

**CAROLINE ELISE WACULICZ ANDRADE**

Seqüenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA na identificação dos isolados de *Colletotrichum* endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss

Monografia apresentada como requisito parcial à conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Profa. Dra. Chirlei Glienke-Blanco

**CURITIBA  
2007**

Dedico esta monografia ao meu grande amor, amigo e companheiro Clayson e aos meus dois príncipes amados, Tiago e João Pedro.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me possibilitado a realização desta monografia.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Chirlei Glienke Blanco que além de orientadora foi incentivadora e grande amiga em todos os momentos.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Vânia Aparecida Vicente pela amizade e conselhos acerca da realização deste trabalho.

À Professora. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Kava-Cordeiro e Lygia Vitória Galli-Terasawa, pela amizade e ótima convivência no LabGeM - Laboratório de Genética de Microrganismos.

Aos amigos do LabGeM, Juliana Fabris, Douglas Montenegro, Fernanda Tanaka, Tatiane Mariussi e Silva, Danyelle Stringari, Josiane Figueiredo, Rosana Nishimura, Renata Gomes, João Fowler, Jociney Lima e D. Izolde que em diversas oportunidades puderam me auxiliar nas atividades do laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Zoologia pelo auxílio no seqüenciamento de DNA

À amiga Isadora B. Kwiatkowski pela grande ajuda, paciência e compreensão durante o processo de seqüenciamento de DNA.

Às amigas do curso de Biologia Juliana Fabris, Sabrina Prata Mota, Priscila Ramos e Luciana Marcinari pela grande amizade e incentivos para a realização deste trabalho.

Aos queridos companheiros e amigos da Coordenação de Biologia, Ro e Eduardo, grandes pessoas que muito auxiliaram em momentos importantes durante o curso.

Aos meus queridos pais Pedro e Daisi pelo grande amor, ajuda constante em todos os sentidos, pelo incentivo e confiança; além de toda a educação que me proporcionaram para a construção do conhecimento que me possibilitou conquistar esta vitória.

Ao meu irmão Guilherme pelas diversas vezes que cuidou de seus queridos sobrinhos para eu poder me dedicar aos estudos.

Ao meu irmão Kristoferson e minha cunhada Mariana que mesmo longe me incentivaram e me apoiaram nesta jornada.

Aos meus queridos tios Nilo e Eliza que muito contribuíram para minha educação além de importantes palavras de incentivo em diversos momentos.

Aos meus sogros Cláudio e Noemi pelo apoio, incentivo, confiança e grande ajuda em diversos momentos.

Ao meu maravilhoso marido Clayson por todos os momentos de apoio, compreensão, e carinho.

Aos meus queridos filhos Tiago e João Pedro por suas palavra e gesto de amor que expressaram seus sentimentos de compreensão e incentivo para a concretização desta monografia.

"O jovem que deseja ser cientista – e à ciência dedicar todo o seu tempo e amor – tem pelo menos três certezas: a de que morrerá um dia (como todo mundo), a de que não ficará rico (como quase todo mundo) e a de que se divertirá muito (como pouca gente)."

Newton Freire-Maia (1918-2003)

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>iv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>vi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
2.1. Objetivo Geral .....	3
2.2. Objetivos Específicos .....	3
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
3.1. Microrganismos Endofíticos .....	4
3.2. Isolamento de Microrganismos Endofíticos .....	6
3.3. Planta <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss .....	7
3.4 Fungo do Gênero <i>Colletotrichum</i> .....	9
3.5 PCR - Reação em Cadeia da Polimerase e Seqüenciamento .....	12
3.6 DNA Ribossomal.....	15
3.6.1 Marcadores ITS em Estudos Filogenéticos .....	15
3.7 Métodos moleculares em sistemática.....	16
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
4.1. Material Biológico.....	20
4.2. Métodos.....	20
4.2.1. Seqüenciamento da Região ITS1 - 5,8S - ITS2 do DNA Ribossomal.....	20
4.2.1.1. Amplificação da região ITS1 - 5,8S - ITS2 do DNA ribossomal.....	20
4.2.1.2. Purificação do DNA.....	21
4.2.1.3. Reação de Seqüenciamento.....	22
4.2.1.4. Purificação da Reação de Seqüenciamento.....	22
4.2.1.5 Seqüenciamento das amostras.....	22
4.2.1.6. Edição e Análise das Seqüências.....	23
4.2.1.7. Análise Filogenética.....	23

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>32</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>38</b>

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: A e B - Microrganismos endofíticos isolados de folhas de espinheira-santa em meio BDA a 28°C.....7
- FIGURA 2: A - Aspecto do arbusto de espinheira-santa; B – Aspecto do fruto tipo cápsula da espinheira-santa; C – Folhas e frutos maduros (deiscentes) de *M. ilicifolia*; D - Aspecto da semente de *M. ilicifolia*.....9
- FIGURA 3: Dendrograma gerado a partir dos dados de similaridade genética de 16 isolados endofíticos de *Colletotrichum* spp por meio de Marcadores RAPD.....11
- FIGURA 4: Sítios de hibridização dos *primers* na região flanqueadora do gene que codifica o DNA ribossomal.....21
- FIGURA 5 – Eletroforese em gel de agarose da PCR para amplificação do rDNA .....24
- FIGURA 6 – Eletroforese após purificação da amplificação das amostras COI2, COL7 e FV113 .....25
- FIGURA 7 – Árvore Filogenética enraizada com *C. Lindemuthianum* gerada pelo método de *Neighborn Joining* .....28
- FIGURA 8 - Árvore Filogenética enraizada com *C. Lindemuthianum* gerada pelo método da Máxima parcimônia.....29
- FIGURA 9 – Alinhamento comparativo da linhagem COL13 e duas linhagens de *Leptosphaeria microscópica*.....30

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Seqüências dos <i>primers</i> utilizados na amplificação da Região ITS1 - 5,8S - ITS2 do DNA Ribossomal.....	21
---	----

## LISTAS DE ABREVIATURAS

COL : Gênero *Colletotrichum*

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA: Ácido etileno diamono tetracético

HCl: Ácido clorídrico

ITS: *Internal Transcribed Spacer*

Kb: Quilo base (1000 pares de base)

MC: Meio completo

MAA: Meio Agar-água

NCBI: National Center for Biotechnology Information

pb: Pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

RAPD: RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA

rDNA: DNA ribosomal

RNA: Ácido ribonucleico

RNAase: Ribonuclease

rpm: rotações por minuto

TBE: Tris-Ácido. Bórico-EDTA

TE: Tris-EDTA

Tris: Tris-(hidroximetil)-aminometano

## RESUMO

*Maytenus ilicifolia* Mart. Reiss., espinheira-santa, é uma planta utilizada para fins medicinais no tratamento de várias doenças, como úlceras gástricas, devido à produção de compostos químicos, como triterpenos e polifenóis. Apresenta microrganismos endofíticos (ou endófitos) que são organismos que vivem em associação simbiótica por pelo menos durante um período de seu ciclo de vida, podendo conferir certos benefícios a este vegetal. Plantas medicinais com propriedades antimicrobianas são habitadas por estes microrganismos, sugerindo que a ação antibacteriana ou antifúngica poderia estar no endófito e não na planta, ou provavelmente na interação. PILEGGI (2006) abordou a caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* por meio de marcadores RAPD e de características morfológicas das colônias; também verificou a presença de pelo menos dois grupos de isolados, sugerindo que os mesmos pertençam a espécies distintas do gênero *Colletotrichum*. Tal autor também obteve resultado promissor em bioprospecção de um isolado denominado de *Mycelia sterilia* (FV113). O presente trabalho buscou caracterizar a espécie dos isolados por meio do seqüenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA. Foram utilizados 4 isolados de *Colletotrichum* pertencentes a subgrupos distintos (COL2, COL6, COL7 e COL13), e o isolado FV113. Analisando os alinhamentos e as árvores geradas, foi possível sugerir que o isolado endofítico COL13 pertence à espécie *Glomerella cingulata* (anamorfo *Colletotrichum gloeosporioides*) e os isolados endofíticos COL2, COL6 e COL7 pertencem à espécie *Colletotrichum boninense*. Por outro lado, o isolado endofítico inicialmente denominado de *Mycelia sterilia* pertence ao gênero *Leptosphaeria*, possivelmente à espécie *Leptosphaeria microscopica*.

Palavras Chave: Fungo endofítico, *Maytenus*, espinheira-santa, Seqüenciamento, ITS, rDNA

## 1. INTRODUÇÃO

*Maytenus ilicifolia* Mart. Reiss., espinheira-santa, planta pertencente à família Celastraceae, é muito utilizada para fins medicinais no tratamento de várias doenças, como por exemplo úlceras gástricas, devido à produção de certos compostos químicos, como triterpenos e polifenóis. Dependendo de sua localização geográfica esta planta recebe designações como cancosa, cancerosa, espinho de Deus, salva-vidas entre outras. No Brasil pode-se encontrar espinheira-santa principalmente nos estados do Sul. Em países da América Latina pode-se citar o Uruguai, Argentina, Bolívia e Paraguai.

Microrganismos endofíticos (ou endófitos) são organismos que vivem em associação simbiótica com várias plantas pelo menos durante um período de seu ciclo de vida, podendo conferir certos benefícios a este vegetal. Existe uma grande diversidade endofítica e esta é constituída principalmente por bactérias e fungos que não causam prejuízos ao hospedeiro, ao contrário dos patógenos. Os endófitos têm sido descritos como protetores contra o ataque de outros microrganismos, insetos, e animais herbívoros, devido à produção de toxinas. São capazes ainda de produzir fitormônios, enzimas e outros compostos químicos, oferecendo vantagens à planta hospedeira, enquanto se desenvolvem em seu interior. No entanto, sob condições de estresse, podem tornar-se patogênicos. Existem relatos do crescimento, enraizamento e resistência ao estresse produzido pelo ambiente na planta com a ajuda destes microrganismos endofíticos. Em geral crescem em meios de cultivo simples, sendo facilmente isolados.

Estudos sobre o potencial destes microrganismos para a área farmacêutica e biotecnológica têm-se mostrado muito importantes, devido principalmente à descoberta de substâncias para uso terapêutico humano, como por exemplo, antibióticos.

Plantas medicinais com propriedade antimicrobiana são habitadas por microrganismos endofíticos, sugerindo que a ação antibacteriana ou antifúngica poderia estar no endófito e não na planta, ou provavelmente na interação. No Brasil vários autores têm mostrado a produção de fármacos por endófitos como *Xylaria* spp, *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum* sp e também *Guignardia* sp. De um isolado de

*Guignardia* sp endófito da planta medicinal cajazeira, *Spondias mombin*, já foi identificado um novo metabólito, o ácido guignardico (RODRIGUES-HEERKLOTZ et al.,2001).

PILEGGI (2006) abordou a caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico. Neste trabalho foram isolados microrganismos endofíticos de folhas, pecíolos e sementes de espinheira-santa, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., sendo 915 endófitos de diferentes tecidos, entre eles 793 fungos filamentosos, 1 actinomiceto e 121 bactérias. Nos isolamentos de folhas e pecíolos, os fungos filamentosos foram mais freqüentes do que as bactérias. Já em sementes ocorreu o inverso, sendo predominante o isolamento de bactérias.

