

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR BASEADA NO SEQUENCIAMENTO DE rDNA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *Pentacalia desiderabilis* (VELL.) CUATREC. (ASTERACEAE)

Gabriela Manzi Moraes (IC) e Ana Paula Pimentel Costa (Orientadora)

Apoio: PIBIC Mackenzie

RESUMO

Microrganismos endofíticos são organismos que habitam o interior de plantas, vivendo principalmente nos tecidos, folhas e flores do vegetal sem danificar seu hospedeiro, porém ainda são pouco conhecidos atualmente. Penetram na planta pelas raízes, por aberturas naturais, feridas de parasitas ou colheita de frutos. Já foram encontrados em todos os vegetais até agora analisados e podem ser uma fonte de inéditos compostos bioativos e estruturas moleculares. *Pentacalia desiderabilis* é um arbusto com flores do raio amarelas e exclusivo de fragmentos restantes da Mata Atlântica em estados da região sul, sudeste e nordeste do Brasil, possuindo adaptações morfológicas e fisiológicas distintas. Apresenta-se em altas altitudes e é uma das únicas espécies nativas do Brasil com crescimento escandente da tribo Senecioneae. No presente trabalho, foi estudada a diversidade de fungos endofíticos associada à espécie *Pentacalia desiderabilis* (Asteraceae) presente em Campos de Altitude de áreas remanescentes do bioma Mata Atlântica em São Paulo. Do total, foram obtidos 29 diferentes isolados e foram identificados por meio do sequenciamento das regiões ITS1 e ITS4 do rDNA. Foi descoberto que os isolados pertencem aos gêneros *Diaporthe*, *Pestalotiopsis*, *Colletotrichum*, *Epicoccum*, *Ophioceras*, *Phaeosphaeria*, *Paraphaeosphaeria*. Dentre as espécies identificadas, *Diaporthe* foi o gênero mais frequente, sendo as espécies *Diaporthe phaseolorum* e *Diaporthe passiflorae* as mais encontradas. Todos os fungos sequenciados pertencem ao Filo Ascomycota. Os resultados obtidos concluíram que *P. desiderabilis* possui uma interessante e singular comunidade natural de fungos endofíticos.

Palavras-chave: Fungo endofítico. *Pentacalia desiderabilis*. Biologia molecular.

ABSTRACT

Endophytic microorganisms are organisms that inhabit the interior of plants, living mainly in plant tissues, leaves and flowers without damaging their host, but they are still little known today. They penetrate the plant by the roots, by natural openings, wounds of parasites or harvest of fruits. They have already been found in all the vegetables analyzed so far and can be a source of unheard of bioactive compounds and molecular structures. *Pentacalia desiderabilis* is a shrub with yellow ray flowers and exclusive of remaining fragments of the Atlantic Forest in southern, southeastern and northeastern Brazil, with different morphological and physiological adaptations. It is present in high altitudes and is one of the only native

species of Brazil with scandant growth of the tribe Senecioneae. In the present work, was investigated the diversity of endophytic fungi associated with the species *Pentacalia desiderabilis* (Asteraceae) present in altitude fields of remnant areas of the Atlantic Forest biome in São Paulo. From the total, 29 different isolates were obtained and were identified through the sequencing of the ITS1 and ITS4 regions of rDNA. It was found that the isolates belong to the genus *Diaporthe*, *Pestalotiopsis*, *Colletotrichum*, *Epicoccum*, *Ophioceras*, *Phaeosphaeria*, *Paraphaeosphaeria*. Among the species identified, *Diaporthe* was the most frequent genus, being the species *Diaporthe phaseolorum* and *Diaporthe passiflorae* the most found. All fungi sequenced belong to the division Ascomycota. The results obtained concluded that *P. desiderabilis* has an interesting and unique natural community of endophytic fungi.

Keywords: Endophytic fungi. *Pentacalia desiderabilis*. Molecular biology.

1. INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos são organismos que habitam o interior de plantas, vivendo principalmente nos tecidos, folhas e flores do vegetal sem danificar seu hospedeiro. Esses seres vivos podem ser tanto fungos como bactérias e insetos (FELBER; PAMPHILE, 2013). Os endófitos são extremamente vantajosos na agricultura e na indústria, especialmente na alimentícia e farmacêutica. Podem ser empregados como fontes de metabólitos primários e secundários de interesse e também como vetores para inserção de genes de interesse nos vegetais, podendo ser aplicados como agentes inibidores de pragas e patógenos (SOUZA et al., 2004). Como resultado, a possibilidade de encontrar novos microrganismos e estes serem produtores de compostos bioativos úteis à indústria, agricultura e medicina vem aumentando a ocorrência de estudos sobre microrganismos endofíticos.

Segundo Azevedo (1998), os fungos são produtores de substâncias secundárias, algumas das quais são utilizadas como inibidores de herbívoros e de outros agentes ocasionadores de injúrias. Esses seres também podem produzir toxinas, fatores de crescimento, antibióticos e outros fármacos e diversos produtos de interesse biotecnológico. Cerca de um quarto de todos os produtos naturais biologicamente ativos, são produzidos a partir de fungos (SILVA et al., 2010).

Estimativas apontam que há cerca de 1,5 milhão de espécies de fungos ao todo no mundo, porém apenas 100.000 destes foram identificados (RAVEN et al., 2014). O estudo da biologia endofítica de plantas específicas foi pouco praticado até hoje em dia. São altas as chances de identificar novos micro-organismos através do isolamento e caracterização de indivíduos localizados em plantas de diversificados ecossistemas, particularmente de vegetais de regiões áridas e tropicais, uma vez que são ambientes onde existem maior quantidade de interações entre os seres vivos (CHAPLA et al., 2012).

Considerando a ampla diversidade e quantidade de espécies presentes na flora mundial, sabe-se que as plantas de diferenciados nichos ecológicos, em particular nichos que apresentam vegetais com morfologia atípica ou estratégias incomuns para sua subsistência, são mais adequadas para o estudo de seus endofíticos (KUSARI; SPITELLER, 2011). Sendo assim, as asteráceas são plantas que possuem adaptações morfológicas e fisiológicas que asseguram sua sobrevivência e sucesso evolucionário. Esses vegetais são capazes de se apresentar em todos os habitats terrestres, exceto a Antártida (FUNK et al., 2009). A família Asteraceae pertence à ordem Asterales, ordem que representa um dos mais importantes grupos taxonômicos de Eudicotiledôneas.

Dentro deste contexto, o objetivo do projeto é estudar a diversidade dos fungos endofíticos associada à espécie *Pentacalia desiderabilis* (Asteraceae) presente em Campos

de Altitude de áreas remanescentes do bioma Mata Atlântica em São Paulo. Através da caracterização molecular dos 77 isolados endófitos previamente obtidos, espera-se obter o máximo de informações sobre cada isolado, determinando o gênero e espécie de cada isolado. Estes dados serão importantes subsídios para a caracterização desta comunidade e a realização de ensaios para avaliar o seu potencial na produção de compostos bioativos, bem como para a formação de recursos humanos especializados.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Os fungos são considerados os principais decompositores da biosfera e se encontram separados em seis grupos do Reino Fungi: Microsporidia, Quítrídios, Zigomicetos, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota (RAVEN et al., 2014).

