



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

CAMILA MELO GONÇALVES

**OCORRÊNCIA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM FOLHAS DE ESPÉCIES DE
ARACEAE E ORCHIDACEAE EM BREJOS DE ALTITUDE EM PERNAMBUCO**

**Recife
2021**

CAMILA MELO GONÇALVES

**OCORRÊNCIA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM FOLHAS DE ESPÉCIES DE
ARACEAE E ORCHIDACEAE EM BREJOS DE ALTITUDE EM PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia Básica

Orientador: Prof. Dr. Gladstone Alves da Silva

Coorientador: Dr. Rafael José Vilela de Oliveira

Recife
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Gonçalves, Camila Melo.

Ocorrência de fungos endofíticos em folhas de espécies de Araceae e
Orchidaceae em brejos de altitude em Pernambuco / Camila Melo Gonçalves. -
Recife, 2021.

65 p. : il., tab.

Orientador(a): Gladstone Alves da Silva

Coorientador(a): Rafael José Vilela de Oliveira

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de
Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, 2021.

Inclui referências, apêndices.

1. Microbiologia. 2. Taxonomia. 3. Fungos endofíticos. I. Silva, Gladstone
Alves da. (Orientação). II. Oliveira, Rafael José Vilela de. (Coorientação). IV.
Título.

570 CDD (22.ed.)

CAMILA MELO GONÇALVES

OCORRÊNCIA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM FOLHAS DE ESPÉCIES DE ARACEAE E ORCHIDACEAE EM BREJOS DE ALTITUDE EM PERNAMBUCO

Dissertação apresentada em 25/02/2021 ao Programa de Pós- graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

COMISSÃO EXAMINADORA

Participação Via Vídeoconferência

Dr. Rafael José Vilela de Oliveira (Co-orientador)/UFPE

Participação Via Vídeoconferência

Dra. Cristina Maria de Souza Motta – Examinador Interno – Titular/UFPE

Participação Via Vídeoconferência

Dra. Rejane Maria Ferreira da Silva - Examinador Externo – Titular/UFPE

Participação Via Vídeoconferência

Dr. Jadson Diogo Pereira Bezerra - Examinador Externo - Suplente/UFG

Participação Via Vídeoconferência

Dr. José Luiz Bezerra - Examinador interno - Suplente/ UFRB

À minha família Adriana Melo, Caroline Melo e Francisco de Assis.

Ao meu esposo Rodrigo Moraes.

À minha avó Maria José Gomes de Melo (*in memoriam*),

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me guiado, me dado discernimento e capacidade de escrever e conseguir superar todas as dificuldades encontradas para chegar até aqui, pois sem o auxílio e discernimento que Ele me deu eu não chegaria a lugar algum.

Aos meus pais, Adriana M^a Melo Gonçalves da Silva e Francisco de Assis Gonçalves da Silva, por apoiarem a minha escolha, estarem sempre ao meu lado me ajudando a superar todas as dificuldades e sempre me aconselhar. À minha irmã, Caroline Melo Gonçalves, por estar sempre pronta a me ouvir, me aconselhar quando precisei e pelos momentos de descontração e oração.

Ao meu esposo, Rodrigo Morais de Oliveira, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, por sempre me auxiliar nos momentos de maior dificuldade, pelos momentos de companheirismo e descontração que foram muito importantes para eu poder chegar onde estou e por nunca me deixar desistir.

À minha avó, Maria José Gomes de Melo (in memoriam), que sempre sonhou esse sonho junto comigo estava e está sempre em oração pedindo pelo meu sucesso.

Aos meus avós, tios e primos, pelos momentos de descontração, por todo o carinho que me deram, pelos conselhos nas horas certas e por nunca descreditarem em mim.

Aos meus amigos do laboratório em especial Rejane M^a da Silva, Julyana M^a da Silva e Deborah Vitória Gomes de Lima Raposo, que ficaram até mais tarde para me auxiliar nos meus experimentos e que foram às coletas tão cansativas. Pelas brincadeiras para aliviar a tensão e por sempre me ouvirem reclamar que não iria conseguir terminar nunca os experimentos.

Aos meus amigos de sala, em especial Jucielle e Samuel que sempre estiveram ao meu lado, pelas horas de estudo, pela ajuda nos trabalhos acadêmicos e por nunca me deixarem desanimar.

Aos meus professores, pela dedicação em formar profissionais éticos e competentes. Ao professor Gladstone Alves da Silva, por ter me orientado, confiado em mim e pelo exemplo de profissional.

Ao amigo e Co-orientador Rafael José Vilela de Oliveira pela sua paciência, dedicação e por estar sempre me auxiliando quando preciso.

Por fim, agradeço a todos que colaboraram com esse trabalho e mesmo indiretamente estavam sempre ao meu lado.

“Você não compreende agora o que estou lhe fazendo; mais tarde, porém, entenderá”.

João 13:7

RESUMO GERAL

Fungos endofíticos são micro-organismos cultiváveis ou não, em meio de cultura, que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar dano aparente ao hospedeiro e sem produzir estruturas externas que emergem nas superfícies das plantas. A família Araceae compreende um grupo de monocotiledôneas herbáceas com 117 gêneros e aproximadamente 4000 espécies. A família Orchidaceae é uma das maiores famílias de plantas, englobando cerca de 25.000 espécies. Não há praticamente trabalhos sobre a ocorrência de fungos endofíticos nos Brejos de Altitude, principalmente considerando trabalhos envolvendo prospecção molecular desses organismos. Assim, o presente trabalho objetivou identificar a diversidade de fungos endofíticos em folhas de Araceae e Orchidaceae em áreas de Brejo de Altitude da Serra Contente (Gravatá) e Mata da Chuva (Bonito) no estado de Pernambuco. No laboratório, as folhas foram lavadas com água corrente e sabão neutro, desinfestados em álcool 70% por 30 segundos, em hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% por 1,5 minutos e realizadas duas lavagens com água destilada esterilizada e com auxílio de um furador esterilizado foram feitos discos foliares (6 mm). Os fragmentos foram transferidos para placa de Petri, em triplicata, contendo ágar malte acrescido de cloranfenicol (50 mg L⁻¹), para posterior identificação taxonômica utilizando literatura especializada para análise morfológica dos táxons. Para confirmação dos táxons, o DNA foi extraído, sendo amplificada e sequenciada a região ITS ("internal transcribed spacer") do rDNA. Foram isolados 214 fungos endofíticos de 360 discos foliares de Orchidaceae e Araceae, distribuídos em 13 gêneros e 21 espécies, dentre eles os que tiveram maior representatividade foram *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis* e *Aspergillus*. Os Brejos de Altitude da Serra Contente e Mata da Chuva possuem comunidades fúngicas diferentes, no entanto as famílias estudadas possuem uma comunidade fúngica similar. Estudos sobre a ocorrência de fungos endofíticos nos Brejos de Altitude são muito importantes, tendo em vista que não há praticamente trabalhos sobre esses organismos nessas áreas.

Palavras chave: Brejos de Altitude. Fungos Endofíticos. ITS rDNA.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms cultivable or not, in culture medium, that inhabit the interior of plant tissues without causing apparent damage to the host and without producing external structures that emerge on the surfaces of plants. The Araceae family comprises a group of herbaceous monocots with 117 genera and approximately 4000 species. The Orchidaceae family is one of the largest plant families in the plant kingdom, encompassing around 25,000 species. There is practically no work on the occurrence of endophytic fungi in *Brejos de Altitude*, mainly considering works involving molecular prospecting of these organisms. Thus, the present study aimed to identify the diversity of endophytic fungi in leaves of Araceae and Orchidaceae in *Brejo de Altitude* areas from Serra Contente (Gravatá) and Mata da Chuva (Bonito) in the state of Pernambuco. In the laboratory, the leaves were washed with water and soap, and with the aid of a sterile punch were made leaf discs (6 mm), then disinfected in 70% alcohol for 30 seconds and sodium hypochlorite (NaOCl) 2% for 1,5 minutes. Two washes with sterile distilled water were performed after disinfection. The fragments were transferred to a petri dish, in triplicate, containing malt agar plus chloramphenicol (50 mg L⁻¹) for further taxonomic identification using specialized literature for morphological analysis of the taxa. To confirm the taxa, the DNA was extracted, amplified and sequencing the ITS region (“internal transcribed spacer”) of the rDNA. Were isolated 214 endophytic fungi from more than 300 leaf discs of Orchidaceae and Araceae, distributed in 13 genera and 21 species. The most representative taxa were *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis* and *Aspergillus*. Serra do Contente and Mata da Chuva have different fungal communities, however the studied families have a similar fungal community. Studies on the occurrence of endophytic fungi in *Brejos de Altitude* are important, considering that there are just few works about these fungi in these areas.

Keywords: *Brejos de Altitude*. Endophytic fungi. ITS rDNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação dos Brejos de Altitude Nordestinos.....	17
Figura 2 - Mata da Serra do Contente - Gravatá (A) e Mata da Chuva – Bonito (B), Pernambuco	23
Figura 3 - Gêneros isolados em folhas de Orchidaceae e Araceae coletadas nos municípios de Gravatá e Bonito, Pernambuco	27
Figura 4 - Diagrama de Venn indicando o número de espécies comuns entre as áreas Mata da Chuva – Bonito e Serra do Contente – Gravatá	29
Figura 5 - Índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') de fungos endofíticos encontrados entre as áreas Mata da Chuva – Bonito e Serra do Contente - Gravatá (Tukey ao nível de $P < 0,05$)	30
Figura 6 - Índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') de fungos endofíticos encontrados entre as famílias Araceae e Orchidaceae (Tukey ao nível de $P < 0,05$).....	30
Figura 7 - Escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) das comunidades de fungos endofíticos nas áreas da Serra do Contente em Gravatá e Mata da Chuva em Bonito, Pernambuco.....	31
Figura 8 - Escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) das comunidades de fungos endofíticos nas famílias Araceae e Orchidaceae	32
Figura 9 - Curva de acumulação de espécies de fungos endofíticos em relação ao número de amostras na Serra do Contente (Gravatá), Pernambuco.....	33
Figura 10 - Curva de acumulação de espécies de fungos endofíticos em relação ao número de amostras na Mata da Chuva – Bonito.....	34
Figura 11 - Filograma obtido a partir de análise bayesiana de sequências da região ITS do rDNA, mostrando o posicionamento de fungos endofíticos isolados das Famílias Araceae e Ochidaceae, nas áreas de estudo.	35

LISTA DE SIGLAS

AS	<i>Anthurium scandens</i>
CB	<i>Caladium bicolor</i>
DP	<i>Dichaea panamensis</i>
EC	<i>Epidendrum cinnabarinum</i>
E sp.	<i>Epidendrum</i> sp.
FR	Frequência de ocorrência
GB	<i>Gomesa basbata</i>
ITS	Internal transcribed space
MA	<i>Mostera adansonii</i>
N	Número de Isolados
NCBI	National Center for Biotechnology Information
SS	<i>Scaphyglottis sickii</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1	FAMÍLIA ORCHIDACEAE	13
2.1.1	Características e Importância	13
2.2	FAMÍLIA ARACEAE	15
2.2.1	Características e Importância	15
2.3	BREJOS DE ALTITUDE	16
2.4	FUNGOS ENDOFÍTICOS	18
2.4.1	Conceito	18
2.4.2	Importância	20
2.4.3	Fungos Endofíticos em Orchidaceae	21
2.4.4	Fungos endofíticos em Araceceae	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	ÁREAS DE ESTUDO	23
3.2	COLETA DO MATERIAL	24
3.3	ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	24
3.4	IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	25
3.4.1	Caracterização morfológica	25
3.4.2	Caracterização molecular	25
3.4.2.1	Extração de DNA dos fungos endofíticos	25
3.4.2.2	Amplificação e sequenciamento	25
3.4.2.3	Análise filogenética	26
3.5	ÍNDICES ECOLÓGICOS	26
4	RESULTADOS	26
4.1	DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS	26
4.2	FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FOLHAS DE ARACEAE E ORCHIDACEAE NA SERRA DO CONTENTE EM GRAVATÁ	32
4.3	FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FOLHAS DE ARACEAE E ORCHIDACEAE NA MATA DA CHUVA EM BONITO	33
4.4	ANÁLISE MOLECULAR DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	34
5	DISCUSSÃO	37
6	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

Azevedo (1998) definiu micro-organismo endofítico como fungos e bactérias que habitam a parte interior das plantas, geralmente as partes aéreas, sem afetar de forma negativa o seu hospedeiro. Os micro-organismos endófitos são todos cultiváveis ou não em meio de cultura, e vivem na parte interna dos vegetais sem causar danos e sem produzir estruturas externas (Azevedo e Araújo, 2007). Essa associação fungo-planta é muito importante, pois os fungos excretam metabólitos secundários que protegem as plantas e ainda auxiliam na promoção do crescimento dos vegetais (Isaeva et al., 2010).

A família Araceae compreende um grupo de monocotiledôneas herbáceas com 117 gêneros e aproximadamente 4000 espécies onde destacam-se *Anthurium* e *Philodendron* como os gêneros com maior representatividade para a América (Govaerts et al., 2011). Araceae é uma família que apresenta indivíduos com uma variedade de formas de vida que tem grande potencial de colonização de diferentes habitats. Essas plantas podem ser encontradas desde os trópicos secos até florestas pluviais, do semiárido ao litoral, pântanos, brejos tropicais e manchas de florestas (Croat, 1990). Andrade et al. (2006) e Rodal (2005) estudando Brejos de altitude na Reserva Ecológica Estadual Mata do Pau-Ferro (Areia – PB) e no Planalto da Borborema (Bonito – PE), encontraram vários indivíduos da família Araceae, demonstrando a ocorrência de representantes dessa família nos Brejos supracitados.

A família Orchidaceae é uma das maiores famílias de plantas, aparentemente a maior do reino vegetal com cerca de 25.000 espécies (Chase et al., 2003). Está distribuída por toda a superfície terrestre com exceção dos pólos e desertos, sua maior diversidade se encontra nas regiões tropicais e subtropicais (Dressler, 1993; Souza & Lorenzi, 2008; Joppa, Roberts & Pimm, 2011). O interesse pelas orquídeas começou na China ou Japão, onde há 3000 anos já havia relatos dessas plantas com flores formosas e perfumadas e seus poderes medicinais (Silva, 2018). Na amazônia brasileira essa família apresenta uma diversidade muito marcante, ainda assim existe pouco conhecimento por parte da população, com relação a sua importância ecológica e econômica (Sabóia et al., 2009; Cantuária et al., 2015; Krahl et al., 2015).

Brejos de Altitude são enclaves de Mata Atlântica, tidos como refúgios de florestas úmidas presentes no interior do continente há milhares de anos, situados no Nordeste brasileiro. Formam ilhas de floresta úmida dentro das regiões semiáridas, onde estão cercados pela vegetação da caatinga, com condições climáticas diferenciadas, contudo o conhecimento sobre a vegetação e ecologia dessas áreas ainda é escasso (Pôrto et al., 2004; Coimbra-Filho &

Câmara, 1996; Lima & Cavalcanti, 1975). Rodal, 1998 afirma que a vegetação dos Brejos de Altitude se destaca por ter grande semelhança com a floresta úmida litorânea, havendo espécies de vegetais e animais comuns entre esses ecossistemas, assim, Brejos de Altitude são considerados ilhas de Mata Atlântica no meio do semiárido.

A Mata Atlântica nordestina está em estado avançado de degradação, sua maior parte não tem condições de ser preservada (Peixoto et al., 2004; Thomas et al., 1998). Dentre os Brejos de Altitude de Pernambuco podemos destacar a Serra do Contente, localizada no município de Gravatá – PE, uma RPPN (Reserva Particular do Patrimônio Natural), a qual foi criada em 2009 com o intuito de preservar a fauna e flora da região e a Mata da Chuva, no município de Bonito-PE, a qual apresenta vegetação mais aberta, com menos estratos arbóreos, além do arbustivo e do herbáceo, sendo este último pouco expressivo.

Os fungos endofíticos possuem um grande potencial a ser explorado no Brasil, tanto para plantas nativas e endêmicas, quanto para aquelas que já são tradicionalmente cultivadas (Azevedo & Araújo, 2007). Não há praticamente trabalhos sobre a ocorrência de fungos endofíticos nos Brejos de Altitude, principalmente se considerarmos trabalhos envolvendo prospecção molecular desses organismos. Assim, o presente estudo objetivou identificar a diversidade de fungos endofíticos em folhas de Araceae e Orchidaceae em áreas de Brejo de Altitude no estado de Pernambuco.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 FAMÍLIA ORCHIDACEAE

2.1.1 Características e Importância

A família Orchidaceae Juss. está distribuída por toda superfície terrestre com cerca de 25.000 espécies identificadas, considerada uma das maiores famílias do reino vegetal, com a maior diversidade distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do globo, porém não há registro de indivíduos nos polos e desertos (Chase et al., 2003; Dressler, 1993; Souza; Lorenzi, 2008; Joppa, Roberts & Pimm, 2011). O grande interesse por essa família vem desde há 3.000 anos da China ou Japão onde já era admirada por possuir flores belas e perfumadas além de seus poderes medicinais (Silva, 2018). Na Amazônia brasileira, a sua diversidade é muito marcante, mas ainda existe pouco conhecimento sobre sua importância ecológica e econômica (Sabóia et al., 2009; Cantuária et al., 2015; Krahl et al., 2015). No Brasil ocorrem cerca de 207 gêneros e 2.400 espécies, das quais 1.543 são endêmicas (Flora do Brasil, 2020).

Os membros da família Orchidaceae são ervas perenes com morfologia muito diversa. Podem ser epífitas, terrestres, rupícolas, hemiepífitas ou saprófitas; com raízes micorrizadas, tuberosas ou não, em geral com velame. O caule é simpodial ou monopodial, muitas vezes rizomatoso. As folhas são alternas, raramente opostas, dísticas ou espiraladas, simples, inteiras, com nervação usualmente paralelinérvia. As inflorescências são racemosas ou paniculadas, algumas vezes reduzidas a uma única flor, terminais ou laterais. As flores são usualmente monoclinas, zigomorfas, ressupinadas ou não, com perianto tepalóide, em geral vistoso; apresentando três sépalas e três pétalas livres. Apresentam um ou dois estames, adnatos ao estilete e ao estigma, formando a coluna; o pólen é em geral agrupado em polínias; o gineceu é sincárpico, tricarpelar; o ovário é ínfero, unilocular com placentação parietal, ocasionalmente trilocular com placentação lateral, apresenta numerosos óvulos. O fruto é uma cápsula, abrindo por três ou seis fendas longitudinais; as sementes são minúsculas, com tegumento membranáceo, e embrião muito reduzido com endosperma ausente (Dahlgren et al., 1985; Dressler, 1993).

A família Orchidaceae tem grande destaque na flora brasileira com mais de 2.500 espécies, representando cerca de 10% das espécies descritas para o mundo (Barros et al., 2015). É uma família bastante rica que está distribuída em todos os domínios fitogeográficos, no Brasil a maior riqueza é encontrada na Mata Atlântica, com cerca de 1.453 espécies (Flora do Brasil, 2020). Na região Nordeste, são registrados 127 gêneros e 656 espécies, sendo em Pernambuco encontrados 70 gêneros e 205 espécies. Nessas regiões as espécies pertencentes a esta família podem ser encontradas como, epífita, hemiepífita, rupícola, saprófita, terrícola ou aquática (Flora do Brasil, 2020).

Fazendo uma breve análise pode-se observar que para o Brasil os vários estudos que existem sobre a família estão direcionados ao conhecimento da composição florística e estrutura da comunidade (Dislich & Mantovani, 1998; Kersten & Silva, 2001; Rogalski & Zanin, 2003; Menini Neto et al., 2004; Cervi & Borgo, 2007; Brustulina & Schmitt, 2008; Dettke et al., 2008; Bataghin et al., 2010). Apesar da vasta literatura mencionada, trabalhos em diferentes regiões se tornam necessários, dado o alto nível de endemismo observado, resultado da fragmentação, o que leva ao isolamento e redução gradual da diversidade de espécies, em combinação com diferenças florísticas e climáticas em cada área (Rizzini, 1997).

A família Orchidaceae está entre as plantas mais apreciadas por possuir uma aparência fascinante e por possuir elevado valor comercial (Meneguice et al., 2004). É uma planta considerada de grande interesse econômico nos mercados nacional e internacional, com

destaque para floricultura e decoração (Lorenzi; Souza, 2001). O Brasil apresenta um notável crescimento na indústria de produção de orquídeas, destaque para o estado de São Paulo como principal produtor (Sebrae, 2015). Com flores dos mais diversos tamanhos e cores, tem seu aspecto ornamental bastante explorado, além disso, a família possui gêneros que fornecem produtos alimentícios (baunilha - gênero *Vanilla*), medicinais, dentre outros produtos utilizados na indústria (Hoehne, 1949; Cardoso & Israel, 2005). Entre as orquídeas medicinais podemos destacar *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi, a qual apresenta o extrato com propriedades imunológicas importantes no tratamento da tuberculose, dentre elas também se destacam as que fazem parte da indústria alimentícia, tais como *Dendrobium densiflorum* Lind. e *D. cariniferum* Rchb.f. que servem de alimento e são utilizadas como medicinais na China. Essas plantas são ricas em ésteres e ácidos aromáticos simples com atividades antioxidantes, antitumorais e antimutagênicas. Também podemos citar os tubérculos de *Satyrium nepalense* D.Don que são consumidos como tônico energético na Ásia e tubérculos da terrícola *Orchis máscula* (L.) L. que são utilizados para a fabricação de um extrato denominado salep que é usado na manufatura de sorvetes na Turquia (Barreto & Parente, 2006; Fan et al., 2001; Chen et al., 2008; Mahendran & Bai, 2009; Roberts & Dixon, 2008).

