

Verificação da Produção de Substâncias Antimicrobianas por Fungos Endofíticos Associados à Soja (*Glycine max* (L.) Merrill) no Estado do Tocantins

*Verification of the Production of Antimicrobial Substances by Endophytic Fungi Associated to Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) in Tocantins State*

Thompson de Oliveira Turibio¹, Eskálath Morganna Silva Ferreira², Francisca Maria Pinheiro Sousa³, Juliana Fonseca Moreira Silva⁴, Raphael Sanzio Pimenta⁵

RESUMO

Fungos endofíticos são micro-organismos que colonizam os tecidos internos de vegetais, de forma intra ou intercelular, sem causar dano ao hospedeiro. Até o momento, foram detectadas a presença de fungos endofíticos em todas as espécies de plantas amostradas, de briófitas a angiospermas. A soja (*Glycine max*) é uma das culturas vegetais mais importantes no Brasil e no mundo, principalmente devido a sua grande concentração de óleo e proteínas. Neste estudo foram isolados fungos endofíticos associados à soja e verificado o seu potencial de produção de substâncias antagonistas a patógenos de interesse médico e agrônômico. Os endófitos foram agrupados macro-morfológicamente em morfoespécies, das quais foram realizados extratos metanólicos que foram avaliados quanto a sua capacidade de inibir *in vitro*, os seguintes micro-organismos alvos: *Candida albicans* ATCC 18804, *C. krusei* ATCC 20298, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 e *Colletotrichum gloeosporioides* CG 162. Foram obtidos 140 isolados a partir de 480 fragmentos de folhas. Estes isolados foram agrupados em 34 morfoespécies. Sendo que 77 isolados foram capazes de inibir o crescimento de pelo menos uma bactéria, 54 inibiram o crescimento de *S. aureus*, 23 inibiram *E. coli* e 18 inibiram tanto *S. aureus* quanto *E. coli*. Nenhum isolado foi capaz de inibir os fungos testados. Contudo, novos estudos devem ser realizados para identificar molecularmente as morfoespécies e caracterizar as substâncias inibitórias produzidas.

Palavras-chave: Substâncias bioativas. Antibacteriano. Antifúngico.

ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms that colonize the inner of vegetable, intra or intercellular without to produce any harm to their host. Until today, were detected the presence of endophytic fungi in all plant species studied from bryophytes to angiosperms. The soybean (*Glycine max*) is one of the most important cultures in Brazil and world, mainly due their great concentration of oil and proteins. In this study we isolate endophyte fungi associated to soybean e was verified their potential to produce antagonistic substances against pathogens of human and vegetables. The endophytes were grouped by macro-morphological characteristics in morphospecies, from that were made methanolic extracts and evaluated in vitro against: *Candida albicans* ATCC 18804, *C. krusei* ATCC 20298, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 and *Colletotrichum gloeosporioides* CG 162. Were obtained 140 strains from 480 samples of leafs. This strays were grouped in 34 morphospecies and 77 strains inhibited the growth of at least one bacteria, 54 inhibited *S. aureus*, 23 inhibited *E. coli* and 18 inhibited both of them. No one strain was able to inhibit the fungi pathogens tested. However, new studies are necessary to identify by molecular biology the endophytes species and to characterize the antagonistic substances that were produced.

Keywords: Bioactive substances. Antibacterial. Antifungal.

¹ Biólogo, mestre em ecologia de ecótonos pela Universidade Federal do Tocantins (UFT)..

E-mail:

thompsonuribio@hotmail.com

² Doutoranda em Biotecnologia (BIONORTE/UFT).

³ Doutora em Microbiologia, professora substituta da Universidade Federal do Tocantins (UFT).

⁴ Doutora em Microbiologia, professora do curso de medicina da Universidade Federal do Tocantins (UFT).

⁵ Doutor em Microbiologia, professor do curso de medicina da Universidade Federal do Tocantins (UFT).

1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos endofíticos são isolados das mais variadas espécies vegetais e podem colonizar diferentes órgãos vegetais, como: caules, folhas, raízes, sementes, flores e espinhos (CARVALHO et al., 2012; HODGSON et al. 2014; QADRI et al., 2014; RIESS et al., 2014; FERREIRA et al., 2015). Estes fungos têm sido isolados de todas as plantas previamente estudadas, incluindo briófitas, pteridófitas e angiospermas (HYDE e SOYTONG, 2008).

