

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

HELOÍSE DE OLIVEIRA ELIAS

Bioprospecção de fungos endofíticos isolados de *Azadirachta indica* (A. Juss) com
potencial de produção de enzimas hidrolíticas e controle do fitopatógeno
Macrophomina phaseolina.

CAMPO GRANDE - MS
2023

HELOÍSE DE OLIVEIRA ELIAS

Bioprospecção de fungos endofíticos isolados de *Azadirachta indica* (A. Juss) com
potencial de produção de enzimas hidrolíticas e controle do fitopatógeno
Macrophomina phaseolina.

Dissertação apresentada como parte das exigências
para obtenção do título de MESTRE EM
BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia da Universidade Católica Dom
Bosco – Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Marcelo Espinola
Carvalho

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Tognolli de Almeida

CAMPO GRANDE - MS
junho – 2023

E42b Elias, Heloíse de Oliveira

Bioprospecção de fungos endofíticos isolados de *Azadirachta indica* (A. Juss) com potencial de produção de enzimas hidrolíticas e controle do fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*/ Heloíse de Oliveira Elias sob orientação do Prof. Dr. Cristiano Marcelo Espinola Carvalho e Prof. Dr. Tiago Tognolli de Almeida.-- Campo Grande, MS : 2023.

54 p.: il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande- MS, 2023
Bibliografia: p. 8- 15

1. Detecção de enzimas microbianas.
2. Fungos endofíticos.
3. Amilase.
4. Lipase.
5. Esterase.
6. Pectinase.
7. Protease - Antagonismo I. Carvalho, Cristiano Marcelo Espinola. II. Almeida, Tiago Tognolli de. III. Título.

**"BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE
AZADIRACHTA INDICA (A. JUSS) COM POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE
ENZIMAS HIDROLÍTICAS E CONTROLE DO FITOPATÓGENO
MACROPHOMINA PHASEOLINA"**

Autora: HELOÍSE DE OLIVEIRA ELIAS

Orientador: Prof. Dr. CRISTIANO MARCELO ESPINOLA CARVALHO

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADA EM 27 DE JUNHO DE 2023.

Prof. Dr. Cristiano Marcelo Espinola Carvalho (Orientador) – UCDB

Prof. Dr. Tiago Tognoli de Almeida (FACSUL)

Profa. Dra. Karla Rejane de Andrade Porto (FACSUL)

Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira (UCDB)

EPÍGRAFE

“A ciência é a alma da prosperidade das nações e a fonte de todo o progresso.”
Louis Pasteur

DEDICATÓRIA

Ao papai Pedro e mamãe Vera Marta, este trabalho é dedicado a vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Nossa Pai Criador, justo e bom, de inteligência suprema e soberana, pela vida, e na confiança que este trabalho seja um instrumento de sua sabedoria.

Ao meu esposo Antonio Alex, meu melhor e eterno amigo, alegria dos meus dias, amor maior de toda vida.

As minhas irmãs Simone e Juliane, pedaço de mim.

As meninas Aline e Alice, presentes de Jesus e Nossa Senhora na minha história.

Ao professor, orientador Cristiano Marcelo Espinola Carvalho, por aceitar esse desafio comigo, acreditar nas minhas ideias e por não me deixar desistir.

Ao professor, coorientador Tiago Tognolli de Almeida, pelos ensinamentos, objetividade, dedicação e paciência.

A amiga irmã Vania Maria, pelas ideias, e por fazer parte da minha vida, sempre.

A amiga Geiza Thaiz Dominguez Monje pela ajuda despendida ao longo do mestrado.

Ao Comando do 9º Grupamento Logístico do Exército Brasileiro, pelo apoio, reconhecimento pessoal, profissional e honra à educação.

A Universidade Católica Dom Bosco, pela convicção de mundo, de sociedade, de tecnologia e de humanidade, e por proporcionar meus estudos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela viabilização de minha formação.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Heloíse de Oliveira Elias, é natural de Campo Grande – Mato Grosso do Sul, nascida em seis de maio de mil novecentos e oitenta e dois. É filha do meio de Pedro Elias Filho e Vera Marta de Oliveira Elias. Graduada em Medicina Veterinária em 2004, e Pós-graduada em Gestão na Qualidade dos Alimentos e Vigilância Sanitária em 2008, pela Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal. Atuação em Segurança de Alimentos, Gestão da Qualidade e Produtividade. No presente tempo, Oficial Médica Veterinária do Exército Brasileiro no 9º Grupamento Logístico.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURA(S).....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO.....	1
1. Fungos endofíticos.....	1
1.1 <i>Azadirachta indica</i> e a produção de fungos endofíticos.....	2
1.2 Fungos endofíticos na produção de enzimas.....	2
2. Enzimas de interesse industrial.....	3
2.1 Amilase.....	4
2.2 Lipase.....	5
2.3 Esterase.....	5
2.4 Pectinase.....	6
2.5 Protease.....	6
3. Fitopatógeno <i>Macrophomina phaseolina</i>	7
4. A Soja.....	7
REFERÊNCIAS.....	8
OBJETIVOS.....	16

	Página
Geral.....	16
ESPECÍFICOS.....	16
Artigo Científico - Bioprospecção de fungos endofíticos isolados de <i>Azadirachta indica</i> (A. Juss) com potencial de produção de enzimas hidrolíticas e controle do fitopatógeno <i>Macrophomina phaseolina</i>	17
Abstract.....	17
1. Introdução.....	19
2. Materiais e métodos.....	21
2.1 Isolamento.....	21
2.1.1 Obtenção dos fungos.....	21
2.1.2 Identificação molecular dos isolados endofíticos.....	21
2.2 Avaliação da produção enzimática por endófitos isolados de <i>Azadirachta indica</i>	22
2.2.1 Atividade amilolítica.....	22
2.2.2 Atividade lipolítica.....	22
2.2.3 Atividade esterásica.....	22
2.2.4 Atividade pectinolítica.....	23
2.2.5 Atividade proteolítica.....	23
2.3 Índice enzimático e análise estatística.....	23
2.4 Atividade antagonística <i>in vitro</i> dos endófitos isolados contra o fitopatógeno <i>Macrophomina phaseolina</i>	24
3. Resultados.....	25
3.1 Isolamento dos fungos endofíticos.....	25
3.2 Identificação molecular	25

	Página
3.3 Atividade enzimática.....	25
3.4 Índice de Antagonismo.....	26
4. Discussão.....	27
5. Conclusão.....	30
6. Referências.....	31
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Árvore filogenética construída com sequências endofíticas de <i>Azadirachta indica</i> e sequências do GenBank (indicadas pelo código do banco de dados), usando o método de junção de vizinhos usando p-distance para nucleotídeos, com a opção de deleção de gap pairwise. Os números acima e abaixo de cada nó indicam a frequência (em porcentagem) de cada ramificação em análises bootstrap de 10.000 réplicas.....	35
Figura 2. Teste antagônico de fungos isolados de <i>Azadirachta indica</i> contra o fungo fitopatogênico <i>Macrophomina phaseolina</i> . A) Isolado AI27A; B) Isolado AI30B (<i>Alternaria</i> sp.); C) Isolado AI25B (<i>Phyllosticta</i> sp.); D) Isolado AI12A; E) Isolado AI11A; F) Isolado AI2A; G) Isolado AI3A.....	36

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Endófitos isolados e identificados de <i>Azadirachta indica</i> e o percentual de identidade encontrados no site do NCBI (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)	37
Tabela 2. Identificação e atividade enzimática de fungos endofíticos isolados de <i>Azadirachta indica</i>	38
Tabela 3. Atividade antagonística <i>in vitro</i> dos endófitos isolados contra o fitopatógeno <i>Macrophomina phaseolina</i>	39

LISTA DE ABREVIATURA(S)

BDA	Batata Dextrose Ágar
B.O.D	Demand Bioquímica de Oxigênio
IE	Índice Enzimático
IA	Índice de Antagonismo
ITS	Internal Transcribed Space
N.I	Não Identificado
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

RESUMO

Fungos endofíticos se hospedam em tecidos vegetais, onde vivem sem causar danos aparentes. São capazes de produzir bioativos úteis para agricultura e aplicações nas indústrias farmacêutica, alimentícia e meio ambiente. Esses endófitos despertam interesse na produção de enzimas hidrolíticas e no controle de fitopatógenos, em substituição à substâncias químicas, visando processos de menor impacto ambiental. *Azadirachta indica*, conhecida como neem, é uma planta que abriga fungos endofíticos. O fungo *Macrophomina phaseolina* é um fitopatógeno causador de patologias na produção da soja, levando a significativas perdas econômicas. Com isso, o objetivo deste estudo foi identificar fungos endofíticos isolados de *Azadirachta indica*, avaliar a produção *in vitro* das enzimas amilase, lipase, esterase, pectinase e protease, bem como, avaliar o potencial de inibição contra o fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*. Dos isolados testados, o endofítico AI30B, identificado como *Alternaria*, apresentou resultados positivos na produção das enzimas protease, esterase e lipase, e o endofítico AI25B, do gênero *Phyllosticta*, demonstrou capacidade na produção da pectinase, além disso, ambos foram positivos no teste antagônico contra o fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*, com resultados de maior relevância neste estudo. A enzima amilase foi produzida apenas pelo isolado endofítico AI35B, no qual houve a impossibilidade de identificação, fato que também ocorreu para outros fungos isolados. O endofítico AI6, do gênero *Phyllosticta* sp., produziu a enzima pectinase, porém, sem atividade antagonista. Os isolados AI37A, AI19B e AI27A, não identificados, foram positivos na produção da enzima esterase, e para protease, os gêneros com resultados positivos foram o AI9A (*Colletotrichum* sp.), AI15A (*Colletotrichum* sp.), AI17B (*Preussia* sp.) e AI32, identificado a nível de classe como Sordariomycetes sp., além dos não identificados AI37A, AI12A, AI35B, AI11A e AI24B. Os isolados AI28A (*Colletotrichum* sp.), AI18A (*Trichoderma* sp.), AI16B (*Diaporthe* sp.) e AI14B (*Colletotrichum* sp.), apresentaram resultados negativos na produção das enzimas hidrolíticas. Os isolados não identificados AI27A, AI12A, AI11A, 2A e 3A, também apresentaram antagonismo contra o fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*.

Palavras chave: detecção de enzimas microbianas, fungos endofíticos, amilase, lipase, esterase, pectinase, protease e antagonismo.

