Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Diversidade genética e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de manguezais do estado de São Paulo

Fernanda Luiza de Souza Sebastianes

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2010

Fernanda Luiza de Souza Sebastianes
Farmacêutica

Diversidade genética e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de manguezais do estado de São Paulo

Orientadora:
Prof[a]. Dr[a]. **ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Sebastianes, Fernanda Luiza de Souza
Diversidade genética e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de manguezais do estado de São Paulo / Fernanda Luiza de Souza Sebastianes. - - Piracicaba, 2010.
150 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Agrobacterium 2. Antibióticos 3. Biotecnologia de plantas 4. Diversidade genética 5 Ecossistemas de mangue 6. Esterificação 7. Fungos 8. Ressonância magnética nuclear I. Título

CDD 589.2
S443d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Ao meu marido Fernando Moreno Sebastianes,

pelo seu amor

DEDICO

Aos meus queridos pais, Celso e Marlete,
e ao meu irmão Cleber, cunhada Mirela
e amada sobrinha Ana Cristina

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos à professora Doutora Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner, pela orientação, confiança, amizade e liberdade concedida para a execução desse trabalho;

Aos Professores Dr. Welington Luiz de Araújo e Dr. João Lúcio de Azevedo, pela oportunidade de realização do trabalho no Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo" e também pelos ensinamentos, presença motivadora e valiosas sugestões;

Ao Prof. Dr. Diego Miguel Cortes Martinez, por me receber em seu laboratório e me orientar durante o estágio de Doutorado realizado na Universidade de Valência, Valência, Espanha;

Ao meu querido marido Fernando Moreno Sebastianes, pela paciência, amor e sensibilidade, e pela convivência de todos esses 14 anos felizes juntos;

Aos meus pais, Marlete e Luiz Celso, por todo apoio e amor, fundamentais para eu desenvolver e concluir esse trabalho;

Aos meus queridos irmão Cleber e cunhada Mirela, e à minha amada sobrinha Ana Cristina, pelos momentos divertidos, pelo apoio e amizade incondicionais;

Às queridas amigas do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo": Aline Silva Romão, Ana Paula Pallu, Andréa Bogas, Léia C. L. Fávaro, Manuella Dourado, Maria Beatriz Calderan, Maria Carolina Quecine, Marise Suzuki, Priscilla B. Rossetto e Renata Assis, pelo companheirismo;

À todos os colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo", que passaram ou ainda fazem parte, com os quais eu convivi nos últimos seis anos: Adalgisa R. Torres, Andréa Guelfi, Ágata C. H. Giancoli, Aldo Procópio, Alessandro Riffel, Aline Silva Romão, Anderson Ferreira, André Lima, Antonio Sérgio F. Filho, Armando Dias, Camila, Carlos E. Ceroni (K-du), Carlos I. Aguilar-Vildoso, Carolina Almeida, Cláudia S. Gai, Cristina Almeida, Cristina S. Maki, Cristiane Fasanella, Danice Luvizotto, Denise Balani, Fernanda Bernardes, Fernanda Bueno, Fernando Barcellos, Francisco D. Andreote, Heloíze Milano, Joelma Marcon, José Antonio da Silva (Zezo), Júlia Kuklinsky-Sobral, Laura Assunção, Luciana Ávila, Luciana Cursino, Marcelo Gullo, Maria Clara Pestana, Mayra K. Martins, Paulo T. Lacava, Natalie Andreoli, Rodrigo Mendes, Rodrigo Stuart, Rudi E. Procópio, Sarina Tsui, Tais G. Lana, Uirá C. F. Belmonte, Vanessa dos Santos, Vivian C. Pietrobon, pela enriquecedora convivência, pelo aprendizado e orientação e excelente ambiente de trabalho;

Aos amigos de Valência, Espanha: Diego, Ilde Alfonso, Jaime, Juan, Laura, Manolo, Maria, Nouredine, Nuria, Pablo, Paloma, Patricia, Pillar, Sandra, Sonia e Vicente, por me receberem com carinho e pelo agradável clima de trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Genética de Leveduras/ESALQ, pela ajuda durante o desenvolvimento de experimentos e agradável convivência, em especial ao Dr. Luiz Humberto

Gomes pela amizade e ajuda concedida durante o doutorado, e principalmente por permitir a utilização do rotaevaporador para obtenção de extratos orgânicos;

À amiga Aline Silva Romão, pelo auxílio nas análises dos dados de diversidade genética e pela leitura da tese;

Ao colega Anderson Ferreira pelo auxílio nas análises de microscopia de fluorescência;

À Dr[a]. Léia C. L. Fávaro, pela ajuda nos experimentos de transformação genética mediada pelo sistema *Agrobacterium tumefaciens*;

Às colegas de trabalho Aline, Ana Paula, Bia, e Renata, pela ajuda no isolamento de fungos endofíticos de manguezais;

À Prof[a]. Dr[a]. Margarida L. R. Aguiar-Perecin e ao Prof. Mateus Mondin, do Laboratório de Citogenética Molecular de Plantas, por permitirem a utilização do microscópio de epifluorescência nas análises do presente trabalho;

À Dr[a]. Mônica T. V. Labate, do laboratório Max Feffer de Genética de Plantas/ESALQ-USP, pela ajuda na realização do experimento *Southern blot*;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate, pela disponibilização das linhagens desarmadas de *Agrobacterium tumefaciens* e disponibilização de equipamentos em seu laboratório;

Às secretárias Léia e Neusa, e aos funcionários Fernando, Valdir e Macedônio, pela ajuda sempre presente;

Ao CNPq, FAPESP e banco Santander pelo apoio financeiro;

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Genética e do curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ/USP;

À todos que direta ou indiretamente participaram na realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigada!

Sede firme, forte e corajoso...”

Josué, capítulo 1, versículo 9

SUMÁRIO

RESUMO.....13
ABSTRACT 15
1 INTRODUÇÃO 17
1.1 Revisão Bibliográfica.....18
1.1.1 Importância dos manguezais.....18
1.1.2 Diversidade genética de fungos em manguezais.....20
1.1.3 Microrganismos endofíticos.....23
1.1.4 Fungos endofíticos.....24
1.1.5 Biossíntese de antibióticos em microrganismos.....25
1.1.6 Transformação genética de fungos pelo sistema *Agrobacterium tumefaciens* 26
1.1.7 Caracterização química de compostos bioativos.....28
1.1.7.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....28
1.1.7.2 Espectrometria de Massas.....30
Referências.....32
2 **DIVERSIDADE GENÉTICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE MANGUEZAIS DO ESTADO DE SÃO PAULO**.....43
Resumo.....43
Abstract 44
2.1 Introdução 45
2.2 Desenvolvimento 46
2.2.1 Material e métodos 46
2.2.1.1 Material vegetal e locais de coleta.....46
2.2.1.2 Isolamento de fungos endofíticos de plantas dos manguezais.....46
2.2.1.3 Purificação e estoque de fungos.....47
2.2.1.4 Identificação molecular 48
2.2.1.5 Análise estatística.....49
2.2.1.6 Análise de diversidade, riqueza e rarefação.....49
2.2.2 Resultados 50
2.2.2.1 Isolamento de fungos endofíticos do manguezal de Bertioga e Cananéia.....50
2.2.2.2 Comunidade Fúngica endofítica Associada aos manguezais.....56
2.2.2.2.1 Classificação taxonômica dos isolados fúngicos.....56
2.2.2.2.2 Gêneros fúngicos observados com maior freqüência.....68
2.2.2.2.3 Gêneros fúngicos observados em menor frequência.....71
2.2.2.4 Diversidade, riqueza e rarefação da comunidade endofítica.....82
2.3 Conclusão 86
Referências... 86
3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO FUNGO *Diaphorte phaseolorum* MEDIADA PELA *Agrobacterium tumefaciens*.....93
Resumo 93
Abstract.....94
3.1 Introdução 95
3.2 Desenvolvimento 96
3.2.1 Material e métodos 96

3.2.1.1 Linhagens patogênicas e condições de cultivo.....96
3.2.1.2 Seleção de fungos endofíticos produtores de antibióticos.....97
3.2.1.3 Transformação Mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.....97
3.2.1.3.1 Isolado transformado.....97
3.2.1.3.2 Otimização do Protocolo de Agrotransformação.....98
3.2.1.3.3 Linhagem de *Agrobacterium tumefaciens*, vetor de transformação e condições de cultivo.....98
3.2.1.3.4 Teste de sensibilidade a higromicina B.....100
3.2.1.3.5 Purificação e Estoque de Fungos.....100
3.2.1.3.6 Confirmação da transformação por PCR (Polymerase Chain Reaction).....101
3.2.1.3.7 Análise da estabilidade mitótica dos transformantes.....101
3.2.1.3.8 Análise dos transformantes por *Southern blot*.....102
3.2.1.3.9 Extração do plasmídio pFAT-gfp, preparo da sonda e hibridação molecular.....103
3.2.1.4 Clonagem e sequenciamento das regiões que flanqueiam o T-DNA.....104
3.3 Resultados e discussões.....105
3.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos de manguezais do estado de São Paulo.....105
3.3.2 Transformação genética do fungo endofítico *Diaporthe phaseolorum*.....107
3.3.2.1 Sensibilidade de *D. phaseolorum* linhagem 41.1(1) à higromicina B.....107
3.3.2.2 Transformação genética de *D. phaseolorum* mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.....107
3.3.2.3 Análises dos transformantes relacionadas à estabilidade mitótica e expressão de GFP 110
3.3.2.4 Confirmação da transformação por PCR (Polymerase Chain Reaction).....111
3.3.2.5 Análise por *Southern blot*.....112
3.3.3 Teste de antagonismo 113
3.3.4 Análise das sequências flanqueadoras do T-DNA por TAIL-PCR.....114
3.4 Conclusão.....116
Referências.....116
4 IDENTIFICAÇÃO DO ANTIBIÓTICO ÁCIDO 3-HIDROXIPROPIÔNICO PRODUZIDO PELO FUNGO ENDOFÍTICO *Diaporthe phaseolorum* POR MEIO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR E ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....123
Resumo..... .123
Abstract..... .124
4.1 Introdução ..... .125
4.2 Desenvolvimento.....126
4.2.1 Material e métodos.....126
4.2.1.1 Linhagens patogênicas e condições de cultivo.....126
4.2.1.2 Avaliação do Potencial Biotecnológico do fungo endofítico *Diaporthe phaseolorum*.....127
4.2.1.3 Condições de cultivo para obtenção de extratos orgânicos fúngicos em pequena escala.....127
4.2.1.4 Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos orgânicos.....128
4.2.1.5 Cultivo em grande escala do fungo endofítico *D. phaseolorum*.....128
4.2.1.6 Determinação do sistema de solventes utilizado como fase móvel na coluna.....129

4.2.1.7 Purificação do antibiótico em coluna.....130

4.2.1.8 Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....130
4.2.1.9 Espectrometria de massa (MS).....131
4.2.1.10 Modificação da estrutura química do antibiótico.....131

4.2.1.11 Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos orgânicos.....132
4.2.2 Resultados e Discussão.....132

4.2.2.1 Atividade antimicrobiana de extratos brutos obtidos em pequena escala.....132
4.2.2.2 Purificação do antibiótico em coluna.....135

4.2.2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana das frações obtidas da coluna.....136

4.2.2.4 Coluna com a fração [171-180].....137

4.2.2.5 Análise da fração pura [6-44] por meio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear.....138

4.2.2.6 Espectrometria de massa (MS).....142

4.2.2.7 Reação química de esterificação do antibiotico ácido 3-hidroxipropiônico.....143

4.3 Conclusão.....147

RESUMO

Diversidade genética e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de manguezais do estado de São Paulo

Manguezais são ecossistemas localizados na confluência de terra e mar, característicos de áreas tropicais e subtropicais, cobrindo cerca de 18,1 milhões de hectares do planeta. A grande biodiversidade encontrada nestes ambientes ressalta a importância da busca por conhecimentos à seu respeito, como o estudo sobre novos princípios ativos derivados de microrganismos endofíticos presentes nas plantas de manguezais. Desta forma, o propósito do presente trabalho foi determinar a diversidade genética da comunidade de fungos endofíticos presentes em folhas e ramos das principais espécies arbóreas de manguezais de Cananéia e Bertioga (situados no estado de São Paulo, Brasil), e avaliar o potencial biotecnológico destes fungos em relação à produção de antibióticos contra os patógenos humanos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli,* e contra o fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis citri* . Os resultados da primeira etapa do trabalho, que envolveu o isolamento e a caracterização de fungos endofíticos filamentosos, mostraram que a comunidade fúngica associada às plantas de manguezais é formada por pelo menos 35 gêneros diferentes, sendo que os gêneros mais frequentes foram *Diaporthe*, *Fusarium, Trichoderma*, *Colletotrichum* e *Xylaria.* Grande parte dos gêneros encontrados neste trabalho é de fungos de solo, indicando que eles estão adaptados às condições adversas dos manguezais. Os resultados mostraram que, dentre as linhagens produtoras de antibiótico, 29,41% pertencem ao gênero *Diaporthe*, o qual apresentou maior frequência na comunidade fúngica estudada. Após a avaliação de 344 fungos quanto ao potencial de atividade antimicrobiana, foi selecionada a linhagem 41.1(1) de *D. phaseolorum,* um endófito de folha de *Laguncularia racemosa*, para elucidação da estrutura química do seu antibiótico purificado. Por meio das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear e de Espectrometria de Massas o antibiótico foi identificado como ácido 3-hidroxipropiônico o qual apresentou atividade frente aos patógenos humanos *Staphylococcus aureus* e *Salmonella tiphy*. A estrutura química deste antibiótico foi modificada por meio de reação química de esterificação de Fischer-Speier para avaliar a relação da estrutura química e atividade biológica deste composto. O produto final da reação química de esterificação do antibiótico ácido 3-hidroxipropiônico não apresentou atividade antimicrobiana, indicando que o grupo hidroxila removido na reação é importante na atividade farmacológica desse composto. Além disso, a linhagem 41.1(1) de *D. phaseolorum* foi transformada geneticamente pelo sistema *Agrobacterium tumefaciens,* visando a obtenção de transformantes deficientes para produção de antibiótico e, com isso, a identificação de genes relacionados com a via de biossíntese do antibiótico ácido 3-hidroxipropiônico. A análise das sequências que flanqueiam o T-DNA, obtidas por TAIL-PCR, mostraram que os genes interrompidos nos transformantes estão relacionados com proteínas de domínios conservados envolvidos com diferentes funções como: translação de proteínas, homeostase do íon orgânico Mg^{2+}, transporte intracelular, migração, adesão e proliferação celular e outras funções celulares. A caracterização da biblioteca de agrotransformantes constitui uma ferramenta importante para o estudo da biologia molecular de fungos que produzem compostos bioativos por meio do seu metabolismo secundário.

Palavras-chave: Fungo; Diversidade; Mangue; Ácido 3-hidroxipropiônico; Ressonância Magnética Nuclear; *Diaporthe phaseolorum*; *Agrobacterium tumefaciens*; Antibiótico; Esterificação de Fischer-Speier

ABSTRACT

Genetic diversity and biotecnological potential of endophytic fungi from mangroves at São Paulo State

Mangroves are ecosystems situated beyond land and sea. They are more frequently found in tropical and subtropical areas englobing around 18.1 millions of hectares in the planet. The great biodiversity found in these ecosystems shows the importance of researching them, including studies regarding new compounds derived from endophytic fungi that inhabit these ecosystems. Therefore, the goal of this study was to determine the genetic diversity of the fungal endophytic community found in leaves and branches of the main arboreal species from mangrove of Cananéia and Bertioga (situated in São Paulo state, Brazil), and to evaluate the biotechnological potential of these fungi concerning the production of antibiotics against the human pathogens *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli,* and against the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis citri* . The results of the first part of this work, including the isolation and characterization of the filamentous endophytic fungi, showed that the mangrove fungal community is made up of at least 35 different genera, from which the most frequent are *Diaporthe*, *Fusarium, Trichoderma*, *Colletotrichum* and *Xylaria.* Most of the fungal genera found in this study come from soil, which suggests that they are adapted to the adverse conditions of mangroves. The results show that among the antibiotic-produncing strains, 29.41% belong to the genus *Diaporthe*, which was the most frequently found in the studied fungal community. After the analysis of 344 fungi regarding the antibiotic activity potential, a strain of *D. phaseolorum* (a leaf endophyte of *Laguncularia racemosa*) was selected to unveil the chemical structure of their purified antibiotic. The nuclear magnetic resonance and the mass spectrometry techniques allowed the identification of the antibiotic as 3-hidroxypropionic acid, which displayed activity against the pathogens *Staphylococcus aureus* and *Salmonella tiphy*. The chemical structure of this antibiotic was modifyed by the chemical reaction of Fischer-Speier sterification in order to evaluate the chemical structure and biological activity of this compound. The final product of the chemical reaction of 3-hidroxipropionic acid sterification had no antibiotic activity, which suggests that the hydroxil group removed from the reaction is important to the pharmachological activity of this compound. Additionally, the strain 41.1(1) of *D. phaseolorum* was genetically transformed by the *Agrobacterium tumefaciens* system, in order to generate antibiotic–deficient transformants, which would help to identify genes related to the biosynthesis pathway of the 3-hidroxypropionic acid antibiotic. The TAIL-PCR analysis revealed that the interrupted genes in the tranformants are related to proteins from conserved domains involved in different functions such as protein translation, Mg^{2+} ion homeostasis, intracellular transport, migration, adhesion and cellular proliferation and other cellular functions. The characterization of the agrotransformants library is an important tool to unveiling the molecular biology of fungi that produce bioactive compounds by the secondary metabolism.