A maioria das cepas de fungos endofíticos que são normalmente isoladas são anamorfos de espécies do filo Ascomycota. Estudos sobre plantas tropicais tem documentado uma notável riqueza endofítica, sendo que muitos destes isolados são produtores de uma ampla variedade de metabólitos secundários com atividades biológicas (HYDE e SOYTONG, 2008; VIEIRA et al., 2014). Estes fungos são considerados por diversos autores como sendo uma fonte importante para a obtenção de substâncias com atividade antibacteriana e antifúngica. Esta atividade antimicrobiana já foi observada contra diversas espécies de patógenos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias Gram positivas e negativas (CARVALHO et al., 2015; VAZ et al., 2012). O compartilhamento de genes e entre os fungos e seus hospedeiros sugere que exista uma relação co-evolutiva entre ambos (CAMATTI-SARTORI et al., 2005). Os fungos endofíticos podem ser transmitidos verticalmente da planta parental para seus descendentes, ou horizontalmente, através de infecções através da cutícula, aberturas naturais ou lesões (SAIKKONEN et al., 2004; SCHULZ e BOYLE, 2005).

A diversidade de espécies de fungos endofíticos isoladas de um mesmo hospedeiro varia significativamente, e a maior parte dessa variação ocorre devido aos métodos de isoladamente e características edafo-ambientais (HYDE e Soyton, 2008).

Estudos relacionados ao isolamento e identificação de fungos endofíticos do tecido foliar de soja foram desenvolvidos nos Estados Unidos por Miller e Roy (1982), na Argentina, por Larran et al., 2002, e no Brasil por Pimentel et al. 2006; sendo estes países os maiores produtores de soja do mundo. A soja é uma espécie vegetal pertencente à família Fabaceae (Leguminosae), sendo a espécie *Glycine max* (L) Merril a mais cultivada (SEDIYAMA, 2009).

A soja é uma das mais importantes culturas agrícolas mundiais pelo fato de seu grão ser rico em óleo e em proteínas (SEDIYAMA, 2009). Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi isolar e caracterizar fungos endofíticos associados à *Glycine max* (L.) e

avaliar o potencial destes micro-organismos quanto à produção de metabólitos com atividade antimicrobiana.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COLETA DAS AMOSTRAS, ISOLAMENTO E AGRUPAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Sementes de soja (*Glycine max*) foram obtidas do banco de germoplasmas da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Gurupi (linhagem M-Soy 8360 RR). Estas sementes foram cultivadas em vasos na Área Experimental do Campus de Palmas da Universidade Federal do Tocantins (UFT). Após 90 dias do plantio, foram coletadas 5 folhas saudáveis de 32 indivíduos. As folhas foram armazenadas em sacos plásticos e processadas imediatamente no Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada da UFT.

As folhas coletadas foram lavadas inicialmente com detergente neutro e enxaguadas com água destilada estéril, de cada folha foram retirados 3 fragmentos, com cerca de 1 cm de diâmetro, totalizando um total de 480 fragmentos. Estes fragmentos foram desinfestados superficialmente através da imersão em álcool 70% (1 min.), hipoclorito de sódio 2% (3 min.) e água destilada estéril (2 min.) (COLLADO et al., 2006). Após desinfecção superficial, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo Agar Batata Dextrose (BDA/Difco) suplementado com 100 µg/ml de cloranfenicol (Sigma/EUA).

As placas foram incubadas a 25 °C por um período de até 60 dias. Os isolados fúngicos obtidos após a incubação foram transferidos para novas placas de Petri contendo meio BDA e incubados a 25 °C por 7 dias para purificação das colônias. Em seguida, foi realizada a caracterização morfológica dos isolados e agrupamento dos mesmos em morfoespécies. Os isolados foram agrupados de acordo com as seguintes características macro-morfológicas: cor da colônia (frente e verso), textura da superfície (frente e verso) e aspecto da borda (ZHOU et al., 2010).

Todos os isolados foram depositados na coleção de Cultura Carlos Augusto Rosa da Universidade Federal do Tocantins, acondicionados em tubos criogênicos de 2 ml contendo glicerol a 30% e mantidos sob refrigeração a -80 °C em triplicata.

2.2 CÁLCULO DA FREQUÊNCIA DE COLONIZAÇÃO

A frequência de colonização, corresponde ao número de fragmentos colonizados, foi calculada utilizando-se a fórmula: $Nd/Nt \times 100$, onde Nd e Nt correspondem,

respectivamente, ao número de amostras das quais foi possível isolar um ou mais fungos endofíticos e ao número total de fragmentos amostrados (TAYLOR et al., 1999).