As orquídeas tem as mais variadas dimensões, podem ser plantas minúsculas com flores do tamanho da cabeça de um alfinete e até plantas gigantes com mais de três metros, produzindo hastes florais de comprimento acima de quatro metros, por possuir uma grande variabilidade genética e por motivos econômicos, espécies de orquídeas vem sofrendo grande depredação, além disso seus habitats, vem sendo constantemente destruído pelo avanço da agricultura (Cardoso & Israel, 2005).

2.2 FAMÍLIA ARACEAE

2.2.1 Características e Importância

A família Araceae tem distribuição cosmopolita e está entre as famílias de monocotiledôneas mais diversas com nove subfamílias, 125 gêneros e 3.550 espécies (Boyce & Croat, 2015). Está distribuída por quase todos os continentes, menos na Antártida, pode-se observar uma maior diversidade nas regiões tropicais e subtropicais com destaque para América Tropical (Croat, 1998; Gonçalves, 2010). O Brasil se destaca por estar entre os países com a maior variedade de Araceae, sendo encontrados 36 gêneros e 473 espécies, destas 243 são endêmicas e 120 espécies foram relatadas para a região Nordeste do país (Mayo et al., 1997). A família ocorre nos mais diversos habitats, desde florestas a

afloramentos rochoso, está entre as principais famílias de epífitas que são comuns na Mata Atlântica (Coelho et al., 2009).

As plantas da família Araceae possuem caules aéreos eretos, escandentes ou procumbentes, subterrâneos, rizomatosos, cormosos ou tuberosos. Os entrenós variam de longos a extremamente curtos com raízes adventícias ao longo destes. As folhas podem ser espiraladas ou dísticas, inteiras ou compostas, geralmente tri-partidas, palmadas, pedadas ou pinadas. Com venação reticulada ou peniparalelinérvea. As inflorescências são terminais, pseudolaterais com pedúnculos longos ou reduzidos. O espádice apresenta flores bissexuadas ou unissexuadas. As flores apresentam perigônio evidente, ou tépalas muito reduzidas ou ausentes, hipóginas, actinomorfas, protogínicas. Os estames são livres ou conados, as anteras geralmente são extrorsas com conectivo frequentemente hipertrofiado. O ovário é do tipo sincárpico com um a vários óvulos por lóculo. Os frutos são bacáceos ou utriculares, isolados ou em sincarpia. As sementes podem apresentar, ou não, endosperma (Coelho, 2018).

Com a maioria de suas espécies sendo terrestre, há uma pequena variedade de plantas epífitas e aquáticas. Uma das características marcante para a família é a toxicidade das folhas, como é o caso de *Dieffenbachia* (comigo-ninguém-pode), algumas são comestíveis, tais como *Colocasia esculenta* (inhame) e *Xanthosoma sagittifolium* (taioba) (Lorenzi, 2008). A família apresenta cerca de 800 espécies de importância econômica na indústria alimentícia, como ornamental e medicinal. Em média 10% da população consome Taro, são raízes de *Colocasia esculenta*, a espécie de Araceae mais cultivada (Vianna, Soares & Appezzato-da-Gloria, 2001; Pedralli, 2002). Dentre as plantas ornamentais temos destaque para os gêneros *Anthurium*, *Philodendron*, *Dieffenbachia*, *Monstera* e *Zantedeschia* (Pedralli, 2002). Entre as várias espécies de Araceae que são utilizadas para fins medicinais, o gênero *Philodendron*, encontrado na Amazônia, tem se destacado no auxílio do tratamento da malária e febre (Milliken et al., 1997a, 1997b; Kvist et al., 2006; López et al., 2006).

2.3 BREJOS DE ALTITUDE

Brejos de Altitude são definidos como enclaves de floresta úmida no semi-árido composto por disjunções de floresta estacional semidecídua, um dos tipos vegetacionais que compõem a floresta Atlântica brasileira, que possuem características diferenciadas como sua vegetação, clima úmido, precipitação anual acima de 900 mm, solo com alto teor de água disponível (Veloso et al., 1991; Theulen, 2004). Dentre as hipótese sobre a origem dos Brejos de Altitude a mais aceita é de que a altitude está associada com as variações climáticas

ocorridas durante o Pleistoceno (há 10.000 anos), que permitiu que a floresta úmida adentrasse a caatinga e após esse período interglacial as ilhas de floresta úmida permaneceram em locais com microclima favorável (Andrade-Lima, 1982; Tabarelli & Santos, 2004).

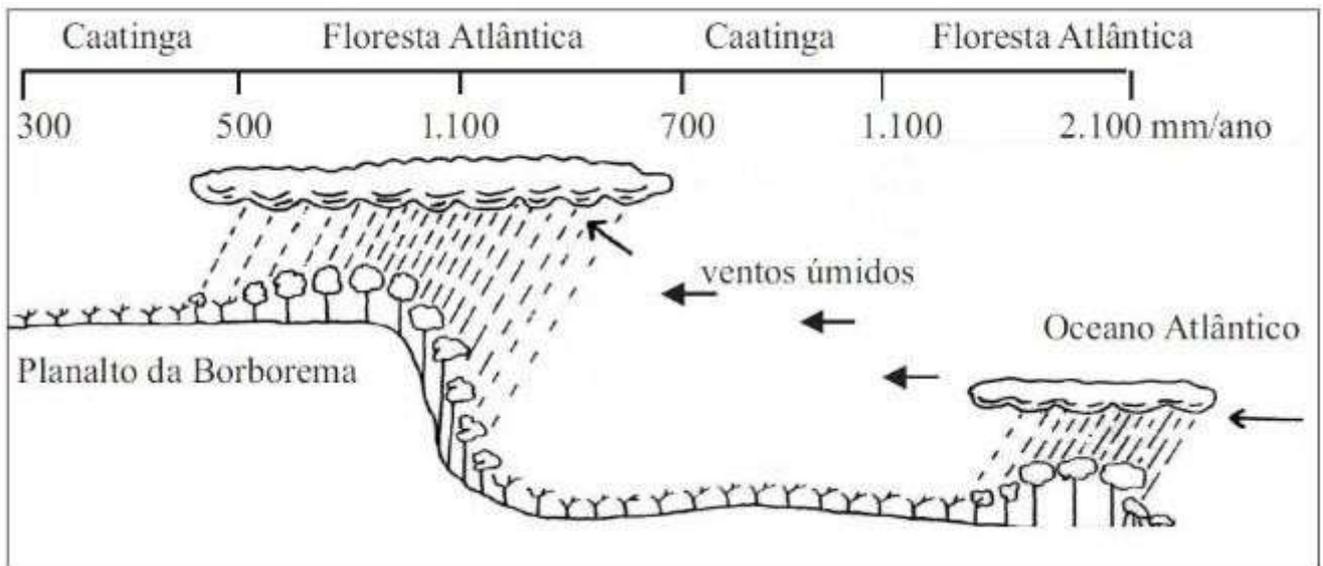
Os Brejos de Altitude possuem altitude variável entre 500 – 1.100 m dentro do domínio da caatinga e são considerados “refúgios atuais” para espécies da floresta Atlântica nordestina, abrangendo os estados da Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande Norte e Sergipe (Andrade-Lima, 1982; Vasconcelos Sobrinho, 1971; Juncá, 2006; Machado, 2011).

Vasconcelos Sobrinho (1971) relatou a presença de 43 brejos distribuídos nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco. Tabarelli & Santos (2004) afirmam que os estados de Pernambuco e da Paraíba possuem 31 brejos, os quais estão distribuídos em 28 municípios do agreste e sertão, dessa forma, ao menos $\frac{1}{4}$ da área de distribuição original da floresta Atlântica nordestina é representada pelos brejos de altitude.

Os Brejos de Altitude de Pernambuco são como regiões úmidas, isoladas dentro de áreas secas, estas regiões situam-se entre 700 e 1.200 m de altitude, com dominância para as florestas subperenifólias, subcaducifólias e caducifólias em seus topos (Araújo Filho et al., 2000). Segundo o IBGE (2012), os Brejos de Altitude são como “refúgios estabelecidos em áreas Alto-Montanas dos inselbergs, relictos do arresamento a que foi submetido o relevo da região”.

Os Brejos de Altitude nordestinos tem como características marcante as relíquias vegetacionais que são disjunções de Floresta Atlântica (**Figura 1**), ilhadas pela vegetação da Caatinga, possuem peculiaridades florísticas, fisionômicas e ecológicas dissonantes do redor por estarem inseridos nas extensões do semiárido. Esse fator está associado ao efeito orográfico, dos planaltos e chapadas entre 600 e 1.100 m de altitude que formam “ilhas” com características exclusivas como o aumento dos níveis da pluviosidade e a redução da temperatura, tais condições o tornam áreas de elevada biodiversidade (Veloso et al., 1991; Barbosa et al., 2004).

Figura 1 - Formação dos Brejos de Altitude nordestinos.



Fonte: Tabarelli e Santos, 2004.

Devido às condições climáticas favoráveis à agricultura, os Brejos de Altitude têm sido considerados áreas prioritárias para o desenvolvimento das atividades de pecuaristas e agricultores (Medeiros et al., 2016). Em vista disso, as florestas nos brejos estão extremamente fragmentadas, grande parte da floresta nordestina, incluindo os brejos, tem sido convertida em terras agricultáveis (Viana et al., 1997); as reservas naturais são pequenas e mal manejadas (Dias et al., 1990, Lima; Capobianco, 1997) e a caça de subsistência é praticada de forma generalizada (Almeida et al., 1995). De acordo com Ranta et al. (1998) grande parte do que restou desta floresta é composta por arquipélagos de fragmentos florestais, a maioria deles com menos de 10 hectares de área.

Segundo Silva & Tabarelli (2000) restam apenas 949 km² de floresta nos brejos da Paraíba e Pernambuco, grande parte representada pela Floresta Estacional Semidecidual e apenas 25 km² de Floresta Ombrófila Aberta. Constantemente, os brejos têm sido convertidos em lavouras de café, banana e culturas de subsistência, como milho, feijão e mandioca, desde o século XIX (Lins, 1989). Tais atividades têm representado perda e fragmentação de habitats, extração seletiva de plantas e extinção de grandes vertebrados pela caça (Vasconcelos Sobrinho, 1971; Silva & Tabarelli 2000).

2.4 FUNGOS ENDOFÍTICOS

2.4.1 Conceito

O primeiro relato para o termo endófito foi feito por A. de Bary em 1866 que, ao

estudar gramíneas, considerou endófitos todos os micro-organismos que vivem no interior dos tecidos das plantas. O termo endófito é derivado do grego (*éndo* + *phytón*) que significa 'no interior da planta' e abrange bactérias, fungos, algas, vírus e insetos que convivem de forma simbiótica com a planta hospedeira (Schulz & Boyle, 2005). Esses micro-organismos são aqueles que, em pelo menos uma fase de seu ciclo de vida, colonizam o interior de tecidos vegetais aéreos, sem causar dano aparente (Carroll, 1986). Segundo Petrini (1991) a definição para endófitos pode ser mais abrangente, inserindo todos os organismos que colonizam os tecidos vegetais (intra ou intercelularmente) sem causar dano aparente ao seu hospedeiro, bem como patógenos latentes que podem viver de forma assintomática.

Apesar do termo 'endófito' ser empregado para todos os organismos que habitam plantas, micologistas tem utilizado o termo 'fungo endofítico' para os que habitam plantas sem causar sintomas visíveis de doenças (Schulz & Boyle, 2005). Azevedo e Araújo (2007) definiram fungos endófitos como todos aqueles que habitam o interior dos tecidos vegetais, podendo ser cultiváveis ou não, sem causar dano aparente ao hospedeiro e sem produzir estruturas externas que emergem nas superfícies das plantas.

Segundo Guo et al. (2008) os fungos endofíticos são aqueles que residem internamente nos tecidos das plantas sem causar efeito negativo imediato. Além disso, os fungos endofíticos são encontrados em praticamente todas as espécies vegetais estudadas até o momento e são reconhecidos como fontes potenciais de novos produtos naturais para exploração na medicina, agricultura e indústria. Adicionalmente, os fungos endofíticos são capazes de excretar metabólitos secundários que protegem as plantas de fitopatógenos e, em contrapartida, os vegetais fornecem nutrientes e um ambiente estável, condições fundamentais e que são vitais para o desenvolvimento dos fungos (Isaeva et al., 2010).

No início dos anos 70 surgiram os primeiros estudos com fungos endofíticos mostrando sua capacidade de desempenhar um papel importante no hospedeiro (Azevedo, 1999), possuindo funções bem definidas nas plantas que hospedam. Esses fungos provocam modificações fisiológicas nas plantas, possuem a capacidade de modificar morfológicamente o tecido vegetal, além de aumentar a resistência a herbívoros e patógenos (Azevedo, 1999; Saikkonen et al., 1998).

Os estudos dos fungos endofíticos vão além dos aspectos ambientais e biotecnológicos despertando também forte interesse da comunidade acadêmica sobre a descoberta de novas espécies. Diante de suas valiosas propriedades combinadas com sua imensa diversidade, a

comunidade científica considerarem esses fungos em uma posição de destaque na microbiota dos vegetais (Arnold et al., 2003).

2.4.2 Importância

O interesse pelo estudo dos fungos endofíticos vem aumentando, pois estes apresentam uma ampla gama de aplicações biotecnológicas (Larran et al., 2002). Os fungos endofíticos têm sido muito estudados quanto ao potencial de sintetizar produtos naturais e moléculas bioativas, sendo bastante utilizados na indústria farmacêutica e alimentícia (Azevedo, 2007). O interesse biotecnológico dos fungos endofíticos foi despertado por Stierle et al. (1993) que observou a capacidade de produção de taxol por *Taxomyces andreanea*, isolado da planta *Taxus brevifolia*. Outros trabalhos mostraram que *Pestalotiopsis microspora* isolado como endofítico de *T. wallachiana*, também produz taxol (Strobel et al., 1996). A partir da descoberta de que fungos endofíticos tem a capacidade de produzir a mesma substância que seu hospedeiro, visualizou-se um processo mais eficiente e menos dispendioso para produção deste fármaco (Neto et al., 2003).

Atualmente foi isolado pela primeira vez um fungo endofítico (*Fusarium* sp.) produtor de Hup A, um alcaloide importante usado no tratamento de Alzheimer (Cruz-Miranda et al., 2020). Outros bioativos naturais obtidos de fungos endofíticos incluem: esteróides, xantonas, fenóis, isocumarinas, quinonas, furandionas, terpenóides, depsipeptídeos e citocalasinas (Krohn et al., 2001; Schulz et al., 1999; Schulz et al., 2002). Devido a isso, várias técnicas relacionadas a química, bioquímica, microbiologia e biologia molecular, têm sido utilizadas para auxiliar no isolamento de novos princípios ativos por esses micro-organismos (Specian et al., 2015).

Alguns fungos endofíticos são capazes de produzir enzimas extracelulares hidrolíticas, como carboximetil celulase (CMC-ase), xilanase e amilase (Farouk et al., 2020). Esses fungos também são capazes de produzir outras enzimas extracelulares incluindo, pectinase, celulase, lipoidase, proteinase, fenoxidase, enzimas catabólicas, ligninase, dentre outras (Oses et al., 2006; Tan & Zou, 2001). Essas enzimas são importantes no processo de penetração e colonização do fungo na planta hospedeira, além de participarem da degradação de resíduos vegetais (Chao Dai, 2010). Além disso, alguns fungos endofíticos são usados como fonte alternativa para a produção de enzimas anticancerígenas principalmente as conhecidas como L-asparaginases (Hatamzadeh et al., 2020).

2.4.3 Fungos Endofíticos em Orchidaceae

Como observados nos estudos de diversidade de fungos endofíticos nota-se que todas as plantas possuem um ou mais gêneros de fungos associados a elas (Soytong, 2008; Alurappa et al., 2018). Os endófitos micorrízicos e não micorrízicos beneficiam as orquídeas em várias condições ecológicas, tais como em condições do solo com baixo teor de nutrientes (Rasmussen, 1995). Nas orquídeas, os fungos endofíticos podem ser isolados a partir de diversos tecidos como haste, folha, rizoma, bulbo maduro, tubérculos e até de raízes (Bayman & Otero, 2006; Liu & Luo, 2010; Ovando et al., 2005; Yang et al., 2008). O micélio fúngico é usado para auxiliar na absorção de várias substâncias promotoras de crescimento como auxina e vitaminas B2, B6 e B9 (ácido fólico) (Maor et al., 2004, Tsavkelova et al., 2006, Tudzynski & Sharon, 2002).

Mesmo quando desenvolvem metabolismo autotrófico, a associação da orquídea com o fungo se faz necessária principalmente para obtenção de minerais, tais como fósforo e nitrogênio, sendo possível evidenciar a transferência de carbono da planta para o fungo e pelo fornecimento da nutrição necessária para a germinação das sementes, isso se deve ao fato das sementes de orquídeas não possuírem endosperma para apoiar a germinação (Clay & Hardy, 2006; Cameron et al. 2007; 2008). Dessa forma a associação fungo – orquídea se torna essencial para o crescimento, desenvolvimento e germinação da planta (Dearnaley & Le Brocque, 2006).

Esse tipo de associação mutualística não deve ser negligenciada, principalmente entre orquídeas epífitas e os fungos, uma vez que essa associação é vital para a germinação das sementes das orquídeas e o estabelecimento da população dessas plantas (Arditti et al., 1990; Brundrett, 2002; Smith & Read, 2008; Dearnaley et al., 2012; McCormick & Jacquemyn, 2014). O fungo desenvolve uma hifa que penetra na célula vegetal e forma os pelotões, que são áreas em que os nutrientes como o açúcar e compostos inorgânicos são trocados nas orquídeas jovens (Dearnaley & Le Brocque, 2006).

A maioria dos estudos feitos com fungos associados a orquídeas se concentram na parte inferior da plantas (raíz), pouco se sabe sobre os endófitos nos tecidos vegetais aéreos e seu papel no estabelecimento e crescimento da orquídea. Estudos realizados em outras famílias de plantas revelaram que fungos endofíticos associados, conferiram benefícios subestimados à planta hospedeira (Herre et al., 2007). Dessa forma, podemos concluir que a frequência, a diversidade e o papel ecológico entre os fungos endofíticos e as orquídeas permanecem amplamente obscuros (Bayman & Otero 2006).

Como mostrou Ma et al. (2015) na sua revisão, pouco são os trabalhos realizados com fungos endofíticos em folhas de orquídeas (Porto Rico - Bayman et al., 1997; Argentina – Sebastian et al., 2014; China – Tao et al., 2008; Kasmir et al. 2011; Índia – Bougoure et al., 2005; Índia - Behera et al. 2013; China – Chen et al., 2011; China – Yuan et al., 2009; Índia – Sawmya et al., 2013; Índia – Sudheep et al., 2012), apenas cerca de 200 gêneros de orquídeas foram investigados em relação a sua diversidade de fungos endofíticos não micorrízicos.

Mesmo existindo poucos estudos sobre essa associação, em alguns trabalhos foram observados que vários compostos de fungos endofíticos da família das orquídeas demonstraram ter propriedades antimicrobianas, antitumorais, anti-inflamatórias e antivirais (Singh et al., 2012). Carvalho et al. (2012) relataram o forte potencial de extratos brutos de fungos endofíticos e extratos vegetais brutos de espécimes de *Stryphnodendron adstringens* contra células de câncer e fungos e bactérias patógenos de humanos.

2.4.4 Fungos endofíticos em Araceae

A família Araceae tem um alto grau de importância, sendo considerada, economicamente, a terceira família botânica mais importante (Diniz, 2020). Ainda assim há uma escassez de trabalhos relacionando a diversidade dos fungos endofíticos com a família Araceae. Não existindo trabalhos relacionando a diversidade e a prospecção molecular desses organismos em associação com a família Araceae nos Brejos de Altitude.

Geralmente os trabalhos que abordam a associação fungo endofítico - Araceae foram realizados nas regiões tropicais como mostra (Oliveira, 2014), que estudou a diversidade de fungos endofíticos em folhas de *Cocos nucifera*.

Na sua maioria os estudos que contemplam os fungos endofíticos e a família Araceae são relacionados a produção enzimática dos fungos associados as plantas, uma vez que os fungos endofíticos são grandes produtores de metabólitos secundários.

Koulen, 2011 afirma em seu trabalho que estudos relacionados ao metabolismo secundário desses fungos ainda são escassos. E Diniz, 2020, estudando a produção de enzimas da espécie *Oenocarpus bacaba* afirma não haver estudos envolvendo a comunidade endofítica relacionada a essa espécie da família Araceae.

