíticos pode ter influenciado no
12 antagonismo dos fitopatógenos por exclusão competitiva, uma vez que fungos que possuem
13 crescimento acelerado acabam colonizando o substrato de forma rápida, exaurindo nutrientes e
14 ocupando um nicho que poderia ser usado por um fungo patogênico (Pujade-renaud *et al.*, 2019;
15 Rodriguez *et al.*, 2009). No ensaio em cultura pareada isso foi observado pelo crescimento rápido dos
16 fungos endofíticos, ocupando quase toda a placa e não deixando espaço para o desenvolvimento dos
17 fitopatógenos. Na placa controle ou em placas com fungos endofíticos com crescimento lento, os
18 patógenos cresceram normalmente, demonstrado que o mecanismo utilizado pelos fungos que têm
19 crescimento rápido afeta significativamente no desenvolvimento de outros fungos no meio de cultura.
20 Ainda, um estudo realizado com fungos endofíticos de tecidos de *Theobroma cacao* reportou que o
21 mecanismo antagônico mais comum utilizados pelos endófitos foi competição por substrato,
22 ocorrendo em 23, 35 e 27% dos endófitos testados contra *M. roreri*, *P. palmivora* e *M. perniciosa*,
23 respectivamente, enquanto a antibiose só ocorreu em 13 e 21% dos isolados investigados contra *M.*
24 *roreri* e *P. palmivora*, e o mecanismo de parasitar o patógeno só foi observado por um isolado de
25 *Trichoderma* (Meíja *et al.*, 2008).

26 A porcentagem de inibição de *C. cassiicola* e *Colletotrichum sp.* pelos isolados endofíticos de
27 seringueira não ultrapassaram 70% de inibição *in vitro*, no entanto o efeito do comportamento dos
28 endófitos sobre o patógeno pode ser alterado na presença da planta hospedeira, podendo ter o efeito
29 inibidor acentuado ou reduzido, como demonstrado no trabalho desenvolvido por Chow *et al.* (2018),
30 onde fungos endofíticos (*D. phaseolorum*, *T. asperillum*, e *P. citrinum*) isolados de diferentes
31 hospedeiros inibiram em até 50% o crescimento de *G. boninense* em testes de cultura pareada, quando
32 estes mesmo isolados foram co-inoculados nos ramos da planta hospedeira, dendezeiro, juntamente

1 com o patógeno (*G. boninense*), foi possível constatar, por meio de PCR em tempo real, que os
2 endófitos foram capazes de superar o patógeno, apresentando maior abundância relativa. Nesse caso
3 a colonização endofítica teve um efeito negativo na infecção pelo patógeno, confirmando a atividade
4 antagônicas dos endófitos testados contra o patógeno. Em outro estudo, Abro *et al.* (2019) reportaram
5 que fungos endofíticos (*Pestalotiopsis humus*, *Penicillium sp.*, *Hypocrea sp.* e *Lasiodiplodia*
6 *theobromae*) isolados de diferentes hospedeiros que obtiveram uma porcentagem de inibição de 34,
7 40, 44 e 66% nos testes *in vitro* contra o patógeno *Fusarium Oxysporum*, agente causal da murcha do
8 pepino. Os resultados foram satisfatórios quando inoculados em sementes de pepino, diminuindo a
9 severidade da doença nas plântulas, variando de 1,20 a 1,40, na escala de 0 a 4 em comparação com
10 o tratamento controle que atingiu 3,60 na escala de severidade da doença.

11 No ensaio de cultura pareada, o patógeno *Colletotrichum sp.* foi o mais suscetível à inibição,
12 tendo seu crescimento inibido por 87,25% dos fungos endofíticos de seringueira, resultado
13 semelhante foi encontrado por Katoch e Pull (2017), onde o crescimento do patógeno *Colletotrichum*
14 *capsici* foi inibido pela maioria dos fungos endofíticos. Os isolados que tiveram maior % de inibição
15 no presente trabalho contra os patógenos estudados pertencem aos gêneros *Cophiniforma*,
16 *Phanerochaete*, *Diaporthe* e um gênero não identificado. Diversos trabalhos já reportaram o potencial
17 de espécies associadas a *Diaporthe* no biocontrole de *F. oxysporum*, *Ceratocystis sp.*, *Botrytis sp.* e
18 *G. boninense* (Chow, Rahman e Ting, 2018; Ginting *et al.*, 2013; González-Teuber, 2016). Outro
19 estudo testou isolados de *Phanerochaete* como agentes de controle biológicos de *F. oxysporum*, e
20 observaram que este endófito inibiu o crescimento do patógeno por competição em cultura pareada
21 (Li *et al.*, 2017) e se mostrou bastante promissor *in vitro*.

22 Os resultados obtidos com os ensaios de cultura pareada demonstraram que os fungos
23 endofíticos isolados de clones de seringueira tem potencial como agentes de controle biológico,
24 principalmente *C. atrovirens* (HEV158C), *Phanerochaete sp. 3* (HEV255M), *Diaporthe sp. 4*
25 (HEV8B) e uma espécie não identificada (HEV1A) que exibiram as maiores porcentagens na inibição
26 dos patógenos.

27 6.3 Produção de enzimas extracelulares

28 A capacidade de síntese de enzimas extracelulares foi detectada em 89,21% dos isolados
29 endofíticos avaliados, demonstrando assim o seu potencial biotecnológico, que está intimamente
30 ligado as necessidades naturais desses fungos, pois precisam produzir um arsenal de enzimas
31 hidrolíticas para penetrar e colonizar os tecidos das plantas hospedeiras (Corrêa *et al.*, 2014; Mandal
32 e Banerjee, 2019; Tan e Zou, 2001). Os estudos com fungos endofíticos de diferentes espécies

1 demonstram a capacidade desses fungos em produzirem diversas enzimas extracelulares como
2 pectinases, amilases, celulasas, lacases, lipases e proteases em meio sólido (Alberto *et al.*, 2016;
3 Amirita *et al.*, 2012; Fouda, Hassan, S. E., *et al.*, 2015).

4 Apesar da potencialidade desses fungos para atividade enzimática, nem todos os isolados
5 apresentam aptidão para produzir determinadas enzimas em condições de laboratório. Neste estudo,
6 11 isolados não secretaram nenhuma das enzimas testadas e, em contrapartida somente 4 secretaram
7 todas as enzimas, e os demais produziram uma ou mais enzima, conforme descrito nos resultados.
8 Isso pode estar relacionado a fatores como pH, temperatura, período de incubação, ou a não liberação
9 da enzima do micélio (Chamekh *et al.*, 2019; Mani e Preethi, 2018), tendo em vista que as condições
10 de temperatura, pH e período de incubação neste estudo foram iguais para todas enzimas.

11 Alguns dos isolados investigados neste trabalho têm o crescimento rápido o que pode ter
12 impedido a detecção das enzimas que pode ter sido secretada no meio, porém o micélio acabou
13 predominando e cobrindo a área de visualização da atividade enzimática, resultado semelhante foi
14 observado no trabalho de Chamekh *et al.* (2019), onde a produção enzimática não foi detectada em
15 10 cepas. Ainda, a não produção enzimática dos fungos pode estar associada ao estado do meio de
16 cultura em que o isolado é cultivado, como demonstrado no trabalho de Patil *et al.* (2015), onde os
17 isolados endofíticos que não foram positivos nos ensaios em placas foram considerados positivos em
18 condições de cultura líquida.

