

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTOS DE PATOLOGIA BÁSICA E DE PATOLOGIA MÉDICA**

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO E CARACTERIZAÇÃO POR  
RAPD DE ISOLADOS DE *Guignardia mangiferae* E *Phyllosticta* sp  
ENDÓFITOS DE *Maytenus ilicifolia***

**CURITIBA**

**2006**

**ANDRÉ KLASS**

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO E CARACTERIZAÇÃO POR RAPD  
DE ISOLADOS DE *Guignardia mangiferae* E *Phyllosticta* sp ENDÓFITOS  
DE *Maytenus ilicifolia***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia dos Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná para obtenção do Grau de Mestre, Área de Concentração: Microbiologia.

Orientadora: Professora Dra. Chirlei Glienke-Blanco.  
Co-orientadora: Professora Dra. Ida Chapaval Pimentel.

**CURITIBA**

**2006**

## AGRADECIMENTOS

Ao concluirmos este trabalho, não podemos deixar de externar nossos agradecimentos a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, nos ajudaram durante o período de estudo e aulas.

Assim, nossos especiais agradecimentos:

A minha família, ao meu pai Clemy Klass, minha mãe Maria Lia Klass, e irmãos;

Às Professoras Doutoras Chirlei Glienke-Blanco e Ida Chapaval Pimentel, que com os seus conhecimentos nos orientaram e aconselharam, permitindo que concluíssemos este trabalho;

Às professoras Sônia Alvim Veiga Pillegi, Patrícia do Roccio Dalzoto, Vanessa Kawa Cordeiro e Vânia Aparecida Vicente das quais obtivemos o “saber” e as informações que nos permitem ser um profissional mais qualificado;

Ao Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná - UFPR por ter me permitido o uso de suas instalações;

Ao Departamento de Patologia Básica da UFPR onde realizei meu mestrado;

A Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG por ter cedido parte de suas instalações;

Aos estagiários de laboratório de Genética de Microrganismos da UFPR;

A técnica Shirley Cercal por ter me ajudado em muito no laboratório;

A secretária do Departamento de Genética da UFPR Valéria Cristina Romeiro por ter me ajudado muito principalmente na fase final do mestrado;

A senhora Izolde Gaertner muito importante dentro do laboratório;

Aos meus amigos;

Aos meus colegas de curso, com os quais pudemos trocar experiências e debater idéias e, acima de tudo, criar novas amizades.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	3
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
3.1 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS .....	4
3.1.1 Considerações Gerais .....	4
3.1.2 Isolamento de Microrganismos Endofíticos .....	5
3.1.3 Endófitos Produtores de Substâncias Antimicrobianas .....	6
3.1.4 Endófitos Isolados de Plantas Medicinais .....	7
3.2 FUNGO <i>Guignardia</i> sp .....	8
3.3 PLANTA <i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reiss .....	9
3.4 MARCADORES MOLECULARES RAPD .....	10
3.4.1 RAPD .....	10
3.4.2 NATUREZA DOS LOCOS RAPD .....	12
3.4.3 RAPD EM MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS .....	13
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	14
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO .....	14
4.2 MEIOS DE CULTURA .....	15
4.2.1 Meio BDA (Meio Ágar-Batata-Dextrose) .....	15
4.2.2 Meio AA (Meio Ágar-Água) .....	15
4.2.3 Meio NA (Meio Ágar-Nutriente) .....	15
4.2.4 Meio MC (Meio Completo) (PONTECORVO <i>et al.</i> 1953) .....	16
4.2.5 Meio MEA .....	16
4.3 SOLUÇÕES E REAGENTES .....	16
4.3.1 Clorofane .....	16
4.3.2 Clorofil .....	17

4.3.3	dNTP.....	17
4.3.4	Fenol Saturado.....	17
4.3.5	Gel de Agarose (0,8%).....	17
4.3.6	Gel de Agarose (1,5%).....	17
4.3.7	Solução de Brometo de Etídeo.....	17
4.3.8	Solução de EDTA 0,5M.....	18
4.3.9	Tampão da Amostra (6x).....	18
4.3.10	Tampão de Corrida TBE 10x.....	18
4.3.11	Solução Tampão de Extração de DNA.....	18
4.3.12	Tampão Tris-EDTA (TE).....	18
4.3.13	Solução de Vitaminas.....	19
4.3.14	RNAse.....	19
4.3.15	Lactofenol.....	19
4.4	MÉTODOS.....	19
4.4.1	Isolamento de <i>Guignardia</i> sp.....	19
4.4.2	Estoque de <i>Guignardia</i> sp.....	20
4.4.3	Identificação Morfológica de Isolados de <i>Guignardia</i> sp.....	20
4.4.4	Atividade Antimicrobiana de Isolados de <i>Guignardia</i> sp.....	21
4.4.5	Análise da Variabilidade Genética de Isolados de <i>Guignardia</i> sp por Marcadores Moleculares RAPD.....	21
4.4.5.1	Extração de DNA.....	21
4.4.5.2	RAPD.....	22
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>24</b>
5.1	ISOLAMENTO.....	24
5.2	ANÁLISE DA VARIABILIDADE MORFOLÓGICA.....	25
5.3	ANÁLISE POR RAPD.....	32
5.4	ANÁLISE POR PCR <i>MULTIPLEX</i> .....	41
5.5	TESTE DE ANTAGONISMO.....	42
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>54</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MACROMORFOLOGIA DO ISOLADO ESE8 DE <i>Phyllosticta</i> sp APÓS 16 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C .....	26
FIGURA 2 - MACROMORFOLOGIA DO ISOLADO FD63 DE <i>G. mangiferae</i> APÓS 16 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C .....	27
FIGURA 3 - MACROMORFOLOGIA DO ISOLADO FD64 DE <i>G. mangiferae</i> APÓS 16 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C .....	28
FIGURA 4 - FOTOMICROGRAFIA DE ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO DOS ISOLADOS ESE12, ESE5 E ESE10 DE <i>Phyllosticta</i> sp APÓS 35 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO DE CULTURA MEA A 28°C .....	30
FIGURA 5 - FOTOMICROGRAFIA DOS ISOLADOS ESE5 DE <i>Phyllosticta</i> sp E FD63 DE <i>G. mangiferae</i> APÓS 35 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO DE CULTURA MEA ..	31
FIGURA 6 - FOTOMICROGRAFIA DOS ASCOS DO ISOLADO FD63 DE <i>G. mangiferae</i> APÓS 35 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO DE CULTURA MEA A 25°C .....	32
FIGURA 7 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD DOS ISOLADOS DE <i>G. mangiferae</i> E <i>Phyllosticta</i> sp UTILIZANDO-SE O PRIMER OPZ19 .....	33
FIGURA 8 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD DOS ISOLADOS DE <i>G. mangiferae</i> E <i>Phyllosticta</i> sp UTILIZANDO-SE O PRIMER OPX08 .....	34
FIGURA 9 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD DOS ISOLADOS DE <i>G. mangiferae</i> E <i>Phyllosticta</i> sp UTILIZANDO-SE O PRIMER OPX19 .....	35
FIGURA 10 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD DOS ISOLADOS DE <i>G. mangiferae</i> E <i>Phyllosticta</i> sp UTILIZANDO-SE O PRIMER OPX12 .....	36
FIGURA 11 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD DOS ISOLADOS DE <i>G. mangiferae</i> E <i>Phyllosticta</i> sp UTILIZANDO-SE O PRIMER OPX01 .....	37
FIGURA 12 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD DOS ISOLADOS DE <i>G. mangiferae</i> E <i>Phyllosticta</i> sp UTILIZANDO-SE O PRIMER OPX07 .....	38
FIGURA 13 - DENDROGRAMA OBTIDO A PARTIR DOS VALORES DE SIMILARIDADE GENÉTICA UTILIZANDO O COEFICIENTE DE JACCARD E O MÉTODO UPGMA COM DADOS DE RAPD .....	39
FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS A PARTIR DA MATRIZ DE SIMILARIDADE DE JACCARD COM DADOS DE RAPD .....	40

FIGURA 15 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR-MULTIPLEX REVELADO EM GEL DE AGAROSE.....	42
FIGURA 16 - TESTE DE ANTAGONISMO DA LINHAGEM ESE12 DE <i>Phyllosticta</i> sp CONTRA O PATÓGENO <i>Staphylococcus aureus</i> RESISTENTE A METICILINA (MRSA).....	44
FIGURA 17 - TESTE DE ANTAGONISMO DO ISOLADO FD63 DE <i>G. mangiferae</i> CONTRA A LINHAGEM PC13 DE <i>G. citricarpa</i> APÓS SEIS DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA BDA A 28°C .....	45
FIGURA 18 - TESTE DE ANTAGONISMO DO ISOLADO FD64 DE <i>G. mangiferae</i> CONTRA A LINHAGEM PC13 DE <i>G. citricarpa</i> APÓS SEIS DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA BDA A 28°C .....	46
FIGURA 19 - TESTE DE ANTAGONISMO DO ISOLADO FD63 DE <i>G. mangiferae</i> CONTRA A LINHAGEM 3C DE <i>G. citricarpa</i> APÓS SEIS DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA BDA A 28°C.....	47
FIGURA 20 - TESTE DE ANTAGONISMO DO ISOLADO FD64 DE <i>G. mangiferae</i> CONTRA A LINHAGEM 3C DE <i>G. citricarpa</i> APÓS SEIS DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA BDA A 28°C.....	48
FIGURA 21 - TESTE DE ANTAGONISMO DO ISOLADO FD63 DE <i>G. mangiferae</i> CONTRA A LINHAGEM 3C DE <i>G. citricarpa</i> APÓS 15 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA BDA A 28°C.....	49
FIGURA 22 - TESTE DE ANTAGONISMO DO ISOLADO FD64 CONTRA A LINHAGEM 3C DE <i>G. citricarpa</i> APÓS 15 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA BDA A 28°C.....	50
FIGURA 23 - TESTE DE ANTAGONISMO DO ISOLADO FD63 DE <i>G. mangiferae</i> CONTRA A LINHAGEM PC13 DE <i>G. citricarpa</i> APÓS 15 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA BDA A 28°C.....	51
FIGURA 24 - TESTE DE ANTAGONISMO DO ISOLADO FD64 DE <i>G. mangiferae</i> CONTRA A LINHAGEM PC13 DE <i>G. citricarpa</i> APÓS 15 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA BDA A 28°C.....	52

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CÓDIGO DOS ISOLADOS, PLANTA HOSPEDEIRA E LOCAL DE ISOLAMENTO.....	14
TABELA 2 - NÚMERO E FREQUÊNCIA DE ISOLADOS DE <i>Guignardia</i> spp OBTIDOS NOS CINCO ISOLAMENTOS .....	24
TABELA 3 - ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO PRESENTES NOS ISOLADOS DE <i>Guignardia mangiferae</i> e <i>Phyllosticta</i> sp E DIMENSÕES OBTIDAS.....	29
TABELA 4 - DIMENSÕES MÉDIAS OBSERVADAS NAS ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO DE <i>G. mangiferae</i> e <i>Phyllosticta</i> sp E VALORES OBSERVADOS NA LITERATURA .....	30
TABELA 5 - AMOVA – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE MARCADORES MOLECULARES .....	41
TABELA 6 - DIFERENÇA MÉDIA ENTRE OS GRUPOS OBTIDOS NA AMOVA .....	41
TABELA 7 - INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DE <i>G. citricarpa</i> (PC13 E 3C) FRENTE AOS ENDÓFITOS DE <i>G. mangiferae</i> (FD63 E FD64) APÓS SEIS DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO DE CULTURA BDA A 28°C .....	44

## RESUMO

A espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Reiss.), planta pertencente à família Celastraceae é uma planta medicinal muito utilizada no tratamento de várias doenças, entre elas, úlceras gástricas, devido à produção de certos compostos químicos. No presente trabalho isolou-se e analisou-se a variabilidade genética por marcadores RAPD de fungos dos gêneros *Guignardia* e *Phyllosticta* encontrados como endófitos nesta planta. Também foi avaliado o potencial antimicrobiano dos isolados endofíticos contra bactérias patogênicas em humanos e fungos fitopatogênicos. Os resultados mostraram que as folhas de *M. ilicifolia* são colonizadas por fungos do gênero *Phyllosticta* e por *Guignardia mangiferae* como endófitos, embora nas condições utilizadas a frequência de isolamento tenha sido inferior a descrita em outras plantas hospedeiras. Utilizando-se marcadores RAPD os isolados foram separados em dois grupos. No primeiro grupo, estão os isolados ESE1 a ESE12, FV12, FV20, FD62 e FD21 endófitos de espinheira-santa. O segundo grupo reuniu o isolado FD63, de espinheira-santa, o isolado FD64 endófito de confrei e as linhagens referências de *G. mangiferae* (N22 e 196). Em função dos agrupamentos formados pelo RAPD e características morfológicas, pode-se sugerir que os isolados do grupo I pertençam ao gênero *Phyllosticta*, mas não foi possível identificar a espécie. O fato de os isolados FD63 e FD64 apresentarem ascos e agruparem com as linhagens referências de *G. mangiferae*, sugere que elas pertençam à espécie *G. mangiferae*. Dados de *PCR multiplex* corroboraram tal sugestão. Os testes de atividade antibacteriana utilizados neste trabalho não identificaram isolados endofíticos com potencial contra os patógenos avaliados. Entretanto, o isolado FD63 de *G. mangiferae* apresentou-se promissor em testes de inibição contra o fitopatógeno *G. citricarpa*.

**Palavras-chave:** Antagonismo, espinheira-santa, *Maytenus ilicifolia*, *Guignardia*, *Phyllosticta*, RAPD.

## 1 INTRODUÇÃO

Fungos do gênero *Guignardia* são endófitos encontrados nos espaços intercelulares de tecidos de diversos vegetais, entre eles a espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Reiss.), planta pertencente à família Celastraceae. Esta planta medicinal é muito utilizada no tratamento de várias doenças, como por exemplo, úlceras gástricas, devido à produção de certos compostos químicos. Dependendo de sua localização geográfica esta planta recebe outras designações, como cancorosa, espinho de Deus, salva-vidas e outras denominações. No Brasil podemos encontrar espinheira-santa principalmente nos estados do Sul. Em países da América Latina podemos 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 do ciclo de vida da planta e que podem 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. Estes microrganismos podem proteger a planta contra ataques de outros microrganismos, animais e insetos-pragas devido provavelmente à produção de toxinas. Existem relatos do crescimento, enraizamento e resistência ao estresse produzido pelo ambiente na planta com a ajuda destes microrganismos endofíticos. Em geral podem crescer em meios de cultivo simples, podendo ser facilmente isolados.

Estudos sobre o potencial destes microrganismos para a área farmacêutica e biotecnológica têm-se mostrado muito importante, devido principalmente à descoberta de substâncias para uso terapêutico humano, como os antibióticos. Plantas medicinais com propriedade antimicrobiana também são colonizadas por microrganismos endofíticos, sugerindo que a ação antibacteriana ou antifúngica poderia estar no endófito e não na planta, ou provavelmente na interação destes. No Brasil vários autores têm mostrado a produção de fármacos por endófitos como *Xylaria* spp, *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum* sp e também *Guignardia* sp. A partir de um isolado de *Guignardia* sp endofítico da planta medicinal *Spondias mombin*, já foi identificado um novo metabólito, o ácido guignardico. Fungos do gênero *Guignardia* (Anamórfico: *Phyllosticta*) são freqüentemente isolados como endofíticos na grande maioria das plantas já estudadas.

Estudos moleculares são realizados na busca de padrões genéticos nestes organismos auxiliando na sua caracterização. Entre as técnicas baseadas em marcadores moleculares, o RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) é de grande auxílio por ser uma forma rápida e fácil para avaliar a diversidade genética entre organismos, sem a necessidade de grandes quantidades de DNA.

O gênero *Guignardia* em especial apresenta grandes dificuldades de identificação em nível de espécie, utilizando-se apenas características morfológicas, assim a identificação e a caracterização molecular deste endófito, são úteis tanto do ponto de vista acadêmico, como em um possível uso deste na indústria farmacêutica ou no controle biológico.

## 2 OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivos:

1. Isolamento e identificação morfológica de endófitos de *Guignardia* sp e *Phyllosticta* sp de folhas de *Maytenus ilicifolia*.
2. Testar a atividade antimicrobiana de linhagens fúngicas de *Guignardia mangiferae* e *Phyllosticta* sp isolados de espinheira-santa contra microrganismos patogênicos de humanos e fitopatógenos.
3. Identificar as linhagens fúngicas em estudo e caracterizar sua diversidade genética por meio de marcadores moleculares RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”).

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS**

##### **3.1.1 Considerações Gerais**

Microorganismos endofíticos (também chamados de endófitos) 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. Muito pelo contrário, os endófitos podem desempenhar relevante função para a saúde vegetal, já que atuam como agentes controladores de microrganismos fitopatogênicos, no controle de insetos e até proteção 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). Microorganismos 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 em 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 dentro de plantas sem apresentar “plumas”, “adereços” ou “paetês”, possuíam algumas funções imprescindíveis para a defesa de seus hospedeiros (NETO; AZEVEDO; ARAUJO, 2002).

A distinção entre endofíticos, epífitos (habitam a superfície da planta) e fitopatogênicos (aqueles que causam doenças as plantas) é puramente didática. Há um gradiente que os separa, sendo assim, uma tarefa muito difícil achar limites para separar cada categoria (AZEVEDO et al., 2000).

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 endofíticas poderiam ser alterados geneticamente, expressarem genes de interesse, serem 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 fazem uma variedade de relações, variando da simbiose para a relação patogênica. Por causa da sua contribuição para a planta hospedeira, os endófitos podem produzir uma variedade de substâncias de potencial uso para a medicina moderna, agricultura e indústria (STROBEL; DAISY, 2003). Estudos revelaram grandes propriedades de interesse biotecnológico destes microrganismos endofíticos. Hoje se atribui 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).

A ocorrência de microrganismos endofíticos pode ser mais ou menos freqüente, que as se apresentam com mais freqüência são chamadas de dominantes e as mais raras de secundárias (GLIENKE, 1995; PEREIRA; AZEVEDO; PETRINI, 1993; AZEVEDO 1998). O clima influi bastante na ocorrência destes microrganismos, em climas temperados a diversidade de espécies é bastante alta tanto em termos quantitativos como qualitativos (RODRIGUES; PETRINI, 1997).