Keywords: Fungus; Diversity; 3-hidroxipropionic acid; Nuclear magnetic resonance; *Diaporthe phaseolorum*; *Agrobacterium tumefaciens*; Antibiotic; Fischer-Speier esterification

1 INTRODUÇÃO

O termo manguezal é frequentemente utilizado para se referir às plantas e à sua comunidade associada. Esta última é composta por uma ampla gama de organismos pertencentes a diferentes grupos incluindo bactérias, fungos, microalgas, invertebrados, pássaros e mamíferos. Os manguezais cobrem aproximadamente 60 a 70% da costa tropical e subtropical do mundo. Brasil, Indonésia e Austrália são os países que apresentam maior abundância desse ecossistema. Na América Latina, os manguezais cobrem aproximadamente 4 milhões de hectares em ambas as costas do Atlântico e do Pacífico. No Brasil, esse ambiente pode ser encontrado desde o Cabo Orange no Amapá até o sul de Santa Catarina na foz do rio Ararangua cobrindo uma área de 25.000 km^2, dos quais aproximadamente 231 km^2 encontram-se no estado de São Paulo. A região da baixada santista, constituída pelos municípios de Bertioga, Cubatão, Guarujá, Itanhaém, Mongaguá, Peruíbe, Praia Grande, Santos e São Vicente, apresenta 1.716,6 km^2 de cobertura vegetal, a qual é constituída por 6% de vegetação de mangue.

Apesar da importância dos microrganismos, muito pouco da diversidade existente é conhecida, tornando imperativa a exploração de microrganismos de ecossistemas como os manguezais brasileiros. A versatilidade bioquímica e diversidade biológica de fungos endofíticos representam uma enorme variedade de genes que ainda são desconhecidos, os quais podem apresentar importantes aplicações biotecnológicas e agrícolas. Por essa razão, o presente trabalho avaliou a comunidade fúngica presente nos manguezais brasileiros através do estudo da diversidade de fungos endofíticos associados aos ramos e às folhas de três espécies arbóreas de manguezais (*Rhizophora mangle, Laguncularia racemosa* e *Avicennia nitida*), levando em consideração possíveis efeitos de diferentes fatores, como as espécies de plantas, o órgão vegetal (ramo e folha), a estação do ano (verão e inverno) e os locais de coleta (Cananéia e Bertioga – impactado e não impactado). Esses estudos são importantes, pois alterações na comunidade fúngica podem estar relacionadas com o equilíbrio do ecossistema, estabilidade, estabelecimento da planta e rendimento.

Considerando a necessidade crescente da busca por microrganismos produtores de novos compostos bioativos mais efetivos, menos tóxicos e que causem menor impacto ambiental, este trabalho também realizou a caracterização química do antibiótico ácido 3-hidroxipropiônico, produzido pelo fungo endofítico *Diaporthe phaseolorum,* por meio de técnicas espectroscópicas

como Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas. Este fungo foi selecionado por apresentar notável capacidade de produzir antibiótico inibidor do crescimento de patógenos e por ser encontrado como gênero mais abundante dentre os fungos endofíticos isolados das espécies arbóreas dos manguezais do estado de São Paulo. Adicionalmente, esse fungo endofítico foi transformado geneticamente pelo sistema *Agrobacterium tumefaciens* visando contribuir para o estudo dos genes da via de biossíntese do antibiótico identificado, o ácido 3-hidroxipropiônico.

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 Importância dos manguezais

Os manguezais são ecossistemas localizados em regiões de interação do ambiente terrestre com o marinho (DAS et al., 2006; HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). Esse ambiente é formado a partir da associação de materiais sedimentares provenientes do mar e continente sendo altamente produtivo. Os manguezais apresentam condições de alta salinidade, extrema inundação com as marés, fortes ventos, altas temperaturas, muito lodo e solo anaeróbico, portanto, apresenta um grupo de plantas e microrganismos que possuem adaptação morfológica, fisiológica, biológica e ecológica para sobreviver nestas condições extremas. Esse ecossistema é um ambiente ecológico único, que abriga árvores com raízes aéreas, galhos, troncos e sedimentos. Ilhados neste habitat, atraem uma comunidade epifaunal rica como fungos, bactérias, macro-algas e invertebrados (BADOLA et al., 2008; KATHIRESAN; BINGHAM, 2001).

A área global total dos manguezais é estimada em 18,1 milhões de hectares, sendo distribuído em 112 países. Mais de 41% das florestas de mangues do mundo estão localizadas no sul e sudeste asiático, sendo que 23% estão situadas somente na Indonésia (GOPAL; CHAUHAN, 2006). Além disso, 27,1% da área total de manguezais encontram-se no continente americano. O Brasil apresenta a segunda maior área de manguezais do mundo, sendo a maior das Américas (SOUSA et al., 2006).

As plantas dos manguezais estão entre as mais produtivas do oceano. A principal representante nas regiões tropicais do continente americano é o mangue vermelho (*Rhizophora mangle*), enquanto que o mangue preto (*Avicennia germinans*) e o mangue branco (*Laguncularia racemosa*) são as mais abundantes nos estuários do México, oeste da Índia, Barramas e Flórida (MILES et al., 1999). Estas plantas sintetizam compostos bioativos utilizados na área médica,

agronômica e cosmética como sais, ácidos orgânicos, carboidratos, hidrocarbonetos, benzoquinonas, nafitofuranos, sesquiterpenos, triterpenos, alcalóides, flavonóides, polímeros, derivados sulfurosos e taninos (LI et al., 2009; MILES et al., 1999; SHARAF et al., 2000; WU et al., 2008).

Estudos recentes indicam que a produção fotossintética das plantas dos manguezais é maior que a das microalgas, algas de recifes de corais e fitoplancton (ALONGI, 2002). O carbono produzido nos manguezais é superior em cerca de 40% ao que o ecossistema requer. O mesmo é consumido por herbívoros, exportado para costas adjacentes, estocado em sedimentos, decomposto e reciclado dentro do sistema. A diminuição dos manguezais pode desencadear um impacto significativo no estoque de carbono global, devido à grande quantidade de carbono fixado e estocado neste ecossistema. Análises do carbono fixado em ecossistemas marinhos estimaram que a perda de aproximadamente 35% dos manguezais de todo o mundo tem resultado na perda de $3,8 \times 10^{14}$ g de carbono estocado como biomassa em manguezais (ALONGI, 2002).

Situados na interface entre terra e mar, os manguezais são ambientes bem adaptados às condições de estresses naturais como temperatura, salinidade, anóxia e radiação ultravioleta. Entretanto, esse ecossistema tem determinados limites de tolerância, sendo sensível às alterações criadas pelas atividades humanas (BADOLA, et al., 2008). A proximidade do mesmo com os centros urbanos favorece a sua exploração. Além disso, efluentes industriais têm contribuído para a contaminação de sedimentos com metais pesados. Muitos manguezais também têm sido contaminados com óleos como resultado de derramamentos de petróleo. Esses eventos têm gerado efeitos negativos nos mesmos (BADOLA, et al., 2008; KATHIRESAN; BINGHAM, 2001).

A manutenção dos manguezais é um desafio de importância econômica para a maioria dos países tropicais. Nos últimos 50 anos, aproximadamente um terço das florestas de mangue foi perdido (ALONGI, 2002), entretanto, os dados publicados revelam taxas de perdas muito variáveis e há considerável margem de erro nas estimativas. Os manguezais de todo o mundo têm sido destruídos principalmente devido à aquacultura, à produção de madeira e ao desenvolvimento urbano. Isso gera significantes perdas de peixes, pássaros, plantas e microrganismos, pois os manguezais estão entre os três ambientes mais produtivos do ecossistema global, ao lado dos recifes de corais e das florestas tropicais (AL-SAYED et al., 2005). Os manguezais servem como refúgio e abrigo, favorecendo a criação e alimentação de

numerosas espécies marinhas importantes para a economia e ecologia. Também são o habitat do principal santuário de pássaros e de um grande número de insetos, alguns répteis, poucos mamíferos e muitos invertebrados (AL-SAYED et al., 2005; HOLGUIN; GONZALEZ-ZAMORANO; DE-BASHAN, 2006; NAGELKERKEN et al., 2008).

O habitat marinho é o maior dentre os habitats da biosfera, cobrindo 70% da superfície da Terra e apresentando o maior espaço para os microrganismos viverem. Os microrganismos marinhos apresentam um alto potencial biotecnológico, representando uma fonte de compostos bioativos de importância comercial e tendo uma extraordinária capacidade de biorremediação. Eles participam na decomposição de matéria orgânica, reciclando e conservando nutrientes neste ecossistema (DAS et al., 2006; KRISTENSEN et al., 2008). No ambiente dos manguezais, há evidências que propõem a íntima relação entre microrganismos – nutriente – planta funcionando como um mecanismo para reciclar e conservar nutrientes. A comunidade microbiana diversa e produtiva de manguezais tropicais transforma continuamente a vegetação morta em fontes de nitrogênio, fósforo e outros nutrientes diversos, que podem ser consumidos pelas plantas. Em troca, exsudados de raízes servem com fonte de alimentação para os microrganismos (DHAM, 2002; KRISTENSEN et al., 2008; SOUSA et al., 2006). Entretanto, o conhecimento da diversidade microbiana de manguezais ainda é muito limitado. Durante as últimas três décadas, os manguezais têm recebido enorme atenção, refletindo em um aumento exponencial do número de publicações (GOPAL; CHAUHAN, 2006), contudo, os conhecimentos sobre este ecossistema ainda são incipientes. Com a contínua degradação deste ambiente, é de extrema importância a avaliação da diversidade e do potencial biotecnológico dos microrganismos que lá habitam, uma vez que estas espécies podem ser extintas.

1.1.2 Diversidade genética de fungos em manguezais

Os estudos sobre fungos marinhos de plantas e solos foram iniciados há 60 anos atrás na Austrália (CRIBB; CRIBB, 1955). Estudos ecológicos e taxonômicos têm sido conduzidos desde 1980, nos oceanos Pacífico e Índico. Esses trabalhos têm contribuído para a identificação de espécies de fungos de manguezais (ABDEL-WAHAB, 2005; PARRENT et al., 2004). Vários artigos foram publicados nas duas últimas décadas sobre os fungos marinhos de manguezais tropicais (CAVALCANTE et al., 2009; GILBERT; GOROSPE; RYVARDEN, 2008; HARVEY;

GOFF, 2010; KUMARESAN; TRICHUR; SURYANARAYANAN, 2001; TREMBLAY, 2007), entretanto, esses aspectos têm sido pouco explorados nos manguezais brasileiros.

Dentre os ecossistemas marinhos, os manguezais constituem o segundo ecossistema mais produtivo e rico, sendo superados apenas pelos recifes de corais (SRIDHAR, 2004). As plantas de manguezais são morfologicamente e fisiologicamente adaptadas a esse ambiente com alta salinidade, inundações (marés), ventos fortes, alta temperatura e solo anaeróbico. Os manguezais apresentam matéria orgânica, proveniente das plantas, a qual forma a base da cadeia alimentar nos estuários tropicais (SARMA; HYDE; VITTAL, 2001). Os fungos marinhos desempenham o importante papel no ciclo de regeneração de nutrientes para decompor essa matéria orgânica morta. O estudo da diversidade da comunidade fúngica marinha, abrangendo a diversidade genética e riqueza de espécies, é o primeiro passo para o modelamento dinâmico da comunidade fúngica em termos de abundância e distribuição espacial e temporal de espécies e na ciclagem de nutrientes. Tais modelos são essenciais para o manejo e conservação eficientes de ambientes marinhos, florestais e agrários, os quais são importantes economicamente (PANG; MITCHELL, 2005).

O ambiente marinho é alvo do desenvolvimento urbano como descarga de efluentes industriais, derramamento de petróleo e contaminação por pesticidas. Os manguezais são ecossistemas muitos expostos a esses fatores estressantes. A contaminação por petróleo é uma das maiores ameaças a todos os organismos marinhos. A presença de hidrocarbonetos no mar pode reduzir a diversidade de fungos marinhos, pois a presença desse composto na superfície de um substrato reduz a aeração diminuindo a atividade dos fungos (HYDE et al., 1998).

A análise do conjunto de genes 18S, 5,8S e 25-28S do rDNA é muito utilizada para avaliar as relações filogenéticas entre os fungos. As regiões variáveis ITS1 e ITS2 são encontradas entre estes genes e são transcritas e processadas dando origem ao RNA ribossômico. (GUARRO; GENE; STCHIGEL, 1999; LARENA et al., 1999). Essas regiões ITS evoluem de modo rápido, sendo utilizadas para discriminar espécies relacionadas e variedades de uma mesma espécie. As regiões ITS são utilizadas na identificação molecular de fungos por 3 principais motivos: o agrupamento gênico que codifica o rDNA está repetido centenas de vezes facilitando a amplificação; os fragmentos de ITS são curtos (600 a 800pb); essas regiões ITS apresentam alta variabilidade discriminando espécies fúngicas, e até mesmo, isolados de algumas espécies.

Análises da sequência de rDNA 18S também são utilizadas em estudos taxonômicos de fungos (KUNINAGA et al., 1997; LEE; TAYLOR, 1992; WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990).

O número de microrganismos descritos na literatura representa apenas uma pequena fração da diversidade microbiana existente (AZEVEDO, 1998; PACE, 1996). Estudos comparativos indicam que apenas uma pequena fração dos microrganismos presentes na natureza, representando entre 0,1% a 1%, dependendo do habitat, é cultivada por meio do emprego de técnicas microbiológicas convencionais (AMANN et al., 1995). Muitos fatores podem ser apontados para a dificuldade no cultivo de microrganismos em condições laboratoriais, incluindo o pouco conhecimento sobre seus requisitos nutricionais e a natureza fastidiosa de muitas espécies presentes em diferentes amostras ambientais. Portanto, a análise de genes do DNA ribossomal proveniente de DNA de amostras ambientais tem expandido o conhecimento da diversidade genética de fungos (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; PACE, 1996).

Várias técnicas moleculares podem ser empregadas para avaliar a diversidade de fungos, como ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), ARISA (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*), DGGE/TGGE (*Denaturing/Temperature Gradient Gel Electrophoresis*), clonagem de genes, SSCP (*Single-Strand-Conformation Polymorphism*), T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*) e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; ANDERSON; CAIRNEY, 2004; PANG; MITCHELL, 2005; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003). A utilização dessas técnicas permite a avaliação do conteúdo de DNA dos organismos, não dependendo do estado fisiológico dos mesmos, permitindo o estudo de microrganismos não cultiváveis.

Dentre os 900 fungos marinhos já identificados, 358 pertencem a ecossistemas de manguezais (MARIA; SHIDHAR, 2002). Estes fungos realizam processos importantes como a transformação de compostos poliméricos em matéria orgânica dissolvida, utilizada por outros consumidores da cadeia alimentar (HYDE et al., 1998).

Diante de poucos estudos sobre fungos endofíticos de manguezais brasileiros, ressalta-se a importância da avaliação da diversidade em manguezais do estado de São Paulo, em busca da determinação da estrutura genética e identificação das espécies presentes. Essa abordagem abre a possibilidade da descoberta de novas espécies de fungos produtores de antibióticos com menor

efeito colateral e impacto ambiental, fornecendo ainda alternativas na prática clínica contra a resistência adquirida pelos microrganismos.