Por meio de características morfológicas das colônias e a observação de microcultivo em microscópio ótico, PILEGGI (2006) sugeriu a identificação de alguns isolados até gênero os quais colonizaram com maior freqüência os tecidos de *M. ilicifolia*. Entre eles encontram-se fungos dos gêneros *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp, *Bipolaris* sp., *Guignardia* sp. e *Cladosporium*. Em *Bipolares* e *Guignardia*, verificou-se especificidade por tecido, sendo isolados quase que exclusivamente em folhas; enquanto que *Cladosporium* sp. não mostrou preferência, sendo tal fungo isolado tanto de folhas, como pecíolos e sementes. PILEGGI (2006) relatou o grande potencial de produção de substâncias antimicrobianas em alguns isolados endofíticos, como o fungo FV113, não identificado, que inibiu o crescimento de *Fusarium* sp., *Guignardia citricarpa* e *Micrococcus luteus*. Demonstrando assim, potencial uso em controle biológico de alguns isolados endofíticos analisados e a partir dos dados de marcadores moleculares, sugere-se pelo menos duas espécies de *Colletotrichum* habitando endofiticamente *M. ilicifolia*. PILEGGI (2006) utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD verificou a presença de pelo menos dois grupos de isolados, sugerindo que os mesmos pertençam a espécies distintas. O presente trabalho busca elucidar esta questão, pelo seqüenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de isolados destes grupos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

- Identificação das espécies de *Colletotrichum* isolados como endófitos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Seqüenciar a região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 4 isolados endófitos de *Colletotrichum* e um isolado *Mycelia sterilia* não identificado;
- Editar e alinhar as seqüências do rDNA dos endófitos;
- Comparar as seqüências com as disponíveis no banco de seqüências GENBANK do NCBI;
- Identificar as espécies de *Colletotrichum* e de *Mycelia sterilia* em estudo.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1. Microrganismos Endofíticos**

Microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior das plantas, sendo encontrados em tecidos vegetais como folhas e ramos (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Esta comunidade endofítica é constituída principalmente por fungos e bactérias, e ao contrário dos microrganismos patogênicos, não causam prejuízos aos seus hospedeiros. Os endófitos podem desempenhar relevante função para a sanidade do vegetal, já que atuam como agentes controladores de microrganismos fitopatogênicos, no controle de insetos e até mesmo protegem a planta contra herbívoros (NETO; AZEVEDO; ARAUJO, 2002). A capacidade de colonizar tecidos de hospedeiros internos fez com que os endófitos se tornassem valiosos para a agricultura como uma ferramenta para melhorar o desempenho da produção (AZEVEDO et al., 2000).

Os endófitos têm sido descritos como protetores contra o ataque de outros microrganismos, insetos, e animais herbívoros, devido à produção de toxinas. Podem ainda produzir fitormônios, enzimas e outros compostos químicos, oferecendo vantagens à planta hospedeira, enquanto se desenvolvem em seu interior. No entanto, sob condições de estresse, podem tornar-se patogênicos (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO et al., 2000).

Microrganismos que beneficiam e colonizam o interior do hospedeiro e que formam estruturas visíveis são intensamente estudados. Este é o caso das bactérias fixadoras de nitrogênio que formam nódulos em raízes e os fungos micorrízicos que entre outros efeitos benéficos, aumentam a absorção dos nutrientes pelos seus hospedeiros. No final dos anos 70 do século XX, vários estudos demonstraram que os microrganismos endofíticos que se encontravam humildemente dentro de plantas, possuíam algumas funções imprescindíveis para a defesa de seus hospedeiros (NETO; AZEVEDO; ARAUJO, 2002).

Os microrganismos que habitam o interior de uma planta, pelo menos durante um período de seu ciclo de vida, são considerados como endofíticos. Porém a distinção entre endofíticos, epifíticos (os que habitam a superfície da planta) e fitopatogênicos

(aqueles que causam doenças as plantas) é puramente didática. Há um gradiente que os separa e assim, surge uma situação onde é uma tarefa muito difícil achar limites para separar cada categoria (AZEVEDO et al., 2000).

A ocorrência de microrganismos endofíticos pode ser relativamente freqüente, as mais frequentemente encontradas são chamadas de dominantes e as mais raras de secundárias (GLIENKE, 1995; PEREIRA; AZEVEDO; PETRINI, 1993; AZEVEDO, 1998). O clima tem grande influência na ocorrência destes microrganismos, em climas temperados a diversidade de espécies é bastante alta tanto em termos quantitativos como qualitativos (RODRIGUES; PETRINI, 1997).

A biodiversidade vegetal em países de clima tropical e subtropical como o Brasil é imensa. Estima-se que cada espécie vegetal possua microrganismos endofíticos ainda não identificados e com propriedades pouco conhecidas, mas potencialmente de interesse aplicado. Além disso, estes microrganismos podem ser utilizados como vetores para a introdução de características de interesse biotecnológico na planta. Assim, fungos e bactérias endofíticos poderiam ser alterados geneticamente, a fim de expressarem genes de interesse, podendo ser utilizados para o controle de patógenos, promoção de crescimento vegetal, síntese de vitaminas, aminoácidos e vacinas no interior da planta hospedeira (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Estes organismos que residem nos tecidos vivos da planta hospedeira realizam inúmeras relações, variando da simbiose a patogenicidade. Em virtude da sua contribuição para a planta hospedeira, os endófitos podem produzir uma diversidade de substâncias de potencial uso para a medicina moderna, agricultura e indústria (STROBEL; DAISY, 2003). Estudos revelaram grandes propriedades de interesse biotecnológico relacionados a estes microrganismos endofíticos. Hoje atribui-se a estes endófitos propriedades importantes como o aumento da resistência à condição de estresse, produção de hormônios vegetais, substâncias com função fisiológica para a planta, toxinas, substâncias antitumorais, entre outras propriedades (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO et al., 2000; STAMFORD et al., 2001; STAMFORD et al., 2002; SUTO et al., 2002; STROBEL, 2003). São grandes as perspectivas do potencial destes organismos

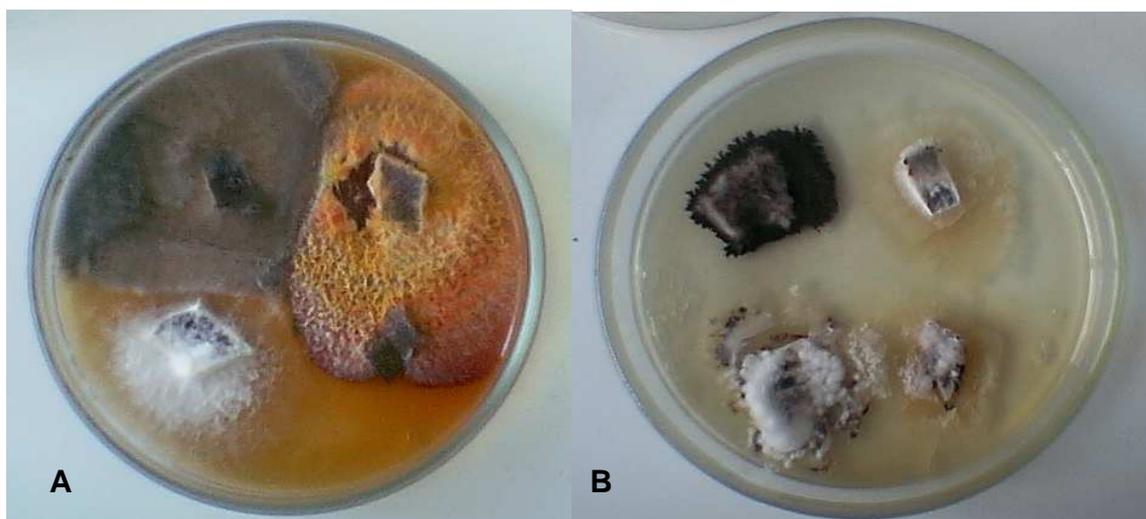
de produzir novas drogas que podem ser candidatos efetivos para tratar doenças em humanos, plantas ou animais (STROBEL; DAISY, 2003).

### **3.2. Isolamento Endofítico**

O processo de isolamento de endófitos exige cuidados especiais para que sejam excluídos os microrganismos que vivem na superfície do hospedeiro, os epífitos. A desinfestação da superfície das folhas, caules e outros órgãos vegetais é uma etapa fundamental para o adequado isolamento destes microrganismos. Os tempos de tratamento e a concentração do agente desinfetante podem variar de acordo com a textura do material a ser utilizado, razão pela qual devem ser feitos testes preliminares para a adequação da metodologia de isolamento, para que apenas os microrganismos epifíticos, mas não os endofíticos sejam eliminados (BLANCO, 1999). Os meios de cultura devem ser apropriados, de acordo com o grupo de endófitos que se deseja isolar, podendo ser acrescentadas substâncias seletivas, como antibióticos, que inibem o crescimento de bactérias, ou fungicidas, que restringem o crescimento de fungos. Outras variáveis igualmente importantes devem ser levadas em consideração, como a idade da planta e dos órgãos utilizados, o local e a época da coleta, a temperatura de incubação das placas para o isolamento, além da recorrência do isolado, revelando o seu verdadeiro estado endofítico (PETRINI, 1991; AZEVEDO, 1998). Deste modo obteve-se como resultado o isolamento de microrganismos endofíticos de folhas de espinheira-santa em meio BDA a 28°C, Figura 1.

Também podem ser utilizados meios específicos que permitem o crescimento de apenas um determinado tipo de microrganismo que se deseja isolar em particular. Os microrganismos endofíticos também são encontrados em muitas espécies de plantas medicinais, o que lhes dá a importância para serem estudados.

FIGURA 1: A e B - Microrganismos endofíticos isolados de folhas de espinheira-santa em meio BDA a 28°C



Fonte: PILEGGI, 2006

### 3.3. Planta *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss

A planta *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss é incluída na classe Magnoliopsida, na ordem Celastrales e na família Celastraceae, em que compreende cerca de 50 gêneros e 800 espécies (CRONQUIST, 1981).

Ela é denominada popularmente de espinheira-santa (PR, RS), cancerosa, erva-santa, espinheira-divina, erva cancerosa (RS) e cancorosa (PR) (CARVALHO-OKANO, 1992), espinho de Deus, limãozinho, maiteno, salva-vidas e também sombra de touro (BITTENCOURT, 2000).

*Maytenus ilicifolia* se localiza predominantemente em florestas ombrófilas mistas, muitas vezes em ambientes ciliares e nos agrupamentos arbóreos (capões) na região de predomínio das estepes (CERVI et al., 1989). É descrita como uma árvore perene que atinge de 2 a 3 metros de altura, de porte arbústico ou arbustivo. As folhas axilares são inteiras e apresentam ou não espinhos dentados nas bordas. As folhas são

congestas, coriáceas, glabras, com estípulas inconspícuas que medem de 2,2 a 9 cm de comprimento e 1,1 a 3,0 cm de largura, as flores são monóclinas, apesar das evidências de que algumas sejam diclinas (CARVALHO-OKANO, 1992; RADOMSKI, 1998; BITTENCOURT, 2000). O fruto é uma cápsula de cor avermelhada, que apresenta uma semente com arilo. Reproduz-se por sementes, preferindo climas mais amenos, ocorrendo espontaneamente ou por meio de cultivo. A colheita das folhas pode ser feita em qualquer época do ano (PANIZZA, 1998).

Plantas sempre foram usadas como uma fonte terapêutica na medicina, tanto em remédios tradicionais quanto em produtos industrializados. A planta espinheira-santa, é geralmente usada na medicina popular brasileira. As folhas secas desta planta são usadas como uma infusão para aliviar dor de estômago e náusea, além do tratamento de úlceras e gastrites, esta planta contém fenóis, taninos gálicos e outros compostos (CAMPAROTO et al., 2002).