Há muito o que ser estudado sobre essa associação tão importante, pois como observado trabalhos relacionados a fungos endofíticos e a família Araceae são mínimos, mesmo a família araceae sendo uma família economicamente importante.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREAS DE ESTUDO

O trabalho foi realizado em duas áreas de Brejo de Altitude localizadas em Pernambuco (Serra do Contente e Mata da Chuva) (Figura 2).

A RPPN Serra do Contente localiza-se no Planalto da Borborema no município de Gravatá a 85 km do Recife, é um Brejo de altitude que apresenta aproximadamente nove hectares e atinge cerca de 700 m de altitude. O clima de Gravatá é considerado tropical com verão seco, a temperatura média anual é de 22 °C, com mínimas chegando a 15 °C nos meses mais frios, enquanto na época mais quente as temperaturas máximas podem chegar a 30 °C. A precipitação média anual é de 725 mm, com chuvas concentradas entre março e julho, sendo julho o mês de maior precipitação, com média de 108 mm (Siqueira-filho & Machado, 2001).

A Mata da Chuva (08°32'20"S e 35°43'22"W) situa-se no município de Bonito, em uma região conhecida como Serra dos Macacos. O município localiza-se a cerca de 140 km da cidade do Recife e está no Agreste do estado de Pernambuco. A precipitação média anual é de 1.157 mm, a temperatura média anual de 21,5 °C e a umidade relativa do ar fica em torno de 40-70 % (Sudene, 1990).

Figura 2 - Mata da Serra do Contente - Gravatá (A) e Mata da Chuva – Bonito (B), Pernambuco.



Fonte: Camila Melo, 2020.

3.2 COLETA DO MATERIAL

No período de agosto a setembro/2018 ocorreu uma visita em cada área. As coletas foram realizadas em plantas maduras e saudáveis de Araceae e Orchidaceae (Tabela 1) ao longo da trilha dentro da mata. Foram coletados de nove a 10 indivíduos por área, com distância mínima de cinco metros entre os mesmos. Foram retiradas três folhas aleatoriamente, de cada indivíduo, acondicionadas em sacos de papel devidamente etiquetados, e transportadas ao Laboratório I do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, para manipulação, no tempo máximo de 24 horas.

Tabela 1 - Espécies de Araceae e Orchidaceae coletadas na Serra do Contente - Gravatá e na Mata da Chuva - Bonito, Pernambuco.

	Araceae		Orchidaceae	
	Mata da Chuva	Serra do Contente	Mata da Chuva	Serra do Contente
Ponto 1	<i>Anthurium scandens</i>	<i>Mostera adansonii</i>	-	<i>Gomesa basbata</i>
Ponto 2	<i>Mostera adansonii</i>	<i>Anthurium scandens</i>	<i>Dichaea panamensis</i>	<i>Gomesa basbata</i>
Ponto 3	<i>Caladium bicolor</i>	<i>Caladium bicolor</i>	<i>Epidendrum cinnabarinum</i>	<i>Scaphyglottis sickii</i>
Ponto 4	<i>Anthurium scandens</i>	<i>Anthurium scandens</i>	<i>Gomesa basbata</i>	<i>Gomesa basbata</i>
Ponto 5	<i>Mostera adansonii</i>	<i>Mostera adansonii</i>	<i>Epidendrum sp.</i>	<i>Scaphyglottis sickii</i>

3.3 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Após a coleta do material, as folhas foram lavadas em água corrente para a remoção da poeira e outros resíduos e depois submetidas à técnica de desinfestação para eliminação dos micro-organismos epifíticos. A técnica que foi utilizada está descrita em Araújo et al. (2002), que consiste na imersão, em câmara asséptica, das folhas em etanol 70% por 30 segundos, em hipoclorito de sódio (3% de cloro ativo) por 1,5 minutos e três lavagens em água destilada, esterilizada. Após a desinfestação de cada folha, foram retirados seis discos contendo 6 mm cada (Gamboa et al., 2002). Esses discos foliares foram distribuídos sobre o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) acrescido de cloranfenicol (100 µg/mL), contido em placas de Petri e incubado a temperatura ambiente ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) por até 30 dias. O controle da eficiência de desinfestação foi confirmado pela inoculação de 1 mL da última água de lavagem em placas de Petri com o mesmo meio de cultura. Após crescimento das colônias, fragmentos das mesmas foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio BDA.

3.4 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

3.4.1 Caracterização morfológica

A identificação morfológica dos fungos isolados foi realizada a partir das observações das características macroscópicas e microscópicas das colônias puras dos fungos endofíticos. A identificação foi realizada utilizando literatura específica (Ellis, 1971, 1976; Carmichael et al., 1980; Sutton, 1980; Domsch et al., 1980; entre outros).

3.4.2 Caracterização molecular

3.4.2.1 Extração de DNA dos fungos endofíticos

A biomassa dos fungos endofíticos foi obtida a partir de culturas desenvolvidas em BDA em placas de Petri, mantidas a 28 °C por até seis dias. Todo micélio foi retirado da placa com o auxílio de uma alça de platina, sendo o material transferido para microtubos de 2 mL com tampa de rosca, acrescidos de 0,5 g de contas de vidro (glass beads) com dois diâmetros diferentes 150-212 µm e 425-600 µm, na proporção de 1:1 respectivamente. O material fúngico foi triturado por agitação em alta velocidade em um agitador tipo FastPrep (Oliveira et al., 2014).

A extração do DNA genômico foi realizada, com o material previamente triturado, conforme Góes-Neto et al. (2005), que inclui homogeneização do material em tampão CTAB 2% e uma lavagem com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), além de precipitação em isopropanol, lavagem em etanol 70% e ressuspensão em 50 µL de água ultrapura.

3.4.2.2 Amplificação e sequenciamento

Para amplificação da região ITS foram utilizados os primers ITS1 e ITS4 (White et al., 1990). Os parâmetros para amplificação e as concentrações dos reagentes (dNTPs, cloreto de magnésio, Taq DNA polimerase e tampão de reação) foram os mesmos descritos por Oliveira et al. (2014). Controles negativos, contendo todos os componentes exceto DNA dos fungos estudados, foram utilizados em cada procedimento para detectar possíveis contaminações.

Os produtos das reações de PCR (5 µL) foram visualizados sob luz UV, a partir de gel de agarose 1%, corado com GelRed. Os produtos de amplificação foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, Wisconsin, USA), seguindo as instruções do fabricante, e encaminhados para a plataforma de sequenciamento do Centro de Biociências da UFPE.

As sequências obtidas foram submetidas a comparação com o banco de dados do

NCBI a partir da utilização do BLASTn para uma identificação preliminar dos fungos isolados.

3.4.2.3 Análise filogenética

As sequências obtidas foram alinhadas com outras recuperadas do GenBank com o auxílio do programa MEGA versão 5.05 (Tamura et al., 2007). A caracterização molecular final foi realizada com a avaliação filogenética e construção de árvores, utilizando análises bayesiana (1×10^6 gerações) e de máxima verossimilhança (1.000 bootstraps), utilizando os programas MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) e PhyML (Guindon & Gascuel, 2003), respectivamente, executados a partir do programa Topali 2.5 (Milneet et al., 2004). O modelo de substituição nucleotídica foi estimado usando Topali 2.5.

3.5 ÍNDICES ECOLÓGICOS

A diversidade de fungos endofíticos foi estimada utilizando o índice de Shannon-Weiner (H'). A diferença entre as médias do índice de diversidade foi avaliada utilizando a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas utilizando o teste de Tukey ($P < 0,05$). A riqueza de espécies foi quantificada como o número de espécies observadas de acordo com a identificação morfológica e análises filogenéticas. Para o cálculo da frequência relativa (Fr), o número de isolados de cada espécie foi dividido pelo número total de isolados, sendo expressa em termos percentuais (Bezerra et al., 2013). Curvas de acumulação foram realizadas para indicar se o número de unidades amostrais foi suficiente para capturar totalmente a riqueza de espécies para cada planta, utilizando funções do pacote do R 'iNEXT' (Hsieh et al., 2016). O estimador Jackknife de primeira ordem (Jackknife1) foi calculado utilizando a função `specpool` do pacote `Vegan` no software estatístico R (<http://www.R-project.org>). O escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS), utilizando o coeficiente de dissimilaridade de Bray-Curtis, foi realizado para visualizar a composição da comunidade de fungos endofíticos entre os Brejos de Altitude e entre as famílias das plantas estudadas. Todas as análises foram realizadas no software estatístico R (<http://www.R-project.org>).

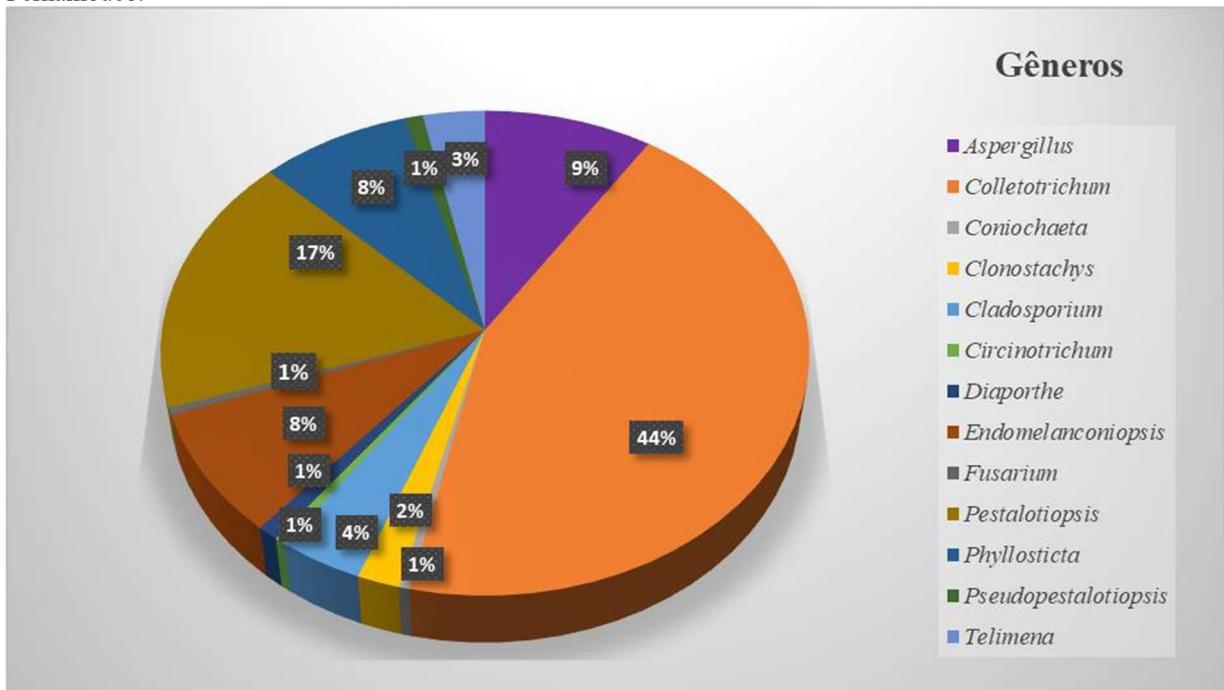
4 RESULTADOS

4.1 DIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Foram isolados 214 fungos endofíticos a partir de 360 discos foliares de Orchidaceae e

Araceae pertencentes a 13 gêneros e 21 espécies. Dentre os gêneros isolados os que tiveram maior representatividade foram *Colletotrichum* (44%), *Pestalotiopsis* (17%) e *Aspergillus* (9%) (Figura 3).

Figura 3 - Gêneros isolados em folhas de Orchidaceae e Araceae coletadas nos municípios de Gravatá e Bonito, Pernambuco.



Fonte: Camila Melo, 2020.

Dos 214 espécimes de fungos endofíticos que ocorreram no presente trabalho, as espécies mais frequentes foram representadas por *Pestalotiopsis* sp., *Colletotrichum* sp. 7 *Aspergillus* sp. e *Colletotrichum* sp. 2 (Tabela 2).

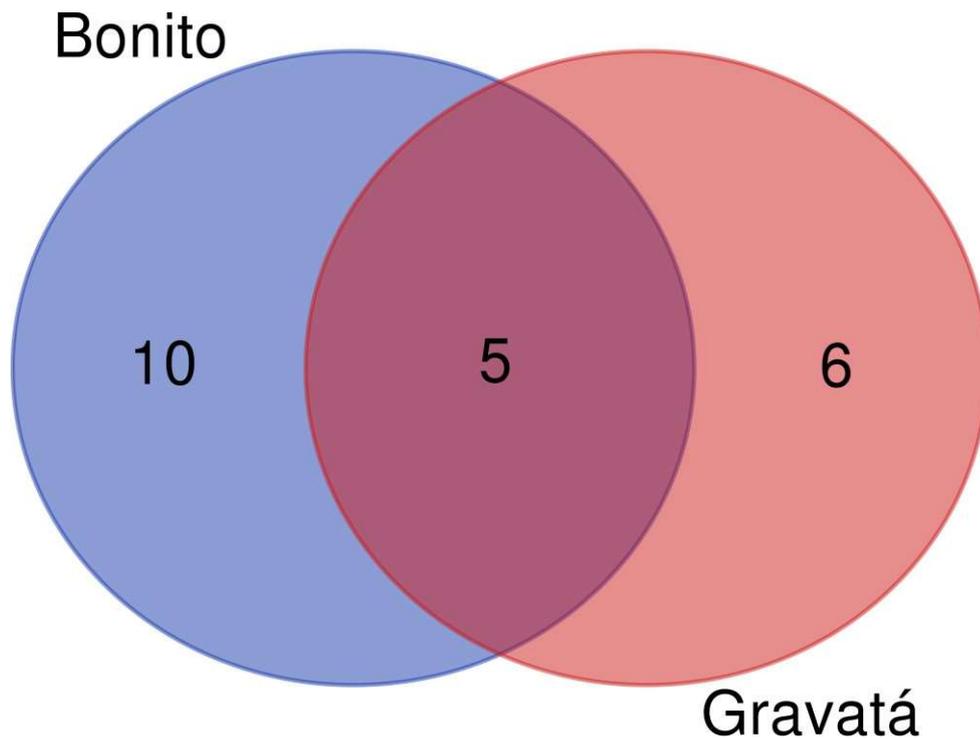
Tabela 2 - Fungos endofíticos isolados das famílias Araceae e Orchidaceae da Serra do Contente (Gravatá) e da Mata da Chuva (Bonito), Pernambuco.

Espécies	GRAVATÁ										BONITO										N	Fr %
	Araceae					Orchidaceae					Araceae					Orchidaceae						
	M/A	AS	CB	AS	MA	GB	GB	SS	GB	SS	AS	MA	CB	AS	MA	DP	EC	GB	E sp.			
<i>Aspegillus</i> sp.	-	-	3	-	3	3	3	3	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19	8,88	
<i>Colletotrichum</i> sp. 1	-	-	-	2	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	2,34	
<i>Colletotrichum</i> sp. 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	8	-	5	1	1	-	-	-	-	18	8,41	
<i>Colletotrichum</i> sp. 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	4	3	-	-	-	-	11	5,14	
<i>Colletotrichum</i> sp. 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	8	-	5	1	1	-	-	-	-	18	8,41	
<i>Colletotrichum</i> sp. 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	4	9	4,21	
<i>Colletotrichum</i> sp. 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	2	8	3,74	
<i>Colletotrichum</i> sp. 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4	2	3	2	4	3	-	22	10,2	
<i>Coniochaeta</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47	
<i>Clonostachys rosea</i>	1	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1,87	
<i>Cladosporium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	6	8	3,74	
<i>Circinotrichum papakurae</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47	
<i>Diaporthe</i> sp.	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	2	0,93	
<i>Endomelanconiopsis endophytica</i>	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	7	1	-	-	-	-	17	7,94	
<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,47	
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	8	3	-	-	-	-	-	-	10	4	2	3	1	2	3	-	-	-	-	36	16,8	
<i>Phyllosticta fallopiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	2	-	3	4	1	2	17	7,94	
<i>Pseudopestalotiopsis theae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	2	0,93	
Sordariomycetes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	0,47	
<i>Telimena</i> sp.	1	3	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	3,27	
Xylariaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	-	2	2	-	-	-	-	7	3,27	
Total de isolados																				214		

(MA) *Monstera adansonii*; (AS) *Anthurium scandens*; (CB) *Caladium bicolor*; (GB) *Gomesa barbata*; (SS) *Scaphyglottis sickii*; (DP) *Dichaea panamensis*; (EC) *Epidendrum cinnabarinum*; (E sp.) *Epidendrum* sp.; (N) Número de Isolados; (Fr) Frequência de ocorrência.

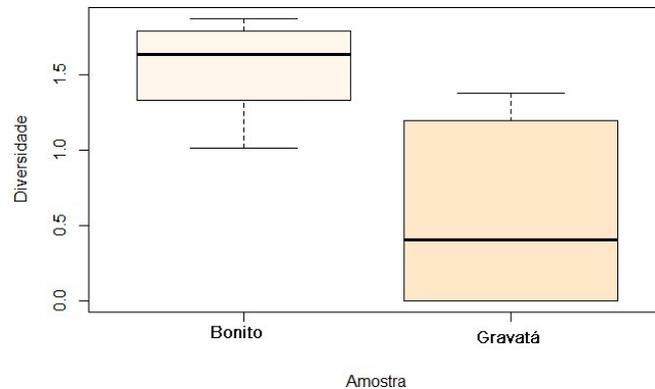
O diagrama Venn, que ilustra o compartilhamento de táxons de fungos entre as áreas de estudos, revelou que apenas cinco espécies, *Colletotrichum* sp. 2, *Colletotrichum* sp. 4, *Diaporthe* sp., *Endomelanconiopsis endophytica*, *Pestalotiopsis* sp., foram comuns entre as áreas Mata da Chuva – Bonito e Serra do Contente – Gravatá (Figura 4).

Figura 4 - Diagrama de Venn indicando o número de espécies comuns entre as áreas Mata da Chuva – Bonito e Serra do Contente – Gravatá.



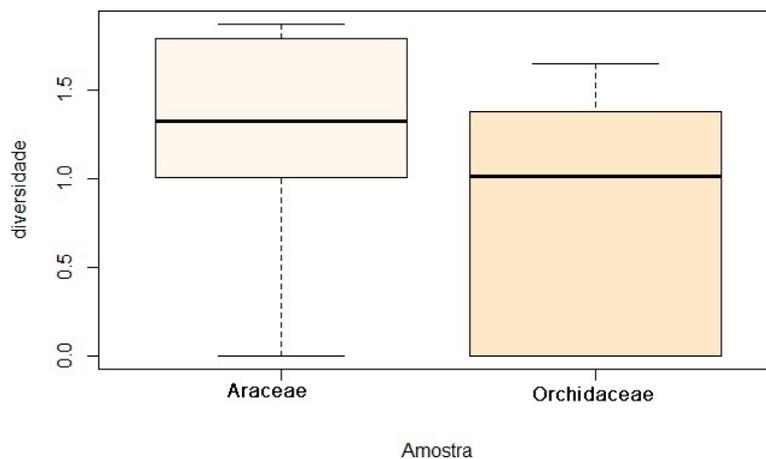
Estatisticamente o índice Shannon-Wiener (H') revelou diferenças significativas na diversidade de fungo endofíticos entre as áreas estudadas (Figura 5), entretanto quando comparamos a diversidade de fungos entre as famílias Araceae e Orchidaceae não houve diferenças significativa (Figura 6).

Figura 5 - Índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') de fungos endofíticos encontrados nas áreas Mata da Chuva – Bonito e Serra do Contente - Gravatá (Tukey ao nível de $P < 0,05$).



Fonte: Camila Melo, 2020.

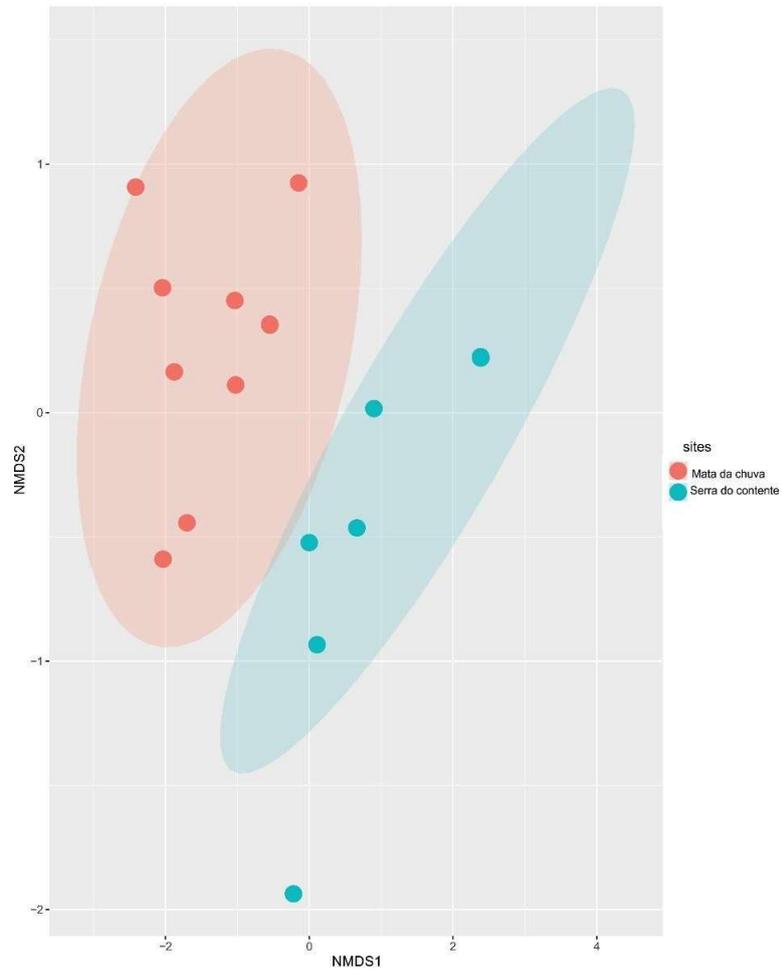
Figura 6 - Índice de diversidade de Shannon-Wiener (H') de fungos endofíticos encontrados nas famílias Araceae e Orchidaceae (Tukey ao nível de $P < 0,05$).