1.1.3 Microrganismos endofíticos

Os microrganismos endofíticos são bactérias ou fungos que colonizam o interior dos tecidos de plantas, sem apresentar efeito patogênico no hospedeiro (OWEN; HUNDLEY, 2004; TAN; ZOU, 2001) Dessa maneira, ocorre uma associação simbiótica entre a planta hospedeira, que o protege e alimenta, e o microrganismo endofítico, produtor de metabólitos bioativos que auxiliam o crescimento e a proteção da planta contra o ataque de fitopatógenos (OWEN; HUNDLEY, 2004; TAN; ZOU, 2001; ZHANG; SONG; TAN, 2006). Entretanto, desde a descoberta dos microrganismos endofíticos em Darnel (Alemanha) em 1904, muitos pesquisadores têm definido diferentemente o termo endófito (HALLMANN et al., 1997; PETRINI, 1991; TAN; ZOU, 2001). Uma definição recente proposta por Azevedo e Araújo (2007) considera endófito como todo aquele que pode ou não crescer em meios de cultura, ou seja, cultiváveis ou não, e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais. Porém, essa definição exclui rizóbios e micorrizas. Dessa forma, Mendes e Azevedo (2007) propuseram a redefinição desse termo, considerando a definição anterior proposta por Azevedo e Araújo (2007), adicionando a divisão dos microrganismos endofíticos em dois tipos: Tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e Tipo II, os que produzem estruturas externas à planta.

Cada uma das 300.000 espécies de plantas existentes é hospedeira de um ou mais microrganismos endofíticos, mas poucas delas têm sido completamente estudadas com relação à sua biologia endofítica. A facilidade de isolamento desses microrganismos em meio de cultura torna esse grupo uma fonte promissora de produtos biotecnológicos. Conseqüentemente, torna-se grande a oportunidade de descobrir novos e interessantes microrganismos endofíticos de plantas hospedeiras de diferentes ecossistemas (STROBEL et al., 2004).

Dentre todos os produtores de compostos bioativos naturais, os microrganismos representam uma fonte rica de metabólitos biologicamente ativos que apresentam ampla aplicação como antibióticos, antiparasitários, antifúngicos, antitumorais, entre muitos outros compostos. Estima-se que somente 1% das espécies de bactérias e menos de 7% das espécies de

fungos sejam conhecidas (HAWKSWORTH, 2004; GUNATILAKA, 2006), sugerindo que milhões de espécies microbianas poderão fornecer importantes biomoléculas. Historicamente, de todos os microrganismos estudados, os actinomicetos e os fungos têm sido os maiores produtores de metabólitos secundários. Sugere-se ainda que os fungos são fundamentais para a saúde e prosperidade de muitos ecossistemas terrestres, sendo essenciais para a sustentabilidade e biodiversidade dos mesmos (GUNATILAKA, 2006; OWEN; HUNDLEY, 2004; SRIDHAR, 2004).

1.1.4 Fungos endofíticos

Estudos sobre a proporção do número de espécies de fungos para cada espécie vegetal indicam que o número estimado de espécies fúngicas é de 1,5 milhões, entretanto o número de espécies descritas até hoje é de aproximadamente 100 mil (HAWKSWORTH, 1991, 2004). Postulados sobre o número de espécies fúngicas existentes chegam até mesmo a estimar 8,25 milhões de espécies fúngicas, considerando que a diversidade é maior em regiões tropicais (ARNOLD et al., 2000; FRÖHLICH; HYDE, 1999). Atualmente, acredita-se que todas as espécies de plantas são potenciais hospedeiros para diversos fungos (AGRIOS, 1997; RODRIGUEZ et al., 2009). Esses dados revelam o grande potencial de exploração da diversidade genética e materiais biotecnológicos fúngicos.

O potencial biotecnológico dos fungos endofíticos tem sido muito estudado por vários autores (DAVIS et al., 2005; KUMAR et al., 2004; SESSITSCH et al., 2004; SURYANARAYANAN et al., 2009; THINES; ANKE; WEBER, 2004). Com o número crescente de trabalhos sobre a interação entre planta e endófitos (ARAÚJO et al., 2001; BRUNDRETT, 2006; RODRIGUEZ; REDMAN, 2008), juntamente com os resultados promissores observados, têm sido importantes os estudos de fungos endofíticos como agentes de controle biológico de inúmeros patógenos (AZEVEDO et al., 2000; LIU et al., 2001; SIEGEL et al., 1990), promotores de crescimento vegetal (MARKS; CLAY, 1990; VARMA et al., 1999), produtores de enzimas (STROBEL; DAISY, 2003) e ainda o uso de fungos endofíticos em plantas como fitoremediadores de áreas poluídas (DERAM et al., 2008; XIAO et al., 2010).

É importante ressaltar que produtos de valor biotecnológico, como antibióticos e outros princípios ativos com inúmeras propriedades farmacológicas, têm sido sintetizados por fungos

endofíticos, tornando esses um importante alvo em estudos aplicados na área médica e agronômica. O taxol, um potente agente antitumoral, sintetizado pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* da planta hospedeira *Taxus brevifolia,* vem sendo estudado para a sua produção em escala industrial (YUAN et al., 2006). Os fungos têm sido uma fonte de antibióticos muito utilizados na prática clínica como a penicilina produzida pelo fungo *Penicillium notatum*, e a cefalexina sintetizada pelo fungo *Cefalosporium acremonium* (OWEN; HUNDLEY, 2004).

Os fungos endofíticos podem contribuir para crescimento da planta hospedeira de modo direto ou indireto. O modo direto de promoção de crescimento vegetal está relacionado com a produção de compostos ativos pelos endófitos, facilitando a absorção de nutrientes e água pela planta hospedeira (ZHANG; SONG; TAN, 2006). Trabalhos têm sugerido que os endófitos alteram o fluxo de água em plantas por meio da produção de compostos químicos solúveis em água como os alcalóides, os quais aumentam o fluxo osmótico nas raízes da planta hospedeira (BACON, 1993; OWEN; HUNDLEY, 2004; TAN; ZOU, 2001). A forma indireta do endófito proporcionar a melhoria no crescimento e desenvolvimento vegetal é feita por meio da proteção ao ataque de pragas e patógenos (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Os endófitos podem proteger as plantas produzindo compostos como alcalóides e terpenos, os quais apresentam efeito inseticida repelindo insetos e tornando a planta menos susceptível ao ataque de insetos. Outro mecanismo encontrado na literatura é o controle natural de insetos por meio da produção de metabólitos citotóxicos pelos fungos entomopatogênicos (REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001; SCHULZ; BOYLE, 2005; STONE; POLISHOOK; WHITE, 2004).

Várias classes de metabólitos secundários como alcalóides, pirolizidinas, esteróides, terpenóides, sesquiterpenos, isocumarínicus, quinonas, flavonóides, fenil-propanóides, policetídeos, lactonas, dentre outros, são produzidos por fungos endofíticos, o que faz com que eles sejam uma fonte promissora para estudos de exploração do potencial biotecnológico de produtos aplicados na prática clínica (ZHANG; SONG; TAN, 2006).

1.1.5 Biossíntese de antibióticos em microrganismos

Antibióticos são definidos como produtos naturais orgânicos produzidos por microrganismos, sendo de baixo peso molecular e ativos a baixas concentrações contra outros microrganismos (STROBEL; DEISY, 2003). Os produtos naturais isolados a partir do

metabolismo secundário de microrganismos têm sido a principal fonte de grande parte dos antibióticos utilizados atualmente no mercado. O primeiro antibiótico utilizado no tratamento de infecções humanas foi a penicilina. Fleming, em 1928, descobriu a penicilina por meio da observação do crescimento do fungo contaminante *Penicillium* em placas inoculadas com *Staphylococcus aureus*. No final da década de 1930, durante a segunda guerra mundial, crescia o número de pacientes infectados, exigindo a descoberta de princípios ativos para o tratamento de doenças infecciosas. Diante dessa necessidade, os pesquisadores Florey e Chain da Universidade de Oxford purificaram a penicilina e comprovaram seu efeito farmacológico antibacteriano em humanos (BENTLEY, 2005; BROWN, 2004; GOMEZ; LOPEZ, 2006).O uso da penicilina na prática clínica a partir de 1940 despertou o interesse de muitos pesquisadores sobre os estudos de antibióticos produzidos por fungos filamentosos e actinomicetos (BENTLEY, 2005; BROWN, 2004).

Peptídeos não ribossomais e policetídeos são as principais classes de antibióticos que apresentam ampla diversidade estrutural. Eles são sintetizados respectivamente por enzimas multifuncionais chamadas de peptídeo sintetase não ribossomal (NRPS) e policetídeo sintetase (PKS). Estas enzimas apresentam similaridade na estrutura modular dos domínios catalíticos e no mecanismo de montagem linear (CHALLIS; NAISMITH, 2004; FINKING; MARAHIEL, 2004; SCHWARZER; MARAHIEL, 2001).

Nos últimos anos foram descobertos inúmeros antibióticos produzidos por endófitos com uma incrível diversidade estrutural e com atividade biológica contra uma ampla gama de patógenos humanos e vegetais. Na literatura são encontradas inúmeras revisões que abordam a biossíntese de antibióticos por meio do metabolismo secundário de fungos endofíticos (ARNOLD, 2007; SCHULZ et al., 2002; HUANG et al., 2008; SURYANARAYANAN et al., 2009; YUAN et al., 2006).

1.1.6 Transformação genética de fungos pelo sistema *Agrobacterium tumefaciens*

Muitos estudos na área de Genética Molecular têm utilizado o sistema de transformação genética para explorar o conhecimento sobre a biologia dos organismos, bem como promover o melhoramento de características de importância biotecnológica. Os principais sistemas de transformação genética desenvolvidos para fungos filamentosos são aqueles que fazem uso de

protoplastos (PEG, eletroporação e REMI), biobalística e *Agrobacterium tumefaciens* (KERSHAW; TALBOT, 2009; RIGGLE; KUMAMOTO, 1998; RUIZ-DÍEZ, 2002; ZUCCARO et al., 2009).

A transformação mediada pela bactéria fitopatogênica *Agrobacterium tumefaciens* é muito utilizada na transformação genética de células vegetais (EADY et al., 1996; HERNALSTEENS et al., 1980; ISHIDA et al., 1996), e também tem sido empregada na transferência de genes em células humanas (KUNIK et al., 2001). Em fungos, o estabelecimento dessa técnica foi realizada inicialmente com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BUNDOCK et al., 1995; HINNEN; HICK; FINK, 1978), e posteriormente adaptado para fungos filamentosos (DE GROOT et al., 1998). Desde então, esse método tem sido empregado com sucesso na transformação genética de dezenas de espécies fúngicas de interesse biotecnológico, incluindo membros dos filos Ascomicota, Basidiomicota, Zigomicota, Glomeromicota e Oomicota (MICHIELSE et al., 2005; LACROIX et al., 2006; FAVARO, 2009).

O método da agrotransformação baseia-se na transferência de parte do DNA (T-DNA) da bactéria fitopatogênica *A.tumefaciens* para células eucarióticas. A infecção natural de plantas por meio da bactéria *A. tumefaciens* favorece o aparecimento de galhas (tumores) devido à transferência e à incorporação de parte de seu plasmídio Ti (T-DNA) para o genoma da célula hospedeira. Os genes presentes no T-DNA estão relacionados com a produção de substâncias que geram desenvolvimento do tumor (MULLINS; KANG, 2001). O plasmídio Ti apresenta os genes *vir,* os quais codificam proteínas que transferem T-DNA para a célula hospedeira. O T-DNA é flanqueado por duas sequências curtas próximas a 25 pares de base denominadas borda direita e borda esquerda, que participam do processo de transferência. A transferência do T-DNA em células vegetais envolve muitas etapas como quimiotaxia, adesão, indução da expressão dos genes *vir*, processamento do T-DNA, transferência do T-DNA, direcionamento do T-DNA ao núcleo e integração no genoma da célula hospedeira (TZFIRA et al., 2006). O plasmídio Ti de *A. tumefaciens* utilizado na transformação *in vitro* de fungos é desarmado, não apresentando a região do T-DNA e as bordas direita e esquerda. A região do T-DNA é modificada mediante substituição de oncogenes por genes de interesse e introduzida em um vetor binário. Esse vetor binário é reintroduzido em uma linhagem de *A. tumefaciens* contendo o plasmídio desarmado, que é capaz de transformar células hospedeiras (LACORTE; ROMANO, 1998).

A transformação via *Agrobacterium tumefaciens* em fungos filamentosos tem mostrado inúmeras vantagens em relação aos métodos convencionais de transformação genética, pois apresenta uma metodologia simples não necessitando de equipamentos como eletroporador ou acelerador de microprojéteis. Além disso, esse procedimento apresenta alta eficiência de transformação e permite a identificação de genes interrompidos (MICHIELSE et al., 2005; MULLINS et al., 2001). Grande parte dos trabalhos que utilizaram a agrotransformação em fungos constatou a integração em cópia única em sítios aleatórios no genoma do hospedeiro (DE GROOT et al., 1998; MICHIELSE et al., 2005; MULLINS et al., 2001).

Essas características favorecem o emprego da metodologia de agrotransformação como uma ferramenta para obter fenótipos mutantes e identificar genes de interesse via mutagênese insercional aleatória, sendo muito empregado em estudos da interação fungo-planta para a identificação de genes relacionados à patogenicidade (MULLINS; KANG, 2001). Se houver sequências homólogas entre a região do T-DNA e genoma do hospedeiro, a integração pode ser mediante a recombinação homóloga, tornando essa técnica de agrotransformação útil para a mutagênese sítio dirigida (MOON et al., 2008; ZHANG et al., 2003). A transformação mediada por *A. tumefaciens* também vem sendo bastante utilizada como ferramenta no estudo da genômica funcional em fungos, uma vez que permite avaliar a função dos genes.

1.1.7 Caracterização química de compostos bioativos

1.1.7.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear baseia-se no fenômeno de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para o estudo das propriedades físicas e químicas da matéria, ou seja, é um ramo da espectroscopia que explora as propriedades magnéticas de núcleos atômicos (FOSTER; MCELROY; AMERO, 2007). A espectroscopia de ressonância magnética nuclear possui várias aplicações em diversas áreas cientificas. Na química, a espectroscopia de RMN é frequentemente usada na determinação estrutural dos compostos, utilizando técnicas uni ou bidimensionais simples. A RMN é uma técnica não destrutiva que permite a análise de compostos orgânicos e alguns inorgânicos (HORNAK, 1997; MACOMBER, 1998; MARTÍNEZ, 2007). Atualmente, a RMN é imprescindível na elucidação estrutural de produtos naturais e

substâncias sintéticas. Isso se deve à evolução contínua dos equipamentos de RMN, desde a sua descoberta (1946), e ao desenvolvimento de novas técnicas, que possibilitam análises muito mais detalhadas de substâncias de estruturas complexas (CLARIDGE, 1999).

Como qualquer outra técnica espectroscópica, a RMN depende das variações de energia quantificáveis que ocorrem em pequenas moléculas, quando elas são irradiadas por radiação eletromagnética. Esse tipo de espectroscopia está relacionada com as transições de *spins* nucleares induzidas por determinadas radiofrequências (rf), entre estados quantificados de energia dos núcleos orientados em um campo magnético. Assim, o núcleo de certos elementos químicos e isótopos comportam-se como se fossem imãs girando em torno de um eixo, criando um campo magnético (BILLETER; WAGNER; WUTHRICH, 2008; WUTHRICH, 1990). Quando se coloca um composto contendo átomos de ^{1}H ou de ^{13}C em um campo magnético muito forte e, simultaneamente, se irradia o composto com energia eletromagnética, os núcleos podem absorver energia em um processo denominado *ressonância magnética*. A absorção desta radiação pelos núcleos desses elementos é quantificada e dá origem a um espectro característico (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1994).

O sinal da espectroscopia de RMN é resultante da diferença entre a energia absorvida e liberada pelos *spins*, quando retornam o nível de menor energia. Esses sinais são caracterizados por seus deslocamentos químicos (frequências), multiplicidade, intensidade e por algumas propriedades de relaxação, fornecendo, deste modo, uma idéia do ambiente químico em que se encontra o núcleo detectado (RATCLIFFE et al., 2001).

O deslocamento químico é dado pela diferença da posição de absorção do hidrogênio da molécula em questão e a de um hidrogênio de referência. Assim, os deslocamentos químicos de hidrogênios de uma molécula são dados pela diferença da posição deles no espectro em relação ao composto de referência interna, o TMS (Tetrametilsilano), que é calibrado em zero (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1994).

A multiplicidade, ou seja, a forma com que os sinais de RMN aparecem no espectro pode ser simples ou múltiplo, caracterizados respectivamente como *singlete* e *multiplete* (*doblete*, *triplete*, *quadruplete*, dentre outros). Essa multiplicidade é produzida por meio do acoplamento entre *spins* próximos. A constante de acoplamento (J) está relacionada com a distância, medida em *Hertz*, entre os sinais *multipletes*. Essa constante indica o grau do acoplamento, que depende

do anglo diedro. O deslocamento (frequência de ressonância do núcleo) também é influenciado pela vizinhança eletrônica (ambiente químico) (MARKWICK; MALLIAVIN; NILGES, 2008).