2.3 PREPARO DE EXTRATOS VEGETAIS

As partes remanescentes de folhas dos 32 indivíduos de *Glycine max*, não utilizadas para o isolamento de fungos endofíticos, foram transferidas para tubos que continham 25 ml de metanol P.A, macerados e mantidos ao abrigo da luz por um período de 15 dias a 4 °C. Após este período sobrenadante (extrato metanólico) foi filtrado através de filtro whatman N° 4 e seco em estufa. Os extratos brutos obtidos foram transferidos para novos tubos e posteriormente foram secos em estufa em temperatura inferior a 35°C.

2.4 PREPARO DOS EXTRATOS FÚNGICOS

Os fungos filamentosos foram cultivados em meio BDA a 28 °C por 14 dias. Após esse período, foi realizada a maceração do micélio juntamente com o meio de cultivo utilizando uma espátula estéril. Os fragmentos foram transferidos para tubos cônicos de 50 ml, sendo adicionados 25 ml de metanol P.A., os tubos foram mantidos refrigerados a 4°C por 7 dias, em seguida o sobrenadante foi filtrado e seco em estufa. Os extratos brutos obtidos foram transferidos para novos tubos e posteriormente secos em estufa a temperatura inferior a 35°C.

Os extratos secos obtidos, tanto vegetais como fúngicos foram solubilizados em solução de água: metanol (9:1) a uma concentração de 10 mg/ml e mantidos a -20°C para posterior utilização nos ensaios antimicrobianos.

2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIANA DOS EXTRATOS

A determinação da atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos foi realizada pelo método de difusão em disco utilizando-se os seguintes micro-organismos alvos: *Candida albicans* ATCC 18804, *C. krusei* ATCC 20298, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 e *Colletotrichum gloeosporioides* CG 162. Foram considerados ativos os extratos que apresentaram inibição acima de 50 % em comparação com o controle e que mantiveram a atividade contra pelo menos um dos micro-organismos alvo, quando testados em triplicata.

2.6 PADRONIZAÇÃO DOS INÓCULOS

Os inóculos das leveduras foram padronizados por meio da escala de Mac Farland nº 1 em densidade óptica, o que corresponde a aproximadamente 3×10^8 UFC/ml (YARROW, 1998). As leveduras foram crescidas em Agar Sabouraud a 28 °C por 48 h. Cinco colônias foram suspensas em solução salina estéril a 0,85 %. A suspensão resultante foi homogeneizada e a densidade celular ajustada com espectrofotômetro, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a absorvância equivalente à de uma solução-padrão da escala de Mc Farland nº 1, em comprimento de onda de 530 nm (NCCLS, 2003).

Os inóculos das bactérias foram padronizados por meio da escala de Mc Farland nº 0,5 em densidade ótica, o que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. As bactérias foram crescidas em ágar BHI a 37°C por 24 h. Cinco colônias foram suspensas em solução salina estéril a 0,85 %. A suspensão resultante foi homogeneizada e a densidade celular ajustada com espectrofotômetro, acrescentando-se solução salina suficiente para obter a absorvância equivalente à de uma solução-padrão da escala de Mc Farland nº 0,5 em comprimento de onda de 625 nm (NCCLS, 2003).

Para a padronização do inóculo do fungo filamentosos, culturas puras de *Colletotrichum gloeosporioides* foram previamente crescidas em meio ágar BDA, a 28 °C no escuro. Ao atingir a fase de maior esporulação (14 dias), cerca de 10-20 ml de polissorbato- 20 (Tween®) a 0,05% foi vertida sobre as culturas e, com o auxílio de uma alça de semeadura, o crescimento fúngico foi raspado e os esporos foram coletados em condições assépticas. A concentração celular foi estimada através de uma câmara de Neubauer e ajustada por diluição em solução salina para uma concentração final de 1×10^4 esporos/ml.