ABSTRACT

Endophytic fungi live in plant tissues, where they live without causing apparent harm. They are able of producing useful bioactives for agriculture and applications in the pharmaceutical, food and environmental industries. These endophytes arouse interest in the production of hydrolytic enzymes and in the control of phytopathogens, replacing chemical substances, aiming at processes with less environmental impact. *Azadirachta indica*, known as neem, is a plant that harbors endophytic fungi. The fungus *Macrophomina phaseolina* is a phytopathogen that causes pathologies in soybean production, leading to significant economic losses. Thus, the objective of this study was to identify endophytic fungi isolated from *Azadirachta indica*, evaluate the in vitro production of amylase, lipase, esterase, pectinase and protease enzymes, as well as to evaluate the inhibition potential against the phytopathogen *Macrophomina phaseolina*. Of the tested isolates, the endophytic AI30B, identified as *Alternaria*, showed positive results in the production of protease, esterase and lipase enzymes, and the endophytic AI25B, of the genus *Phyllosticta*, demonstrated ability to produce pectinase, in addition, both were positive in the antagonistic test against the phytopathogen *Macrophomina phaseolina*, with results of greater relevance in this study. The amylase enzyme was produced only by the endophytic isolate AI35B, in which it was impossible to identify, a fact that also occurred for other isolated fungi. The endophytic AI6, of the genus *Phyllosticta* sp., produced the pectinase enzyme, however, without antagonistic activity. The isolates AI37A, AI19B and AI27A, not identified, were positive in the production of the esterase enzyme, and for protease, the genera with positive results were AI9A (*Colletotrichum* sp.), AI15A (*Colletotrichum* sp.), AI17B (*Preussia* sp.) and AI32, identified at class level as *Sordariomycetes* sp., in addition to the unidentified AI37A, AI12A, AI35B, AI11A and AI24B. The isolates AI28A (*Colletotrichum* sp.), AI18A (*Trichoderma* sp.), AI16B (*Diaporthe* sp.) and AI14B (*Colletotrichum* sp.), showed negative results in the production of hydrolytic enzymes. The unidentified isolates AI27A, AI12A, AI11A, 2A and 3A also showed antagonism against the phytopathogen *Macrophomina phaseolina*.

Keywords: detection of microbial enzymes, endophytic fungi, amylase, lipase, esterase, pectinase, protease and antagonism.

INTRODUÇÃO

1. Fungos endofíticos

Os fungos endofíticos colonizam as regiões inter e/ou intracelulares dos tecidos vegetais saudáveis e têm uma relação simbiótica com seus hospedeiros (BOGAS et al., 2022). Na maioria dos casos os fungos endofíticos apresentam uma relação mutualística, antagonista ou neutra com seu hospedeiro. Com relação ao mutualismo, o endófito pode conferir características importantes ao hospedeiro, como resistência ao estresse hídrico, alteração nas propriedades fisiológicas entre outras (AZEVEDO et al., 2000).

A colonização endófito-hospedeiro pode ocorrer de maneira semelhante ao dos patógenos, podendo ocorrer por meio de infecção de sementes ou zona radicular; ou pela entrada via pecíolo, hidatódios e estômatos; ou ainda, via feridas deixadas por patógenos e insetos (SCHULZ; BOYLE, 2005; MARINHO et al., 2005, CHAPLA et al., 2013). Os microrganismos endofíticos provenientes desta via de transmissão podem vir a ser patogênicos em algum momento da vida do hospedeiro, por exemplo, quando as folhas entram em senescência (SAIKKONEN et al., 1998, ALY, 2010).

Esses microrganismos produzem enzimas e outros compostos bioativos que lhes permitem sobreviver em habitats competitivos com outros microrganismos. Desta forma são vistos como uma fonte promissora de produtos naturais bioativos, potencialmente úteis para a agricultura no controle biológico de doenças e pragas. Os fungos endofíticos exibem um amplo espectro de aplicações na medicina, agricultura, indústria e meio ambiente. Portanto, a pesquisa sobre fungos endofíticos pode ajudar na descoberta de novas biomoléculas para várias aplicações biotecnológicas (FELBER; PAMPHILE, 2013).

Os fungos endofíticos têm se tornado novas fontes de enzimas industrialmente úteis, como as lipases, esterase, proteases, entre outras, havendo uma enorme diversidade de enzimas a serem descoberta entre os fungos endofíticos (LISBOA, 2015). São microrganismos de grande importância na produção enzimática, em virtude de que, enzimas microbianas apresentam uma rentabilidade elevada, baixos custos de produção, estabilidade em várias condições extremas e susceptibilidade genética para manipulação (NIYONZIMA, 2015).

1.1 *Azadirachta indica* e a produção de fungos endofíticos

Inúmeros estudos já revelaram que fungos endofíticos podem produzir os mais diversos tipos de enzimas, tais como: amilases, lipases, proteases, pectinases e celulases (FELBER et al., 2019; RIBEIRO et al., 2018; MONTEIRO et al., 2020). Além disso, eles desempenham um importante papel protegendo os tecidos da sua planta hospedeira contra insetos e microrganismos fitopatogênicos (MONTEIRO et al., 2020). Os fungos endofíticos agem sobre fitopatógenos pela ação de enzimas degradativas da parede celular (RATNAWEERA; SILVA, 2017; DINIZ et al., 2020).

A *Azadirachta indica*, comumente conhecida como neem, é uma árvore perene nativa do subcontinente indiano, com valor e importância demonstrada tanto na agricultura como na indústria farmacêutica (KHARWAR et al., 2020).

Esta antiga árvore medicinal, muitas vezes chamada de “maravilhosa árvore”, é considerada uma fábrica química de diversos e complexos compostos, abrangendo ampla variedade de atividades biológicas e modos únicos de ação contra patógenos e pragas na agricultura e pecuária. Até agora, mais de 400 compostos foram isolados de diferentes partes do Neem, incluindo importantes metabólitos secundários bioativos. Além disso, as propriedades químicas e biológicas do neem têm sido extensivamente exploradas para microrganismos associados, especialmente uma classe chamada de microrganismos endofíticos ou endófitos (KHARWAR et al., 2020).

De acordo com Ricci, et al., 2022, os diferentes tipos de microrganismos endofíticos hospedados em *Azadirachta indica* (A. Juss), produzem fitoproductos químicos diversos. A busca por metabólitos secundários advindos de microrganismos endofíticos e de plantas de conhecida ação medicinal é uma fonte promissora para resolução de problemas na área de saúde. Assim, a rica e considerável coleção de fungos endofíticos de *Azadirachta indica* pode representar uma fonte única de compostos bioativos (VERMA et al., 2011).

1.2 Fungos endofíticos na produção de enzimas

De acordo com Da Silva 2017, importantes estudos relacionados ao cultivo microbiano para a produção de enzimas, têm sido amplamente explorados em todo o mundo. O desenvolvimento dessas tecnologias de produção facilitou a geração de novos produtos à base de enzimas com aplicações em produtos farmacêuticos, alimentos, peptídeos bioativos, pesquisas básicas, entre outros.

O autor informa que a aplicabilidade de microrganismos em biotecnologia é potencializada por suas diversas vantagens, incluindo produção em larga escala, curto tempo de cultivo e facilidade de manuseio.

A pesquisa por novos microrganismos isolados e identificados para produção de substâncias bioativas, principalmente as enzimas microbianas, se faz necessário, pois a indústria biotecnológica necessita de novos produtores microbianos com alta eficiência para futuras aplicações industriais (FRANÇA et al., 2020).

A bioprospecção é um importante pré-requisito para a pesquisa e desenvolvimento biotecnológico, baseia-se na exploração da diversidade microbiana para a produção de enzimas. Espécies fúngicas também são exploradas na tecnologia enzimática (DA SILVA, 2017).

A busca de microrganismos que possam produzir essas enzimas é constante e várias técnicas de biologia molecular estão disponíveis hoje para utilização nesse processo. Enzimas industriais são produzidas a partir de microrganismos há mais de um século e dentre eles destacam-se as bactérias, leveduras e os fungos filamentosos (ARNAU et al, 2019; REGINATTO, 2016).

As enzimas microbianas costumam ser mais úteis do que as enzimas de plantas e animais devido à grande variedade de atividades catalíticas disponíveis, maiores rendimentos, possível facilidade de manipulação genética e rápido crescimento de microrganismos nos meios econômicos. As enzimas microbianas também são mais estáveis do que as correspondentes enzimas vegetais e animais e sua produção é relativamente mais conveniente e segura (GAETE et al., 2020, KASANA & GULATI, 2011).

Faria Silva, et al 2017, relata ainda que, diante da crescente aplicabilidade de enzimas, são necessários estudos que busquem microrganismos capazes de produzi-las, e o estudo com fungos filamentosos endofíticos pode possibilitar o conhecimento acerca de novas moléculas e de novas espécies produtoras de enzimas.

2. Enzimas de interesse industrial

Enzimas são substâncias presentes nas células dos organismos vivos em pequenas quantidades que são capazes de acelerar reações químicas sem que elas mesmas sejam alteradas após a reação (HAILE & AYELE, 2022). As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas que aceleram a velocidade de uma reação e que são aplicadas industrialmente (PRADO, 2019).

De acordo com Melo et al. (2018), enzimas são produtos biotecnológicos mais utilizados atualmente em diversos setores industriais, porém ainda apresentam elevados custos de produção e purificação. Para atender a demanda de mercado, é necessário que as enzimas estejam disponíveis em quantidade economicamente viável.

A utilização de enzimas em processos industriais consiste em uma alternativa viável para a substituição de catalisadores químicos, possibilitando o desenvolvimento de processos de menor impacto ambiental (REGINATTO, 2016). A utilização de enzimas nas indústrias permite o desenvolvimento de processos tecnológicos tão eficientes quanto os realizados pela natureza e sem impactos ambientais (FRANÇA et al, 2020).

Globalmente, o mercado de enzimas tem mostrado um incremento gradual, com destaque para a indústria de alimentos (REGINATTO, 2016). Segundo descrito por Gaete et al. (2020), a demanda do mercado por enzimas industriais está aumentando, sendo necessária a busca de fontes de enzimas com diferentes funcionalidades.

Assim, para o futuro e continuidade do desenvolvimento científico, são necessários investimentos para a prospecção de enzimas microbianas para constante avanços na biotecnologia e desenvolvimento industrial sustentável (DA SILVA, 2017).

As hidrolases englobam um grupo de enzimas que catalisam a quebra de ligações covalentes em reação com água; entre elas estão as proteases, amilases, lipases e pectinase, sendo enzimas muito importantes, com ampla utilização na indústria em geral (SOUZA et al, 2014).

2.1 Amilase

As amilases estão entre as enzimas mais importantes no mercado global devido às suas potenciais aplicações em uma série de processos industriais, como alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos, têxteis e indústrias de papel (SELVAN et al., 2016, SAHNOUN et al., 2015).

Para França & Silva (2021), as amilases são enzimas classificadas entre as mais importantes enzimas industriais, sendo de grande interesse na biotecnologia atual. Embora elas possam ser derivadas de diversas fontes, as de origem microbiana são geralmente as mais procuradas pelas indústrias, devido a série de vantagens apresentadas.

São capazes de degradar o amido e são obtidas do malte ou produzidas por diversos vegetais ou microrganismos, através de processos fermentativos (CUZZI et al., 2011; FARIA SILVA et al., 2017).

2.2 Lipase

A lipase é outro exemplo de enzima de grande importância biotecnológica, podendo ser aplicada em diferentes setores (LISBOA, 2015). São enzimas com alta eficiência e seletividade, o que as tornam potencialmente úteis em diversos processos biotecnológicos e industriais. Nas últimas décadas, a utilização de lipases microbianas em substituição aos catalisadores químicos convencionais tem sido fortemente incentivada (FERRAZ et al., 2018).

As lipases pertencem a um grupo de enzimas com capacidade de atuarem sobre substratos insolúveis em água, e também em diferentes reações, como as reações de hidrólise (KAMANSKI, 2017).

De acordo com De Jesus et al (2018), economicamente e industrialmente as lipases são mais utilizadas devido sua relativa facilidade de produção e a abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las.

