

MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

ENDOFITIC MICROORGANISMS AND THEIR BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL

AMANDA DA SILVA RIBEIRO^{1*}, JOÃO ALENCAR PAMPFILE²

1. Doutoranda em Biologia Comparada na Universidade Estadual de Maringá; 2. Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, docente do curso de graduação de Tecnologia em Biotecnologia na Universidade Estadual de Maringá.

* Avenida Colombo, 5790, Jardim Universitário, Maringá, Paraná, Brasil. CEP: 87020-900. amanda.rib30@gmail.com

Recebido em 12/12/2016. Aceito para publicação em 16/02/2017

RESUMO

Micro-organismo endofíticos são aqueles capazes de colonizar internamente os tecidos da planta hospedeira, sem causar danos aparentes ou estruturas externas visíveis. Todas as plantas estudadas até o momento são colonizadas por estes micro-organismos, eles desempenham um papel ecológico fundamental para suas plantas hospedeiras, conferindo diversos benefícios como produção compostos antimicrobianos que protegem a planta contra o ataque de fitopatógenos e promoção do crescimento vegetal. Estes micro-organismos tem despertado grande interesse na área biotecnológica, pois apresentam grande potencial como agentes de controle biológico, além disso, para colonizar a planta e competir com outros microrganismos, os endofíticos produzem uma variedade de substâncias, sendo uma fonte importante de compostos biologicamente ativos que têm aplicações medicinais, industriais ou agrícolas promissoras. O objetivo desta revisão é destacar o potencial biotecnológico dos micro-organismos endofíticos como fontes de novas substâncias de interesse, como agentes de controle biológico de pragas agrícolas e na produção de enzimas de interesse industrial.

PALAVRAS-CHAVE: Endófitos, controle biológico, atividade antimicrobiana, metabólitos secundários, enzimas.

ABSTRACT

Endophytic microorganisms are those capable of internally colonizing plant tissues without causing apparent damage or visible external structures. All the plants studied to date are colonized by these microorganisms, they play a fundamental ecological role for their host plants, conferring several benefits such as the production of antimicrobial compounds that protect the plant against the attack of phytopathogens and the promotion of plant growth. These microorganisms have aroused great interest in the biotechnology area because of their potential as biological control agents; In addition, to colonize the plant and compete with other microorganisms, the endophytes produces a variety of substances, being an important source of biologically active compounds that have promising medicinal, industrial or agricultural applications. The objective of this review is to highlight the biotechnological potential of endophytic mi-

croorganisms as a sources of new substances of interest, such as agents for the biological control of agricultural pests and the production of enzymes of industrial interest.

KEYWORDS: Endophytes, biological control, antimicrobial activity, secondary metabolites, enzymes.

1. INTRODUÇÃO

Endófitos foram descritos pela primeira vez por Bary (1866) quem primeiro delineou a diferença entre eles e os patógenos de plantas¹. Eram considerados como todos os microrganismos capazes de colonizar, em alguma fase do seu ciclo de vida, os tecidos internos da planta, sem causar danos ao seu hospedeiro². Mais recentemente foram definidos como sendo todo micro-organismo capaz de colonizar internamente os tecidos da planta hospedeira, sem causar danos aparentes ou estruturas externas visíveis³ ocupando espaços inter e intracelulares⁴. Mendes e Azevedo (2007)⁵ ampliaram essa definição dividindo os endófitos em dois tipos: tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e tipo II, os que produzem estruturas externas à planta, como fungos micorrízicos e bactérias simbiotes fixadoras de nitrogênio.

São diversos os benefícios que os endófitos conferem aos seus hospedeiros: contribuem ou são responsáveis pela adaptação das plantas ao estresse biótico e abiótico, aumentando a resistência à seca e escassez de água, bem como a tolerância à alta temperatura e alta salinidade; produzem compostos antimicrobianos que protegem a planta contra o ataque de fitopatógenos; conferem tolerância ao estresse oxidativo, promovem o crescimento vegetal, dentre outras vantagens. Em troca, as plantas fornecem estrutura espacial, nutrientes e proteção contra dessecação^{6,7}.