Nos últimos anos, essa área vem sendo marcada com avanços tecnológicos em instrumentação, proporcionado o aparecimento de novas técnicas de RMN, dentre elas COSY, HMQC, NOESY, QMBC, NOE DIFF e J-resolved. Os dados gerados pelo método de RMN são comparados com dados de Espectrometria de Massas, Ultravioleta (UV) e Infra Vermelho (IV), permitindo obter informações mais seguras e precisas sobre a estrutura química da molécula em estudo (HORNAK, 1997; MACOMBER, 1998; MARTÍNEZ, 2007). Além disso, o banco de dados disponível no site (https://scifinder.cas.org) permite ao cientista buscar as estruturas previamente identificadas e descritas na literatura, servindo como ponto de partida nos estudos de identificação da estrutura química de compostos bioativos.

1.1.7.2 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massa é uma técnica analítica poderosa que é usada para identificar compostos desconhecidos, quantificar materiais conhecidos e elucidar as propriedades químicas e estruturais das moléculas. A detecção de compostos pode ser conseguida para quantidades muito pequenas de amostra, como nanogramas (10^{-12} g) (XING et al., 2007). Os princípios científicos em que a técnica se baseia envolve a geração de íons que são depois detectados. A sofisticação está nos métodos que são usados para a geração desses mesmos íons e no modo de analisá-los (DOLE et al., 1968).

Dentre as técnicas de ionização, a espectrometria de massas por *electrospray* é a mais utilizada atualmente. A *electrospray* (ESI/MS) sofreu um rápido crescimento tornando-se numa técnica analítica fundamental para análise de uma vasta gama de compostos polares, não voláteis e termicamente instáveis, permitindo avaliar compostos de baixa massa molecular até biopolímeros de elevada massa molecular (YAMASHITA; FENN, 1984). Essencialmente, três características fazem com que essa técnica seja considerada distinta das outras técnicas de ionização. A primeira é a capacidade de produzir íons multiplamente carregados, com número de cargas elevado, reduzindo, assim, a razão m/z, de tal modo que seja possível analisar compostos de elevada massa molecular de até centenas de kDa, em praticamente todo o tipo de analisadores. Uma segunda característica é que as amostras são introduzidas em solução, o que possibilita o acoplamento com muitas técnicas de separação. Por último, o *electrospray* é uma técnica de

ionização branda, permitindo que as interações entre moléculas (ligações de hidrogênio) que existem em solução sejam preservadas na fase gasosa (CLARKE et al., 2007; OLAH; MCLOUGHLIN; GILBERT, 1997; ZHANG et al., 2000).

Na determinação da massa molecular, a espectrometria de massas é fundamental, porque as principais características dos espectros de massa de biomoléculas são a predominância de íons moleculares multiplamente carregados e a ausência de fragmentação, o que permite a determinação rigorosa de massas moleculares. No entanto, em relação à estrutura molecular obtém-se pouca informação. Porém, a simples utilização de diferentes analisadores de massas possibilita a obtenção de maiores informações estruturais (HOFFMANN, 1996). Dentre os analisadores mais comumente utilizados, podemos destacar o analisador quadrupolar. Com este tipo de analisador é possível realizar experimentos como os de íons produto e de íons precursores, que permitem a obtenção de informações com respeito à estrutura molecular do composto analisado. Assim, nos experimentos de íons produto, o primeiro quadrupolo é programado para que apenas uma determinada razão massa/carga atravesse o analisador, filtrando todos os demais íons. Deste modo, esse íon é fragmentado com uma energia conhecida e determinada na cela de colisão, e todos os fragmentos podem ser analisados no segundo quadrupolo. A origem de um íon precursor também pode ser determinada, invertendo-se as funções dos quadrupolos. A altíssima seletividade (cerca de 100 vezes mais que MS/MS convencional) pode ser conseguida através de experimentos de massas de alta resolução (SRM) (HOFFMANN, 1996). Esses experimentos, em ambos os quadrupolos, são programados para deixarem passar apenas uma determinada razão massa/carga, o que leva à determinação da massa molecular precisa do composto, ou seja, são instrumentos capazes de distinguir íons que diferem suas massas com precisão de 0,0001 (HOFFMANN, 1996). A técnica de Espectrometria de Massas é essencial na identificação da massa molecular de compostos bioativos, bem como na confirmação dos dados obtidos por meio da técnica de RMN.

Referências

ABDEL-WAHAB, M.A. Diversity of marine fungi from Egyptian Red Sea mangroves. **Botanica Marina**, Berlin, v. 48, p. 348-355, 2005.

AGRIOS, G.N. Plant disease caused by fungi. **Plant Pathology**. London:Academic Press, 1997. p. 245-406.

ALONGI, D.M. Present state and future of the world`s mangrove forests. **Environmental Conservation**, Queensland, v. 29, p. 331-349, 2002.

AL-SAYED, H.A.A.; GHANEM, E.H.; SALEH, K M. Bacterial community and some physico-chemical characteristics in a subtropical mangrove environment in Bahrain. **Marine Pollution Bulletin**, New York, v. 50, p. 147-155, 2005.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 143–169, 1995.

ANANDA, K.; SRIDHAR, K.R. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the West coast of India. **Canadian Journal Microbiology**, Saskatoon, v. 48, p. 871-878, 2002.

ANDERSON, I.C.; CAIRNEY, J.W.G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, New York, v. 8, p. 769-779, 2004.

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A. V.; SARIDAKIS H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.

ARNOLD, A.E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews,** Amsterdam, v. 21, p. 51-66, 2007.

ARNOLD, A.E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G.S.; COLEY, P.D.; KURSAR, T.A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, Oxford, v. 3, p. 267-274, 2000.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. 488p.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR., W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microrganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 3, p. 1-36, 2000.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESMHMUKH, S. K. (Ed.). **Fungi**: multifaceted microbes. Boca Raton: CRC Press, 2007. chap. 12, p. 191-209.

BACON, C.W. Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte-infected tall fescue. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Athens, v. 44, p. 123-141, 1993.

BADOLA, R.; PRIMAVERA, J.H.; BARBIER, E.; DAHDOUH-GUEBAS, F. Ethnobiology, socio-economics and management of mangrove forests: A review. **Aquatic Botany**, New York, v. 89, p. 220-236, 2008.

BENTLEY, R. The development of penicillin. **Biology and Medicine**, Aligarh, v. 48, p. 444-452, 2005.

BILLETER, M.; WAGNER, G.; WUTHRICH, K. Solution NMR structure determination of proteins revised. **Journal Biomol NMR**, Gothenburg, v. 42, p. 155-158, 2008.

BRUNDRETT, M.C. Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In: SCHULZ, B.J.E.; BOYLE, C.J.C.; SIEBER, T.N. (Ed.). **Microbial root endophytes**. Berlin: Springer-Verlag, 2006. chap. 16, p. 281-293.

BUNDOCK, P.; DEN DULK-RAS, A.; BEIJERSBERGEN, A.; HOOYKAAS, P.J.J. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 14, p. 3206-3214, 1995.

CAVALCANTE, R.M.; SOUSA, F.W.; NASCIMENTO, R.F.; SILVEIRA, E.R.; FREIRE, G.S. S. The impact of urbanization on tropical mangroves (Fortaleza, Brazil): Evidence from PAH distribution in sediments. **Journal of Environmental Management**, New York, v. 91, p. 328-335, 2009.

CHALLIS, G. L.; NAISMITH, J. H. Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis. **Current Opinion in Structural Biology,** Oxford, v. 14, p. 748-756, 2004.

CLARIDGE, T.D.W. High-resolution NMR techniques in organic chemistry. In: CLARIDGE, T. D. W. **Tetrahedron Organic Chemistry Series**. Oxford: Pergamon Press, 1999. p. 300-320.

CLARKE, N.J.; RINDGEN, D.; KORFMACHER, W.A.; COX, K.A. Systematic LC/MS metabolite identification in drug discovery: a four-step strategy to characterize metabolites by LC/MS techniques early in the pharmaceutical discovery process. **Analytical Chemistry**, New York, v. 73, p. 431-439, 2007.

CRIBB, A.B.; CRIBB, J.W. Marine fungi from queensland. In: CRIBB, A.B.; CRIBB, J.W. **Marine fungi from Queensland I**. Queensland: University Queensland, 1955. p.77-81.

DAS, S.; LYLA, P S.; KHAN, A. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. **Current Science**, Bangalore, v. 90, p. 1325-1334, 2006.

DAVIS, R.A.; ANDJIC, V.; KOTIW, M.; SHIVAS, R.G. Phomoxins B and C: Polyketides from an endophytic fungus of the genus Eupenicillium. **Phytochemistry**, Netherlands, v. 66, p. 2771-2775, 2005.

DE GROOT, M.J.A.; BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P.J.J.; BEIJERSBERGEN, A.G.M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. **Nature Biotechnology**, New York, v. 16, p. 839-842, 1998.

DERAM, A.; LANGUEREAU-LEMAN, F.; HOWSAM, M.; PETIT, D.; HALUWYN, C.V. Seasonal patterns of cadmium accumulation in *Arrhenatherum elatius* (*Poaceae*): Influence of mycorrhizal and endophytic fungal colonisation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 845-848, 2008.

DOLE, M.; MACK, L.L.; HINES, R.L.; MOBLEY, R.C.; FERGUSON, L.D.; ALICE, M.B. Molecular beams of macroions. **Journal of Chemical Physics,** New York, v.49, p. 2240-2249, 1968.

EADY, C.C.; LISTER, C.E.; SUO, Y.; SCHAPER, D. Transient expression of uidA constructs in in vitro onion (*Allium cepa* L.) cultures following particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated DNA delivery. **Plant Cell Reports**, New York, v. 15, p. 958-962, 1996.

FÁVARO, L.C.L. **Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.)**. 2009. 219p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FINKING, R; MARAHIEL, M.A. Biosynthesis of nonribosomal peptides. **Annual Review of Microbiology**, New York, v. 58, p. 453-488, 2004.

FOSTER, M.P.; MCELROY, C.A.; AMERO, C.D. Solution NMR of large molecules and assemblies. **Biochemistry**, Ohio, v. 46, p. 331-340, 2007.

FRÖHLICH, J.; HYDE, K.D. Biodiversity of palm fungi in the tropics: Are global fungal diversity estimates realistic? **Biodiversity and Conservation**, London, v. 8, p. 977-1004, 1999.

GILBERT, G.S. GOROSPE, J.; RYVARDEN, L. Host and habitat preferences of polypore fungi in Micronesian tropical flooded forests. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, p. 674-680, 2008.

GOMEZ, M.L.; LOPEZ, M.T. Historia las claves de una epoca: Wright y Fleming**. Sociedad Española de Quimioterapia,** Madri, v. 19, p. 187-192, 2006.

GOPAL, B.; CHAUHAN, M. Biodiversity and its conservation in the Sundarban Mangrove Ecosystem. **Aquatic Sciences**, Berlin, v. 68, p. 338-354, 2006.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A.M. Development in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, p. 454-500, 1999.

GUNATILAKA, A.A.L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. **Journal Natural Product**, Ohio, v. 69, p. 509-526, 2006.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HARVEY, J.B.J.; GOFF, L.J. Genetic covariation of the marine fungal symbiont *Haloguignardia irritans* (Ascomycota, Pezizomycotina) with its algal hosts *Cystoseira* and *Halidrys* (Phaeophyceae, Fucales) along the west coast of North America. **Fungal Biology**, Amsterdam, v. 114, p. 82-95, 2010.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, p. 641-655, 1991.

HAWKSWORTH, D.L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 50, p. 9–18, 2004.

HERNALSTEENS, J.; VAN VLIET, F.; BEUSKELEER, M. D.; DEPICKER, A.; ENGLER, G.; LEMMERS, M.; HOLSTERS, M.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. The *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA in plants. **Nature**, London, v. 287, p. 654-656, 1980.

HINNEN, A.; HICK, S.J.B.; FINK, G.R. Transformation of yeast chimeric ColE1 plasmid carrying LEU2. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 75, p. 1929-1933, 1978.

HOFFMANN, E. Tandem mass spectrometry: a primer. **Journal of Mass Spectometry**, New York, v. 31, p. 129-137, 1996.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 33, p. 265-278, 2001.

HOLGUIN, G.; GONZALEZ-ZAMORANO, P.; DE-BASHAN, L.E. Mangrove health in an arid environmental encroached by urban development – a case study. **Science of the Total Environment**, Boston, v. 363, p. 260-274, 2006.

HORNAK, J. P. **The Basics of NMR**. New York: John Wiley , 2002. 480 p.

HUANG, Z.; CAI, X.; SHAO, C.; SHE, Z.; XIA, X.; CHEN, Y.; YANG, J.; ZHOU, S.; LIN, Y. Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. **Phytochemistry**, Netherlands, p. 1604-1608, 2008.

HYDE, K.D.; JONES, E.B.G.; LEANO, E.; POINTING, S.B.; POONYTH, A.D.; VRIJMOED, L.L.P. Role of fungi in marine ecosystems. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 7, p. 1147-1161, 1998.

ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, p. 745-750, 1996.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B.L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. **Advances in Marine Biology**, San Diego, v. 40, p. 81-251, 2001.

KERSHAW, M.J.; TALBOT, N.J. Genome-wide functional analysis reveals that infection-associated fungal autophagy is necessary for rice blast disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 106, p. 15967-15972, 2009.

KRISTENSEN, E.; BOUILLON, S.; DITTMAR, T.; Marchand, C. Organic carbon dynamics in mangrove ecosystems: A review. **Aquatic Botany**, New York, v. 89, p. 201-219, 2008.

KUMAR D.S.S.; CHEUNG, H. YEUNG, C.S.L.; CHEN, F.; HYDE, K.D. In vitro studies of endophytic fungi from Tripterygium wilfordii with anti-proliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 94, p. 295-300, 2004.

KUMARESAN, V.; SURYANARAYANAN, T.S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. **Mycological Research**, Cambridge, v.105, p. 1388-1391, 2001.

KUNINAGA, S.; NATSUAKI, T.; TAKEUCHI, T.; YOKOSAWA, R. Sequence variation of the rDNA ITS regions withinand between anastomosis groups in *Rhyzoctonia solani*. **Current Genetics**, Berlin, v. 32, p.237-243, 1997.

KUNIK, T.; TZFIRA, T.; KAPULNIK, Y.; GAFNI, Y.; DINGWALL, C.; CITOVSKY, V. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 98, p. 1871-1876, 2001.

LACROIX, B.; TZFIRA, T.; VAINSTEIN, A.; CITOVSKY, V. A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. **Trends in Genetics**, London, v. 22, p. 29-37, 2006.

LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/EMBRAPA, 1998. p. 93-109.

LARENA, I.; SALAZAR, O.; GONZALEZ V.; JULIAN, M. C.; RUBIO, V. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdan, v. 75, p. 187-194, 1999.

LEE, S.B.; TAYLOR, J.W. Phylogeny of five fungus-like protoctistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 9, p. 636-653, 1992.

LI, M.Y.; XIAO, Q.; PAN, J.Y.; WU, J. Natural products from semi-mangrove flora: source, chemistry and bioactivities. **Natural Product Reports,** Cambridge, v. 26, p. 281-298, 2009.

LIN, X.; HUANG, Y.; FANG, M.; WANG, J.; ZHENG, Z.; SU, W. Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungi, *Diaporthe* sp. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 251, p. 53-58, 2005.

LIU, C.I.; ZOU, W.X.; LU, I.; TAN, R.X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 88, p. 277-282, 2001.

MACINI, M.; CHANETON, E. J.; GHERSA, C.M.; MÜLLER, C.B. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. **Nature**, London, v. 409, p. 78–81, 2001.

MACOMBER, R.S.A. **Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy**. New York: John Wiley, 1998. 382 p.

MARIA, G.L.; SRIDHAR, K.R. Richness and diversity of filamentous fungi on woody litter of mangrove along the west coast of India. **Current Science**, Bangalore, v. 83, p. 1573-1580, 2002.

MARTÍNEZ, D.M.C. **Farmacoquímica Natural**. Valencia: Moliner, 2007. 93 p.

MARKS, S.; CLAY, K. Effects of CO_2 enrichment, nutrient addition, and fungal endophyte-infection on the growth of two grasses. **Oecologia**, Berlin, v. 84, p. 207–214, 1990.

MARKWICK, P.R.L.; MALLIAVIN, T.; NILGES, M. Structural Biology by NMR: Structure, Dynamics, and Interactions. **Computacional Biology**, Paris, v. 4, p. 1-7, 2008.

MENDES, R.; AZEVEDO, J.L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A.M. (Org.). **Micologia:** avanços no conhecimento. Recife: UFPE: 2007. p. 129-140.

MICHIELSE, C.B.; HOOYKAAS, P.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.; RAM, A.F. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Current Genetics**, Berlin, v. 48, p. 1-17, 2005.