As lipases são onipresentes na natureza e são produzidas por várias plantas, animais e microrganismos. No entanto, para a produção de enzimas industriais, os microrganismos são a fonte mais preferida (SHARMA & KANWAR 2014).

2.3 Esterase

As esterases são enzimas da classe hidrolase responsáveis pelo metabolismo de lipídios de membrana celular, e podem ser usadas como marcadores de processos (LEMES et al., 2022; RAFEEQ et al., 2022).

De acordo com Rafiq et al. (2022), várias técnicas são empregadas para rastrear e identificar esterases, por meio de vários procedimentos de triagem e identificação. As aplicações industriais das esterases contribuem significativamente para as iniciativas ecológicas da natureza, bem como para as indústrias alimentícia e têxtil.

Os fungos filamentosos são considerados bons produtores, pois secretam estas enzimas para o meio de cultura em níveis mais elevados que os secretados por leveduras e bactérias (FRANÇA et al., 2020).

2.4 Pectinase

Enzimas pectinolíticas, ou pectinases, atuam degradando as substâncias pécticas presentes na parede celular dos vegetais. Para a produção de pectinases, leveduras, bactérias e fungos filamentosos são utilizados, porém, a maioria das preparações comerciais destas enzimas é obtida de fungos filamentosos (REGINATTO, 2016).

De acordo com Reginatto (2016), as pectinases microbianas podem ser utilizadas em uma variedade de processos industriais, sendo sua utilização também relacionada a outros setores industriais, como a indústria têxtil.

A demanda mundial pela utilização de pectinase microbiana em diferentes indústrias têm aumentado. As principais fontes de pectinase são microrganismos, principalmente bactérias, fungos e leveduras (HAILE & AYELE, 2022).

As pectinases são enzimas utilizadas principalmente para o segmento de alimentos e bebidas, correspondem a aproximadamente 25% das enzimas utilizadas na indústria de alimentos, onde sua principal aplicação é no processamento de frutas (LI et al., 2012).

2.5 Protease

De acordo com Nascimento et al. (2021), as proteases são enzimas que atuam na hidrólise de ligações peptídicas e indispensáveis na coagulação, digestão de alimentos e até mesmo o melhoramento de produtos industrializados, como em detergentes, medicamentos e couro por exemplo. Por agir em muitas reações, as proteases se tornam uma grande aliada das indústrias de alimentos que utilizam essas enzimas para otimizarem seus produtos, modificando seu sabor, cor, forma, textura ou até mesmo a funcionalidade nutricional.

São enzimas bastante eficazes quando aplicadas em alimentos, suas propriedades podem agir em vários aspectos do produto levando a inovações, mudanças, melhoramentos e agregação de valores (NASCIMENTO et al., 2021).

As fontes das proteases podem ser diversas, como plantas, animais e microrganismos, confirmado também a importância das inúmeras pesquisas científicas que comprovam as ações biotecnológicas das proteases (NASCIMENTO et al., 2021).

3. Fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*

O fungo *Macrophomina phaseolina* é o fitopatógeno responsável por diversas doenças que acometem a cultura da soja. Este microrganismo está relacionado a podridão cinzenta da haste ou podridão carvão que tem causado expressivas perdas na cultura da soja, porém, também pode acometer diversas culturas, tais como, algodão, milho, girassol e sorgo (ALMEIDA, 2014; LORENZETTI, 2018).

Este organismo é caracterizado pela produção de microescleródios de coloração escura, devido à produção de melanina, que é encontrado principalmente na região radicular da planta hospedeira, o que confere a este órgão a coloração escura. Esta estrutura lhe permite sobreviver em condições extra planta, como no solo, sendo ela a principal fonte de inóculo deste patógeno (ISHIKAWA et al., 2017).

Em condições naturais, o fungo *Macrophomina phaseolina* ocorre mantendo o equilíbrio entre microrganismos e o ciclo de nutrientes, sem causar danos significativos. Porém, em ambiente favorável de altas temperaturas, de 28 a 35°C, e baixa umidade do solo, se transforma em patógeno com grande potencial de dano, ocorrendo a diminuição da produtividade, podendo causar expressivas perdas na econômicas (DILKIN et al., 2020; BIZARI 2018; ALMEIDA et al., 2014).

De acordo Dilkin et al., 2020, os agrotóxicos aplicados nas lavouras com objetivo de aumentar a produtividade, embora atuem na proteção contra patógenos, podem também causar contaminação no ambiente, afetando outros organismos.

A grande diversidade de fungicidas, facilidade de uso e de aquisição, aliado ao uso frequente, permite que determinados organismos apresentem resistência aos produtos, além de outros impactos negativos, o que demonstra a importância do controle biológico do fungo *Macrophomina phaseolina* (Dilkin et al., 2020).

4. A Soja

O termo *commodity* refere-se a produtos que são ofertados sem diferenças significativas e comercializados igualmente em diferentes continentes. Assim como outros produtos do país, a soja é uma *commodity* agrícola. Atualmente, o Brasil é o maior produtor e exportador de soja do mundo. De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), em 2021 foi colhida a safra recorde de soja no Brasil com produção de 135,9 milhões de toneladas (CORRÊA, 2022).

A produção de soja em Mato Grosso do Sul atingiu a marca histórica de 15 milhões toneladas do grão na safra 2022/2023 (SIGA/MS, 2023).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Á. M. R.; SEIXAS, C. D. S.; FARIAS, J. R. B.; DE OLIVEIRA, M. C. N.; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; DA COSTA, J. M.; GAUDÊNCIO, C. A. ***Macrophomina phaseolina* em soja.** Londrina - PR: Embrapa Soja, 2014. 55 p. 1a edição. Versão on line. ISSN 2176-2937; n.346.
- ALY, A.H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity.** v.41, n.1, p.16,2010.
- ARAÚJO, W. L.; LACAVA, P. T.; MARCON, J.; LIMA, A.O.S.; KUKLIMSKYSOBRAL, J.; KLEINER-PIZZIRANI, A. A.; AZEVEDO, J. L. (Coord.). **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos.** Piracicaba: CALQ, 2010. 167 p.
- ARNAU J, YAVER D, HJORT CM. Strategies and Challenges for the Development of Industrial Enzymes Using Fungal Cell Factories. **Grand Challenges in Fungal Biotechnology.** 2019;179-210. Published 2019 Sep 27. doi:10.1007/978-3-030-29541-7_7.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHRONI, W. J.; PEREIRA, J. O.; ARAUJO, W. L. Endophytic microrganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB: Eletronic Journal of Biotechnology.** v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.
- BADALYAN, S. M., GLORIA I., NARINE, G. G. "Antagonistic Activity of Xylotrophic Mushrooms against Pathogenic Fungi of Cereals in Dual Culture." **Phytopathologia Mediterranea** 41, no. 3 (2002): 220–25. <http://www.jstor.org/stable/26456630>.
- BIZARI, E. H. **Estudo de herança genética da resistência à *Macrophomina phaseolina* na cultura da soja.** Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. CDU 631.52:633.34.

BOGAS, A. C., CRUZ, F. P. N., LACAVA, P. T., SOUSA, C. P. Endophytic fungi: an overview on biotechnological and agronomic potential. **Brazilian Journal of Biology.** 84 • 2024. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.258557>.

CAMPANILE, G.; RUSCELLI, A.; LUISI, N. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in planta tests. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 117, n. 3, p. 237-246, 2007.

CHAPLA, V. M. et al. Fungos endofíticos: Uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013. Disponível em: <http://acervodigital.unesp.br/handle/11449/75343>. Acesso em 10/12/2022 às 23:30hs.

CORRÊA, A. R. **Commodities Agrícola**. Programa de Educação Tutoria, 2022. Disponível em: <https://ufsm.br/r-779-883>. Acesso em 30/07/2023 às 09:57hs.

CUZZI, C.; LINK, S.; VILANI, A.; ONOFRE, S. B. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* DC (ASTERACEAE). **Global Science and Technology**, v. 4, n. 2, 2011.

DA SILVA, R. R. Bacterial and Fungal Proteolytic Enzymes: Production, Catalysis and Potential Applications. **Appl Biochem Biotechnol (2017)** 183(1)–19. DOI 10.1007/s12010-017-2427-2.

DE JESUS, J. R., DE MOURA, J. C. S., GUERRA, O. G., DA SILVA, M. H. R., MACHADO, A. M. Potencial enzimático de fungos endofíticos isolados de folhas de *Dipteryx alata*. **Colloquium Vitae**, vol. 10, n. Especial 5, Jul–Dez, 2018, p.158-164. ISSN: 1984-6436. DOI: 10.5747/cv.2018.v10.nesp5.000347.

DILKIN, E. R . S., MATIAS, R., DE OLIVEIRA, A. K. M., CORREA, B. O., PEDRINHO, D. R. Potencial de Uso de Plantas Daninhas de Áreas Agrícolas e de Pastagens do Cerrado de Mato Grosso do Sul. – Londrina: Editora Científica, 2020. **Boletim Técnico**. ISBN 978-65-00-13004-1.

DINIZ, F. V.; MAGALHÃES, Y. M.; PAZ, F. S.; SILVA, A. L. D.; GOMES, L. C.; SANTOS, G. S.; CARVALHO, C. M. Atividade enzimática de fungos endofíticos de bacaba (*Oenacarpus bacaba* Mart.). **Biota Amazônia**, v.10, n.3, p.7-11, 2020.

FARIA SILVA, L. A. et al. Produção de Amilase por Fungo Filamentoso Endofítico em Fermentação Submersa. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 3, supl. 1, p. 49–53, 2017 - ISSN2447-6218. Disponível em: <<https://periodicos.ufmg.br/index.php/ccaufmg/article/view/3000>>. Acesso em 04/05/2022 às 11:22hs.

FELBER, A. C., PAMPHILE, J. A.; **Fungos Endofíticos: Potencial Como Controladores Biológicos e Estudos em Videiras**. UNINGÁ Review. 2013 Abr. No 14(1). p. 13-25.

FELBER, A. C.; SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; COSTA, A. T.; POLONIO, J. C.; MOURÃO, K. S. M.; PAMPHILE, J. A. Endoglucanase production by endophytic fungi isolated from *Vitis labrusca* L. with peanut hull and sawdust as substrates. **Bioscience Journal**, v.35, n.3, p.933-940, 2019.

FERRAZ, J. L. de A. A. et al. Obtenção de Lipases Microbianas: Uma Breve Revisão. RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais, v. 20, n. 1, p. 30-54, 2018.

FRANÇA, E. da S.; MARINHO, J. dos S.; CÂNDIDO, T. R. da S.; LINS, U. M. de B. L.; ANDRADE, R. F. da S.; TAKAKI, G. M. de C.-.; DA SILVA, C. A. A.; OKADA, K. Detecção de esterase e lipase produzidas por fungos filamentosos isolados de solos da Caatinga. **Brazilian Journal of Development, [S. I.]**, v. 6, n. 11, p. 91693–91709, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n11-543. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/20430>. Acesso em: 12 dec. 2022.