O suprimento adicional de N para as plantas, fornecido pelos endófitos, é a forma direta que estes microrganismos utilizam para promover o crescimento de diferentes culturas. A presença do gene nifH, que codifica a

unidade Fe-nitrogenase do complexo nitrogenase, tem se tornado um marcador muito utilizado no estudo da diversidade de endofíticos com potencial para fixar nitrogênio^{8,9}.

Estes micro-organismos têm despertado grande interesse na área biotecnológica, apresentam grande potencial como agentes de controle biológico de doenças causadas por bactérias, fungos e nematoides, além disso, para colonizar a planta e competir com outros microrganismos, os endofíticos produzem uma variedade de substâncias, sendo uma fonte importante de compostos biologicamente ativos que têm aplicações medicinais ou agrícolas promissoras. Produzem uma variedade de compostos secundários com atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos patogênicos de plantas e humanos^{10,11,12,13} e mais recentemente tem sido explorados na produção de enzimas de interesse industrial^{14,15}.

O presente trabalho teve como objetivo, por meio de uma revisão bibliográfica, destacar o potencial biotecnológico dos micro-organismos endofíticos como fontes de novas substâncias de interesse, como agentes de controle biológico de pragas agrícolas e na produção de enzimas de interesse industrial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão da literatura especializada, com base em artigos, livros, dissertações, teses e obras publicadas no período compreendido entre 1998 e 2016. Foram consultadas desde obras clássicas a artigos recentes, em inglês e português, referentes ao tema micro-organismos endofíticos, controle biológico, metabólitos secundários, enzimas. A busca foi realizada nas plataformas de busca Science Direct, Portal Capes, Scielo e Web of Science.

3. RESULTADOS

Microrganismos endofíticos

Durante mais de um século os micro-organismos endofíticos foram quase que ignorados, principalmente devido ao fato de que se conhecia muito pouco sobre suas reais funções no interior dos vegetais e também por não produzirem em seus hospedeiros, estruturas externas visíveis¹⁶. Apenas no final dos anos 70, que microrganismos endofíticos começaram a adquirir importância, quando foi verificado que eles apresentam interações simbióticas com o hospedeiro, protegendo as plantas do ataque de insetos, de doenças e de herbívoros¹.

Todas as plantas possuem microrganismos endofíticos, incluindo fungos e bactérias. Em geral, existem espécies dominantes, que são bastante frequentes em um determinado hospedeiro, e outras secundárias, mais raras¹⁷, de modo que as plantas possuem uma microbiota endofítica característica e que deve ser importante para

sua sanidade e manutenção¹. Alguns fatores que influenciam na biodiversidade de endofitos encontrados em uma planta são a idade da planta, do tecido ou órgão¹⁸, as condições fisiológicas do hospedeiro, as condições ambientais e distribuição geográfica⁶. O tempo gasto até a planta ser submetida ao isolamento, a metodologia utilizada, o meio de cultura selecionado, o tamanho do fragmento vegetal e as condições de cultivo também irão influenciar na conclusão sobre a frequência de infecção, diversidade e composição de espécies^{19,20}. Bussey III *et al.* (2015)²¹ observou uma redução significativa na diversidade de fungos endofíticos em raízes de *Anemopsis californica* cultivada em estufa, comprovando a influência das condições ambientais e método de cultivo na diversidade dos endofitos.