Fungos endofíticos já foram encontrados em todos os vegetais até agora analisados, podem ser uma fonte de inéditos compostos bioativos e estruturas moleculares, bem como são muito numerosos em plantas de regiões tropicais e subtropicais. Estão presentes em diversos grupos do Reino Fungi (ARAÚJO et al., 2010).

Os fungos endofíticos penetram na planta pelas raízes, por aberturas naturais como hidatódios e estômatos, por feridas de parasitas ou colheita de frutos (AZEVEDO, 1998). Um mesmo fungo pode colonizar vários vegetais, uma vez que os esporos do endofítico podem ser transportados pelo vento ou por insetos de uma planta para outra, porém consegue interagir de específicas maneiras com cada hospedeiro (FELBER; PAMPHILE, 2013). Segundo Chapla et al. (2012), possuem uma íntima relação mutualística na qual adquirem proteção e nutrientes do vegetal, ao mesmo tempo que oferecem uma maior resistência, principalmente a fatores bióticos e abióticos que danificam a planta. De acordo com Lucero et al. (2006), o surgimento de tais resistências se deve a capacidade dos endofíticos de alterar geneticamente, fisiologicamente e ecologicamente o vegetal. Portanto, possuem um papel fundamental na mediação das interações planta-herbívoros, planta-patógenos e plantaambiente (OKI et al., 2009).

A diversidade de fungos endofíticos pode diferenciar-se conforme o hospedeiro, distribuição geográfica, idade do vegetal e condições em relação à sazonalidade e ecologia da região, envolvendo também a altitude e a precipitação. No vegetal, uma ou duas espécies de endofíticos podem ser dominantes em um hospedeiro específico, enquanto os demais se apresentam em menor frequência (AZEVEDO, 1998; PIMENTEL et al., 2010).

Podem ser fundamentais também na elaboração de fármacos anticancerígenos, sendo que 48,6% desses remédios são adquiridos através de produtos naturais desses fungos. Em alguns estudos, foi descoberto que podem possuir propriedades antidiabéticas, imunossupressoras, citotóxicas e antivirais. Podem também reduzir o efeito de poluentes ao

causar a degradação de produtos tóxicos, contribuindo na conservação do meio ambiente (CHAPLA et al., 2012; ARAÚJO et al., 2010).

Uma espécie da família Asteraceae de clima tropical e colonizada por fungos endofíticos é a *Pentacalia desiderabilis*. É um arbusto com flores do raio amarelas e exclusivo de fragmentos restantes da Mata Atlântica em estados da região sul, sudeste e nordeste do Brasil. Apresenta-se em altitudes que variam de 400 a 2220 m. s. m. (TELES, 2008). De acordo com Teles e Stehmann (2011), *P. desiderabilis* é uma das únicas espécies nativas do Brasil com crescimento escandente da tribo Senecioneae, sendo facilmente reconhecida por tal característica. Nos meses de agosto e setembro é encontrada com flores e frutos.

Um estudo iniciado anteriormente por Pena e colaboradores (comunicação pessoal), visava a obtenção e seleção de extratos brutos oriundos de fungos endofíticos associados à espécie *Pentacalia desiderabilis* (Vell.) Cuatrec. (Asteraceae). Este espécime foi encontrado em Campos de Altitude de áreas remanescentes do bioma Mata Atlântica no bairro de Umuarama em Campos do Jordão, o qual é um ambiente com muita umidade, baixas temperaturas e elevada altitude. Pena e colaboradores obtiveram 77 isolados de fungos endofíticos. Estes isolados foram agrupados em 24 morfotipos, baseados na velocidade de crescimento (rápido, intermediário e lento) e o aspecto (coloração do fungo e do meio de cultura e textura do fungo) da cultura.

Este trabalho iniciou-se com o isolamento destes microrganismos, porém é primordial o conhecimento da diversidade desta comunidade para a prospecção e realização de ensaios visando avaliar o seu potencial na produção de compostos bioativos. A interação plantaendofítico é extremamente complexa, portanto, a investigação dos padrões de colonização constitui-se como um importante modo de avaliação do desenvolvimento da planta hospedeira e reflete nos compostos bioativos produzidos. Para tanto é fundamental identificar quais são os fungos endofíticos associados à *P. desiderabilis* e quantas destas espécies seriam dominantes neste vegetal.

A muitos anos atrás na sistemática microbiana, a identificação de fungos filamentosos era realizada apenas através de características morfológicas, microscópicas e macroscópicas. Entretanto, tal metodologia muitas vezes não originava dados e resultados precisos, podendo resultar em uma identificação errada e também necessitava de muito tempo e esforço. Por isso, atualmente estão sendo utilizados métodos baseados na biologia molecular devido sua praticidade, rapidez e alta precisão nos resultados ao utilizar uma pequena quantidade de DNA. Além disso, a biologia celular e molecular pode contribuir para melhorar e aprofundar o conhecimento em relação às interações entre os microrganismos e seu ambiente (WACULICZ-ANDRADE, 2009; RODRIGUES, 2010).

Estes métodos possibilitam a identificação de espécimes em diferentes amostras ambientais e possibilitam estudar os organismos sem a necessidade de realizar o cultivo deles, diminuindo, assim, o custo e o tempo das análises. Também podem auxiliar em novas informações acerca composição, fisiologia e filogenia das comunidades microbianas, contribuindo para um melhor conhecimento na área da ecologia microbiana (RODRIGUES, 2010; WACULICZ-ANDRADE, 2009).

Atualmente, para investigar a variabilidade genética dos fungos, usa-se a técnica de amplificação por PCR de fragmentos do DNA ribossômico (rDNA). O rDNA está localizado em locais específicos do genoma e apresenta a função de codificar variadas moléculas de RNA ribossomal, tendo muita importância na tradução de proteínas dos organismos. As unidades do rDNA se encontram repetidas em diversas sequências e são separadas entre si por regiões intergênicas (IGS). Essas sequências repetidas se mostram como um cluster gênico, com alguns genes intensamente conservados, apresentando evolução muito lenta e, por isso, apresentam poucas variações ao longo de várias gerações (ARRUDA et al., 2003; WACULICZ-ANDRADE, 2009; SALLES; SOUZA, 1998).