### 3.1.2 Isolamento de Microrganismos Endofíticos

Podem-se detectar endófitos via microscopia óptica (WHITE Jr.; MORGAN-JONES; MORROW, 1993), eletrônica (VIRET; PETRINI, 1994) e também por métodos sorológicos (SINCLAIR, 1991).

Vários cuidados são tomados durante o isolamento destes microrganismos para que sejam excluídos todos os microrganismos epífitos (BLANCO, 1999). Os tipos de descontaminantes superficiais, suas concentrações e os tempos de permanência de caules,

folhas e outros órgãos nestas soluções são fundamentais para um bom isolamento livre de epífitos (BLANCO, 1999). Devem ser utilizados meios de cultura apropriados e podem-se utilizar substâncias como antibióticos e/ou fungicidas, de acordo com o grupo de endófitos que se deseja isolar (PETRINI, 1991; AZEVEDO, 1998). Também são levados em consideração a idade da planta, órgãos utilizados, local, época de coleta e temperatura de incubação das placas (PETRINI, 1991; AZEVEDO, 1998).

### 3.1.3 Endófitos Produtores de Substâncias Antimicrobianas

Antibiose é a inibição de um organismo por um produto metabólico de outro microrganismo. É muito evidente a importância de um microrganismo antagonista ser efetivo contra vários organismos patogênicos, bem como para diferentes isolados. Em ensaios *in vitro*, quando se observa uma inibição no desenvolvimento de algum patógeno, atribui-se como consequência disso a produção de um antibiótico por parte dos antagonistas (LINHARES; MATSUMURA; LUZ, 1995).

HUANG et al. (2001) testaram a ação de fungos endofíticos que foram isolados de plantas medicinais frente a outros fungos e tumores. Os resultados indicaram fortemente que fungos endofíticos isolados de plantas medicinais são muito importantes na medicina como agentes antimicrobianos e antitumorais.

BELL, WELLS e MARKHAM (1982) verificaram a variação do potencial antagonico de isolados de *Trichoderma* aos agentes patogênicos e suscetibilidade destes patógenos frente ao fungo *Trichoderma* “in vitro”. Controlando o ambiente, provendo uma base de nutrição uniforme, temperatura, umidade e luz padronizada renderam informações úteis sobre o grau de variabilidade antagônica do *Trichoderma*.

RODRIGUES, HESSE e WERNER (2000) pesquisaram a atividade bioativa de extratos de fungos endofíticos isolados da planta *Spondias mombin* L (cajazeiro). Estes extratos, incluindo o de *Guignardia* sp, foram testados contra determinados microrganismos. O fungo *Guignardia* sp apresentou atividade contra um determinado número de microrganismos, entre os quais podemos citar *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Em 2001, RODRIGUES-HEERKLOTZ et al isolaram, elucidaram a estrutura química e a síntese assimétrica de um novo metabólito, a ácido guignardico por *Guignardia* sp, isolados da planta *Spondias mombin*.

ARAÚJO, SILVA e AZEVEDO (2000) isolaram 53 microrganismos endofíticos de

folhas e raízes de milho e testaram sua atividade antimicrobiana contra vários microrganismos patogênicos de humanos e foi constatada a inibição de quase todos estes patógenos frente às linhagens isoladas.

A munumbicina, uma substância produzida por uma linhagem endofítica, isolada da planta medicinal *Kennedia nigriscans* foi isolada e caracterizada. O extrato purificado deste microrganismo apresenta quatro componentes que foram chamados de munumbicina A, B, C e D. Em geral eles apresentam inibição contra a maioria dos microrganismos patogênicos testados, principalmente contra bactérias gram-positivas. A munumbicina B inibiu *Staphylococcus aureus* resistente à metilicilina (MRSA) e a D apresentou atividade contra o parasita da malária *Plasmodium falciparum* (CASTILLO et al., 2002).

CORRADO e RODRIGUES (2004) observaram a atividade bactericida de linhagens do fungo endofítico *Phomopsis* sp isoladas das folhas de *Aspidosperma tomentosum* e pecíolos de *Spondias mombin* contra uma grande gama de bactérias e até fungos filamentosos e leveduras.

O fungo *Gliocladium* sp da planta *Eucryphia cordifolia* produziu uma mistura de compostos orgânicos, com capacidade de matar alguns fungos fitopatogênicos, mostrando um papel muito importante na agricultura (STINSON et al., 2003), também se mostrou muito eficaz contra alguns tipos de micoses em humanos (STROBEL, 2003).

#### 3.1.4 Endófitos Isolados de Plantas Medicinais

Em muitas espécies de plantas medicinais são encontrados microrganismos endofíticos. Um endófito produtor de taxol e outros metabólitos foram identificados no interior da planta *Taxus brevifolia*, utilizado para o tratamento do câncer (STIERLE et al., 1995). Um fungo endófito da planta *Taxus marei* do gênero *Tubercularia* coletada no sudeste chinês também apresentou a produção do taxol (WANG et al., 2000).

ZOU et al. (2000) isolaram um endófito da planta *Artemisia mongolica* (Fisch. Ex Bess.), identificado como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz e Sacc, que produziu uma substância com capacidade antimicrobiana denominado de ácido coletotrico. Da planta *Taxus wallichiana* foi constatada a produção de uma substância chamada de paclitaxel produzidas pelos fungos endofíticos *Sporormia minima* e *Trichothecium* sp (SHRESTHA et al., 2001).

Da planta *Spondias mombin* foram isolados microrganismos endofíticos, cujos

extratos apresentaram atividades contra alguns microrganismos patogênicos em humanos (RODRIGUES, HESSE, WERNER, 2000).

### 3.2 FUNGO *Guignardia* sp

O gênero *Guignardia* que segundo SIVANESAN (1984) foi descrito em 1982 por Viala e Ravaz, compreende as formas teleomorfas de espécies de *Phyllosticta* e de alguns outros gêneros relacionados de fungos imperfeitos. O gênero *Phyllosticta* com mais de 2000 espécies, foi empregado por VAN DER AA (1973) para fungos crescendo em folhas e formando no tecido hospedeiro, pequenos picnídios com conídios hialinos e unicelulares. A fase anamorfa do gênero *Guignardia* é freqüentemente isolado de folhas vivas em várias plantas e estudos ecológicos em grupos de endofíticos sugeriram que este fungo é dominante em plantas de ericáceos (OKANE; NAKAGIRI; ITO, 2001).

Dentro do gênero *Guignardia*, uma espécie estudada no Brasil é *G. citricarpa*, que segundo SIVANESAN (1984) é um ascomiceto, da ordem Dothideales e família Dothideacea. O fungo possui estroma plectenquimatoso, pseudotécio globoso a subgloboso, medindo de 125 a 360 µm no seu diâmetro, contendo um poro de 14 a 16 µm, as paredes são espessas com 20 a 22 µm. A estrutura do asco tem forma de clava, arredondado em sua extremidade superior, bitunicado, contendo oito ascósporos unicelulares, hialinos, com um aspecto ligeiramente acinzentado, rombóides, com grânulos e um grande vacúolo central, cobertos com um quepe gelatinoso nas extremidades 8-17 x 3,3-8 µm. Segundo SIVANESAN (1984), são encontrados pseudoparáfises em pseudotécios maduros. A colônia cresce lentamente, atingindo diâmetro de 7 cm em 20 dias, em vários meios de cultura, a 20°C, e o micélio escuro é submerso, formando uma crosta plectenquimatosa (GLIENKE-BLANCO et al., 2002).

De acordo com JOHNSTON e FULLERTON (1988), as duas formas de reprodução (anamorfa e teleomorfa) são encontradas associadas na planta. As estruturas de frutificação da forma imperfeita (*Phyllosticta citricarpa*) são representadas pelos picnídios, que macroscopicamente são globosos, pretos, pequenos e semi-eruptivos. Em corte vertical eles têm um diâmetro de 70 a 330 µm, com parede marrom escura, globosos e células pseudoparenquimatosas.

O interesse em fungos endofíticos como fonte de combinações de componentes

bioativos modernos está aumentando principalmente por causa da dificuldade de se achar novos componentes de direcionamento interessantes a partir de organismos extensivamente investigados (RODRIGUES-HEERKLOTZ et al., 2001). Espécies de *Guignardia* e/ou seus gêneros anamórficos *Phyllosticta* foram freqüentemente isolados como endófitos produtores de substâncias com alguma propriedade. O mais abundante, o phyllosinol contém uma porção de cetona alfa-beta não saturado com atividade antibacteriana (RODRIGUES-HEERKLOTZ et al., 2001).

No Brasil, o gênero *Guignardia* (*Phyllosticta*) já foi isolado como endófito de citros (GLIENKE-BLANCO et al., 2002), *Mangiferae indica* L, conhecida como manga (STRINGARI, 2004), *Ilex paraguarienses*, conhecida como erva-mate (PENNA, 2000), *Spondias mombin*, conhecido como cajazeiro (RODRIGUES-HEERKLOTZ et al., 2001) entre outros. Há uma grande dificuldade na identificação de espécies deste gênero principalmente utilizando-se apenas características morfológicas (STRINGARI, 2004).

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

A planta *M. ilicifolia* Mart. ex Reiss se engloba na classe Magnoliopsida, na ordem Celastrales e na família Celastraceae, em que compreende cerca de 50 gêneros e 800 espécies (CRONQUIST, 1981). É denominada popularmente de espinheira-santa (PR, RS), cancerosa, erva-santa, espinheira-divina, erva cancosa (RS) e cancorosa (PR) (CARVALHO-OKANO, 1992), espinho de Deus, limãozinho, maiteno, salva-vidas e também sombra de touro (BITTENCOURT, 2000).

*M. ilicifolia* se localiza predominantemente em florestas ambrófilas 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 e no 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 às propriedades terapêuticas a espinheira-santa é largamente utilizada na medicina popular o que está acarretando uma exploração sem limites (FLORES et al., 1998).

### 3.4 MARCADORES MOLECULARES RAPD

#### 3.4.1 RAPD

Um dos aspectos fundamentais da revolução causada pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi a possibilidade de se gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma. DNA em grande quantidade pode ser facilmente detectado a olho nu diretamente no gel de eletroforese através de corantes específicos de DNA, como por exemplo, brometo de etídeo. A construção de *primers* para a amplificação via PCR dependia do conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência de DNA de interesse. Para conhecer estas seqüências são necessários a clonagem e o sequenciamento da região. Em vista disso, com exceção de alguns genes de seqüência conhecida, a PCR apresentou, de início, um uso limitado como técnica para a obtenção de marcadores moleculares. O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar *primers* mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Esta reação de amplificação randômica para análise do

polimorfismo do DNA foi descrita primeiramente por WILLIAMS et al. (1990), e recebeu o nome de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).

A metodologia RAPD é basicamente uma variação do protocolo da PCR, com duas características distintas: 1º utiliza um *primer* único ao invés de um par de *primers*; 2º o *primer* único tem seqüência arbitrária, e portanto sua seqüência alvo é desconhecida (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). A reação é aquecida a 90-95°C, para desnaturação do DNA molde, sofre um resfriamento entre 36-42°C para permitir a hibridação dos oligonucleotídeos iniciadores aos sítios apropriados no DNA molde e um novo aquecimento de 70-75°C para que a Taq DNA polimerase sintetize novas fitas de DNA, completando-se assim o primeiro ciclo de amplificação (SAIKI et al., 1985; CRUZ; MILACH, 1998). Nos ciclos seguintes, os oligonucleotídeos irão se ligar nas fitas originais de DNA e também nas sintetizadas nos ciclos anteriores. Os produtos são separados por eletroforese e revelados com brometo de etídeo sob luz ultravioleta.

Marcadores RAPD são obtidos pela amplificação de locos cromossômicos, na reação de amplificação, onde os *primers* são submetidos a condições apropriadas de temperatura e se hibridizam com seqüências genômicas que lhe são complementares. Para que ocorra amplificação, há necessidade que existam no genoma dois sítios complementares ao *primer* localizados em direções opostas e distantes entre si (< 4000 pares de bases). Como a seqüência de cada iniciador é determinada de modo aleatório, este pode encontrar várias regiões complementares à sua seqüência e, por isso, revelar vários locos. Os fragmentos amplificados (*amplicons*), por sua vez, são separados em um gel de poliacrilamida ou agarose, e visualizados após coloração com nitrato de prata ou brometo de etídeo (LOPES et al, 2002).

A variação genética entre diferentes populações de um determinado organismo pode ser observada por meio da metodologia do RAPD, onde o padrão de amplificação pode ser utilizado para gerar um dendrograma que permite a análise desta variação genética (SUNDBERG; SLAUGHTER; CRUPPER, 2002). O RAPD pode ser usado para análise do DNA de vários microrganismos, e uma de suas principais vantagens é que o método não precisa do conhecimento prévio da bioquímica e da fisiologia do organismo estudado (McCLELLAND; WELSH, 1990).

Uma característica do RAPD, que difere dos marcadores isoenzimáticos, RFLPs e microssatélites (quando revelados por PCR), é sua dominância. Alelos de um mesmo loco são revelados pela presença ou ausência de uma banda que, por sua vez, resulta da

amplificação de um fragmento de determinado tamanho no gel, identificando-se variabilidade entre indivíduos e populações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). No entanto, não é possível saber se o loco amplificado está em homozigose ou heterozigose. Sendo assim, marcadores dominantes, ao contrário dos codominantes, não permitem a distinção entre genótipos homozigóticos e heterozigóticos os quais constituem apenas uma classe, isto é, a que apresenta o alelo amplificado. Os indivíduos nos quais os alelos não são amplificados constituem a outra classe, considerada homozigótica para ausência da banda, qualquer que seja o motivo pelo qual o fragmento não foi amplificado (LOPES et al., 2002). Em fungos haplóides, isto não representa um problema (GLIENKE, 1995).

Os RAPDs pertencem a uma classe de marcadores moleculares muito útil em taxonomia, genética de populações, tipagem molecular, mapeamento genético e obtenção de diagnóstico via PCR (BLANCO, 1999).

#### 3.4.2 NATUREZA DOS LOCOS RAPD

A natureza molecular do polimorfismo RAPD não é inteiramente conhecida. Entretanto, evidências experimentais indicam que diferenças de apenas um par de bases (mutações de ponto) são suficientes para causar a não complementaridade do *primer* com o sítio de iniciação (“*priming site*”) e assim impedir a amplificação de um segmento. Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções de sítios de iniciação adjacentes ou inserções que colocam dois sítios de iniciação adjacentes a uma distância acima daquela que a enzima Taq DNA polimerase é capaz de percorrer. Assim, o polimorfismo genético detectado pelos marcadores RAPD tem natureza binária, isto é, o segmento amplificado (banda no gel) está presente ou ausente. Dados experimentais de mapeamento genético em diversas espécies indicam que os locos de marcadores RAPD estão distribuídos ao acaso ao longo do genoma, sem evidências de agrupamento de marcadores em regiões específicas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

#### 3.4.3 RAPD EM MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

A técnica de RAPD é muito utilizada em estudos de variabilidade genética de vários organismos, também em fungos endofíticos (MANULIS et al., 1993; HOLMES;

ECKERT; PITT, 1994; LIEW; IRWIN, 1994; MEIJER; MEGNEGNEAU; LINDERS, 1994; NICHOLSON; REZANOON, 1994; RIBEIRO, 1995; LONGO, 1996; GUIMARÃES, 1998).

Por meio de RAPD foi encontrado uma alta variabilidade genética entre isolados de *Guignardia* sp, observando-se pelo menos duas espécies diferentes geneticamente, a *G mangiferae* (endofítica) e a outra *G citricarpa* (patogênica), esta última causadora da mancha preta em *Citrus* (GLIENKE-BLANCO et al., 2002). Em crucíferas o RAPD foi usado para diferenciar linhagens patogênicas e não patogênicas, por exemplo, *Leptosphaeria maculans* (GOODWIN; ANNIS, 1991) e de *Brassica napus* (SCHAFER; WOSTEMEYER, 1992).

Foram investigadas bactérias endofíticas de raízes de cana-de-açúcar. Estas linhagens bacterianas foram analisadas morfológicamente, bioquimicamente e molecularmente por RAPD. A diversidade por RAPD foi mais evidente do que a obtida por análise morfológica e bioquímica, mostrando a importância do uso do RAPD em microrganismos endofíticos (SUMAM et al., 2001).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

As linhagens utilizadas foram obtidas a partir de culturas monospóricas de *Guignardia* sp e *Phyllosticta* sp (Tabela 1) isoladas como endófitos de folhas da planta espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex reiss) e Confrei (*Symphitum* sp.L). Nos testes de atividade antagônica foram utilizados os microrganismos:

1. Bactérias -> *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Sthapylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA).
2. Fungos -> PC13 e 3C (*G. citricarpa*).

TABELA 1 - CÓDIGO DOS ISOLADOS, PLANTA HOSPEDEIRA E LOCAL DE ISOLAMENTO

Código da linhagem	Hospedeiro	Localidade
ESE1	<i>M. ilicifolia</i>	Embrapa, Colombo
ESE2	<i>M. ilicifolia</i>	Embrapa, Colombo
ESE4	<i>M. ilicifolia</i>	Embrapa, Colombo
ESE5	<i>M. ilicifolia</i>	Embrapa, Colombo
ESE6	<i>M. ilicifolia</i>	Embrapa, Colombo
ESE7	<i>M. ilicifolia</i>	Embrapa, Colombo
ESE8	<i>M. ilicifolia</i>	Embrapa, Colombo
ESE9	<i>M. ilicifolia</i>	Embrapa, Colombo
ESE10	<i>M. ilicifolia</i>	Embrapa, Colombo
ESE11	<i>M. ilicifolia</i>	Embrapa, Colombo
ESE12	<i>M. ilicifolia</i>	Embrapa, Colombo
FV12	<i>M. ilicifolia</i>	Embrapa, Colombo
FV20	<i>M. ilicifolia</i>	Embrapa, Colombo
FD21	<i>M. ilicifolia</i>	Embrapa, Colombo
FD62	<i>M. ilicifolia</i>	Embrapa, Colombo
FD63	<i>M. ilicifolia</i>	Embrapa, Colombo
FD64	<i>Symphitum</i> sp.L	UEPG

Os isolados FV12, FV20, FD21, FD62 e FD63 foram gentilmente cedidos pela

Prof<sup>a</sup>. Sônia Alvim Veiga Pillegi da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). O isolado FD64 foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

## 4.2 MEIOS DE CULTURA

### 4.2.1 Meio BDA (Meio Ágar-Batata-Dextrose)

Batata	200,0g
Dextrose	10,0g
Ágar	15,0g
Água destilada	p/1000ml

As batatas foram descascadas e em pequenos pedaços foram cozidas em meio litro de água destilada por uma hora. O caldo resultante, após filtração com gaze, foi completado com água destilada para 1000 ml. O pH foi ajustado para 5,8. Foi adicionado ágar e autoclavado a 1 atmosfera (atm) por 20 minutos.