19 Das enzimas investigadas neste estudo, a amilase e lipase foram as mais detectadas entre os
20 fungos endofíticos de seringueira, essas enzimas são secretadas pelos endófitos como parte do seu
21 mecanismo para superar a defesa do hospedeiro contra invasão microbiana e obter nutrientes para o
22 seu desenvolvimento (Ayob e Simarani, 2016; Corrêa *et al.*, 2014), além de que o potencial amilolítico
23 apresentado por esses isolados sugere uma possível mudança no seu estilo de vida, podendo degradar
24 o amido disponível na senescência da planta hospedeira, tornando-os saprófitos (Mahfooz *et al.*,
25 2017; Patil *et al.*, 2015). Ainda, a produção dessas duas enzimas pela grande maioria desses isolados
26 sugere que os fungos endofíticos de seringueira utilizam lipídios e carboidratos como fonte de energia
27 (Desire *et al.*, 2014; Maria, Sridhar e Raviraja, 2005). Toghueo *et al.* (2017) em um estudo com
28 fungos endofíticos de plantas medicinais reportaram que 78% e 60% dos fungos endofíticos
29 produziram amilase e lipase, esse resultado corrobora com os que foram encontrados para os isolados
30 de seringueira.

31 No presente estudo, mais de 50% dos isolados testados, incluindo espécies de *Colletotrichum*,
32 *Diaporthe*, *Phyllosticta*, e *Xylaria*, produziram as enzimas amilase e lipase. Diversos trabalhos têm

1 reportado o potencial de alguns desses gêneros, como *Colletotrichum*, *Diaporthe* e *Phyllosticta* na
2 produção dessas enzimas (Amirita *et al.*, 2012; Toghueo *et al.*, 2017). A alta e moderada produção
3 dessas enzimas foram detectadas, em sua grande maioria, pelos isolados de *Colletotrichum* (gênero
4 mais abundante) que apresentaram grande variação no índice enzimático entre eles. Essa variação no
5 IE também foi detectada no trabalho Tuppad e Shishupala, (2014) com fungos endofíticos do gênero
6 *Colletotrichum* isolados de diferentes partes da planta medicinal *Butea monosperma*, onde o IE variou
7 de 0.82 a 1.84 para a enzima amilase.

8 Ao avaliar o potencial dos isolados para produção das enzimas celulase e protease, verificou-se
9 que somente 20 e 33% dos fungos endofíticos de seringueira demonstraram capacidade para degradar
10 caseína do leite e celulose. Em um estudo feito com fungos endofíticos de *Viola odorata*, Katoch *et*
11 *al.* (2017) reportaram um número baixo de isolados produzindo as mesmas enzimas, somente 33 e
12 37% dos fungos isolados foram positivos para celulase e protease. Sunitha, Devi e Srinivas (2013)
13 avaliando a atividade de enzimas extracelulares de fungos endofíticos de plantas medicinais
14 reportaram que 28 e 32% dos isolados produziram protease e celulase. Devido a interação planta-
15 endófito ser altamente dependente de fatores como espécie hospedeira, tecido, idade da planta, e
16 condições climáticas, esses fatores podem influenciar na biologia dos fungos e conseqüentemente na
17 produção de enzimas (Sunitha, Devi e Srinivas, 2013; Zabalgoeazcoa, 2008).

18 No presente estudo os isolados de *Xylaria*, *Fomitopsis*, *Colletotrichum*, *Cucurbitaria*,
19 *Hypoxylon*, *Diaporthe*, *Rigidoporus*, *Neodidymella*, *Trametes* e *Flavodon* mostraram atividade
20 proteolítica. A atividade proteolítica de alguns desses fungos, como *Colletotrichum* e *Diaporthe*, já
21 foram reportadas em outros trabalhos com atividade enzimática de fungos endofíticos (Sunitha, Devi
22 e Srinivas, 2013; Toghueo *et al.*, 2017). A capacidade dos fungos endofíticos para degradar celulose
23 está associada à sua adaptação ao seu habitat, que está em conjunto de materiais lignocelulósicos no
24 corpo da planta hospedeira (Bhagobaty e Joshi, 2012). A atividade celulolítica neste estudo foi
25 verificada em espécies de *Fomitopsis*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Hypoxylon*, *Diaporthe* e outros 4
26 gêneros não identificados. Outros estudos apontaram a produção de celulase pelos fungos *Curvularia*,
27 *Colletotrichum*, *Diaporthe* (Katoch e Pull, 2017; Mani e Preethi, 2018; Santos *et al.*, 2019; Shubha e
28 Srinivas, 2017).

29 Os fungos endofíticos são recursos promissores para aplicações na indústria, devido às suas
30 necessidades naturais podem hidrolisar diversas enzimas que são necessárias para aplicações
31 industriais (Toghueo *et al.*, 2017). As enzimas produzidas pelos fungos são mais lucrativas, pois esses
32 microrganismos necessitam de um espaço limitado para crescer, se desenvolvem uma composição

1 simples de meio, tem natureza extracelular e são passíveis de manipulação genética (Mandal e
2 Banerjee, 2019). Ainda, sabe-se que 60% das enzimas industriais são produzidas por fungos
3 onipresentes e de distribuição mundial (Suryanarayanan *et al.*, 2012).

4 **7 CONCLUSÃO**

5 Neste estudo foram isolados 269 fungos, dos quais 3 são gêneros novos e 8 são espécies novas.
6 A composição taxonômica de fungos endofíticos presentes nos folíolos dos clones mostrou que eles
7 recrutam comunidades diferentes de fungos e são dominados por espécies do gênero *Colletotrichum*.
8 O clone C44 apresentou maior diversidade de espécies de fungos endofíticos em relação aos clones
9 C06 e C45. E o clone C45 apresentou maior quantidade de endófitos isolados dos seus folíolos.

10 A maioria dos fungos endofíticos de seringueira inibiram o crescimento de *Colletotrichum* sp. e
11 *C. cassicola in vitro*. Os fungos endofíticos *Cophinforma atrovirens*, *Phanerochaete* sp. 3, *Diaporthe*
12 sp. 4 e uma espécie não identificada apresentaram maior potencial como agentes de controle
13 biológico.

14 Os fungos endofíticos dos clones de *Hevea* spp. exibiram potencial para produção das enzimas
15 testadas neste estudo, sendo amilase e lipase as enzimas mais produzidas pelos endófitos.

ANEXO

Tabela S1. Números de depósito no GenBank das sequências ITS dos isolados endofíticos de *Hevea* sp. geradas neste estudo.

Isolados	Código isolados	No. de acesso Genbank	Isolados	Código isolados	No. de acesso Genbank
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h1	HEV70P	MT470446	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV27F	MT470469
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h1	HEV89R	MT470447	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV29F	MT470470
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h1	HEV103U	MT470448	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV30F	MT470471
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h1	HEV125Z	MT470449	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV31F	MT470472
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h1	HEV156C	MT470450	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV38H	MT470473
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h1	HEV170D	MT470451	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV41H	MT470474
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h1	HEV187F	MT470452	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV44I	MT470475
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h1	HEV205H	MT470453	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV46J	MT470476
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h1	HEV224J	MT470454	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV47J	MT470477
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV3A	MT470455	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV52k	MT470478
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV6B	MT470456	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV53k	MT470479
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV7B	MT470457	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV56L	MT470480
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV9B	MT470458	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV57L	MT470481
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV11C	MT470459	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV61N	MT470482
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h3	HEV12C	MT470460	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV65N	MT470483
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV13C	MT470461	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV66P	MT470484
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV16D	MT470462	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV67P	MT470485
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV17D	MT470463	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV69P	MT470486
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV18D	MT470464	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV71P	MT470487
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV19D	MT470465	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV72P	MT470488
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV22E	MT470466	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV73P	MT470489
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV24E	MT470467	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV78Q	MT470490
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV26E	MT470468	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV82R	MT470491

Isolados	Código isolados	No. de acceso Genbank
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV83R	MT470492
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV84R	MT470493
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV88R	MT470494
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV90R	MT470495
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV92S	MT470496
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV95S	MT470497
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV99T	MT470498
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV100T	MT470499
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV102U	MT470500
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV108V	MT470501
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV109V	MT470502
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV112V	MT470503
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV114V	MT470504
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV115X	MT470505
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV116X	MT470506
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV121Z	MT470507
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV122Z	MT470508
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV123Z	MT470509
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV128A	MT470510
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV131A	MT470511
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV133A	MT470512
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV138B	MT470513
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV143B	MT470514
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV148B	MT470515
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV150B	MT470516
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV154C	MT470517
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV155C	MT470518