FRANÇA, I. B. DE; SILVA, C. A. A. DA. Utilização de resíduos agroindustriais na produção de amilase por *Aspergillus niger* UCP 1095 através de fermentação submersa/ Use of agroindustrial waste for the production of amilase by *Aspergillus niger* UCP 1095 through submerger fermentation. **Brazilian Journal of Development**, [S. I.], v. 7, n. 5, p. 51331–51345, 2021. DOI: 10.34117/bjdv.v7i5.30169. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/30169>. Acesso em: 9 feb. 2023.

GAETE, A. V.; TEODORO, C. E. S.; MARTINAZZO, A. P. Use of agro-industrial waste for cellulase production: a review. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, e567985785, 2020 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5785>.

HAILE, S., & AYELE, A. Pectinase de Microrganismos e Suas Aplicações Industriais. **The Scientific World Journal**, vol. 2022, Artigo ID 1881305, 15 páginas. <https://doi.org/10.1155/2022/1881305>.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, p. 597-607, 1975.

ISHIKAWA, M. S., RIBEIRO, N. R., OLIVEIRA, E. C., ALMEIDA, A. A. DE., & BALBI-PEÑA, M. I.. (2018). Seleção de cultivares de soja para resistência à podridão negra da raiz (*Macrophomina phaseolina*). **Summa Phytopathologica**, 44(1), 38–44. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/178653>.

LEMES, E. S., MENDONÇA, A. O., AUMONDE, T. Z., BRUINSMA, M. S., PEDÓ, T., VILLELA, F. A. Análise da qualidade fisiológica de sementes de amaranto colhidas em diferentes épocas e armazenadas por até dois anos. **Rev. Agr. Acad.**, v. 5, n. 3, Mai/Jun (2022). doi: 10.32406/v5n3/2022/104-114/agrariacad.

LI, C.; ADAMCIK, J.; MEZZENGA, R. (2012). Biodegradable nanocomposites of amyloid fibrils and graphene with shape-memory and enzyme-sensing properties. **Nat. Nanotechnol.** 7(7): 421-427.

LISBOA, H. C. F. **Fungos endofíticos: prospecção de atividade biocatalítica e aplicação biotecnológica.** 2015. 222 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química., 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/136030>>. Acesso em 04/05/2022 às 11:24hs.

LORENZETTI, E., STANGARLIN, J. R., KUHN, O. J., & PORTZ, R. L.. (2018). Indução de resistência à Macrophomina phaseolina em soja tratada com extrato de alecrim. **Summa Phytopathologica**, 44(1), 45–50. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/176895>.

KAMANSKI, A. M. B. (2017). **Purificação de lipases fúngicas visando aplicação em tratamento de óleo residual de fritura.** BDTC – Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações. Disponível em: <<https://rd.uff.edu.br/handle/prefix/1550>>. Acesso em: 11/12/22, às 16:18hs.

KHARWAR, R. N., SHARMA, V. K., MISHRA, A., KUMAR, J., SINGH, D. K., VERMA, S. K., GOND, S. K., KUMAR, A., KAUSHIK, N., REVURU, B., & KUSARI, S. (2020). Harnessing the Phytotherapeutic Treasure Troves of the Ancient Medicinal Plant *Azadirachta indica* (Neem) and Associated Endophytic Microorganisms. **Planta Médica**, 86(13/14), 906–940. <https://doi.org/10.1055/a-1107-9370>.

MELO, T. L., MELO, V. A., ALVES, C. A. Produção De Protease Utilizando Planejamento Fatorial Em Meios Contendo Resíduos Industriais. **Engevista**, v. 20, n.5, p.792-804, dezembro 2018. DOI: <https://doi.org/10.22409/engevista.v20i5.9509>.

MONTEIRO, M. C. P.; TAVARES, D. G.; NERY, E. M.; QUEIROZ, M. V.; PEREIRA, O. L.; CARDOSO, P. G. Enzyme Production by *Induratia* spp. Isolated from Coffee Plants in Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.63, n.1, p.1-9, 2020.

NASCIMENTO, M. C., SILVA ALENCAR, V. N., NASCIMENTO, T. P., BATISTA, J. M. S., PORTO, A. L. F. Proteases e Suas Aplicações Biotecnológicas Nas Indústrias Alimentícias. In: **Congresso Internacional da Agroindústria – CIAGRO 2021**. DOI: <https://doi.org/10.31692/IICIAGRO.0076>.

NIYONZIMA, F.N.; MORE, S.S. Coproduction of detergent compatible bacterial enzymes and stain removal evaluation. **Journal of Basic Microbiology**, v.55, n.10, p.1149-1158, 2015.

RAFEEQ, H., HUSSAIN, A., SAFDAR, A., SHABBIR, S., BILAL, M., SHER, F., FRANCO, M., LQBAL, H, MN. **Aplicações Industriais de Enzimas Microbianas**. Capítulo Esterases e suas aplicações industriais. 1^a edição. 2022. ISBN 9781003202998.

RATNAWEERA, P. B.; SILVA, E. D. Endophytic Fungi: A Remarkable Source of Biologically Active Secondary Metabolites. In: Maheshwari, D.; Annapurna, K. (eds) Endophytes: Crop Productivity and Protection. **Sustainable Development and Biodiversity**, v.16, n.1, p.191-212, 2017.

REGINATTO, C. **Produção e Caracterização Parcial de Pectinases de *Aspergillus niger* Lb-02-Sf Obtidas em Processo Submerso**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ucs.br/handle/11338/1161>. Acesso em: 28/02/20223, às 21:00hs.

RIBEIRO, A. S.; POLONIO, J. C.; COSTA, A.T.; SANTOS, C. M.; RHODEN, S. A.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Bioprospection of Culturable Endophytic Fungi Associated with the Ornamental Plant *Pachystachys lutea*. **Current Microbiology**, v.75, n.5, p.588-596, 2018.

RICCI, A. N., JÚNIOR, J. C. R. M., PRADEBON, V. P. O., MAIA, L. R., LOOSLI, A. W. M., ROEL, A. R., ALMEIDA, T. T. (2022). Bioativos Derivados de Fungos Endofíticos Isolados da *Azadirachta Indica* (Neem) e suas aplicações. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, e13911932454, 2022 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i9.32454>.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: A continuum of interactins with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, n. 29, p. 319-343, 1998.

SAITOU, N., & NEI, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.

SHARMA, S., & KANWAR, SS (2014). Lipases tolerantes a solventes orgânicos e aplicações. **The Scientific World Journal**, 2014.

SIERRA, G.A. A simple method for the detection of lytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonine van Leeuwenhoek, Dordrecht**, v. 28, p. 15-22, 1957.

SIGA - Sistema de Informação Geográfica do Agronegócio/MS. **Boletim Casa Rural - Agricultura**. Elaboração: Sistema Famasul/APROSOJA-MS. Semadesc (Secretaria de Meio Ambiente, Desenvolvimento, Ciência, Tecnologia e Inovação). Ed. nº 509/2023| Maio. Disponível em: <https://www.semadesc.ms.gov.br/wp-content/uploads/2023/05/PRODUTIVIDADE-DA-SOJA-SAFRA-2022-2023-23.05.2023.pdf>. Acesso em: 30/07/2023, às 10:15hs.

SILVA, M. C. S., POLONIO, J. C., QUECINE, M. C., DE ALMEIDA, T. T., BOGAS, A. C., PAMPHILE, J. A., PEREIRA, J. O., ALTOLFI-FILHO, S., AZEVEDO, J. L. Endophytic cultivable bacterial community obtained from the *Paullinia cupana* seed in Amazonas and Bahia regions and its antagonistic effects against *Colletotrichum gloeosporioides*, **Microbial Pathogenesis**, Volume 98, 2016, Pages 16-22, ISSN 0882-4010, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.023>.

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

SOUZA, R. C.; CANTÃO, M. E.; NOGUEIRA, M. A.; VASCONCELOS, A. T. R.; GOMES, R. R.; VICENTE, V. A.; HUNGRIA, M. **Triagem de hidrolases por metagenômica de solos agrícolas do Norte do Paraná**. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 14., João Pessoa, 2014. Anais.

TAMURA, K., STECHER, G., & KUMAR, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular biology and evolution**, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., & GIBSON, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic acids research**, 22(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.

VERMA, V. C., GOND, S. K., KUMAR, A., KHARWAR, R. N., BOULANGER, La. A., & STROBEL, G. A. (2011). Endophytic Fungal Flora from Roots and Fruits of an Indian Neem Plant *Azadirachta indica* A. Juss., and Impact of Culture Media on their Isolation. **Indian journal of microbiology**, 51(4), 469–476. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0121-6>.

ZHENG, J. et al. Protein Expression and Purification A stereoselective esterase from *Bacillus megaterium*: Purification, gene cloning, expression and catalytic properties. **Protein Expression and Purification**, v. 136, p. 66–72, 2017.

WEBER, R. W. S.; KAPPE, R.; PAULULAT, T.; MOSKER, E.; ANKE, H. Anti-Candida metabolites from endophytic fungi. **Phytochemistry**. V. 68, p. 886-982, 2006.

OBJETIVOS

Geral

Realizar a prospecção de fungos endofíticos isolados da planta *Azadirachta indica* com potencial de produção de enzimas hidrolíticas e controle do fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*.

Específicos

- Identificar os isolados endofíticos isolados da planta de *Azadirachta indica*, por meio da amplificação da região ITS pelo método de PCR;
- Avaliar a produção *in vitro* das enzimas amilase, lipase, esterase, pectinase e protease, pelos isolados endofíticos de *Azadirachta indica*;
- Avaliar potencial de inibição dos endófitos, contra o fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*.

Artigo Científico - Bioprospection of endophytic fungi isolated from *Azadirachta indica* (A. Juss) with potential to produce hydrolytic enzymes and control the phytopathogen *Macrophomina phaseolina*.

Artigo formatado de acordo com as normas da revista Microbial Pathogenesis.

Heloíse de Oliveira Elias^a, Tiago Tognoli de Almeida^b, Cristiano Marcelo Espinola Carvalho^{a,b}

^a Postgraduate Program in Biotechnology, Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Av. Tamandaré, 6000 - Jardim Seminário, Campo Grande - MS, 79117-900

^b Stricto sensu Postgraduate Program in Environmental Sciences and Agricultural Sustainability, Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Av. Tamandaré, 6000 - Jardim Seminário, Campo Grande - MS, 79117-900

Corresponding author:

E-mail address: heloelias@gmail.com

ABSTRACT

Endophytic fungi host plant tissues, where they live without causing apparent harm. They are able of producing useful bioactives for agriculture and applications in the pharmaceutical, food and environmental industries. These endophytes arouse interest in the production of hydrolytic enzymes and in the control of phytopathogens, replacing chemical substances, aiming at processes with less environmental impact. *Azadirachta indica*, known as neem, is a plant that harbors endophytic fungi. The fungus *Macrophomina phaseolina* is a phytopathogen that causes pathologies in soybean production, leading to significant economic losses. Thus, the objective of this study was to identify endophytic fungi isolated from *Azadirachta indica*, evaluate the in vitro production of amylase, lipase, esterase, pectinase and protease enzymes, as well as to evaluate the inhibition potential against the phytopathogen *Macrophomina phaseolina*. Of the tested isolates, the endophytic AI30B, identified as the genus *Alternaria* sp., showed positive results in the production of protease, esterase and lipase enzymes, and the endophytic AI25B, of the genus *Phyllosticta* sp., demonstrated ability to produce pectinase, in addition, both were positive in the antagonistic test against the phytopathogen *Macrophomina phaseolina*, with results of greater relevance in this study. The amylase enzyme was produced only by the endophytic isolate AI35B, in which it was impossible to identify, a fact that also

occurred for other isolated fungi. The endophytic AI6, of the genus *Phyllosticta* sp., produced the pectinase enzyme, however, without antagonistic activity. The isolates AI37A, AI19B and AI27A, not identified, were positive in the production of the esterase enzyme, and for protease, the genera with positive results were AI9A (*Colletotrichum* sp.), AI15A (*Colletotrichum* sp.), AI17B (*Preussia* sp.) and AI32, identified at class level as Sordariomycetes sp., in addition to the unidentified AI37A, AI12A, AI35B, AI11A and AI24B. The isolates AI28A (*Colletotrichum* sp.), AI18A (*Trichoderma* sp.), AI16B (*Diaporthe* sp.) and AI14B (*Colletotrichum* sp.), showed negative results in the production of hydrolytic enzymes. The unidentified isolates AI27A, AI12A, AI11A, 2A and 3A also showed antagonism against the phytopathogen *Macrophomina phaseolina*.