Fonte: Camila melo, 2020.

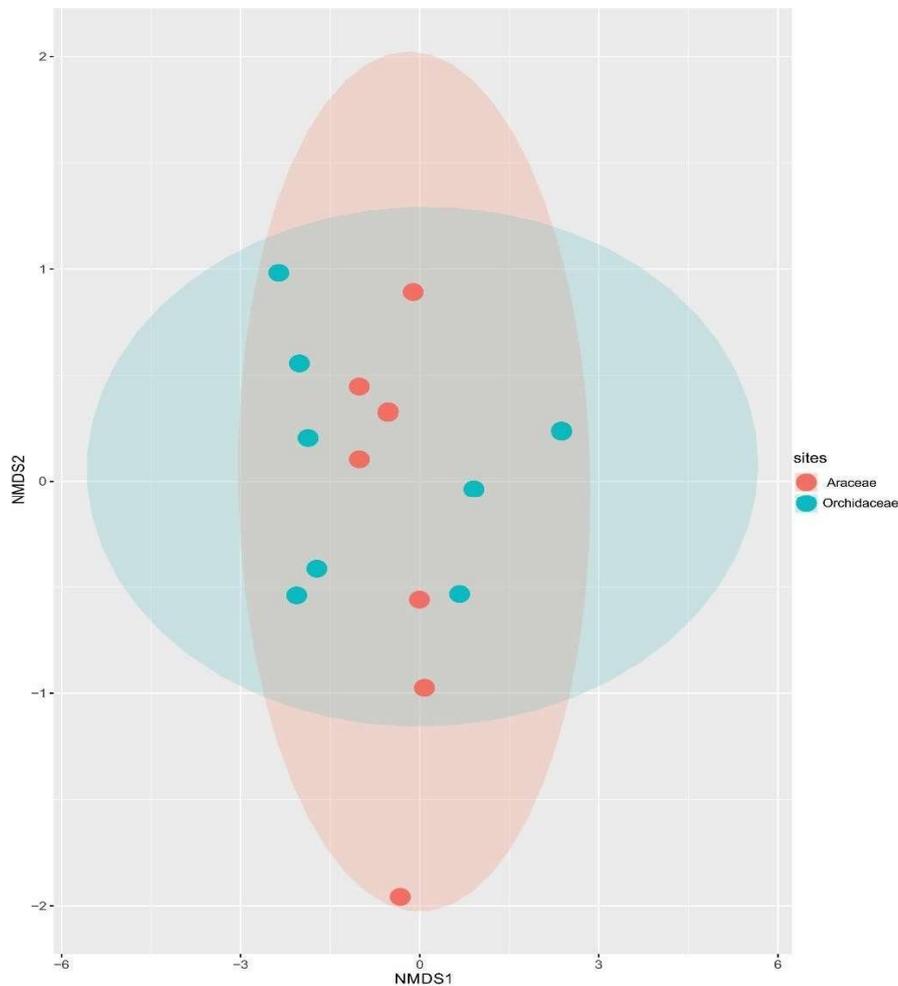
A partir da análise de NMDS foi possível observar que a composição da comunidade de fungos endofíticos na Mata da Chuva (Bonito) é diferente daquela encontrada na Serra do Contente (Gravatá) (Figura 7). Sugerindo que as diferentes condições ambientais estão influenciando a composição da comunidade de fungos endofíticos. Porém, a análise de NMDS demonstrou que as comunidades de fungos endofíticos são semelhantes entre as diferentes famílias (Araceae e Orchidaceae) (Figura 8).

Figura 7 - Escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) das comunidades de fungos endofíticos nas áreas da Serra do Contente em Gravata e Mata da Chuva em Bonito, Pernambuco.



Fonte: Camila Melo, 2020.

Figura 8 - Escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) das comunidades de fungos endofíticos nas famílias Araceae e Orchidaceae.



Fonte: Camila Melo, 2020.

4.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FOLHAS DE ARACEAE E ORCHIDACEAE NA SERRA DO CONTENTE EM GRAVATÁ

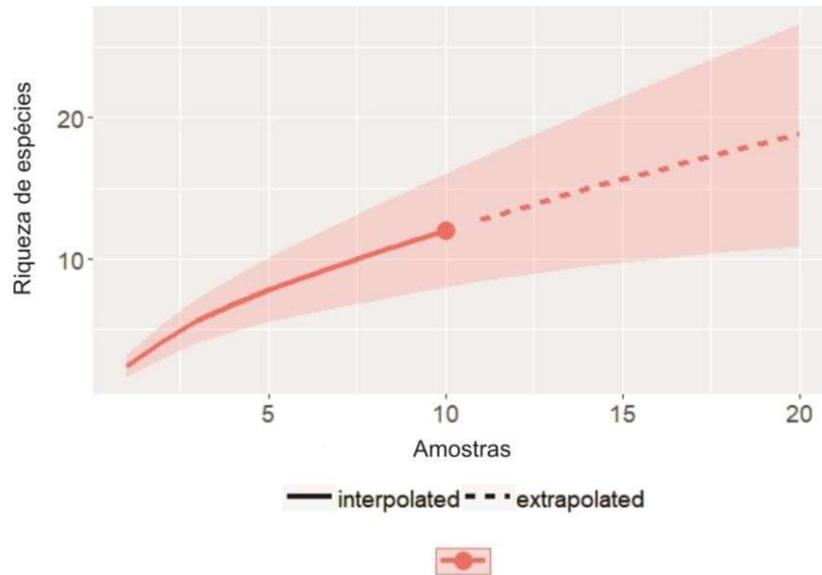
Do total de endófitos isolados, 77 foram encontrados nas plantas coletadas na Serra do Contente (Gravatá), sendo 40 recuperados de folhas de Araceae e 37 de folhas de Orchidaceae (Tabela 2). A riqueza de espécies foi maior em Araceae (8 espécies), enquanto em Orchidaceae foram encontrados seis espécies de fungos endofíticos.

Dos isolados encontrados em folhas de Araceae destacam-se, pela maior ocorrência, os táxons *Pestalotiopsis* sp., *Endomelanconiopsis endophytica* e *Telimena* sp., respectivamente. Entre os fungos isolados em folhas de Orchidaceae, foram mais frequentes os táxons *Pestalotiopsis* sp. e *Aspergillus* sp. respectivamente.

De acordo com a curva de acumulação de espécies a assíntota não foi atingida, indicando que o número total de espécies esperada não foi encontrado, ou seja, a riqueza continuaria a aumentar

com um maior número de amostras (Figura 9). Com base no Jackknife de primeira ordem (Jackknife 1), a riqueza estimada foi de 19 táxons, no entanto apenas 11 espécies foram recuperadas no presente estudo, correspondendo a 57%.

Figura 9 - Curva de acumulação de espécies de fungos endofíticos em relação ao número de amostras na Serra do Contente (Gravatá), Pernambuco.



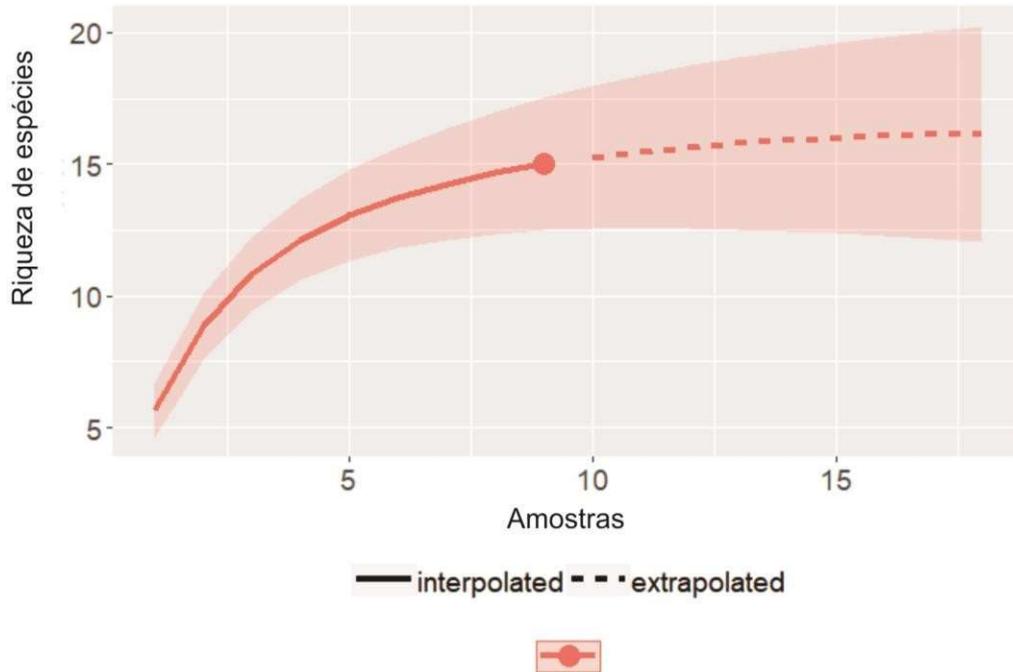
Fonte: Camila Melo, 2020.

4.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FOLHAS DE ARACEAE E ORCHIDACEAE NA MATA DA CHUVA EM BONITO

137 espécimes de fungos endofíticos foram obtidos na Mata da Chuva (Bonito), sendo 89 isolados de folhas de Araceae e 48 em folhas de Orchidaceae (Tabela 2). Dos táxons isolados, destacaram-se como os mais frequentes *Colletotrichum* sp. 7, *Phyllosticta fallopiae*, *Colletotrichum* sp. 2 e *Colletotrichum* sp. 4, respectivamente. As espécies *Colletotrichum* sp. 2, *Colletotrichum* sp. 4 e *Colletotrichum* sp. 7 foram as mais frequentes em folhas de Araceae, em folhas de Orchidaceae destacaram-se, como os mais frequentes, os taxons *Phyllosticta fallopiae* e *Colletotrichum* sp. 7, respectivamente. Entre as famílias de plantas estudadas em Bonito, apenas duas espécies foram compartilhadas (*Colletotrichum* sp. 7 e *Phyllosticta fallopiae*).

A curva de acumulação de espécies para a Mata da Chuva (Bonito) não atingiu a assíntota, indicando que o número total de espécies esperadas não foi encontrado, isso sugere que a riqueza continuaria a aumentar com um maior esforço amostral (Figura 10). Com base no índice Jackknife 1 a riqueza estimada foi de 17 espécies, no entanto foram recuperados 15 táxons, 82% da riqueza estimada.

Figura 10 - Curva de acumulação de espécies de fungos endofíticos em relação ao número de amostras na Mata da Chuva – Bonito.



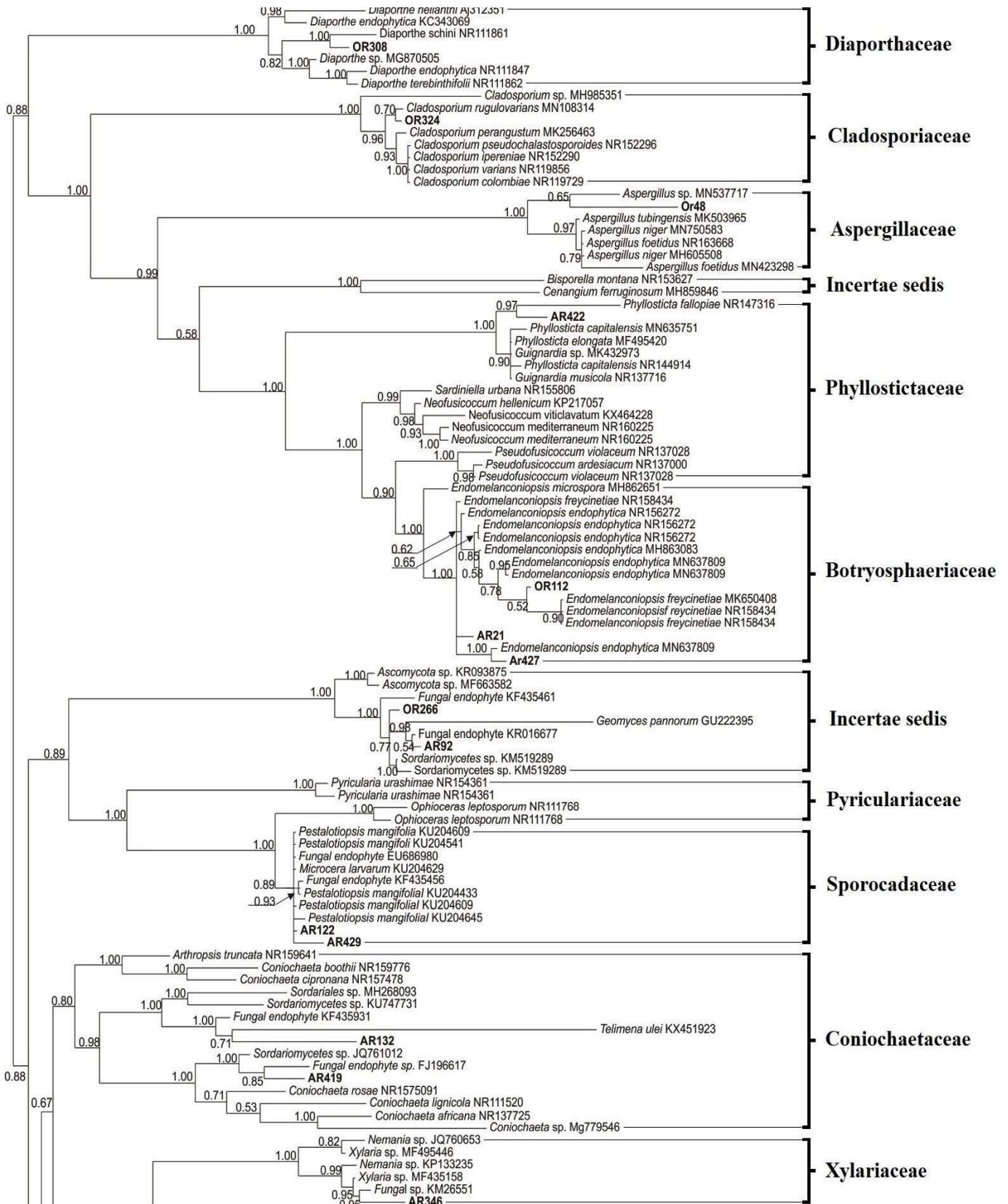
Fonte: Camila Melo, 2020.

4.4 ANÁLISE MOLECULAR DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

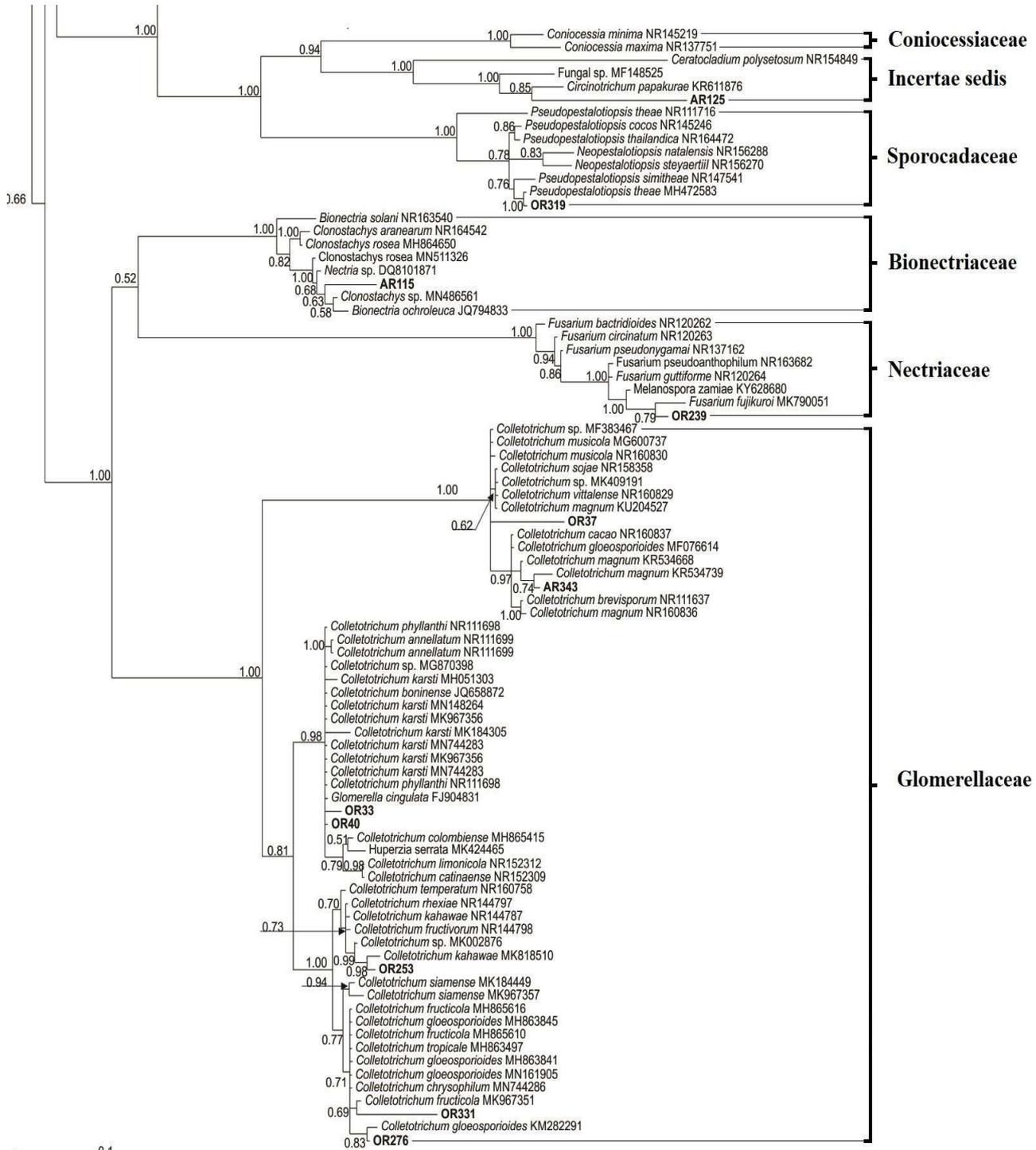
Foi realizada a análise das sequências do ITS rDNA das espécies de fungos endofíticos isolados de folhas de Aracea e Orchidaceae, a partir da busca por máxima identidade, realizada com a utilização do programa Blastn. As sequências foram comparadas com outras do banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para auxílio na identificação das mesmas.

Foi construída uma árvore filogenética com as sequências obtidas no presente estudo, onde é mostrado o agrupamento dos isolados com sequências de espécies depositadas no NCBI (**Figura 11**). Os isolados se agruparam em 14 famílias: Diaporthaceae, Cladosporiaceae, Aspergillaceae, Phyllostictaceae, Botryosphaeriaceae, Pyriculariaceae, Sporocadaceae, Coniochaetaceae, Xylariaceae, Conioceciaceae, Sporocadaceae, Bionectriaceae, Nectriaceae e Glomerellaceae.

Figura 11 - Filograma obtido a partir de análise bayesiana de sequências da região ITS do rDNA, mostrando o posicionamento de fungos endófitos isolados das Famílias Araceae e Ochidaceae, nas áreas de estudo.



Continuação - Filograma obtido a partir de análise bayesiana de seqüências da região ITS do rDNA, mostrando o posicionamento de fungos endófitos isolados das Famílias Araceae e Ochidaceae, nas áreas de estudo.



Fonte: Camila Melo, 2020.

Glomerellaceae foi a família mais representativa, sete isolados (Or331, Ar343, Or253, Or276, Or37, Or33 e Or40) agruparam-se com o gênero *Colletotrichum*. Foi obtido um isolado, Ar 346, pertencente a família Xylariaceae, infelizmente a identificação deste isolado não foi possível para categorias inferiores a família. Em Botriosphaeriaceae três isolados, Or112, Ar21 e Ar27

agruparam-se com representantes de *Endomelaconipsis*. O isolado Ar115 pertence à família Bionectriaceae formou um clado próximo com *Clonostachys* e gêneros relacionados. A família Aspergillaceae foi representada por um isolado, Or48, que foi identificado morfológicamente e filogeneticamente como *Aspergillus* sp.