Isolados	Código isolados	No. de acceso Genbank
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV157C	MT470519
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV167D	MT470520
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV179E	MT470521
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV180E	MT470522
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV185F	MT470523
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV186F	MT470524
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV194G	MT470525
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV198G	MT470526
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV201G	MT470527
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV202H	MT470528
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV203H	MT470529
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV204H	MT470530
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV207H	MT470531
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV216I	MT470532
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV218I	MT470533
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV219I	MT470534
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV223J	MT470535
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV227J	MT470536
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV233K	MT470537
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV235K	MT470538
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV247L	MT470539
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	HEV248L	MT470540
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h3	HEV14C	MT470541
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h3	HEV62N	MT470542
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV20D	MT470543
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV43I	MT470544
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV64N	MT470545

Isolados	Código isolados	No. de acceso Genbank
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV68P	MT470546
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV74P	MT470547
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV75P	MT470548
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV76Q	MT470549
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV77Q	MT470550
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV79Q	MT470551
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV81R	MT470552
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV85R	MT470553
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV86R	MT470554
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV87R	MT470555
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV91S	MT470556
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV93S	MT470557
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV94S	MT470558
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV96T	MT470559
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV97T	MT470560
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV98T	MT470561
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV104U	MT470562
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV105U	MT470563
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV106V	MT470564
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV107V	MT470565
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV111V	MT470566
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV113V	MT470567
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV129A	MT470568
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV130A	MT470569
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV132A	MT470570
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV152C	MT470571
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV153C	MT470572

Isolados	Código isolados	No. de acceso Genbank
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV160C	MT470573
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV161C	MT470574
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV163D	MT470575
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV164D	MT470576
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV166D	MT470577
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV181E	MT470578
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV182F	MT470579
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV183F	MT470580
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV184F	MT470581
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV192G	MT470582
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV193G	MT470583
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV195G	MT470584
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV197G	MT470585
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV206H	MT470586
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV210H	MT470587
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV213I	MT470588
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV214I	MT470589
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV217I	MT470590
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV220I	MT470591
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV222J	MT470592
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV225J	MT470593
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV243L	MT470594
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV250L	MT470595
<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	HEV258M	MT470596
<i>Colletotrichum gigasporum</i>	HEV35G	MT470597
<i>Colletotrichum gigasporum</i>	HEV117X	MT470598
<i>Colletotrichum gigasporum</i>	HEV230J	MT470599

Isolados	Código isolados	No. de acceso Genbank
<i>Colletotrichum paranaense</i>	HEV63N	MT470600
<i>Colletotrichum theobromicola</i>	HEV25E	MT470601
<i>Cophinforma atrovirens</i>	HEV119X	MT470602
<i>Cophinforma atrovirens</i>	HEV158C	MT470603
<i>Corynespora cassiicola</i>	HEV39H	MT470604
<i>Corynespora cassiicola</i>	HEV80Q	MT470605
<i>Corynespora cassiicola</i>	HEV244L	MT470606
<i>Corynespora cassiicola</i>	HEV256M	MT470607
<i>Curvularia aerea</i>	HEV165D	MT470608
<i>Curvularia asianensis</i>	HEV48J	MT470609
<i>Curvularia</i> sp. V	HEV151C	MT470610
<i>Curvularia</i> sp. V	HEV264N	MT470611
<i>Diaporthe</i> C.f. <i>passifloricola</i>	HEV127A	MT470612
<i>Diaporthe hongkongensi</i>	HEV137B	MT470613
<i>Diaporthe hongkongensi</i>	HEV234K	MT470614
<i>Diaporthe schini</i>	HEV45I	MT470615
<i>Diaporthe schini</i>	HEV139B	MT470616
<i>Diaporthe schini</i>	HEV208H	MT470617
<i>Diaporthe schini</i>	HEV215I	MT470618
<i>Diaporthe</i> sp. 1	HEV21E	MT470619
<i>Diaporthe</i> sp. 1	HEV23E	MT470620
<i>Diaporthe</i> sp. 1	HEV49J	MT470621
<i>Diaporthe</i> sp. 1	HEV54L	MT470622
<i>Diaporthe</i> sp. 1	HEV124Z	MT470623
<i>Diaporthe</i> sp. 1	HEV135A	MT470624
<i>Diaporthe</i> sp. 1	HEV136B	MT470625
<i>Diaporthe</i> sp. 1	HEV169D	MT470626

Isolados	Código isolados	No. de acceso Genbank
<i>Diaporthe</i> sp. 1	HEV209H	MT470627
<i>Diaporthe</i> sp. 1	HEV237K	MT470628
<i>Diaporthe</i> sp. 1	HEV254M	MT470629
<i>Diaporthe</i> sp. 1	HEV257M	MT470630
<i>Diaporthe</i> sp. 2	HEV42I	MT470631
<i>Diaporthe</i> sp. 2	HEV126A	MT470632
<i>Diaporthe</i> sp. 2	HEV147B	MT470633
<i>Diaporthe</i> sp. 2	HEV176E	MT470634
<i>Diaporthe</i> sp. 3	HEV118X	MT470635
<i>Diaporthe</i> sp. 4	HEV8B	MT470636
<i>Diaporthe</i> sp. 4	HEV36G	MT470637
<i>Diaporthe</i> sp. 4	HEV134A	MT470638
<i>Diaporthe</i> sp. 4	HEV144B	MT470639
<i>Diaporthe</i> sp. 4	HEV172E	MT470640
<i>Diaporthe</i> sp. 4	HEV177E	MT470641
<i>Diaporthe</i> sp. 4	HEV178E	MT470642
<i>Diaporthe</i> sp. 4	HEV231K	MT470643
<i>Diaporthe</i> sp. 5	HEV32G	MT470644
<i>Diaporthe</i> sp. 6	HEV33G	MT470645
<i>Diaporthe</i> sp. 6	HEV140B	MT470646
<i>Diaporthe</i> sp. 6	HEV146B	MT470647
<i>Diaporthe</i> sp. 6	HEV162D	MT470648
<i>Diaporthe</i> sp. 6	HEV2A	MT470649
<i>Diaporthe</i> sp. 6	HEV171D	MT470650
<i>Diaporthe</i> sp. 6	HEV175E	MT470651
<i>Diaporthe</i> sp. 6	HEV188F	MT470652
<i>Diaporthe</i> sp. 6	HEV239K	MT470653

Isolados	Código isolados	No. de acceso Genbank
<i>Diaporthe</i> sp. 6	HEV240K	MT470654
<i>Diaporthe</i> sp. 6	HEV249L	MT470655
<i>Diaporthe</i> sp. 6	HEV267N	MT470656
<i>Diaporthe</i> sp. 6	HEV269N	MT470657
<i>Flavodon</i> sp.1	HEV40H	MT470658
<i>Fomitopsis subtropica</i>	HEV228J	MT470659
<i>Fusarium concolor</i>	HEV199G	MT470660
<i>Hypoxylon</i> sp. 1	HEV51K	MT470661
<i>Multiguttulispora sympodialis</i>	HEV145B	MT470662
<i>Muscodor</i> sp. 1	HEV173E	MT470663
unknown 2	HEV15C	MT470664
unknown 3	HEV34G	MT470665
unknown 4	HEV58M	MT470666
unknown 5	HEV259M	MT470667
<i>Neodidymella thailandicum</i>	HEV229J	MT470668
<i>Pestalotiopsis adusta</i>	HEV120Z	MT470669
<i>Phanerochaete</i> sp. 1	HEV60M	MT470670
<i>Phanerochaete</i> sp. 2	HEV196G	MT470671
<i>Phanerochaete</i> sp. 3	HEV255M	MT470672
<i>Phyllosticta bifrenariae</i>	HEV4A	MT470673
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	HEV5A	MT470674
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	HEV50K	MT470675
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	HEV55L	MT470676
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	HEV142B	MT470677
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	HEV174E	MT470678
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	HEV190F	MT470679
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	HEV191F	MT470680