O gênero *Maytenus* apresenta grande interesse na área de produção de medicamentos e já foram relatados propriedades antitumorais e antimicrobianos de extrato de sementes e raízes deste gênero (LIMA et al., 1969; SANTANA; ASFORA; COTIAS, 1971; POWELL; SMITH Jr., 1979; KUTNEY et al., 1981; FRANÇA; PEREIRA, 1997; CORSINO et al., 1998; SANNOMIYA et al., 1998; CORSINO et al., 2000; GONZALEZ et al., 2001; ORABI et al., 2001).

Devido as propriedades terapêuticas a espinheira-santa é largamente utilizada na medicina popular e está acarretando uma exploração sem limites devido ao seu constante uso (FLORES et al., 1998). A Figura 2 a seguir, mostra o aspecto do arbusto, das folhas, frutos e sementes de *M. ilicifolia*, a espinheira-santa.

FIGURA 2: A - Aspecto do arbusto de espinheira-santa; B – Aspecto do fruto tipo cápsula da espinheira-santa; C – Folhas e frutos maduros (deiscentes) de *M. ilicifolia*; D - Aspecto da semente de *M. ilicifolia*.



Fonte: PILEGGI (2006)

### 3.4 Fungos do Gênero *Colletotrichum*

Fungos do gênero *Colletotrichum* são fitopatógenos importantes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Esses fungos são os causadores de uma diversidade de doenças como antracnose, podridão de pedúnculo, varicela em manga, abacate e mamão (BAILEY et al., 1992). O sintoma característico da doença é o surgimento de lesões arredondadas, grandes, necróticas, com o centro dos tecidos deprimidos, onde são produzidas massas de conídios de coloração alaranjada (BAILEY et al., 1992),

podendo ocorrer uma podridão-mole nos frutos, prejudicando a sua comercialização (LIMA FILHO; OLIVEIRA; MENEZES, 2003).

Espécies de *Colletotrichum* são tradicionalmente diferenciadas com base em caracteres morfológicos e culturais. Características como morfologia de conídios, presença de setas e do teleomorfo, coloração de colônia, produção de pigmentos e taxa de crescimento têm sido usadas para diferenciar espécies morfológicamente próximas, como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* J.H. Simmonds (SUTTON, 1992; FREEMAN *et al.*, 1998).

As dificuldades encontradas na identificação das espécies de *Colletotrichum* estão relacionadas à grande diversidade fenotípica, influência de fatores ambientais na estabilidade dos caracteres morfológicos e culturais, existência de formas intermediárias e falta de padronização de condições culturais empregadas nos diferentes estudos (SUTTON, 1992; FREEMAN *et al.*, 1998;). A diferenciação entre espécies com base no círculo de hospedeiros ou hospedeiro de origem também não é um critério confiável para espécies como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* que infectam diferentes hospedeiras (FREEMAN *et al.*, 1998;).

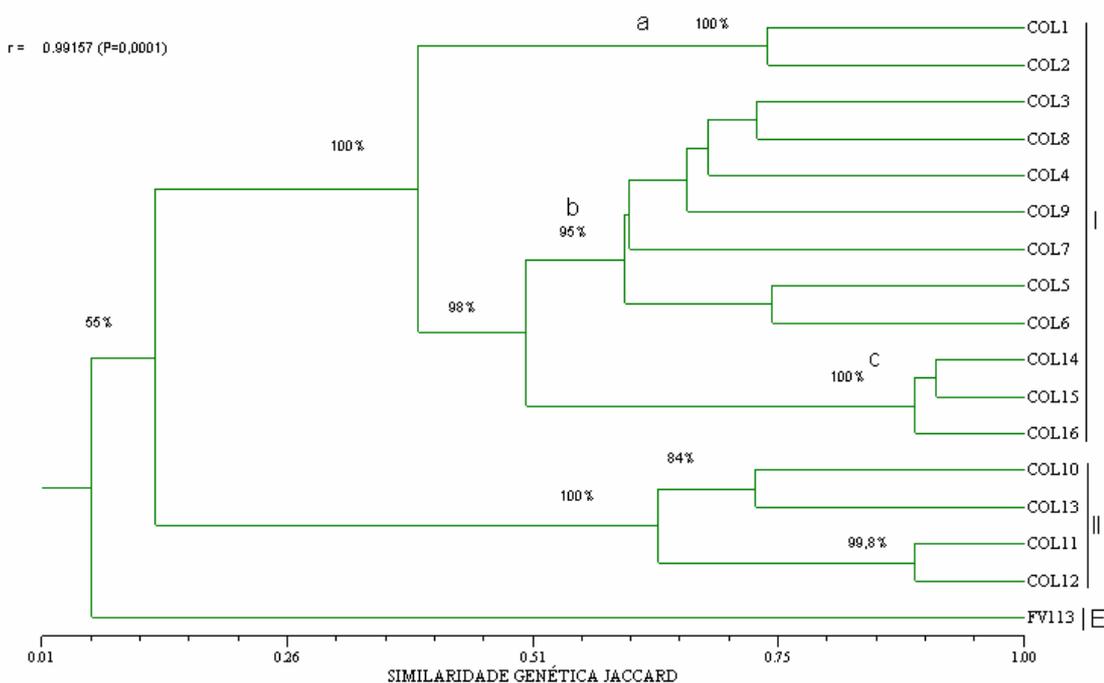
É freqüente a ocorrência de mais de uma espécie de *Colletotrichum* associada a uma mesma hospedeira e uma mesma espécie pode atacar múltiplas hospedeiras (FREEMAN *et al.*, 1998). *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. acutatum* causam, em geral, sintomas semelhantes como às podridões de frutos em pós-colheita (PERES, 2002).

Métodos moleculares são ferramentas úteis na diferenciação das espécies do gênero *Colletotrichum* (LOPEZ, 2001). A comparação de seqüências da região ITS 1 do rDNA entre *C. gloeosporioides* e outras espécies do gênero levaram ao desenvolvimento de oligonucleotídeos (*primers*) taxon-específicos para a diferenciação entre *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* por PCR (reação da polimerase em cadeia) (MILLS; HODSON; BROWN, 1992). Esses *primers* têm sido utilizados para a confirmação da identidade de isolados patogênicos de diversas hospedeiras (FREEMAN *et al.*, 1998; FREEMAN *et al.*, 2001;). A identificação das espécies de *Colletotrichum* patogênicas a uma determinada hospedeira, bem como a determinação

de sua variabilidade, são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle, além de propiciar um melhor entendimento da epidemiologia da doença.

PILEGGI (2006) utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD verificou a presença de pelo menos dois grupos de isolados, sugerindo que os mesmos pertençam a espécies distintas (Figura 3). No presente trabalho, objetiva-se a identificação em nível de espécie destes isolados, utilizando-se seqüenciamento das regiões ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA.

FIGURA 3: Dendrograma gerado a partir dos dados de similaridade genética de 16 isolados endofíticos de *Colletotrichum* spp por meio de Marcadores RAPD



Fonte: PILEGGI, 2006

Nota: I: grupo 1, II: grupo 2, E: isolado FV113 incluído como grupo externo. Os valores de *bootstrap* estão representados em porcentagens. Somente os valores acima de 50% foram ilustrados. O valor de *r* representa o valor de correlação da matriz cofenética.

### 3.5 PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Seqüenciamento

A reação em cadeia da polimerase, geralmente chamada de PCR, é um procedimento extremamente poderoso que permite a amplificação de uma seqüência alvo de DNA em um genoma em um milhão de vezes ou mais. O procedimento de PCR foi criado por Kary Mullis, que recebeu o Prêmio Nobel de Química de 1993 por este trabalho. A PCR pode ser usada para clonar uma determinada seqüência de DNA *in vitro*, sem o uso de células vivas durante o processo de clonagem. Entretanto, o procedimento só pode ser realizado quando a seqüência de nucleotídeos de interesse é previamente conhecida, pois o método envolve o uso de oligonucleotídeos sintéticos (*iniciadores*) complementares às pontas de um determinado segmento de DNA, que servem de iniciadores da amplificação enzimática do segmento intercalar de DNA (SNUSTAD; SIMMONS, 2001).

O procedimento de PCR envolve três etapas, cada uma repetida muitas vezes. Na etapa 1, o DNA contendo a seqüência a ser amplificada é desnaturado por aquecimento a 94-97°C por cerca de 30 segundos. Na etapa 2, o DNA desnaturado é hibridizado a um excesso de iniciadores de oligonucleotídeos sintéticos a 50-60°C. A temperatura ideal de hibridização depende da composição de bases dos iniciadores. Na etapa 3, a DNA polimerase é usada para replicar o segmento de DNA entre os sítios complementares aos iniciadores. Os iniciadores flanqueiam e determinam a seqüência alvo que deve ser amplificada através do pareamento específico das bases, e fornecem a ponta 3'-OH necessária para a amplificação covalente, e o DNA genômico desnaturado fornece o molde necessário (SNUSTAD; SIMMONS, 2001). A polimerização é geralmente feita a 70-72°C por um tempo variável de acordo com o tamanho da seqüência que se quer amplificar. Os produtos do primeiro ciclo de replicação são então desnaturados, novamente hibridizados aos iniciadores e replicados novamente com a DNA polimerase. Após cada ciclo de síntese de DNA, os fragmentos novos gerados servem, por sua vez, como molde, e dentro de poucos

ciclos, o produto predominante é uma única espécie de fragmento de DNA, cujo comprimento corresponde à distância entre os dois iniciadores originais (ALBERTS, *et al.*, 2004). Ou seja, a natureza repetitiva da reação em cadeia da polimerase é a chave para seu poder de amplificação de determinada seqüência alvo de DNA através da extensão dos iniciadores (ANTON, *et al.*, 2006).

Este procedimento é repetido muitas vezes até que o nível desejado de amplificação seja obtido. Na prática, de 20 a 30 ciclos de reação são necessários para a amplificação efetiva do DNA de interesse. A amplificação ocorre exponencialmente, por meio da fórmula:  $N = N^{\circ} \cdot 2^n$ , onde N é o número final de cadeias de DNA;  $N^{\circ}$  é o número inicial de DNA molde (*template*) e n é o número de repetições do ciclo.

Inicialmente, a PCR era feita com DNA polimerase I de *E. coli*. Como esta enzima é inativada por aquecimento durante a etapa de desnaturação, uma nova quantidade de enzima tinha que ser adicionada à etapa 3 de cada ciclo. Esse problema foi solucionado com a descoberta de uma DNA polimerase termoestável isolada da bactéria de fontes termais *Thermus aquaticus*. Essa enzima, conhecida como *Taq* polimerase, se mantém estável em temperaturas de até 117°C, com temperatura ótima de funcionamento de 72°C, permanecendo, portanto, ativa durante a etapa de desnaturação do DNA. Como resultado, a polimerase não tem que ser adicionada após cada ciclo de desnaturação. Um excesso de *Taq* polimerase e iniciadores podem ser adicionados no início do processo de PCR, e os ciclos de amplificação podem ser feitos por alterações seqüenciais na temperatura. As máquinas de PCR, ou termocicladores, mudam a temperatura automaticamente e abrigam grande número de amostras, tornando tarefa simples a amplificação de seqüências específicas de DNA por PCR (SNUSTAD; SIMMONS, 2001).