Os isolados Ar122 e Ar429 foram identificados morfológicamente e filogeneticamente como *Pestalotiopsis mangifolia*. A família Coniochaetaceae foi representada por dois isolados, Ar132 que filogeneticamente agrupou-se com o gênero *Telimena* e Ar419 que agrupou-se com o gênero *Coniochaeta*. Os isolados Or266 e Ar92 não apresentaram estruturas reprodutivas, sendo classificados como Mycelia sterilia, as análises moleculares permitiram a identificação até o nível da classe Sordariomycetes.

O isolado Or308, pertencente à família Diaporthaceae, foi identificado morfológicamente como *Diaporthe* sp., e filogeneticamente o isolado agrupou-se com sequências de *Diaporthe schini*. Os isolados Or324, Ar125 e Or239 formaram agrupamentos filogenéticos com sequências dos gêneros *Cladosporium*, *Circinotrichum* e *Fusarium* respectivamente. Os isolados Ar422 e Or319 foram identificados morfológicamente e filogeneticamente como *Phyllosticta fallopie* e *Pseudopestalotiopsis theae*, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

Foram inoculados mais de 300 discos foliares de Araceae e Orchidaceae em meio de cultura, dos quais, 214 endófitos fúngicos foram isolados. Vários estudos, em regiões tropicais, mostram resultados similares ao presente estudo, dentre eles, Pádua et al. (2019) trabalhando em Brejos de Altitude em Pernambuco encontraram 152 isolados e 11 gêneros. Godinho et al. (2019) na Serra da Mantiqueira em Minas Gerais obtiveram 65 isolados e 13 gêneros. Em outro estudo, Arnold; Lutzoni, (2007) relataram 21 táxons isolados em floresta tropical úmida em Barro Colorado Island, Panamá. Neste cenário - Brejos de Altitude, uma floresta úmida no meio da floresta seca (Caatinga) - é um ecossistema favorável para a manutenção de uma comunidade diversificada de fungos endofíticos (Pádua et. al., 2019).

Estudos envolvendo fungos endofíticos em hospedeiros pertencentes à família Orchidaceae ainda são escassos. Juan Chen et al. (2011) na China, encontraram 401 endófitos pertencentes a 19 gêneros em espécies de Orchidaceae consideradas medicinais. No entanto, no presente estudo, para a família Orchidaceae, 85 endófitos pertencentes a oito gêneros foram encontrados. Possivelmente com mais coletas e mais áreas de estudos seria possível encontrar outras espécies e até táxons nunca descritos para ciência.

Entre os gêneros identificados, *Colletotrichum* e *Pestalotiopsis* tiveram um maior destaque

por serem considerados os gêneros com a maior ocorrência para o presente estudo, são gêneros normalmente observados como fungos endofíticos em diversas espécies de plantas (Larran et al., 2002; Baayen et al., 2002; Glienke-Blanco et al., 2002; Hata et al., 2002; Santamaria ; Bayman 2005; Chareprasert et al., 2006; Wang et al., 2007; Rakotoniriana et al., 2008; Xing et al., 2010; Juan Chen et al., 2011). Esses gêneros também foram relatados por Pádua et al. (2019) estudando a diversidade de fungos endofíticos em cactáceas em Brejo de altitude de Pernambuco. Em um estudo realizado em uma floresta temperada no Japão, Hata et al. (2002) consideraram espécies de *Colletotrichum* como a maioria dos endófitos comuns. Os representantes desses grupos (*Colletotrichum* e *Pestalotiopsis*) são comumente relatados como endófitos de plantas medicinais, plantas economicamente importantes, plantas endêmicas, naturais e invasoras (Gautam, 2014). Isolados desses gêneros também são encontrados causando várias doenças em plantas de interesse econômico e ecológico tais como plantas frutíferas, produtoras de grãos e cereais, plantas ornamentais e florestais (Bezerra et al., 2017a; Dissanayake et al., 2017; Guarnaccia et al., 2017).

Com apenas três isolados, o gênero *Diaporthe* é considerado um dos gêneros com menor ocorrência para o estudo. Por outro lado, no estudo realizado por Pádua et al. (2019) espécies de *Diaporthe* foram encontradas com maior frequência em folhas de *Myracrodruon urundeuva* em áreas de Brejos de Altitude quando comparado com áreas de Caatinga. Já em estudos realizados em ambientes secos, espécies desse gênero são incessantemente relatadas como endófitos de vários tipos plantas (Murali et al., 2007; Gomes et al., 2013; Bezerra et al., 2017a).

Dentre os isolados encontrados, alguns são de representantes pertencentes a gêneros frequentemente registrados como endófitos, sendo também conhecidos como produtores de compostos e enzimas importantes na indústria farmacêutica e agrônômica. Dentre eles podemos citar: *Cladosporium* e *Diaporthe* que produzem compostos antimicrobianos e compostos anticancerígenos (Ding et al., 2008; Lin et al., 2005; Kumaran; Hur, 2009); e *Paraconiothyrium*, o qual produz Brefeldin A, substância com propriedades antifúngicas, antivirais e anticancerígenas (Khan et al., 2012). *Cladosporium* é um táxon conhecido por produzir compostos antimicrobianos, esses organismos geralmente são isolados do ar, solo, grãos, plantas, dentre outros substratos (Vieira et al., 2006; Ding et al., 2008). Moricca et al. (2001), estudando *Cladosporium* em culturas de feijão, relataram o gênero como um endófito com potencial promissor no controle biológico.

Segundo Rampelotto et al. (2013), mais relevante do que uma grande diversidade é a variedade da composição da comunidade microbiana. De acordo com a análise de composição de espécies (MNDS), do presente estudo, houve diferença na composição da comunidade fúngica entre as áreas, porém quando realizada a análise entre as famílias estudadas a composição fúngica se sobrepôs. Esses resultados indicam que há uma alta diversidade de fungos endofíticos associados às

famílias das plantas estudadas, ocorrendo maior influência da área de coleta, quando em comparação com os hospedeiros botânicos estudados. É possível observar no estudo de Pádua et al. (2019) que a composição das comunidades dos fungos endofíticos é fortemente influenciada pelo tipo de ecossistema, quando comparando fungos endofíticos isolados de Brejo de Altitude e Caatinga. Isso se deve ao fato de que a diversidade de fungos endofíticos pode ser influenciada por diversos fatores bióticos e abióticos, tais como: tipo de hospedeiro, mudanças de clima e vegetação local (Nascimento et al., 2015; Koide et al., 2017). Além disso, as curvas de acumulação obtidas neste estudo mostraram que a comunidade de fungos endofíticos não foi recuperada na sua totalidade. Arnold & Lutzoni, (2007), estudando a ocorrência de fungos endofíticos na floresta tropical úmida e Pádua et al. (2019) estudando esses organismos em Brejos de Altitude de Pernambuco, também demonstraram a dificuldade no isolamento e esporulação de algumas das espécies de fungos endofíticos encontradas.

Há uma escassez de estudos com o objetivo de investigar a diversidade de endófitos nas regiões de Brejo de Altitude, limitando-se a alguns trabalhos com dados introdutórios (Bezerra et al., 2012; 2013; 2017a; b; c; Freire et al., 2015; Pires, 2015; Santos et al., 2015a). Contudo, estudos realizados nas famílias Araceae e Orchidaceae, as quais tem importância ornamental e econômica, têm gerado vários trabalhos (Lorenzi; Souza, 2001; Pedralli, 2002). Ainda não há estudos sobre a associação de fungos endofíticos nos Brejos de Altitude em nenhuma espécie da família Araceae, e para a família Orchidaceae poucos são os relatos para endófitos de folhas. Dessa forma, este estudo torna-se pioneiro sobre diversidade de endófitos, ao menos para a família Araceae em Brejos de Altitude.

No presente estudo foram reportados 214 isolados, pertencentes a 21 espécies de fungos endofíticos nas folhas de representantes das famílias Araceae e Orchidaceae em dois Brejos de Altitude de Pernambuco (Serra do Contente em Gravatá e Mata da Chuva em Bonito), o que contribui para o conhecimento da diversidade desses fungos nesse ecossistema. Esse resultado mostra uma rica comunidade de fungos endofíticos isolados de espécies dessas plantas. Praticamente não existem trabalhos sobre a ocorrência de fungos endofíticos nos Brejos de Altitude, principalmente considerando estudos envolvendo prospecção molecular desses organismos. Com relação à biodiversidade desses micro-organismos, o Brasil possui ainda um grande potencial a ser explorado, tanto para plantas nativas e endêmicas, quanto para aquelas já tradicionalmente cultivadas (Azevedo & Araújo, 2007).

6 CONCLUSÃO

- Houve diferença na comunidade fúngica entre as áreas;

- A comunidade de fungos endofíticos não variou de acordo com as famílias das plantas estudadas;
- Coletas adicionais das folhas das plantas devem ser realizadas para que a riqueza esperada de fungos endofíticos seja alcançada;
- A análise molecular dos fungos endofíticos, confirmou grande parte da identificação morfológica, contribuindo na identificação dos táxons encontrados;
- *Coniochaeta* sp. é uma nova espécie de fungo para ciência;
- Estudos sobre a ocorrência de fungos endofíticos nos Brejos de Altitude são muito importantes, tendo em vista que não há praticamente trabalhos nessas áreas, principalmente considerando trabalhos envolvendo prospecção molecular desses organismos.

REFERÊNCIAS

- Almeida, R.T., D.S. Pimentel & E.M.C. Silva. **The red-handed howling monkey in the state of Pernambuco, north-east Brazil.** Neotropical Primates 3:174-176, 1995.
- Alurappa, Ramesha et al. **Produção de fungos endofíticos e metabólitos bioativos: uma atualização. In: Biotecnologia microbiana .** Springer, Singapura. p. 455-482. 2018.
- Andrade, L. A., Oliveira, F. X., Nascimento, I. S., Fabricante, J. R., Sampaio, E. V., & Barbosa, M. R. **Análise florística e estrutural de matas ciliares ocorrentes em brejo de altitude no município de Areia, Paraíba.** Revista Brasileira de Ciências Agrárias, 1(1), 31-40, 2006.
- Andrade-lima, D. **Present day forest refuges in Northeastern Brazil.** Pp. 245-254, in: PRANCE, G.T. (ed.). Biological Diversification in the Tropics. Columbia University Press, New York, 1982.
- Araújo Filho, J.C.; Burgos, N.; Lopes, O.F.; Silva, F.H.B.; Medeiros, L.A.R.; Mélo Filho, H.F.R.; Silva, F.B.R.; Leite, A.P.; Santos, J.C.P.; Sousa Neto, N.C.; Silva, A.B.; Luz, L.R.Q.P.; Lima, P.C.; Reis, R.M.G.; Barros, A.H.C. **Levantamento de reconhecimento de baixa e média intensidade dos solos do estado de Pernambuco.** Recife: Embrapa Solos – UEP Recife; Rio de Janeiro: Embrapa Solos. 252p, 2000.
- Araújo, Welington L.; Marcon, Joelma; Maccheroni JR., Walter; Elsas, Jan Drik van; Vuurde, Jim; Azevedo, João Lúcio. **Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants.** Applied and environmental microbiology, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.
- Arditti J, Ernst R, Yam TW, Glabe C. **The contributions of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review.** Lindleyana 5:249–255, 1990.
- Arnold, A.E., Mejía L.C., Kyllö, D.A., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N.A., Herre, E.A. **Fungal Endophytes Limit Pathogen Damage in a Tropical Tree.** Proceedings of the National Academy of Sciences 100: 15649-15654, 2003.
- Arnold, A. E., & Lutzoni, F. **Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots?.** Ecology, 88(3), 541-549. 2007.
- Araújo Filho, J.C.; Burgos, N.; LopeS, O.F.; Silva, F.H.B.; Medeiros, L.A.R.; Mélo Filho, H.F.R.; Silva, F.B.R.; Leite, A.P.; Santos, J.C.P.; Sousa Neto, N.C.; Silva, A.B.; Luz, L.R.Q.P.; Lima, P.C.; Reis, R.M.G.; Barros, A.H.C. **Levantamento de reconhecimento de baixa e média intensidade dos solos do estado de Pernambuco.** Recife: Embrapa Solos – UEP Recife; Rio de Janeiro: Embrapa Solos. 252p. 2000.

- Azevedo, J.L. **Microrganismos endofíticos.** In: Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds.) **Ecologia microbiana. Jaguariúna:** Embrapa-CNPMA, pp.117-137, 1999.
- Azevedo, J. L.; Araújo, W. L. **Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. Fungi: multifaceted microbes.** CRC press, Boca Raton, p. 189-207, 2007.
- Azevedo, João Lúcio. **Microrganismos endofíticos. Ecologia microbiana,** p. 117-137, 1998.
- Baayen RP, Bonants PJM, Verkley G, Carroll GC, van der Aa HA, de Weerd M, van Brouwershaven IR, Schutte GC, Maccheroni W Jr, Glienke de Blanco C, Azevedo JL. **Non pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*).** *Phytopathology* 92:464–477. 2002.
- Barbosa, M. R. V. et al. **Diversidade florística na Mata do Pau-Ferro, Areia, Paraíba.** In: Pôrto, K. C. et al. (Org.). *Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba: história natural, ecologia e conservação.* Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, p. 111-122, 2004.
- Barreto, D. W.; Parente, J.P. **Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochilum*.** *Carbohydr Polymer,* v.64, p.287-291, 2006.
- Barros, F., Vinhos, F., Rodrigues, V.T., Barberena, F.F.V.A., Fraga, C.N., Pessoa, E.M, Forster, W., Menini Neto, L., Furtado, S.G., Nardy, C., Azevedo, C.O. & Guimarães, L.R.S. **Orchidaceae In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro,** Rio de Janeiro. BFG.2015. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* 66: 1085-1113, 2015.
- Bataghin FA, Barros F, Pires JSR. **Distribuição da comunidade de epífitos vasculares em sítios sob diferentes graus de perturbação na Floresta Nacional do Ipanema, São Paulo, Brasil.** *Revista Brasileira de Botânica* 33: 501-512. 2010.
- Bayman, P., Lebron, LL, Tremblay, RL e Lodge, JD. **Varição em fungos endofíticos de raízes e folhas de *Lepanthes* (Orchidaceae).** *New Phytol.* 135, 143-149, 1997.
- Bayman, Paul; Otero, J. Tupac. **Microbial endophytes of orchid roots.** In: *Microbial root endophytes.* Springer, Berlin, Heidelberg, p. 153-177, 2006.
- Behera, D., Tayung, K. e Mohapatra, UB. **PCR-based identification of endophytes from three orchid species collected from Similipal Biosphere Reserve, India.** *Índia. Sou. Int. J. Res. Formal Appl.* 3 (1), 10-17, 2013.
- Bezerra, J. D., Santos, M. G., Barbosa, R. N., Svedese, V. M., Lima, D. M., Fernandes, M. J. S., ... & Souza-Motta, C. M. **Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study.** *Symbiosis* 60: 53-63. 2012. 2013.

- Bezerra, J. D., Nascimento, C. C., Barbosa, R. D. N., da Silva, D. C., Svedese, V. M., Silva-Nogueira, E. B., ... & Souza-Motta, C. M. **Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential.** Brazilian Journal of Microbiology, 46(1), 49-57. 2015.
- Bezerra, J. D. P., de Azevedo, J. L., & Souza-Motta, C. M. **Why study endophytic fungal community associated with cacti species?.** In Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics (pp. 21-35). Springer, Cham. 2017a.
- Bezerra, J. D., Sandoval-Denis, M., Paiva, L. M., Silva, G. A., Groenewald, J. Z., Souza-Motta, C. M., & Crous, P. W. **New endophytic *Toxico cladosporium* species from cacti in Brazil, and description of *Neocladosporium* gen. nov.** IMA fungus, 8(1), 77. 2017b.
- Bezerra, J. D., Oliveira, R. J., Paiva, L. M., Silva, G. A., Groenewald, J. Z., Crous, P. W., & Souza-Motta, C. M. **Bezerromycetales and Wiesneriomycetales ord. nov. (class Dothideomycetes), with two novel generato accommodate endophytic fungi from Brazilian cactus.** Mycological progress, 16(4), 297-309. 2017c.
- Bougoure, JJ, Bougoure, DS, Cairney, JWG; Dearnaley, JDW. **ITS-RFLP e análise de sequência de endófitos de *Acianthus*, *Caladenia* e *Pteroslylis* (Orchidaceae) no sudeste de Queensland, Austrália.** Mycol. Res. 109 (4), 452-460, 2005.
- Boyce, P. C.; Croat, T. B. **The Überlist of Araceae: totals for published and estimated number of species in aroid genera.** Acesso em, 2019, 2.02: 2015.
- Brundrett MC. **Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants.** New Phytol 154:275–304, 2002.
- Brustulin, Jacqueline; Schmitt, Jairo Lizandro. **Composição florística, distribuição vertical e floração de orquídeas epifíticas em três parques municipais do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.** Pesquisas, Botânica, v. 59, p. 143-158, 2008.
- C. Clay, and J.Hardy, **Orchid Society.** 3, 42, 2006.
- Cameron, Kenneth M. **Molecular phylogenetics of Orchidaceae: the first decade of DNA sequencing.** Memoirs-New York Botanical Garden, v. 95, p. 163, 2007.
- Cantuária, P. C.; Freitas, J. L.; Silva, R. B. L.; Cantuaria, M. F. Junior, F. C.; Ribeiro, F. M. B.; Barros, F.; Santos, J. U. M. **Percepção ambiental e da família Orchidaceae por moradores da área de proteção ambiental da Fazendinha, Amapá, Brasil.** Biota Amazônia, v. 5, n. 2, p. 76-83. Macapá, 2015.
- Cardoso, J. C., & Israel, M. **Levantamento de espécies da família Orchidaceae em Águas de Sta. Bárbara (SP) e seu cultivo.** Horticultura Brasileira, 23(2), 169-173, 2005.

- Carroll, G.C. **The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials.** In: Fokkema, N.J.; Heavel, J.; Van der, H. (eds.) *Microbiology of the phylloplane.* London, Cambridge University Press, pp.205-222. 1986.
- Carvalho, Camila R. et al. **The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah.** *Symbiosis*, v. 57, n. 2, p. 95-107, 2012.
- Cervi, A. C.; Borgo, M. **Epífitos Vasculares no Parque Nacional do Iguçu, Paraná (Brasil). Levantamento Preliminar.** *Fontqueria*, Madrid, v. 55, n. 51, p. 415-422, 2007.
- Chareprasert S, Piapukiew J, Thienhirun S, Whalley AJS, Sihanonth P. **Endophytic fungi of teakleaves *Tectonagrandis* L. andrain tree leaves *Samaneasaman*Merr.** *World J Microbiol Biotechnol* 22:481–486. 2006.
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Barret, R.L. & Freudenstein, J.V. **DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification.** In *Orchid conservation* (K.W. Dixon, S.P. Kell, R.L. Barrett & P.J. Cribb, eds.). Natural History Publications, Sabah. p. 69-89, 2003.
- Chao Dai, Wei Gu. **p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis.** *Trends Mol Med.* November ; 16(11): 528–536, 2010.
- Chen, Y.; Liu, Y.; Jiang, J.; Zhang, Y.; Yin, B., **Dendronone, a new phenanthrenequinone from *Dendrobium cariniferum*.** *Food Chemistry*, v. 111,p11-12, 2008.
- Chen, J., Hu, KX, Hou, XQ; Guo, SX. **Endophytic fungi assemblages from 10 *Dendrobium* medicinal plants (Orchidaceae).** *Mundo J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 1009-1016, 2011.
- Coelho, M.A.N.; Sakuragui, C.M.; Gonçalves, E.G.; Temponi, L.G. & Valadares, R.T. *Araceae: Stehmann, J.R.; Forzza, R.C.; Salino, A.; Sobral, M.; Costa, D.P. & Kamino, L.H.Y. (eds.). Plantas da Floresta Atlântica. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Pp. 141-145, 2009.*
- Coelho, M. A. N. **Flora of the canga of Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Araceae.** *Rodriguésia*, 69(1), 25-40, 2018.
- Coimbra-Filho, A.F. & I.G. Câmara. **Os limites originais do bioma mata Atlântica na região Nordeste do Brasil.** FBCN, Rio de Janeiro, 1996.
- Croat, T.B. **The ecology and life forms of Araceae.** *Aroideana*, 11(3-4): 4-56. 1990.
- Croat, T.B. **History and current status of systematic research with Araceae.** *Aroideana*, v.21, p. 26- 145.1998.