Isolados	Código isolados	No. de acceso Genbank
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	HEV238K	MT470681
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	HEV242L	MT470682
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	HEV246L	MT470683
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	HEV261N	MT470684
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	HEV241	MT470685
<i>Pseudopestalotiopsis</i> sp. 1	HEV141B	MT470686
<i>Rigidoporus microporus</i>	HEV200G	MT470687
<i>Rigidoporus microporus</i>	HEV236K	MT470688
<i>Tinctoporellus epimiltinus</i>	HEV212I	MT470689
<i>Trametes cingulata</i>	HEV211H	MT470690
<i>Trametes cubensis</i>	HEV59M	MT470691
<i>Trametes cubensis</i>	HEV159C	MT470692
<i>Xylaria cubensis</i>	HEV268N	MT470693

Tabela S2 Lista dos isolados endofíticos de *Hevea* sp. que compõem o agrupamento taxonômico usado neste estudo

OTU	Códigos de identificação dos isolados
1	HEV70P, HEV89R, HEV103U, HEV125Z, HEV156C, HEV170D, HEV187F, HEV205H, HEV224J, HEV110V, HEV253M, HEV260M
2	HEV3A, HEV6B, HEV7B, HEV9B, HEV10B, HEV11C, HEV13C, HEV16D, HEV17D, HEV18D, HEV19D, HEV22E, HEV24E, HEV26E, HEV27F, HEV28F, HEV29F, HEV30F, HEV31F, HEV38H, HEV41H, HEV44I, HEV46J, HEV47J, HEV52K, HEV53K, HEV56L, HEV57L, HEV61N, HEV65N, HEV66P, HEV67P, HEV69P, HEV71P, HEV72P, HEV73P, HEV78Q, HEV82R, HEV83R, HEV84R, HEV88R, HEV90R, HEV92S, HEV95S, HEV99T, HEV108V, HEV109V, HEV112V, HEV114V, HEV115X, HEV116X, HEV121Z, HEV122Z, HEV123Z, HEV128A, HEV131A, HEV133A, HEV138B, HEV143B, HEV148B, HEV150B, HEV154C, HEV155C, HEV157C, HEV167D, HEV179E, HEV180E, HEV185F, HEV186F, HEV194G, HEV198G, HEV201G, HEV202H, HEV203H, HEV204H, HEV207H, HEV216I, HEV218I, HEV219I, HEV223J, HEV226J, HEV227J, HEV233K, HEV235K, HEV247L, HEV248L, HEV251M, HEV252M, HEV265N
3	HEV12C, HEV14C, HEV62N
4	HEV20D, HEV37H, HEV43I, HEV64N, HEV68P, HEV74P, HEV75P, HEV76Q, HEV77Q, HEV79Q, HEV81R, HEV85R, HEV86R, HEV87R, HEV91S, HEV93S, HEV94S, HEV96T, HEV97T, HEV98T, HEV100T, HEV101U, HEV102U, HEV104U, HEV105U, HEV106V, HEV107V, HEV111V, HEV113V, HEV129A, HEV130A, HEV132A, HEV152C, HEV153C, HEV160C, HEV161C, HEV163D, HEV164D, HEV166D, HEV168D, HEV181E, HEV182F, HEV183F, HEV184F, HEV189F, HEV192G, HEV193G, HEV195G, HEV197G, HEV206H, HEV210H, HEV213I, HEV214I, HEV217I, HEV220I, HEV222J, HEV225J, HEV243L, HEV250L, HEV258M
5	HEV35G, HEV117X, HEV230J
6	HEV63N
7	HEV25E
8	HEV119X, HEV158C
9	HEV39H, HEV80Q, HEV244L, HEV256M
10	HEV262N
11	HEV165D
12	HEV48J
13	HEV151C, HEV264N
14	HEV127A
15	HEV137B, HEV234K
16	HEV45I, HEV139B, HEV208H, HEV215I
17	HEV21E, HEV23E, HEV49J, HEV54L, HEV124Z, HEV135A, HEV136B, HEV169D, HEV209H, HEV237K, HEV254M, HEV257M, HEV149B, HEV221J, HEV232K, HEV245L, HEV266N
18	HEV42I, HEV126A, HEV147B, HEV176E
19	HEV118X
20	HEV8B, HEV36G, HEV134A, HEV144B, HEV172E, HEV177E, HEV178E, HEV231K
21	HEV32G
22	HEV2A, HEV33G, HEV140B, HEV146B, HEV162D, HEV171D, HEV175E, HEV188F, HEV239K, HEV240K, HEV249L, HEV267N, HEV269N,
23	HEV263N
24	HEV228J
25	HEV199G

OTU	Códigos de identificação dos isolados
26	HEV40H
27	HEV51K
28	HEV145B
29	HEV173E
30	HEV229J
31	HEV120Z
32	HEV60M
33	HEV196G
34	HEV255M
35	HEV4A
36	HEV5A, HEV50K, HEV55L, HEV142B, HEV174E, HEV190F, HEV191F, HEV238K, HEV241L, HEV242L, HEV246L, HEV261N
37	HEV141B
38	HEV200G, HEV236K
39	HEV212I
40	HEV211H
41	HEV59M, HEV159C
42	HEV1A
43	HEV15C
44	HEV34G
45	HEV58M
46	HEV259M
47	HEV268N

Tabela S3. Produção de enzimas extracelulares e inibição de fitopatógenos (*Corynespora cassiicola* e *Colletotrichum* sp.) por 102 fungos endofíticos isolados de clones de seringueira (C06, C44 e C45) de *Hevea* sp.

Clone	Isolado	Espécie	Índice enzimático (IE)				Porcentagem de inibição (%)	
			Amilase	Celulase	Lipase	Protease	<i>C. cassiicola</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.
C 06	HEV31F	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	1,62	-	1,2	1,06	19,44	15,67
C 06	HEV59M	<i>Trametes cubensis</i>	1,73	-	-	1,06	-	12,18
C 06	HEV253K	<i>Diaporthe</i> sp. 1	1,28	1,18	1,1	1,07	14,47	20,28
C 06	HEV51K	<i>Hypoxyylon</i> sp. 1	1,46	1,54	1,29	1,08	-	10,08
C 06	HEV229J	<i>Neodidymella thailandicum</i>	1,52	-	-	1,08	0	4,46
C 06	HEV3A	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	-	1,28	1,19	1,22	20,37	16,58
C 06	HEV21E	<i>Diaporthe</i> sp. 1	1,28	-	1,12	-	28,26	20,05
C 06	HEV53K	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	1,55	-	1,15	-	2,81	13,29
C 06	HEV150B	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	1,73	-	1,16	-	16,11	28,77
C 06	HEV22E	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	2,07	1,4	1,18	-	28,32	8,95
C 06	HEV100T	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	1,39	-	1,18	-	18,06	40,93
C 06	HEV170D	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h1	2,66	-	1,2	-	21,31	42,85
C 06	HEV23E	<i>Diaporthe</i> sp. 1	1,24	-	1,21	-	27,88	13,7
C 06	HEV179E	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	1,15	-	1,21	-	17,58	19,94
C 06	HEV64N	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	1,19	-	1,24	-	6,13	30,6
C 06	HEV17D	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	3,3	1,28	1,25	-	21	12,04
C 06	HEV28E	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	1,24	1,11	1,25	-	21,25	10,05
C 06	HEV44I	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	2,67	1,94	1,26	-	11,52	17,98
C 06	HEV208H	<i>Diaporthe schini</i>	1,18	-	1,27	-	31,84	38,97
C 06	HEV199G	<i>Fusarium concolor</i>	-	-	1,3	-	22,41	26,35
C 06	HEV34G	N.I 3	-	1,11	1,45	-	0	9,47
C 06	HEV14C	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h3	2,88	-	1,5	-	-	16,31
C 06	HEV37H	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	1,34	-	1,73	-	3,39	18,05
C 06	HEV48J	<i>Curvularia asianensis</i>	1,69	1,12	-	-	9,47	13,04
C 06	HEV204H	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	1,87	1,14	-	-	13,35	21,81
C 06	HEV49J	<i>Diaporthe</i> sp. 1	1,63	1,26	-	-	27,81	18,67