MILES, D.H.; KOKPOL, U.; CHITTAWONG, V.; TIP-PYANG, S.; TUNSUWAN, K.; NGUYEN, C. Mangrove Forests – The importance of conservation as a bioresource for ecosystem diversity and utilization as a source of chemical constituents with potential medicinal and agricultural value**. Pure Applied Chemical**, Berlin, v. 70, p. 23-27, 1999.

MOON, Y.S.; DONZELLI, B.G.G.; KRASNOFF, S.B.; MCLANE, H.; GRIGGS, M.H.; COOKE, P.; VANDENBERG.J.D.; GIBSON, D.M.; CHURCHILL, A. C.L. *Agrobacterium*-Mediated Disruption of a Nonribosomal Peptide Synthetase Gene in the Invertebrate Pathogen *Metarhizium anisopliae* Reveals a Peptide Spore Factor. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 4366-4380, 2008.

MULLINS, E.D.; KANG, S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 58, p. 2043-2052, 2001.

MULLINS, E.D.; CHEN, X.; ROMAINE, C.P.; RAINA, R.; GEISER, D.M.; KAMG, S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. **Phytopathology**, Lancaster, v. 91, p. 173-180, 2001.

NAGELKERKEN, I.; BLABER, S.J.M.; BOUILLON, S.; GREEN, P.; HAYWOOD, M.; KIRTON, L.G.; MEYNECKE, J-O.; PAWLIK, J.; PENROSE, H M.; SASEKUMAR, A.P.J. The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: A review. **Aquatic Botany**, New York, v. 89, p. 155-185, 2008.

OLAH, T.V.; MCLOUGHLIN, D.A.; GILBERT, J.D. The simultaneous determination of mixtures of drug candidates by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry as an in vivo drug screening procedure. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 11, p. 17-23, 1997.

OWEN, N.L.; HUNDLEY, N. Endophytes – the chemical synthesizer inside plants. **Science Progress,** New York, v. 87, p. 79-99, 2004.

PACE, N.R. New perspective on the natural microbial word: molecular microbial ecology. **ASM News**, New York, v. 62, p. 463-470, 1996.

PANG, K.L.; MITCHELL, J.I. Molecular approaches for assessing fungal diversity in marine substrata. **Botanica Marina**, Berlin, v. 48, p. 332-337, 2005.

PARRENT, J.L.; GARBELOTTO, M.; GILBERT, G.S. Population genetic structure of the polypore Datronia caperata in fragmented mangrove forests. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, p. 403-410, 2004.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J.H.; HIRANO, S.S. (Ed.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991. p. 179-197.

RATCLIFFE, R.G.; ROSCHER, A.; SACHAR-HILL, Y. Plant RMN spectroscopy. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, New York, v. 39, p. 267-300, 2001.

REDMAN, R.S.; DUNIGAN, D.D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis: from mutualism to parasitism, who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist**, London, v. 151, p. 705-716, 2001.

RIGGLE, P.J.; KUMAMOTO, C.A. Genetic analysis in fungi using restriction-enzyme-mediated integration. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 390-394, 1998.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, p. 1109-1114, 2008.

RODRIGUEZ, R.J.; WHITE JR, J.F.; ARNOLD, A.E.; REDMAN, R.S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, London, v. 182, p. 314-330, 2009.

RUIZ-DÍEZ, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, p. 189-195, 2002.

SARMA, V.V.; HYDE, K.D.; VITTAL, B.P.R. Frequence of occurrence of mangrove fungi from the east coast of India. **Hydrobiologia**, Netherlands, v. 455, p. 41-53, 2001.

SCHWARZER, D.; MARIEL, M.A. Multimodular biocatalysts for natural product assembly. **Natur wissenchaften,** Berlin, v. 88, p. 93-101, 2001.

SCHLOSS, P.D., HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 14, p. 303-310, 2003.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 996-1004, 2002.

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

SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. **Canadian Journal Microbiology,** Saskatoon, v. 50, p. 239-249, 2004.

SHARAF, M.; EL-ANSARI, M.A.; SALEH, N.A.M. New flavonoids from *Avicennia marina* **Fitoterapia**, Novara, v. 71, p. 274-277, 2000.

SIEGEL, M.R.; LATCH, G.C.M.; BUSH, L.P.; FANNIN, F.F.; ROWAN, D.D.; TAPPER, B.A.; BACON, C.W.; JOHNSON, M.C. Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 3301-3315, 1990.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. New York: John Wiley, 1994. 387 p.

SOUSA, O.V.; MACRAE, A.; MENEZES, F.G.R.; GOMES, N.C.M.; VIEIRA, R.H.S.F.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.S. The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceará, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, New York, v. 52, p. 1725-1734, 2006.

SRIDHAR, K.R. Mangrove fungi in India. **Current Science**, Bangalore, v. 86, p. 1586-1587, 2004.

STONE, J.K.; POLISHOOK, J.D.; WHITE, J.R.J. Endophytic fungi. In: MUELLER, G.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S. (Ed.). **Biodiversity of fungi:** inventory and monitoring methods. Burlington: Elsevier, 2004. p. 241-270.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophitic microorganisms. **Journal Natural Products**, Washington, v. 67, p. 257-268, 2004.

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

SURYANARAYANAN, T.S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU M. B.; SASSE, F.; JANSEN R.; MURALI T. S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam**,** v. 23, p. 9-19, 2009.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 18, p. 448-459, 2001.

THINES, E.; ANKE, H.; WEBER, R.W.S. Fungal secondary metabolites as inhibitors of infection-related morphogenesis in phytopathogenic fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, p. 14-25, 2004.

TREMBLAY, L.B.; DITTMAR, T.; MARSHALL, A.G.; COOPER, W. J.; COOPER, W.T. Molecular characterization of dissolved organic matter in a North Brazilian mangrove porewater and mangrove-fringed estuaries by ultrahigh resolution Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance mass spectrometry and excitation/emission spectroscopy. **Marine Chemistry**, New York, v. 105, p. 15-29, 2007.

TZFIRA, T.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 17, p. 147-154, 2006.

VARMA, A.; VERMA, S.; SAHAY, N.; BUTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2741-2744, 1999.

WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domain Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

WUTHRICH, K. Protein Structure Determination in Solution by NMR Spectroscopy. The **Journal of Biological Chemistry**, Zurich, v. 265, p. 22059-22062, 1990.

WU, J.; XIAO, Q.; XU, J.; LI, M. Y.; PAN, J.Y.; YANG, M. H. Natural products from true mangrove flora: source, chemistry and bioactivities. **Natural Products Reports,** Cambridge, v. 25, p. 955-981, 2008.

XIAO, X.; LUO, S.; ZENG, G.; WEI, W.; WAN, Y.; CHEN, L.; GUO, H.; CAO, Z.; YANG, L.; CHEN, J.; XI, Q. Biosorption of cadmium by endophytic fungus (EF) *Microsphaeropsis* sp. LSE10 isolated from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, p. 1668-1674, 2010.

XING, J.; XIE, C.; LOU, H. Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry in natural products bioanalysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, New York, v. 44, p. 368-378, 2007.

YAMASHITA, M.; FENN, J.B. Electrospray ion source another variation on the free-jet theme. **Journal of Physical Chemistry**, New York, v. 88, p. 4451-4459, 1984.

YUAN, J. I.; JIAN-NAN B. I.; BING Y.; XU-DONG Z. Taxol-producing Fungi: A New Approach to Industrial Production of Taxol. **Chinese Journal of Biotechnology**, New York, v. 22, p. 1-6, 2006.

ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 23, p. 753-771, 2006.

ZHANG, N.; FOUNTAIN, S.T.; BI, H.; ROSSI, D.T. Quantification and rapid metabolite identification in drug discovery using API Time-of-Flight LC/MS. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 72, p. 800-806, 2000.

ZHANG, A.; LU, P.; DAHL-ROSHAK, A.M.; PARESS, P.S. Efficient disruption of a polyketide synthase gene (pks1) required for melanin synthesis through *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glarea lozoyensis*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 268, p. 645-655, 2003.

ZUCCARO, A.; BASIEWICZ, M.; ZURAWSKA, M.; BIEDENKOPF, D.; KOGEL, K.H. Karyotype analysis, genome organization, and stable genetic transformation of the root colonizing fungus *Piriformospora indica*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, p. 543-550, 2009.

2 DIVERSIDADE GENÉTICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE MANGUEZAIS DO ESTADO DE SÃO PAULO

Resumo

Fungos endofíticos apresentam funções biológicas importantes, constituindo imensos reservatórios de novos princípios ativos ainda pouco explorados. A versatilidade bioquímica e diversidade biológica dos fungos endofíticos representam uma enorme variedade de genes ainda desconhecidos, os quais, por sua vez, podem apresentar importantes aplicações biotecnológicas, agrícolas e médicas. O número estimado de espécies fúngicas é imenso, entretanto menos de 7% delas são descritas. O presente trabalho buscou acessar a diversidade da comunidade de fungos endofíticos de ramos e folhas de três espécies vegetais (*Rhizophora mangle, Avicennia nitida* e *Laguncularia racemosa*) de dois manguezais do estado de São Paulo (Bertioga impactado e não impactado, e Cananéia), em duas estações diferentes (verão e inverno). Cerca de 4300 fungos endofíticos foram isolados em meio de cultura a partir das partes vegetais avaliadas, sendo que 344 foram identificados por meio do sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, comparação das sequências de nucleotídeos com as disponíveis no GenBank via BLASTn, e agrupamento em filogramas. Foram calculados os índices de diversidade de Shannon-Wienner e de riqueza de Chao1. Os resultados mostraram que os ramos apresentaram maior frequência e diversidade fúngica quando comparados com as folhas. Houve diferença na frequência de fungos isolados de folhas e ramos das diferentes espécies para os locais impactado e não impactado avaliados no verão e inverno, sendo que as espécies *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa* apresentaram maior frequência de fungos endofíticos no local impactado. A frequência de colonização pode ser afetada pela estação do ano em que é realizada a coleta, e o efeito depende do manguezal considerado. As análises revelaram que a comunidade fúngica associada às plantas de manguezal é composta por pelo menos 35 gêneros diferentes, sendo que os mais frequentes foram *Diaporthe, Colletotrichum, Fusarium*, *Trichoderma e Xylaria.* Houve a predominância de fungos do Filo Ascomiceto (99,42%), já que apenas 0,58% pertencem ao Filo Basidiomiceto. A comunidade fúngica associada às plantas de manguezais é composta por um pequeno número de gêneros com muitos representantes e por um grande número de gêneros com poucos representantes. A construção de curvas de rarefação mostrou que a amostragem populacional adotada no presente trabalho permitiu acessar a diversidade da comunidade fúngica associada às plantas de manguezais considerando os níveis de similaridade de 97% e 95% entre as sequências de nucleotídeos, sendo que os índices de diversidade de Shannon-Wienner e de riqueza de Chao1 encontrados para estes níveis de similaridade foram ($H'_{(95\%)}$=4,00; $H'_{(97\%)}$=4,22; $Chao1_{(95\%)}$=204; $Chao1_{(97\%)}$=603). Esses dados indicam que a comunidade de fungos endofíticos de ramos e folhas das três espécies de plantas dos manguezais de Cananéia e Bertioga avaliada no verão abriga grande diversidade e riqueza de fungos. Os resultados revelaram que as plantas de manguezais são o reservatório de uma grande diversidade fúngica com alto potencial para exploração do ponto de vista biotecnológico. Esse é o primeiro relato sobre análise da diversidade de fungos endofíticos de manguezais do estado de São Paulo compreendendo um grande número de isolados fúngicos identificados por meio de biologia molecular.

Palavras-chave: Diversidade; Fungos; Endófitos; Manguezais; Identificação molecular

2 GENETIC DIVERSITY OF ENDOPHYTIC FUNGI FROM MANGROVES AT SÃO PAULO STATE

Abstract

Endophytic fungi have important biologic functions and can be considered huge sources of new compounds which have not been effectively explored yet. The biochemical versatility and biologic diversity of endophytic fungi indicates that there is a wide variety of unknown genes, which can have important applications for biotechnology, agriculture and medicine. Although the estimated number of fungal species is huge, less than 7% of them have been described. This study aimed to evaluate the diversity of endophytic fungal community from leaves and branches of three plant species (*Rhizophora mangle, Avicennia nitida* and *Laguncularia racemosa*) from two mangroves of São Paulo State (Cananéia, Bertioga oil-spilled and Bertioga non oil-spilled) under two different seasons (summer and winter). About 4300 fungi were isolated in culture media from the plant tissues evaluated, whereas 344 fungi isolates were identified by sequencing the ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA, comparing the sequences of nucleotides with those available in GenBank by BLASTn, and confirming by phylogram gathering. The Shannon-Wienner index of diversity and the Chao1 index of richness were calculated. The results showed that the branches had the highest frequence of fungal diversity when compared to the leaves. There were differences in the frequencies of fungi isolated from different species in leaves and branches from oil-spilled and non oil-spilled mangrove in summer and winter seasons. The species *Rhizophora mangle* and *Laguncularia racemosa* presented the highest frequency of endophytic fungi in the oil-spilled mangrove. The frequency of colonization can be influenced by the season of the year in which is performed the collection and the effect depends on the mangrove analysed. The results revealed that the fungal community associated to the mangrove plants is composed by at least 35 different genera – the most frequent was *Diaporthe, Colletotrichum, Fusarium*, *Trichoderma and Xylaria.* Fungi from the Ascomiceto Phylum predominated (99.42%), whereas only 0.58% belonged to the Basidiomiceto phylum. The fungal community associated to mangrove plants is composed by a small number of genera with many members and by a great number of genera with a few members. The rarefaction curves displayed that the selected populational sample enabled to access the mangroves' fungal community diversity with similarity levels of 97% and 95% among nucleotide sequences. The Shannon-Wienner and the Chao1 indexes obtained to these similarity levels were $H'_{(95\%)}$=4,00, $H'_{(97\%)}$=4,22, $Chao1_{(95\%)}$=204 and $Chao1_{(97\%)}$=603. These data suggest that the endophytic fungal community from branches and leaves of the three species of plants from Cananéia and Bertioga mangroves during the summer season has a greater diversity of fungi. The results presented in this work showed that mangrove plants host a fungal community highly diverse with a great potential for biotechnological exploration. This is the first report regarding analysis of endophytic fungal diversity from mangroves in São Paulo State, including the identification of a great number of fungal isolates by molecular biology.

Keywords: Diversity; Fungi; Endophytes; Mangrove; Molecular Identification

2.1 Introdução

Os manguezais são conhecidos pelos seus vários bioprodutos de grande importância médica e econômica. O grande potencial dos manguezais como fonte de novos agroquímicos e compostos medicinais tem sido muito relatado (ANANDA; SRIDHAR, 2002; BANDARANAYAKE, 1995, 1998, 2002; LI et al., 2009; MILES et al., 1999; SHARAF et al., 2000; WU et al., 2008). Esse notável potencial biotecnológico das plantas de manguezais pode estar relacionado com a comunidade de fungos endofíticos que estabelece associação mutualística com a planta. Por essa razão, cada vez mais a comunidade endofítica dessas plantas tem sido investigada (CAVALCANTE et al., 2009; GILBERT; GOROSPE; RYVARDEN, 2008; HARVEY; GOFF, 2010; KUMARESAN; TRICHUR; SURYANARAYANAN, 2001; TREMBLAY, 2007). Portanto, estudos sobre a comunidade endofítica de plantas de manguezais são importantes, permitindo o acesso a novas espécies de fungos e metabólitos produzidos pelos mesmos, bem como o estudo da interação entre planta hospedeira e fungo endofítico.

O número estimado de espécies fúngicas é de 1,5 milhões, entretanto o número de espécies descritas até hoje é de aproximadamente 100 mil (HAWKSWORTH, 1991, 2004). Atualmente, acredita-se que todas as espécies de plantas são potenciais hospedeiros para diversos fungos (AGRIOS, 1997; RO DRIGUEZ et al., 2009). Fungos endofíticos de plantas tropicais estão entre o grupo de fungos que têm sido estudados para chegar a esse número estimado de 1,5 milhões de espécies fúngicas (SURYANARAYANAN; VENKATESAN; MURALI, 2003). Esses dados revelam o grande potencial de exploração da diversidade genética e materiais biotecnológicos de endófitos de plantas tropicais.

Diferentes tipos de fungos podem estar associados aos manguezais, dentre eles os epifíticos, saprófitas, biotróficos superficiais, patógenos e endófitos (GOH; YIPP, 1996). Entretanto, ainda pouco se conhece sobre a comunidade fúngica endofítica das plantas de manguezais, já que essa comunidade tem sido mais estudada em outras plantas tropicais (SURYANARAYANAN; KUMARESAN; JOHNSON, 1998).