- Cruz-Miranda, OL, Folch-Mallol, J., Martínez-Morales, F., Gesto-Borroto, R., Villarreal, ML, & Taketa, AC. **Identificação de um fungo endofítico produtor de Huperzine A de *Phlegmariurus taxifolius***. *Molecular Biology Reports* , 47 (1), 489-495. 2020
- da Silva Santos, M. G., Pereira Bezerra, J. D., Svedese, V. M., Sousa, M. A., Vasconcelos da Silva, D. C., Cavalcanti Maciel, M. D. H., ... & de Souza-Motta, C. M. **Screening of endophytic fungi from cactos of the Brazilian tropical dry forest according to their L-asparaginase activity**. *Sydowia* 67: 147-156.2015.
- Dahlgren, R. M. T.; Clifford, H. T. & Yeo, P. F. **The Families of the Monocotyledons**. Springer Verlag. Berlin, 1985.
- Dearnaley, J., & Le Brocq, A. **Endophytic fungi associated with Australian orchids**. *Australas. Plant Conserv.* 15(2), 7–9, 2006.
- Dearnaley JDW, Martos F, Selosse MA. **Orchid mycorrhizas: molecular ecology, physiology, evolution and conservation aspects**. In: Hock B (ed) *Fungal associations*. Springer, Berlin, pp 207–230, 2012.
- Dettke, G., A.; Orfrini, A., C.; Milaneze-Gutierrez, M., A. **Composição florística e distribuição de epífitas vasculares em um remanescente alterado de Floresta Estacional Semidecidual no Paraná, Brasil**. *Rodriguésia*, p. 859-872, 2008.
- Dias, I.S., I.G. Câmara& C.F. Lino. **Workshop Mata Atlântica: problemas, diretrizes e estratégias de conservação**.Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo, 1990.
- Ding, L.; Qin, S.; LI, F.; Chi, X.; Laatsch, H. **Isolation, Antimicrobial activity, and metabolites of fungus *Cladosporium* sp. Associated with red alga *Porphyrayezoensis***. *Current Microbiology*, v. 56, n. 3, p. 229-235, 2008.
- Dissanayake A, Phillips A, Hyde K, Yan JY, Li XH. **The current status of species in *Diaporthe***. *Mycosphere* 8: 1106-1156.2017.
- Dislich, R; Mantovani, W. **A flora de epífitas vasculares da reserva da cidade universitária" Armando de Salles Oliveira"(São Paulo, Brasil)**. *Boletim de Botânica da universidade de são Paulo*, p. 61-83, 1998.
- Diniz, F. V., Lima, Y. D. M. M., da Paz, F. S., da Silva, A. L. D., Gomes, L. C., Santos, G. S., & Carvalho, C. M. **Atividade enzimática de fungos endofíticos de bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.)**. *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, 10(3), 7-11. 2020.
- Dressler, R. L. **Phylogeny and classification of the Orchid Family**, Dioscorides Press, Portland. 314p, 1993.

- Domsch, K. H.; GAMS, W.; Anderson, T. H. **Compendium of soil fungi**. Volume 1. Academic press, London, 1980.
- Ellis, M.B. et al. **Dematiaceous hyphomycetes**. Commonwealth Mycological Institute, Kew. P. 608. England. 1971.
- Ellis, M.B. More Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew. England 507. 1976.
- Fan, C.; Wang, W.; Wang, Y.; Qin, G.; Zhao, W. **Chemical constituents from *Dendrobium densiflorum***. *Phytochemistry*, v.57 p.1255-1258, 2001.
- Farouk, H. M.; Attia, E., Z.; El-Katatny, M., H. **Produção de enzima hidrolítica de fungos endofíticos isolados de soja (*Glycine max*)**. *Journal of Modern Research* , v. 2, n. 1, pág. 1-7, 2020.
- Flora do Brasil 2020. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/>. Acesso em 08/01/2020
- Freire, K. T. L. S., Araújo, G. R., Bezerra, J. D. P., Barbosa, R. N., Silva, D. C. V., Svedese, V. M., ... & Souza-Motta, C. M. **Fungos endofíticos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae) sadia e infestada por *Dactylopius opuntiae* (Cockerell, 1896) (Hemiptera: Dactylopiidae)**. *Gaia scientia*, 9(2), 104-11.2015.
- Gautam, A.K. **The genera *Colletotrichum*: an incitant of numerous new plant diseases in India**. *Journal on New Biological Reports* v, 3 n.1, p. 09-21 2014.
- Glienke-Blanco C, Aguilar-Vildoso CI, Vieira MLCV, Barroso PAV, Azevedo JL. **Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants**. *Genet Mol Biol* 25:251–255. 2002.
- Godinho, B. T. V., Santos, Í. A. F. M., Gomes, E. A., Piccoli, R. H., & Cardoso, P. G. **Endophytic fungi community in *Eremanthus erythropappus* tree from anthropogenic and natural areas of Minas Gerais**. *Cerne*, 25(3), 283-293, 2019.
- Góes-Neto, A.; Loguercio-Leite, C.; Guerrero, R.T. **DNA extraction from frozen fieldcollected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods**. *Biotemas*, v. 18, n. 2, p. 19-32, 2005.
- Gomes RR, Glienke C, Videira SIR, Lombard L, Groenewald JZ, Crous PW. ***Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi**. *Persoonia* 31: 1-41.2013.
- Gonçalves, E.G. **Araceae no Distrito Federal In: Cavalcanti Tb e Batista Mf. Flora do Distrito Federal, Brasil**. EMBRAPA. 8: 57-78.2010.

- Govaerts, R., Frodin, D.G., Bogner, J., Boyce, P., Cosgriff, B., Croat, T.B., Gonçalves, E.G., Grayum, M.H., Hay, A., Hettterscheid, W., Landolt, E., Mayo, S.J., Murata, J., Nguyen, V.D., Sakuragui, C.M., Singh, Y., Thompson, S. & Zhu, G. (continuously updated). **World checklist of Araceae (and Acoraceae)**. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew, 2011.
- Guarnaccia, V., Groenewald, J. Z., Li, H., Glienke, C., Carstens, E., Hattingh, V. & Crous, P. W. **First report of *Phyllosticta citricarpa* and description of two new species, *P. paracapitalensis* and *P. paracitricarpa*, from citrus in Europe**. *Studies in mycology*, 87, 161-185. 2017.
- Guindon, Stéphane; Gascuel, Olivier. **Um algoritmo simples, rápido e preciso para estimar grandes filogenias por máxima verossimilhança**. *Biologia Sistemática*, v. 52, n. 5, pág. 696-704, 2003.
- Guo, B., Wang, Y., Dimingo, X., Tang, K. **Starting from products natural bioativos endophytes: a revision**. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 44 (2): 153-8, 2008.
- Hata K, Atari R, Sone K. **Isolation of endophytic fungi from leaves of *Pasaniaedulis* and their with in-leaf distributions**. *Mycoscience* 43:369–373.2002.
- Hatamzadeh, Sareh et al. **Isolation and identification of L-asparaginase-producing endophytic fungi from the Asteraceae family plant species of Iran**. *PeerJ*, v. 8, p. e8309, 2020.
- Herre EA, Mejia LC, Kyllö DA, Rojas E, Maynard Z, Butler A, Van Bael AS. **Implicações ecológicas dos efeitos antipatógenos de endófitos e micorrizas fúngicas tropicais**. *Ecology* 88: 550–558. 2007.
- Hoehne, F.C. **Iconografia de Orchidaceas do Brasil**. Instituto de Botânica de São Paulo. 601 p, 1949.
- Hsieh, TC; MA, KH; Chao, Anne. **iNEXT: um pacote R para rarefação e extrapolação da diversidade de espécies (números H III)**. *Métodos em Ecologia e Evolução*, v. 7, n. 12, pág. 1451-1456, 2016.
- Hyde, K.D.; Soyong, K. **The fungal endophyte dilemma**. *Fungal Diversity*, v. 33, p. 163-173, 2008.
- H.X. Liu, Y.B. Luo, H. Liu. **Studies of mycorrhizal fungi of Chinese orchids and their role in orchid conservation in China—a review**, *Bot. Rev.* 76, 241–262, 2010.
- H.N. Rasmussen. **Terrestrial Orchids: from Seed to Mycotrophic Plant**, Cambridge University press, Cambridge, 1995.
- I. Ovando, A. Damon, R. Bello, D. Ambrosio, V. Albores, L. Adriano, M. Salvador. **Isolation of endophytic fungi and their mycorrhizal potential for the tropical epiphytic orchids**

- Cattleya skinneri*, *C. aurantiaca* and *Brassavola nodosa*, Asian J. Plant Sci. 4, 309–315, 2005.
- Isaeva, O. V., Glushakova, A. M., Garbuz, S. A., Kachalkin, A. V., & Chernov, I. Y. Biology bulletin, 37(1), 26-34. 2010.
- Joppa, L. N.; Roberts, D. L.; Pimm, S. **L.How many species of flowering plants are there? Proceedings of the Royal Society, Biological Sciences**, v. 278, p. 554-559, 2011.
- Kasmir, J., Senthilkumar, SR, Britto, SJL e Raj, JM. **Identificação de endófitos fúngicos de membros de Orchidaceae com base na região nrITS (espaçador interno transcrito)**. Int. Res. J. Biotechnol, 2 (6), 139-144, 2011.
- Kersten, R., de A.; Silva, S., M. **Composição florística e estrutura do componente epifítico vascular em floresta da planície litorânea na Ilha do Mel, Paraná, Brasil**. Brazilian Journal of Botany, v. 24, n. 2, p. 213-226, 2001.
- Khan, A.L.; Hamayun, M.; Hussain, J.; Kang, S.; Lee, I. **The new ly isolated endophytic fungus *Paraconiothyrium* sp. LK1 produces ascotoxin**. Molecules, v. 17, n. 1, p. 1103-1112, 2012.
- Krahl H. A.; Krah D.R.P.; Valsko J.J.; Holanda A.S.S.; Etringer-Junior H.; Nascimento J.W. **Polinização em orquídeas brasileiras**. Natureza on line 13(3): 128-133.2015.
- Krohn, K., Flörke, U., Rao, M. S., Steingröver, K., Aust, H. J., Draeger, S., & Schulz, B. **Metabolites from fungi 15. New isocoumarins from an endophytic fungus isolated from the Canadian thistle *Cirsium arvense***. Natural product letters, 15(5), 353-361, 2001.
- Koide, R. T., Ricks, K. D., & Davis, E. R. **Climate and dispersal influence the structure of leaf fungal endophyte communities of *Quercus gambelii* in the eastern Great Basin, USA**. Fungalecology, 30, 19-28. 2017.
- Koulen, H. H. F. **Metabolismo secundário de fungos Endofíticos associados às plantas *strychnos cf. toxifera* (loganiaceae) e *mauritia flexuosa* (arecaceae)**. 2011.
- Kumaran, R.S.; Hur, B.K. **Screening of species of the endophytic fungus *Phomopsis* for the production of the anticancer drug taxol**. Biotechnology and Applied Biochemistry, v. 54, n. 1, p. 21-30, 2009.
- Kvist, L. P., Christensen, S. B., Rasmussen, H. B., Mejia, K., & Gonzalez, A. **Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis**. Journal of ethnopharmacology, 106(3), 390-402, 2006.
- Larran, S., Rollán, C., Ángeles, H.B., Alippi, H.E., M.I. Urrutia, M.I. **Endophytic fungi in healthy soybean leaves**. Investimento na Agricultura e Proteção Vegetal 17 (1): 173-178.2002.

- Larran S, Perello' A, Simo'n MR, Moreno V. **Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves.** World J Microbiol Biotechnol 18:683–686.2002.
- Lima, A.R.F. & A.O. Cavalcanti. **Estudo sobre a posição dos brejos no sistema Pernambucano.** R. Pernam. Desenv., v. 2 (1):Jan/Jun 1975. Recife, 1975.
- Lima, A.R. & J.P.R. Capobianco. **Mata Atlântica: avanços legais e institucionais para a sua conservação.** Documentos ISA nº 4, Instituto Ambiental, São Paulo, 1997.
- Lin, X; Huang, Y; Fang, M; Wang, J; Zheng, Z; SU, W. **Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungi, *Diaporthe* sp.** FEMS Microbiology Letters, v. 251, n. 1, p. 53-58, 2005.
- Lins, R.C. **As áreas de exceção do agreste de Pernambuco.** Sudene, Recife.1989.
- Lorenzi, H. S.; Souza, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil.** 3 ed. 835 p. Nova Odessa: Ed. Plantarum Ltda.2001.
- Lorenzi, H.& Moreira de Souza, H. **Botânica Sistemática, São Paulo:** Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.
- López Camacho, R., Navarro López, J. A., Montero González, M. I., Amaya Vecht, K., Rodríguez Castañeda, M., & Polania Barboza, A. **Manual de identificación de especies no maderables del corregimiento de Tarapacá, Colombia** (No. Doc. 22098) CO-BAC, Bogotá), 2006.
- Ma X, Kang J, Nonachaiyapoom S, Wen T, Hyde KD. **Non mycorrhizal endophytic fungi from orchids.** Special section: Endophyte. Current Science 108, 1–16, 2015.
- Machado, W.J. **Composição florística e estrutura da vegetação em área de caatinga e Brejo de Altitude na Serra da Guia, Poço Redondo, Sergipe, Brasil.** Dissertação de Mestrado em Ecologia e Conservação 84 f. Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2011.
- McCormick MK, Jacquemyn H. **What constrains the distribution of orchid populations?** New Phytol 202:392–400, 2014.
- Mahendran, G.; BAI, V.N. **Mass propagation of *Satyrium nepalense* D.Don. –A medicinal orchid via seed culture.** Scientia Horticulturae, v.119, p.203-207, 2009.
- Maor, R., Haskin, S., Levi-Kedmi, H., & Sharon, A. **In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*.** Appl. Environ. Microbiol., 70(3), 1852-1854, 2004.
- Mayo, S.J.; Bogner, J. & Boyce, P.C. **The genera of Araceae.** Royal Botanic Gardens, Kew. 370p, 1997.
- Medeiros, J. F. de. **Da análise sistêmica à Serra de Martins: contribuição teórico-metodológica aos brejos de altitude.** 2016. 219f. Tese (Doutorado em Geografia) - Centro de Ciências

Humanas, Letras e Artes, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

- Menini Neto, Luiz; Almeida, Valquiria Rezende; Forzza, Rafaela Campostrini. **A família Orchidaceae na Reserva Biológica da Represa do Gramma-Descoberto, Minas Gerais, Brasil.** Rodriguésia, v. 55, n. 84, p. 137-156, 2004.
- Meneguice, B.; Oliveira, R. B. D.; Faria, R. T. **Propagação vegetativa de Epidendrum ibaguense Lindl. (Orchidaceae) em substratos alternativos ao xaxim.** Semina: Ciências Agrárias, v. 25, n. 2, p. 101-106, 2004.
- MICRO, S. B. D. A. À., & EMPRESAS-SEBRAE, E. P. (2015). **Flores e plantas ornamentais do Brasil: volume 1-o mercado brasileiro de flores e plantas ornamentais.** Brasília, DF: SEBRAE.
- Milliken, W. **Traditional antimalarial medicine in Roraima, Brazil.** Economic Botany, v.51, n.3, p.212- 237, 1997a. MILLIKEN, W. **Plants for malaria plants for fever: medicinal species in Latin America -a bibliographic survey.**Kew (UK): Royal Botanic Garden, 1997b.116p.
- Moricca, S. et al. **Antagonism of the two-needle pine stem rust fungi *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini* by *Cladosporium tenuissimum* in vitro and in planta.** Phytopathology, v. 91, n. 5, p. 457-468, 2001.
- Murali TS, Suryanarayanan TS, Venkatesan G. **Fungal endophyte communities in two tropical forests of Southern India: diversity and host affiliation.** MycologicalProgress 6: 191-199. <https://doi.org/10.1007/s11557-007-0540-2>. 2007.
- Nascimento, TL; Oki, Y .; Lima, DMM; Almeida-Cortez, JS; Fernandes, GW; Souza-Motta, CM **Biodiversidade de fungos endofíticos em diferentes idades foliares de *Calotropisprocera* e sua atividade antimicrobiana.** Ecologia Fúngica 14: 79-86, 2015.
- Neto, P.A.S., Azevedo, J.L., Araújo, W.L. **Microrganismos Endofíticos. Interação com plantas e potencial biotecnológico.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento 5 (29),2003.
- Oliveira, R.J.V.; et al. **Corniculariella brasiliensis, a new species of coelomycetes in the rhizosphere of *Caesalpinia echinata* (Fabaceae, Caesalpinioideae) in Brazil.** Phytotaxa, v.178, n. 3, p: 197–204, 2014(a).
- Oliveira, R. J. V. D. **Diversidade e identificação de fungos endofíticos em folhas de *Cocos nucifera*L., em Goiana Pernambuco, com base em morfologia e sequências de rDNA.** (Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco). 2014.
- Oses, R., Valenzuela, S., Freer, J., Baeza, J., & Rodríguez, J. **Evaluation of fungal endophytes for lignocellulolytic enzyme production and wood biodegradation.** International Biodeterioration & Biodegradation, 57(2), 129-135, 2006.

- Pádua, A. P. S. L. D., Freire, K. T. L. D. S., Oliveira, T. G. L. D., Silva, L. F. D., Araújo-Magalhães, G. R., Agamez-Montalvo, G. S., ... & Souza-Motta, C. M. D. **Fungal endophyte diversity in the leaves of the medicinal plant *Myracrodruon urundeuva* in a Brazilian dry tropical forest and their capacity to produce L-asparaginase.** *Acta Botanica Brasilica*, (AHEAD). 2018.
- Pedralli, G. **Dioscoreaceae e Araceae: aspectos taxonômicos, etnobotânicos e espécies nativas com potencial para melhoramento genético.** In: Simpósio Nacional Sobre as Culturas do Inhame e do Taro II, João Pessoa. Resumo, João Pessoa: EMEPA-PB, 2002. v.2, 234 p, 2002.
- Peixoto, G.L.; Martins, S.V.; Silva, A.F.; Silva, E. **Composição florística do componente arbóreo de um trecho de Floresta Atlântica na Área de Proteção Ambiental da Serra da Capoeira Grande, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.** *Acta Botânica Brasilica*, São Paulo, v.18, n.1, p.151-160, 2004.
- Petrini, O. **Fungal endophyte of tree leaves.** In: Andrews, J., Hirano, S.S. (eds.) *Microbial ecology of leaves.* New York, Springer Verlag, pp.179-197, 1991.
- Pires, I. M., Silva, A. V., Santos, M. G. S., Bezerra, J. D. P., Barbosa, R. N., Silva, D. C. V., & Svedese, V. M. **Potencial antibacteriano de fungos endofíticos de cactos da Caatinga, uma floresta tropical seca no Nordeste do Brasil.** *Revista Gaia Scientia* 9: 155-161. 2015.
- Pôrto, K. C., Cabral, J. J., & Tabarelli, M. **Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba. História natural, ecologia e conservação.** Ministério do Meio Ambiente e Universidade Federal do Pernambuco, Brasília, 2004.
- Rakotoniriana EF, Munaut F, Decock C, Randriamampionona D, Iriamboloniaiana M, Rakotomalala T, Rakotonirina EJ, Rabemanantsoa C, Cheuk K, Ratsimamanga SU, Mahillon J, ElJaziri M, Quetin-Leclercq J, Corbisier AM. **Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions with leaves.** *Anton Leeuw Int J G* 93:26–36. 2008.
- Rampelotto, PH; Ferreira, AS; Barboza, ADM; Roesch, LFW. **Alterações na diversidade, abundância e estrutura das comunidades bacterianas do solo na savana brasileira sob diferentes sistemas de uso da terra.** *Ecologia microbiana*. 66, p. 593-607, 2013.
- Ranta, P., T. Blom, J. Niemela, E. Joensuu & M. Siitonen. **The fragmented Atlantic rain forest of Brazil: size, shape and distribution of forest fragments.** *Biodiversity and Conservation* 7:385-403, 1998.
- Rizzini, C.T. **Tratado de fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos.** Âmbito Cultural Edições, Rio de Janeiro. 2 ed. 1997.
- Roberts, D. L.; Dixon, K. W. **Orchids.** *Current Biology*, v.18, p.325-329, 2008.

- Rodal, M.J.N.; Sales, M.F.; Mayo, S.J. **Florestas serranas de Pernambuco: localização e diversidade dos remanescentes dos brejos de altitude**. Recife: Imprensa Universitária, 1998b.
- Rodal, M. J. N., Sales, M. F., Silva, M. J. D., & Silva, A. G. D. **Flora de um Brejo de Altitude na escarpa oriental do planalto da Borborema, PE, Brasil**. Acta Botanica Brasilica, 19(4), 843-858, 2005.
- Rogalski, Juliana M.; Zanin, Elisabete M. **Composição florística de epífitos vasculares no estreito de Augusto César, floresta Estacional Decidual do Rio Uruguai, RS, Brasil**. Brazilian Journal of Botany, v. 26, n. 4, p. 551-556, 2003.
- Ronquist, F.; Huelsenbeck, J.P. **MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models**. Bioinformatics, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.
- Sabóia, F.B.F.; Scudeller, V. V.; Ribeiro, J. E. L. da S. **Lista anotada das Orchidaceae na reserva de desenvolvimento sustentável do Tupé, Manaus-AM**. 27 Biotupé: meio físico, diversidade biológica e sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central. Vol. 2, cap. 10. Pags: 122-133, UEA edições: Manaus, 2009.
- Santamaría J, Bayman P. **Fungal epiphyte and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*)**. MicrobEcol 0:1–8. 2005.
- Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M., & Sullivan, T. J. **Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants**. Annual review of Ecology and Systematics, 29(1), 319-343, 1998.
- Sawmya, K., Vasudevan, TG e Mural, TS. **Endófitos fúngicos de duas espécies de orquídeas - apontam para a especificação de órgãos**. Czech Mycol. 65 (1), 89-101, 2013.
- Sebastian, F., Vanesa, S., Eduardo, F., Graciela, T. e Silvana, S. **Germinação simbiótica de sementes e desenvolvimento de protocormos de *Aa achalensis* Schltr. Uma orquídea terrestre endêmica da Argentina**. Micorriza, 24 (1), 35-43, 2014.
- Silva, Itamara Lima da. **Eventos fenológicos de orquídeas da Ilha da Paciência-Iranduba/AM**. 2018.
- Silva, J. M. C. & Tabarelli, M. **Tree species impoverishment and the future flora of the Atlantic Forest of northeast Brazil**. Nature, v. 404, p. 72-74, 2000.
- Smith SE, Read DJ. **Mycorrhizal symbiosis**. Academic Press, London, 2008.
- Singh, S., Singh, A. K., Kumar, S., Kumar, M., Pandey, P. K., & Singh, M. C. K. **Medicinal properties and uses of orchids: A concise review**. Applied Botany, 52, 11627–11634, 2012.
- Siqueira Filho, J.A. & I.C. Machado. **Biologia reprodutiva de *Canistrum aurantiacum* E. Morren (Bromeliaceae) em remanescente da floresta Atlântica, Nordeste do Brasil**. Acta Botanica Brasilica 15:427-444. 2001.