Clone	Isolado	Espécie	Índice enzimático (IE)				Porcentagem de inibição (%)	
			Amilase	Celulase	Lipase	Protease	<i>C. cassicola</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.
C 06	HEV263N	<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	1,26	1,82	-	-	20,02	38,98
C 06	HEV201G	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	1,18	-	-	-	19,13	30,85
C 06	HEV42I	<i>Diaporthe</i> sp. 2	1,19	-	-	-	21,86	20,63
C 06	HEV2A	<i>Diaporthe</i> sp. 6	1,21	-	-	-	9,43	6,77
C 06	HEV45I	<i>Diaporthe schini</i>	1,21	-	-	-	13,37	24,33
C 06	HEV112V	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	1,73	-	-	-	-	22,73
C 06	HEV159C	<i>Trametes cubensis</i>	2,67	-	-	-	-	26,34
C 44	HEV226J	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	2,04	-	1,19	1,07	16,98	19,31
C 44	HEV40H	<i>Flavodon</i> sp.1	-	-	-	1,07	1,29	24,73
C 44	HEV239K	<i>Diaporthe</i> sp. 6	1,43	1,23	1,21	1,07	15,16	20,1
C 44	HEV140B	<i>Diaporthe</i> sp. 6	-	1,2	1,31	1,07	-	8,56
C 44	HEV268N	<i>Xylaria cubensis</i>	1,24	-	1,26	1,09	3,34	-
C 44	HEV244L	<i>Corynespora cassicola</i>	-	1,12	4,14	1,12	12,72	30,95
C 44	HEV228J	<i>Fomitopsis subtropica</i>	1,76	1,23	-	1,12	10,73	12,82
C 44	HEV163D	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	1,56	-	1,1	-	11,16	37,31
C 44	HEV32G	<i>Diaporthe</i> sp. 5	-	-	1,11	-	19,84	23,52
C 44	HEV123Z	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	1,42	1,4	1,13	-	12,47	27,68
C 44	HEV74P	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	1,16	-	1,14	-	11,84	32,23
C 44	HEV25E	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	1,45	-	1,2	-	21,26	12,98
C 44	HEV256M	<i>Corynespora cassicola</i>	-	1,18	1,2	-	14,11	28,34
C 44	HEV120Z	<i>Pestalotiopsis adusta</i>	-	-	1,2	-	7,31	-
C 44	HEV132A	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	1,6	-	1,2	-	13,57	23,93
C 44	HEV36G	<i>Diaporthe</i> sp. 4	-	-	1,24	-	28	22,1
C 44	HEV109V	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	1,36	-	1,25	-	13,13	19,68
C 44	HEV67P	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	-	-	1,26	-	20,72	24,22
C 44	HEV15C	N.I 2	1,6	1,13	1,27	-	8,21	-
C 44	HEV174E	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	1,51	-	1,28	-	-	15,38
C 44	HEV186F	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	1,87	-	1,34	-	15,74	33,12

Clone	Isolado	Espécie	Índice enzimático (IE)				Porcentagem de inibição (%)	
			Amilase	Celulase	Lipase	Protease	<i>C. cassiicola</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.
C 44	HEV247L	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	1,31	1,13	1,41	-	7,64	25,14
C 44	HEV127A	<i>Diaporthe C.f. passifloricola</i>	-	1,83	1,44	-	13,76	25,46
C 44	HEV172A	<i>Diaporthe</i> sp. 4	-	1,11	1,47	-	13,78	33,36
C 44	HEV242L	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	1,33	-	1,51	-	-	-
C 44	HEV50K	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	1,51	-	1,89	-	-	2,71
C 44	HEV33G	<i>Diaporthe</i> sp. 6	-	1,13	-	-	-	17,67
C 44	HEV177E	<i>Diaporthe</i> sp. 4	1,24	-	-	-	15,59	38,77
C 44	HEV58M	N.I 4	1,27	-	-	-	-	5,45
C 44	HEV8B	<i>Diaporthe</i> sp. 4	1,44	-	-	-	43,71	27,48
C 44	HEV146B	<i>Diaporthe</i> sp. 6	-	-	-	-	15,17	36,64
C 44	HEV158C	<i>Cophinforma atrovirens</i>	-	-	-	-	32,19	66,4
C 44	HEV1A	N.I 1	-	-	-	-	44,32	53,51
C 44	HEV221J	<i>Diaporthe</i> sp. 1	-	-	-	-	19,45	36,12
C 44	HEV240K	<i>Diaporthe</i> sp. 6	-	-	-	-	19,17	42,12
C 44	HEV264N	<i>Curvularia</i> sp. V	-	-	-	-	12,04	8,27
C 44	HEV39H	<i>Corynespora cassiicola</i>	-	-	-	-	6,78	30,5
C 45	HEV202H	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	1,51	-	1,26	1,07	5,54	17,47
C 45	HEV200G	<i>Rigidoporus microporus</i>	1,51	-	-	1,07	15,79	20,52
C 45	HEV137B	<i>Diaporthe hongkongensi</i>	-	1,42	1,76	1,08	3,29	25,44
C 45	HEV262N	<i>Cucurbitaria berberidis</i>	-	-	1,62	1,12	-	-
C 45	HEV250L	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	-	-	1,25	1,13	13,06	29,24
C 45	HEV111V	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	1,53	-	1,21	1,16	14,98	38,97
C 45	HEV184F	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	-	-	1,25	1,16	12,39	33,05
C 45	HEV129A	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	1,24	1,33	1,27	1,28	12,19	18,3
C 45	HEV192G	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	1,42	-	1,11	-	10,19	39,62
C 45	HEV89R	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h1	1,35	1,12	1,13	-	7,31	35,52
C 45	HEV105U	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	1,67	1,33	1,15	-	20,05	27,9
C 45	HEV138B	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	1,35	-	1,17	-	12,77	15,59

Clone	Isolado	Espécie	Índice enzimático (IE)				Porcentagem de inibição (%)	
			Amilase	Celulase	Lipase	Protease	<i>C. cassiicola</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.
C 45	HEV108V	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	1,33	1,07	1,19	-	7,82	36,12
C 45	HEV168D	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	-	-	1,2	-	18,36	29,2
C 45	HEV81R	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	1,23	-	1,21	-	11,06	29,93
C 45	HEV10B	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	1,34	-	1,22	-	-	16,99
C 45	HEV259M	N.I 5	-	1,33	1,24	-	-	1,05
C 45	HEV80Q	<i>Corynespora cassiicola</i>	1,26	-	1,24	-	12,4	30,85
C 45	HEV237K	<i>Diaporthe</i> sp. 1	1,37	1,23	1,25	-	7,38	29,24
C 45	HEV213I	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	1,46	-	1,26	-	4,56	21,69
C 45	HEV131A	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	1,26	-	1,26	-	11,24	26,73
C 45	HEV79Q	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	-	-	1,27	-	16,24	23,35
C 45	HEV249L	<i>Diaporthe</i> sp. 6	1,28	1,13	1,3	-	5,16	27,32
C 45	HEV97S	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	-	1,32	1,35	-	6,61	9,63
C 45	HEV122Z	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	1,69	-	1,62	-	28,2	38,7
C 45	HEV63N	<i>Colletotrichum paranaense</i>	1,71	1,23	1,76	-	5,66	1,71
C 45	HEV69P	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h2	1,64	1,18	2,14	-	11,39	27,2
C 45	HEV101T	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	1,23	-	-	-	23,77	25,82
C 45	HEV130A	<i>Colletotrichum C.f. fructicola</i> h4	-	-	-	-	6,13	19,6
C 45	HEV169D	<i>Diaporthe</i> sp. 1	-	-	-	-	19,03	38,7
C 45	HEV234K	<i>Diaporthe hongkongensi</i>	-	-	-	-	25,04	33,87
C 45	HEV255M	<i>Phanerochaete</i> sp. 3	-	-	-	-	18,25	61,3
C 45	HEV234K	<i>Diaporthe hongkongensi</i>	-	-	-	-	25,04	33,87
C 45	HEV255M	<i>Phanerochaete</i> sp. 3	-	-	-	-	18,25	61,3