A transmissão pode ser horizontal ou vertical. A maioria dos endofíticos são transmitidos de forma horizontal através dos esporos. Alguns podem ser transmitidos verticalmente através das sementes^{6,22}. Na transmissão horizontal estes microrganismos adentram as plantas por aberturas naturais ou ferimentos. Uma das portas de entrada mais utilizadas são as raízes; a emergência de raízes laterais resulta em uma abertura, que serve de entrada para os microrganismos. O próprio crescimento das raízes, ao penetrar no solo, gera abrasões que facilitam sua entrada. Outras portas de entrada são aberturas naturais como estômatos e hidatódios, aberturas causadas por insetos, e até por estruturas de fungos patogênicos, como os apressórios¹⁷. Também pode ocorrer entrada ativa de endofitos pela produção de enzimas ou estruturas que facilitam sua penetração. Após a infecção ocorre movimento dos micro-organismos dentro da planta, habitando de forma ativa o apoplasto, vasos condutores, podendo ainda em alguns casos ocorrer colonização intracelular^{17,18}.

O padrão de colonização difere entre a parte aérea e a raiz da planta. A colonização da parte aérea é confinada a células individuais ou pode ser intercelular, mas localizada. A colonização das raízes, por outro lado, é geralmente extensa, mas pode também ser inter ou intracelular. As possíveis razões para esses padrões de colonização diferentes podem ser, diferenças anatômicas, as relações fonte-dreno, as diferenças de permeabilidade ou de nutrientes fornecidos pelo endofito ou pelo hospedeiro²³. Os endofitos que habitam as folhas estão sob um conjunto de pressões seletivas distintas daqueles que habitam outras partes da planta. As folhas têm menor duração em relação ao caule e raiz, são bioquimicamente mais dinâmicas, as condições ambientais são mais variáveis, são mais sujeitas a danos por herbivoria. As implicações dessas diferenças não foram exploradas, e podem elucidar padrões gerais da história de vida e especificidade entre hospedeiro e endofito²⁰.

Existem adaptações evolutivas entre alguns endofitos e seus hospedeiros²³. Essas adaptações incluem a trans-

ferência horizontal de genes da planta para o endófito e entre os próprios endófitos⁶, evidencia disso é o fato de alguns desses microrganismos sintetizarem os mesmos compostos bioativos produzidos por suas plantas hospedeiras²⁴. Um exemplo bastante divulgado é a produção de taxol pelo endófito *Taxomyces andreanae* isolado de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae)²⁵. Outros relatos incluem a produção do inseticida natural azadirachtin pelo fungo endofítico *Eupenicillium parvum* isolado de *Azadirachta indica*²⁶, e a produção da droga anticancerígena camptotecin por um fungo da família Phycmycetes isolado de *Nothapodytes foetida*²⁷.

Não existe um limite claro entre microrganismos endofíticos, epifíticos e patogênicos, mas sim um gradiente entre eles. Um endofítico pode se tornar patogênico conforme as condições ambientais ou equilíbrio com outros endófitos, bem como um epifítico pode entrar na planta e lá permanecer por certo período causando ou não algum dano¹. Alguns fungos endofíticos podem ser patogênicos para plantas que não são suas hospedeiras. O que determina se um endófito irá crescer assintomático na planta ou se sua colonização irá causar uma doença será as adaptações do hospedeiro, a virulência inata do endófito, resposta de defesa do hospedeiro, ou seja, interações antagônicas equilibradas e as condições ambientais²³. Também durante o envelhecimento ou senescência foliar os endófitos podem se tornar patogênicos e causar doenças externas⁶.

Atividade antagonista e controle biológico

Os micro-organismos endofíticos tem sido utilizados no controle biológico de fitopatógenos porque podem inibir ou reduzir o crescimento dos patógenos por micoparasitismo, antibiose, produção de metabólitos, competição por nutrientes e indução de resistência na planta⁷.

Depois que o endófito coloniza o tecido do hospedeiro e estabelece um nicho, ele irá obter uma fonte confiável de nutrientes providos pela planta, exsudatos e lixiviados, proteção contra dessecação e espaço, em retorno irá proteger o hospedeiro contra outros micro-organismos^{6,28}.

O emprego destes micro-organismos na agricultura tem aumentado nos últimos anos devido aos benefícios que os endófitos promovem para as plantas, especialmente promovendo o crescimento e controlando pragas, substituindo produtos químicos e contribuindo para a preservação do meio ambiente¹⁶.