2.7 ENSAIO ANTIMICROBIANO

Para a realização dos ensaios antimicrobianos, uma alíquota de 100 µl de cada uma das suspensões celulares de leveduras e bactérias previamente padronizadas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud para as leveduras e meio ágar BHI para as bactérias e semeadas com alça de Drigalski (SILVA et al., 2015). Discos de papel estéreis (6,2 mm de diâmetro) foram colocados sobre a superfície seca das placas inoculadas com os micro-organismos alvo e 10 µl da solução em água: metanol (9:1) de cada extrato (10 mg/ml) foi aplicado sobre os discos. Foram considerados ativos os extratos que apresentaram halo de inibição após um período de incubação de 48 horas a 28 °C e 37 °C para as leveduras e bactérias, respectivamente.

Para a determinação da atividade antifúngica contra o fungo filamentos, 10 µl de cada extrato foi aplicado em papel de filtro e secos à temperatura ambiente. A suspensão contendo esporos de *Colletotrichum gloeosporioides* na concentração final de 1×10^4 esporos/ml foi borrifada sobre o papel de filtro onde as amostras foram aplicadas e, em seguida, o mesmo foi incubado por 72 h a 28 °C em câmara úmida. Após este período, foi observada a presença/ausência do crescimento fúngico próximo às áreas de aplicação dos extratos. Como controles positivos foram aplicados 10 µl de cloranfenicol (Sigma/EUA) para as bactérias e 10 µl de anfotericina B (Sigma/EUA) para as leveduras e fungo filamentos.

O extrato do meio de cultura sem crescimento fúngico, e 10 µl da solução água: metanol (9:1) foram utilizados como controles negativos. Todos os extratos brutos foram avaliados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 140 isolados de fungos endofíticos a partir dos 480 fragmentos de folhas de *Glycine max* L. analisados, resultando numa taxa de colonização de 29.2 % (Tabela1). Esse valor foi superior ao descrito por Pimentel et al. (2006), que obtiveram uma taxa de colonização de 17,2 %, quando estudaram a colonização de fungos endofíticos de *Glycine max* L. em diferentes condições ambientais. Porém, há poucos relatos de trabalhos que a microbiota endofítica presente nas folhas deste grupo de plantas. No entanto a soja abriga uma alta diversidade morfológica de fungos endofíticos, o que sugere uma interação ecológica bastante complexa entre a soja e os fungos endofíticos (LARRAN et al., 2002; PIMENTEL et al., 2006).

Os 140 fungos isolados foram agrupados em 34 morfoespécies (Figura 1), sendo que cada grupo compartilha os mesmos aspectos macromorfológicos das estruturas vegetativas (GAMBOA e BAYMAN, 2001; SOUZA et al., 2004). As morfoespécies mais frequentes foram M7, M27 e M31 todos com 11 (7,9 %) isolados e as menores frequências foram observadas nos grupos M8, M11, M13, M21, M25, M30, M32 e M34 com apenas um isolado.

Tabela 1. Frequência de isolamento de fungos endofíticos associados a *Glycine max*.

Hospedeiro	Frequência de isolados	Frequência (%)
P1	6	4,3
P2	5	3,6
P3	3	2,1
P4	4	2,9
P5	6	4,3
P6	2	1,4
P7	1	0,7
P8	2	1,4
P9	2	1,4
P10	7	5,0
P11	4	2,8
P12	6	4,3
P13	0	0,0
P14	7	5,0
P15	2	1,4
P16	6	4,3
P17	0	0,0
P18	2	1,4
P19	8	5,7
P20	1	0,7
P21	9	6,4
P22	4	2,9
P23	6	4,3
P24	4	2,9
P25	4	2,9
P26	6	4,3
P27	4	2,9
P28	7	5,0
P29	6	4,3
P30	5	3,6
P31	2	1,4
P32	9	6,4
Total	140	100

Os extratos vegetais não apresentaram nenhuma atividade contra os micro-organismos alvo (*Candida albicans*, *C. krusei*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Colletotrichum gloeosporioides*), o que permite supor que a inibição, proporcionada pelos extratos fúngicos, se deve a substâncias secretadas pelos fungos endofíticos.