REFERÊNCIAS

- ABRO, M. A. *et al.* Biocontrol Potential of Fungal Endophytes against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* Causing Wilt in Cucumber. **Plant Pathology Journal**, v. 35, n. 6, p. 598–608, 2019.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5th ed. ed. [s.l.] Elsevier, 2004.
- ALBERTO, R. N. *et al.* Extracellular enzymatic profiles and taxonomic identification of endophytic fungi isolated from four plant species. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, p. 1–12, 2016.
- AMIRITA, A. *et al.* Enumeration of endophytic fungi from medicinal plants and screening of extracellular enzymes. **World Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 13–19, 2012.
- ARAÚJO, K. S. *et al.* Diversity of culturable endophytic fungi of *Hevea guianensis* : A latex producer native tree from the Brazilian Amazon. v. 12, n. 42, p. 953–964, 2018.
- ARNOLD, A. E. *et al.* Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 26, p. 15649–15654, 2003.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi : progress , challenges , and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 51–66, 2007.
- ARNOLD, A. E.; LUTZONI, F. Diversity and Host Range of Foliar Fungal Endophytes : **Ecology**, v. 88, n. 3, p. 541–549, 2007.
- AYOB, F. W.; SIMARANI, K. Endophytic filamentous fungi from a *Catharanthus roseus* : Identification and its hydrolytic enzymes. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 3, p. 273–278, 2016.
- BACKMAN, P. A.; SIKORA, R. A. Endophytes: An emerging tool for biological control. **Biological Control**, v. 46, n. 1, p. 1–3, 2008.
- BARDOU, P. *et al.* jvenn : an interactive Venn diagram viewer. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 293, p. 1–7, 2014.
- BARY, A. DE. Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyces. *In: Hofmeister's Handbook of Physiological Botany*. [s.l.: s.n.]. p. 338.
- BENOLIEL, B. *et al.* A novel promising *Trichoderma harzianum* strain for the production of a cellulolytic complex using sugarcane bagasse in natura. **Springer Plus**, v. 2, n. 656, p. 2–7, 2013.
- BERG, G. *et al.* Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, n. 2, p. 215–229, 2005.

BERNSTEIN, M. E.; CARROLL, G. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. **Canadian Journal of Botany**, v. 55, n. Rayner 1948, p. 644–653, 1977.

BHAGOBATY, R. K.; JOSHI, S. R. Enzymatic Activity of Fungi Endophytic on Five Medicinal Plant Species of the Pristine Sacred Forests of Meghalaya , India. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 40, n. 17, p. 33–40, 2012.

BRETT, C. T. Cell-wall degradation. *In*: BRETT, C. T.; WALDRON, K. (Eds.). . **Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls**. 1. ed. London: Unwin Hyman Ltd, 1990. p. 169–179.

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. 1–44, 2016.

CARROLL, G. Fungal Endophytes in Stems and Leaves : From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. **Ecology**, v. 69, n. 1, p. 2–9, 1988.

CHADHA, N. *et al.* An ecological role of fungal endophytes to ameliorate plants under biotic stress. **Archives of Microbiology**, v. 197, n. 7, p. 869–881, 2015.

CHAMEKH, R. *et al.* Isolation , Identification and Enzymatic Activity of Halotolerant and Halophilic Fungi from the Great Sebka of Oran in Northwestern of Algeria Isolation , Identification and Enzymatic Activity of Halotolerant and. **Mycobiology**, v. 230, n. 241, p. 230–241, 2019.

CHANDRASEKHAR, T. R. *et al.* Age of yield stabilization and its implications for optimising selection and shortening breeding cycle in rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Euphytica**, v. 156, n. 1–2, p. 67–75, 2007.

CHAO, A. *et al.* Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: A framework for sampling and estimation in species diversity studies. **Ecological Monographs**, v. 84, n. 1, p. 45–67, 2014.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Artigo Fungos Endofíticos : Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais Endophytic Fungi : An Unexplored and Sustainable Source of New and Bioactive Natural Products Resumo Fungos Endofíticos : Uma Fonte Inexplorada e Susten. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421–437, 2013.

CHAVERRI, P.; GAZIS, R. O. *Trichoderma amazonicum* , a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. **Mycobiology**, v. 103, n. 1, p. 139–151, 2011.

CHEONG, S. L. *et al.* Characterizing antagonistic activities and host compatibility (via simple endophyte-calli test) of endophytes as biocontrol agents of *Ganoderma boninense*. **Biological Control**, v. 105, p. 86–92, 2017.

CHOI, Y.; HYDE, K. D.; HO, W. W. H. Single spore isolation of fungi. **Fungal Diversity**, v. 3, p. 29–38, 1999.

CHOI, Y. W.; HODGKISS, I. J.; HYDE, K. D. Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. **Water**, p. 55–66, 2005.

CHOW, Y. Y.; RAHMAN, S.; TING, A. S. Y. Interaction dynamics between endophytic biocontrol agents and pathogen in the host plant studied via quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) approach. **Biological Control**, v. 125, n. June, p. 44–49, 2018.

CLAY, K. Fungal Endophytes of Grasses : A Defensive Mutualism between Plants and Fungi. **Ecological Society of America**, v. 69, n. 1, p. 10–16, 1988.

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, 2014.

COSTA, L. C.; PEIXOTO, P. E. C.; GUSMÃO, L. P. F. Effects of storage conditions and culture media on the saprobic fungi diversity in tropical leaf litter. **Mycosphere**, v. 6, n. 1, p. 43–52, 2015.

COSTA, R. B. DA *et al.* Melhoramento e conservação genética aplicados ao Desenvolvimento Local – o caso da seringueira (*Hevea sp.*). **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v. 1, p. 51–58, 2001.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 1, p. 25–39, 1971.

DÉON, M. *et al.* First characterization of endophytic *Corynespora cassiicola* isolates with variant *cassiicolin* genes recovered from rubber trees in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 54, p. 87–99, 2012.

DESIRE, M. H. *et al.* Enzymes and qualitative phytochemical screening of endophytic fungi isolated from *Lantana camara* Linn . Leaves. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 2, n. 06, p. 1–6, 2014.

DOYLE, J. .; DOYLE, J. . A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1987.

DUARTE JR., A. M. Fordlândia e Belterra: as cidades de Henry Ford na Amazônia. **Revista Brasileira de Casos de Ensino em Administração**, v. 5, n. 1, p. 1–13, 2015.

DUNN, I. S.; BLATTNER, F. R. Charons 36 to 40: multi enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. **Nucleic Acids**

Research, v. 15, n. 6, p. 2677–2698, 1987.

FERNANDES, E. G. *et al.* Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. **Microbiological Research**, v. 181, p. 84–92, 2015.

FERREIRA, M. C. *et al.* Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discovery of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p. 36–44, 2015.

FERREIRA, M. C.; ASSIS, J. C. S. DE; ROSA, L. H. Diversity of endophytic fungi associated with *Carapichea ipecacuanha* from a native fragment of the Atlantic Rain Forest. **South African Journal of Botany**, v. 000, p. 1–5, 2020.