Dentro deste cluster gênico, há regiões denominadas de regiões espaçadoras internas (ITS) que apresentam alto polimorfismo uma vez que evoluem rapidamente e, por isso, apresentam intenso interesse para pesquisas a níveis de gênero, espécie e população. O rDNA apresenta, portando, o gene 18S, o gene 5,8S e o gene 28S. Entre os dois primeiros genes há a região ITS1 e entre os dois últimos há a região ITS4. (FUNGARO, 2000; WACULICZ-ANDRADE, 2009). O resultado obtido é comparado com uma base de dados com sequências de DNA que já foram anteriormente identificadas. Esses marcadores são capazes de investigar o genoma independentemente do estado fisiológico dos microrganismos pesquisados ou do estágio de desenvolvimento de seus tecidos. Também podem distinguir espécies muito parecidas entre si (NETO, 2002; THOMPSON; OLIVEIRA, 2005; SARA, 2011; SALLES; SOUZA, 1998).

3. METODOLOGIA

A espécie *Pentacalia desiderabilis* (Vell.) Cuatrec. (Asteraceae) foi coletada na região do condomínio Umuarama, pertencente à Universidade Presbiteriana Mackenzie, que se encontra a cerca de 1700m de altitude na Serra da Mantiqueira, próximo às coordenadas 22°46'24"S e 45°33'45"W, no município de Campos do Jordão, a 170 km da capital paulista, no extremo leste do Estado de São Paulo. A identificação da espécie foi realizada pela Prof^a. Dr^a. Oriana Aparecida Fávero e a respectiva exsicata depositada no herbário do CCBS/UPM.

A metodologia empregada para o isolamento dos fungos endofíticos foi baseada no procedimento citado por Maier et al. (1997) e Souza et al. (2004). O crescimento dos fungos

era monitorado e repiques sucessivos foram sendo realizados até a obtenção de isolados puros, que foram preservados em “slants” (tubo de ensaio contendo meio BDA inclinado) e água estéril.

Os fungos previamente isolados foram cultivados em meio Batata Dextrose Ágar (BDA – Difco) em placa de Petri de 9 cm de diâmetro, em estufa a 25 °C, por 10-18 dias, dependendo da velocidade de crescimento do fungo. Em seguida, foram feitas suspensões micelianas em 5 mL do meio Batata Dextrose Broth (BD – Difco) em tubos falcon de 15 mL, a partir de repiques pequenos retirados das culturas em placas com meio de cultura sólido. O material foi incubado em estufa a 25 °C por 15 dias vedado totalmente com papel alumínio para impedir a incidência de luz no material.

Em seguida ao crescimento do fungo em meio líquido, o micélio foi filtrado com o auxílio de papel filtro. Posteriormente, foi lavado com água purificada e secado com papel toalha, sendo assim submetido ao protocolo de extração. A extração de DNA foi realizada conforme o método descrito por Rodrigues (2010), com algumas modificações. Foram acrescentados 5 minutos em todas as centrifugações, para melhor separação da fase aquosa e da fase sobrenadante. Conforme necessário, o produto final da extração foi armazenado no congelador (-20 °C) até a sua utilização.

As amostras de DNA obtidas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% para quantificação e verificação da qualidade do DNA, sendo também utilizados marcadores de concentração.

As amostras de DNA genômico foram submetidas a reação de amplificação por PCR. Os oligonucleotídeos iniciadores aplicados foram o ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') para a realização do estudo da região ITS (WHITE; MORROW, 1990; WHITE et al., 1990). A reação foi realizada de acordo com Rodrigues (2010), com algumas modificações. Cada reação de PCR foi realizada para um volume final de 50 µl contendo de 5-10 ng de DNA; 10 µl de tampão 5x; 2,5 µl de primer ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e 2,5µl de primer ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), ambos em concentração de 100pm; 2 µl de dNTPs a 10 pm; 7 µl de MgCl₂ 25 mM; 1 µl de enzima Taq Polimerase. As amostras foram submetidas as seguintes condições no termociclador: desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C, seguido de 24 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e alongação a 72°C por 1 minuto. Por fim, extensão de 72 °C por 5 minutos.

Conforme necessário, as amostras foram armazenadas no congelador (-20°C), para preservação do material. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de

agarose 1,2%, com visualização através de coloração com Syber Safe (Invitrogen). Um produto de 500 pb foi visível, juntamente excessos de reagentes utilizados na reação.

O produto da amplificação por PCR foi submetido à purificação, através do kit Invisorb® Fragment CleanUp da Invitex, seguindo as etapas detalhadas no manual de instruções. Após, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,2% para verificação do material purificado.

Para melhor controle, as amostras foram quantificadas após a purificação. Para tal, foi utilizado o aparelho Quantus™ Fluorometer da Promega, seguindo o protocolo manual para QuantiFluor® dsDNA System. Para o sequenciamento do DNA, foi utilizada a plataforma Applied Biosystems® 3500 Genetic Analyzer. As amostras foram enviadas para a empresa Helixxa Pesquisa (Campinas, SP) para a realização da reação de sequenciamento, juntamente com os dados de quantificação de cada amostra.

Os arquivos obtidos pela empresa foram visualizados com o programa BioEdit (Biological sequence alignment editor – versão 7.2.5). Em seguida, foram convertidos para formato “.zip” e encaminhados para o site electropherogram quality analysis (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>), onde foi apresentado uma tabela de qualidade de cada amostra. Foram retirados do site os contigs pertencentes às sequências que apresentaram uma boa qualidade. As que obtiveram baixa qualidade foram descartadas.

Os contigs foram enviados para o banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) desenvolvido pela National Center for Biothecnology para pesquisa das espécies. Neste, foi obtido para cada amostra a distribuição dos 100 melhores Blasts de 100 sequências armazenadas no site e sequências que produziram alinhamentos significativos. Neste último, foram obtidos o nome científico do organismo estudado, juntamente com seu *max score*, *total score*, *query cover*, *e-value*, *identidade* e *accession* (Query ID).

Em alguns casos, quando se obteve duas ou mais sequências com nomes diferentes, porém com *max score* e *identidade* iguais, a literatura foi consultada para analisar a morfologia do fungo estudado e confirmar com melhor precisão a espécie do organismo.

Após obtenção do nome científico ou gênero de cada fungo, a literatura foi consultada para descobrir qual nicho e quais atividades já foram encontrada sobre os isolados estudados.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

Dos 77 fungos inicialmente isolados, 51 apresentaram significativo crescimento e sem contaminação. Em todos estes, foi realizada a extração de DNA.

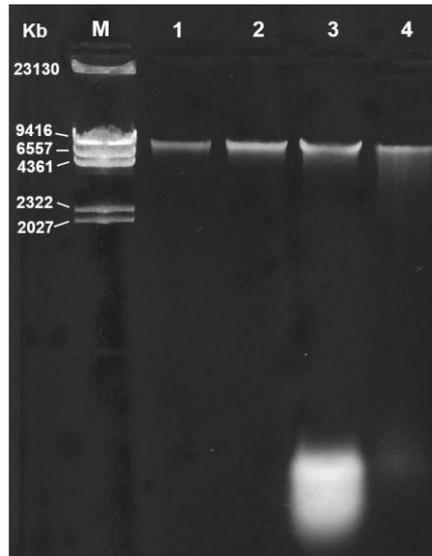


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% das amostras de DNA após extração de DNA de 4 isolados de *Pentacalia desiderabilis*. Kb: tamanhos das bases do marcador utilizado. M: marcador Lambda DNA-HindIII Digest (Biolabs®), onde não foi possível a visualização das bandas de tamanho 564 pb e 125 pb; 1 a 4: DNA de fungos. Amostra 3 com pequeno rastro, mas com a presença de grande quantidade de RNA na parte inferior. Amostra 4 com rastro significativo e pouco RNA.