São diversos os trabalhos relatando a atividade destes micro-organismos contra bactérias, fungos e nematoides fitopatogênicos. Orlandelli *et al.* (2014)²⁹ verificaram que os extratos brutos obtidos de fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum* Sw., (jaborandi ou falso-jaborandi) foram capazes de inibir a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* causadora do cretamento bacteriano em feijão. Orlandelli *et al.* (2015)¹⁵

também avaliaram a atividade antifúngica de fungos endofíticos de *P. hispidum* contra os fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Colletotrichum* sp., *Phyllosticta citricarpa* e *Moniliophthora perniciosa* e observaram que em alguns casos os endofíticos foram mais eficientes que os fungicidas comerciais.

Felber *et al.* (2016)³⁰ isolaram os fungos endofíticos de *Vitis labrusca* (uva) e avaliaram o potencial dos endófitos no controle *in vitro* de fungos patogênicos da videira, incluindo *Alternaria* sp., *Sphaceloma* sp. e *Glomerella* sp., em alguns casos a porcentagem de inibição foi acima de 50%. Polonio *et al.* (2015)¹³ também obteve resultados promissores com fungos endofíticos isolados de *Mikania glomerata* (guaco) contra os fungos *Fusarium solani* e *Didymella bryoniae*, com índices de inibição de 60 e 66% respectivamente. Os fungos isolados de *Coffea arabica* (café) por Bongiorno *et al.* (2016)³¹ também foram eficientes contra os fitopatógenos *Glomerella* sp., *Colletotrichum* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum* com índices de inibição de até 60%.

Não só os fungos endofíticos apresentam atividade inibitória, as bactérias endofíticas também vêm sendo estudadas. Specian *et al.* (2016)³² isolou e testou bactérias endofíticas de *Malpighia emarginata* (acerola) contra *Glomerella* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Moniliophthora perniciosa*, *Didymella bryoniae*, *Fusarium solani*, *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum*, obtendo índices de inibição de até 89% com a espécie endofítica *Bacillus* sp.

Recentemente vem sendo demonstrada a atividade dos micro-organismos endofíticos no controle de nematoides. Bogner *et al.* (2016)³³ isolou fungos endofíticos das raízes de tomate e verificou que as espécies *Trichoderma asperellum* e *Fusarium oxysporum* foram capazes de reduzir a penetração e a densidade de ovos de *Meloidogyne incognita* em até 46% nas raízes do tomate.

Estes estudos demonstram o grande potencial dos micro-organismos endofíticos no controle biológico de pragas agrícolas, sua eficiência pode estar ligada ao fato destes micro-organismos colonizarem um habitat semelhante ao ocupado pelos patógenos. Além disso, eles são vantajosos por outros benefícios que podem trazer as plantas hospedeiras como promoção do crescimento vegetal e aumento da resistência das plantas às condições de estresse biótico e abiótico⁶.

Produção de compostos bioativos

Para colonizar a planta e competir com outros microrganismos, os endofíticos produzem uma variedade de substâncias incluindo enzimas³⁴, e uma ampla variedade de metabólitos secundários bioativos como alcalóides, benzopironas, quinonas, flavonóides, ácidos fenólicos, esteróides, terpenóides, tetralonas, xantonas e outros³⁵. Tais metabólitos apresentam amplo espectro de aplicação, entre eles como agentes anticancerígenos²⁵

fungicidas, antibióticos^{17,36,37}, agrotóxicos, imunossuppressores, antiparasitários, e antioxidantes^{38,39}.