Embora vários estudos sobre a associação de fungos com os detritos de manguezais tenham sido publicados (ANANDA; SRIDHAR, 2004; HYDE; LEE, 1995; KUMAR; HATHA; CHRISTI, 2007), há poucos relatos sobre fungos endofíticos de plantas de manguezais, sendo que a maioria deles são sobre endófitos de folhas (SURYANARAYANAN; KUMARESAN;

JOHNSON, 1998; SURYANARAYANAN; VENKATESAN; MURALI, 2003; KUMARESAN; SURYANARAYANAN, 2001). O estudo sobre raízes de plantas de manguezais mostrou que elas são uma fonte rica de fungos endofíticos (ANANDA; SRIDHAR, 2002).

O presente trabalho investigou a diversidade genética de fungos endofíticos de ramos e folhas de *Rhizophora mangle, Avicennia nitida* e *Laguncularia racemosa* presentes nos manguezais de Bertioga e de Cananéia, durante o verão e o inverno. As frequências dos fungos endofíticos foram comparadas entre os diferentes fatores de variação (local de isolamento, estação do ano e órgão vegetal). Amostras representativas foram selecionadas para identificação molecular dos fungos endofíticos por meio do sequenciamento de segmentos do rDNA, BLASTn e agrupamento em filogramas.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Materiais e métodos

2.2.1.1 Material vegetal e locais de coleta

Para a realização do presente trabalho, foram coletados ramos e folhas de mangue vermelho (*Rhizophora mangle*), mangue Siriba (*Avicennia nitida*) e mangue branco (*Laguncularia racemosa*) presentes no manguezal de Bertioga e Cananéia, no estado de São Paulo, Brasil. A coleta nestes dois locais foi realizada em duas épocas diferentes, verão e inverno, totalizando 4 isolamentos. A coleta no manguezal de Bertioga foi realizada em local impactado, que sofreu derramamento de petróleo em 1980, e em local não impactado, o qual não sofreu o derramamento de petróleo. Em cada local foram coletadas folhas e ramos de cinco plantas de cada uma das três espécies (*Rhizophora mangle*, *Avicennia nitida*, *Laguncularia racemosa*). O delineamento adotado para as análises estatísticas foi o inteiramente casualizado com cinco repetições.

2.2.1.2 Isolamento de fungos endofíticos de plantas dos manguezais

O isolamento de fungos endofíticos de folhas e ramos de plantas dos manguezais de

Bertioga e Cananéia seguiu o processo de desinfecção superficial, no qual as superfícies das folhas e ramos foram desinfectadas pela seguinte sequência de imersão: etanol 70% por 60 segundos; hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% (v/v) de cloro ativo por 3 minutos; novamente em etanol 70% por 60 segundos e duas lavagens em água esterilizada. Após processadas, as folhas/ramos foram cortadas em pequenos fragmentos de aproximadamente 50 mm^2, com auxílio de um estilete sobre placa de Petri esterilizada. Foram transferidos 7 fragmentos vegetais para cada placa de Petri contendo meio de cultura BDA (Potato Dextrose Agar, Merk) acrescido dos antibióticos cloranfenicol (50 $\mu g.mL^{-1}$) e estreptomicina (50 $\mu g.mL^{-1}$), para impedir o crescimento de bactérias. Com a finalidade de avaliar a eficiência do processo de desinfecção, 100 μL da água utilizada na última lavagem foram semeadoas sobre meio BDA (Potato Dextrose Agar, Merk). As placas de isolamento foram incubadas a 28º C por 2 a 14 dias e acompanhadas periodicamente para avaliação do crescimento de fungos a partir dos fragmentos vegetais. Após o crescimento fúngico, as colônias foram contadas, agrupadas por características morfológicas e isolados representativos da diversidade fúngica foram coletados, purificados e estocados para análises posteriores.

2.2.1.3 Purificação e estoque de fungos

A purificação das colônias estocadas foi realizada por meio de diluição em série e semeadura em meio de cultura sólido. Para isso, com o auxílio de alça metálica esterilizada foram coletados esporos e/ou micélios da colônia e transferidos para tubo de 2 mL contento 1 mL de solução de salina (8,5 g de NaCl em 1 L de água), após, o tubo foi intensamente agitado utilizando-se agitador (Vortex). Após a agitação, a suspensão foi diluída até 10^{-5} e 10^{-6} e 100 μL dessas diluições foram semeadas em placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram incubadas em estufa a 28º C para o crescimento e obtenção de colônias isoladas. As colônias isoladas foram armazenadas de acordo com o método Castellani (ARAÚJO et al., 2002), no qual os fungos foram crescidos em meio BDA sólido, e então foram coletados discos de meio de cultura com micélios e colocados em frascos de 10 mL contendo água esterilizada. Os frascos foram identificados e armazenados à temperatura ambiente.

2.2.1.4 Identificação molecular

O DNA dos isolados fúngicos foi extraído de acordo com Raeder e Broda (1985). As regiões ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA foram amplificadas pela técnica de PCR em termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94º C por 5 minutos, seguido de 24 ciclos de 94º C por 30 s, 55º C por 30 s e 72º C por 30 s, após os ciclos, uma extensão final a 72º C por 7 minutos. Foram utilizados os *primers* ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), os quais anelam em posições específicas do 18S e 28S do rDNA. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 μL, contendo Tampão 1x (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,4), 3,7 mM de $MgCl_2$, 1 mM de dNTP, 0,05 $U.\mu L^{-1}$ de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen),0,4 μM de cada *primer* e 3 ng de DNA. O fragmento amplificado foi observado por eletroforese em gel de agarose 1,4% a 3 $V.cm^{-1}$, juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). Após a eletroforese o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1 $mg.mL^{-1}$) e fotodocumentado. Posteriormente, os fragmentos amplificados foram purificados com o Kit GFX PCR (Amersham Pharmacia Biotech) e enviados para o Instituto Biológico, São Paulo - SP, onde foram sequenciados pelo Dr. Ricardo Harakava.

A classificação taxonômica dos isolados fúngicos foi realizada com base na sequência de nucleotídeos da região ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA. Inicialmente, as sequências de nucleotídeos foram analisadas comparativamente via BLASTn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) contra a base de dados do GenBank, que utiliza o método heurístico para encontrar o melhor *score* de alinhamentos locais entre a sequência submetida e o banco de dados. Com isso, foram consideradas as classificações equivalentes às das sequências de linhagens bem caracterizadas que apresentaram os valores mais altos de similaridade com as sequências submetidas. Em seguida, a classificação taxonômica foi confirmada pelo agrupamento em filogramas com sequências de gêneros e espécies conhecidas disponíveis no GenBank. Para o alinhamento, edição e construção da árvore foi utilizado o programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007). O agrupamento foi calculado de acordo com o método de *Neighbor-Joining* (NJ) para 1000 réplicas com base nas matrizes de distância genética calculadas pelo modelo de Jukes-Cantor e posterior comparação de sequências de nucleotídeos com as disponíveis no GenBank, por meio do programa BLASTn, e confirmação pelo agrupamento em filogramas.

2.2.1.5 Análise estatística

A análise estatística dos dados de isolamento foi realizada utilizando-se os dados de frequência fúngica (Ff = *número de colônias fúngicas/número de fragmentos do órgão vegetal*). A análise de variância foi realizada com o auxílio do programa *SAS - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA,* considerando o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial. Os dados de Ff foram transformados usando a fórmula $\sqrt{x+0,5}$ antes da análise de variância para normalização dos dados.

2.2.1.6 Análise de diversidade, riqueza e rarefação

A diversidade e a riqueza da comunidade fúngica de ramos e folhas das três espécies de plantas *Rhizophora mangle, Avicennia nitida* e *Laguncularia racemosa*, nas duas épocas de isolamento (verão e inverno) e nos dois locais amostrados (Bertioga e Cananéia) foram quantificadas por meio do cálculo dos índices de Shannon-Wienner (*H'*) e Chao1, respectivamente. Estes índices foram calculados utilizando o programa computacional DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005), que também gerou os dados de rarefação, considerando diferentes níveis de similaridade entre as sequências de nucleotídeos da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA dos fungos avaliados. As matrizes de similaridade utilizadas no programa DOTUR foram geradas com o alinhamento das sequências de cada um dos grupos e posterior cálculo das matrizes aplicando as distâncias de Jukes-Cantor, no programa DNADist, no *software* Phylip (http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/dnadist-simple.html). O programa DOTUR calculou desta maneira a ocorrência dos diferentes filotipos nos diferentes grupos de sequências. Os níveis de similaridade para determinar os níveis taxonômicos nas análises foram: 100% (linhagens), 99% (espécies) e 97-95% (gêneros).

2.2.2 Resultados e discussões

2.2.2.1 Isolamento de fungos endofíticos dos manguezais de Bertioga e Cananéia

Por meio do método de isolamento dependente de cultivo foi possível isolar 1200 e 1600 fungos endofíticos em Bertioga no verão e no inverno, respectivamente. Já nos isolamentos de Cananéia no verão e no inverno foram observados 800 e 700 fungos endofíticos, respectivamente. A frequência destes fungos foi avaliada nas folhas e ramos de três espécies de plantas (*Rhizophora mangle*, *Avicennia nitida* e *Laguncularia racemosa*) presentes nos manguezais de Cananéia e Bertioga (local impactado e local não impactado). Os fungos endofíticos obtidos nos isolamentos realizados foram separados em 10 grupos morfológicos (Figura 2.1). O principal critério utilizado para a separação das colônias foi a coloração. Devido ao grande número de isolados e diversidade morfológica obtidos no isolamento, essa primeira classificação com base na morfologia facilitou a coleta dos dados, permitindo a organização dos dados durante a coleta de colônias fúngicas.

A análise de variância (ANOVA) para os fatores de variação órgão vegetal (ramo e folha), espécie (*Rhizophora mangle*, *Avicennia nitida* e *Laguncularia racemosa*) e isolamento (Cananéia-verão, Cananéia-inverno, Bertioga/local impactado-verão, Bertioga/local impactado-inverno, Bertioga/local não impactado-verão, Bertioga/local não impactado-inverno), foi realizada a partir dos dados de frequência fúngica e os resultados estão listados na Tabela 2.1. Os resultados da ANOVA mostraram que todos os fatores de variação (órgão, espécie e isolamento) deram origem a mudanças significativas ($P<0,05$) nas frequências dos fungos associados às plantas dos manguezais de Cananéia e Bertioga (Tabela 2.1, Figura 2.2), indicando que os diferentes fatores considerados (órgão, espécie, local de isolamento e estação) apresentaram efeitos significativos sobre a quantidade de fungos endofíticos das plantas de maguezais do estado de São Paulo. As espécies das plantas influenciaram de forma significativa ($P=0,0221$) a frequência de fungos endofíticos (Tabela 2.1), sendo que em termos de quantidade de fungos endofíticos *Laguncularia racemosa* > *Rhizophora mangle* > *Avicennia nitida* (Figura 2.2a).

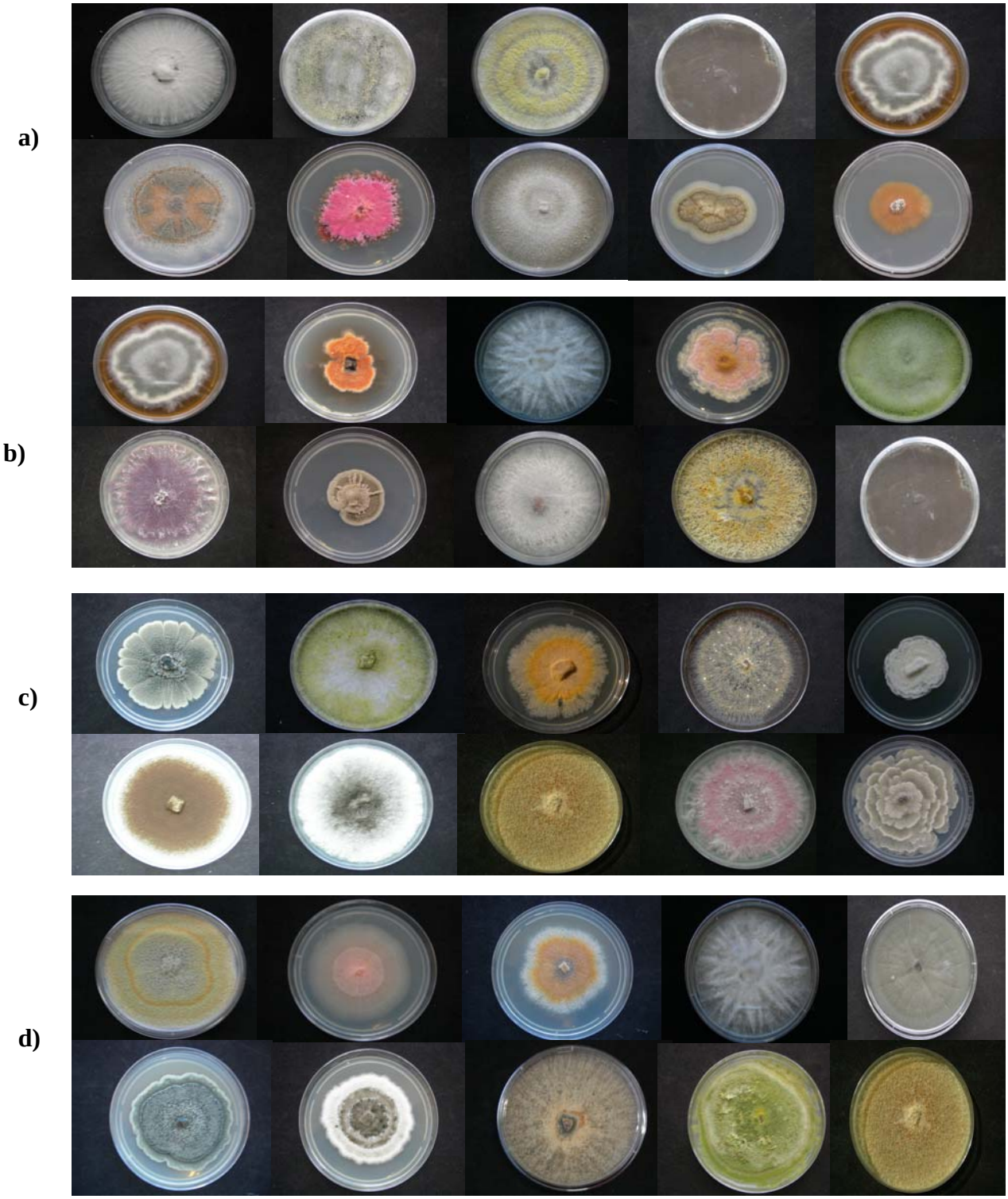

Figura 2.1 – Grupos morfológicos obtidos no isolamento de fungos endofíticos de ramos e folhas das espécies *Rhizophora mangle*, *Avicennia nitida* e *Laguncularia racemosa* dos manguezais de a) Bertioga-verão; b) Bertioga-inverno, c) Cananéia-verão, e d) Cananéia-inverno. Os fungos foram cultivados em meio BDA

Tabela 2.1 - ANOVA para os fatores órgão (folha e ramo), isolamento (Cananéia-verão, Cananéia-inverno, Bertioga/local impactado-verão, Bertioga/local impactado-inverno, Bertioga/local não impactado-verão, Bertioga/local não impactado-inverno) e espécie (*Rhizophora mangle*, *Avicennia nitida* e *Laguncularia racemosa*)

Fator de variação (FV)	**GL**	**SQ**	**QM**	**F**	**P > F**
Repetição	4	0,01377453	0,00688726	0,200	0,8183 ^{ns}
Espécie	2	0,26402151	0,13201075	3,850	0,0221*
Órgão	1	6,14733275	6,14733275	179,0	<,0001**
Isolamento	5	6,12251279	1,22450256	35,67	<,0001**
Interação (Espécie X órgão)	2	0,22886761	0,11443380	3,330	0,0365*
Interação (Espécie X isolamento)	9	2,19590832	0,24398981	7,110	<,0001**
Interação (Órgão X isolamento)	5	0,64367155	0,12873431	3,750	0,0024**
Interação (Espécie X órgão X isolamento)	9	1,22701225	0,13633469	3,970	<,0001**
Coeficiente de variação (CV) = 14,81					

^{ns} - indica que não existe diferença significativa entre os valores de F encontrados e os valores da tabela F (PEARSON; HARTLEY, 1966).

* - indica que existe diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade.