Uma desvantagem do uso da *Taq* polimerase na PCR é que são introduzidos erros nas cópias amplificadas do DNA em freqüências baixas, mas significativas. Ao contrário das DNA polimerases, a *Taq* polimerase não contém atividade de revisão 3'→5' e, conseqüentemente, produz uma freqüência maior que o normal de erros de replicação (uma base mal pareada por mil bases). Se um nucleotídeo incorreto é incorporado durante um ciclo inicial de PCR, ele será amplificado como outro

nucleotídeo qualquer na seqüência de DNA. Para muitas aplicações estes erros ocasionais são de pouca importância, entretanto em alguns casos, como seqüenciamentos de DNA e análise de polimorfismos gênicos, qualquer erro de replicação pode corromper os resultados e análises posteriores (ANTON, *et al.*, 2006). Esse problema foi solucionado, na década de 90, com o desenvolvimento de enzimas termoestáveis de alta fidelidade que possuem atividade adicional de exonuclease 3'→5', removendo os nucleotídeos incorporados erroneamente à fita crescente de DNA. Tais enzimas são conhecidas como *proofreading enzymes*, as quais possuem uma freqüência de erros muito menor que a *Taq* polimerase (ANTON, *et al.*, 2006).

Sem o desenvolvimento da PCR, seria praticamente inconcebível determinar a seqüência de nucleotídeos de cromossomos ou de genomas inteiros como vemos atualmente. O procedimento mais usado atualmente, desenvolvido por Fred Sanger e colaboradores, usa a síntese de DNA *in vitro* (PCR) na presença de nucleotídeos fluorescentes e terminadores específicos de cadeia. Tal procedimento de seqüenciamento de DNA depende da produção de uma população de fragmentos de DNA que tenham uma ponta em comum (todos terminam exatamente no mesmo nucleotídeo, ponta 5' do iniciador) e terminam em todas as posições possíveis (cada nucleotídeo consecutivo) na outra ponta 3', de forma que possam ser separados por eletroforese (ANTON, *et al.*, 2006).

Os 2', 3'-didesoxinucleosídeo trifosfatados são os terminadores de cadeia mais freqüentemente usados. As DNA polimerases têm uma necessidade absoluta de uma ponta 3'-OH livre na cadeia de DNA a ser amplificada. Se um didesoxinucleotídeo é adicionado à extremidade de uma cadeia, ele irá bloquear a extensão subsequente da mesma, pois os 2', 3' didesoxinucleotídeos não têm 3'-OH. Usando os quatro tipos de 2', 3' didesoxinucleotídeos, ddTTP, ddCTP, ddATP e ddGTP, numa reação de PCR com um único iniciador, podem ser geradas quatro populações de fragmentos, cada população com cadeias que terminam na mesma base (T, C, A ou G).

Em uma determinada reação, a proporção de dNTP:ddNTP (onde N pode ser qualquer uma das quatro bases) é mantida em aproximadamente 100:1, de modo que a probabilidade de término em um determinado momento na cadeia nascente é de cerca

de 1/100. Isso gera uma população de fragmentos que terminam em todos os sítios potenciais dentro de uma distância de algumas centenas de nucleotídeos do iniciador terminal original. O desoxinucleotídeo final da cadeia pode ser identificado por corantes fluorescentes presentes em cada um dos ddNTP, de forma que o seqüenciamento é então realizado em máquinas automatizadas, que separam os produtos da reação de PCR com os didesoxinucleotídeos fluorescentes, através de eletroforese em um tubo capilar. Como as moléculas de DNA com diferença de um nucleotídeo na região 3' possuem diferentes pesos moleculares, elas passam sequencialmente (por ordem de tamanho) por uma fotocélula no final do capilar que detecta a fluorescência dos corantes presentes nos ddNTP e conseqüentemente determina a seqüência do fragmento de DNA analisado (ANTON, *et al.*, 2006).

### **3.6 DNA Ribossomal**

O uso do DNA ribossomal (rDNA) como marcador molecular, pode ser empregado na análise da variabilidade genética, para diferentes níveis taxonômicos. As seqüências codificantes do rDNA, regiões 18S, 5,8S e 28S, evoluem muito lentamente e são altamente conservadas, possibilitando a sua utilização em estudos com organismos pouco relacionados taxonomicamente. Ao contrário do rDNA, as regiões espaçadoras internas destes genes, conhecidas como ITS ("Internal Transcribed Spacer") evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo, e sendo desta forma, de grande interesse nos estudos filogenéticos de gêneros, espécies e populações (WHITE *et al.*, 1990).

#### **3.6.1 Marcadores ITS em Estudos Filogenéticos**

O DNA ribossômico (rDNA) tem sido objeto de um grande número de estudos, com diversas aplicações na genética, evolução e melhoramento, podendo ser utilizado para uma ampla faixa de níveis taxonômicos. Tal interesse está diretamente

relacionado à estrutura destas regiões, que se encontra em locais específicos do genoma, e repetidos em seqüência inúmeras vezes.

A função do rDNA, ao contrário de outras seqüências repetitivas que aparentemente não tem função conhecida no genoma, é a de codificar as diferentes moléculas do RNA ribossômico, representando extrema importância no processo de tradução de proteínas.

Em geral, as regiões 18S, 5,8S e 28S, das unidades de repetição, não apresentam variações de seqüência, enquanto que as regiões internas que são transcritas, conhecidas como ITS (*Internal Transcribed Spacer*), variam enormemente. Desta forma, as seqüências codificantes do rDNA evoluem muito lentamente e são altamente conservadas, possibilitando a sua utilização em estudos com organismos pouco relacionados taxonomicamente. Ao contrário do rDNA, as regiões espaçadoras internas destes genes (ITS), evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo, e sendo assim, de grande interesse nos estudos filogenéticos a níveis de espécies gêneros, e populações (WHITE et al., 1990).

Estas características permitem ainda, a sua utilização na obtenção de polimorfismos de comprimento de fragmento (RFLP) nos locos de rDNA. O número de cópias de uma determinada seqüência de rDNA, e variações de nucleotídeos nestas seqüências, também tem sido utilizados em tais estudos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1994).

### **3.7 Métodos moleculares em sistemática**

Desde que a informação necessária para o funcionamento dos organismos está no DNA, ou RNA em alguns vírus, pode-se realizar estudos de parentesco evolutivo dos mesmos pela comparação das seqüências presentes no ácido desoxirribonucléico. Este método possui diversas vantagens sobre os métodos clássicos baseados em características morfológicas e fisiológicas (NEI; KUMAR, 2000). Primeiro, o DNA é formado por quatro tipos de nucleotídeos (A, T, C, G) de forma que pode ser usado

para comparar qualquer grupo de organismos, como bactérias, plantas e animais, o que seria impossível em métodos clássicos de filogenia. Segundo, desde que as alterações evolutivas do DNA seguem um padrão relativamente regular, é possível utilizar modelos matemáticos para formular a taxa de mudança e comparar DNAs de organismos distantemente relacionados. Terceiro, o genoma de todos os organismos consiste de longas seqüências de nucleotídeos, contendo, portanto, uma quantidade muito maior de informações filogenéticas que características morfológicas. Por essas razões, filogenias moleculares podem clarificar muitos padrões de ramificação da árvore da vida, os quais tem sido difíceis de interpretar por metodologias clássicas (NEI; KUMAR, 2000).

Embora hajam diversas características intrínsecas a filogenia molecular, que a tornam muito mais informativa que filogenias baseadas em outros tipos de caracteres, os filogeneticistas moleculares devem saber optar pelo método que mais condiz com determinada situação, de forma a evitar erros sistemáticos (MEYER, 1996). Os métodos mais comumente usados são classificados em três grupos principais: métodos de distância, métodos de parcimônia, e métodos de máxima verossimilhança.

Nos métodos de distância, ou métodos de matrizes de distância, a divergência entre duas seqüências (DNA, RNA ou proteína) é expressa como a fração dos sítios que diferem entre tais seqüências em um alinhamento. De maneira geral, quanto mais similar entre si for um par de seqüências, estas serão mais próximas evolutivamente. Também, quanto mais tempo se passa desde a divergência de dois organismos (isto é, duas seqüências) a partir de um ancestral comum, maior será o percentual de diferenças entre as seqüências correspondentes. Embora esta última suposição pareça lógica, nem sempre é verdadeira, pois algumas linhagens podem evoluir mais rapidamente que outras; mesmo se duas linhagens evoluam com a mesma velocidade, ou seja, com a mesma taxa de mutações, tal suposição talvez seja falsa devido a múltiplas substituições (HALL, 2001). Devido a estas peculiaridades, muitas vezes os métodos de distância subestimam a real quantidade de mudanças (mutações) ao longo das linhagens. A forma mais simples de determinar a distância entre seqüências homólogas de DNA, ou de proteínas, é através da proporção de sítios nos quais duas seqüências são diferentes, em relação ao total de nucleotídeos, ou aminoácidos. Essa

proporção, conhecida como distância  $p$ , pode ser facilmente estimada pela relação  $p=n_d/n$ , onde  $n_d$  representa a quantidade de sítios divergentes entre duas seqüências com  $n$  nucleotídeos, ou aminoácidos (NEI & KUMAR, 2000).

Quando se analisa seqüências de aminoácidos proximamente relacionadas, a distância  $p$  fornece uma estimativa do número de substituições nucleotídicas que ocorreram entre os genes que codificam tais proteínas. Entretanto, quando  $p$  é grande (entre duas seqüências de aminoácidos), ele subestima o número de substituições nucleotídicas, já que não leva em conta a ocorrência de mutações sinônimas. Esse problema é mais sério para alinhamentos de DNA, visto que só existem quatro estados de caracteres em seqüências nucleotídicas. Assim sendo, para estimar o número de substituições nucleotídicas é necessário utilizar modelos matemáticos de distância (NEI & KUMAR, 2000).

A partir de dados obtidos por modelos matemáticos de distância, podem ser construídas árvores filogenéticas de distâncias. Diversos modelos computacionais realizam esse trabalho, sendo que os mais populares são o UPGMA (“*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*”) e Neighbor Joining (NJ) (HALL, 2001). Estes usam uma série específica de cálculos, através de métodos algorítmicos, para estimar uma árvore filogenética, a partir de uma matriz de distâncias calculadas com seqüências de DNA ou proteínas. Tais cálculos envolvem a manipulação de uma matriz de distância, a qual é derivada de um alinhamento múltiplo de seqüências. Iniciando com tal alinhamento, ambos os programas calculam a distância (ou seja, a fração de diferenças), para cada par de seqüências e acumulam esses dados numa matriz de dados.

O método UPGMA é um método de agrupamento (*clustering*) que está embutido na suposição de que as árvores filogenéticas construídas são aditivas, ou seja, são ultraméricas, de forma que todos os táxons (ou seqüências) são igualmente distantes de um grupo externo (“raiz”), e que a distância de grupos irmãos a seu ancestral comum é idêntica, suposições que são pouco prováveis de serem verdadeiras. Por esse motivo, e outros detalhes, UPGMA é raramente usado atualmente.

O método Neighbor Joining é similar ao UPGMA na manipulação dos dados em matrizes de distância, entretanto, ele não constrói agrupamentos (*clusters*), mas calcula diretamente a distância em relação a nós internos da árvore filogenética. NJ não assume que todos os táxons sejam eqüidistantes da raiz, dessa forma, a distância de táxons irmãos, a um determinado nó (ancestral comum), pode ser diferente (HALL, 2001).