O extrato bruto de diversas linhagens vem sendo avaliadas contra patógenos humanos e de plantas. Rhoden *et al.* (2012)⁴⁰ avaliaram o extrato bruto de fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Trichilia elegans* (pau-de-ervilha) e verificou atividade antimicrobiana contra as bactérias patogênicas humanas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Micrococcus luteus* e *Enterococcus hirae*. Garcia *et al.* (2012)¹⁰ obtiveram resultados semelhantes com fungos endofíticos de *Sapindus saponaria* (pau-sabão), os extratos das linhagens foram capazes de inibir o crescimento da *E. coli*, *M.luteus*, *S.typhi*, *E. hirae* e *S. aureus*. Orlandelli *et al.* (2012)⁴¹ analisaram os extratos de fungos endofíticos de *Piper hispidum* (falso-jaborandi) contra as mesmas bactérias, obtendo resultados semelhantes.

Polonio *et al.* (2015)¹³ analisaram o extrato bruto de *Diaporthe citri* isolado de *Mikania glomerata* (guaco) e obteve resultados promissores contra *Staphylococcus aureus*. A análise química desse extrato revelou a presença de ácido 3-nitropropionico, este composto pode estar envolvido em sistemas de defesa e nutrição de endófitos e plantas hospedeiras, podendo também participar do ciclo biogeoquímico do nitrogênio⁴².

O extrato bruto obtido a partir de micro-organismos endofíticos também pode apresentar atividade contra fungos fitopatogênicos. Melo *et al.* (2009)³⁶ avaliaram o extrato de metabólitos secundários produzidos por *Bacillus pumilus* isolado da mandioca e verificaram forte inibição contra patógenos *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum* e *Sclerotium rolfsii*, a análise química revelou a presença do antifúngico pumilacidina.

Em certos casos é verificado que os endófitos são capazes de produzir os mesmos compostos que suas plantas hospedeiras, possivelmente isso se deve a transmissão horizontal de genes⁶. Um exemplo é a produção de taxol pelo endófito *Taxomyces andreanae* isolado de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae)²⁵. Devido a este fato muitas pesquisas são realizadas com micro-organismos endofíticos de plantas medicinais como *Trichilia elegans*, *Mikania glomerata* e *Sapindus saponaria* na busca por compostos de interesse farmacêutico^{4,13,40}, também com plantas de interesse agrícola como *Vitis labrusca* e *Coffea arabica* buscando-se endófitos capazes de combater fitopatógenos^{30,31}.

Portanto os estudos têm demonstrado que os endófitos são uma fonte potencial de novos compostos, muitos dos quais de interesse medicinal ou agrícola. Apenas entre 2008 e 2009 as investigações com fungos endofíticos levaram à descoberta de mais de 100 novos produtos naturais⁶.

Produção de enzimas

Para adentrar nas plantas, os micro-organismos en-

dofíticos produzem enzimas que facilitam sua penetração. Há relatos de produção de celulase, amilase, fenoloxidase, pectinase, xylanase, tirosinase, gelatinase e lipase por fungos endofíticos isolados de diversas plantas^{14,43}. Aparentemente os fungos endofíticos possuem dois tipos de sistemas enzimáticos extracelulares necessários para degradar a biomassa vegetal: o sistema hidrolítico responsável pela degradação dos polissacarídeos, consistindo principalmente em xilanases e celulases; e o exclusivo sistema ligninolítico oxidativo, que degrada a lignina e abre anéis fenil, compreende principalmente lacases, ligninases e peroxidases. A habilidade dos endófitos em degradar a complexa estrutura da lignocelulose os torna potencialmente úteis na exploração da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol combustível e outros produtos químicos de valor agregado¹⁴.

Estes micro-organismos também têm sido utilizados no controle biológico de fitopatógenos, pois podem inibir ou reduzir o crescimento dos patógenos por micoparasitismo, antibiose, produção de metabólitos, competição por nutrientes ou indução de resistência na planta⁷. Uma das formas pelas quais os endófitos competem com os fungos fitopatogênicos é por meio da liberação de enzimas hidrolíticas como proteases, glucanases, chitinases capazes de degradar a parede celular das hifas destes fungos⁴⁴. Tian *et al.* (2008)⁴⁵ observou que plantas colonizadas por endofíticos apresentavam níveis maiores de enzimas de defesa do que plantas não colonizadas indicando que os endofíticos podem induzir a planta a produzir mais enzimas sob pressão da doença.