Keywords: detection of microbial enzymes, endophytic fungi, amylase, lipase, esterase, pectinase, protease and antagonism.

1. Introdução

Microrganismos endofíticos, podem ser, na maioria das vezes, fungos e bactérias que vivem no interior das plantas sem lhes causar prejuízos. Eles colonizam o interior de órgãos e tecidos vegetais sem causar sintomas visíveis, estabelecendo uma íntima associação mutualística, tornando as plantas mais resistentes a ambientes com estresse e recebendo nutrientes e proteção (FELBER & PAMPHILE, 2013).

O termo endófito descrito originalmente por De Bary em 1866, refere-se a qualquer microrganismo que vive nos tecidos de plantas, distinguindo-se dos epífíticos que vivem na superfície (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010).

Os endófitos vêm despertando interesse da comunidade científica, devido às suas aplicações biotecnológicas em diversas áreas, inclusive no controle de fitopatógenos, por diferentes mecanismos, sendo eles, a antibiose de metabólitos, a competição por subsistência e por micoparasitismo (STROBEL; DAISY, 2003; GONÇALVES et al., 2017; ADELEKE et al., 2022).

Estudos indicam a grande capacidade destes organismos na produção de enzimas extracelulares hidrolíticas de interesse industrial como, amilases, lipases e celulases (CUZZI et al., 2011, BERNARDI-WENZEL, 2013), e na indústria farmacêutica podem atuar na produção de metabólitos secundários que inibem o desenvolvimento de patógenos, demonstrando assim atividade bactericida, fungicida e leishmanicida (WEBER et al., 2006; PILEGGI et al., 2002, ORLANDELLI et al., 2012; ALMEIDA et al., 2018; HAWAR, 2022) e também produzir substâncias com atividades antitumorais (NETO et al., 2002; RAI et al., 2021).

O Neem, *Azadirachta indica* (A. Juss) é uma planta utilizada na indústria farmacêutica experimental, amplamente aplicada como medicamento popular para diversos fins terapêuticos, bem como, uma fonte de agroquímicos por muitos séculos na agricultura (KHARWAR et al., 2020).

A espécie medicinal é uma planta que vem se tornando importante na terapia herbal alternativa, principalmente na agroindústria, sendo, portanto, rica fonte de metabólitos especiais que pode vir a produzir fitofármacos e ainda, novos agentes agroquímicos biocompatíveis, como bioformulações a partir do óleo das sementes desta planta, objetivando novas formulações biotecnológicas (EMERENCIANO, 2013).

Neste contexto, desperta um interesse significativo em função das suas propriedades fagorrepelente e inseticidas já comprovadas (EMERENCIANO, 2013), além de hospedar diferentes tipos de microrganismos endofíticos (RAJAGOPAL et al., 2011).

Além disso, a prospecção de microrganismos com potencial para uso no biocontrole de doenças de culturas agrícolas de interesse econômico tem se tornado um dos principais alvos da pesquisa biotecnológica, por meio do uso de microrganismos como agentes naturais, com objetivo de quebra de resistência dos fitopatógenos às moléculas utilizadas (DE OLIVEIRA, 2017).

O fungo *Macrophomina phaseolina* é um fitopatógeno causador de diferentes patologias que acometem, além de outras culturas, a produção da soja, levando a podridão cinzenta da haste ou podridão carvão, as quais remetem à perdas econômicas significativas (ALMEIDA, 2014; LORENZETTI, 2018). Por ser considerado um fitopatógeno responsável por causar grandes perdas na produção, e considerando que, até o presente momento, nenhum cultivar foi identificado com resistência a esse fungo (BIZARI 2018), é relevante avaliar a possibilidade da ação enzimática sobre esse microrganismo.

Desta forma o presente trabalho tem como objetivo a bioprospecção de fungos endofíticos isolados da planta *Azadirachta indica* com o potencial de produção de enzimas hidrolíticas e controle do microrganismo *Macrophomina phaseolina*.

2. Materiais e métodos

2.1 Isolamento

2.1.1 Obtenção dos fungos

Os fungos endofíticos previamente isolados da folha de *Azadirachta indica*, pertencente a Fazenda Escola UCDB - Universidade Católica Dom Bosco, localização 20°23'49.6"S 54°36'57.7"W, fazem parte da micoteca do Laboratório de Entomologia Agrícola (E116/B09) do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande – MS, Brasil. Estes organismos estavam estocados em água destilada estéril e foram ativados em meio Batata Dextrose Ágar (BDA).

2.1.2 Identificação molecular dos isolados endofíticos

Os fungos foram crescidos em meio BDA por sete (7) dias em membrana de diálise, em placas de Petri, e posteriormente macerados em nitrogênio líquido. O material resultante foi submetido a extração de DNA total utilizando kit PowerSoil® DNA Isolation Kit – QIAGEN.

Foi realizada a amplificação do DNA ribossomal, região ITS1-5,8S-ITS2, de acordo com (Almeida et al. 2015). Os amplicons resultantes foram purificados com o reagente ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (Applied Biosystems) e o sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer.

Para a determinação da distância genética dos isolados, as sequências obtidas pelo sequenciamento foram comparadas com as sequências disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando o BLASTn para procurar as sequências mais próximas.

A árvore filogenética foi elaborada por meio do software MEGA 11 (Tamura et al., 2021). As sequências obtidas, por meio do sequenciamento foram alinhadas por ClustalW (Thompson et al., 1994), com a filogenia efetuada pelo método neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) e com o teste bootstrap de 10.000 repetições.

2.2 Avaliação da produção enzimática por endófitos isolados de *Azadirachta indica*

A atividade enzimática dos microrganismos foi avaliada qualitativa e semi-quantitativamente, de acordo com Silva et al. (2016), com modificações.

Os isolados fúngicos foram crescidos em meio BDA, e então semeados em placas de Petri com os meios de cultura específicos para cada enzima, e incubados a 28°C por 2 a 7 dias.

2.2.1 Atividade amilolítica

Os isolados foram crescidos em placas com em meio mínimo M9, substituindo a glicose por 1% de amido solúvel (p/v) e contendo 0,5% de extrato de levedura, na proporção de 10 g de amido solúvel, 5 g de extrato de levedura, 12,8 g de Na₂HPO₄·7H₂O, 3 g de KH₂PO₄, 0,5g de NaCl, 1 g de NH₄Cl, 5g de MgSO₄·7H₂O, 0,01g de CaCl₂·2H₂O, 15 g de Ágar e 1000 ml de H₂O destilada.

Após o crescimento microbiano, foram adicionados 10 ml de solução de iodo e lavados quase imediatamente com água.

A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a produção de amilase (Hankin e Anagnostakis, 1975). Para o controle foi utilizado a enzima α-Amilase (SIGMA – código A3176-500KU).

2.2.2 Atividade lipolítica

O meio para detecção de lipase foi o proposto por Sierra, 1957, acrescido de Tween 20, na proporção de 10 g de Peptona, 5 g de Extrato de levedura, 5 g de NaCl, 0,1 g de CaCl₂·2H₂O, 15 g de Ágar, 10 ml de Tween 20 e 990 ml de H₂O destilada. Após a esterilização do meio de cultura foi adicionado 1% (p/v) de Tween 20, previamente esterilizado. A presença de halos formados por cristais indicou a secreção de lipase pelos isolados.

2.2.3 Atividade esterásica

Para observação da produção de esterase foi utilizada a mesma metodologia da lipase, substituindo o Tween 20 pelo Tween 80.

Foi utilizada proporção de 10 g de Peptona, 5 g de Extrato de levedura, 5 g de NaCl, 0,1 g de CaCl₂·2H₂O, 15 g de Ágar, 10 ml de Tween 80 e 990 ml de H₂O destilada. A produção de esterase foi indicada pela presença de halos claros ao redor dos isolados (Sierra, 1957).

2.2.4 Atividade pectinolítica

Os microrganismos foram crescidos em meio mínimo M9, substituindo glicose por 1% de pectina (p/v), contendo 0,5% de extrato de levedura, na proporção de 10 g de Pectina cítrica, 5 g de Extrato de Levedura, 12,8 g de Na₂HPO₄·7H₂O, 3 g de KH₂PO₄, 0,5 g de NaC, 1 g de NH₄Cl, 5 g de MgSO₄·7H₂O, 0,01g de CaCl₂·2H₂O, 15 g de Ágar e 1000 ml de H₂O destilada.

Após o crescimento microbiano, foram adicionados 10 ml de lugol e imediatamente realizada uma lavagem com água. A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a produção de pectinase (Sierra, 1957).

2.2.5 Atividade proteolítica

Para avaliação da atividade proteolítica foi utilizado o meio de detecção de protease, na proporção de 5 g de Triptona, 2,5 g de Extrato de levedura, 2,5 g de NaCl, 1 g de Glicose, 15 g de Ágar, 900 ml de H₂O destilada e 100 ml de Leite desnatado. Após a esterilização, para cada 900 ml de meio foi adicionado 100 ml de leite desnatado. A atividade proteolítica foi indicada pela visualização da formação de halo transparente ao redor do isolado (Sierra, 1957).

2.3 Índice enzimático e análise estatística

A atividade enzimática dos fungos endofíticos foi avaliada qualitativamente, para isso, todos foram testadas nos meios de culturas específicos, e somente os que deram resultados positivos foram analisadas semi-quantitativamente, pela medição do diâmetro do halo e da colônia com régua milimetrada, sendo determinado o Índice Enzimático (IE), conforme a fórmula abaixo:

$$IE = \frac{\text{diâmetro do halo}}{\text{diâmetro da colônia}}$$

Os maiores valores de IE indicam maior produtividade enzimática. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando o software R. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância.

2.4 Atividade antagonística *in vitro* dos endófitos isolados contra o fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*

Os fungos endofíticos isolados dos tecidos foliares foram testados para atividade antagonística contra os fungos fitopatogênicos *Macrophomina phaseolina*, por meio da técnica de cultura pareada (Campanile et al. 2007) modificada.