### 4.2.2 Meio AA (Meio Ágar-Água)

Ágar	15,0g
Água	1000 ml

Foi ajustado o pH para 5,8 e autoclavado a 1 atm por 20 minutos.

### 4.2.3 Meio NA (Meio Ágar-Nutriente)

Peptona de gelatina	5,0g
Extrato de carne bovina	3,0g
Ágar	15,0g
Água destilada	p/1000ml

Foi ajustado o pH para 5,8 e autoclavado a 1 atm por 20 minutos.

#### 4.2.4 Meio MC (Meio Completo) (PONTECORVO et al., 1953)

NaNO <sub>3</sub>	6,0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5g
KCl	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5g
FeSO <sub>4</sub>	0,01g
ZnSO <sub>4</sub>	0,01g
Glicose	10,0g
Peptona	2,0g
Extrato de levedura	2,0g
Caseína hidrolisada	1,5g
Solução de vitaminas	1,0ml
Ágar	15,0g
Água	p/ 1000ml

Todos os compostos (exceto o ágar) foram dissolvidos sob agitação. Completou-se o volume para 1000ml. O pH foi ajustado para 5,8 com hidróxido de sódio 1N. Colocou-se o ágar e autoclavou-se.

#### 4.2.5 Meio MEA

Extrato de Malte	20g
Glicose	20g
Peptona	1g
Ágar	15g
Água destilada	p/1000ml

Autoclavar a 1 atm por 20 minutos.

### 4.3 SOLUÇÕES E REAGENTES

#### 4.3.1 Clorofane

Fenol	50%
Clorofórmio	50%

#### 4.3.2 Clorofil

Clorofórmio	240ml
Álcool Isoamílico	10ml

#### 4.3.3 dNTP

Os quatro desoxirribonucleotídeo (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) que foram utilizados vêm de uma mistura com concentração final de 20 mM. Para realizar as reações de amplificação, esta mistura foi diluída de modo a obter uma concentração de 2,5 mM para cada dNTP.

#### 4.3.4 Fenol Saturado

Foi obtido com fenol cristalizado dissolvido em banho-maria, e acrescentado um volume de tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,0. Após agitação de 30 minutos, a fase aquosa foi retirada e então acrescentado um volume de tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,0. Este processo foi repetido até atingir o pH desejado (pH: 8,0). Em seguida adicionou-se um volume final de 1/10 do tampão Tris-HCl 0,2 M pH 8,0 e estocou-se em frasco escuro a uma temperatura de 4°C.

#### 4.3.5 Gel de Agarose (0,8%)

Agarose	0,8g
Tampão TBE 1x	100ml

#### 4.3.6 Gel de Agarose (1,5%)

Agarose	1,5g
Tampão TBE 1x	100ml

#### 4.3.7 Solução de Brometo de Etídeo

Foi dissolvido 1% (p/v) de brometo de etídeo em água destilada para solução estoque (proteger contra a luz). Para o processo de revelação, foi diluído 3,0µl desta solução em 100 ml de tampão TBE 1x.

#### 4.3.8 Solução de EDTA 0,5M

EDTA	37,22g
Água	200ml

O pH foi ajustado para 8,0 com hidróxido de sódio.

#### 4.3.9 Tampão da Amostra (6x)

Azul de bromofenol	250 mg
Ficoll	15g
Água	100ml

#### 4.3.10 Tampão de Corrida TBE 10x

Trizma base	54g
Ácido bórico	27,5g
EDTA	4,65g
Água Milli-Q	p/ 500ml

A solução foi autoclavada e guardada à temperatura ambiente. No momento do uso, diluiu-se dez vezes com água Milli-Q.

#### 4.3.11 Solução Tampão de Extração de DNA

Tris-HCl pH 8,0	200mM
NaCl	250 mM
EDTA pH 8,0	25mM
SDS (p/v)	1%

Preparada apenas no momento do uso.

#### 4.3.12 Tampão Tris-EDTA (TE)

Tris-HCl pH 8,0	10mM
EDTA pH 8,0	1mM

#### 4.3.13 Solução de Vitaminas

Ácido nicotínico	100mg
Ácido p-aminobenzóico	10mg
Biotina	0,2mg
Piridoxina	50mg
Riboflavina	100mg
Tiamina	50mg
Água destilada esterilizada	p/ 100ml

A solução foi aquecida a 100°C em banho-maria por 15 minutos e guardada em frasco escuro a 4°C.

#### 4.3.14 RNase

A solução foi preparada em uma concentração de 10 mg/ml, em 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5) e 15 mM de NaCl. Aqueceu-se em 100°C por 15 minutos e foi estocado a -20°C.

#### 4.3.15 Lactofenol

Hidrato de cloral cristalizado	4 partes (em peso)
Acido láctico puro	1 parte (em peso)
Fenol	1 parte (em peso)

### 4.4 MÉTODOS

#### 4.4.1 Isolamento de *Guignardia* sp e *Phyllosticta* sp

Os isolamentos foram realizados entre março e julho de 2004. Os fungos isolados de espinheira-santa foram obtidos de acordo com a metodologia descrita em GLIENKE-BLANCO et al, (2002). O pecíolo das folhas foi tampado com parafina para que as soluções germicidas não atingissem a comunidade endofítica. Estas folhas foram tratadas com etanol 70% por um minuto, hipoclorito 3% por dez minutos e álcool 70 % por 30

segundos. No final deste procedimento as folhas foram deixadas em água destilada autoclavada por 20 minutos. Placas contendo meio BDA (item 4.2.1) foram utilizadas para receber alíquotas desta água para controle.

Fragmentos das folhas com o tamanho de 1 cm<sup>2</sup> foram transferidos (4 fragmentos de folhas por placa) em placa de petri (70 placas) contendo meio BDA (item 4.2.1) com tetraciclina (100 µg/mL) e incubados a 28° C. Estas placas foram observadas diariamente para detectar o crescimento dos endófitos em estudo.

#### 4.4.2 Estoque de *Guignardia* sp e *Phyllosticta* sp

Folhas de espinheira-santa foram autoclavadas com água destilada à 1 atm por 20 minutos, em seguida cortadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> e colocados em placas de petri contendo meio Ágar-Água (item 4.2.2), 5 por placa. Foram repicados fragmentos do micélio fúngico próximos aos pedaços de folha de espinheira-santa, que cresceram em direção à folha e esporularam sobre ela. Após 30 dias sob uma temperatura de 28°C foi verificado o seu crescimento e os fragmentos foliares cobertos de esporos foram colocados em pequenos frascos (tipo *eppendorf*) com sílica previamente autoclavados e estocados à uma temperatura de 4°C (BLANCO, 1999).

#### 4.4.3 Identificação Morfológica de Isolados endofíticos

A caracterização morfológica dos 17 isolados endofíticos se baseou na macromorfologia (estrutura da colônia) e micromorfologia (estruturas de reprodução) apresentadas no item 3.2.

Utilizando-se quatro diferentes meios de cultura, meio BDA (item 4.2.1), meio MC (item 4.2.4), meio AA (item 4.2.2) e meio MEA (item 4.2.5), as observações macroscópicas foram realizadas após 16 dias de incubação a 28°C.

Observações microscópicas foram realizadas para a visualização e medição de estruturas de reprodução como conídios, microconídios e ascósporos. Foram feitas lâminas utilizando lactofenol de Aman dos isolados provenientes dos quatro meios de cultura do vigésimo ao trigésimo sexto dia de crescimento à 28°C.

#### 4.4.4 Atividade Antimicrobiana dos Isolados endofíticos

Para o teste de produção de substâncias antimicrobianas, utilizou-se 12 isolados endofíticos (ESE4, ESE5, ESE8, ESE9, ESE10, ESE11, ESE12, FV12, FV20 e FD21, FD63 e FD64). O método utilizado foi descrito por MARIANO et al (1993). Após 21 dias de crescimento em BDA (item 4.2.1) foram obtidos inóculos dos isolados com o auxílio de um furador de disco (0,6 mm de diâmetro) e estes foram colocados no centro de placas de petri contendo meio ágar nutriente (item 4.2.3).

As bactérias patogênicas testadas foram repicadas em caldo nutriente e incubadas durante 24 horas a 37°C. 100 µl desta cultura líquida foram transferidos para tubos contendo ágar fundido e a mistura foi inoculada em placas de petri com agar nutriente (item 4.2.3) onde se localizam as linhagens endofíticas. As placas foram incubadas durante, no mínimo, 48 horas, em temperatura de 37°C, para propiciar o crescimento bacteriano. O surgimento de halo em volta do microrganismo endofítico é indicativo positivo para produção de substâncias antimicrobianas. O experimento foi realizado em 3 repetições.

Para avaliar a capacidade antagônica contra fungos testados, inóculos dos isolados endofíticos e dos testados foram obtidos com o auxílio do furador de disco, após 21 dias de crescimento, e colocados em placas de petri com meio BDA (item 4.2.1) em extremidades opostas da placa. As placas foram incubadas a 28°C por 7 dias a fim de observar a formação da inibição do crescimento.

#### 4.4.5 Análise da Variabilidade Genética de Isolados endofíticos por Marcadores Moleculares RAPD

##### 4.4.5.1 Extração de DNA

DNA dos isolados de *Guignardia* sp e *Phyllosticta* sp foram obtidos utilizando o protocolo de RAEDER e BRODA (1985), modificado por GLIENKE-BLANCO et al. (2002). O fungo foi crescido em meio completo (item 4.2.4) sólido por sete dias a 28°C e foi liofilizado por 48hs. O micélio foi coletado e triturado com adição de nitrogênio líquido, e a cada grama de micélio foram acrescentados 4 mL de tampão de extração (item

4.3.11). Após agitação incubou-se por 15 minutos a 70°C. Um volume de fenol saturado (item 4.3.4) foi acrescentado e após misturar suavemente as fases, procedeu-se a centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos. Foi coletada a fase aquosa à qual foi acrescentado um volume de clorofane (item 4.3.1) e a solução novamente centrifugada. Após coletar a fase aquosa, foi adicionado a este um volume de clorofil (item 4.3.2) misturou-se as fases e centrifugou-se da mesma forma. À fase aquosa foram adicionados vagorosamente dois volumes de etanol P.A. resfriado a -20°C, permanecendo nesta temperatura por uma hora, promovendo assim a precipitação do DNA. Após este período, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante desprezado e os tubos invertidos para a secagem do “pellet”. Após a secagem, o DNA foi ressuspenso cuidadosamente em 200 µL de tampão T.E. (item 4.3.12). O DNA foi tratado com RNase (4.3.14) 50 µg/mL e incubado em banho-maria a 37°C por uma hora. O tratamento com clorofil (item 4.3.2) foi repetido e também foi realizada a precipitação com etanol e a ressuspenso em 200 µL de tampão T.E. (item 4.3.12). O DNA foi quantificado e verificado sua integridade em eletroforese em gel de agarose 0,8% (item 4.3.5).

#### 4.4.5.2 RAPD

Ajustou-se a reação de amplificação, testando as concentrações de DNA, MgCl<sub>2</sub>, os ciclos de amplificação e a seleção de oligonucleotídeos (*primers*). Os *primers* utilizados para esta análise foram: OPX01, OPX03, OPX07, OPX08, OPX09, OPX12, OPX19, OPQ04 e OPZ19.

Cada reação foi constituída de 40 ciclos após desnaturação inicial a 95°C durante 4 minutos. Cada ciclo consistiu de 1 minuto a 92°C, 1 minuto e 30 segundos a 37°C e 2 minutos a 72°C. Ao final dos ciclos realizou-se uma extensão final de 3 minutos a 72°C. Para a análise do polimorfismo, os produtos de amplificação foram separados por eletroforese (3 V/cm) em gel de agarose 1,5% e corados por 15 minutos com solução de brometo de etídeo. Para a marcação do peso molecular utilizou-se o DNA *ladder* de 100 pares de bases (pb) e o DNA de  $\lambda$  /Hind III. Os fragmentos resultantes foram observados em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados. A similaridade genética foi calculada com base em variáveis binárias utilizando o coeficiente de similaridade Jaccard (0 para ausência e 1 para presença de banda), segundo a fórmula  $J=M/P$ , onde M é o número de concordâncias positivas, e o P é o número

total de variáveis menos o número de concordâncias negativas. As unidades foram agrupadas por meio do método UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average”) que é um modelo de agrupamento hierárquico que permite a construção de dendrogramas (SNEATH; SOKAL, 1973). As matrizes, dendrogramas e a análise de componentes principais foram elaborados com auxílio do programa computacional NTSYS-PC (ROHLF, 1998). Foram utilizadas linhagens de espécies conhecidas como controle (*G. citricarpa*, *G. mangiferae* e *P. spinarum*).

O *bootstrap* foi calculado utilizando o programa BOOD (COELHO; 2005) com 10.000 reamostragens, a fim de verificar a confiabilidade dos agrupamentos. A análise de variância dos marcadores RAPD foi realizada utilizando o *software Arlequin* (SCHNEIDER; ROESSLI; EXCOFFIER, 2000).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO

Nos cinco isolamentos realizados obteve-se um total de 11 linhagens endofíticas dos fungos *Guignardia* sp e *Phyllosticta* sp (Tabela 2). A frequência geral de isolamento destes fungos por fragmento foliar plaqueado foi de 0,88%. Este valor apresentou-se semelhante aos valores encontrados por PILLEGI (2004) que foi de 0,67% na mesma planta hospedeira. Foi observado que nove (81,82%) isolados foram obtidos no segundo isolamento. As diferentes frequências observadas ao longo das 5 coletas (Tabela 2) podem ser causadas por época do ano da coleta, condições climáticas e condições do solo, apesar de todas as folhas coletadas pertencerem ao mesmo pomar.

TABELA 2 - NÚMERO E FREQUÊNCIA DE ISOLADOS DE *Guignardia* spp OBTIDOS NOS CINCO ISOLAMENTOS

Nº de coleta	Nº de fragmentos plaqueados	Nº de frequência de <i>Guignardia</i> spp
I	250	0
II	250	9 (3,6%)
III	250	1 (0,4%)
IV	250	1 (0,4%)
V	250	0
TOTAL	1250	11 (0,88%)

As frequências de isolamento de *Guignardia* encontradas em espinheira-santa foram mais baixas do que encontradas em manga (STINGARI, 2004) e citros (GLENKE, 1995). Tal diferença deve-se provavelmente também a variações na relação hospedeiro - endófito. Isto pode sugerir que tais plantas de *M. ilicifolia*, apresentem propriedades nutricionais e fisiológicas que não favorecem o desenvolvimento deste microrganismo endofítico em seu interior.

Por outro lado, observou-se que muitos fungos endofíticos cresceram no meio de cultura mais rapidamente do que os fungos dos gêneros *Guignardia* e *Phyllosticta*, o que muitas vezes dificultou o isolamento e pode ter diminuído a frequência obtida. Outros

meios de cultura também poderiam ter sido utilizados.

## 5.2 ANÁLISE DA VARIABILIDADE MORFOLÓGICA

Os 11 isolados das linhagens ESE obtidos neste trabalho e mais os isolados FV12, FV20 e FD62 apresentaram crescimento reduzido mesmo após 16 dias de crescimento nos 4 meios de cultura utilizados. Na figura 1 observa-se o isolado ESE8, sendo que os outros isolados ESE apresentaram morfologia semelhante. Observou-se que no meio MC (item 4.2.4) a coloração sofreu modificação (isenta de pigmento) enquanto que a menor taxa de crescimento foi verificada no meio Agar-Água (item 4.2.2), justificado devido as características do meio extremamente pobre em nutrientes.

Por outro lado, a taxa de crescimento dos isolados FD63 e FD64 foi muito superior aos demais analisados, sendo que em 16 dias as colônias atingiram a borda da placa de petri (figuras 2 e 3). Observou-se também grande variação na morfologia destes isolados, nos diferentes meios utilizados.