FLORENCIO, C.; COURI, S.; FARINAS, C. S. Correlation between Agar Plate Screening and Solid-State Fermentation for the Prediction of Cellulase Production by *Trichoderma* Strains. **Enzyme Research**, v. 2012, p. 1–7, 2012.

FOUDA, A. H.; HASSAN, S. E. D.; *et al.* Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, n. 1, p. 95–104, 2015.

FOUDA, A. H.; HASSAN, S. E.; *et al.* Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, n. 1, p. 95–104, 2015.

GAMBOA, M. A.; LAUREANO, S.; BAYMAN, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? **Mycopathologia**, v. 156, n. 1, p. 41–45, 2003.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. **Doenças da seringueira no Brasil**. 2. ed ed. Brasília: Embrapa, 2012.

GAZIS, R. *et al.* Culture-based study of endophytes associated with rubber trees in Peru reveals a new class of Pezizomycotina: Xylonomycetes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 65, n. 1, p. 294–304, 2012.

GAZIS, R.; CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**, v. 3, n. 3, p. 240–254, 2010a.

_____. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**, v. 3, n. 3, p. 240–254, 2010b.

_____. Wild trees in the Amazon basin harbor a great diversity of beneficial endosymbiotic fungi: Is this evidence of protective mutualism? **Fungal Ecology**, v. 17, p. 18–29, 2015.

GINTING, R. C. *et al.* Diversity of Endophytic Fungi from Red Ginger (*Zingiber officinale*

Rosc.) Plant and Their Inhibitory Effect to *Fusarium oxysporum* Plant Pathogenic Fungi. **Journal of Biosciences**, v. 20, n. 3, p. 127–137, 2013.

GONÇALVES, P. DE S.; CARDOSO, M.; ORTOLANI, A. A. Origem, variabilidade e domesticação de Hevea; uma revisão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 135–156, 1990.

GONZÁLEZ-TEUBER, M. The defensive role of foliar endophytic fungi for a South American tree. **AoB Plants**, v. 8, p. 1–9, 2016.

GUO, L. D.; HUANG, G. R.; WANG, Y. Seasonal and tissue age influences on endophytic fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in the Dongling Mountains, Beijing. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 8, p. 997–1003, 2008.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. . The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597–607, 1975.

HANSON, C. A. *et al.* Beyond biogeographic patterns : processes shaping the microbial landscape. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 7, p. 497–506, 2012.

HEPPERLE, D. **A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualization tool for molecular sequences** Distributed by the author via: <http://www.sequentix.de> Align Ver.07/04©, , 2004.

HERRE, E. A. *et al.* Tropical plants as chimera: some implications of foliar endophytic fungi for the study of host-plant defence, physiology and genetics. **Biotic Interactions in the Tropics**, v. 1011, p. 226–238, 2005.

____. Ecological Implications of Anti-pathogen Effects of Tropical Fungal Endophytes and Mycorrhizae. **Ecological Monographs**, v. 88, n. 3, p. 550–558, 2007.

HILL, M. O. Diversity and Evenness: a Unifying Notation and Its Consequences. **Ecology**, v. 54, n. 2, p. 427–432, 1973.

HIRATA, Y.; KONDO, H.; OZAWA, Y. Natural rubber (NR) for the tyre industry. *In*: **Chemistry, Manufacture and Applications of Natural Rubber**. [s.l: s.n.]. p. 325–352.

HORA JÚNIOR, B. T. *et al.* Erasing the Past : A New Identity for the Damoclean Pathogen Causing South American Leaf Blight of Rubber. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1–12, 2014.

HSIEH, T. C.; MA, K. H.; CHAO, A. **iNEXT: iNterpolation and EXTrapolation for species diversity**, 2020.

HUMBER, R. A. Fungi : Identification. *In*: **Fungi. Manual of Techniques in Insect Pathology**. [s.l: s.n.]. p. 153–185.

HYDE, K. D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, v. 173, p. 163–173, 2008.

KATOCH, M.; PULL, S. Endophytic fungi associated with *Monarda citriodora*, an aromatic and medicinal plant and their biocontrol potential. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1528–1535, 2017.

KHARWAR, R. N. *et al.* The endophytic fungal complex of *Catharanthus*. **Current science**, v. 95, n. 2, p. 228–223, 2008.

LAXMAN, R. S. *et al.* Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 3152–3158, 2005.

LEAL, A. C.; RAMOS, A. L. M.; PEREIRA, J. DA P. Evaluation of Rubber Tree Clones Under Different Tapping Systems in Northwestern Paraná State, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, n. 0, p. 2–9, 2018.

LEE, J.; TAN, W.; TING, A. Revealing the antimicrobial and enzymatic potentials of culturable fungal endophytes from tropical pitcher plants (*Nepenthes* spp.). **Mycosphere**, v. 5, n. 2, p. 364–377, 2014.

LI, P. *et al.* Possible mechanisms of control of *Fusarium* wilt of cut chrysanthemum by *Phanerochaete chrysosporium* in continuous cropping fields : A case study. n. April, p. 1–13, 2017.

MAHFOOZ, M. *et al.* Evaluation of Antifungal and Enzymatic Potential of Endophytic Fungi Isolated from *Cupressus torulosa* D . Don. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 7, p. 4084–4100, 2017.

MANDAL, S.; BANERJEE, D. Proteases from Endophytic Fungi with Potential Industrial Applications. *In: Recent Advancement in White Biotechnology Through*. [s.l.] Springer Nature Switzerland AG, 2019. p. 319–359.

MANI, M.; PREETHI, K. Enzymatic and Phytochemical Analysis of Endophytic Fungi on *Aegle Marmelos* from Western Ghats of Tamil Nadu, India. **International Journal of Life Science & Pharma Research**, v. 8, n. 1–8, 2018.

MAPELLI, F. *et al.* Potential for Plant Growth Promotion of Rhizobacteria Associated with *Salicornia* Growing in Tunisian Hypersaline Soils. **BioMed Research International**, p. 1–13, 2013.

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, n. 1, p. 67–80, 2005.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, P. *et al.* Two fungal endophytes reduce the severity of pitch canker

disease in *Pinus radiata* seedlings. **Biological Control**, v. 94, p. 1–10, 2016.

MAXMEN, A. Crop pests: under attack. **Nature**, v. 501, n. 7468, p. S15–S17, 2013.

MEJÍA, L. C. *et al.* Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control**, v. 46, p. 4–14, 2008.

MISHRA, Y. *et al.* Understanding the Biodiversity and Biological Applications of Endophytic Fungi: A Review. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. s8, n. 01, p. 2–11, 2014.

MITCHELL, A. M. *et al.* *Muscodor crispans*, a novel endophyte from *Ananas ananassoides* in the Bolivian Amazon. **Fungal Diversity**, v. 31, p. 37–43, 2008.

MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Fungal Endophytes in Mediterranean Oak Forests: A Lesson from *Discula quercina*. **Phytopathology**, v. 98, n. 4, p. 380–386, 2008.

NAIR, K. P. P. **The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World**. [s.l: s.n.].

NIELSEN, R. I.; OXENBOLL, K. **Enzymes from fungi: their technology and uses** *Mycologist*, , 1998.

NOVO, M. T. *et al.* How do Detergents Work ? A Qualitative Assay to Measure Amylase Activity. **Journal of Biological Education**, n. August, p. 2–10, 2015.

OKSANEN, J. *et al.* **vegan: Community Ecology Package**, 2019. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=vegan>>

OONO, R. *et al.* A comparison of the community diversity of foliar fungal endophytes between seedling and adult loblolly pines (*Pinus taeda*). **Fungal Biology**, v. 9, p. 917–928, 2015.

OSTERGAARD, L. H.; OLSEN, H. S. Industrial Applications of Fungal Enzymes. *In*: M., H. (Ed.). . **The Mycota X**. 2nd. ed. [s.l.] Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010. p. 269–290.