A figura 1 retrata a extração de DNA obtida de algumas amostras através da visualização com gel de agarose 0,8%. A partir desta imagem, foi possível estimar o tamanho do rDNA, a qualidade e a concentração de cada amostra. Foi estimado que o tamanho do rDNA dos fungos estudados foi entre as bandas de 6557pb a 9416pb, valores estes compatíveis com os encontrados na literatura de Pramateftaki et al. (2000) e Mountfort e Orpin (1994) que estimam um tamanho entre 7 kb e 11 kb.

As amostras foram comparadas com o marcador para se obter uma estimativa da concentração das amostras após extração. Para a realização da técnica de PCR, é necessário de no mínimo 20 ng/μl de DNA e no máximo 100 ng/μl. Foi visto que algumas amostras apresentaram menos de 20 ng/μl, porém, mesmo assim, foi possível realizar a reação.

O rastro encontrado em algumas amostras sinaliza que ocorreu degradação do DNA, o que pode danificar a reação. Porém, em alguns casos, isso não interferiu na amplificação por PCR, uma vez que a degradação ocorrida não afetou a região estudada. Também foi visto que grande parte das amostras demonstraram conter RNA. A presença do RNA não interferiu na amplificação, uma vez que o RNA é uma molécula estável e os *primers* vão apenas se alinhar à molécula de DNA.

Também foi realizada a amplificação por PCR das 51 amostras de DNA extraídas. Todas as amostras apresentaram uma banda de 500 pares de base, como descrito por Araújo et al. (2010).

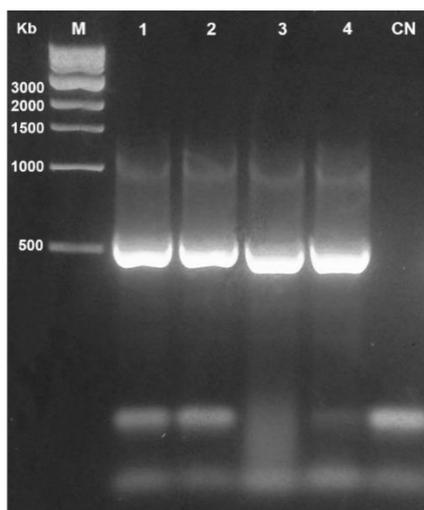


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos produtos de amplificação por PCR obtidos de 4 diferentes isolados de *Pentacalia desiderabilis* utilizando os *primers* ITS 1 e ITS 4. Kb: tamanhos das bases do marcador utilizado. M: marcador 1 kbp DNA ladder (Biolabs®); 1 a 4: produto de PCR de diferentes isolados apresentando banda de 500 pb com alta concentração; CN: controle negativo da reação de PCR apresentando apenas excesso de componentes da reação, sem nenhuma banda aparente, mostrando que não houve contaminação na reação. Região inferior da foto demonstrando excesso de *primers*, DNA e outros componentes da reação;

A figura 2 apresenta 4 diferentes isolados apresentando uma banda de 500 pb. Com o auxílio do marcador molecular utilizado, foi possível estimar que todas as amostras realizadas obtiveram uma concentração superior de 125 ng/ μ l.

Foi visualizado um rastro entre as bandas de 1000 pb e 500 pb que pode interferir no sequenciamento. Já na região inferior da figura, ocorreu a presença de excessos de *primers*, DNA e reagentes que também podem causar interferência.

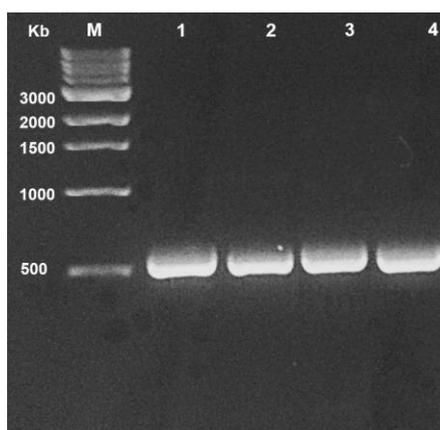


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% dos produtos de amplificação por PCR obtidos de 4 diferentes isolados de *Pentacalia desiderabilis* utilizando os *primers* ITS 1 e ITS 4. Kb: tamanhos das bases do marcador utilizado. M: marcador 1 kbp DNA ladder (Biolabs®); 1 a 4: produto de PCR de diferentes isolados apresentando banda de 500 pb com alta concentração. Todas amostras demonstraram possuir apenas a banda de 500 pb, sem rastros.

Todas as amostras foram purificadas para evitar problemas no sequenciamento. A purificação se mostrou eficiente para a remoção tanto dos rastros e da banda de 1000 pb, quanto de excessos de *primers*, DNA e outros componentes da reação de PCR. Como

mostrado na figura 3, mesmo após a purificação, as amostras continuaram demonstrando possuir mais de 125 ng/μl de concentração.

A quantificação foi realizada em todas essas amostras e foi concluído que possuíram cerca de 72 e 194 ng/μl de concentração, com uma média de 139 ng/μl. Tal fato, confirma a concentração estimada com o uso do marcador. Todas estas amostras foram enviadas para sequenciamento.

Das 51 sequências enviadas, 29 apresentaram uma boa qualidade segundo a tabela obtida no site electropherogram quality analysis, que é um programa *phrap* que permite a montagem de contigs, gera informações sobre eles, permite a manipulação de diversas sequências ao mesmo tempo, dentre outras funções (FORMIGUIERI, 2004). As amostras que foram avaliadas como “Ok” pelo site apresentaram uma quantidade superior de 100 pares de bases com qualidade acima de 20% do total da sequência. Já as avaliadas como “No” não cumpriram alguma dessas duas características e por isso foram descartadas.

Em alguns casos, pode-se obter uma sequência forward definida como “Ok”, porém uma sequência reverse definida como “No”, ou vice-versa. Nestes casos, a obtenção de uma sequência “No” acaba desqualificando a outra sequência, uma vez que é necessário de ambas para formar o contig. Em outros casos, pode ocorrer uma quebra do DNA na região a ser sequenciada. Tal ocorrência, pode resultar em uma fita incompleta e fragmentada com apenas pequenos trechos sequenciados, apresentando baixa quantidade de pares de bases com qualidade acima de 20%, resultando em uma sequência qualificada como “No”.