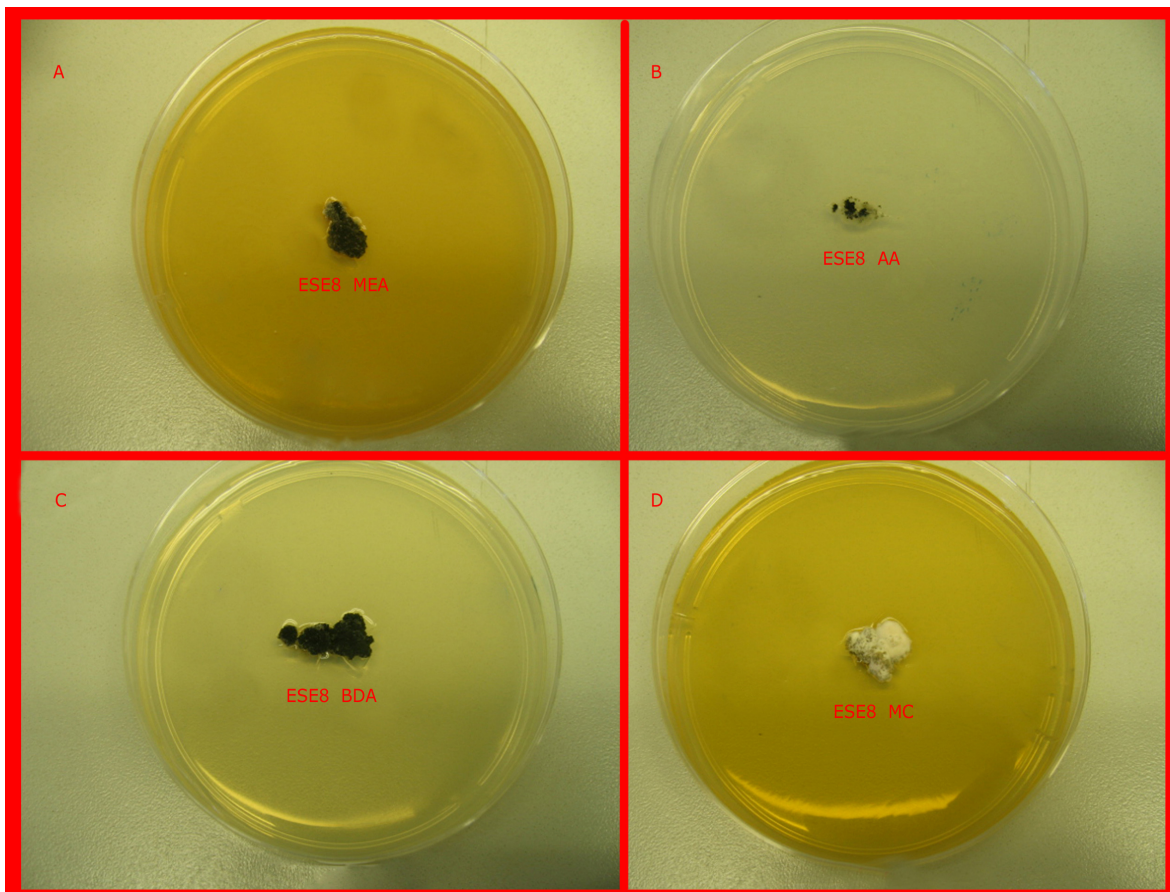
O isolado FD63 apresentou morfologia semelhante ao isolado FD64 endófito de *Symphytum* sp.L, ao contrário dos demais isolados de *M. ilicifolia*. Isto foi especialmente verdadeiro nos meios MEA (item 4.2.5) e AA (item 4.2.2). Diferenças maiores foram observadas nos meios MC (4.2.4) e BDA (item 4.2.1), este principalmente. As diferenças nas taxas de crescimento observadas para os isolados provavelmente refletem diferenças genéticas quanto às necessidades nutricionais de cada um.

O isolado FD64 isolado de *Symphytum* sp.L, apresentou formação de setores, como pode ser visto na figura 3. Tais setores refletem a instabilidade apresentada por tais linhagens endofíticas mantidas em meio de cultura. Indo de encontro com o observado para este gênero por GLIENKE (1995), STRINGARI (2004), KAVA-CORDEIRO (2004) e POSSIEDE (2004).

Observações microscópicas revelaram a presença de estruturas de reprodução assexuada na maioria dos isolados como conídios e espermácios (tabela 3). Espermácios estiveram presentes nas linhagens ESE1 ESE2, ESE5, ESE7, ESE9, ESE10, ESE12, FV20, FD21 e FD62. As figuras 4 e 5 ilustram a morfologia das estruturas de reprodução encontradas nestes isolados. O tamanho e a forma das estruturas de reprodução encontradas nos isolados (tabelas 3 e 4) sugerem que estes pertencem ao gênero *Phyllosticta*. Por outro lado, a presença de ascos e ascósporos só foi visualizada nos isolados FD63 e FD64 (Tabela 3, Figuras

5 e 6). Assim, sugere-se que tais isolados pertencem ao gênero *Guignardia*.

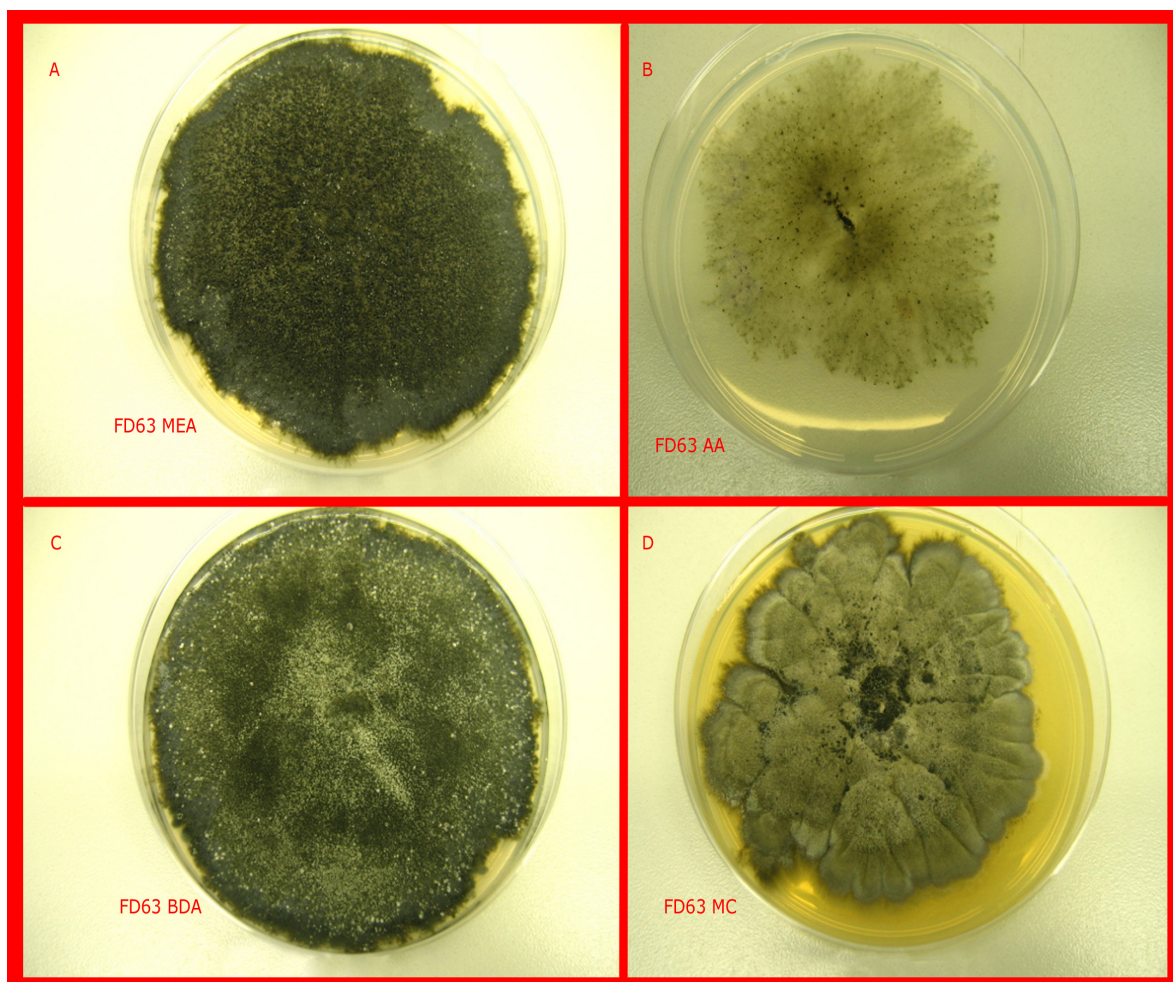
FIGURA 1 - MACROMORFOLOGIA DO ISOLADO ESE8 DE *Phyllosticta* sp APÓS 16 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C



Legenda: A= meio MEA; B= meio Agar-Água; C= meio BDA; D= meio Completo.

FONTE: o autor.

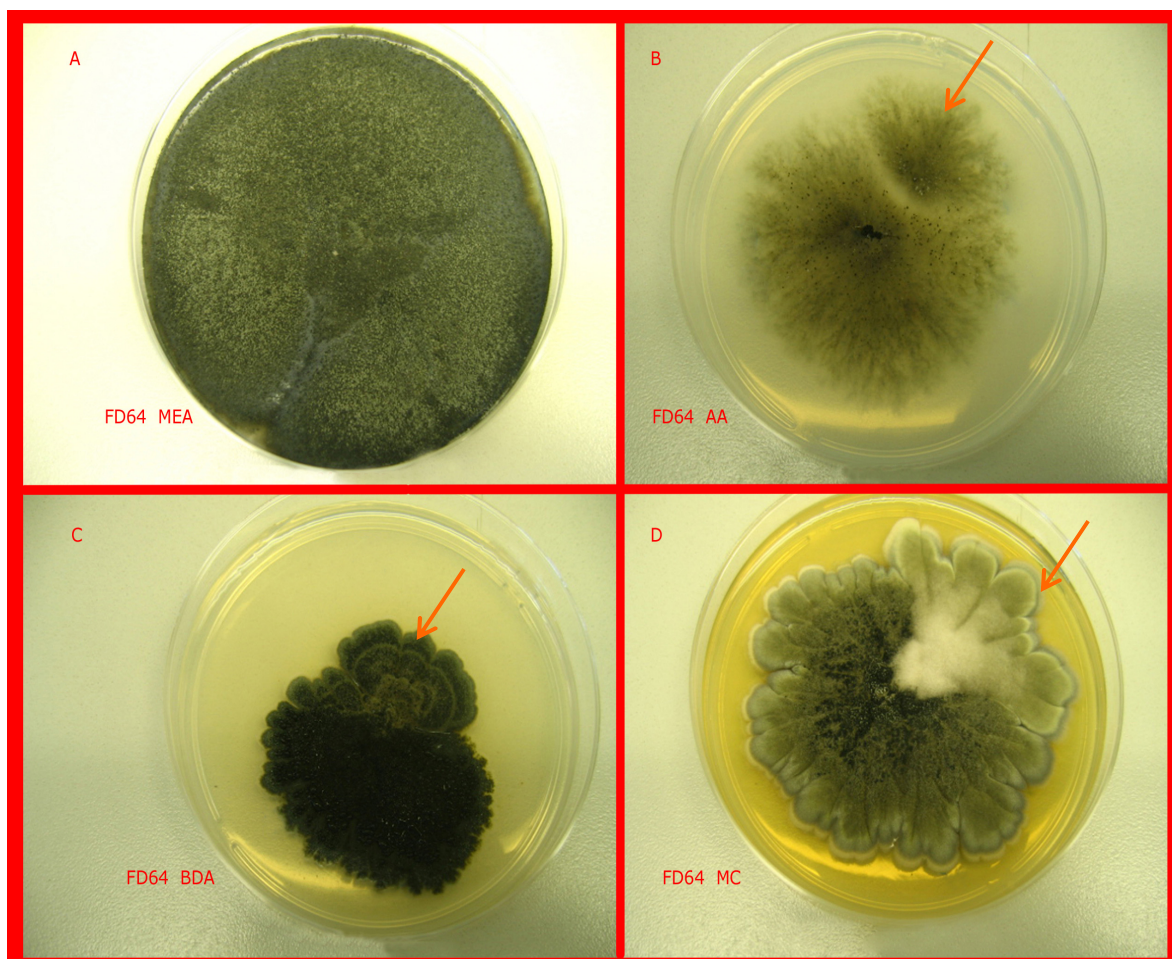
FIGURA 2 - MACROMORFOLOGIA DO ISOLADO FD63 DE *G. mangiferae* APÓS 16 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C



Legenda: A= meio MEA; B= meio Agar-Água; C= meio BDA; D= meio Completo.

FONTE: o autor.

FIGURA 3 - MACROMORFOLOGIA DO ISOLADO FD64 DE *G. mangiferae* APÓS 16 DIAS DE CRESCIMENTO A 28°C



Legenda: A= meio MEA; B= meio Agar-Água; C= meio BDA; D= meio Completo. As setas indicam setores de crescimento.

FONTE: o autor.

TABELA 3 - ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO PRESENTES NOS ISOLADOS DE *Guignardia mangiferae* e *Phyllosticta* sp E DIMENSÕES OBTIDAS

Isolado	Asco	Ascósporo	Conídio	Espermácio
ESE1	-	-	-	8µm/2µm
ESE2	-	-	11,5µm/6,3µm	8µm/2µm
ESE4	-	-	-	+
ESE5	-	-	10,5µm/6,9µm	7,9µm/2µm
ESE6	-	-	-	-
ESE7	-	-	-	7,78µm/2µm
ESE8	-	-	-	-
ESE9	-	-	-	+
ESE10	-	-	+	8µm/2µm
ESE11	-	-	-	++
ESE12	-	-	+	7,3µm/2µm
FV12	-	-	-	-
FV20	-	-	-	+
FD21	-	-	-	7,2µm/2µm
FD62	-	-	-	7,9µm/2µm
FD63	+	8µm/6,7µm	9,16µm/6,91µm	-
FD64	+	+	9,4µm/6,7µm	-

Legenda: + = presença de estrutura.

- = ausência de estrutura.

TABELA 4 - DIMENSÕES MÉDIAS OBSERVADAS NAS ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO DE *G. mangiferae* e *Phyllosticta* sp E VALORES OBSERVADOS NA LITERATURA

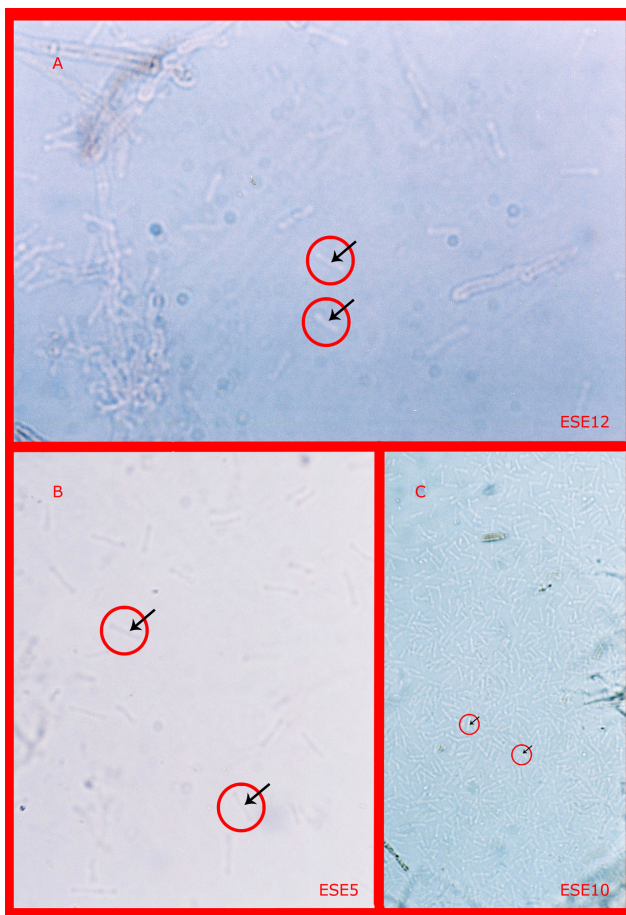
ESTRUTURA	OBSERVADO	LITERATURA
CONÍDIOS	10,14µm/6,7µm	10-20µm/5-10µm (1)
ESPERMÁCIOS	7,76µm/2µm	5,0-8,0µm/0,5-1,0µm (2)
ASCÓSPOROS	8,0µm/6,7µm	8,0-17,5µm/3,3-8,0µm (3)

Legenda: 1 = AA e VANEV, 2002.

2 = AA, 1973.

3 = SIVANESAN, 1984.

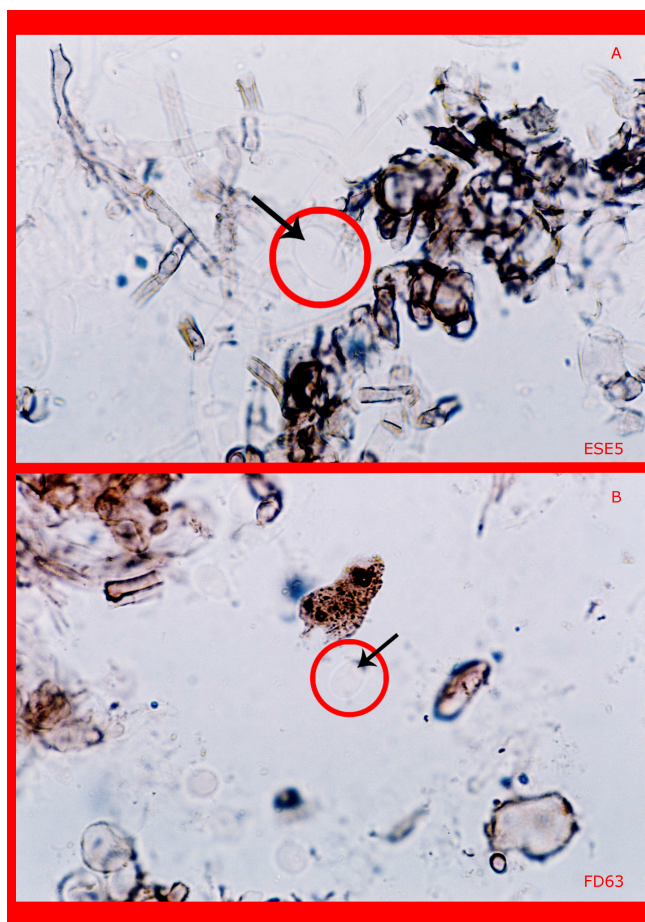
FIGURA 4 - FOTOMICROGRAFIA DE ESTRUTURAS DE REPRODUÇÃO DOS ISOLADOS ESE12, ESE5 E ESE10 DE *Phyllosticta* sp APÓS 35 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO DE CULTURA MEA A 25°C



Legenda: A -> isolado ESE12 em aumento de 1000x; B -> isolado ESE5 em aumento de 1000x; C -> isolado ESE10 em aumento de 400x. Coloração de lactofenol de Aman. Setas indicam espermácios.

FONTE: o autor.

FIGURA 5 - FOTOMICROGRAFIA DOS ISOLADOS ESE5 de *Phyllosticta* sp E FD63 de *G. mangiferae* APÓS 35 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO DE CULTURA MEA A 25°C



Legenda: A -> Linhagem ESE5 em aumento de 1000x; B -> linhagem FD63 em aumento de 1000x. Coloração de lactofenol de Aman. Setas indicam conídios.

FONTE: o autor.

FIGURA 6 – FOTOMICROGRAFIA DOS ASCOS DO ISOLADO FD63 DE *G. mangiferae* APÓS 35 DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO DE CULTURA MEA A 25°C



Legenda: A -> aumento de 400x; B -> aumento de 1000x. Coloração de lactofenol de Aman. Setas indicam ascos com ascósporos.