Discos de 6 mm de colônias crescidas por 7 dias dos isolados endofíticos e fitopatógeno, foram inoculados em polos opostos de placas de Petri contendo meio de cultura BDA, a 4 cm de distância. Os testes foram realizados em triplicata, bem como, o controle negativo, com o fitopatógeno em um (C1) ou ambos os polos das placas (C2). As placas foram incubadas em B.O.D a 28°C por 7 dias.

O índice de antagonismo (IA) de cada endófito foi calculado de acordo com Campanile et al. (2007). As interações competitivas entre endófitos e patógenos foram analisadas segundo a escala de Badalyan (Badalyan et al. 2002). O teste de antagonismo *in vitro* foi avaliado estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$), com auxílio do programa R (R Core Team 2014).

3. Resultados

3.1 Isolamento dos fungos endofíticos

Foram utilizados 22 fungos endofíticos previamente isolados da planta *Azadirachta indica*, selecionados conforme a disponibilidade das amostras do estoque da micoteca do Laboratório de Entomologia Agrícola (E116/B09), bem como, em observação à capacidade operacional do laboratório.

3.2 Identificação molecular

O sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA e por meio da análise de BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) do banco de dados GenBank permitiu identificar sete gêneros fúngicos (*Colletotrichum*, *Diaporthe*, *Phyllosticta*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Phomopsis* e *Preussia*) e uma classe (Sordariomycetes).

A análise filogenética confirmou a identificação molecular dos 12 isolados em nível de gênero, sendo dentre eles 5 do gênero *Colletotrichum* (AI14B, AI15A, AI15B, AI9A e o AI28A), 1 do gênero *Diaporthe* (AI16B), 2 do gênero *Phyllosticta* (AI6 e AI25B), 1 do gênero *Alternaria* (AI30B), 1 do gênero *Trichoderma* (AI18A), 1 do gênero *Phomopsis* (AI23A) e 1 do gênero *Preussia* (AI17B), enquanto o nível de classe foi confirmado para o isolado Sordariomycetes (AI32) (Tabela 1 e Figura 1). Os dados de sequência deste estudo foram submetidos ao GenBank.

3.3 Atividade enzimática

Dos vinte e dois (22) isolados endofíticos testados, apenas o isolado AI35B (N.I) foi positivo para a enzima amilase, obtendo IE de 1.14. Já para a lipase, apenas o isolado AI30B *Alternaria* sp. foi positivo, obtendo um IE de 1.23. Para esterase, os isolados AI30B *Alternaria* sp., AI37A (N.I), AI19B (N.I) e AI27A (N.I) apresentaram resultados positivos, obtendo um IE estatisticamente similares, de 1,23, 1.17, 1.31 e 1.37, respectivamente. Já os isolados AI25B e AI6, ambos do gênero *Phyllosticta*, apresentaram resultados positivos estatisticamente semelhantes para pectinase, com IE de 2.7 e 2.71, respectivamente.

Para produção de protease, os isolados endofíticos que apresentaram resultados positivos foram o AI37A (N.I), AI9A (*Colletotrichum* sp.), AI12A (N.I), AI15A (*Colletotrichum* sp.), AI35B (N.I), AI11A (N.I), AI24B (N.I), AI17B (*Preussia* sp.), AI30B (*Alternaria* sp.) e AI32 (Sordariomycetes), com IE variando entre 1.13 e 2.6, divididos em quatro (4) grupos estatísticos, conforme observado na Tabela 2.

Os isolados AI28A (*Colletotrichum* sp.), AI18A (*Trichoderma* sp.), AI16B (*Diaporthe* sp.) e AI14B (*Colletotrichum* sp.), apresentaram resultados negativos para produção de todas as enzimas hidrolíticas testadas.

3.4 Índice de Antagonismo

Na verificação do IA contra o fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*, foram avaliados os vinte e dois (22) fungos endofíticos isolados de *Azadirachta indica* usando a técnica de Cultura Pareada.

Os isolados AI12A (N.I), AI27A (N.I), AI30B (*Alternaria* sp.), AI25B (*Phyllosticta capitalensis*), AI11A (N.I), AI2A (N.I) e AI3A (N.I), apresentaram resultados positivos contra o fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*.

Por meio da análise de variância (ANOVA) do Índice de Antagonismo (IA), foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens endofíticas testadas contra o fitopatógeno. Os IA obtidos variaram entre 5.6 e 52%, sendo que quinze (15) isolados não apresentaram inibição do fitopatógeno. Assim foram gerados sete (7) grupos estatísticos distintos, como observado na Tabela 3.

De acordo com a escala de Badalyan (2002), as interações competitivas entre endófitos, tanto os isolados de *Azadirachta indica*, frente ao fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* foram dos tipos: A = inibição por contato micelial, observados nos isolados AI2A, AI11, AI3A AI30B (*Alternaria* sp) e AI27A (N.I), B = inibição à distância, observado no isolado AI25B (*Phyllosticta* sp.) e CA1 = sobreposição parcial do antagonista após inibição por contato micelial, visível no isolado AI12A (N.I) (Figura 2 e Tabela 3).

4. Discussão

No presente estudo podemos notar que a planta *Azadirachta indica*, conhecida como neem, possui em sua comunidade endofítica cultivável, fungos de diferentes gêneros, os quais possuem atividade na produção *in vitro* de enzimas, como amilase, lipase, esterase, pectinase e protease, bem como, a atividade antagônica desses endófitos contra o fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*.

Estudos têm demonstrado que os fungos endofíticos deste hospedeiro produzem vários compostos bioativos potenciais, que precisam ser caracterizados (VERMA et al., 2011; RICCI et al., 2022). Esta planta hospeda diferentes tipos de fungos endofíticos, conforme relatado por Chutulo & Chalannavar (2018), onde as funções biológicas dos seus compostos bioativos foi discutida, tendo em vista suas futuras perspectivas industriais.

Desta forma, pode-se notar no presente estudo a possibilidade da obtenção de fungos endofíticos isolados de *Azadirachta indica*, dos gêneros identificados *Colletotrichum* sp., *Diaporthe* sp., *Phyllosticta* sp., *Alternaria* sp., *Trichoderma* sp., *Phomopsis* sp. e do gênero *Preussia* sp., como também, a nível da classe Sordariomycetes.

Neste sentido, Verma et al., 2011, obteve isolados a partir de folhas de *Azadirachta indica*, as espécies de fungos dos gêneros *Colletotrichum* sp., *Trichoderma* sp. e *Alternaria* sp., resultados que corroboram com o estudo conduzido por Kumaresan et al. (2015) e Taware et al. (2017), no qual foram isolados endófitos dos gêneros *Trichoderma*, *Colletotrichum*, e *Alternaria*, entre outros, também das folhas de *Azadirachta indica* (A. Juss.), demonstrando que tais gêneros são comuns desta planta hospedeira.

Outros gêneros obtidos no presente estudo, também já foram descritos, sendo relatado por Wu et al. (2008), o isolamento do endófito dos gêneros *Phomopsis*, e *Phyllosticta*, sendo este último também relatado por Tejesvi et al. (2006), a partir da casca interna de *Azadirachta indica*.

É crescente a demanda por pesquisas no isolamento e identificação de microrganismos de interesse biotecnológico, em especial atenção às enzimas microbianas, devido a eficiência em aplicações industriais (França et al., 2020).

Com isto, no presente estudo, após a seleção dos fungos isolados e identificação dos fungos endofíticos, foram obtidos resultados favoráveis quanto a eficiência na produção das enzimas hidrolíticas amilase, lipase, esterase, pectinase e protease.

Dos fungos analisados, apenas quatro (4) apresentaram resultados negativos para produção das enzimas hidrolíticas testadas, enquanto os isolados *Alternaria* e *Phyllosticta*, obtiveram resultados promissores, tanto para a produção enzimática, como também, no teste de antagonismo.

No presente estudo, os gêneros *Preussia* sp. e *Colletotrichum* sp., bem como, a classe Sordariomycetes sp., também apresentaram resultados positivos na produção enzimática.

Em concordância a estes resultados, o endófito do gênero *Alternaria* sp., foi dominante na produção de enzimas, no estudo realizado por Taware et al. (2017), onde também foi observada a produção de enzimas pelo endófito *Colletotrichum* sp.

Em divergência a estes resultados, no estudo de Wenzel et al. (2013), foram observados resultados negativos para produção de lipase e protease, a partir do endófito *Alternaria* sp. A produção da enzima lipase por endófitos do gênero *Alternaria* sp., foi estudada por Iftikhar et. al (2015), apresentando resultados favoráveis.

Já no estudo de Alves et al. (2020), foi analisada a capacidade de produção da enzima lipase por fungos endofíticos dos gêneros *Alternaria* sp. e *Diaporthe* sp., as quais também estavam em processo de depósito na Micoteca URM (University Recife Mycology) da Universidade Federal de Pernambuco, obtendo resultados negativos.

No presente estudo, o gênero *Diaporthe* sp., apresentou resultados negativos, tanto para produção enzimática, como também, no teste de antagonismo.

No trabalho realizado por Reyes RDC et al. (2021), fungos endofíticos dos gêneros *Colletotrichum* sp e *Phyllosticta* sp., apresentaram capacidade de produção enzimática, sendo também observado que de algumas espécies estudadas, não foi possível a identificação, e que as mesmas também produziram enzimas, resultados também similares com o presente estudo.

As diferenças observadas nesta pesquisa, em relação a estudos anteriores, podem ser indicativos de possíveis limitação da técnica. Tal afirmação foi observada nos estudos que também apresentaram divergências em relação à outras literaturas. De acordo com Alves et al. (2020), o resultado negativo para a formação de halo de degradação pode ser justificado pela limitação da técnica utilizada.

Desta forma, não é possível afirmar que os isolados avaliados não sejam produtores de enzimas.

Há tempos os microrganismos vêm sendo uma promissora fonte de recursos biotecnológicos, com o intuito de se descobrir fungos com potenciais aplicações na agricultura (SANTOS et al., 2021).

De acordo com Imbeloni et al. (2015), o controle biológico tem sido indicado como alternativa desejada no manejo de pragas. A opção ao seu uso, quando disponível, altera diretamente a utilização e consumo de produtos químicos sintéticos, conhecidos como agrotóxicos ou agroquímicos. Nesse contexto, inúmeras espécies de fungos têm sido estudadas como agentes de biocontrole de doenças em diversas culturas agrícolas.

Os fungos fitopatogênicos, assim como os endófitos, habitam no interior dos tecidos vegetais, no entanto, diante de estresses bióticos e abióticos, tornam-se patógenos e causam doenças nas plantas por meio de distúrbios em seu metabolismo celular (BOMFIM et al., 2013), como ocorre no caso dos gêneros fúngicos *Alternaria* e *Phyllosticta* isolados no presente estudo, uma vez que são considerados fungos patogênicos (Walker et al. 2013), por serem bastante conhecidos como produtores de micotoxinas de grande periculosidade, principalmente em alimentos (DANELLI et al., 2012; MAGNANI et al., 2005).

Embora fungos do gênero *Phyllosticta* sejam conhecidos pelo seu potencial fitopatogênico, algumas espécies produzem metabólitos biotativos os quais possuem outras atribuições Kirk et al. (2008), sendo considerado taxonomicamente confuso (WIKEE et al., 2011).

Já no trabalho realizado por Imbeloni et al. (2015), foram utilizados isolados de *Alternaria* sp., observando resultados promissores contra fungos fitopatogênicos.