Para confirmação, as amostras foram visualizadas com o programa BioEdit que é um programa *phred* que permite a aferição da qualidade de cada base obtida, leitura de cromatogramas, visualização e edição dos contigs, dentro outros aspectos (FORMIGUIERI, 2004).

Nos cromatogramas das amostras analisadas, foram atribuídas bases a cada pico observado e valores que indicam a qualidade de cada base. Quanto maior o pico, maior a chance da base indicada no cromatograma ser a correta, portanto, picos baixos podem indicar uma imprecisão na base indicada. Quanto menor a quantidade de bases indefinidas, melhor a sequência para a identificação de indivíduos. O programa também demonstra, logo em cima das bases obtidas, a região da sequência que está sendo observada.

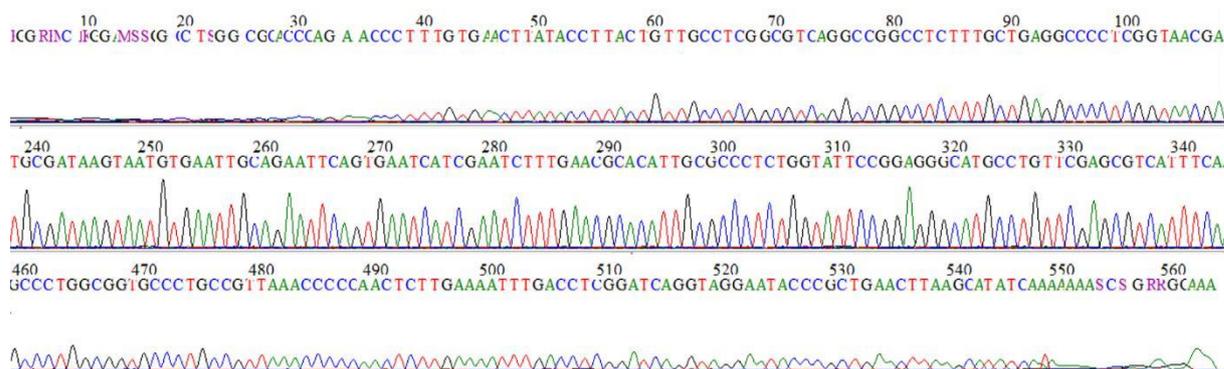


Figura 4 – Sequência foward do isolado P2B visualizada no programa BioEdit. Primeira linha representa o começo da sequência com as primeiras bases obtidas. Segunda linha representa a região central da sequência apresentando uma ótima qualidade. Terceira linha representa a região final da sequência, com as últimas bases obtidas.

A figura 4 demonstra uma sequência foward da amostra P2B que apresentou alta qualidade devido a picos estáveis e únicos em cada região da sequência, apresentando essas características por toda a sequência. É muito comum que a região inicial e a final da sequência apresentem picos muito baixos e bases incertas. O cromatograma de algumas amostras se apresentou com picos muito baixos ou com muita ocorrência de sobreposição entre os picos em grande parte da sequência, principalmente na região central, significando que existia na sequência uma alta quantidade de bandas imprecisas, o que depreciou a qualidade da sequência.

Não foi utilizado um programa unicamente *consed*, uma vez que não houve edição dos contigs e o programa *phrap* utilizado e o BLASTn já permitiram a visualização dos alinhamentos.

O programa BLASTn permite a comparação de uma sequência de nucleotídeos de entrada com um banco de dados de sequências de nucleotídeos. Com ele, podemos obter os parâmetros mais importantes para este estudo: o *score*, identidade e *e-value*. O *score* é uma nota que foi atribuída pelo algoritmo e pela quantidade de pareamentos perfeitos e imperfeitos entre a sequência que vai ser estudada com uma sequência já depositada no GenBank. Quanto maior o *score*, melhor o pareamento, porém o *score* não pode ser analisado individualmente, deve ser acompanhado de outros valores (AMARAL et al., 2007).

O *e-value* representa a probabilidade de que o alinhamento realizado pelo site seja correto ou errôneo, falso positivo. Pode ser considerado como o número esperado de falsos positivos que apresentariam *score* bastante similar. Quanto menor seu valor, menor a chance de se obter um falso positivo, maior sua confiabilidade. Estatisticamente, o *e-value* pode representar um valor significativo de ser um falso-positivo, porém, biologicamente, em alguns casos, o valor obtido pode não ser significativo e se encontrar na faixa ideal. O *e-value* pode ser representado como 0,0, 0,12 ou se apresenta em forma abreviada de notação científica,

como, por exemplo, $3e-25$. Também é importante ressaltar que há maiores chances de sequências pequenas apresentarem um resultado falso positivo (AMARAL et al., 2007).

Identidade é a quantidade de letras com pareamento perfeito identificados no alinhamento da sequência estudada e da armazenada no banco de dados. É expresso em porcentagem e a similaridade entre as sequências é baseada em seu valor (AMARAL et al., 2007).

A partir destes parâmetros obtidos pelo BLASTn, foram escolhidas como certas as sequências que apresentaram maior valor de *score*, maior identidade e menor *e-value* possível.

Segundo Moreira (2013), fungos pertencentes ao filo Ascomycota, podem apresentar problemas em sua identificação caso suas sequências sejam obtidas a partir da região ITS. Para tal, é necessário realizar uma interpretação específica para estas sequências. As sequências com identidade de 99% devem ser consideradas como a mesma espécie, igual a 98% como pertencentes à mesma espécie ou gênero devendo haver sempre uma comparação com sua morfologia, entre 95% e 97% devem ser consideradas apenas o mesmo gênero e as abaixo de 95% como pertencentes à mesma família, classe ou como inconclusiva.

Após a obtenção do sequenciamento, os fungos com boas sequências foram cultivados novamente em duplicatas para verificação de contaminação por outros fungos. Apenas o isolado P28A2 apresentou dois fungos. Os demais estavam totalmente isolados e o L69B não pode ser verificado devido a este se apresentar sem crescimento.

Das 29 sequências, foram obtidos os gêneros *Diaporthe*, *Pestalotiopsis*, *Colletotrichum*, *Epicoccum*, *Ophioceras*, *Phaeosphaeria*, *Paraphaeosphaeria*. A maioria dos fungos pertencem ao gênero *Diaporthe*, sendo as espécies mais frequentes *Diaporthe passiflorae* e *Diaporthe phaseolorum*. Todos os fungos identificados pertencem ao filo Ascomycota.

A partir do alinhamento com sequências previamente depositadas no *GenBank*, os isolados P2B, P28C2 e L58A foram identificados como *Diaporthe passiflorae*, pois apresentaram identidade máxima de respectivamente 98%, 99% e 99%, *e-value* 0.0 e alto *score*.

Os fungos P8, P18, L49, L50A, L62A1 e L62A2 foram identificadas como *Diaporthe phaseolorum*, uma vez que apresentaram identidade de 98% a 99%, *e-value* 0.0 e *score* alto.