FONTE: o autor.

### 5.3 ANÁLISE POR MARCADORES RAPD

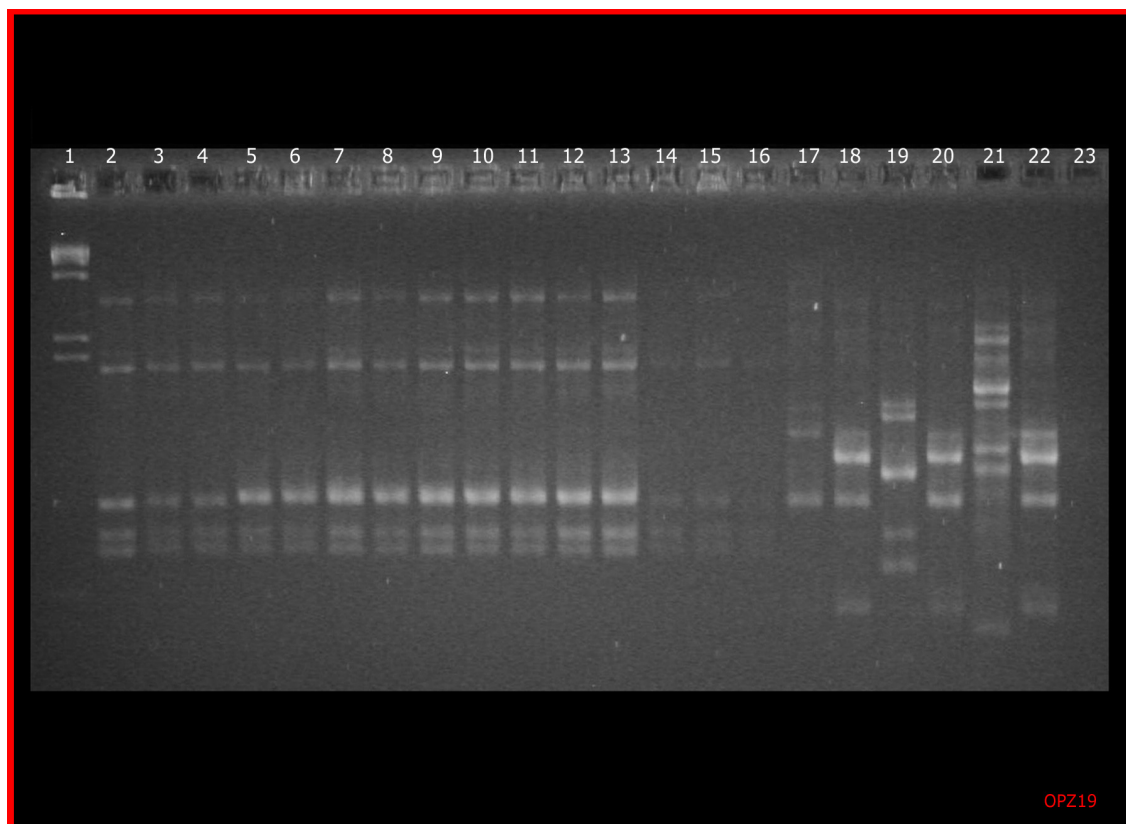
Utilizando nove *primers* obteve-se um total de 126 bandas polimórficas (figuras 7 a 12). A análise dos marcadores RAPD permitiu a confecção de um dendrograma separando os isolados estudados em dois grupos (figura 13). No primeiro grupo, com *bootstrap* de 100% estão os isolados de *Phyllosticta* sp, ESE1 a 12, o FV12, FV20, FD62 e FD21, todos obtidos como endófitos de espinheira-santa.

O segundo grupo (com *bootstrap* de 100%) reuniu os isolados FD63, FD64 e as linhagens referências N22 e 196 (ambas *G. mangiferae*).

Os dois grupos apresentaram baixa similaridade genética entre si (20%). As linhagens referências PR6 (*Phyllosticta spinarum*) e 19.02 (*Guignardia citricarpa*) apresentaram valores de similaridade ainda menores com os demais isolados (figura 13). Os isolados do grupo 1 apenas apresentaram estruturas de reprodução assexuada e mostraram-se diferentes morfológicamente dos isolados FD63 e FD64. Em função do agrupamento formado e as características morfológicas, pode-se sugerir que tais isolados pertençam ao gênero *Phyllosticta*, porém não é possível determinar a espécie.

O fato de os isolados FD63 e FD64 apresentarem ascos semelhantes aos de *G. mangiferae* e agruparem por RAPD com as linhagens referências de *G. mangiferae*, sugere-se que pertençam a esta espécie. Pode-se notar que os dados moleculares corroboraram com os dados morfológicos em relação a aspectos macroscópicos e microscópicos.

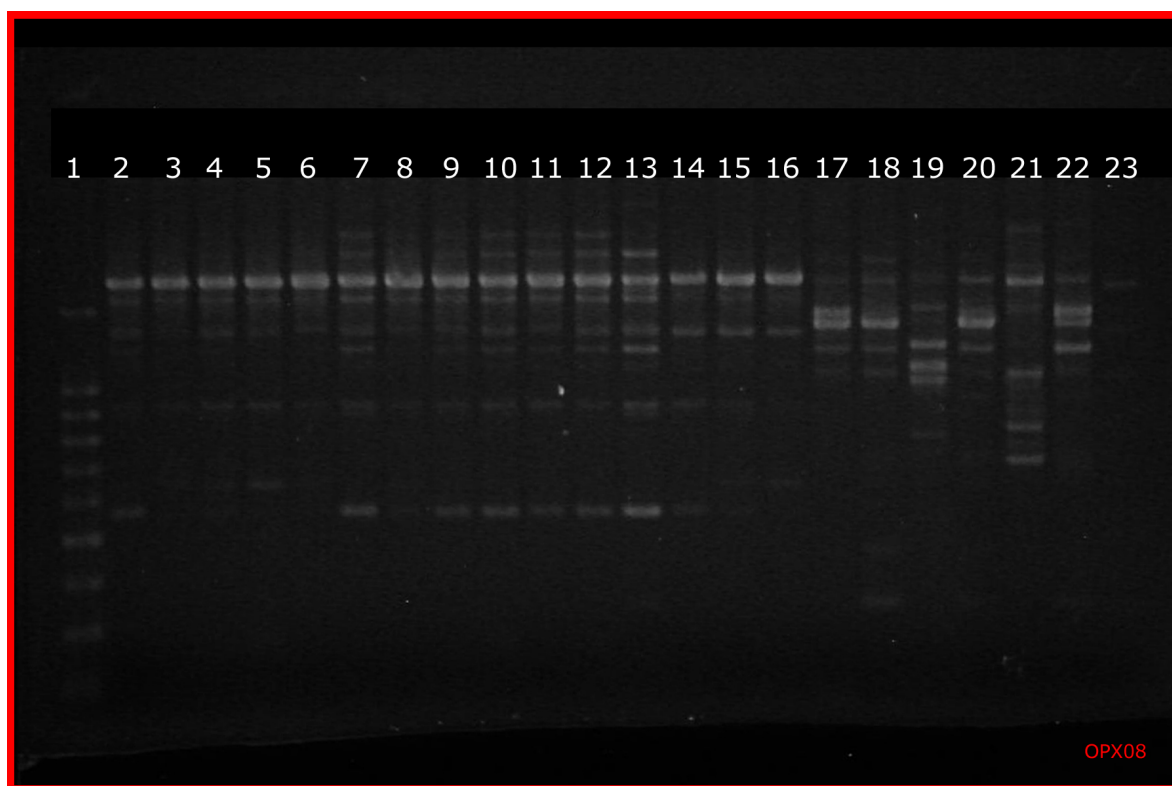
FIGURA 7 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD DOS ISOLADOS DE *G. mangiferae* E *Phyllosticta* sp UTILIZANDO-SE O PRIMER OPZ19



Legenda: 1: Marcador de Peso Molecular,  $\lambda$ HindIII; 2 a 18: ESE1, ESE2, ESE4, ESE5, ESE6, ESE7, ESE8, ESE9, ESE10, ESE11, ESE12, FV12, FV20, FD21, FD62, FD63, FD64; 19: *P. spinarum* (PR6); 20: *G. mangiferae* (N22); 21: *G. citricarpa* (19/02); 22: *G. mangiferae* (196); 23: Branco (controle sem DNA).

FONTE: o autor.

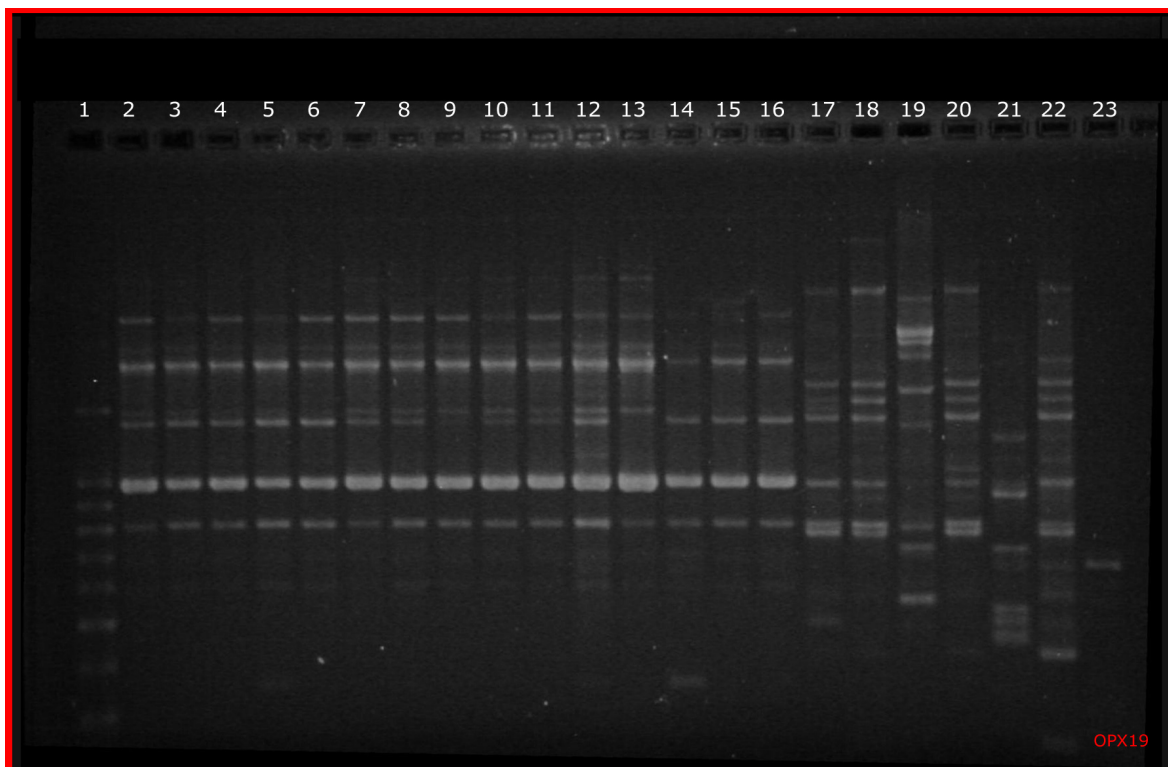
FIGURA 8 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD DOS ISOLADOS DE *G. mangiferae* E *Phyllosticta* sp UTILIZANDO-SE O PRIMER OPX08



Legenda: 2: Marcador de Peso Molecular, *laedder*; 2 a 18: ESE1, ESE2, ESE4, ESE5, ESE6, ESE7, ESE8, ESE9, ESE10, ESE11, ESE12, FV12, FV20, FD21, FD62, FD63, FD64; 19: *P. spinarum* (PR6); 20: *G. mangiferae* (N22); 21: *G. citricarpa* (19/02); 22: *G. mangiferae* (196); 23: Branco (controle sem DNA).

FONTE: o autor.

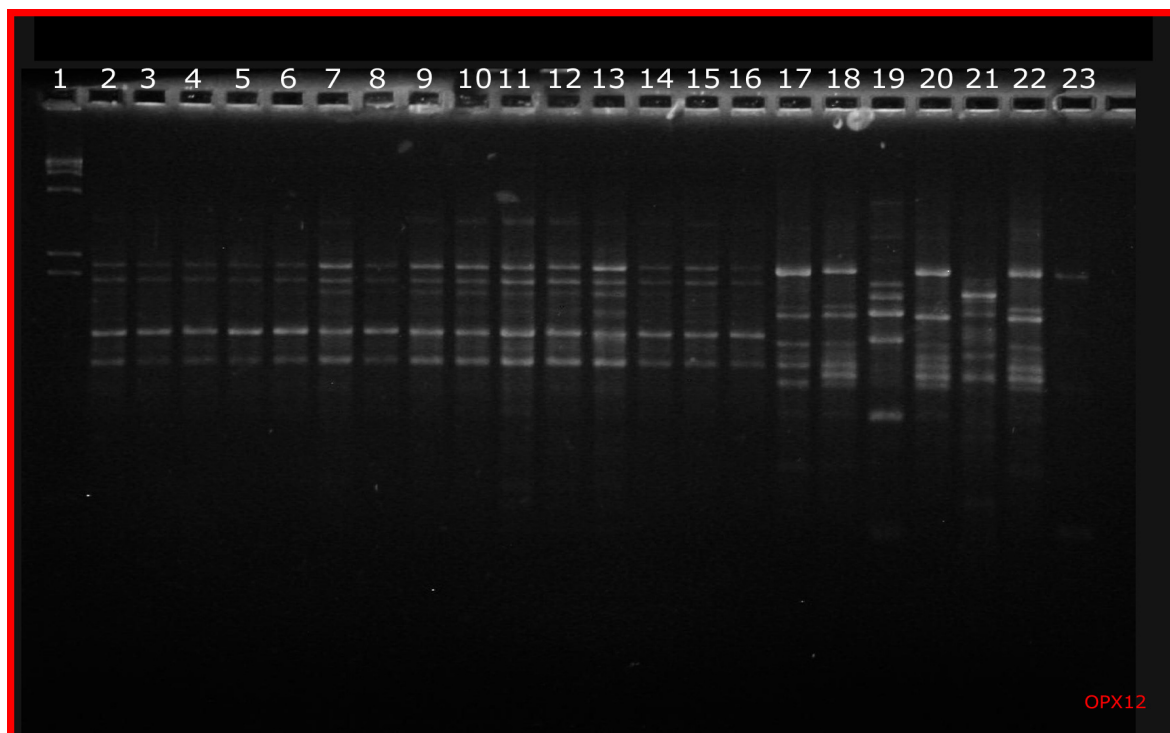
FIGURA 9 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD DOS ISOLADOS DE *G. mangiferae* E *Phyllosticta* sp UTILIZANDO-SE O PRIMER OPX19



Legenda: 3: Marcador de Peso Molecular, *laedder*; 2 a 18: ESE1, ESE2, ESE4, ESE5, ESE6, ESE7, ESE8, ESE9, ESE10, ESE11, ESE12, FV12, FV20, FD21, FD62, FD63, FD64; 19: *P. spinarum* (PR6); 20: *G. mangiferae* (N22); 21: *G. citricarpa* (19/02); 22: *G. mangiferae* (196); 23: Branco (controle sem DNA).

FONTE: o autor.

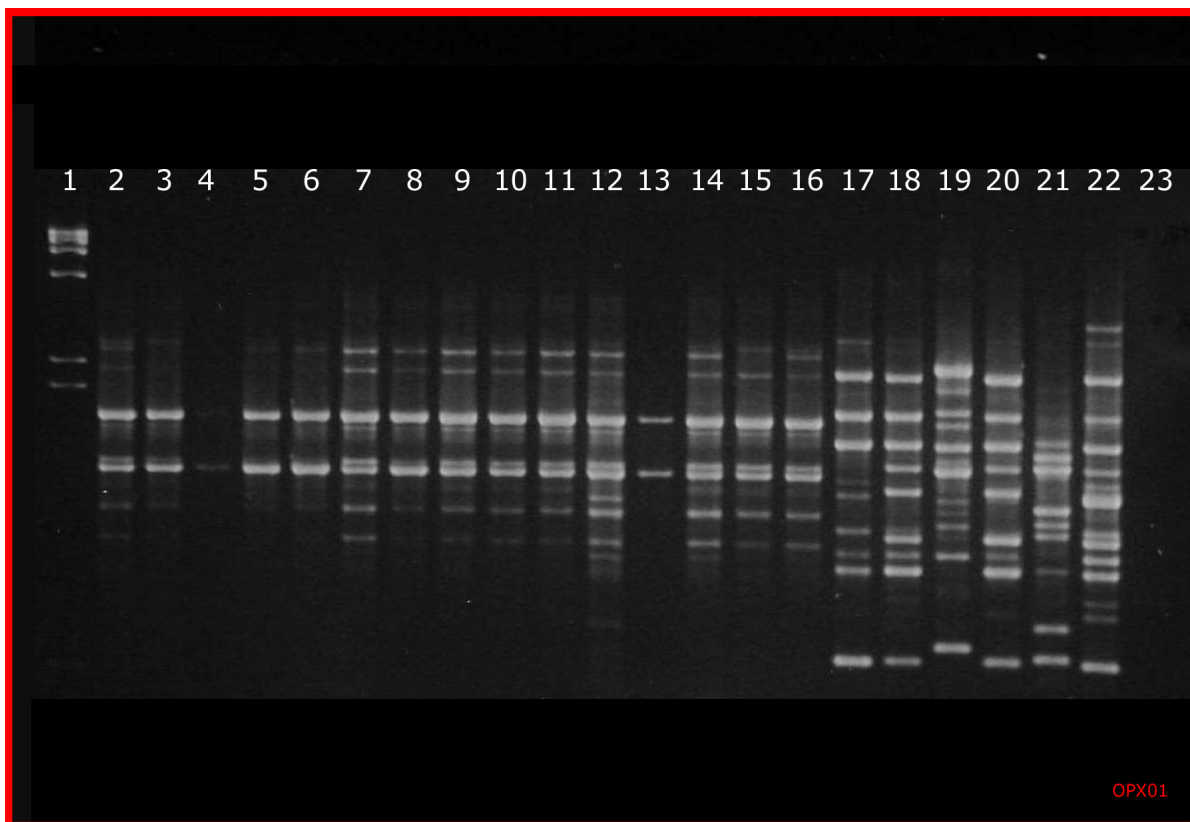
FIGURA 10 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD DOS ISOLADOS DE *G. mangiferae* E *Phyllosticta* sp UTILIZANDO-SE O PRIMER OPX12



Legenda: 4: Marcador de Peso Molecular,  $\lambda$ HindIII; 2 a 18: ESE1, ESE2, ESE4, ESE5, ESE6, ESE7, ESE8, ESE9, ESE10, ESE11, ESE12, FV12, FV20, FD21, FD62, FD63, FD64; 19: *P. spinarum* (PR6); 20: *G. mangiferae* (N22); 21: *G. citricarpa* (19/02); 22: *G. mangiferae* (196); 23: Branco (controle sem DNA).