Estes resultados corroboram com o presente estudo, onde os gêneros fúngicos isolados *Alternaria* sp. e *Phyllosticta* sp., demonstraram capacidade antagônica contra o fungo patogênico *Macrophomina phaseolina*, podendo então serem considerados como promissores agentes de biocontrole.

5. Conclusão

No presente estudo, podemos observar como principais resultados a efetiva capacidade da planta *Azadirachta indica* (A. Juss), conhecida como neem, em abrigar fungos endofíticos, demonstrando a possibilidade da utilização de diferentes gêneros e classe de microrganismos isolados desta planta, considerados promissores na produção *in vitro* das enzimas amilase, lipase, esterase, pectinase e protease, bem como, a atividade antagônica desses endófitos contra o fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*.

Desta forma, fica confirmado o potencial biotecnológico dos fungos endofíticos avaliados, com ênfase aos gêneros *Alternaria* sp., na produção das enzimas protease, esterase e lipase, e *Phyllosticta* sp., na produção da enzimas pectinase, como também, ambos demonstraram o potencial de inibição contra o fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*.

Diante dos resultados, fica evidenciada a relevância em prosseguimento nas pesquisas relacionadas à prospecção de microrganismos oriundos de tecidos vegetais, com comprovada importância biotecnológica, capazes de contribuir para novos processos industriais e agrícolas, no que se refere à operações eficientes que promovam impacto ambiental positivo e diminuição de perdas econômicas.

6. Referências

- ALMEIDA, T. T., ORLANDELLI, R. C., AZEVEDO, J. L., & PAMPHILE, J. A. (2015). Molecular characterization of the endophytic fungal community associated with *Eichhornia azurea* (Kunth) and *Eichhornia crassipes* (Mart.) (Pontederiaceae) native to the Upper Paraná River floodplain, Brazil. *Genetics and molecular research: GMR*, 14(2), 4920–4931. <https://doi.org/10.4238/2015.May.11.25>.
- ALVES, V, C, S.; OLIVEIRA, F, F.; COSTA, M, V, D.; NASCIMENTO, S, S.; DE LIMA, J, M, S.; SOUZA-MOTTA, C, M. Seleção de fungos endofíticos produtores de lipase. Capítulo 17. **Micologia [recurso eletrônico]: fungos e/ou seus metabólitos como objeto de estudo** / Organizador Benedito Rodrigues da Silva Neto. – Ponta Grossa, PR: Atena, 2020.
- BIZARI, E. H. **Estudo de herança genética da resistência à *Macrophomina phaseolina* na cultura da soja.** Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. CDU 631.52:633.34.
- BOMFIM, A.G.J., ALBUQUERQUE, G.M.R., BEZERRA, J.D.P., SILVA, D.C.V., SVEDESE, V.M., PAIVA, L.M., SOUZA-MOTTA, C.M. 2013. Fungos fitopatogênicos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Cultivada em área de floresta tropical seca no Brasil. 2013. **Bol. Soc. Latin. Carib. Cact. Suc.** 10, n.2, mayo-agosto. pp. 27-33.
- CLAIR WALKER, C.; MACIEL, C, G.; BOVOLINI, M, P.; POLLET, C, P.; MUNIZ, M, F, B. Transmissão e Patogenicidade de *Phomopsis* sp. Associadas às Sementes de Angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida* Benth.). **Floresta e Ambiente** 2013 abr./jun.; 20(2):216-222. ISSN 2179-8087 (online).
- DANELLI, A, D.; VIANA, E.; FIALLOS, F, G. Fungos patogênicos detectados em sementes de trigo de ciclo precoce e médio, produzidas em três lugares do Rio Grande do Sul, Brasil. **Scientia Agropecuaria** 1(2012) 67 – 74.

DE OLIVEIRA, J. C. M. D. **Potencial biotecnológico de actinomicetos para produção de enzimas hidrolíticas e biocontrole in vitro de pantoea ananatis, agente causal da mancha-branca do milho.** Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de São João del-Rei, 2017.

EMERENCIANO, D.P. (UFRN); MACIEL, M.A.M. (UNP/UFRN); Baracho, B.B.D. (UFRN); Moura, M.F.V. (UFRN). **Técnicas de obtenção do óleo de Azadirachta indica e aplicações comerciais.** In: 54º Congresso Brasileiro de Química. Natal-RN. ABQ – Associação Brasileira de Química. ISBN 978-85-85905-10-1. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2014/trabalhos/11/5561-18621.html>. Acesso em: 26 de março de 2023.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L.; **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**, 2a. ed., EDUCS: Caxias do Sul, 2010.

GONÇALVES, B., BASTOS, E., HANNA, S. prospecção tecnológica de fungos endófitos e aplicações na indústria farmacêutica. **Cad. Prospec., Salvador**, v. 10, n. 1, p.56-67, jan./mar. 2017. D.O.I.: dx.doi.org/10.9771/ cp.v10i1.20114.

IFTIKHAR, T.; ABDULLAH, R.; IQTEDAR, M.; AKM, AFTAB.; NIAZ, MUBASHIR.; SIDRA; TABASSUM, B.; MAJEEED, H. Produção de lipases por *Alternaria* sp. (mbl 2810) através da optimização das condições ambientais utilizando a técnica de fermentação submersa. **International Journal of Biosciences (IJB)** 2015 Vol.7 No.2 pp.178-186 ref.31. **ISSN:** 2220-6655.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi, 10th edn. **CAB International**, Wallingford, 2008.

KUMARESAN S., KARTHI V., SENTHILKUMAR V., BALAKUMAR BS, STEPHEN A. Constituintes bioquímicos e potencial antioxidante de fungos endofíticos isolados das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) de Chennai. **J. Acad. Res. Ind.** 2015; 3 :355–361.

MAGNANI, R, F.; DE SOUZA, G, D.; FILHO, E, R.; FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M, B.; WULFF, N, A. **Sociedade Brasileira de Química**, 2005. Disponível em: https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/38/111/38111156.pdf. Acesso em: 15 de junho de 2022.

NETO, P. Q. C. **Isolamento e Identificação de fungos endofíticos da pupunha (*Bactris gasipaes Kunth*) e caracterização por marcadores moleculares.** 86 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, 2002.

PILEGGI, M.; RAIMAN, M. P.; MICHELI, A.; BEATRIZ, S.; BOBATO, V. Ação Antimicrobiana e interação endofítica em *Symphytum officinale L.* Publicatio UEPG **Biological and Health Sciences**. v. 8 n.1, p. 47-55, 2002.

RAJAGOPAL, K., KATHIRAVAN, G., & KARTHIKEYAN, S. (2011). Extração e caracterização de melanina de Phomopsis: Um fungo felofítico isolado de *Azadirachta indica A. Juss.* **Jornal Africano de Pesquisa em Microbiologia**, 5 (7), 762-766.
R CORE TEAM. R., 2014. A language and environment for statistical computing (Version 3.0. 2). Vienna.

REYES RDC, PARAYAO AM, WAING KGD 2021. Identification and evaluation of enzymatic ability of fungal endophytes from *Citrofortunella microcarpa* (Bunge) Wijnands. **Studies in Fungi** 6(1), 460– 468, Doi 10.5943/sif/6/1/35.

SANTOS, G, B, L.; SILVA, J, M.; SOBRINHO, R, R.; NASCIMENTO, A, R, S.; MONTALDO, Y, C.; SILVA, R, M, S.; SANTOS, T, M, C.; CAETANO, L, C. Prospecção química e atividade antagônica in vitro do endófito Phomopsis sp. contra fungos fitopatogênicos. **Journal of Environmental Analysis and Progress**. V. 06 N. 03(2021) 167-173. ISSN: 2525-815X.

STROBEL, G. A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n.4, p.491-502, 2003.

Taware A. S.* More Y. W. Ghag S. V., Rajurkar S. K. Screening of endophytic fungi isolated from *Azadirachta indica* A. Juss. for production of enzyme. **Bioscience Discovery**, 8(4): 688-694, October – 2017. Bioscience Discovery, 8(4): 688-694, October – 2017.

TEJESVI MV, MAHESH B., NALINI MS, PRAKASH HS, KINI KR, SUBBIAH V., SHETTY HS. Fungal endofíticos conjuntos de árvores medicinais etnofarmacologicamente importantes. **Pode. J. Microbiol.** 2006; 52 :427–435. doi: 10.1139/w05-143.

VERMA VC, GOND SK, KUMAR A, KHARWAR RN, BOULANGER LA, STROBEL GA. Endophytic Fungal Flora from Roots and Fruits of an Indian Neem Plant *Azadirachta indica* A. Juss., and Impact of Culture Media on their Isolation. **Indian J Microbiol.** 2011 Oct;51(4):469-76. doi: 10.1007/s12088-011-0121-6. Epub 2011 Feb 3. PMID: 23024409; PMCID: PMC3209946.

WENZEL, J. B.; MORESCO, A, A, DE A.; VILAS BOAS, E.; BURIN, F, A, G.; SOUZA, R, O. Atividade Enzimática e Antimicrobiana de Fungos Endofíticos Isolados de Soja. **Persp. Online: biol. & saúde**, Campos dos Goyatazes, 9 (3), 01 – 15, 2013. seep.perspectivaonline.com.br.

WIKEE, S.; UDAYANGA, D.; CROUS, P. W.; CHUKEATIROTE, E.; MCKENZIE, E. H. C.; BAHKALI, A. H.; DAI, D.; HYDE, K. D. *Phyllosticta* - an overview of current status of specie recognition. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 51, p. 43-61, 2011.

WU, S. H., CHEN, Y. W., SHAO, S. C., WANG, L. D., LI, Z. Y., YANG, L. Y., LI, S. L., & HUANG, R. (2008). Ten-membered lactones from *Phomopsis* sp., an endophytic fungus of *Azadirachta indica*. **Journal of natural products**, 71(4), 731–734. <https://doi.org/10.1021/np070624j>.