Robl *et al.* (2013)⁴⁶ avaliaram 110 fungos endofíticos quanto as suas habilidades em produzir hemicelulases e enzimas afins, destacando as linhagens *Aspergillus niger* DR02, *Trichoderma atroviride* DR17 e DR19, *Alternaria* sp. DR45, *Annulohyphoxylon stigyum* DR47 e *Talaromyces wortmannii* DR49, como excelentes produtores de enzimas hidrolíticas para serem usados como parte de misturas para decompor a biomassa de cana a nível industrial.

Orlandelli *et al.* (2015)¹⁵ verificou a produção de protease pelos fungos endofíticos isolados de *P. hispidum*, 28 das 98 linhagens foram capazes de produzir a enzima quando crescidas em meio de cultura indutor. Specian *et al.* (2016)³² analisando bactérias endofíticas de *M. emarginata*, obteve resultados promissores quanto a produção enzimática, foi possível verificar a produção e celulase, amilase, pectinase, xylanase, lipase, protease e esterase.

Os fungos filamentosos são a fonte preferida de enzimas industriais devido à sua excelente capacidade para a produção de proteínas extracelulares. Enzimas obtidas a partir de micro-organismos são amplamente utilizadas na indústria de detergentes, féculas, combustíveis, alimentos, bebidas, têxtil, papel, couro dentre muitas ou-

tras⁴⁷. Neste sentido, os endófitos têm se tornado uma fonte potencial de enzimas de interesse industrial a ser explorada¹⁴.

5. CONCLUSÃO

Os fungos endofíticos desempenham um papel ecológico fundamental para suas plantas hospedeiras trazendo benefícios desde a promoção do crescimento vegetal ao controle de pragas. Sua habilidade em inibir o crescimento de fitopatógenos os torna promissores agentes de controle biológico, beneficiando a saúde humana e o meio ambiente.

Estes micro-organismos representam um reservatório para a descoberta de novos compostos, tais como antibióticos, antioxidantes, imunomoduladores e compostos anticancerígenos e antiparasitários, que podem ser explorados nas indústrias farmacêutica e agroquímica. Também podem ser explorados na produção de diversas enzimas de interesse industrial.

Embora a capacidade dos fungos para produzir metabolitos bioativos únicos seja bem conhecida, os endófitos ainda não foram amplamente explorados, talvez porque estamos apenas começando a entender sua distribuição e biologia.