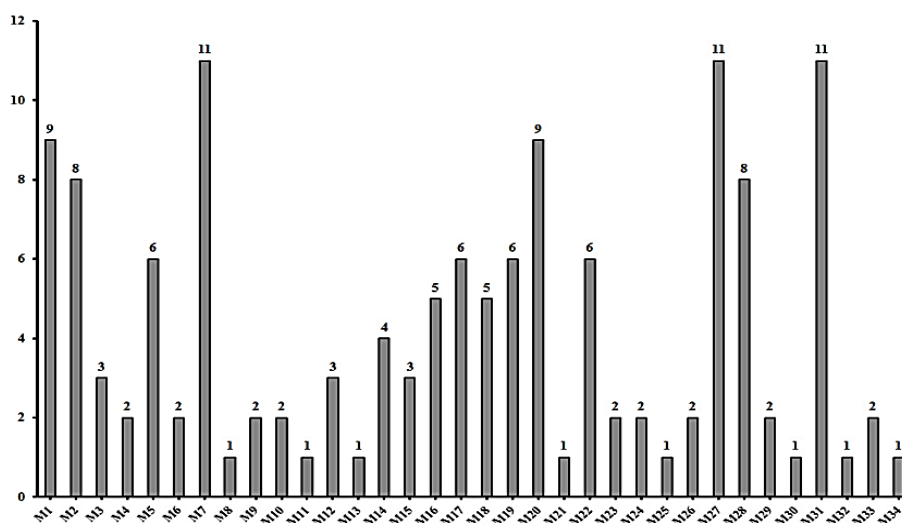


Figura 1. Frequência de morfotipos de fungos endofíticos isolados de *Glycine max* linhagem M-Soy 8360 RR.

Dos 140 extratos fúngicos brutos avaliados, 77 (55 %) foram ativos contra pelo menos um dos micro-organismos alvo (Figura 2). Do total de extratos ativos, 54 (38,6 %) apresentaram atividade contra *S. aureus* e 23 (16,4 %) contra *E. coli*. Sendo que 18 (12,9 %) extratos apresentaram atividade contra dois micro-organismos. Nenhum extrato foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans*, *C. krusei* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Souza et al. (2004) realizaram um estudo com extratos de 79 linhagens de fungos endofíticos, dos quais apenas 24,1 % apresentaram atividades antagônicas contra um ou mais micro-organismos-teste utilizados nestes ensaios. Porém, estes extratos não apresentaram atividade inibitória contra *Candida albicans*, corroborando com os resultados apresentados neste trabalho, em que nenhum extrato fúngico teve a capacidade de inibir o crescimento deste micro-organismo.

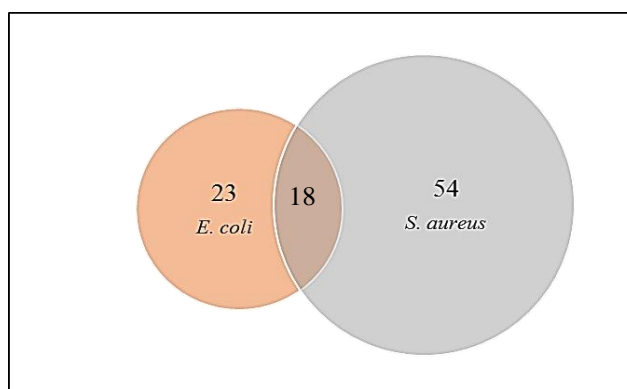


Figura 2. Diagrama de Venn, número extratos positivos contra *E. coli*, *S. aureus* e contra ambas as bactérias.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo dos fungos endofíticos associados a monoculturas ainda é incipiente e precisa ser melhor compreendido, principalmente no que se refere às culturas tropicais. Estes dados poderão subsidiar estratégias de controle biológico e colaborar para a bioprospecção de substâncias bioativas de interesse econômico. Contudo, novos estudos voltados principalmente para a identificação das espécies de fungos endofíticos associados a soja e a caracterização das substâncias antagonistas produzidas ainda merecem atenção em estudos futuros.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a C. Martins Coelho. Este estudo foi apoiado pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) (AUXPE-PRO-AMAZONIA-3312/2013 / processo nº 23038.010315 / 2013-66).