PAL, K. K.; GARDENER, B. M. Biological Control of Plant Pathogens. **The Plant Health Instructor**, p. 1–25, 2006.

PALLARDY, S. G.; PALLARDY, S. G. CHAPTER 8 – Lipids, Terpenes, and Related Substances. **Physiology of Woody Plants**, p. 217–232, 2008.

PANDEY, A. K.; REDDY, M. S.; SURYANARAYANAN, T. S. ITS-RFLP and ITS sequence analysis of a foliar endophytic *Phyllosticta* from different tropical trees. **Mycological Research**, v. 107, n. 4, p. 439–444, 2003.

PATIL, M. G. *et al.* Extracellular Enzymatic Activities of Endophytic Fungi Isolated from Various Medicinal Plants. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 3, p. 1035–1042, 2015.

- PETRINI, O. Fungal Endophytes of Tree Leaves. *In*: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. . (Eds.). . **Microbial Ecology of Leaves**. 1. ed. Madison: Springer, 1991. p. 179–197.
- POINTING, S. B. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. **Fungal Diversity**, v. 2, n. March, p. 17–33, 1999.
- POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253–1256, abr. 2008.
- PRIYADARSHAN, P. M. **Biology of Hevea Rubber**. 2 ed ed. Thiruvananthapuram, Kerala, India: Springer Nature, 2017.
- PUJADE-RENAUD, V. *et al.* Endophytes from wild rubber trees as antagonists of the pathogen *Corynespora cassiicola* Abstract : **Phytopathology**, p. 1–33, 2019.
- RATHOD, D. *et al.* Microbial Endophytes: Progress and Challenges. *In*: CHANDRA, S.; LATA, H.; VARMA, A. (Eds.). . **Biotechnology for Medicinal Plants**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 101–121.
- RIVANO, F. *et al.* Performance of 10 *Hevea brasiliensis* clones in Ecuador, under South American Leaf Blight escape conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 762–773, 2016.
- ROCHA, A. C. S. *et al.* Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonism on *Microcyclus ulei*. **Fungal Diversity**, v. 47, p. 75–84, 2011.
- RODRIGUEZ, P.; GONZALEZ, D.; RODRÍGUEZ GIORDANO, S. Endophytic microorganisms: A source of potentially useful biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, n. 2016, p. S569–S581, 2016.
- RODRIGUEZ, R. J. *et al.* Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, v. 182, p. 314–330, 2009.
- SAIKKONEN, K. Forest structure and fungal endophytes. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2–3, p. 67–74, 2007.
- SAIKKONEN, K.; SAARI, S.; HELANDER, M. Defensive mutualism between plants and endophytic fungi? **Fungal Diversity**, v. 41, n. October 2009, p. 101–113, 2010.
- SANTOS, B. S. DOS *et al.* Screening of endophytic fungi stored in a culture collection for taxol production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 59–63, 2018.
- SANTOS, C. M. *et al.* Enzymatic and Antagonist Activity of Endophytic Fungi from *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). **Acta Biológica Colombiana**, v. 65, n. 2, p. 322–330, 2019.
- SCHMIT, J. P.; MUELLER, G. M. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, p. 99–111, 2007.

SCHOCH, C. L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 16, p. 6241–6246, 2012.

SCHULZ, B. *et al.* The endophyte-host interaction: A balanced antagonism? **Mycological Research**, v. 103, n. 10, p. 1275–1283, 1999.

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

SHUBHA, J.; SRINIVAS, C. Diversity and extracellular enzymes of endophytic fungi associated with *Cymbidium aloifolium* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 48, p. 2248–2258, 2017.

SIMPSON, E. H. Measurement of Diversity. **Nature**, v. 163, p. 688, 1949.

SINGH, H. *et al.* Screening of endophytic actinomycetes for their herbicidal activity. **Annals of Agrarian Science**, v. 16, n. 2, p. 101–107, 2017.

SOBRAL, L. V.; MELO, K. N.; SOUZA, C. M. Antimicrobial and enzymatic activity of anemophilous fungi of a public university in Brazil. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 89, n. 9, p. 2327–2356, 2017.

SOLIS, M. J. L. *et al.* The diverse community of leaf-inhabiting fungal endophytes from Philippine natural forests reflects phylogenetic patterns of their host plant species *Ficus benjamina*, *F. elastica* and *F. religiosa*. **Mycoscience**, v. 57, n. 2, p. 96–106, 2015.

SPECIAN, V. *et al.* Chemical Characterization of Bioactive Compounds From The Endophytic Fungus *Diaporthe Helianthi* Isolated from *Luehea divaricata*. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1174–1182, 2012.

STONE, J. K.; POLISHOOK, J. D.; WHITE, J. F. **Endophytic Fungi**. 1st Editio ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2004.

SUN, X. *et al.* Community structure and preference of endophytic fungi of three woody plants in a mixed forest. **Fungal Ecology**, v. 5, n. 2009, p. 624–632, 2012.

SUN, X.; GUO, L. D.; HYDE, K. D. Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. **Fungal Diversity**, v. 47, p. 85–95, 2011.

SUNITHA, V. H. *et al.* Amylase production by endophytic fungi *Cylindrocephalum* sp. isolated from medicinal plant *Alpinia calcarata* (Haw.) Roscoe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1213–1221, 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.

SURYANARAYANAN, T.; RAJULU, G.; VIDAL, S. Biological Control Through Fungal Endophytes: Gaps In Knowledge Hindering Success. **Current Biotechnology**, v. 05, n. 999, p. 1–1, 2016.

SURYANARAYANAN, T. S. *et al.* Fungal endophytes: An untapped source of biocatalysts. **Fungal Diversity**, v. 54, p. 19–30, 2012.

SVEDESE, V. M. *et al.* Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 1989–1995, 2012.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes : a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 1993, p. 448–459, 2001.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. ChemInform Abstract: Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites. **ChemInform**, v. 32, n. 44, p. no-no, 2010.

TEAM, R. C. **A language and environment for statistical computing** ViennaR Foundation for Statistical Computing, , 2020. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>

THOMAS, D. *et al.* Spatial patterns of fungal endophytes in a subtropical montane rainforest of northern Taiwan. **Fungal Ecology**, v. 39, p. 316–327, 2019.

THOMPSON, J. D. *et al.* The CLUSTAL _ X windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p. 4876–4882, 1997.

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, 2017.

TRIPATHI, S. *et al.* Mycorrhizal Fungi and Other Root Endophytes as Biocontrol Agents Against Root Pathogens. *In*: VARMA, AJIT (Ed.). . **Mycorrhiza: Genetics and Molecular Biology**. Third Edit ed. [s.l.] Mycorrhiza, 2008. p. 281–306.

TUPPAD, D. S.; SHISHUPALA, S. Evaluation of endophytic fungi from *Butea monosperma* for antimicrobial and enzyme activity. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 2, n. 4, p. 38–45, 2014.

VAZ, A. B. M. *et al.* A multiscale study of fungal endophyte communities of the foliar endosphere of native rubber trees in Eastern Amazon. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

VIEIRA, W. A. S. *et al.* Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, 2014.

WICHERLEY, P. R. The Genus *Hevea* - Botanical Aspects. *In*: SETHURAJ, M. R.; MATHEW, N. (Eds.). . **Natural Rubber: Biology, Cultivation and Technology**. 1st Editio ed. [s.l.] Elsevier Science, 1992. p. 50–66.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. New York: Springer-Verlag, 2016.

YU, J. *et al.* Diversity and Antifungal Activity of Endophytic Fungi Associated with *Camellia oleifera* Diversity and Antifungal Activity of Endophytic Fungi Associated with. **Mycobiology**, v. 8093, n. 46:2, p. 85–91, 2018.

ZABALGOGEAZCOA, I. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. Special issue, p. 138–146, 2008.

ZHANG, Q. *et al.* Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. **Biological Control**, v. 72, p. 98–108, 2014.