** - indica que existe diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade

As plantas de manguezais podem sintetizar e acumular solutos para regular e manter o balanço osmótico (POPP et al., 1993; WERNER; STELZER, 1990). A espécie vegetal *Laguncularia racemosa* acumula manitol e prolina para regular a concentração de sal interna (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001; POLANIA, 1990). Estudos indicam que o manitol e prolina favorecem o crescimento de fungos em meio de cultivo servindo como uma fonte adicional de energia (COUTINHO, 2000; MACHADO et al., 2007). Portanto, esses solutos que atuam no controle osmótico da planta poderiam estar também favorecendo o crescimento e desenvolvimento de fungos endofíticos na espécie *Laguncularia racemosa* a qual apresentou a maior frequência fúngica descrita nesse trabalho. Características químicas das espécies de plantas de manguezais também podem estar relacionadas com a resistência à insetos herbívoros (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001; CHOONG et al., 1992; KATHIRESAN, 2003). No estudo de Gara et al., 1990 a espécie *Laguncularia racemosa* apresentou maior nível de resistência ao ataque do inseto *Oiketicus kirbyi* em relação as espécies *Avicennia germinas* e *Conocarpus erectus*. A produção de taninos pela planta *Laguncularia racemosa* pode estar associado à proteção química ao ataque de insetos, favorecendo dessa forma o crescimento e desenvolvimento dessa espécie vegetal (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001).

A ANOVA revelou a presença de interação (P=0,0365) entre os fatores espécie e órgão, ou seja, o efeito das diferentes espécies de mangue sobre a frequência de fungos endofíticos depende do órgão vegetal avaliado, e vice-versa. Ao comparar as frequências fúngicas entre folhas e ramos das três espécies de plantas, foi observado que houve diferença significativa

(P<0,001) entre a ocorrência de fungos (Figura 2.2 b), o que sugere que os ramos possuem um maior número de fungos endofíticos, e portanto, devem constituir um local mais favorável para desenvolvimento desses microrganismos. Isso indica que a colonização dos fungos endofíticos varia de acordo com o órgão vegetal. Esse padrão de colonização de microrganismos endofíticos ao longo da planta também foi observado nos estudos com bactérias endofíticas de cana-de-açucar e soja, sendo que as partes inferiores das plantas apresentavam maior frequência de endófitos (MENDES et al., 2007; KUKLINSKY-SOBRAL, et al., 2004). Além disso, a ANOVA revelou que as espécies *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa* apresentaram diferença signficativa na frequência de fungos endofíticos quando foram comparados os dois locais (impactado e não impactado) (Figura 2.2c, Tabela 2.1). Uma vez que a maior frequência fúngica foi encontrada no local impactado pode-se sugerir que nas espécies *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa* a comunidade fúngica endofítica deve estar levando mais tempo para recuperar o seu equilíbrio natural o que já deve estar ocorrendo com comunidade fúngica de *Avicennia nitida*. É provável que a comunidade fúngica que coloniza endofiticamente as diferentes espécies de plantas não seja a mesma devido às diferenças na interação fungo-planta, isso pode estar relacionado com esta diferença estatística observada. No estudo de Hyde (2004) foi observada a diminuição da frequência fúngica do manguezal poluído com petróleo quando comparado ao manguezal sadio. O efeito da toxicidade proveniente do derramamento de petróleo em manguezais pode ser diferente entre as espécies de plantas atingidas. No estudo de Lamparelli et al. (1997) o derramento de petróleo na região costeira do estado de São Paulo causou 25,9% de desfoliação em *Rhizophora mangle*, 43,4% e 64,5% de defoliação em *Laguncularia racemosa* e *Avicennia schaueriana* respectivamente. A mortalidade diferencial das espécies de plantas pode levar a mudanças na estrutura da comunidade biológica dos manguezais atingidos (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001).

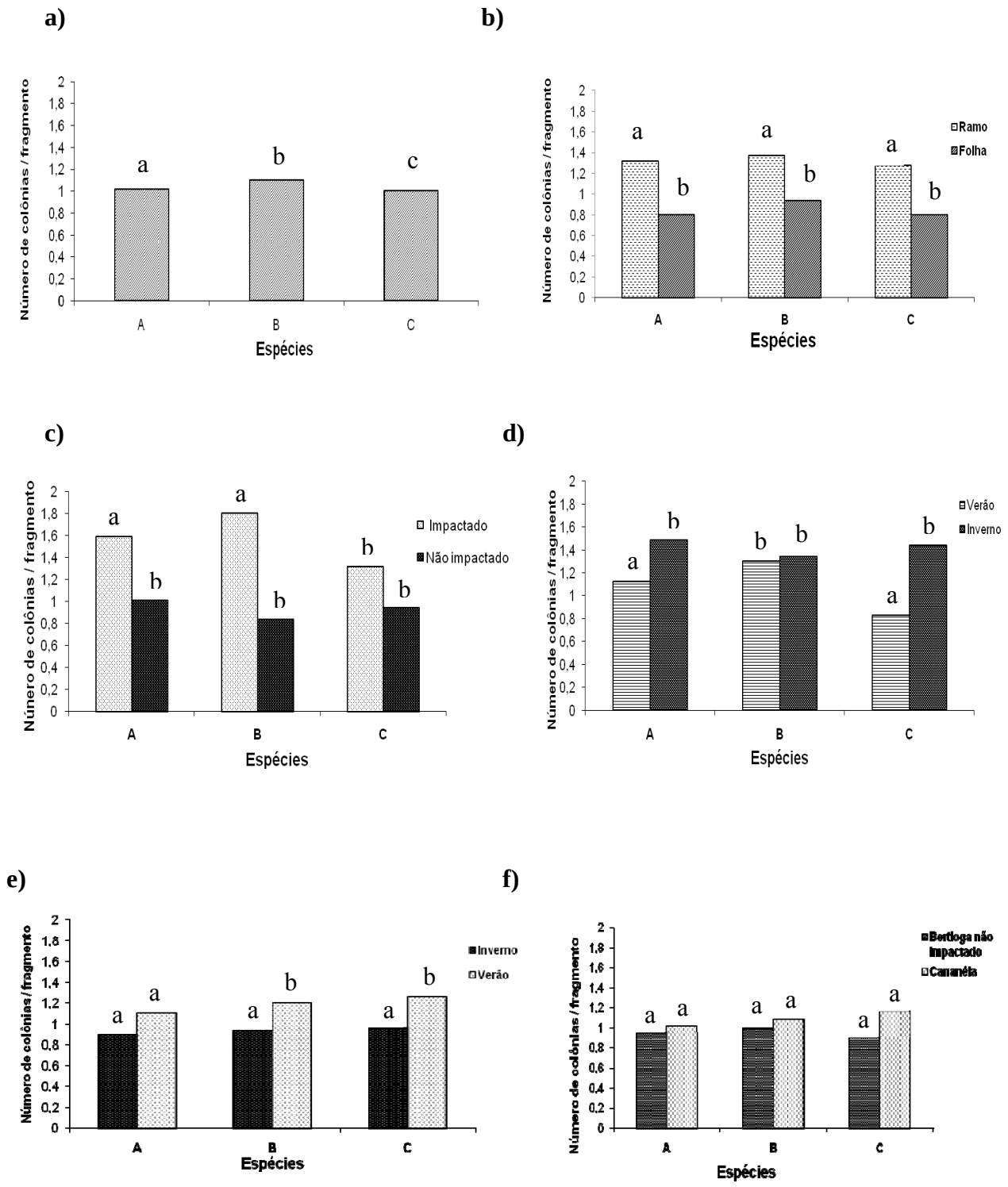

Figura 2.2 - Frequência de isolamento de fungos endofíticos das espécies de plantas (**a**) A: *Rhizophora mangle* B: *Laguncularia racemosa* e C: *Avicennia nitida* de acordo com os seguintes tratamentos: (**b**) ramo e folha, (**c**) Bertioga impactado e não impactado, (**d**) Bertioga verão e inverno, (**e**) Cananéia verão e inverno e (**f**) local não impactado de Bertioga e Cananéia. Letras iguais não representam diferença significativa a 5% de probabilidade no teste de comparação de médias de Tukey

Os resultados da ANOVA mostraram diferença estatisticamente significativa (P<0,001) entre a frequência de fungos endofíticos de ramos e folhas das espécies *Rhizophora mangle* e *Avicennia nitida* encontradas em Bertioga no inverno e no verão, indicando que estas espécies de plantas foram mais colonizadas por fungos endofíticos no inverno (Figura 2.2d, Tabela 2.1). De acordo com dados do Cepagri (Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas aplicadas a agricultura – http://www.cpa.unicamp.br) o inverno em Bertioga no ano da coleta (2007) foi chuvoso, apresentando índice pluviométrico médio de 427,25 mm e temperatura média de 24,3º C. Essa umidade pode ter contribuído para a maior colonização de fungos endofíticos nestas espécies vegetais durante o inverno em Bertioga. Diferentemente, os dados de isolamento a partir de folhas e ramos de plantas coletadas em Cananéia mostraram que a frequência de fungos endofiticos das espécies *Laguncularia racemosa* e *Avicennia nitida* foi estatisticamente maior no verão (Figura 2.2e, Tabela 2.1). De acordo com dados do Cepagri o verão em Cananéia em 2007 foi mais chuvoso e quente que o inverno, apresentando índice pluviométrico médio de 212,7 mm e temperatura média de 23,9º C. Os fatores climáticos (umidade e temperatura) podem ter favorecido a maior colonização de fungos endofíticos nas espécies *Laguncularia racemosa* e *Avicennia nitida* durante o verão em Cananéia. Estudos sobre fungos endofíticos de manguezais mostram que a plantas são mais colonizadas durante os meses mais úmidos (KUMARESAN; SURYANARAYANAN, 2001; SARMA; HYDE; VITTAL, 2001; SURYANARAYANAN; KUMARESAN; JOHNSON, 1998; SURYANARAYANAN; MURALI; VENKATESAN, 2002). Dessa forma, a umidade deve ser um fator importante para o crescimento e desenvolvimento fúngico. Além disso, não foi observada diferença estatística entre a frequência total de fungos endofíticos das três espécies de plantas localizadas em Cananéia e o local não impactado de Bertioga (Figura 2.2f). Este resultado pode ser explicado pelo fato de os dois ambientes apresentarem menor efeito antropogênico, portanto é necessária a preservação das florestas de manguezais, desta maneira será preservada também a comunidade de fungos endofíticos que podem fornecer novos compostos biologicamente ativos com inúmeras funções como antibióticos, enzimas, etc.

A ANOVA revelou a presença de interação (P<0,001) entre os fatores espécie e isolamento, ou seja, o efeito das diferentes espécies vegetais sobre a frequência de fungos endofíticos depende do local de isolamento e estação do ano, e vice-versa. Além disso, também foi constatada a interação entre órgão e isolamento (P=0,0024) indicando que a frequência de

fungos nos diferentes órgãos (ramo e folha) depende do local de isolamento. Houve também a interação entre os três fatores, órgão, espécie e isolamento (P<0,001) mostrando que o efeito dos diferentes órgãos sobre a frequência de fungos endofíticos depende da espécie e do local de coleta avaliados.

2.2.2.2 Comunidade fúngica endofítica associada aos manguezais

2.2.2.2.1 Classificação taxonômica dos isolados fúngicos

Foram selecionados 344 fungos endofíticos com base na classificação morfológica abrangendo amostras representativas da diversidade de cada tratamento. Estes endófitos foram identificados por meio da comparação das suas sequências de nucleotídeos da região ITS1-5,8S-ITS2 com sequências conhecidas do banco de dados GenBank (NCBI). Considerando-se os maiores valores de similaridade, e posterior confirmação pelo agrupamento em filogramas (Figuras 2.3 a 2.12), foi possível determinar a classificação taxonômica dos fungos avaliados. Entretanto, alguns isolados não apresentaram alta similaridade com nenhuma sequência do banco de dados, indicando que pode se tratar de uma nova espécie ou que o banco de dados para a região ITS encontra-se incompleto.

De acordo com os resultados, 25,59% dos isolados fúngicos foram identificados em nível de gênero, 61,04% foram identificados em nível de espécie e 13,37% não foram identificados em nível de gênero, sendo que o nível taxonômico mais próximo (filo, classe, ordem ou família) está listado na tabela 2.5. Nas condições avaliadas, a comunidade fúngica associada às plantas de manguezais é composta por pelo menos 35 gêneros diferentes e de alguns fungos não identificados (Tabelas 2.2, 2.3, 2.4, 2.5). Dentre os fungos identificados, o filo mais abundante isolado de plantas de manguezais foi o Ascomicota (99,42%), sendo identificados fungos pertencentes as classes Eurotiomicetos, Sordariomicetos, Dothideomicetos e Sacaromicetos. O filo Basidiomicota representou apenas 0,58% da população avaliada. Estudos relatam que a comunidade fúngica associada às plantas é composta predominantemente pelo filo Ascomicota (GOMES et al., 2003; SRIDHAR; WANG; GUO; HYDE, 2005; ZIJLSTRA et al., 2005). Além disso, há baixa frequência de fungos do filo Basidiomicota isolados mediante o cultivo de fragmentos vegetais em meio de cultura (CROZIER et al., 2006). É importante ressaltar que o

acesso à diversidade genética de fungos mediante técnica de isolamento está limitada aos fungos cultivados e às condições avaliadas. Provavelmente, somente uma parte da diversidade pode ser acessada com a metodologia de isolamento dependente de cultivo, entretanto, o método utilizado nesse trabalho fornece informações importantes sobre frequência e composição da comunidade fúngica cultivável associada aos manguezais. Dessa forma, tem sido relatada na literatura a diferença entre as comunidades fúngicas obtidas por meio de métodos dependente e independente de cultivo (STUART et al., 2010; ZUCCARO; SCHULZ; MITCHELL, 2003).

Os gêneros mais frequentes nesse trabalho foram *Diaphorte, Fusarium, Trichoderma*, *Colletotrichum* e *Xylaria*. Vinte gêneros (*Arthothelium, Chrysoporthe, Coniothyrium, Coprinellus, Curvularia, Epicoccum, Eutypa, Gelasinospora, Lasiodiplodia, Massarina, Neosartorya, Neurospora, Nigrospora, Periconia, Phaeoramularia, Phaeoseptoria, Phanerochaete, Pseudallescheria, Scolecobasidium,* e *Valsa*) foram representados por apenas um isolado. Esses dados indicam que a comunidade fúngica avaliada é composta por poucos gêneros com muitos representantes e muitos gêneros com poucos representantes. Estudos prévios mostram também essa distribuição dos fungos que compõem a comunidade endofítica de manguezais (ANANDA; SRIDHAR, 2002; SARMA; HYDE; VITTAL, 2001; SURYANARAYANAN; KUMARESAN; JOHNSON, 1998; SURYANARAYANAN; MURALI; VENKATESAN, 2002; SURYANARAYANAN; KUMARESAN, 2000). O grupo de fungos não identificados foi representado por 46 isolados (13,37%) pertencentes ao filo Ascomicota, sendo que, 15 apresentaram similaridades com representantes da ordem Diaporthales, 6 apresentaram similaridades com membros da ordem Hipocreales, 8 apresentaram similaridades com membros da ordem Xilariales, 2 apresentaram similaridades com membros da ordem Botryosphaeriales, 2 apresentaram similaridades com membros da ordem Pleosporales, 1 apresentou similaridade com membros da ordem Trichosphaeriales, 2 apresentaram similaridade com membros da ordem Pyrenulales, 9 apresentaram similaridades com membros da família Glomerellaceae, 1 apresentou similaridade com membros da classe Dothideomicetos. Os gêneros que compõem a comunidade fúngica endofítica de plantas de manguezais encontram-se listados nas Tabelas 2.2, 2.3 e 2.4.