Os demais métodos, máxima parcimônia e máxima verossimilhança, são baseados na análise do estado de caracteres e não em matrizes de distância. Eles utilizam os múltiplos alinhamentos diretamente, através da comparação dos estados dos caracteres dentro de cada coluna (cada posição) no alinhamento.

Os métodos de parcimônia foram originalmente desenvolvidos para caracteres morfológicos, e existem muitas versões diferentes (NEI & KUMAR, 2000). A parcimônia é baseada na suposição que a topologia (árvore) mais provável é aquela que requer o menor número de mudanças para explicar um determinado alinhamento. A premissa básica desse método é que os táxons (seqüências) compartilham características comuns porque eles herdaram tal característica de um ancestral comum. Esse método é intuitivo porque ele satisfaz a noção de que o cenário evolutivo mais provável é aquele que requer o menor número de eventos (os eventos nesse caso são mutações). Através desse método, frequentemente são geradas inúmeras árvores filogenéticas sutilmente diferentes, as quais são consistentes com o mesmo número mínimo de eventos evolutivos, e, portanto, igualmente parcimoniosas (HALL, 2001).

Nos métodos de Máxima Verossimilhança, observando um determinado conjunto de dados de seqüências, e considerando um determinado modelo evolutivo, a probabilidade é maximizada para cada topologia, sendo que a topologia que apresenta a máxima verossimilhança (maior probabilidade de ser verdadeira) é escolhida como o modelo final. Ou seja, esse método procura pela topologia que, sob algum modelo evolutivo pré-determinado, maximize a verossimilhança (possibilidade) dos dados observados (HALL, 2001). Esse método quase sempre produz uma única árvore. A vantagem é que ele permite especificar o modelo evolucionário para um determinado conjunto de dados (alinhamento), de forma que a possibilidade da árvore resultante ser

verdadeira é previamente conhecida. Entretanto, uma desvantagem da máxima verossimilhança é que ela é bem mais lenta que métodos de distâncias ou parcimônia.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Material Biológico

- Amostras de DNA extraídos de três isolados de *Colletotrichum*(COL2; COL7; COL15) e 1 de *Mycelia sterilia* (FV113), obtidos por PILEGGI (2006).

- Seqüências de ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de dois isolados de *Colletotrichum* (COL6 e COL13) obtidas por PILEGGI (2006).

### 4.2. Métodos

#### 4.2.1. SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1 - 5,8S - ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL

##### 4.2.1.1. Amplificação da região ITS1 - 5,8S - ITS2 do DNA ribossomal

A reação foi realizada com os *primers* V9D e LS266 (Tabela 1), que são universais para fungos e permitem amplificar a região ITS1 - 5,8S - ITS2 do DNA ribossomal (Figura 4).

As condições da reação foram de acordo com a descrição de WHITE et al. (1990), com algumas modificações: 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 1U de *Taq* polimerase (Invitrogen) 0,8µl dos *primers* (3,5pmoles), 0,2mM de cada dNTP, 3,0µl de MgCl<sub>2</sub>, e volume final de 50µl.

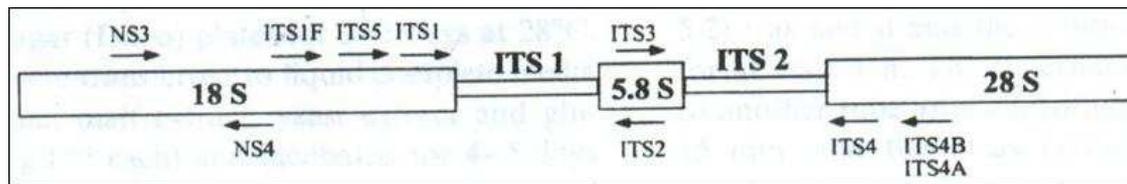
A amplificação foi realizada em um termociclador Eppendorf (Modelo: Mastercycler Gradient), com desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 56°C, 1 minuto a 72°C; seguida de extensão final de 3 minutos a 72°C.

TABELA 1 - SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1 - 5,8S - ITS2 do DNA RIBOSSOMAL

<i>PRIMER</i>	SEQUÊNCIA
ITS1	5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G3'
ITS4	5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3'
ITS5	5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAGG 3'
V9D	5'TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA3'
LS266	5'GCAT TCC CAA ACA ACT CGA CTC3'

Fonte: WHITE e MORROW (1990); DE HOOG et al. (2003)

FIGURA 4: REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2 DO rDNA E LOCAIS DE HIBRIDAÇÃO DOS *PRIMERS*



#### 4.2.1.2. Purificação do DNA

Aos produtos da amplificação da PCR com os *primers* V9D e LS266, foram acrescentados 50µl de solução PEG 20% , em seguida incubados a 37°C por 30 minutos; centrifugados por 20 minutos a 13000rpm. Os *pellets* resultantes foram lavados com etanol 80% gelado, centrifugados por 2 minutos a 13000rpm; lavados com etanol 96% gelado colocados em *speed vac* por 10 minutos a 70°C e ressuspensos em 15µl de água ultrapura.

Para confirmação da presença do DNA na amostra, 1µl, foi aplicado em gel de agarose 1,4% (Item 4.3.6).

#### 4.2.1.3. Reação de Seqüenciamento

Para a reação de seqüenciamento foram utilizados 1 µl de DNA purificado com PEG; 0,5µl de Buffer (Applied Biosystems); 0,5µl do *primer* ITS 4; 0,5µl de mistura para seqüenciamento Big Dye (Applied Biosystems) completando com água ultrapura para um volume final de 10µl. As mesmas condições foram aplicadas para os *primers* ITS5 ou ITS1 (Tabela 1, Figura 4)

A amplificação foi realizada em um termociclador *Eppendorf* (Modelo: *Mastercycler Gradient*), seguindo uma desnaturação inicial a 96°C por 1 minutos; 35 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C, 4 minutos a 60°C, seguida de extensão final a 8°C com uma rampa de 1°C por segundo.

#### 4.2.1.4. Purificação da Reação de Seqüenciamento

Ao produto da reação de seqüenciamento foram adicionados 40µl de isopropanol 75%, ficando a temperatura ambiente por 20 minutos; centrifugado por 25 minutos a 13000rpm. Retirado o isopropanol, o *pellet* é lavado com 200µl etanol 70% não gelado e centrifugado por 5 minutos a 13000rpm. Após ser retirado todo o etanol, prossegue para a secagem em speed vac a 60°C durante 45 minutos. Os tubos foram então, embalados em papel alumínio protegendo-os da luminosidade.

Após este tratamento, cada amostra foi ressuspensa em 20µl de formamida Hi-Di, seguindo para a placa de seqüenciamento e desnaturado no termociclador por 2 minutos a 95°C.

#### 4.2.1.5 Seqüenciamento das amostras

Após a purificação da reação de seqüenciamento as amostras foram encaminhadas para o seqüenciador automático de 96 capilares MegaBace da Amersham Biosciences e a incorporação de cada dideoxynucleotídeo marcado com um

cromóforo na reação de seqüenciamento foi lido pelo seqüenciador automático pela captação da fosforilação.

#### 4.2.1.6. Edição e Análise das Seqüências

O alinhamento das seqüências obtidas foi realizado com auxílio do programa CLUSTAL-W versão 1.7 (THOMPSON et al., 1994) com os seguintes valores de penalidades atribuídas para a criação de deleções (*gap opening*) e para definir o tamanho das mesmas (*gap extension*): *pairwise alignment parameter gap opening* - 10.00 e *gap extension* - 0.10, e *multiple alignment parameters: gap opening* - 15.00 e *gap extension* - 0.30. Sendo realizada posterior inspeção visual através do programa BioEdit 7.0.5.3 (HALL, 1999). As seqüências obtidas foram também comparadas com outras seqüências existentes no banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), pelo programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997), o qual permite detectar homologia de uma seqüência biológica com seqüências caracterizadas já existentes. O programa usa um algoritmo heurístico e procura por homologia através de regiões alinhadas localmente de identidade e/ou similaridade entre uma seqüência desconhecida e seqüências em um banco de dados. É composto por cinco programas (blastp, blastn, blastx, tblastn e tblastx) que são, na verdade variações para o tipo de comparação a ser realizada. Para análise das seqüências obtidas no presente trabalho, foi utilizado o programa blastn que compara seqüências de nucleotídeos com um banco de dados de seqüências de nucleotídeos.

#### 4.2.1.7. Análise Filogenética

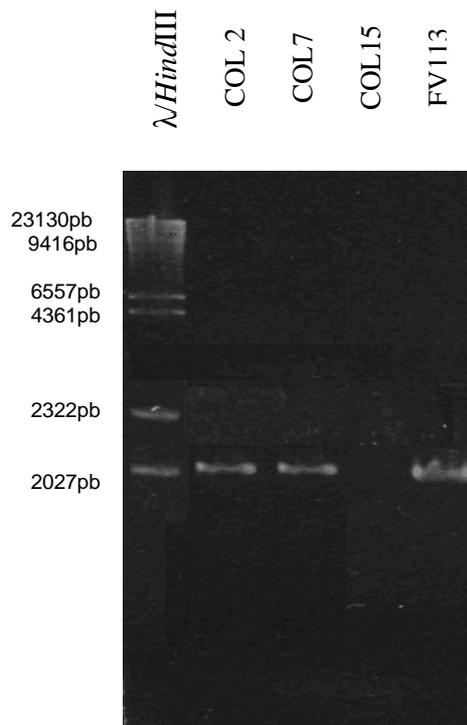
Após a edição, alinhamento e análise prévia das seqüências, estas foram submetidas ao software MEGA versão 3.1 (KUMAR, TAMURA, NEI, 2004) para obtenção das árvores filogenéticas baseadas em distância, pelo método de Neighbor Joining e Máxima parcimônia. A consistência dos nós obtidos foi avaliada pelo procedimento de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 reamostragens.

Foram utilizadas como referência linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Glomerella cingulata*, *C. boninensis*, depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Como grupo externo foi utilizada a linhagem AB087222 de *C. lindemuthianum*, também depositada no GenBank (ANEXO 1).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram realizadas PCR, para a amplificação da região ITS1 - 5,8S - ITS2 do DNA ribossomal (Item 4.2.1.1.), obtendo o resultado representado na Figura 5.

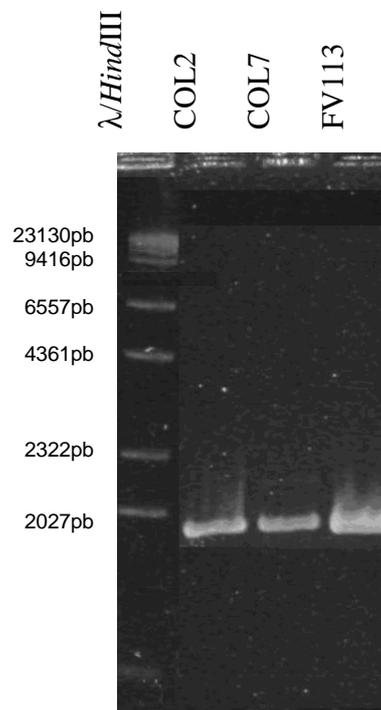
FIGURA 5 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO rDNA



NOTA: REAÇÃO REALIZADA COM OS PRIMERS V9D E LS266, MARCADOR  $\lambda/HindIII$ ; VOLUME FINAL DE 50 $\mu$ L

Com estes resultados as amostras COL2 COL7 e FV113 puderam prosseguir com o protocolo de seqüenciamento seguindo as etapas de reação de seqüenciamento (Item 4.2.1.3) e purificação da reação de seqüenciamento (item 4.2.1.4). Podendo então ser encaminhadas para o seqüenciador automático, porém a amostra COL15 ainda necessita de nova PCR, não prosseguindo para as etapas de seqüenciamento do DNA.