FONTE: o autor.

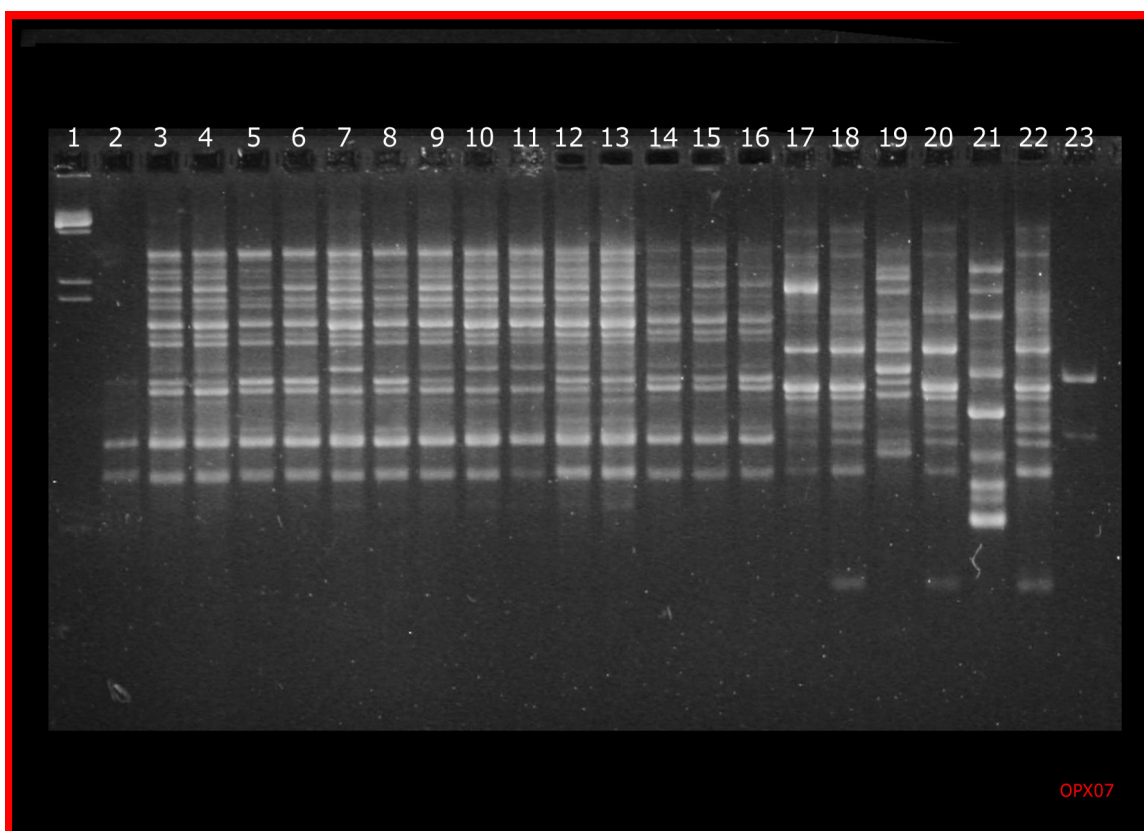
FIGURA 11 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD DOS ISOLADOS DE *G. mangiferae* E *Phyllosticta* sp UTILIZANDO-SE O PRIMER OPX01



Legenda: 5: Marcador de Peso Molecular,  $\lambda$ HindIII; 2 a 18: ESE1, ESE2, ESE4, ESE5, ESE6, ESE7, ESE8, ESE9, ESE10, ESE11, ESE12, FV12, FV20, FD21, FD62, FD63, FD64; 19: *P. spinarum* (PR6); 20: *G. mangiferae* (N22); 21: *G. citricarpa* (19/02); 22: *G. mangiferae* (196); 23: Branco (controle sem DNA).

FONTE: o autor.

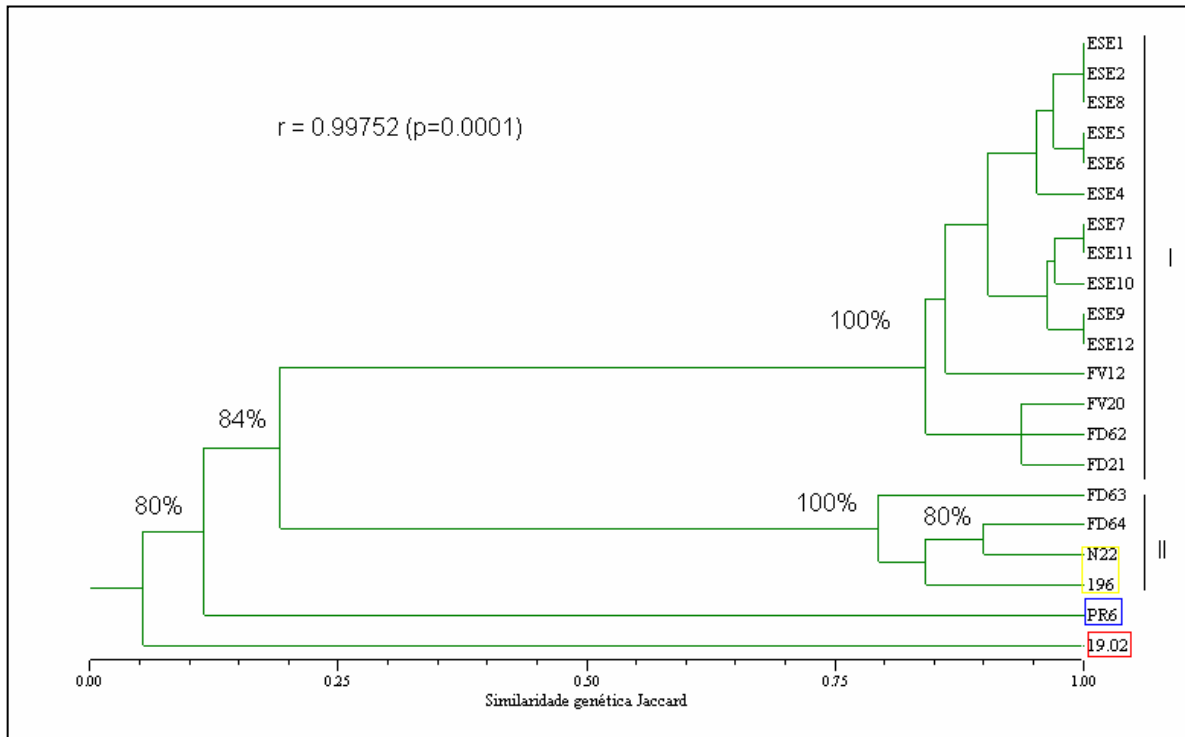
FIGURA 12 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD DOS ISOLADOS DE *G. mangiferae* E *Phyllosticta* sp UTILIZANDO-SE O PRIMER OPX07



Legenda: 6: Marcador de Peso Molecular,  $\lambda$ HindIII; 2 a 18: ESE1, ESE2, ESE4, ESE5, ESE6, ESE7, ESE8, ESE9, ESE10, ESE11, ESE12, FV12, FV20, FD21, FD62, FD63, FD64; 19: *P. spinarum* (PR6); 20: *G. mangiferae* (N22); 21: *G. citricarpa* (19/02); 22: *G. mangiferae* (196); 23: Branco (controle sem DNA).

FONTE: o autor.

FIGURA 13 - DENDROGRAMA OBTIDO A PARTIR DOS VALORES DE SIMILARIDADE GENÉTICA POR RAPD UTILIZANDO O COEFICIENTE DE JACCARD E O MÉTODO UPGMA

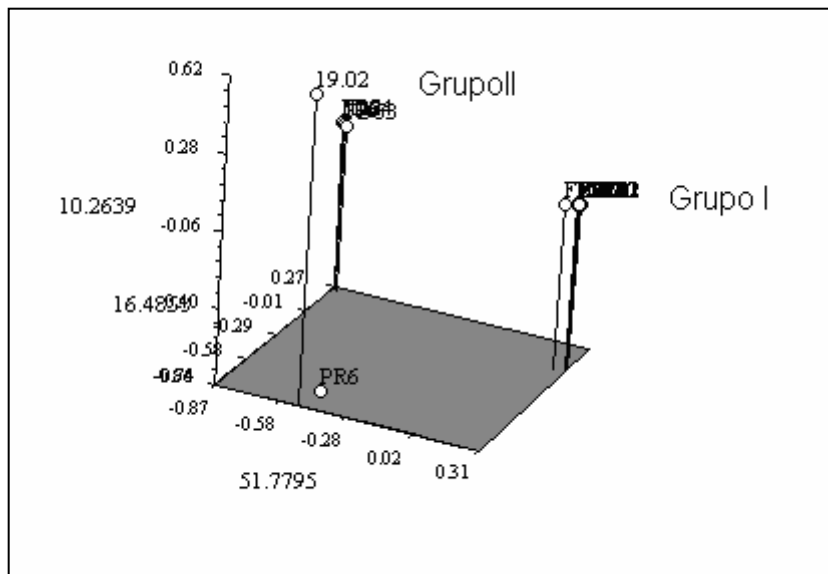


Legenda:  $r$  = coeficiente de correlação entre matriz de similaridade e matriz cofenética pelo teste de Mantel. Os valores de bootstrap estão representadores em porcentagens. Somente os valores superiores a 70% foram considerados. Linhagens referências utilizadas: *G. mangiferae* (*P. capitalensis*), *P. spinarum*, *G. citricarpa* (*P. citricarpa*).

FONTE: o autor.

Na figura 14, entretanto, o grupo I apresenta-se mais distante do grupo II do que as linhagens PR6 e 19.02. Tais dados diferem dos dados apresentados no dendrograma (figura 13) com relação à posição do grupo I. No dendrograma (figura 13) o grupo II que contém os isolados de *G. mangiferae* (FD63 e FD64), está mais próximo do grupo I do que da linhagem de *P. spinarum* (PR6) e de *G. citricarpa* (19.02). Por outro lado, a figura 14 revela uma dissimilaridade genética maior dos isolados de *Phyllosticta* sp (ESE1 a 12, FV12, FV20, FD21 e FD62) das demais espécies de *Phyllosticta* e *Guignardia* presentes neste estudo.

FIGURA 14 - REPRESENTAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS A PARTIR DA MATRIZ DE SIMILARIDADE DE JACCARD COM DADOS DE RAPD



Legenda: Grupo I e Grupo II contêm os isolados representados na figura 13.

FONTE: o autor

A análise de variância dos marcadores moleculares (tabelas 5 e 6) corrobora a divisão dos isolados endofíticos em dois grupos, como o sugerido nas figuras 13 e 14. Entretanto, novamente os isolados do grupo I parecem estar mais distantes dos demais isolados do grupo II do que dos isolados do grupo externo. Como todos os isolados utilizados nestas análises pertencem aos gêneros *Guignardia* e *Phyllosticta*, não é possível afirmar com certeza a classificação dos isolados do grupo I, apesar dos dados morfológicos sugerirem pertencer ao gênero *Phyllosticta*. O sequenciamento das regiões ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de isolados de ambos os grupos poderá confirmar tal classificação.

TABELA 5 - AMOVA – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE MARCADORES MOLECULARES

Fonte de Variação	G.L.	Componentes de Variação	Porcentagem de Variação
Entre grupos	2	23,04 Va	85,33
Dentro de grupos	18	3,96 Vb	14,67

FST: 0,85 (P=0,0).

TABELA 6 - DIFERENÇA MÉDIA ENTRE OS GRUPOS OBTIDOS NA AMOVA

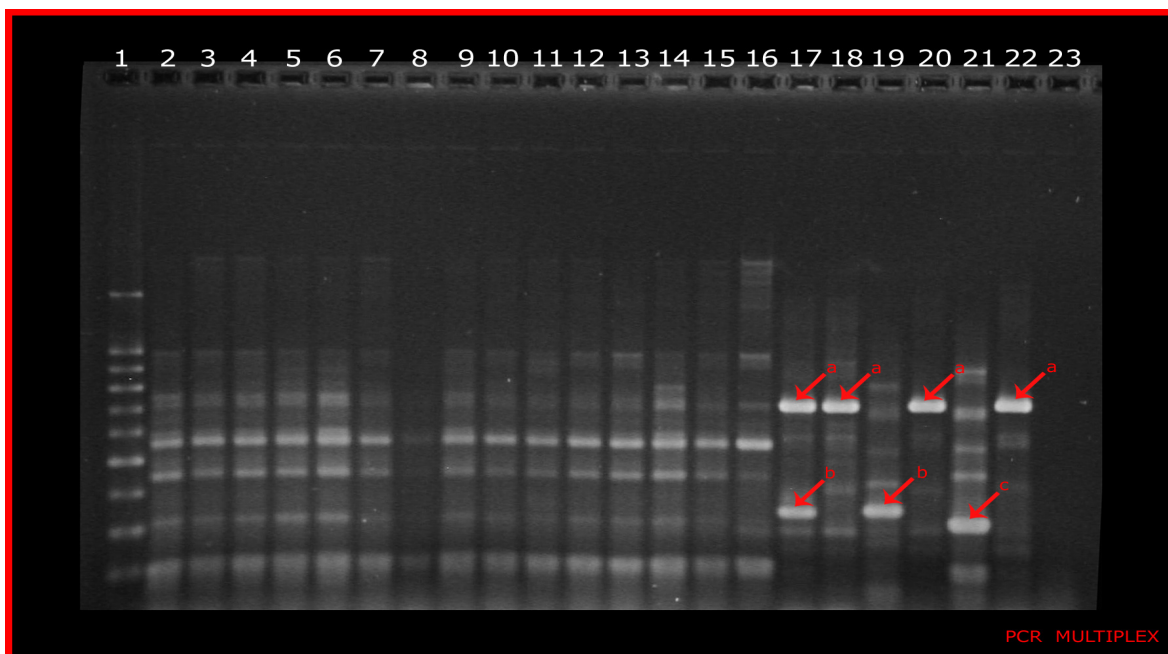
	I	II	Externo
I	3,75		
II	48,79	9,00	
EXTERNO	25,06	39,50	63,00

#### 5.4 ANÁLISE POR PCR *MULTIPLEX*

A fim de confirmar e identificação dos isolados endofíticos foram utilizados dois pares de *primers*, específicos para identificar *G. mangiferae*, *Phyllosticta spinarum* e *G. citricarpa*, em uma reação de PCR *multiplex* (FABRIS, 2006), como pode ser observado na figura 15.

O isolado FD64 apresentou a mesma banda em gel de agarose das linhagens de *G. mangiferae* (N22 e 196). Por outro lado o isolado FD63 apresentou bandas das linhagens de *G. mangiferae* (N22 e 196) e de *P. spinarum* (PR6). Os demais isolados não apresentaram nenhuma banda relacionada com as linhagens padrões utilizadas, sugerindo que elas não pertencem às espécies *G. mangiferae*, *P. spinarum* ou *G. citricarpa*, concordando com os dados apresentados por RAPD.

FIGURA 15 - PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR-MULTIPLEX REVELADO EM GEL DE AGAROSE



Legenda: 1->Marcador de Peso Molecular, *laedder*, 2-16-> ESE1, ESE2, ESE4, ESE5 ESE12, FV12, FV20, FD21, FD62, 17-> FD63, 18-> FD64, 19->PR6, 20->N22, 21->19/02, 22->196, 23->B (Branco). a-> banda para *G. mangiferae*, b-> banda para *P. spinarum*, c-> banda para *G. citricarpa*.

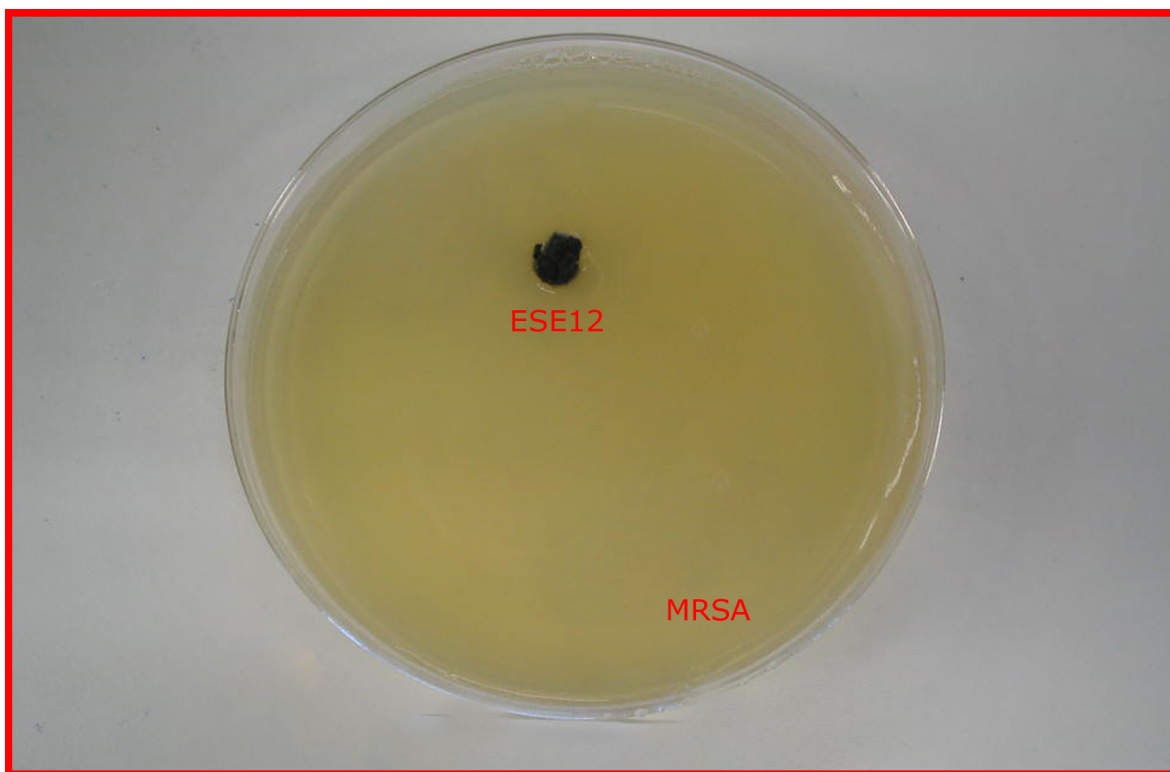
FONTE: o autor

## 5.5 TESTE DE ANTAGONISMO

Doze isolados endofíticos foram usados em testes de antagonismo frente aos patógenos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *S. aureus* resistente a metilina (MRSA) como mostra a figura 16.