- Sociedade Nordestina de Ecologia. **Mapeamento da Mata Atlântica, seus ecossistemas associados dos estados da Paraíba e do Rio Grande do Norte: relatório técnico.**São Paulo, 2002.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A.K., Krohn, K. **Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites.** Mycological Research 106 (9): 996-1004, 2002.
- Schulz, B., Boyle, C. **The endophytic continuum.** Mycological Research 109 (6): 661-686, 2005.
- Souza, V.; Lorenzi, H. **Botânica Sistemática.** 2. Ed.2008.
- Specian, V. et al. **Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos.** UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde, v. 16, n. 4, p. 345-51, 2015.
- Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D. **Taxol and Taxane Production by Taxomyces andreanae and Endophytic Fungus of Pacific.** Yew. Science 260: 214-216, 1993.
- Strobel, G., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R.S., Hess, W.M. **Taxol from Pestalotiopsis microspora, an endophytic fungus of Taxus wallachiana.**Microbiology 142: 435-440, 1996.
- SUDENE (Superintendência de Desenvolvimento do Nordeste). **Dados pluviométricos mensais do Nordeste.** Pernambuco. Recife, Série Pluviometria, 6. 1990.
- Sudheep, NM e Sridhar, KR, **Endófitos fúngicos não micorrízicos em duas orquídeas da floresta Kaiga (Ghats Ocidental), Índia.** J. For. Res., 23 (3), 453-460, 2012.
- Tabarelli, M., e Santos, A. M. M. **Uma breve descrição sobre a história natural dos brejos nordestinos.** Brejos de Altitude em Pernambuco e Paraíba, História Natural, Ecologia e Conservação, 9, 17-24. 2004.
- Tao, G., Liu, ZY, Hyde, KD, Liu, XZ e Yu, ZN. **A análise completa do rDNA revela novos fungos e endofíticos em Bletilla ochracea (Orchidaceae).** Fungal Divers, 33, 101-122, 2008.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.** Molecular Biology and Evolution, 24: 1596-1599. 2007.
- Tan, R. X., & Zou, W. X. **Endophytes: a rich source of functional metabolites.** Natural product reports, 18(4), 448-459, 2001.
- Theulen, V. **Conservação dos Brejos de Altitude no Estado de Pernambuco. In Brejos de Altitude em Paraíba e Pernambuco: História Natural, Ecologia e conservação** (K.C. Pôrto, J.J.P. Cabral & M. Tabarelli, eds.). Ministério do Meio ambiente, Brasília. 324 p.
- Juncá, F.A. 2006. Diversidade e uso de hábitat por anfíbios anuros em duas localidades da Mata Atlântica do estado da Bahia.2004.

- Thomas, W.W. Carvalho, A.M.V., Amorim, A. M., Garrison, J. Aebeláez, A.L. **Plant endemism in two forest in Southern Bahia, Brazil.** Biodiversity and Conservation, Dordrecht, v.7, n.3, p.311-322, 1998.
- Tsavkelova, E. A., Klimova, S. Y., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. **Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review.** Applied biochemistry and microbiology, 42(2), 117-126, 2006.
- Tudzynski, B., & Sharon, A. **Biosynthesis, biological role and application of fungal phytohormones.** In Industrial Applications (pp. 183-211). Springer, Berlin, Heidelberg, 2002.
- Vasconcelos Sobrinho, J. **As regiões naturais do Nordeste, o meio e a civilização.** Conselho de Desenvolvimento de Pernambuco, Recife, 1971.
- Veloso, H. P., Rangel-Filho, A. L. R., & Lima, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal.** Ibge, 1991.
- Viana, V.M., A.J. Tabanez & J.L. Batista. **Dynamics and restoration of forest fragments in the Brazilian Atlantic moist forest.** Pp. 351-365, in: Laurance, W.F. & R.O. Bierregaard JR. (eds.) Tropical forest remnants: ecology, management, and conservation of fragmented communitie. The University of Chicago Press, Chicago, 1997.
- Vianna, W.O.; Soares, M.K.M. e Appezzato-da-gloria, B. **Anatomia da raiz escura de *Philodendron bipinnatifidum* Schott (Araceae).** Acta Botanica. Brasilica, v.15, p. 313-320, 2001.
- Vieira, D. G., Silva, R. M. D., Silva, O. F., Fonseca, M. J. D. O., Soares, A. G., & Costa, R. A. **Crescimento in vitro de fungos (*Colletotrichum gloeosporioides* e *Cladosporium cladosporioides*) isolados de frutos do mamoeiro, sob atmosfera controlada e refrigeração.** Revista Brasileira de Fruticultura, 28(3), 387-390. 2006.
- Xing X, Guo S, Fu J. **Biodiversity and distribution of endophytic fungi associated with *Panax quinquefolium* L. cultivated in a forest reserve.** Symbiosis 51:161–166.2010.
- Wang FW, Jiao RH, Cheng AB, Tan SH, Song YC. **Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp.** World J MicrobiolBiotechnol 23:79–83. 2007.
- White, T.J. et al. **Amplification and direct sequencing of fungal rRNA genes for phylogenetics, p 315–322. PCR protocols: a guide to methods and applications.** Academic Press, Inc, New York, NY, 1990.
- Y.L. Yang, P.F. Lai, S.P. Jiang. **Research development in *Dendrobium officinale*,** J. Shandong

Univ. TCM 32 82–85 (in Chinese with English abstract), 2008.

Yuan, ZL, Chen, YC e Yang, Y. **Diversos endófitos fúngicos não micorrízicos que habitam uma orquídea epifítica e medicinal (*Dendrobium nobile*): estimativa e caracterização.** J. Microbiol. Bioteehnol. 25, 295-303, 2009.

Apêndice A – Artigo

Coniochaeta monsterae* sp. nov., (Coniochaetaceae, Coniochaetales): a new endophytic species from Brazil*Abstract**

During an investigation of endophytic fungi on healthy leaves of *Monstera adansonii* in Brazil led to the identification of an interesting fungus. Based on morphological features and phylogenetic analyses of ITS region and the large subunit (LSU) of the nuclear rDNA we propose a new specie, *Coniochaeta monsterae*. This anamorphic species is characterized by Conidiogenous cells phialidic, solitary, straight, cylindrical, lageniform. Conidia biguttulate, ellipsoidal to cylindrical and formation of abundant yeast-like cells.

Keywords: Endophytic; *Coniochaeta*; *Monstera adansonii*.

Introduction

Coniochaetaceae was established to accommodate *Coniochaeta* (Sacc.) Cooke and *Coniochaetidium* (Malloch & Cain, 1971). Currently, only two genera are accepted in Coniochaetaceae, *Barrina* A.W. Ramaley and *Coniochaeta* (Sacc.) Cooke (Huhndorf et al. 2004, García et al. 2006, Wijayawardene et al. 2018). Species belonging to this family are widely distributed and have different modes of nutrition such as saprobes in dung, litter or soil, plant or animal pathogens, rarely in humans and endophytes of various plants. In addition, they are also found in acidic water with high concentrations of heavy metals (Ramaley 1997, Weber 2002, Weber et al. 2002, Huhndorf et al. 2004, García et al. 2006, Kirk et al. 2008, Damm et al. 2010, Khan et al. 2013, Troy et al. 2013, Miller et al. 2014, Vázquez-Campos et al. 2014, Maharachchikumbura et al. 2015, 2016, Wijayawardene et al. 2017).

Coniochaeta (Coniochaetaceae, Coniochaetales, Sordariomycetes, Ascomycota) includes about 100 species (García et al. 2006, Harrington et al. 2019, Phookamsak et al. 2019), was introduced with type species *Coniochaeta ligniaria* (Grev.) Cooke (Cooke 1887). Is characterized by presenting ascomata superficial or semi-immersed. Asci cylindrical, clavate, sub-globose or globose. Ascospores narrowly ellipsoid to fusoid, broadly ellipsoidal to globose, lenticular or cruciform, with rounded to apiculate ends, flattened on one or both sides; one-celled, smooth or pitted; brown to dark brown, olive-greenish to dark olivaceous or black (García et al. 2006). The genus *Lecytophora* (Melin & Nannfeldt 1934), the asexual morph of *Coniochaeta*, is characterized by having colonies colours varying from nearly white to yellowish or orange, salmon-coloured, pink or isabelline; its hyaline hyphae and its mostly intercalary phialides with very short lateral necks, periclinal wall thickening and flaring collarettes (Gams 2000, Weber 2002).

The species of *Coniochaeta* and your anamorphs of *Lecytophora* are isolated from a variety of sources including wood, freshwater and food (Checa et al. 1988, Weber 2002, Raja et al. 2012), human and animal tissue (de Hoog et al. 2000, Perdomo et al. 2013, Troy et al. 2013, Khan et al. 2013), and even uranium mines (Vázquez-Campos et al. 2014). Studies report *Coniochaeta* species establish endophytism with several plants, causing no disease symptoms. Eo et al. (2014) reported several species on ginseng leaves. *Coniochaeta endophytica* was isolated from healthy photosynthetic tissue from *Platyclusus orientalis* (Harrington et al. 2019). While *Coniochaeta ligniaria* was reported in leaves of *Baekkea frutescens* (Kokaew et al. 2011). Other species have been found in tissues of *Dactylis glomerate* and *Euphorbia polycaulis* (Márquez et al. 2007, Nasr et al. 2017). The endophytic species of *Coniochaeta* are also reported as potential producers of

antibacterial and antimicrobial substances (Asgari et al. 2007, Márquez et al. 2007, Rivera-Orduña et al. 2011, Harrington et al. 2019).

During an investigation of endophytic fungi in healthy *Monstera adansonii* leaves in Brazil, an isolate was found that is morphologically and phylogenetically distinct from other known species of *Coniochaeta*. Based on these results, a new species, *Coniochaeta monsterae*, is introduced, illustrated and compared with similar taxa.

Materials and methods

Fungal isolation

Healthy leaves of *Monstera adansonii* Schott. were collected from Ecological Reserve Mucuri (Bonito, Pernambuco, Brazil) (08°32'20"S and 35°43'22"W). The leaves were transported to the laboratory and processed within 24 h. The samples were washed with tap water to remove dust particles from the surface. Discs of size 6 mm were cut from the leaves using a sterile cork perforator, disinfected with 70% alcohol for 30 s and 2% sodium hypochlorite (NaOCl) for 2 min, and washed twice with sterile distilled water to remove the sodium hypochlorite (Araújo et al. 2002; modified). The disinfected discs were plated on malt extract agar (MEA) containing chloramphenicol (50 mg/L) and incubated at room temperature (28 ± 2 °C).

Morphological study

Isolate was cultured on MEA, potato dextrose agar (PDA) and Oatmeal and incubated at 25 °C under daylight conditions for up to 4 weeks. After 2 weeks of incubation, the diameter of the colonies was measured, and its morphology was described. Colony colours on the surface and reverse were assessed according to the colour charts of Rayner (1970). Micromorphological descriptions were obtained via cultures grown for 10 days. At least 15 conidiogenous cells, and 30 conidia were measured to estimate the mean size of those structures. Reference strain is deposited in the URM culture collection (Micoteca URM Profa. Maria Auxiliadora Cavalcanti), and prepared microscope slides are deposited in the URM herbarium (Herbário URM Padre Camille Torrend) at the Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

DNA extraction and amplification

Biomass was obtained from cultures grown on MEA after 7 days at 25 °C. Genomic DNA was extracted using the CTAB method based on the protocol described by Góes-Neto et al. (2005). To amplify the internal transcribed spacer (ITS) region and the large subunit (LSU) of nuclear rDNA, the respective primer pairs ITS1/ITS4 (White et al. 1990) and LR0R/LR5 (Vilgalys and Hester 1990) were used. The PCR conditions described by Oliveira et al. (2014) were followed. The products of DNA extractions and reactions (5 µL) of PCR were visualized under UV light with 1% agarose gel stained with GelRed. Amplification products were purified with the PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen), following the manufacturer's instructions, and sequenced using the Multipurpose DNA Sequencing Platform. Sequence assembly and editing were performed using Pregap4 and Gap4 in the Staden package (Staden et al. 2000) and deposited in GenBank (Table 1).

Phylogenetic analyses

To analyze the phylogenetic relationships of the new species, ITS and LSU nrDNA sequences of members belonging to *Coniochaeta* were obtained from GenBank and aligned with the sequence generated in the present study. The fungal sequences were aligned and edited with MEGA, version 5.05 (Tamura et al. 2007). Prior to phylogenetic analysis, the optimal model of nucleotide substitution was estimated using Topali 2.5 (Milne et al. 2004). Bayesian inference (two runs over 4×10^6 generations with a burn-in of 2500) and maximum likelihood (with support estimated by a

bootstrap analysis with 1000 replicates) analyses were performed, respectively, with MrBayes 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) and PhyML (Guindon and Gascuel, 2003), launched from Topali 2.5.

Results

Topologies of the best phylogenetic tree obtained using the Maximum likelihood analysis and Bayesian inference (Fig. 2) using the combined dataset of ITS and LSU, reveals that the sequence of the new species of *Coniochaeta monsterae* formed distinct clades with other species of group. In the phylogenetic tree the more related sequence of *Coniochaeta monsterae* is *Coniochaeta fasciculata* (CBS 205.38). In the BLASTn analysis of the ITS rDNA sequences, *C. monsterae* is 92,2% similar to *Coniochaeta fasciculata* (CBS 205.38) and regarding analysis of the LSU rDNA sequences they are 99.1 % similar.

Taxonomy

Coniochaeta monsterae sp. nov.

Mycobank:

Etymology: the name refers the host plant, *Monstera adansonii*.

Description on PDA — *Mycelial hyphae* thin septate, simple to branched, hyaline, smoothwalled, guttulate, anastomosis observed, 1.8–2.4 µm. *Conidiogenous cells* lateral, phialidic, solitary, straight, cylindrical, lageniform, 4–7 × 1.8–2.4 µm. Generally wider at the base, becoming thinner toward the apex. *Conidia*, hyaline, smooth-walled, biguttulate, ellipsoidal to cylindrical with round ends or with one end slightly acute, sporulation abundant, variable in size, 2.5–6.2 × 1.8–3 µm; yeast like cells observed frequently. *Chlamydospore* and *sexual* morph not observed.

Culture characteristics — Colonies on PDA reaching 28,7 mm diam. after 2 weeks at 25 °C; amber, circular with regular margin, reverse pale brown yellowish. Colonies on MEA reaching to 34 mm diam. after 2 weeks at 25 °C; white cream turning pale yellow, colony circular with regular margin, reverse pale luteous. On oatmeal agar (OA) reaching to 35 mm diam. after 2 weeks at 25 °C; regular margin, surface and reverse white.

Material examined – Brazil, Pernambuco, Bonito, Ecological Reserve Mucuri, isolated as endophyte from leaves of *Monstera adansonii*, 11 april 2019, C. M. Gonçalves, collector number – ex-type culture URM 8284)

Note – the new species, *Coniochaeta monsterae* forms a well separate clade, close to *Coniochaeta africana* (Damm et al. 2010) and *Coniochaeta fasciculata* (Weber, 2002). However, *C. monsterae* can be easily distinguished from these species by the presence of straight, lageniform conidiogenic cells without collarette. The new species remember *Coniochaeta fodinicola* for producing colonies initially white cream turning pale with age, yeast-like cells and phialide conidiogenic cells without collarette (Vazquez-Campos et al. 2014).

Discussion

Members of *Lecythophora*, an anamorphic genus of the Coniochaetaceae, are characterized by present salmon pink to dark brown colonies and intercalary conidiogenic cells with distinct collarettes (Damm et al. 2010; Khan et al. 2013). Molecular studies reported eight species included in *Lecythophora* are anamorphs of *Coniochaeta* (Weber 2002, Damm et al. 2010; Guarro et al. 2012, Khan et al. 2013). These fungi are generally found as saprobes in various substrates, such as wood, bark of different trees, soil and leaves. When pathogens the representatives of this fungi exhibit low virulence on most hosts, usually appearing as opportunistic invaders of previously infected, wounded or senescent tissue (Damm et al. 2010). However, also includes endophytic taxa, such as *Coniochaeta ligniaria* (Kokaew et al. 2011) and *Coniochaeta endophytica* (Harrington et al. 2019).

In this study, the new specie, *Coniochaeta monsterae* was isolated living as an endophyte of healthy de *Monstera adansonii*.

We introduce a phylogenetic analysis and morphological characterization to distinguish

Coniochaeta monsterae from other closely related species. The new species of the group *Coniochaeta* is phylogenetically next to *Coniochaeta fasciculata* and *Coniochaeta africana* (Fig. 2). However, *Coniochaeta fasciculata* isolated from butter in Switzerland, may be distinguished from *Coniochaeta monsterae* by to produce colonies grey-brown to black, adelophialides and collarettes long (Weber, 2002). *Coniochaeta africana*, described from necrosis in wood of *Prunus salicina*, may be distinguished from *Coniochaeta monsterae* by to produce discrete conidiophores rare cylindrical to ventricose, conidiogenous cells discrete, phialides cylindrical to ventricose and conidia aggregated in heads (Damm et al. 2010).

The new species, *Coniochaeta monsterae*, remember *Coniochaeta fodinicola* for producing colonies initially white cream turning pale with age, yeast-like cells and phialide conidiogenic cells without collarette (Vazquez-Campos et al. 2014). However, *C. monsterae* differs from *C. fodinicola* by the absence of chlamydospores, production of cylindrical and lageniform conidiogenic cells, generally wider at the base, becoming thinner towards the apex, and bigutulated, ellipsoidal to cylindrical conidia. Other species share some characteristics with *C. monsterae*. For example, *C. polymorpha*, described from the endotracheal tube of a preterm neonate, resembles *C. monsterae* by the absence of chlamydospores, production of smooth-walled, ellipsoidal hyaline conidia and yeast-like cells (Khan et al. 2013). On the other hand, *C. monsterae* differs from *C. polymorpha* by producing guttulated vegetative hyphae, straight, cylindrical, lageniform conidiogenic cells, generally wider at the base, becoming thin toward the apex without collarette and bigutulated conidia.

The espécie *C. euphorbiae*, *C. iranica* and *C. endophytica* were described from healthy tissue of *Euphorbia polycaulis* and *Platyclusus orientalis*, respectively (Nasr et al. 2018; Harrington et al. 2019). In *C. monsterae* yeast-like cells were observed, as well as on the species *C. euphorbiae* and *C. iranica* (Nasr et al. 2018). However, *C. monsterae* can be morphologically distinct from both species by producing conidiogenic lageniform cells, sometimes wider at the base, becoming thinner toward the apex, bigutulated, ellipsoidal conidia. *Coniochaeta endophytica* differs from *C. monsterae* by producing phialidic conidiogenous cells ampulliform, conidia oblong, without yeast-like cells. All these species are not phylogenetically related with *C. monsterae*.

The species described here apparently does not cause host disease symptoms, suggesting that further studies are needed to better understand the ecological function of the fungus-plant interaction. The knowledge of new fungal endophytes associated with plants that live in different ecosystems in Brazil may contribute to the understanding of the ecological role of these organisms, besides providing subsidies for future research for biotechnological purposes.

References

- Asgari B, Zare R. (2006). Two new *Coniochaeta* species from Iran. *Nova Hedwigia* 82:227–236. DOI: <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2006/0082-0227>
- Checa, J., Barrasa, J. M., Moreno, G., Fort, F., & Guarro, J. (1988). The genus *Coniochaeta* (Sacc.) Cooke (Coniochaetaceae, Ascomycotina) in Spain. *Cryptogam. Mycol*, 9, 1-34.
- Damm, U., Fourie, P.H. & Crous, P.W. (2010). *Coniochaeta* (Lecythophora), *Collophora* gen. nov. and *Phaeomoniella* species associated with wood necroses of Prunus trees. *Persoonia* 24: 60–80. <https://doi.org/10.3767/003158510X500705>
- de Hoog, G. S., Guarro, J., Gené, J., & Figueras, M. J. (2000). Atlas of clinical fungi (No. Ed. 2). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
- García, D., Stchigel, A. M., Cano, J., Caldach, M., Hawksworth, D. L., & Guarro, J. (2006). Molecular phylogeny of Coniochaetales. *Mycological research*, 110(11), 1271-1289. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.07.007>
- Gams W, McGinnis MR. (1983). *Phialemonium*, a new intermediate anamorphic genus between *Phialophora* and *Acremonium*. *Micologia* 75: 977 - 987. <https://doi.org/10.11606/T.42.2014.tde-30062014-161056>
- Gams, W. (2000). *Phialophora* and some similar morphologically little-differentiated anamorphs of

divergent ascomycetes. *Studies in Mycology*, 187-200.