Já a amostra L63 apresentou a mesma identidade de 99% para *Diaporthe phaseolorum* e *Diaporthe passiflorae* e mesmo *e-value* de 0,0, porém o primeiro obteve 992 de *score* enquanto que o segundo teve 981 de *score*. Portanto, essa amostra foi classificada como *D.*

phaseolorum. O mesmo caso se apresentou no isolado L48, igual identidade de 99% para *Diaporthe sp.* e *Diaporthe passiflorae* e igual 0,0 e-value, porém *Diaporthe sp.* apresentou 981 de score, enquanto que *D. passiflorae* obteve 970. Este isolado foi classificado como *Diaporthe sp.*

Foram classificados como *Diaporthe sp.* as amostras P28A2, L46A, L67 e 11B por apresentar 98% a 99% de similaridade com *Diaporthe sp.* com alto score e baixo e-value ou por apresentar entre 95% a 97% com alguma espécie do gênero *Diaporthe* com 0.0 de evalue e score de mediano a alto.

Os isolados P2A1, P3, P9, L46B e P22A foram classificadas como pertencentes à família Diaporthaceae por apresentarem valor de identidade entre 92 a 94%, 0,0 e-value e mediano score.

Segundo Gomes et al. (2013), com a deleção do Art. 59 do Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas (ICN), os nomes para organismos iguais que apresentam diferenças quanto ao estado assexuado e sexuado devem ser nomeados igualmente. Como o nome *Diaporthe* foi descoberto em 1870 e o *Phomopsis* em 1905, deve-se ser adotado apenas o nome mais antigo para este grupo de fungos. Portanto, nas amostras P22B1, P28A2 e L46B o gênero obtido como *Phomopsis sp.* foi substituído para *Diaporthe sp.* Sendo assim, o isolado L46B foi classificado como *Diaporthe sp.* devido a uma similaridade de 93%, 0.0 e-value e mediano score.

Já a amostra P28A2, como explicado anteriormente, apresentou contaminação com outro fungo e, portanto, foi classificada como inconclusiva. Enquanto isso, o isolado P22B1 apresentou identidade de 96% e foi identificado como *Diaporthe sp.*, porém demonstrou um e-value de 1×10^{-163} , tal fato é explicado por este isolado ter obtido uma pequena sequência, como discutido anteriormente.

O isolado L56 foi considerado como inconclusivo por apresentar uma sequência com similaridade de 86% e um score de 571, contrastando com a outra sequência obtida de similaridade de 91%, porém com score de 545, menor que o da primeira. Além disso, ainda apresentou um alto e-value de 6×10^{-159} para a primeira sequência e 4×10^{-151} para a segunda. Tais fatos podem ser explicados pelo lento crescimento deste fungo. Devido sua demora para crescer, é provável que se tenha obtido menor quantidade de material para extração de DNA e, portanto, baixa concentração de DNA, prejudicando a amplificação da região ITS.

O isolado L65A foi o que apresentou menor concentração de DNA de todas as amostras "Ok" e apresentou uma similaridade de 99%. Neste, obteve-se duas sequências com a mesma identidade, porém ele foi devidamente classificado como *Colletotrichum gloeosporioides* devido à morfologia comparada com estudos de Waculicz-Andrade (2009).

O isolado L70B foi identificado como *Epicoccum nigrum* devido a obtenção de 99% de similaridade, 0,0 e-value e alto score. Já o fungo L44 foi classificado como *Ophioceras leptosporum* por apresentar uma identidade de 98%, e-value 0,0 e 929 de score. Entretanto, o isolado L64 foi identificado como *Phaeosphaeria sp.* devido uma identidade de 96% e evalue de 8×10^{-152} .

Os isolados L69A e L69B foram primeiramente classificados como fungos endofíticos no *GenBank* com uma similaridade de 99%, score de 1044 e 0,0 e-value. Porém, apresentaram diversas espécies do gênero *Pestalotiopsis* com identidade também de 99%, entretanto com score de 1038. Por fim, foram classificadas como fungo endofítico do gênero *Pestalotiopsis*.

Segundo Verkley (2004), os organismos *Paraphaeosphaeria sp.* e *Paraconiothyrium sp.* pertencem ao mesmo gênero *Paraphaeosphaeria sp.* O isolado P23, portanto, foi identificado como *Paraphaeosphaeria sp.*, uma vez que apresentou similaridade de 99% com *Paraphaeosphaeria neglecta* e *Paraconiothyrium sporulosum*, apresentando também o mesmo score de 1037.

Espécie ou gênero	Nicho	Função	Referências
<i>Diaporthe sp.</i>	Endofítico, fitopatígeno, saprofítico e patógeno	Anticancerígeno, antioxidante, antifúngico, inseticida e antibacteriano	GOMES et al., 2013; EL-FAR et al., 2013; BIASETTO, 2016; BORGES, 2008; PES, 2015
<i>Diaporthe passiflorae</i>	Fitopatígeno	Sem relatos	ELFAR et al., 2013
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	Endofítico, fitopatígeno e patógeno	Produz derivados dicetopiperazinas	FERNÁNDEZ; HANLIN, 1996; GOMES et al., 2013; BORGES, 2008
<i>Paraphaeosphaeria sp.</i>	Endofítico e saprofítico	Antimicrobiano, antifúngico, antitumoral e compostos citotóxicos	DOURADO et al., 2016; WONG et al., 2000; WIJERATNE et al., 2004
<i>Ophioceras leptosporum</i>	Sapofítico	Antibacteriana, compostos citotóxicos, antitumorais e antioxidantes	MONKAI et al., 2013
<i>Phaeosphaeria sp.</i>	Fitopatígeno	Antimicobacteriana e citotóxica	SACHS et al., 2011; PITTAYAKHAJONWUT et al., 2008
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Endofítico, fitopatígeno e saprofítico	Antimicrobiana, antidepressiva, anti-inflamatória, antioxidante e antitumoral	WACULICZ-ANDRADE, 2009; MOREIRA, 2013; MARTINS et al., 2005; BIASETTO, 2016
<i>Pestalotiopsis sp.</i>	Endofítico, saprofítico, fitopatígeno e epífita	Anticancerígeno, antidiabético, antifúngico, antioxidante e antitumorais	KRUSCHEWSKY, 2010; OSONO, 2008; MOREIRA, 2013
<i>Epicoccum nigrum</i>	Epífita, endofítico, patógeno e saprofítico	Antioxidante, antirretroviral, antitumoral, antifúngica e bactericida	FERREIRA, 2016; ARAÚJO, 2012

Tabela 1 – Relação entre gêneros e espécies obtidas dos isolados, seu nicho ecológico, sua função e devidas referências.