FIGURA 6 – ELETROFORESE APÓS PURIFICAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS COL2, COL7 E FV113



Uma vez que cada amostra foi amplificada com os *primers* ITS4 e ITS5 separadamente, foram geradas duas seqüências de nucleotídeos para cada um dos endófitos. Realizando um procedimento de complemento reverso da seqüência gerada com o *primer* ITS4 e comparando-a com a seqüência gerada com o *primer* ITS5, foi

possível obter uma seqüência consenso para cada amostra utilizando o programa BioEdit.

Para a análise das seqüências obtidas, foram utilizadas também as seqüências obtidas por PILEGGI (2006), denominadas de COL6 e COL13, também seqüenciadas com a utilização dos *primers* ITS1 e ITS5. As quatro seqüências foram deste modo alinhadas pelo programa CLUSTAL-W.

O alinhamento obtido entre as diferentes amostras gera uma hipótese da homologia das posições entre bases nitrogenadas. Este alinhamento permitiu a visualização comparativa das seqüências de modo que se pode inserir espaços ou traços para representar deleções ou inserções com o intuito de minimizar as diferenças entre elas. Estas inserções ou deleções estariam representando eventos que teriam ocorrido modificando as seqüências originais após a divisão do ancestral comum mais recente entre as espécies comparadas.

Com um total de quatro amostras seqüenciadas (COL2, COL6, COL7 e COL13) e utilizando suas seqüências consenso geradas pelo programa BioEdit, foi possível comparar estas seqüências com outras presentes no GenBank, por meio do programa BLASTn, permitindo desta forma uma vasta comparação destas amostras com outras já registradas em seu banco de dados. Selecionando para alinhamento e nova comparação àquelas que apresentaram maior grau de similaridade comparativamente.

De posse destas amostras seqüenciadas e das selecionadas no GenBank, foi necessário se processar novo alinhamento pelo programa MEGA para a comparação de seqüências das linhagens (ANEXO).

Analisando o alinhamento gerado, pode-se perceber a presença de grande similaridade entre a linhagem COL13 e as linhagens retiradas do GenBank caracterizadas como *Glomerella cingulata* EF488442, EF423552, AM491334, DQ286224 e *Colletotrichum gloeosporioides* AJ301986, AJ301919; sendo *G. cingulata* a forma teleomórfica de *C. gloeosporioides*.

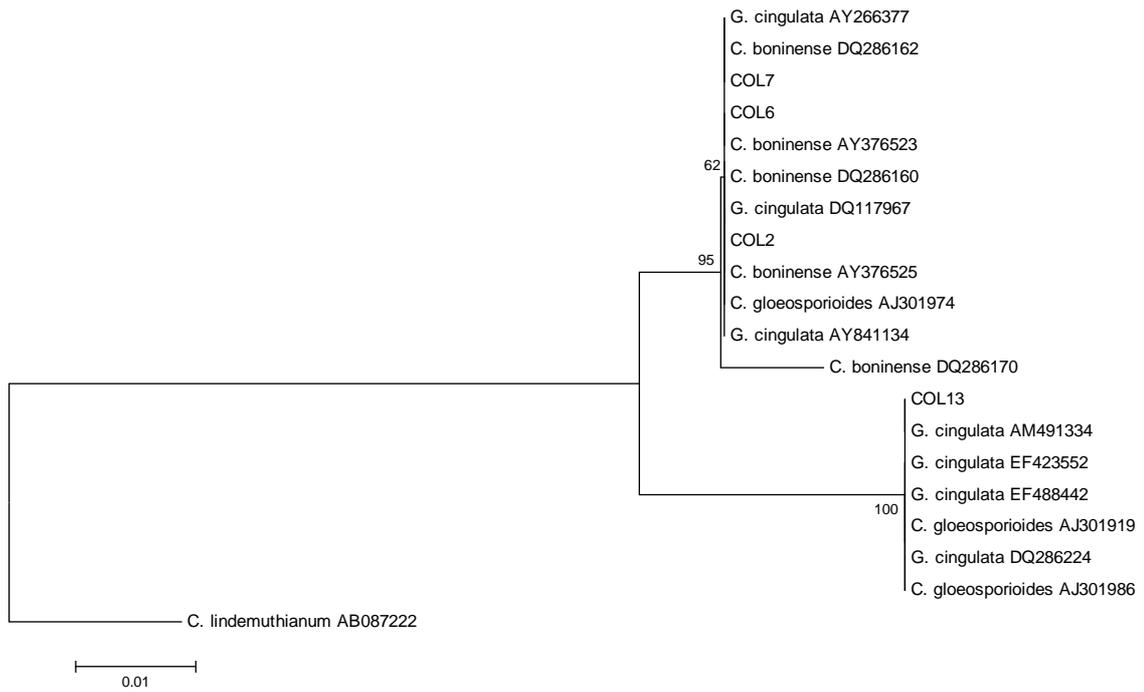
Percebe-se ainda que as linhagens COL2, COL6 e COL7, são muito similares a *Colletotrichum boninense* DQ286160, AY376523, DQ286170, DQ286162, AY376525 e *Glomerella cingulata* AY266377, DQ117967, AY841134.

Esta variação de nomenclatura com relação a *C. boninense* deve-se a uma divergência de entendimento de diferentes autores com relação à autenticidade desta nova espécie de *Colletotrichum*, proposta por MORIWAKI et al. (2003).

Prosseguindo a análise das seqüências utilizou-se como *out group* a linhagem AB087222 de *Collethotrichum lindemuthianum* também depositada no GenBank, para enraizar as árvores filogenéticas. Por meio do programa MEGA foram geradas duas árvores filogenéticas, uma pelo método de *Neighbor Joining* e outra pelo método da Máxima parcimônia (Figuras 7 e 8).

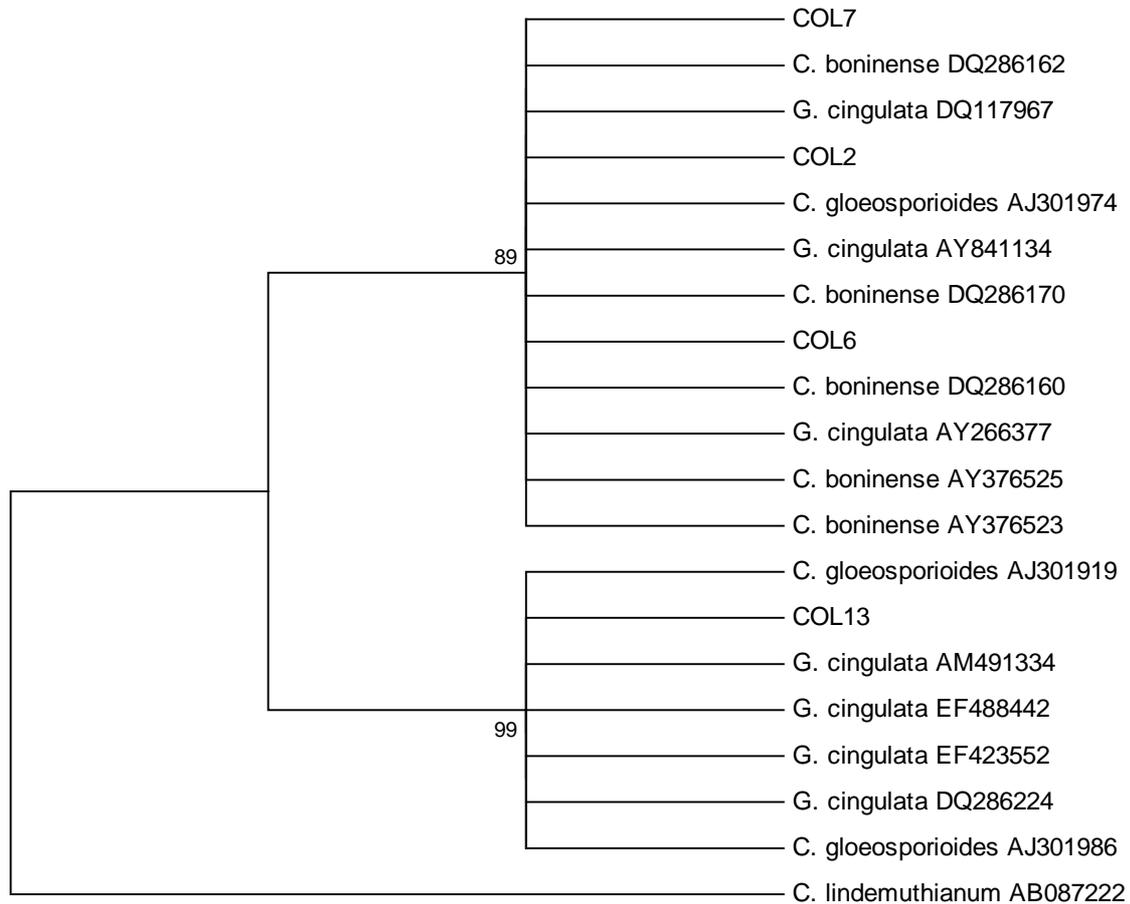
A espécie *C. boninense* foi recentemente sugerida por MORIWAKI et al. (2003) para fungos inicialmente classificados como *C. gloeosporioides*. Tais autores justificaram a descrição desta nova espécie por características morfológicas e moleculares, especificamente seqüenciamento de regiões ITS do rDNA. PILEGGI (2006) demonstrou por meio de marcadores RAPD a ocorrência de alta variabilidade genética entre os isolados de *Colletotrichum*, sugerindo a existência de duas espécies endofíticas presentes nesta amostra. Desta forma, o presente trabalho vem a corroborar com MORIWAKI et al. (2003) e PILEGGI (2006).

FIGURA 7 – Árvore Filogenética enraizada com *C. lindemuthianum* gerada pelo método de *Neighbor Joining*.



Fonte: O autor

FIGURA 8 - Árvore Filogenética enraizada com *C. lindemuthianum* gerada pelo método da Máxima parcimônia.