Os resultados foram negativos (sem formação de halo) para todos os isolados testados contra estas bactérias patogênicas humanas, indicando que tais linhagens não apresentaram tal propriedade antagonista.

FIGURA 16 - TESTE DE ANTAGONISMO DA LINHAGEM ESE12 DE *Phyllosticta* sp CONTRA O PATÓGENO *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (MRSA)



FONTE: o autor.

Os doze isolados endofíticos de *G. mangiferae* (FD63 e FD64) e de *Phyllosticta* sp foram testados contra linhagens patogênicas de *G. citricarpa* (PC13 e 3C) (figuras 17 a 24).

Os melhores resultados foram observados (Tabela 7) utilizando-se as linhagens de *G. mangiferae* (FD63 e FD64), uma vez que os demais isolados de *Phyllosticta* sp utilizados, possuem crescimento muito lento e reduzido nos meios ensaiados, dificultando assim a utilização da técnica de antagonismo direto. Os dados apresentados na tabela 7 mostram que a linhagem FD63 inibiu em 22,7% o crescimento micelial da linhagem 3C de *G. citricarpa*, que apresenta-se resistente a altas concentrações (100,0µg/ml) do fungicida Benomil (POSSIEDE, 2004). Tal resultado revela que a linhagem FD63 é mais promissora no controle do fitopatógeno *G. citricarpa* do que a linhagem FD64.

Assim, sugere-se que novos testes sejam realizados e outros métodos utilizados, como o de difusão por técnica de poço descrito por SOUZA et al. (2004) onde utiliza-se

extrato metanólico do fungo. Para os testes contra bactérias, sugere-se a utilização do método de bioautografia (CORRADO; RODRIGUES, 2004).

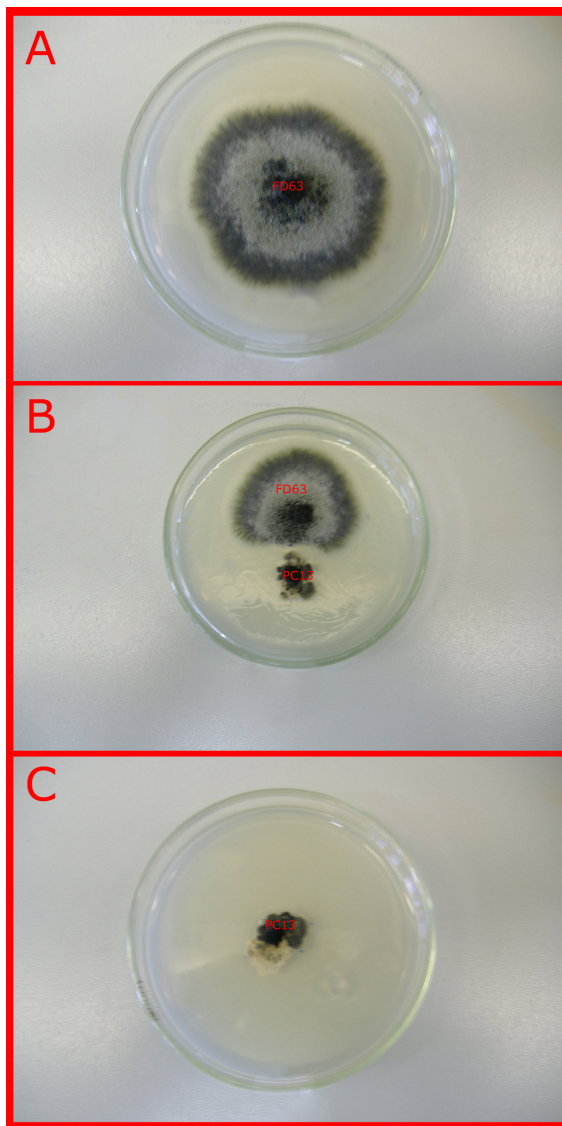
TABELA 7 - INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DE *G. citricarpa* (PC13 E 3C) FRENTE AOS ENDÓFITOS DE *G. mangiferae* (FD63 E FD64) APÓS SEIS DIAS DE CRESCIMENTO EM MEIO DE CULTURA BDA A 28°C

ENDÓFITO	PATÓGENO	INIBIÇÃO EM %
FD63	3C	22,7%
FD63	PC13	12,8%
FD64	3C	3,2%
FD64	PC13	1,8%

Utilizando-se equação de TAECHOWISAN et al. (2005)

Fonte: o autor.

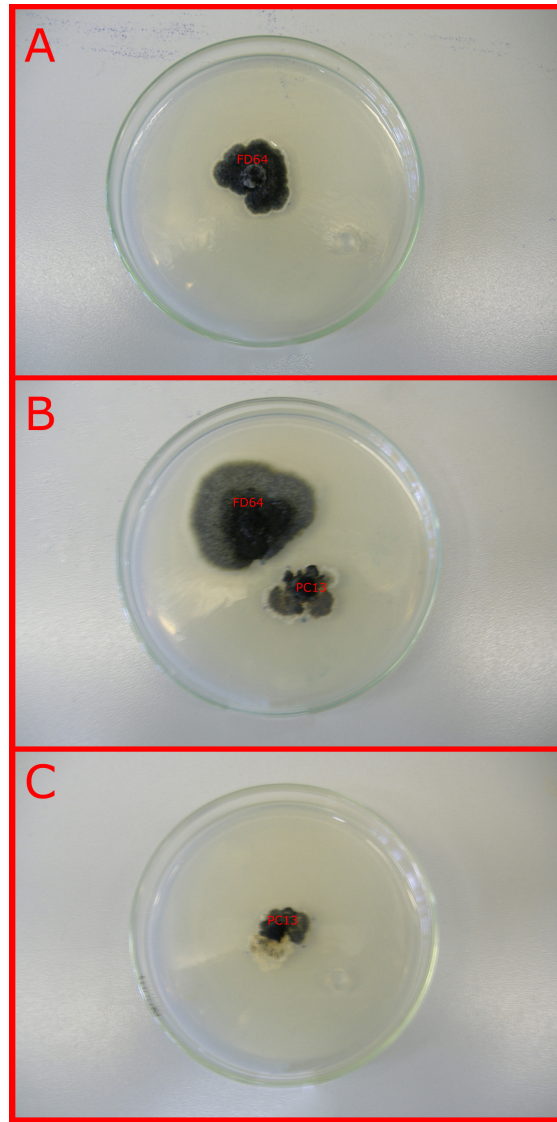
FIGURA 17 - TESTE DE ANTAGONISMO DO ISOLADO FD63 DE *G. mangiferae* CONTRA A LINHAGEM PC13 de *G. citricarpa* APÓS SEIS DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA BDA A 28°C



Legenda: A= Controle FD63; B= FD63 contra PC13; C= Controle PC13.

FONTE: o autor.

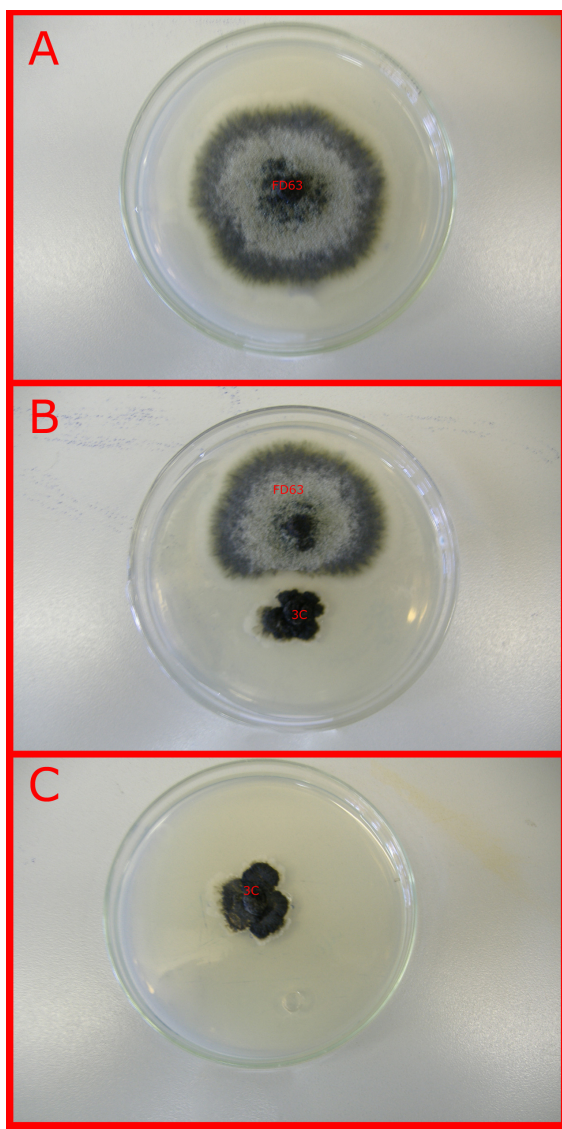
FIGURA 18 - TESTE DE ANTAGONISMO DO ISOLADO FD64 DE *G. mangiferae* CONTRA A LINHAGEM PC13 DE *G. citricarpa* APÓS SEIS DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA BDA A 28°C



Legenda: A= Controle FD64; B= FD64 contra PC13; C= Controle PC13.

FONTE: o autor.

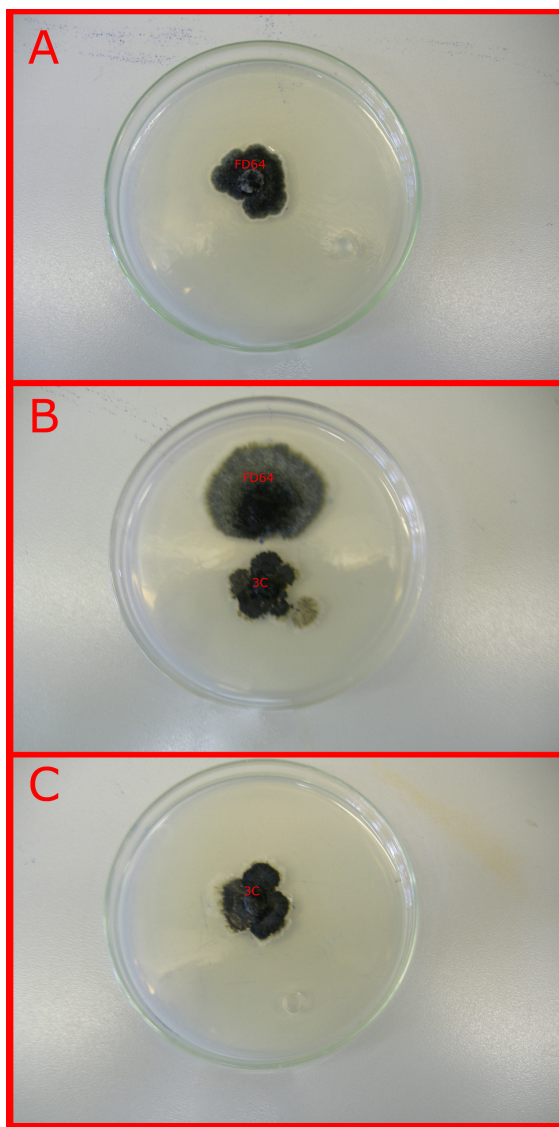
FIGURA 19 - TESTE DE ANTAGONISMO DO ISOLADO FD63 DE *G. mangiferae* CONTRA A LINHAGEM 3C DE *G. citricarpa* APÓS SEIS DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA BDA A 28°C



Legenda: A= Controle FD63; B= FD63 contra 3C; C= Controle 3C.

FONTE: o autor.

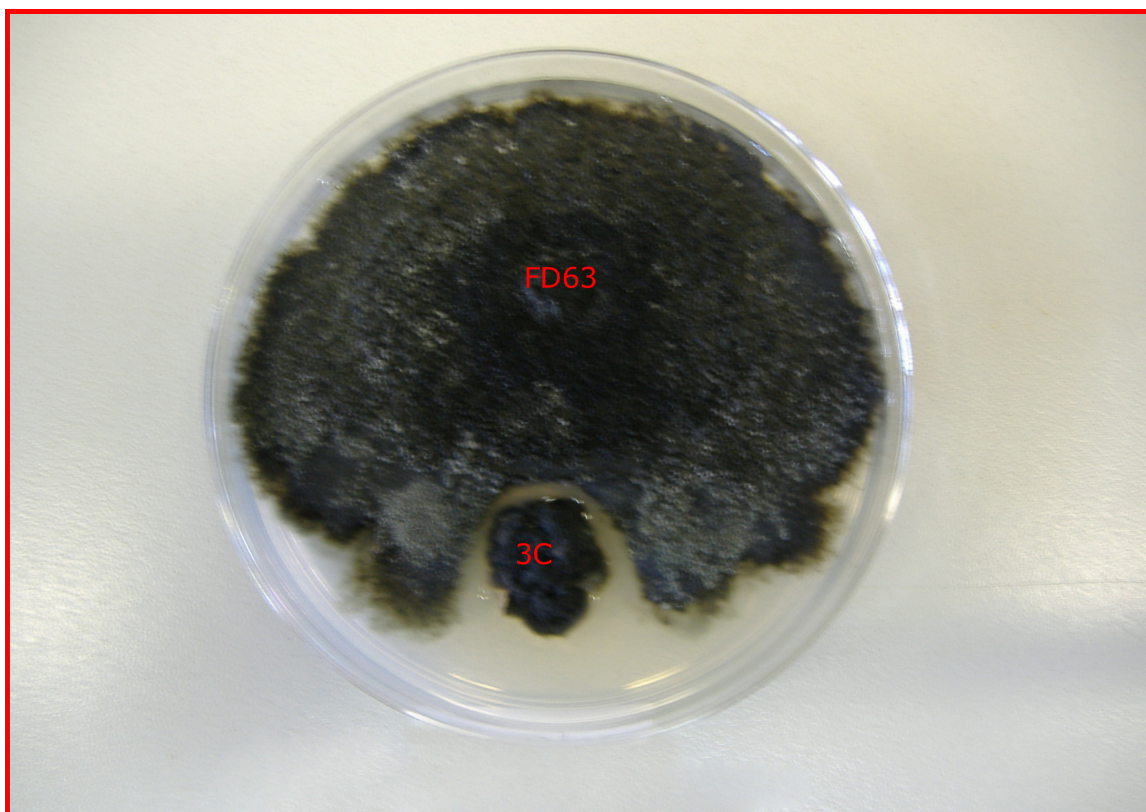
FIGURA 20 - TESTE DE ANTAGONISMO DO ISOLADO FD64 DE *G. mangiferae* CONTRA A LINHAGEM 3C DE *G. citricarpa* APÓS SEIS DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA BDA A 28°C



Legenda: A= Controle FD64; B= FD64 contra 3C; C= Controle 3C.

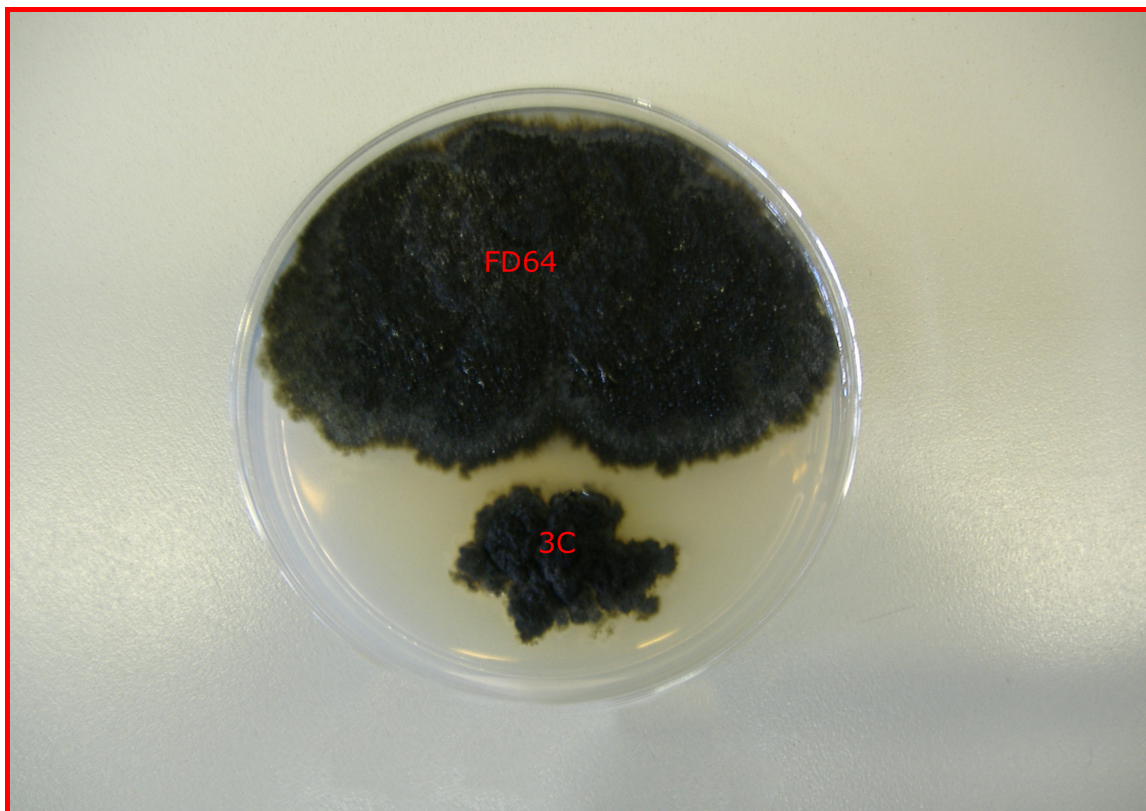
FONTE: o autor.