A tabela 1 apresenta o nome científico e os gêneros encontrados, nicho a qual o fungo pertence, tipo de atividade que o fungo pode exercer e literatura dos dados encontrados. Não foi incluída a família encontrada em alguns isolados. Saber as propriedades que estes fungos são capazes de oferecer pode auxiliar os estudos biotecnológicos atualmente e facilitar futuros estudos contribuindo no descobrimento de novas moléculas e novas propriedades.

Apesar de alguns isolados obtidos neste trabalho serem considerados fitopatógenos na literatura, os organismos foram extraídos a partir de partes sadias de *P. desiderabilis* sem nenhuma doença aparente, o que indica que é muito provável que eles sejam endofíticos deste vegetal. Segundo Borges (2008), é difícil classificar um organismo corretamente em endofítico, epifítico ou fitopatógeno, visto que ainda não há estudos suficientes para distinguir o limite de cada uma dessas categorias. Com isso, alguns autores podem classificar erroneamente um determinado organismo.

Portanto, foram encontrados 7 endofíticos identificados como *D. phaseolorum*, 1 *C. gloeosporioides* e 1 *E. nigrum*. Já a nível de gênero, foram encontrados 7 isolados com gênero *Diaporthe*, 2 *Pestalotiopsis* e 1 *Paraphaeosphaeria* com possíveis fungos endofíticos. Ao todo, 2 foram considerados inconclusivos e os demais não apresentam características de endofíticos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo, foi possível estudar a presença de fungos endofíticos associados à *P. desiderabilis* presente em Campos do Jordão, São Paulo. Esta possui uma interessante e singular comunidade natural de fungos endofíticos. Foram identificados 29 fungos inicialmente isolados por meio do sequenciamento das regiões ITS1 e ITS4 do rDNA. Os isolados pertencem aos gêneros *Diaporthe*, *Pestalotiopsis*, *Colletotrichum*, *Epicoccum*, *Ophioceras*, *Phaeosphaeria*, *Paraphaeosphaeria*. Dentre as espécies identificadas, *Diaporthe* foi o gênero mais frequente, sendo as espécies *Diaporthe phaseolorum* e *Diaporthe passiflorae* as mais encontradas.

Para a correta identificação dos isolados, os seguintes aspectos devem ser cuidadosamente observados: é necessário obter entre 20 ng/μl e 100ng/μl de concentração de DNA após extração, porém é possível realizar a técnica com menor concentração; a degradação do DNA pode ser evitada tomando cuidados ao realizar a extração e ao armazenar as amostras; o RNA não interfere na amplificação; uma alta concentração obtida após amplificação não garante sequências com boa qualidade; a purificação deve ser realizada com cuidado e com um kit ou técnica de boa qualidade; é necessário uma precisa análise das sequências forward e reverse de cada amostra; o programa *phred* permite

confirmar a qualidade das amostras; o *score* obtido deve ser alto e analisado com o *e-value* e identidade; o *e-value* deve ser baixo e sua correta análise permite a eliminação de resultados falso-positivos; contigs pequenos podem interferir nos valores de *e-value* e *score*; identidade deve ser alta e seu valor pode definir a classificação dos organismos.

Devido à alta quantidade de fungos obtidos pertencentes ao gênero *Diaporthe*, uma melhor caracterização e agrupamento em morfoespécies deveria ter sido realizada. Recomenda-se também que os isolados que não foram sequenciados e os que apresentaram baixa similaridade sejam submetidos novamente ao processo de extração de DNA e produção de seus amplicons para correta identificação.

Por fim, maiores estudos devem ser realizados para avaliar a presença de outros fungos associados à *P. desiderabilis* que não foram obtidos neste estudo e também para avaliar novos bioativos que podem ser extraídos destes fungos.

6. REFERÊNCIAS

AMARAL, A. M.; REIS, M. S.; SILVA, F. R. (Ed.). **O programa BLAST: guia prático de utilização** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, Distrito Federal: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, dez. 2007. 24 p.

ARAÚJO, F. D. S. **Aspectos da ecologia química de *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.), *Epicoccum nigrum* e *Tetragonisca angustula***. Campinas: UNICAMP, 2012. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

ARAÚJO, W. L.; LACAVA, P. T.; MARCON, J.; LIMA, A. O. S.; KUKLIMSKYSOBRAL, J.; KLEINER-PIZZIRANI, A. A.; AZEVEDO, J. L. (Coord.). **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2010. p. 167.

ARRUDA, M. C. C. de; FERREIRA, M. A. S.; MILLER, R. N. G.; RESENDE, M. L. V.; FELIPE, M. S. S. Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis perniciosus* from different geographic origins and hosts. **Mycological Research**, Brasil, v. 107, n. 01, p. 25-37, 2003

AZEVEDO, J. L. de. Microorganismos endofíticos. In: AZEVEDO, João Lúcio de; MELO, Itamar Soares de. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa, 1998. Cap. 4. p. 117-137.

BIASETTO, C. R. **Fungos endofíticos em *Eugenia brasiliensis*: prospecção química, biológica, enzimática e avaliação do co-cultivo e epigenética em *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp. e *Colletotrichum* sp.** Araraquara: UNESP, 2016. 69 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química Júlio de Mesquita Filho, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

BORGES, W. S. **Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformações**. Ribeirão Preto: USP, 2008. 350 f. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAÚJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, Araraquara, v. 5, n. 3, p. 421-437, nov. 2012.

ELFAR, K; TORRES, R.; DIAZ, G. A.; LATORRE, B. A. Characterization of *Diaporthe australafricana* and *Diaporthe spp.* Associated with Stem Canker of Blueberry in Chile. **Plant Disease**, Chile, v. 97, n.8, p. 1042-1050, jul. 2013.

DOURADO, C. P.; AMORIM, M. R.; BOTERO, W. B.; PEIXOTO, T.; SANTOS, L. C. Avaliação do perfil químico do fungo endofítico *Paraphaeosphaeria sporulosa* isolado das folhas de *Paepalanthus planifolius* (Bong) Korn (Eriocaulaceae). **Rev. Cien. Farm. Básica Apl.**, Araraquara, v. 37, p. 1, ago. 2016

FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Fungos endofíticos: potencial como controladores biológicos e estudos em videiras. **UNINGÁ Review**, Maringá, v. 1, n. 14, p. 13-25, abr. 2013.

FERNÁNDEZ, F. A.; HANLIN, R. T. Morphological and ARPD Analyses of *Diaporthe phaseolorum* from Soybean. **Mycologia**, Nova York, v. 88, n. 3, p. 425-440, 1996.

FERREIRA, A. J. **Análise e anotação do genoma de *Epicoccum nigrum* e metabolismo secundário**. São Paulo: USP, 2016. 136f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de PósGraduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

FORMIGHIERI, E. F. **Phred phrap consed**. Campinas: Laboratório de Genômica e Expressão da UNICAMP, 2004. 28 p.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Londrina, v. 14, p. 12-16, 2000.