REFERÊNCIAS

- [01] Azevedo JL. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? Rev bras bot 1999 Out; 22(2):225-229.
- [02] Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews JH, Hirano SS: Microbial Ecology of Leaves. New York: Springer Verlag; 1991.
- [03] Azevedo JL, Araújo WL. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Ganguli BN, Deshmukh SK: Fungi: multifaceted microbes. Boca Raton: CRC press; 2007.
- [04] Garcia A, Rhoden SA, Rubin Filho CJ, Nakamura CV, Pamphile JA. Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindus saponaria* L. and their localization by scanning electron microscopy. Biol Res 2012 Mar; 45(2):139-48.
- [05] Mendes R, Azevedo JL. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: Maia LC, Malosso E, Yano-Melo AN: Micologia: avanços no conhecimento. 1ª ed. Recife: Editora Universitária da UEPE, 2007.
- [06] Aly AH, Debbab A, Proksch P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. Appl Microbiol Biotechnol 2011 Jun; 90(6):1829-45.
- [07] Heydari A, Pessarakli M. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. J Biol Sci 2010; 10(4): 273-290.
- [08] Teixeira MA, Melo IS, Vieira RF, Costa FEC, Harakava R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. Pesq agropec bras 2007 Jan; 42(1): 43-49.
- [09] Izquierdo JA, Nüsslein K. Distribution of extensive *nifH* gene diversity across physical soil microenvironments. Microb Ecol 2006 May; 51(4):441-52.
- [10] Garcia A, Rhoden AS, Bernardi-Wenzel J, Orlandelli RC, Azevedo JL, Pamphile JA. Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Endophytic Fungi Isolated from Medicinal Plant *Sapindus saponaria* L. J Appl Pharm Sci 2012 Oct; 2:35-40.
- [11] Romeralo C, Santamaría O, Pando V, Diez JJ. Fungal endophytes reduce necrosis length produced by *Gremmeniella abietina* in *Pinus halepensis* seedlings. Biol Control 2015 Jan; 80: 30–39.
- [12] Ratnaweera PB, Silva ED, Williams DE, Andersen RJ. Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant *Opuntia dillenii* and the isolation of equisetin, from endophytic *Fusarium* sp. BMC Complement Altern Med 2015 Jul;15:220.
- [13] Polonio JC, Almeida TT, Garcia A, Mariucci GE, Azevedo JL, Rhoden SA, et al. Biotechnological prospecting of foliar endophytic fungi of guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) with antibacterial and antagonistic activity against phytopathogens. Genet Mol Res 2015 Jul 3;14(3):7297-309.
- [14] Corrêa RCG, Rhoden SA, Mota TR, Azevedo JL, Pamphile JA, Souza CGM, et al. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. J Ind Microbiol Biotechnol 2014 Oct;41(10):1467-78.
- [15] Orlandelli RC, Almeida TT, Alberto RN, Polonio JC, Azevedo JL, Pamphile JA. Antifungal and proteolytic activities of endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. Braz J Microbiol. 2015 Jun;46(2):359-66.
- [16] Peixoto Neto PAS, Azevedo JL, Araújo WL. Microrganismos endofíticos. Biotecnologia Cienc Desenvolv 2002; 29:62-77.
- [17] Azevedo JL. Microrganismos endofíticos. In: Melo IS, Azevedo JL: Ecologia microbiana. Jaguariúna: EM-BRAPA; 1998.
- [18] Peixoto Neto PAS, Azevedo JL, Caetano LC. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. BLACPM 2004 Jul; 3(4):69-72.
- [19] Gamboa MA, Laureano S, Bayman P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? Mycopathologia. 2002;156(1):41-5.
- [20] Arnold AE. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. Fungal Biol Ver 2007 May; 21:51–66.
- [21] Bussey III RO, Kaur A, Todd DA, Egan JM, El-Elimat T, Graf TN, et al. Comparison of the chemistry and diversity of endophytes isolated from wild-harvested and greenhouse-cultivated yerba mansa (*Anemopsis californica*). Phytochem Lett 2015 Mar; 11:202–208.
- [22] Hartley SE, Gange AC. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. Annu Rev Entomol. 2009;54:323-42.
- [23] Schulz B, Boyle B. The endophytic continuum. Mycol Res 2005 Jun;109(6):661-86.
- [24] Alvin AA, Miller KI, Neilan BA. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. Microbiol Res 2014 Jul;169(7-8):483-95.
- [25] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of