- Harrington, A. H., del Olmo-Ruiz, M., U'Ren, J. M., Garcia, K., Pignatta, D., Wespe, N., ... & Arnold, A. E. (2019). *Coniochaeta endophytica* sp. nov., a foliar endophyte associated with healthy photosynthetic tissue of *Platycladus orientalis* (Cupressaceae). *Plant and Fungal Systematics*, 64(1), 65-79. <https://doi.org/10.2478/pfs-2019-0008>
- Hawksworth, D. L., & Yip, H. Y. (1981). *Coniochaeta angustispora* sp. nov. from roots in Australia, with a key to the species known in culture. *Australian Journal of Botany*, 29(3), 377-384. <https://doi.org/10.1071/BT9810377>
- Hernandez-Restrepo, M., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2015). *Neocordana* gen. nov., the causal organism of *Cordana* leaf spot on banana. <http://hdl.handle.net/2263/49947>
- Hoffman, M. T., & Arnold, A. E. (2008). Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycological research*, 112(3), 331-344. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.10.014>
- Hongsanan, S., Maharachchikumbura, S. S., Hyde, K. D., Samarakoon, M. C., Jeewon, R., Zhao, Q., ... & Bahkali, A. H. (2017). An updated phylogeny of Sordariomycetes based on phylogenetic and molecular clock evidence. *Fungal diversity*, 84(1), 25-41. <https://doi.org/10.1007/s13225-017-0384-2>
- Huhndorf, S. M., Miller, A. N., & Fernández, F. A. (2004). Molecular systematics of the Sordariales: the order and the family Lasiosphaeriaceae redefined. *Mycologia*, 96(2), 368-387. <https://doi.org/10.1080/15572536.2005.11832982>
- Kamiya, S., Uchiyama, S., & Udagawa, S. I. (1995). Two new species of *Coniochaeta* with a cephalothecoid peridium wall. *Mycoscience*, 36(4), 377-383. <https://doi.org/10.1007/BF02268619>
- Khan, Z., Gené, J., Ahmad, S., Cano, J., Al-Sweih, N., Joseph, L., ... & Guarro, J. (2013). *Coniochaeta polymorpha*, a new species from endotracheal aspirate of a preterm neonate, and transfer of *Lecythophora* species to *Coniochaeta*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104(2), 243-252. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9943-z>
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., & Stalpers, J. A. (2008). *Dictionary of the Fungi*. (10thedn). Wallingford, UK.
- Kokaew J, Manoch L, Worapong J, Chamswarnng C, Singburaudom N, Visarathanonth N, Piasai O, Strobel G (2011). *Coniochaeta ligniaria* an endophytic fungus from *Baeckea frutescens* and its antagonistic effects against plant pathogenic fungi. *Thai J Agric Sci* 44:123–131.
- Maharachchikumbura, S.S.N., Hyde, K.D., Jones, E.B.G., McKenzie, E.H.C., Bhat, J.D., Dayarathne, M.C., Huang, S.K., Norphanphoun, C., Senanayake, I.C., Perera, R.H., Shang, Q.J., Xiao, Y., D'souza, M.J., Hongsanan, S., Jayawardena, R.S., Daranagama, D.A., Konta, S., Goonasekara, I.D., Zhuang, W.Y., Jeewon, R., Phillips, A.J.L., Abdel-Wahab, M.A., Al-Sadi, A.M., Bahkali, A.H., Boonmee, S., Boonyuen, N., Cheewangkoon, R., Dissanayake, A.J., Kang, J., Li, Q.R., Liu, J.K., Liu, X.Z., Liu, Z.Y., Luangsa-ard, Coniochaeta From Uzbekistan *Phytotaxa* 336 (1) © 2018 Magnolia Press • 57 J.J., Pang, K.L., Phookamsak, R., Promputtha, I., Suetrong, S., Stadler, M., Wen, T. & Wijayawardene, N.N. (2016). Families of Sordariomycetes. *Fungal Diversity* 79: 1–317. <https://doi.org/10.1007/s13225-016-0369-6>
- Mahoney, D. P., & LaFavre, J. S. (1981). *Coniochaeta extramundana*, with a synopsis of other *Coniochaeta* species. *Mycologia*, 73(5), 931-952. <https://doi.org/10.1080/00275514.1981.12021423>
- Malloch, D., & Cain, R. F. (1971). New cleistothecial Sordariaceae and a new family, *Coniochaetaceae*. *Canadian Journal of Botany*, 49(6), 869-880. <https://doi.org/10.1139/b71-127>
- Melin, E., & Nannfeldt, J. A. (1934). Researches into the blueing of ground wood-pulp. *Researches into the blueing of ground wood-pulp*. (3-4).
- Miller, A. N., Huhndorf, S. M., & Fournier, J. (2014). Phylogenetic relationships of five uncommon species of *Lasiochaeta* and three new species in the Helminthosphaeriaceae

- (Sordariomycetes). *Mycologia*, 106(3), 505-524. <https://doi.org/10.3852/13-223>
- Minoura K, Morinaga T, Muroi T. (1977). Some ascomycetes isolated from the soil of Nepal (III). *Transações da Sociedade Micológica do Japão* 18: 119 – 12.
- Moreau C, Moreau M. (1949). Some Ascomyetes from the Congo collected by MM. Roger Heim e A. Bachy. *Revue de Mycologie, Suppl. colonial* 14: 55-66.
- Nasr, S., Bien, S., Soudi, M. R., Alimadadi, N., Fazeli, S. A. S., & Damm, U. (2018). Novel Collophorina and Coniochaeta species from Euphorbia polycaulis, an endemic plant in Iran. *Mycological progress*, 17(6), 755-771. <https://doi.org/10.1007/s11557-018-1382-9>
- Perdomo, H., García, D., Gené, J., Cano, J., Sutton, D. A., Summerbell, R., & Guarro, J. (2013). Phialemoniopsis, a new genus of Sordariomycetes, and new species of *Phialemonium* and *Lecythophora*. *Mycologia*, 105(2), 398-421. <https://doi.org/10.3852/12-137>
- Phookamsak, R., Hyde, K. D., Jeewon, R., Bhat, D. J., Jones, E. G., Maharachchikumbura, S. S., ... & Doilom, M. (2019). Fungal diversity notes 929–1035: taxonomic and phylogenetic contributions on genera and species of fungi. *Fungal Diversity*, 95(1), 1-273. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00421-w>
- Raja, H. A., Shearer, C. A., Fournier, J., & Miller, A. N. (2012). Freshwater ascomycetes: *Coniochaeta gigantospora* sp. nov. based on morphological and molecular data. *Mycoscience*, 53(5), 373-380. <https://doi.org/10.1007/S10267-012-0181-4>
- Ramaley, A. W. (1997). Barrina, a new genus with polysporous asci. *Mycologia*, 89(6), 962-966. <https://doi.org/10.1080/00275514.1997.12026868>
- Rivera-Orduña, F. N., Suarez-Sanchez, R. A., Flores-Bustamante, Z. R., Gracida-Rodriguez, J. N., & Flores-Cotera, L. B. (2011). Diversity of endophytic fungi of *Taxus globosa* (Mexican yew). *Fungal Diversity*, 47(1), 65-74. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0045-1>
- Romero, A. I., Carmarán, C. C., & Lorenzo, L. E. (1999). A new species of *Coniochaeta* with a key to the species known in Argentina. *Mycological Research*, 103(6), 689-695. <https://doi.org/10.1017/S0953756298007564>
- Saccardo, P. A. (1882). *Sylloge Fungorum* 1: i-xviii, 1–768. Italy, Padua.
- Sánchez Márquez, M., Bills, G. F., & Zabalgoceazcoa, I. (2007). The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*.
- Samarakoon, M. C., Gafforov, Y., Liu, N., Maharachchikumbura, S. S., Bhat, J. D., Liu, J. K., ... & Hyde, K. D. (2018). Combined multi-gene backbone tree for the genus *Coniochaeta* with two new species from Uzbekistan.
- Schoch, C. L., Robbertse, B., Robert, V., Vu, D., Cardinali, G., Irinyi, L., ... & Kirk, P. M. (2014). Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. Database, 2014. <https://doi.org/10.1093/database/bau061>
- Schol-Schwarz MB. (1970). Review of genus *Phialophora* (Moniliales). *Persoonia* 6: 59-94.
- Taylor, L. D. (1970). *Coniochaeta velutina* and its synonyms. *Canadian journal of botany*, 48(1), 81-83. <https://doi.org/10.1139/b70-010>
- Troy, G. C., Panciera, D. L., Pickett, J. P., Sutton, D. A., Gene, J., Cano, J. F., ... & Wickes, B. L. (2013). Mixed infection caused by *Lecythophora canina* sp. nov. and *Plectosphaerella cucumerina* in a German shepherd dog. *Medical mycology*, 51(5), 455-460. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.754998>
- Udagawa, S., & Furuya, K. (1979). *Poroconiochaeta*, a new genus of the Coniochaetaceae. *Transactions of the Mycological Society of Japan*.
- Udagawa, S., & Sugiyama, Y. (1982). New records and new species of ascomycetous microfungi from Nepal, a preliminary report on the expedition of 1980. *Reports on the Cryptogamic Study in Nepal*, 11-46.
- Vázquez-Campos, X., Kinsela, A. S., Waite, T. D., Collins, R. N., & Neilan, B. A. (2014). *Fodinomyces uranophilus* gen. nov. sp. nov. and *Coniochaeta fodinicola* sp. nov., two uranium mine-inhabiting Ascomycota fungi from northern Australia. *Mycologia*, 106(6), 1073-1089.

<https://doi.org/10.3852/14-013>

- Yokoyama, T., & Ito, T. (1988). A new species of *Coniochaeta* from Japanese soils. Transactions of the Mycological Society of Japan (Japan).
- Wanasinghe, D. N., Phukhamsakda, C., Hyde, K. D., Jeewon, R., Lee, H. B., Jones, E. G., ... & Gafforov, Y. (2018). Fungal diversity notes 709–839: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa with an emphasis on fungi on Rosaceae. *Fungal diversity*, 89(1), 1-236. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0395-7>
- Weber, E. (2002). The *Lecythophora-Coniochaeta* complex: I. Morphological studies on *Lecythophora* species isolated from *Picea abies*. *Nova Hedwigia*, 74(1-2), 159-185. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2002/0074-0159>
- Weber, E., Görke, C., & Begerow, D. (2002). The *Lecythophora-Coniochaeta* complex: II. Molecular studies based on sequences of the large subunit of ribosomal DNA. *Nova Hedwigia*, 74(1-2), 187-200. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2002/0074-0187>
- Wijayawardene, N.N., Hyde, K.D., Rajeshkumar, K.C., Hawksworth, D.L., Madrid, H., Kirk, P.M., Braun, U., Singh, R.V., Crous, P.W., Kukwa, M., Lücking, R., Kurtzman, C.P., Yurkov, A., Haelewaters, D., Aptroot, A., Lumbsch, H.T., Timdal, E., Ertz, D., Etayo, J., Phillips, A.J.L., Groenewald, J.Z., Papizadeh, M., Selbmann, L., Dayarathne, M.C., Weerakoon, G., Jones, E.B.G., Suetrong, S., Tian, Q., Castañeda-Ruiz, R.F., Bahkali, A.H., Pang, K-L., Tanaka, K., Dai, D.Q., Sakayaroj, J., Hujslová, M., Lombard, L., Shenoy, B.D., Suija, A., Maharachchikumbura, S.S.N., Thambugala, K.M., Wanasinghe, D.N., Sharma, B.O., Gaikwad, S., Pandit, G., Zucconi, L., Onofri, S., Egidi, E., Raja, H.A., Kodsueb, R., Cáceres, M.E.S., Pérez-Ortega, S., Fiuza, P.O., Monteiro, J.S., Vasilyeva, L.N., Shivas, R.G., Prieto, M., Wedin, M., Olariaga, I., Lateef, A.A., Agrawal, Y., Fazeli, S.A.S., Amoozegar, M.A., Zhao, G.Z., Pfliegler, W.P., Sharma, G., Oset, M., Abdel-Wahab, M.A., Takamatsu, S., Bensch, K., de Silva, N.I., De Kese, A., Karunarathna, A., Boonmee, S., Pfister, D.H., Lu, Y-Z., Luo, Z-L., Boonyuen, N., Daranagama, D.A., Senanayake, I.C., Jayasiri, S.C., Samarakoon, M.C., Zeng, X-Y., Doilom, M., Quijada, L., Rampadarath, S., Heredia, G., Dissanayake, A.J., Jayawardana, R.S., Perera, R.H., Tang, L.Z., Phukhamsakda, C., Hernández-Restrepo, M., Ma, X., Tibpromma, S., Gusmao, L.F.P., Weerahewa, D. & Karunarathna, S.C. (2017). Notes for genera-Ascomycota. *Fungal Diversity* 86: 1–594. <https://doi.org/10.1007/s13225-017-0386-0>

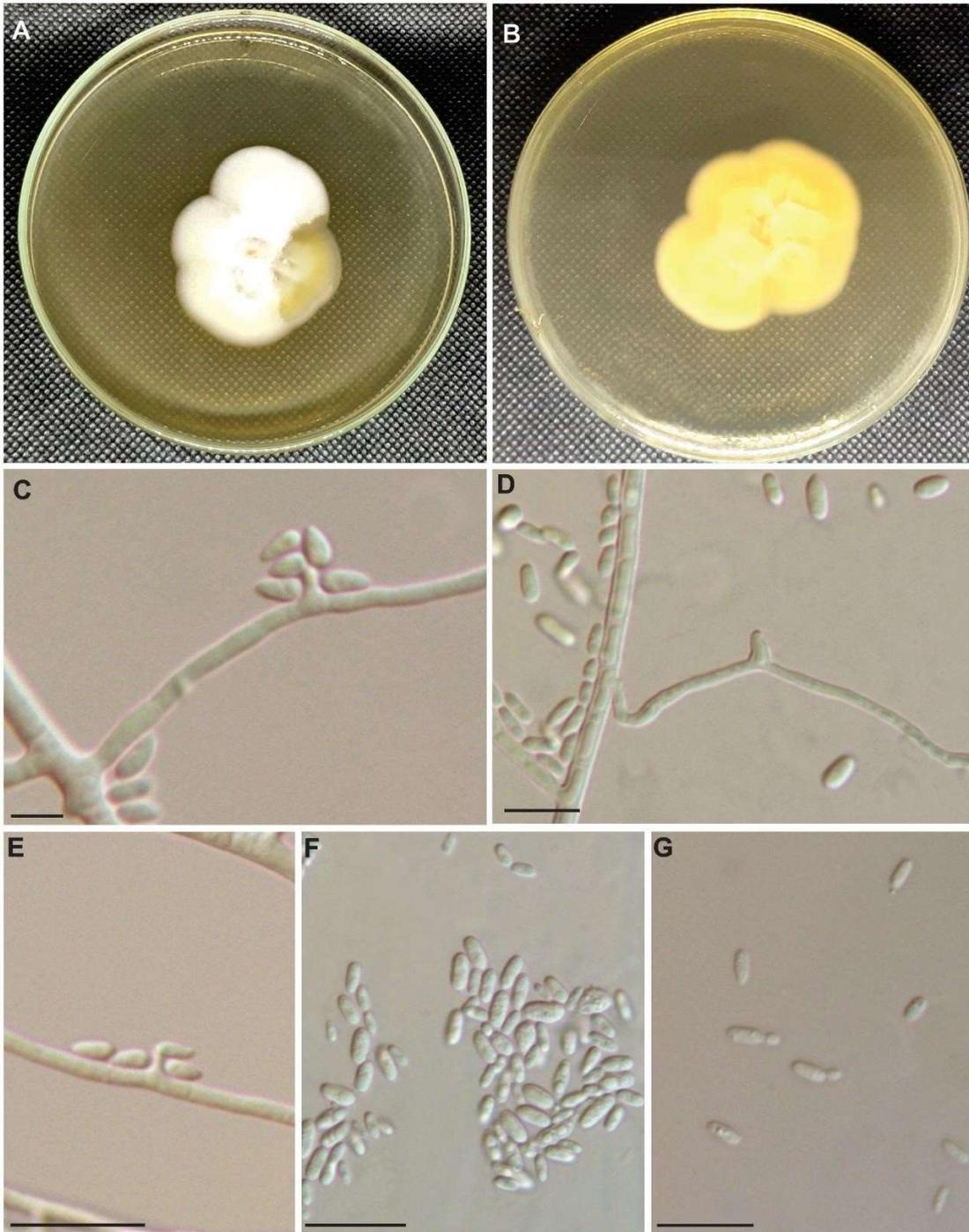


Figure 1. *Coniochaeta monsterae*. A-B culture in malt extract agar after two weeks (reverse B.); C.D.E. Conidiogenic cells and conidia F. Conidia. G. Yeast-like cells. Scale bars: 10 μm

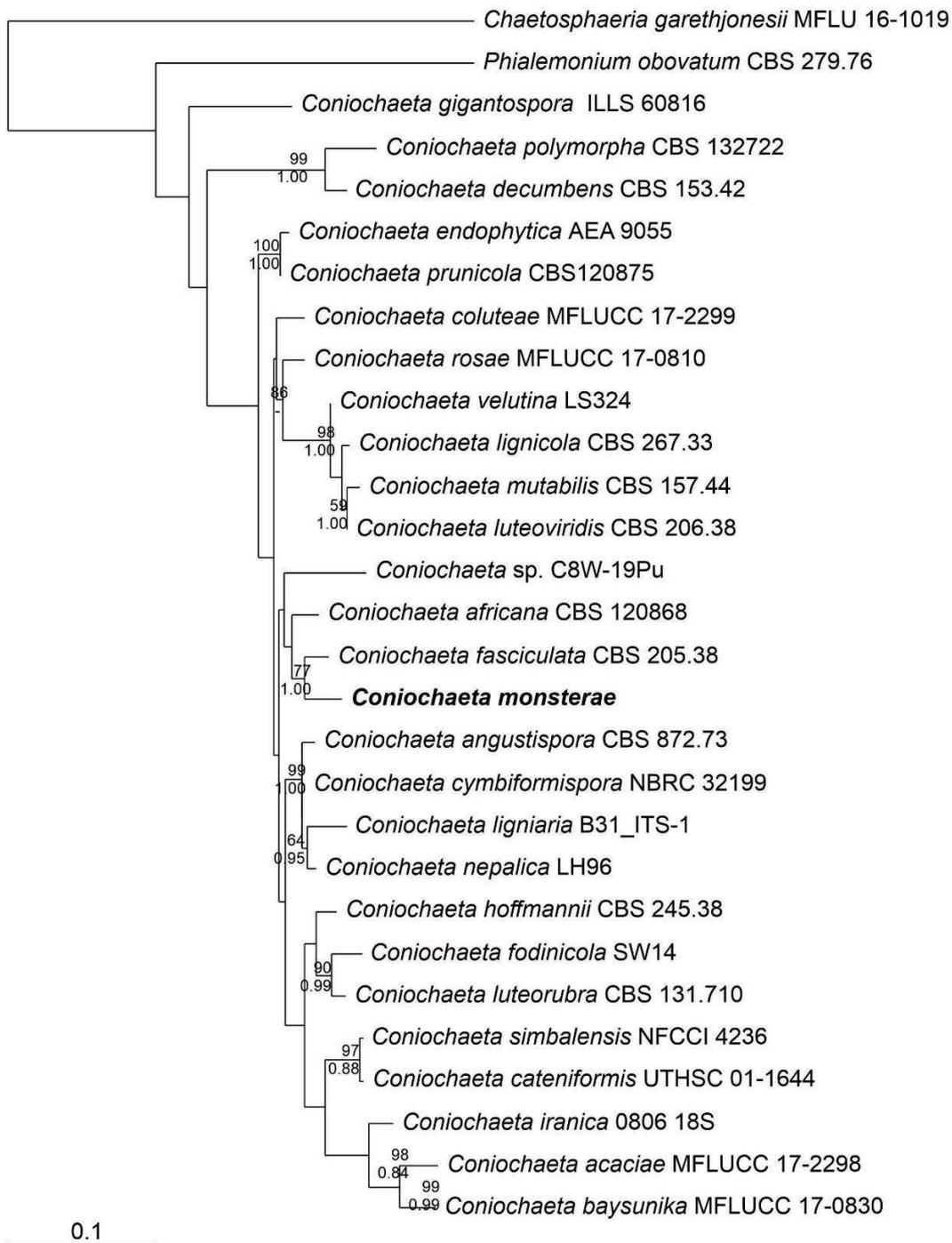


Figure 2. Bayesian inference tree (BI) obtained from phylogenetic analysis of ITS and LSU rDNA sequences of *Coniochaeta* members. The new species is in bold. The support values shown in the nodes are from the maximum likelihood (ML) and BI and analyzes, respectively.