FUNK, V. A.; SUSANNA, A.; STUESSY, T. F.; BAYER, R. J. (2009). **Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae**. Vienna: Handcover IAPT, 2009. p. 1000.

GOMES, R. R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, S. I. R.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**, v. 31, p. 1-41, 2013.

KRUSCHEWSKY, M. C. **Taxonomia e ecologia do gênero *Pestalotiopsis* no Brasil, com ênfase para a Mata Atlântica do sul da Bahia**. Ilhéus: UESC, 2010. 68f. Dissertação (Mestrado em Produção vegetal) – Programa de pós-graduação em produção vegetal, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010

KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes?. **Nat. Prod. Rep**, Alemanha, v. 28, p. 1203-1207, 2011.

LUCERO, M. E.; BARROW, J. R.; OSUNA, P.; REYES, I. Plant-fungal interactions in arid and semi-arid ecosystems: Large-scale impacts from microscale processes. **Journal of Arid Environments**, New Mexico, n. 65, p. 276-284, 2006.

MAIER, W.; HAMMER, K.; DAMMANN, U.; SCHULZ, B.; STRACK, D. Accumulation of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives induced by an arbuscular mycorrhizal fungus in members of the Poaceae. **Planta**, Alemanha, n. 202, p. 36-42, 1997.

MONKAI, J.; CHUKEATIROTE, E.; CHAMYUANG, S.; SYNITSYA, A.; RUMI, T.; HYDE, K. D. Antimicrobial activity of some saprobic fungi isolated from *Magnolia liliifera* and *Cinnamomum iners* leaves. **Mycology**, v. 4, n. 2, p. 82-84, 2003.

MOREIRA, M. G. **Diversidade e atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O., Kuntze**. Ouro Preto: UFOP, 2013. 68f.

Dissertação (Mestre em Biotecnologia) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Núcleo de pesquisa em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, 2013.

MOUNTFORT, D. O.; ORPIN, C. G. **Anaerobic fungi: biology, ecology and function**. 12. v. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 291

NETO, P. Q. C. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos da Pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) e caracterização por marcadores moleculares**. Manaus: UFA, 2002. 103f. Dissertação (Mestre em Genética e Evolução) – Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, Manaus, 2002.

OKI, Y.; SOARES, N.; BELMIRO, M. S.; JUNIOR, A. C.; FERNANDES, G. W. Influência dos fungos endofíticos sobre os herbívoros de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Neotropical Biology and Conservation**, Minas Gerais, v. 4, n. 2, p. 83-88, ago. 2009.

PES, M. P. **Metabólitos secundários obtidos de *Diaporthe* sp. aplicados para o controle de plantas daninhas**. Santa Maria: UFSM, 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015

PIMENTEL, I. C.; FIGURA, G.; AUER, C. G. Fungos endofíticos associados a acículas de *Pinus taeda*. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 36, n. 1, p. 85-88, 2010.

PITTAYAKHAJONWUT, P.; SOHSOMBOON, P.; DRAMAE, A.; SUVANNAKAD, R.; LAPANUN, S.; TANTICHAREON, M. Antimycobacterial substances from *Phaeosphaeria* sp BCC8292. **Planta Med.**, Tailândia, v. 74, p. 281-286, 2008

PRAMATEFTAKI P.V., ANTONIOU P.P., TYPAS M.A. The complete DNA sequence of the nuclear ribosomal RNA gene complex of *Verticillium dahliae*: intraspecific heterogeneity within the intergenic spacer region. **Fungal Genet Biol**. v. 29, n. 2, p. 135-43. 2000.

RAVEN, Peter H.; EVERT, Ray F.; EICHHORN, Susan E. **Biologia Vegetal**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 876.

RODRIGUES, R. L. **Fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* Mart. Ex Schult F. (Velloziaceae) presente em afloramentos rochosos nos estados de Minas Gerais e Tocantins**. Ouro Preto: UFOP, 2010. 70f. Dissertação (Mestre em Ecologia de Biomas Tropicais) – Programa de Pós-graduação em Ecologia de Biomas Tropicais, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.

SACHS, P. J. D.; NEVES, C. S. V. J.; CANTERI, M. G.; SACHS, L. G. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha branca em milho. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 37, n. 4, p. 202-204, 2011.

SALLES, J. F.; SOUZA, F. A. **Revisões em micorriza I: Técnicas moleculares aplicadas ao estudo dos fungos micorrízicos arbusculares**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 24p, 1998.

SARA. Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária de Pernambuco. **Isolamento, identificação, estudo molecular e biocontrole de fungos de solo em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Recife: Instituto Agrônomo de Pernambuco, 2011. p. 40.

SILVA, G. H.; OLIVEIRA, C. M. de; TELES, H. L.; BOLZANI, V. da S.; ARAÚJO, A.R.; PFENNING, L. H.; YOUNG, M. C. M.; COSTA-NETO, C. M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Citocalasinas produzidas por *Xylaria* sp., um fungo endofítico de *Piper aduncum* (PIPERACEAE). **Quim. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2038-2041, 2010.

SOUZA, A. Q. L. de; SOUZA, A. D. L. de; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIZ, M. I. de M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, Amazonas, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

TELES, A. M. **Contribuição ao estudo taxonômico da tribo Astereae no Brasil e Senecioneae (Asteraceae) no estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte: UFMG, 2008. p. 256. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

TELES, A. M.; STEHMANN, J. R. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Asteraceae – Senecioneae. **Bol. Bot. Univ**, São Paulo, v. 29, n.1, p. 57-68, 2011.

THOMPSON, F. L.; OLIVEIRA, V. M. de. **Taxonomia Microbiana**. Brasil: CRIA, 2005. p. 35.

VERKLEY, G. J. M.; SILVA, M.; WICKLOW, D. T.; CROUS, P. W. *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 323-335, 2004.

WACULICZ-ANDRADE, C. E. **Variabilidade genética de fungos do gênero Colletotrichum de plantas cítricas e da vegetação espontânea**. Curitiba: UFP, 2009. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

WHITE Jr., J. F.; MORROW, A. C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. **Mycologia**, 82, p.218-226, 1990.

WHITE, T.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.J.J.; SNINSKY, J.J. & WITHE, T.J. **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. New York, Academic Press, p.315-322, 1990.

WIJERATNE, E. M.; CARBONEZI, C. A.; TAKAHASHI, J. A.; PIERSON, E. E.; PIERSON III, L. S.; VANETTEN, H. D.; WHITESELL, L.; BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L. Isolation, optimization of production and structure-activity relationship studies of Monocillin I, the cytotoxic constituent of *Paraphaeosphaeria quadriseptata*. **The Journal of antibiotics**, v. 57, n. 8, p. 541-546, aug. 2004.

WONG, M. K. M.; GOH, T.; HYDE, K. D. *Paraphaeosphaeria schoenoplecti* sp. nov. from senescent culms of *Schoenoplectus litoralis* in Hong Kong. **Fungal Diversity**, v. 4, p. 171-179, 2000.