- Pacific yew. Science. 1993 Apr;260(5105):214-6.
- [26] Kusari S, Verma VC, Lamshoeft M, Spitteller M. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. World J Microbiol Biotechnol 2012 Mar;28(3):1287-94.
- [27] Puri SC, Verma V, Amna T, Qazi GN, Spitteller M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. J Nat Prod 2005 Dec;68(12):1717-9.
- [28] Gao F, Dai C, Liu X. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. Afr J Microbiol Res 2010 Aug; 4(13):1346-1351, 2010.
- [29] Orlandelli RC, Almeida TT, Alberto RN, Specian V, Azevedo JL, Pamphile JA. *In vitro* inhibition of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* by crude ethyl acetate extracts of endophytic fungi isolated from *Piper hispidum* Sw. AAAS 2014 Jan; 2:1-8.
- [30] Felber AC, Orlandelli RC, Rhoden SA, Garcia A, Costa AT, Azevedo JL, et al. Bioprospecting foliar endophytic fungi of *Vitis labrusca* Linnaeus, Bordô and Concord cv. Ann Microbiol 2016 Jun; 66:765-775.
- [31] Bongiorno VA, Rhoden SA, Garcia A, Polonio JC, Azevedo JL, Pereira JO, Pamphile JA. Genetic diversity of endophytic fungi from *Coffea arabica* cv.IAPAR-59 in organic crops. Ann Microbiol 2016 Jun; 66: 855-865.
- [32] Specian V, Costa AT, Felber AC, Polonio JC, Azevedo JL, Pamphile JA. Molecular phylogeny and biotechnological potential of bacterial endophytes associated with *Malpighia emarginata*. Genet Mol Res 2016 Apr;15(2):1-19.
- [33] Bogner CW, Kariuki GM, Elashry A, Sichtermann G, Buch AK, Mishra B, et al. Fungal root endophytes of tomato from Kenya and their nematode biocontrol potential. Mycol Progress 2016 Mar; 15: 30.
- [34] Lima AO, Quecine MC, Fungaro MH, Andreote FD, Maccheroni W Jr, Araújo WL, et al. Molecular characterization of a β -1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. Appl Microbiol Biotechnol 2005 Jul;68(1):57-65.
- [35] Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. Nat Prod Rep. 2001 Aug;18(4):448-59.
- [36] Melo FMP, Fiore MF, Moraes LAB, Silva-Stenico ME, Scramin S, Teixeira MA, et al. Antifungal compound produced by the cassava endophyte *Bacillus pumilus* MAIIM4A. Sci Agric 2009 Sep; 66(5): 583-592.
- [37] Suzuki MT. Isolamento, identificação e caracterização de linhagens endofíticas de *Bacillus thuringiensis* de mandioca (*Manihot esculanta* Crantz). [Dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo; 2006.
- [38] Pimentel MR, Molina G, Dionísio AP, Maróstica Junior MR, Pastore GM. The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process. Biotechnol Res Int 2011; 2011:1-11.
- [39] Santos TT, Varavallo MA. Application endophytic microorganisms in agriculture and production of substances of economic interest. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde 2011 Jul; 32(2):199-212.
- [40] Rhoden SA, Garcia A, Bongiorno VA, Azevedo JL, Pamphile JA. Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Trichilia elegans* A Juss. J Appl Pharm Sci 2012 Aug; 2(8):57-59.
- [41] Orlandelli RC, Alberto RN, Almeida TT, Azevedo JL, Pamphile JA. *In vitro* Antibacterial Activity of Crude Extracts Produced by Endophytic Fungi Isolated from *Piper hispidum* Sw. J Appl Pharm Sci 2012 Oct; 2(10):137-141.
- [42] Polonio JC, Ribeiro MA, Rhoden SA, Sarragiotto MH, Azevedo JL, Pamphile JA. 3-Nitropropionic acid production by the endophytic *Diaporthe citri*: Molecular taxonomy, chemical characterization, and quantification under pH variation. Fungal Biol 2016 Dec;120(12):1600-1608.
- [43] Souza HQ, Oliveira LA, Andrade JS. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. Ciênc Tecnol Aliment 2008 Dez; 28:116-24.
- [44] Almeida FBR, Cerqueira FM, Silva RN, Ulhoa CJ, Lima AL. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. Biotechnol Lett. 2007 Aug;29(8):1189-93.
- [45] Tian P, Nan Z, Li C, Spangenberg G. Effect of endophyte *Neotyphodium lolii* on susceptibility and host physiological response of perennial ryegrass to fungal pathogens. Eur J Plant Pathol 2008 Dec; 122: 593-602.
- [46] Robl D, Delabona P, Mergel CM, Rojas JD, Costa P, Pimentel IC, et al. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. BMC Biotechnology 2013;13(1):94.
- [47] Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. Industrial enzyme applications. Curr Opin Biotechnol. 2002 Aug;13(4):345-51.