Fonte: O autor

Por meio de seqüenciamento da linhagem FV113, e comparando-a com outras seqüências registradas no banco de dados GenBank, foi possível obter um alinhamento comparativo de FV113 com *Leptosphaeria microscopica*, como demonstra a Figura 9. Foi possível assim conferir à amostra FV113, sua identificação como sendo *Leptosphaeria microscopica* de acordo com comparações feitas em banco de dados

GenBank. Sendo descrito como endófito com potencial para bioprospecção e aplicação como controle biológico. (KISS et al., 1998)

FIGURA 9 – Alinhamento comparativo da linhagem FV113 e duas linhagens de *Leptosphaeria microscopica*

1_19755	166	CGTAGGTGAACACTGCGGAAGGATCATTAAATTCAGTAGCTTGCTACTGTTAGGGGGGTC	225
<a href="#">AF455494</a>	1	.....-.....-.....-.....-.....	56
<a href="#">AF455486</a>	1	.....-.....-.....-.....-.....	56
1_19755	226	TATTAGTCTGTATAGTATCACTACTGATGAGCAGCACGACCCTCTGTCTATAACCCTTGTC	285
<a href="#">AF455494</a>	57	..A.....	116
<a href="#">AF455486</a>	57	..A.....	116
1_19755	286	TTTTGCGCACTCATGTTTCCTCGGCGGCTTAATACCCGCCGGCTGGATCAATCTATAACC	345
<a href="#">AF455494</a>	117	.....-.....	175
<a href="#">AF455486</a>	117	.....-.....	175
1_19755	346	TTTTTAATTTTCAATCAGCGTCTGAAAAACCTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCT	405
<a href="#">AF455494</a>	176	.....	235
<a href="#">AF455486</a>	176	.....	235
1_19755	406	CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAA	465
<a href="#">AF455494</a>	236	.....	295
<a href="#">AF455486</a>	236	.....	295
1_19755	466	TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATG	525
<a href="#">AF455494</a>	296	.....	355
<a href="#">AF455486</a>	296	.....	355
1_19755	526	CCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTACTAT	585
<a href="#">AF455494</a>	356	.....	415
<a href="#">AF455486</a>	356	.....	415
1_19755	586	CGTGGACTCGCCTTAAAGTCATTGGCAGCCAGTGTTTTGGTATTGGAGCGCAGCACATTT	645
<a href="#">AF455494</a>	416	.....	475
<a href="#">AF455486</a>	416	.....	475
1_19755	646	TGCGCCTCTAGCCTAGAACAACACTAGCGTCCAGTAAGCCTTTTTTCACTTTTGACCTCGGAT	705
<a href="#">AF455494</a>	476	.....	535
<a href="#">AF455486</a>	476	.....	535
1_19755	706	CAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA	751
<a href="#">AF455494</a>	536	.....	581
<a href="#">AF455486</a>	536	.....	581

## 6. CONCLUSÃO

Analisando os alinhamentos e as árvores geradas, foi possível inferir a correspondência das linhagens seqüenciadas com aquelas presentes no banco de dados GenBank:

- O isolado endofítico COL13 pertence à espécie *Glomerella cingulata* (anamorfo *Colletotrichum gloeosporioides*);
- Os isolados endofíticos COL2, COL6 e COL7 pertencem à espécie *Colletotrichum boninense*;
- O isolado endofítico com potencial para bioprospecção e inicialmente denominado de *Mycelia sterilia* (FV113) pertence ao gênero *Leptosphaeria*, possivelmente à espécie *Leptosphaeria microscopica*.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D. LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. Trad. Amauri B. Simonetti et al. Porto Alegre: Artes Médicas, 2004.
- ANTON, M. et al. **PCR Applications Manual**. 3<sup>rd</sup>Edition. Roche Applied Science: Germany, 2006.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** 25:3389-3402. 1997.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.;AZEVEDO, J. L. de (Eds.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. p. 117-137.
- AZEVEDO, J.L.; JÚNIOR, W.M.; PEREIRA, J.O; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Environmental Biotechnology**, vol. 3, n°1, p. 40-65, 2000.
- BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, A. J.; JEGER, J. M. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Oxford: **British Society for Plant Pathology**, 1992. p.88-120.
- BITTENCOURT, J. V. M. **Variabilidade genética em populações naturais de *Maytenus ilicifolia* por meio de marcadores RAPD**. Curitiba, 2000. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Produção Vegetal) Universidade Federal do Paraná.
- BLANCO, C.G. ***Guignardia citricarpa* Kiely: Análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro**. Piracicaba, 1999. Tese de Doutorado- escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
- CAMPAROTO, M.L.; TEIXEIRA, R.O; MANTOVANI, M.S.; VICENTINI, P. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, 25, 1, p. 85-89, 2002.
- CARVALHO-OKANO, R. M. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* (Celastraceae) do Brasil extra-amazônico**. Campinas, 1992. 253 f. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Vegetal), Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

- CERVI, A. C.; PACIORNIK, E. F.; VIEIRA, R. F.; MARQUES, L. C. Espécies vegetais de um remanescente de Floresta de Araucária (Curitiba-Brasil): estudo preliminar I. **Acta Biologica Paranaense**, Curitiba, v. 18, n. 1-4, p. 73-114, 1989.
- CORSINO, J.; BOLZANI, V. da S.; PEREIRA, A. M. S.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Bioactive sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus*. **Phytochemistry**, v. 48, n° 1, p. 137-140, 1998.
- CORSINO, J.; CARVALHO, P. R. F. de; KATO, M. J.; LATORRE, L. R.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; ARAÚJO, A. R.; BOLZANI, V. da S.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, A. M. S.; FURLAN, M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 741-748, 2000.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.
- DE HOOG GS, VICENTE V, CALIGIORNE RB, KANTARGLIOCU S, TINTELNOT K, GERRITS VAN DEN ENDE AHG, HAASE G. Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. **J Clin Microbiol** 41:4767–4778, 2003.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **International Journal of Organic Evolution**, Lancaster, v.39, p.366-369, 1985.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 220p.1994.
- FLORES, R.; STEFANELLO, S.; FRANCO, E.T.H.; MANTOVANI, N. Regeneração *In Vitro* de Espinheira-Santa (*Maytenus ilicifolia* Mart). **Rev. Bras. de Agrociência**, v.4, n°03, 201-205, Set-Dez., 1998.
- FRANÇA, S. de C.; PEREIRA, A. M. S. Espinheira-santa: do estudo à viabilização de um fitoterápico brasileiro contra úlcera gástrica. **Revista Racine**, São Paulo, set./out./nov., p. 67-69, 1997.
- FREEMAN, S., KATAN, T. & SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease** 82:596-605. 1998.
- FREEMAN, S., HOROWITZ, S., SHARON, A. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. **Phytopathology** 91 (10): 986-992 OCT 2001.

- GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* kiely detectada por RAPD.** Curitiba, 1995. Dissertação de Mestrado- Setor de Ciências Biológicas, Universidade federal do Paraná.
- GONZALEZ, F. G.; PORTELA, T. Y.; STIPP, E. J.; DI STASI, L. C. Antiulcerogenic and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 41-47, 2001.
- HALL, B. G. **Phlogenetic Trees Made Easy: A How-to Manual for Molecular Biologists.** Massachusetts U.S.A.: Sinauer Associates, Inc., 2001.
- KISS, L & NAKASONE, K. K. **Ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences do not support the species status of *Ampelomyces quisqualis*, a hyperparasite of owdery mildew fungi.** *Curr Genet* 33: 362–367, 1998.
- KUMAR, S, TAMURA, K, NEI, M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics** 5:150-163.
- KUTNEY, J. P.; BEALE, M. H.; SALISBURY, P. J.; STUART, K. L.; WORTH, B. R.; TOWNSLEY, P. M.; CHALMERS,, W. T.; NILSSON, K.; JACOLI, G. G. Isolation and characterization of natural products from plant tissue cultures of *Maytenus buchananii*. **Phytochemistry**, v. 20, n° 4, p. 653-657, 1981.
- LIMA FILHO, R. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Caracterização Enzimática e Patogenicidade Cruzada de *Colletotrichum* spp. Associados a Doenças de Pós-Colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.6, p.620-625, 2003.
- LIMA, O. G. de; D'ALBUQUERQUE, I. L.; COELHO, J. S. de B.; MARTINS, D. G.; LACERDA, A. L.; MACIAL, G. M. Substâncias antimicrobianas de plantas superiores –Maitenina, novo antimicrobiano com ação antineoplásica, isolado de celastrácea de Pernambuco. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 9, n° 1-2, p. 17-25, 1969.
- LOPEZ, A.M.Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas** 291-337. 2001.

- MEYER, D. **ÁRVORES EVOLUTIVAS HUMANAS: Uma discussão sobre inferência filogenética**. In: Serie Monografias - nº 3 – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1996.
- MILLS, P.R., HODSON, A. & BROWN, A.E. Molecular differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates infecting tropical fruit. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (Eds.) **Colletotrichum: Biology, pathology and control**. Wallingford. CAB International. 1992.
- MORIWAKI, J., SATO, T. AND TSUKIBOSHI, T. **Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan**. Mycoscience 44: 47- 53. (2003).
- NEI, M.;KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford University Press, New York. 2000.
- NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos Endofíticos: Interação com Plantas e Potencial Biotecnológico. **Revista Biotecnologia**, ano 5, nº29, nov/dez, 2002.
- ORABI, K. Y.; AL-QASOUMI, S. I.; EL-OLEMY, M. M.; MOSSA, J. S.; MUHAMMAD, I. Dihydroagarofuran alkaloid and triterpenes from *Maytenus heterophylla* and *Maytenus arbutifolia*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 475-480, 2001.
- PANIZZA, S. **Plantas que Curam (Cheiro de Mato)**. 15° ed. São Paulo: IBRASA, pp. 265. 1998.
- PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia**, v. 85, nº 3, p. 362-364, 1993.
- PERES, A.P. **Podridão peduncular de mamão: variabilidade dos agentes etiológicos e aspectos fisiopatológicos na pós-colheita**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras. 2002
- PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991. p. 179-197
- PILEGGI, S.A.V. **Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. por meio de marcadores moleculares RAPD e seu potencia farmacológico**. Curitiba, 2006. Tese de Doutorado - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

- POWELL, R. G.; SMITH Jr., C. R. Antitumor agents from higher plants. In: SWAIN, T.; KLEIMAN, R. **The Resource Potential in Phytochemistry – Recent Advances in Phytochemistry**. v. 14. New York, Plenum Press, 1979. 215 p.
- RADOMSKI, M. I. **Caracterização ecológica e fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* Mart., em populações nativas no município da Lapa – Paraná**. Curitiba, 1998. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciências do Solo) – Universidade Federal do Paraná.
- RODRIGUES, K. F.; PETRINI, O. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. In: HYDE, K. D. **Diversity of Tropical Microfungi**. Hong Kong, University of Hong Kong Press, 1997. p. 57-69.
- SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; RASTRELLI, L.; PIZZA, C. A flavonoid glycoside from *Maytenus aquifolium*. **Phytochemistry**, v. 49, n° 1, p. 237-239, 1998.
- SANTANA, C. F. de; ASFORA, J. J.; COTIAS, C. T. Primeiras observações sobre o emprego da maitenina em pacientes cancerosos. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 11, n° 2, p. 37-49, 1971.
- SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J.. **Fundamentos de Genética**. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, R.J., 2001. 756p
- STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Nocardiaopsis* sp. endophyte of yam bean. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 137-141, 2001.
- STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 105-109, 2002.
- STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 535-544, 2003.
- STROBEL, G. & DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, vol. 67, n°4, p. 491-502, 2003.
- SUTO, M.; TAKEBAYASHI, M.; SAITO, K.; TANAKA, M.; YOKOTA, A.; TOMITA, F. Endophytes as producers of xylanase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n° 1, p. 88-90, 2002.

- SUTTON, B.C. (1992). The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: **Colletotrichum Biology, Pathology and Control** (eds. J.A. Bailey and M.J. Jeger). CAB International, Wallingford, UK: 1-26.
- WHITE, T.M.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315–321.
- WHITE Jr., J. F.; MORROW, A. C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. **Mycologia**, Lawrence, v.82, p.218-226, 1990.