FIGURA 21 - TESTE DE ANTAGONISMO DO ISOLADO FD63 DE *G. mangiferae* CONTRA A LINHAGEM 3C DE *G. citricarpa* APÓS 15 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA BDA A 28°C



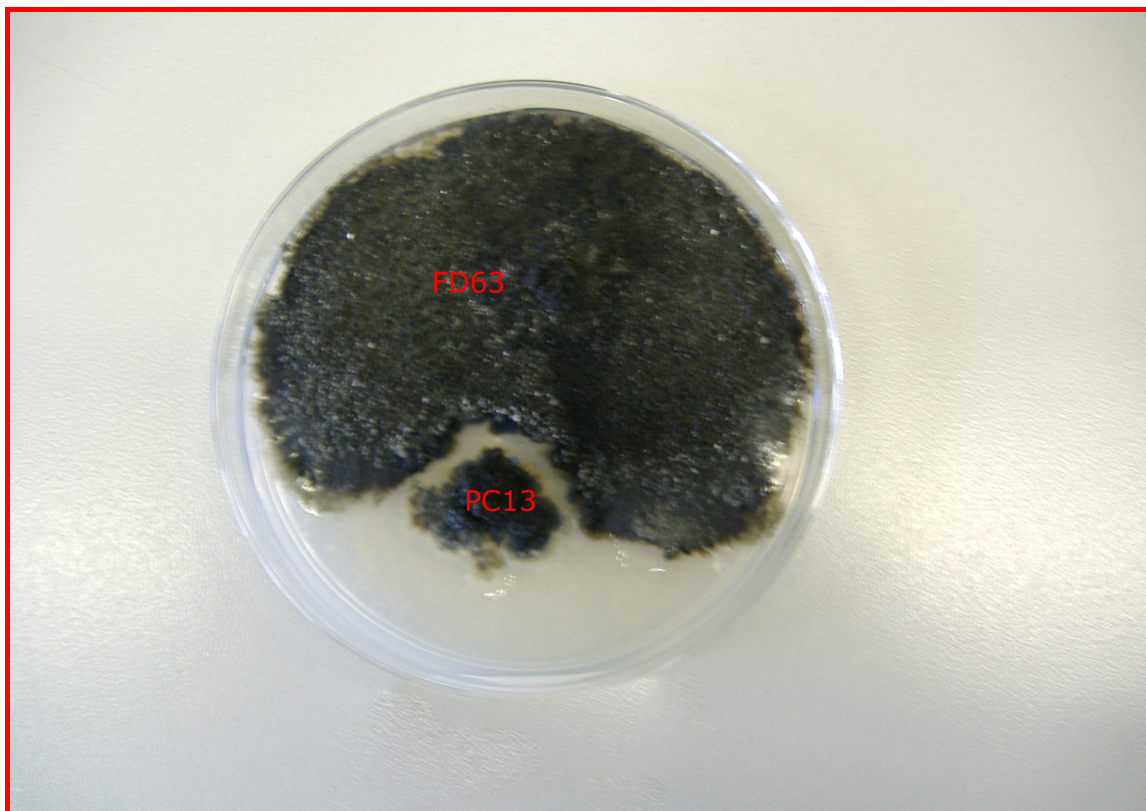
FONTE: o autor.

FIGURA 22 - TESTE DE ANTAGONISMO DO ISOLADO FD64 DE *G. mangiferae* CONTRA A LINHAGEM 3C DE *G. citricarpa* APÓS 15 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA BDA A 28°C



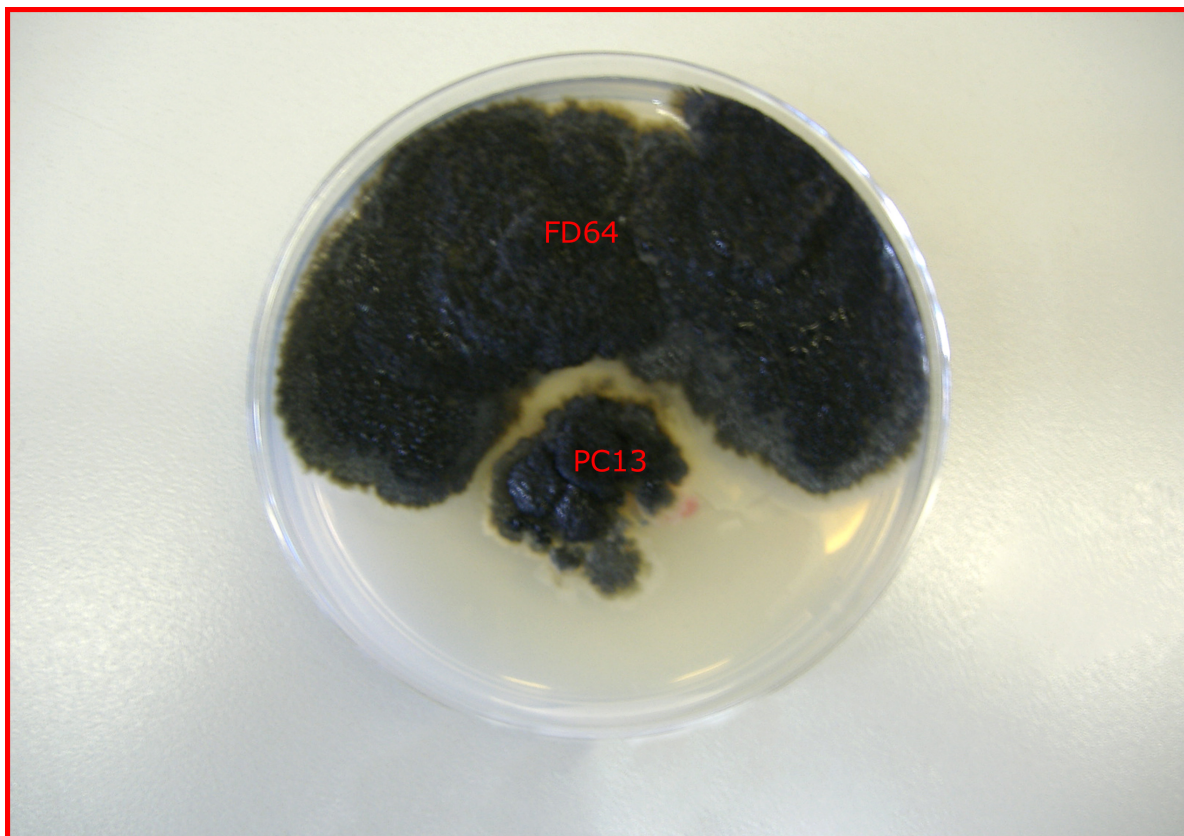
FONTE: o autor.

FIGURA 23 - TESTE DE ANTAGONISMO DO ISOLADO FD63 DE *G. mangiferae* CONTRA A LINHAGEM PC13 DE *G. citricarpa* APÓS 15 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA BDA A 28°C



FONTE: o autor.

FIGURA 24 - TESTE DE ANTAGONISMO DO ISOLADO FD64 DE *G. mangiferae* CONTRA A LINHAGEM PC13 DE *G. citricarpa* APÓS 15 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA BDA A 28°C



FONTE: o autor.

## 6 CONCLUSÕES

- A planta medicinal *M. ilicifolia* é colonizada por fungos dos gêneros *Phyllosticta* e *Guignardia* como endófitos, embora a frequência de isolamento destes tenha sido inferior aos descritos em outras plantas hospedeiras.
- Há grande variabilidade morfológica e genética entre os isolados de *Phyllosticta* e *Guignardia* endofíticos de *M. ilicifolia*.
- Os isolados endofíticos FD63 e FD64 provavelmente pertencem à espécie *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*), enquanto os demais isolados obtidos pertencem ao gênero *Phyllosticta*.
- Os testes de antagonismo empregados não revelam potencial antibacteriano dos isolados obtidos e analisados neste trabalho, entretanto, a linhagem FD63 de *G. mangiferae* apresentou-se promissora na inibição de *G. citricarpa*.

## REFERÊNCIAS

- AA, VAN DER H.A. Studies in Phyllosticta I. **Studies in Mycology**, n.5, p.1-110, 1973.
- AA, VAN DER H.A.; VANEV, S. **A revision of the species described in *Phyllosticta***. 510p. 2002.
- ARAÚJO, J. M. de; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, n.4, p.447-451, 2000.
- 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**, v.3, n.1, p.40-65, 2000.
- BELL, D.K.; WELLS, H.D.; MARKHAM, C.R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, 72: p.379-382, 1982.
- 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**, v.25, n.1, p.85-89, 2002.
- CARVALHO-OKANO, R. M. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae) do Brasil extra-amazônico**. Campinas, 1992. 253f. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Vegetal), Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.
- CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; FORD, E. J.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; ALBERT, H.; ROBISON, R.; CONDRON, M. A. M.; TEPLow, D. B.; STEVENS, D.; YAVER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology**, v.148, p.2675-2685, 2002.
- 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 Biológica Paranaense**, Curitiba, v.18, n.1-4, p.73-114, 1989.

COELHO, A.S.G. (2005). **Software Bood**. Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap. V. 3.03. UFG.

CORRADO, M. e RODRIGUES, K.F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis sp.* **J Basic Microbiol**, 44, p.157-160, 2004.

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.

CRUZ, R. P.; MILACH, S. C. K. Análise de RAPD. In: MILACH, S. **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre: Sandra Milach Editora, p.107-116, 1998.

FABRIS, J. **Diagnóstico molecular de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta do citros**. Monografia. UFPR, 2006.

FERREIRA, M.E. e GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. pp. 220.

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, p.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.

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.

GLIENKE-BLANCO, C.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; VIEIRA, M.L.C.; BARROSO, P. A. V.; AZEVEDO, J.L. Genetics variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.2, p.251-255, 2002.

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.

GOODWIN, P. H.; ANNIS, S. L. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.9, p.2482-2486, 1991.

GUIMARÃES, V. C. **Isolamento de fungos endofíticos do hospedeiro *Paulinia cupana* H. B. K. var. *sorbilis* (Mar.) Ducke e análise da variabilidade genética detectada por marcadores RAPD no endófito *Glomerella cingulata***. Manaus, 1998. 115p. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos e Universidade do Amazonas.

HOLMES, G. J.; ECKERT, J. W.; PITT, J. I. Revised description of *Penicillium ulaiense* and its role as a pathogen of Citrus fruits. **Phytopathology**, v.84, p.719-727, 1994.

HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.31, n.47, p.163-167, 2001.

JOHNSTON, P.R. e FULLERTON, R.A. *Cryptosporiopsis citri* sp. Nov.; cause of a citrus leaf spot in the Pacific Islands. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, v.1, n.16, p.159-163, 1998.

KAVA-CORDEIRO, V. *Guignardia citricarpa*, *G.mangiferae* e *Phyllosticta spinarum*: CARACTERIZAÇÃO MORFOLOGICA, SCARs E RNA DUPLA FITA, Curitiba 2004, tese de doutorado-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, p 77.

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.

LIEW, E. C. Y.; IRWIN, J. A. G. Comparative studies on *Phytophthora megasperma* isolates from chickpea collected in Australia and Spain. **Mycological Research**, v.98, n.11, p.1284-1290, 1994.

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.

LINHARES, L.I.; MATSUMURA, A.T.S.; LUZ, V.C. Avaliação da amplitude de ação antagonística de microrganismos epífitas do trigo sobre o crescimento radial de *Drechslera tritici-repentis*. **Rev. Bras. de Agrociência**, v.1, n.3, p.119-126, set-dez., 1995.

LONGO, A. C. **Transformação genética e variabilidade detectada por RAPD em isolados endofíticos de *Colletotrichum musae***. Piracicaba, 1996. 101f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo.

LOPES, R.; LOPES, M.T.G.; FIGUEIRA, A.V.O; CAMARGO, L.E.A; FUNGARO, M.H.P.; CARNEIRO, M.S.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores Moleculares (Rapid E Aflp): Aspectos Técnicos e Interpretação Genética. **Revista Biotecnologia**, ano 5, n.29, nov/dez, 2002.

MANULIS, S.; KOGAN, N.; REUVEN, M.; BEN-YEPHET, Y. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi from carnation. **Phytopathology**, v.84, p.98-101, 1993.

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologias de Plantas**, v.I, p.369-409, 1993.

McCLELLAND, M.; WELSH, J. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.18, n.24, p.7213-7218, 1990.

MEIJER, G.; MEGNEGNEAU, G.; LINDERS, E. G. A variability for isozyme, vegetative, compatibility, and RAPD markers in natural populations of *Phomopsis subordinaria*. **Mycological Research**, v.98, n.3, p.267-276, 1994.

NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos Endofíticos: Interação com Plantas e Potencial Biotecnológico. **Revista Biotecnologia**, ano 5, n.29, nov/dez, 2002.

NICHOLSON, P.; REZANOON, H. N. The use of random amplified polymorphic DNA to identify pathotype and detect variation in *Pseudocercospora herpotrichoides*. **Mycological Research**, v.98, n.1, p.13-21, 1994.

OKANE, I.; NAKAGIRI, A; ITO, T. Identity of *Guignardia* sp. Inhabiting ericaceous plants. **Canadian Journal of Botany**, v.79, Iss. 1, p.101-109, jan/2001.

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)**. 15ed. São Paulo: IBRASA, 1998. pp. 265.

PENNA, E.B. da S. **Microrganismos endofíticos em erva-mate (*Ilex paraguariensis*, ST.HIL.) e variabilidade genética em *Phyllosticta* sp. Por RAPD**. Curitiba, 2000. 123 f. Dissertação (Mestrado em Genética), Universidade Federal do Paraná.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia**, v.85, n.3, p.362-364, 1993.

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.

PILLEGI, S. A. V. (comunicação pessoal, 2004). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Laboratório de Microbiologia.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A .; HEMMOS, L.M.; MAC DONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, v.5, p.141-238, 1953.

POSSIEDE, Y. M. **Estudos morfofisiológicos e genéticos em *Guignardia* spp. e *Phyllosticta* sp.** Curitiba, 2004. 129f. Tese (Doutorado em Genética) – 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.

RAEDER, U. e BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v.1, p.17-20, 1985.

RIBEIRO, L. A. **Variabilidade genética por RAPD em fungos endofíticos do gênero *Penicillium* provenientes de *Zea mays* L.** Curitiba, 1995. 90f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

RODRIGUES, K.F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal of Basic Microbiology**, v.40, n.4, p.261-267, 2000.

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.

RODRIGUES-HEERKLOTZ, K.F.; DRANDAROV, K.; HEERKLOTZ, J.; HESSE, M.; WERNER, C. Guignardia Acid, a Novel Type of Secondary Metabolite Produced by the Endophytic fungus *Guignardia* sp.: Isolation, Structure Elucidation, and Asymmetric Synthesis. **Helvetica Chimica Acta**, v.84, p.3766-3772, 2001.

ROHLF, F.J. **NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system.** New York: Exeter Publishing, 1998.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S. J.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354, 1985.

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.

SCHÄFER, C.; WÖSTEMEYER, J. Random primer dependent PCR differentiates aggressive from non-aggressive isolates of the oilseed rape pathogen *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*). **Journal of Phytopathology**, v.136, p.124-136, 1992.

SCHNEIDER, S; ROESSLI, D; EXCOFFIER, L. **Arlequin Ver. 2.000**: a software for population genetics data analysis. Switzerland: Genetic and Biometry Laboratory/University of Geneva.

SHRESTHA, K.; STROBEL, G. A.; SHRIVASTAVA, S. P.; GEWALI, M. B. Evidence for paclitaxel from three new endophytic fungi of Himalayan yew of Nepal. **Planta Medica**, v.67, n.4, p.374-376, 2001.

SINCLAIR, J. B. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, n.3, p.220-224, 1991.

SIVANESAN, A. **The bitunicate ascomycetes and their anamorphs**. Germany: J.Cramer, 1984. 701p.

SNEATH, P.H. e SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1973. 573p.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Nocardioopsis* 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.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D.; GROTHAUS, P.; BIGNAMI, G. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. **Journal of Natural Products**, v.58, n.9, p.1315-1324, sep. 1995.

STINSON, M.; EZRA, D.; HESS, W. M.; SEARS, J.; STROBEL, G. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. **Plant Science**, v.165, p.913-922, 2003.

STRINGARI, D. **Estudo da variabilidade genética de isolados do fungo *Guignardia* sp por meio de marcadores RAPD e seqüências ITS**. Curitiba, 2004. Dissertação de Mestrado- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v.5, p.535-544, 2003.

STROBEL, G. e DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n.4, p.491-502, 2003.

SUMAM, A.; SHASANY, A. K.; SINGH, M.; SHAHI, H. N.; GAUR, A.; KHANUJA, S. P. S. Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, Dordrecht, v.17, n.1, p.39-45, 2001.

- SUNDBERG, M.I.; SLAUGHTER, D.M.; CRUPPER, S.S. Application of Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Fingerprinting to Detect Variation in *Sericea Lespedeza* (*Lespedeza cuneata*). **Transactions of the Kansas Academy of Science**, v.105, p.91-95, 2002.
- 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.
- VIRET, O.; PETRINI, O. Colonization of beech leaves (*Fagus sylvatica*) by the endophyte *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomonina errabunda*). **Mycological Research**, v.98, p.423-432, 1994.
- WANG, J.; LI, G.; LU, H.; ZHENG, Z.; HUANG, Y.; SU, W. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. **FEMS Microbiology Letters**, v.193, p.249-253, 2000.
- WHITE Jr., J. F.; MORGAN-JONES, G.; MORROW, A. C. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. **Agriculture Ecosystems e Environment**, Amsterdam, v.44, p.13-37, 1993.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGER, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.22, p.6531-6535, 1990.
- ZOU, W. X.; MENG, J. C.; LU, H.; CHEN, G. X.; SHI, G. X.; ZHANG, T. Y., TAN, R. X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, v.63, n.11, p.1529-1530, 2000.