REFERÊNCIAS

- CAMATTI-SARTORI, V.; DA SILVA-RIBEIRO, R. T.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; PAGNOCCA, F. C.; ECHEVERRIGARAY, S.; AZEVEDO, J. L. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. **J. Basic Microb**, v. 45, p. 397–402, 2005.
- CARVALHO, C. R.; GONÇALVES, V. N.; PEREIRA, C. B.; JOHANN, S.; GALLIZA, I. V.; ALVES, T. M. A.; RABELLO, A.; SOBRAL, M. E. G.; ZANI, C. L.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. 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, p. 95-107, 2012.
- CARVALHO, C. R.; VIEIRA, M. L. A.; CANTRELL, C. L.; WEDGE, D. E.; ALVES, T. A. A.; ZANI, C. L.; PIMENTA, R. S.; SALES JUNIOR, P. A.; MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Biological activities of ophiobolin K and 6-epi-ophiobolin K produced by the endophytic fungus *Aspergillus calidoustus*. **Natural product research**, V. 30, p. 478-481, 2015
- COLLADO, J.; PLATAS, G.; PELÁEZ, F. Fungal endophytes in leaves, twigs and bark of *Quercus ilex* from Central Spain. **Nova Hedwigia**, v. 63, p. 347–360, 1996.
- FERREIRA, M. C.; VIEIRA, M. D. L. A.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A.; JUNIOR, P. A. S.; MURTA, S. M.; ROMANHA, A. J.; GILE, L. H., V. G.; CARVALHO, A. G. O.; ZILLIG, J. E.; VITAL, M. J. S.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal

Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p. 36-44, 2015.

GAMBOA, M.A.; BAYMAN, P. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*). **Biotropica**, v. 33, p. 352-360, 2001.

HODGSON, S.; CATES, C.; HODGSON, J.; MORLEY, N. J.; SUTTON, B. C.; GANGE, A. C. Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. **Ecology and Evolution**, v. 4, n. 8, p. 1199-1208, 2014.

HYDE, K. D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, v. 33, p.163-173, 2008.

SILVA, J. F. M.; PELUZIO, J. M.; PRADO, G.; MADEIRA, J. E. G. C.; SILVA, M. O.; MORAIS, P. B.; ROSA, C. A.; PIMENTA, R. S.; NICOLI, J. R. Use of Probiotics to Control Aflatoxin Production in Peanut Grains. **The Scientific World Journal**, 2015. doi:10.1155/2015/959138

LARRAN, S.; PERELLÓ, A.; SIMÓN, M. R.; MORENO, V. Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 683-686, 2002.

MILLER, W. A.; ROY, K. W. Effects of benomyl on the colonization of soybean leaves, pods and seeds by fungi. **Plant Disease**, v.66, n.10, p. 918-920, 1982.

NCCLS. 2003. Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6 ed. Approved Standard M7-A6, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wyane, PA, USA.

PIMENTEL, I. C.; GLIENKE-BLANCO, C.; GABARDO, J.; STUART, R. M.; AZEVEDO, J. L. Identification and colonization of endophytic fungi from soybean (*Glycine max* L.) Merrill under different environmental conditions. **Brazilian Arch. Biol. Technol.** v. 49, p. 705–711, 2006.

QADRI, M.; RAJPUT, R.; ABDIN, M. Z.; VISHWAKARMA, R. A.; RIYAZ-ULHASSAN, S. Diversity, molecular phylogeny, and bioactive potential of fungal endophytes associated with the himalayan blue pine (*Pinus wallichiana*). **Microbial Ecology**, v. 67, n. 4, p. 877-887, 2014.

RIESS, K.; OBERWINKLER, F.; BAUER, R.; GARNICA, S. Communities of endophytic Sebaciniales associated with roots of herbaceous plants in agricultural and grassland ecosystems are dominated by *Serendipita herbamans* sp. nov. **PloS One**, v. 9, n.4, 2014.

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S. H. Evolution of endophyte plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 275-280, 2004.

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

SEDIYAMA, T. Tecnologias de Produção e Usos da Soja: Londrina: **Mecenas**, 2009.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas

tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**. v. 34, n. 2, p. 185 – 195, 2004.

TAYLOR, J., HYDE, K.; JONES, E. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. **New Phytologist**, v. 142, n. 2, p. 335-346, 1999.

Vaz, A. B. M., Brandão, L. R.; Vieira, M. L. A.; Pimenta, R. S.; Morais, P. B.; Sobral, M. E. G.; Rosa, L. H.; Rosa, C. A. Diversity and antimicrobial activity of fungal endophyte communities associated with plants of Brazilian savanna ecosystems. **African Journal of Microbiology Research**, V. 6, p. 3173-3185, 2012.

VIEIRA, M. L. A.; JOHANN, S.; HUGHES, F. M.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. The diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with medicinal plant *Baccharis trimera* (Asteraceae) from the Brazilian savannah. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 60, p. 847-856, 2014.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 4 ed. (C. P. KURTZMAN, J. W. FELL, eds.) Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science B. V. 1998.

ZHOU, X.; ZHU, H.; LIU, L.; LIN, J.; TANG, K. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 86, p. 1707–1717, 2010.