## **ANEXO**

Alinhamento das seqüências das linhagens estudadas submetidas ao software MEGA versão 3.1 (KUMAR; TAMURA; NEI; 2004)

alinhamento com todas

```

#MEGA
!Title dna;
!Format
  DataType=Nucleotide
  NSeqs=20 NSites=529
  Identical=. Missing=? Indel=-;

!Domain=Data;
  C. gloeosporioides COL13      TCCGTTGGTG AACCAGCGGA GGGATCATT A CTGAGTTTAC
-GCTCTATAA CCCTTTGTGA
#COL6
C.....
#COL7
C.....
#COL2
C.....
#C._gloeosporioides_AJ301974
C.....
#C._boninense_DQ286160
C.....
#C._boninense_AY376523
-----
#G._cingulata_AY266377
C.....
#C._boninense_DQ286170
C.....
#G._cingulata_DQ117967
C.....
#C._boninense_DQ286162
-----
#G._cingulata_AY841134
-----
#C._boninense_AY376525
-----
#G._cingulata_EF488442
-----
#G._cingulata_EF423552
-----
#G._cingulata_AM491334
-----
#G._cingulata_DQ286224
-----
#C._gloeosporioides_AJ301986
-----
#C._gloeosporioides_AJ301919
-----
#C._lindemuthianum_AB087222
-----

#COL13      ACATACCTAT AACTGTTGCT TCGGCGGGTA GGGTCTCCGC
-----GAC -CCTCCCGGC
#COL6      .....C ..... ..CCG...C.
TGAAAAG... G.....
#COL7      .....C ..... ..CCG...C.
TGAAAAG... G.....
#COL2      .....C ..... ..CCG...C.
TGAAAAG... G.....
#C._gloeosporioides_AJ301974
TGAAAAG... G.....
#C._boninense_DQ286160
TGAAAAG... G.....
#C._boninense_AY376523
TGAAAAG... G.....
#G._cingulata_AY266377
TGAAAAG... G.....
#C._boninense_DQ286170
TGAAAAG... G.....

```

```

                                alinhamento com todas
#G._cingulata_DQ117967          .....C ..... ..CCG...C.
TGAAAAG... G.....
#C._boninense_DQ286162         .....C ..... ..CCG...C.
TGAAAAG... G.....
#G._cingulata_AY841134         .....C ..... ..CCG...C.
TGAAAAG... G.....
#C._boninense_AY376525         .....C ..... ..CCG...C.
TGAAAAG... G.....
#G._cingulata_EF488442         .....
-----
#G._cingulata_EF423552         .....
-----
#G._cingulata_AM491334         .....
-----
#G._cingulata_DQ286224         .....
-----
#C._gloeosporioides_AJ301986   .....
-----
#C._gloeosporioides_AJ301919   .....
-----
#C._lindemuthianum_AB087222    .....A-- ...C..... ..CG ..AGG.....
----- . T..C.....

#COL13                          CT---CCCGC CTCCGGGCGG G-----TC GGCGCCCGCC
GGAGGATAAC CAAACTCTGA
#COL6                            .CGGA..G.A .C..CC.... .ACCGGACC. ....
.....-
#COL7                            .CGGA..G.A .C..CC.... .ACCGGACC. ....
.....-
#COL2                            .CGGA..G.A .C..CC.... .ACCGGACC. ....
.....-
#C._gloeosporioides_AJ301974   .CGGA..G.A .C..CC.... .ACCGGACC. ....
-----
#C._boninense_DQ286160         .CGGA..G.A .C..CC.... .ACCGGACC. ....
-----
#C._boninense_AY376523         .CGGA..G.A .C..CC.... .ACCGGACC. ....
-----
#G._cingulata_AY266377         .CGGA..G.A .C..CC.... .ACCGGACC. ....
-----
#C._boninense_DQ286170         .CGGA..G.A .C..CCTG.. .GCCGGAC.. ....
-----
#G._cingulata_DQ117967         .CGGA..G.A .C..CC.... .ACCGGACC. ....
-----
#C._boninense_DQ286162         .CGGA..G.A .C..CC.... .ACCGGACC. ....
-----
#G._cingulata_AY841134         .CGGA..G.A .C..CC.... .ACCGGACC. ....
-----
#C._boninense_AY376525         .CGGA..G.A .C..CC.... .ACCGGACC. ....
-----
#G._cingulata_EF488442         ..---- ..----- ..
-----
#G._cingulata_EF423552         ..---- ..----- ..
-----
#G._cingulata_AM491334         ..---- ..----- ..
-----
#G._cingulata_DQ286224         ..---- ..----- ..
-----
#C._gloeosporioides_AJ301986   ..---- ..----- ..
-----
#C._gloeosporioides_AJ301919   ..---- ..----- ..
-----
#C._lindemuthianum_AB087222    .C----- -CG.TC.... ..----- -
.....A... .C.....-

#COL13                          TT-TAACGAC GTTTCTTCTG AGTGGTACAA GCAA-TAAT
CAAAACTTTT AACAAACGGAT
#COL6                            ..G..... ..C.T.. ..A....
.....

```

```

alinhamento com todas
#COL7      ..G..... ..C.T.. ..A....
#COL2      ..G..... ..C.T.. ..A....
#C._gloeosporioides_AJ301974 ..G..... ..C.T.. ..A....
#C._boninense_DQ286160 ..G..... ..C.T.. ..A....
#C._boninense_AY376523 ..G..... ..C.T.. ..A....
#G._cingulata_AY266377 ..G..... ..C.T.. ..A....
#C._boninense_DQ286170 ..T..... ..C.T.. ..A....
#G._cingulata_DQ117967 ..G..... ..C.T.. ..A....
#C._boninense_DQ286162 ..G..... ..C.T.. ..A....
#G._cingulata_AY841134 ..G..... ..C.T.. ..A....
#C._boninense_AY376525 ..G..... ..C.T.. ..A....
#G._cingulata_EF488442 ..-..... ..-....
#G._cingulata_EF423552 ..-..... ..-....
#G._cingulata_AM491334 ..-..... ..-....
#G._cingulata_DQ286224 ..-..... ..-....
#C._gloeosporioides_AJ301986 ..-..... ..-....
#C._gloeosporioides_AJ301919 ..-..... ..-....
#C._lindemuthianum_AB087222 ..T..... ..C..... ..C.... ..-..G.
#COL13      CTCTTGGTTC TGGCATCGAT GAAGAACGCA GCGAAATGCG
ATAAGTAATG TGAATTGCAG
#COL6      .....
#COL7      .....
#COL2      .....
#C._gloeosporioides_AJ301974 .....
#C._boninense_DQ286160 .....
#C._boninense_AY376523 .....
#G._cingulata_AY266377 .....
#C._boninense_DQ286170 .....
#G._cingulata_DQ117967 .....
#C._boninense_DQ286162 .....
#G._cingulata_AY841134 .....
#C._boninense_AY376525 .....
#G._cingulata_EF488442 .....
#G._cingulata_EF423552 .....
#G._cingulata_AM491334 .....

```

alinhamento com todas

```
.....
#G._cingulata_DQ286224 .....
#C._gloeosporioides_AJ301986 .....
#C._gloeosporioides_AJ301919 .....
#C._lindemuthianum_AB087222 .....
.....
#COL13 AATTCAGTGA ATCATCGAAT CTTTGAACGC ACATTGCGCC
CGCCAGCATT CTGGCGGGCA
#COL6 .....
#COL7 .....
#COL2 .....
#C._gloeosporioides_AJ301974 .....
#C._boninense_DQ286160 .....
#C._boninense_AY376523 .....
#G._cingulata_AY266377 .....
#C._boninense_DQ286170 .....
#G._cingulata_DQ117967 .....
#C._boninense_DQ286162 .....
#G._cingulata_AY841134 .....
#C._boninense_AY376525 .....
#G._cingulata_EF488442 .....
#G._cingulata_EF423552 .....
#G._cingulata_AM491334 .....
#G._cingulata_DQ286224 .....
#C._gloeosporioides_AJ301986 .....
#C._gloeosporioides_AJ301919 .....
#C._lindemuthianum_AB087222 .....
.....
#COL13 TGCCTGTTCG AGCGTCATTT CAACCCTCAA GCTCTGCTTG
GTGTTGGGGC C-CTACAG-C
#COL6 .....
#COL7 T-....G.T.
#COL7 T-....G.T.
#COL2 .....
#C._gloeosporioides_AJ301974 T-....G.T.
#C._boninense_DQ286160 T-....G.T.
#C._boninense_AY376523 T-....G.T.
#G._cingulata_AY266377 T-....G.T.
#C._boninense_DQ286170 T-....G.T.
```

alinhamento com todas

```

..... T-....G.T.
#G._cingulata_DQ117967 .....
..... T-....G.T.
#C._boninense_DQ286162 .....
..... T-....G.T.
#G._cingulata_AY841134 .....
..... T-....G.T.
#C._boninense_AY376525 .....
..... T-....G.T.
#G._cingulata_EF488442 .....
..... -.....-
#G._cingulata_EF423552 .....
..... -.....-
#G._cingulata_AM491334 .....
..... -.....-
#G._cingulata_DQ286224 .....
..... -.....-
#C._gloeosporioides_AJ301986 .....
..... -.....-
#C._gloeosporioides_AJ301919 .....
..... -.....-
#C._lindemuthianum_AB087222 ..... A.C.....
.C..... TT.C..G.-.

```

```

#COL13 TGATGTAGGC CCTCAAAGGT AGTGGCGGAC CCTCCCGGAG
CCTCCTTTGC GTAGTAAC-T
#COL6 -..C.....
..... A.
#COL7 -..C.....
..... A.
#COL2 -..C.....
..... A.
#C._gloeosporioides_AJ301974 -..C.....
..... A.
#C._boninense_DQ286160 -..C.....
..... A.
#C._boninense_AY376523 -..C.....
..... A.
#G._cingulata_AY266377 -..C.....
..... A.
#C._boninense_DQ286170 -..C..... T.....
..... A.
#G._cingulata_DQ117967 -..C.....
..... A.
#C._boninense_DQ286162 -..C.....
..... A.
#G._cingulata_AY841134 -..C.....
..... A.
#C._boninense_AY376525 -..C.....
..... A.
#G._cingulata_EF488442 .....
..... -.....-
#G._cingulata_EF423552 .....
..... -.....-
#G._cingulata_AM491334 .....
..... -.....-
#G._cingulata_DQ286224 .....
..... -.....-
#C._gloeosporioides_AJ301986 .....
..... -.....-
#C._gloeosporioides_AJ301919 .....
..... -.....-
#C._lindemuthianum_AB087222 ...C..G... ..AC ..... G.....
..... A.

```

```

#COL13 TTACGTCTCG CACTGGGATC CGGAGGG-AC TCTTGCCGTA
AAACCCCC
#COL6 ..-.....-

```

alinhamento com todas

```
.....-
#COL7 ..-.....
#COL2 ..-.....
#C._gloeosporioides_AJ301974 ..-.....
#C._boninense_DQ286160 ..-.....
#C._boninense_AY376523 ..-.....
#G._cingulata_AY266377 ..-.....
#C._boninense_DQ286170 ..-.....T
#G._cingulata_DQ117967 ..-.....A
#C._boninense_DQ286162 ..-.....
#G._cingulata_AY841134 ..-.....
#C._boninense_AY376525 ..-.....
#G._cingulata_EF488442 .....-
#G._cingulata_EF423552 .....-
#G._cingulata_AM491334 .....-
#G._cingulata_DQ286224 .....-
#C._gloeosporioides_AJ301986 .....-
#C._gloeosporioides_AJ301919 .....-
#C._lindemuthianum_AB087222 AC-.AC....C...C..C...C..C.....
..C.....
```