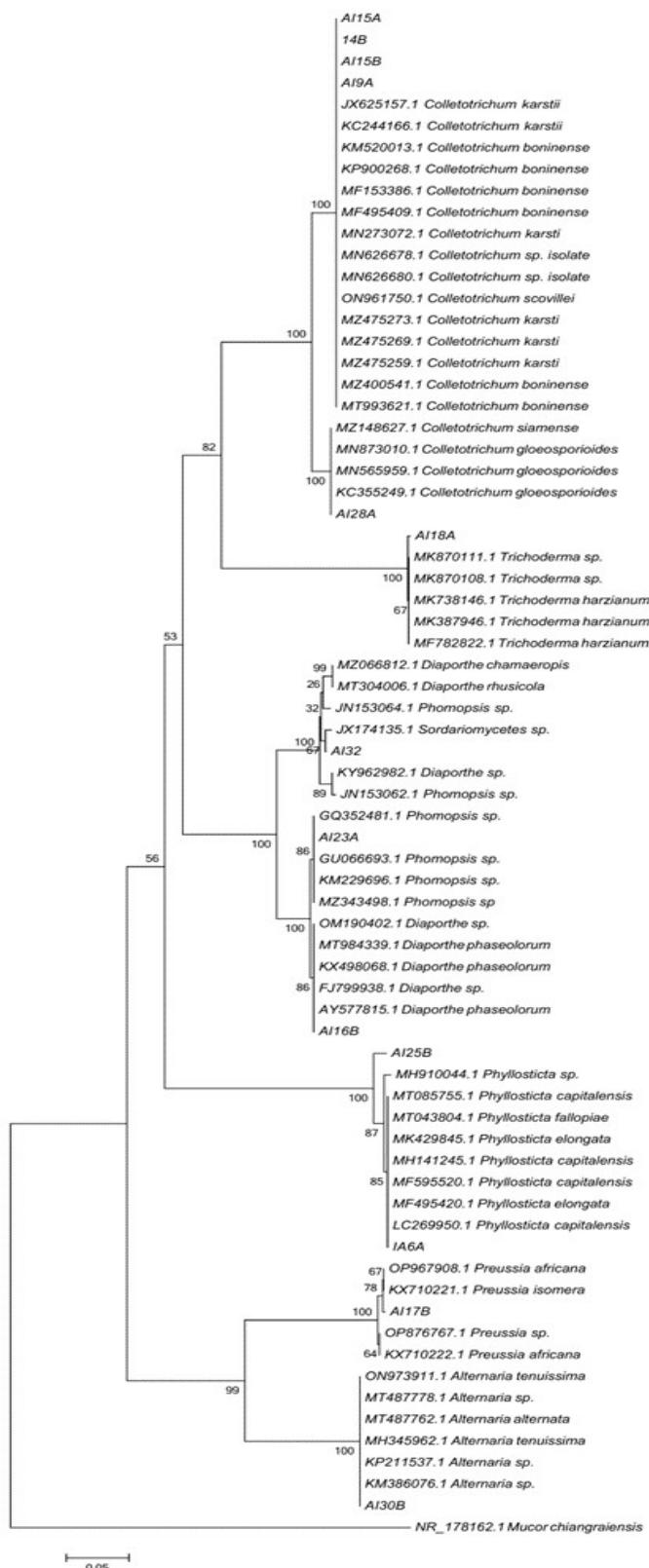


Figura 1. Árvore filogenética construída com sequências de fungos endofíticos isolados de *Azadirachta indica* e sequências do GenBank (indicadas pelo código do banco de dados), usando o método de junção de vizinhos usando p-distance para nucleotídeos, com a opção de deleção de gap pairwise. Os números acima e abaixo de cada nó indicam a frequência (em porcentagem) de cada ramificação em análises bootstrap de 10.000 réplicas.

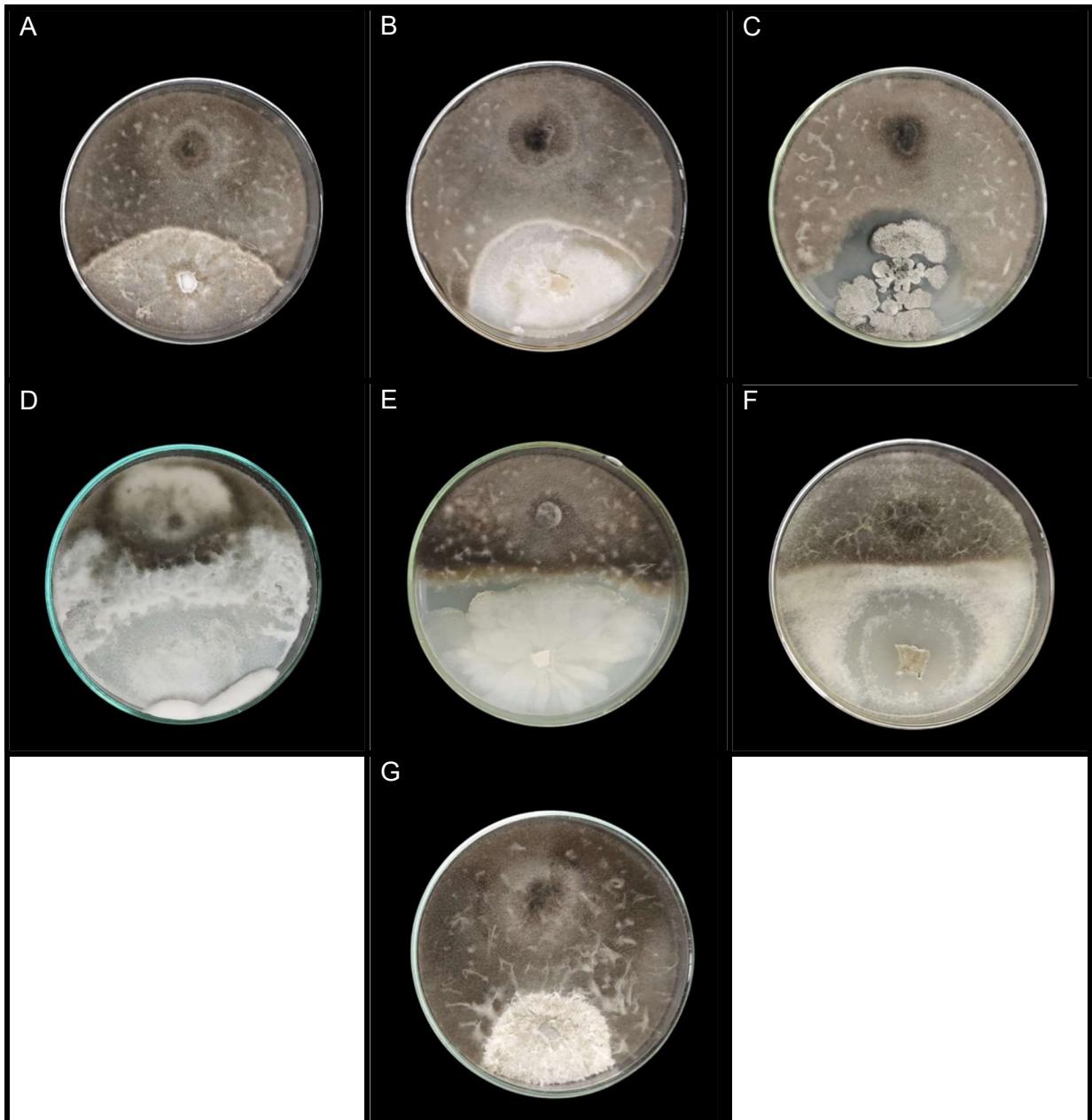


Figura 2. Teste antagônico de fungos isolados de *Azadirachta indica* contra o fungo fitopatogênico *Macrophomina phaseolina*. A) Isolado AI27A; B) Isolado AI30B (*Alternaria* sp.); C) Isolado AI25B (*Phyllosticta* sp.); D) Isolado AI12A; E) Isolado AI11A; F) Isolado AI2A; G) Isolado AI3A.

Tabela 1. Endófitos isolados e identificados de *Azadirachta indica* e o percentual de identidade encontrados no site do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Isolado endofítico	Linhagem mais relacionada no GenBank	% Identidade	Código Genbank
AI14B	<i>Colletotrichum karstii</i>	99.82%	KC244166
AI15A	<i>Colletotrichum scovillei</i>	99.64%	ON961750
AI15B	<i>Colletotrichum boninense</i>	99.64%	KM520013
AI16B	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	97.58%	MT984339
AI32	Sordariomycetes sp.	97.59%	JX174135
AI9A	<i>Colletotrichum boninense</i>	97.27%	KP900268.1
AI6	<i>Phyllosticta fallopiae</i>	98.29%	MT043804.1
AI30B	<i>Alternaria</i> sp.	99.62%	KP211537.1
AI18A	<i>Trichoderma harzianum</i>	99.48%	MK738146.1
AI23A	<i>Phomopsis</i> sp.	99.45%	GU066693.1
AI25B	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	97.65%	MT085755.1
AI28A	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99.43%	MN873010.1
AI17B	<i>Preussia isomera</i>	99%	KX710221.1

Tabela 2. Identificação e atividade enzimática de fungos endofíticos isolados de *Azadirachta indica*.

Isolado endofítico	Índice enzimático (IE)*				
	Protease	Esterase	Pectinase	Amilase	Lipase
AI27A (N.I)	-	1.23 ^a ± 0,06	-	-	-
AI17B (<i>Preussia isômera</i>)	2.6 ^a ±0	-	-	-	-
AI30B (<i>Alternaria</i> sp.)	1.79 ^c ±0,21	1.17 ^a ±0,18	-	-	1.23±0,03
AI28A (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	-	-	-	-	-
AI19B (N.I)	-	1.31 ^a ±0,22	-	-	-
AI35B (N.I)	2.53 ^a ±0,11	-	-	1.14±0,02	-
AI15A (<i>Colletotrichum scovillei</i>)	1.33 ^d ±0,08	-	-	-	-
AI9A (<i>Colletotrichum boninense</i>)	1.85 ^c ±0,14	-	-	-	-
AI37A (N.I)	1.94 ^c ±0,4	1.37 ^a ±0,24	-	-	-
AI25B (<i>Phyllosticta capitalensis</i>)	-	-	2.7 ^a ±0,17	-	-
AI12A (N.I)	1.17 ^c ±0	-	-	-	-
AI18A (<i>Trichoderma harzianum</i>)	-	-	-	-	-
AI6 (<i>Phyllosticta fallopiae</i>)	-	-	2.71 ^a ±0,36	-	-
AI11A (N.I)	1.13 ^d ±0,02	-	-	-	-
AI16B (<i>Diaporthe phaseolorum</i>)	-	-	-	-	-
AI32 (Sordariomycetes sp.)	2 ^c ±0,2	-	-	-	-
AI24B (N.I)	2.31 ^b ±1,01	-	-	-	-
AI14B (<i>Colletotrichum karstii</i>)	-	-	-	-	-
AI15B (<i>Colletotrichum boninense</i>)	-	-	-	-	-
AI23A (<i>Phomopsis</i> sp.)	-	-	-	-	-
2A	-	-	-	-	-
3A	-	-	-	-	-

*Médias das triplicatas. Os valores IE seguidos da mesma letra nas colunas não foram distinguidos pelo teste de Scott-knott ($p < 0,05$). ± Desvio padrão.

**(N.I): Não Identificado.

Tabela 3. Atividade antagonística *in vitro* dos endófitos isolados, com atividade, contra o fitopatógeno *Macrophomina phaseolina*.

Isolado endofítico	Índice de antagonismo (%)	Tipo de interação
AI2A (N.I)	52% ^a	A
AI12A (N.I)	40% ^b	CA1
AI11 (N.I)	33% ^c	A
AI3A (N.I)	27.3% ^d	A
AI30B (<i>Alternaria</i> sp)	22% ^e	A
.AI25B (<i>Phyllosticta</i> sp.)	20% ^e	B
AI27A (N.I)	5.6% ^f	A

*Diferentes letras em cima das colunas indicam que, os valores são diferentes pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$).

**(N.I): Isolado não identificado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biotecnologia endofítica pode ser empregada para a produção eficiente de produtos vegetais de considerável importância agrícola, industrial e econômica. A planta *Azadirachta indica* demonstra resultados significativos, de grande relevância, sendo fundamental avanços nas pesquisas com fungos endofíticos para utilização em aplicações biotecnológicas. Novos estudos em tecidos vegetais podem ser determinantes para auxiliar na potencialização das descobertas de compostos bioativos e atividades biológicas de endófitos para traçar perspectivas futuras.