Tabela 2.2 – Classificação taxonômica de 171 fungos endofíticos e distribuição de acordo com estação do ano (verão e inverno), espécies de plantas (A: *Rhizophora mangle*, B: *Laguncularia racemosa* e C: *Avicennia nitida*) e órgãos (F: folha e R: ramo) em Cananéia

Gênero	**Fungos endofíticos de Cananéia no verão**							**Fungos endofíticos de Cananéia no inverno**							**Total geral**	**%**
	A		**B**		**C**		**Total**	**A**		**B**		**C**		**Total**		
	R	**F**	**R**	**F**	**R**	**F**		**R**	**F**	**R**	**F**	**R**	**F**			
Alternaria	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	1	2	1,17
Arthothelium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aspergillus	0	0	0	1	2	1	4	0	2	0	0	0	1	3	7	4,09
Botryosphaeria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chrysoporthe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Colletotrichum	3	1	0	2	9	0	15	1	8	0	2	2	7	21	35	21,05
Coniothyrium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coprinellus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Curvularia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0,59
Cylindrocladium	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,59
Cytospora	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	2	1,17
Endothia	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	2	1,17
Epicoccum	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,59
Eutypa	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,59
Fusarium	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,59
Gelasinospora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Guignardia	4	0	0	1	0	0	5	0	0	0	3	0	1	4	9	5,26
Lasiodiplodia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Massarina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0,59
Neofusicoccum	0	0	2	0	0	0	2	0	1	0	0	1	0	2	4	2,34
Neosartorya	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neurospora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nigrospora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0,59
Penicillium	1	0	2	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1	1	4	2,34
Periconia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0,59
Pestalotiopsis	0	0	0	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	1,75
Phaeoramularia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0,59
Phaeoseptoria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phanerochaete	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0,59
Phomopsis	3	0	5	5	7	2	22	1	0	1	1	2	3	8	30	17,54
Pichia	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	3	3	1,75
Pseudallescheria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0,59
Scolecobasidium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0,59
Trichoderma	6	0	1	0	0	0	7	2	1	3	1	1	3	11	18	10,53
Xylaria	3	0	0	0	2	2	7	0	1	1	0	0	0	2	9	5,26
Não identificado	0	6	2	1	2	1	12	0	4	1	3	10	0	18	30	17,54

Fungos que foram identificados nas fases sexual e assexual foram agrupados sendo que o gênero indicado foi o da fase assexual;
Não identificado – grupo de endófitos que não apresentaram similaridade com as sequências depositadas no banco de dados do GenBank

Tabela 2.3 – Classificação taxonômica de 88 fungos endofíticos e distribuição de acordo com local de estação (verão e inverno), espécies de plantas (A: *Rhizophora mangle*, B: *Laguncularia racemosa* e C: *Avicennia nitida*) e órgãos (F: folha e R: ramo) no local impactado de Bertioga

Gênero	**Fungos endofíticos do local impactado de Bertioga no verão**							**Fungos endofíticos do local impactado de Bertioga no inverno**							**Total geral**	**%**
	A		**B**		**C**		**Total**	**A**		**B**		**C**		**Total**		
	R	**F**	**R**	**F**	**R**	**F**		**R**	**F**	**R**	**F**	**R**	**F**			
Alternaria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arthothelium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aspergillus	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	2	2,27
Botryosphaeria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chrysoporthe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1,14
Colletotrichum	0	1	0	1	2	2	6	0	2	0	1	2	4	9	15	17,05
Coniothyrium	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	2	2,27
Coprinellus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Curvularia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cylindrocladium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	2	2,27
Cytospora	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1,14
Endothia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	2	2,27
Epicoccum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eutypa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fusarium	2	4	2	5	1	1	15	1	0	1	0	2	0	4	19	21,59
Gelasinospora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Guignardia	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	2	2	2,27
Lasiodiplodia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1,14
Massarina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neofusicoccum	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	3	3	3,41
Neosartorya	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neurospora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nigrospora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Penicillium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Periconia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pestalotiopsis	1	0	2	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0	1	4	4,55
Phaeoramularia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phaeoseptoria	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1,14
Phanerochaete	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phomopsis	1	2	1	0	2	1	7	2	1	2	1	2	1	9	16	18,18
Pichia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pseudallescheria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Scolecobasidium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trichoderma	0	0	1	0	1	0	2	0	1	0	0	0	0	1	3	3,41
Xylaria	0	2	0	0	2	1	5	0	1	0	0	0	0	1	6	6,82
Não identificado	1	1	0	1	0	1	4	1	0	0	2	0	1	4	8	9,09

[1] Fungos que foram identificados nas fases sexual e assexual foram agrupados sendo que o gênero indicado foi o da fase assexual;
[2] ***Não identificado*** – grupo de endófitos que não apresentaram similaridade com as sequências depositadas no banco de dados do GenBank

Tabela 2.4 – Classificação taxonômica de 85 fungos endofíticos e distribuição de acordo com local de estação (verão e inverno), espécies de plantas (A: *Rhizophora mangle*, B: *Laguncularia racemosa* e C: *Avicennia nitida*) e órgãos (F: folha e R: ramo) no local não impactado de Bertioga

Gênero	**Fungos endofíticos do local não impactado de Bertioga no verão**							**Fungos endofíticos do local não impactado de Bertioga no inverno**							**Total geral**	**%**
	A		**B**		**C**		**Total**	**A**		**B**		**C**		**Total**		
	R	**F**	**R**	**F**	**R**	**F**		**R**	**F**	**R**	**F**	**R**	**F**			
Alternaria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1,18
Arthothelium	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1,18
Aspergillus	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	3	3	3,53
Botryosphaeria	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	2	2,35
Chrysoporthe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Colletotrichum	0	1	0	0	1	1	3	0	0	2	0	1	0	3	6	7,06
Coniothyrium	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1,18
Coprinellus	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1,18
Curvularia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cylindrocladium	0	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2,35
Cytospora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1,18
Endothia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Epicoccum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eutypa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fusarium	1	2	0	5	0	1	9	1	1	0	5	1	0	8	17	20
Gelasinospora	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1,18
Guignardia	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1,18
Lasiodiplodia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Massarina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Neofusicoccum	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1,18
Neosartorya	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1,18
Neurospora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1,18
Nigrospora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Penicillium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	2	2	2,35
Periconia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pestalotiopsis	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1,18
Phaeoramularia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phaeoseptoria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phanerochaete	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phomopsis	3	2	4	3	3	0	15	3	2	1	2	0	1	9	24	28,24
Pichia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pseudallescheria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Scolecobasidium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trichoderma	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	4	5	5,88
Xylaria	0	0	0	0	1	2	3	1	0	0	0	0	0	1	4	4,71
Não identificado	1	2	2	0	0	0	5	1	0	1	1	0	1	4	9	10,59

[1] Fungos que foram identificados nas fases sexual e assexual foram agrupados sendo que o gênero indicado foi o da fase assexual;
[2] ***Não identificado*** – grupo de endófitos que não apresentaram similaridade com as sequências depositadas no banco de dados do GenBank

Tabela 2.5 - Identificação taxonômica dos 344 isolados fúngicos por meio do sequenciamento da região ITS1-5,8S ITS2 do rDNA, análise via BLASTn e agrupamento em filograma

Isolado	Endófito [1]	Identificação taxonômica considerada [2]	Filo	Classe
59 (4)	Ramo/L	*Alternaria alternata*	Ascomicota	Dothideomicetos
12.2 (2)	Folha/L	*Alternaria alternata*	Ascomicota	Dothideomicetos
25.1(3)	Folha/L	*Alternaria solani*	Ascomicota	Dothideomicetos
101(3)	Folha/R	*Arthothelium spectabile*	Ascomicota	Arthoniomycetes
8(4)	Ramo/A	*Aspergillus niger*	Ascomicota	Eurotiomicetos
9(4)	Ramo/A	*Aspergillus awamori*	Ascomicota	Eurotiomicetos
22(3)	Folha/R	*Aspergillus awamori*	Ascomicota	Eurotiomicetos
50(3)	Folha/A	*Aspergillus sp.*	Ascomicota	Eurotiomicetos
55(3)	Folha/R	*Aspergillus sp.*	Ascomicota	Eurotiomicetos
56(3)	Folha/R	*Aspergillus niger*	Ascomicota	Eurotiomicetos
82(4)	Folha/L	*Aspergillus awamori*	Ascomicota	Eurotiomicetos
108(4)	Folha/A	*Aspergillus awamori*	Ascomicota	Eurotiomicetos
14.5(2)	Folha/A	*Aspergillus oryzae*	Ascomicota	Eurotiomicetos
17.5(3)	Ramo/A	*Aspergillus awamori*	Ascomicota	Eurotiomicetos
30.2(2)	Folha/R	*Aspergillus awamori*	Ascomicota	Eurotiomicetos
30.3(2)	Folha/R	*Aspergillus awamori*	Ascomicota	Eurotiomicetos
41(3)	Ramo/R	*Botryosphaeria rhodina*	Ascomicota	Dothideomycetos
3.2(1)	Ramo/L	*Botryosphaeria rhodina*	Ascomicota	Dothideomycetos
28(3)	Folha/A	*Chrysoporthe cubensis*	Ascomicota	Sordariomicetos
2(4)	Ramo/A	*Colletotrichum gloeosporioides*	Ascomicota	Sordariomicetos
5(4)	Ramo/A	*Colletotrichum sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
7(4)	Ramo/A	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos
12(4)	Ramo/A	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos
13(4)	Ramo/A	*Colletotrichum fragariae*	Ascomicota	Sordariomicetos
14.4(2)	Folha/L	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos
16(3)	Folha/L	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos
21(4)	Ramo/R	*Colletotrichum fragariae*	Ascomicota	Sordariomicetos
23(3)	Folha/A	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos
24(3)	Folha/A	*Colletotrichum fragariae*	Ascomicota	Sordariomicetos
27(4)	Ramo/R	*Colletotrichum fragariae*	Ascomicota	Sordariomicetos
31(3)	Ramo/A	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos
39(3)	Folha/R	*Colletotrichum gloeosporioides*	Ascomicota	Sordariomicetos
66(3)	Ramo/L	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos
71(4)	Folha/L	*Colletotrichum fragariae*	Ascomicota	Sordariomicetos
87(4)	Ramo/A	*Colletotrichum sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
91(3)	Ramo/A	*Colletotrichum fragariae*	Ascomicota	Sordariomicetos
96(3)	Ramo/A	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos
100(2)	Folha/R	*Colletotrichum fragariae*	Ascomicota	Sordariomicetos
107(4)	Folha/R	*Colletotrichum fragariae*	Ascomicota	Sordariomicetos
10.21(2)	Folha/A	*Colletotrichum sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
10.23(2)	Folha/A	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos
10.25(2)	Folha/A	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos
10.26(2)	Folha/A	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos
15.10(2)	Folha/R	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos
15.16(2)	Folha/R	*Colletotrichum fragariae*	Ascomicota	Sordariomicetos
15.19(2)	Folha/R	*Colletotrichum fragariae*	Ascomicota	Sordariomicetos
15.20(2)	Folha/R	*Colletotrichum fragariae*	Ascomicota	Sordariomicetos
15.25(2)	Folha/A	*Colletotrichum sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
2.1(1)	Ramo/A	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos

Tabela 2.5 - Identificação taxonômica dos 344 isolados fúngicos por meio do sequenciamento da região ITS1-5,8S ITS2 do rDNA, análise via BLASTn e agrupamento em filograma

Isolado	Endófito [1]	Identificação taxonômica considerada [2]	Filo	Classe
20.1(2)	Ramo/A	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos
22.2(3)	Folha/A	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos
3.14(2)	Ramo/A	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos
3.45(2)	Folha/R	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos
3.5(2)	Folha/R	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos
3.8(2)	Ramo/A	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos
33.4(1)	Ramo/A	*Colletotrichum sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
66.2(1)	Ramo/A	*Colletotrichum gloeosporioides*	Ascomicota	Sordariomicetos
7.2(1)	Folha/L	*Colletotrichum sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
7a(2)	Folha/R	*Colletotrichum boninense*	Ascomicota	Sordariomicetos
26(3)	Folha/A	*Coniothyrium minitans*	Ascomicota	Dothideomicetos
81(3)	Ramo/R	*Coprinellus radians*	Basidiomicota	Agaricomicetos
3.20(2)	Ramo/A	*Curvularia affinis*	Ascomicota	Dothideomicetos
4(3)	Ramo/L	*Cylindrocladium spathulatum*	Ascomicota	Sordariomicetos
5(3)	Ramo/L	*Cylindrocladium spathulatum*	Ascomicota	Sordariomicetos
83(4)	Folha/L	*Cylindrocladium spathulatum*	Ascomicota	Sordariomicetos
21.4(1)	Folha/L	*Cylindrocladium spathulatum*	Ascomicota	Sordariomicetos
3.3(1)	Ramo/L	*Cylindrocladium spathulatum*	Ascomicota	Sordariomicetos
12.1(2)	Ramo/R	*Cytospora rhizophorae*	Ascomicota	Sordariomicetos
2.3(3)	Ramo/A	*Cytospora rhizophorae*	Ascomicota	Sordariomicetos
59.4(1)	Ramo/R	*Cytospora rhizophorae*	Ascomicota	Sordariomicetos
6(4)	Ramo/A	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
9(3)	Ramo/L	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
10(3)	Ramo/L	*Diaporthe stewartii*	Ascomicota	Sordariomicetos
30(3)	Folha/A	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
36(3)	Folha/R	*Diaporthe phaseolorum*	Ascomicota	Sordariomicetos
37(4)	Ramo/R	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
44(3)	Folha/R	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
48(3)	Ramo/R	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
52(4)	Ramo/R	*Diaporthe phaseolorum*	Ascomicota	Sordariomicetos
54(4)	Ramo/L	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
57(4)	Ramo/L	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
60(3)	Folha/L	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
2(3)	Ramo/L	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
79(3)	Folha/R	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
94(4)	Ramo/A	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
97(4)	Folha/A	*Diaporthe phaseolorum*	Ascomicota	Sordariomicetos
98(3)	Ramo/A	*Diaporthe phaseolorum*	Ascomicota	Sordariomicetos
1.2(1)	Folha/R	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
1.4(2)	Ramo/R	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
12.2(1)	Ramo/L	*Diaporthe stewartii*	Ascomicota	Sordariomicetos
2.2(1)	Ramo/A	*Diaporthe phaseolorum*	Ascomicota	Sordariomicetos
2.5(2)	Ramo/L	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
3.10(2)	Ramo/A	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
39.1(1)	Ramo/R	*Diaporthe phaseolorum*	Ascomicota	Sordariomicetos
39.4(1)	Ramo/R	*Diaporthe stewartii*	Ascomicota	Sordariomicetos
41.1(1)	Folha/L	*Diaporthe phaseolorum*	Ascomicota	Sordariomicetos
5.1(1)	Ramo/L	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
51.5(1)	Folha/R	*Diaporthe phaseolorum*	Ascomicota	Sordariomicetos

Tabela 2.5 - Identificação taxonômica dos 344 isolados fúngicos por meio do sequenciamento da região ITS1-5,8S ITS2 do rDNA, análise via BLASTn e agrupamento em filograma

Isolado	Endófito [1]	Identificação taxonômica considerada [2]	Filo	Classe
66.5(1)	Ramo/A	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
67.1(1)	Ramo/A	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
69.1(4)	Folha/L	*Diaporthe neotheicola*	Ascomicota	Sordariomicetos
79.2(1)	Ramo/R	*Diaporthe sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
97.4(1)	Folha/L	*Diaporthe stewartii*	Ascomicota	Sordariomicetos
1(3)	Ramo/L	*Endothia viridistroma*	Ascomicota	Sordariomicetos
46(3)	Ramo/R	*Endothia viridistroma*	Ascomicota	Sordariomicetos
13.9(2)	Ramo/R	*Endothia viridistroma*	Ascomicota	Sordariomicetos
30.1(2)	Folha/R	*Endothia gyrosa*	Ascomicota	Sordariomicetos
40(4)	Ramo/R	*Epicoccum nigrum*	Ascomicota	Dothideomicetos
76(4)	Folha/L	*Eutypa lata*	Ascomicota	Sordariomicetos
3(3)	Ramo/L	*Fusarium sambucinum*	Ascomicota	Sordariomicetos
42(3)	Ramo/R	*Fusarium sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
74(3)	Folha/L	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
75(3)	Folha/L	*Fusarium chlamydosporum*	Ascomicota	Sordariomicetos
78(3)	Ramo/R	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
90(3)	Ramo/A	*Fusarium camptoceras*	Ascomicota	Sordariomicetos
12.3(3)	Folha/L	*Fusarium sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
14.1(1)	Ramo/R	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
16.1(1)	Ramo/R	*Fusarium sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
21.2(1)	Folha/L	*Fusarium sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
21.3(1)	Folha/L	*Fusarium sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
21.5(1)	Folha/L	*Fusarium sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
21.6(1)	Folha/L	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
34.3(1)	Ramo/A	*Fusarium sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
48.5(1)	Folha/A	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
58.2(1)	Folha/L	*Fusarium sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
63.1(1)	Ramo/L	*Fusarium sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
65.3(1)	Ramo/L	*Fusarium sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
68.1(1)	Folha/A	*Fusarium lateritium*	Ascomicota	Sordariomicetos
86.3(1)	Folha/R	*Fusarium sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
20.1(1)	Ramo/L	*Gelasinospora tetrasperma*	Ascomicota	Sordariomicetos
68(3)	Folha/L	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
69(4)	Ramo/L	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
82(3)	Ramo/R	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
88(3)	Ramo/A	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
92(3)	Ramo/A	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
99(3)	Folha/L	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
1.1(1)	Folha/R	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
21.1(1)	Folha/L	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
24.1(1)	Folha/L	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
50.1(1)	Folha/R	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
51.3(1)	Folha/R	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
55.1(1)	Folha/L	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
7.4(1)	Folha/R	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
8.1(1)	Folha/R	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
89.1(1)	Folha/L	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
9.3(1)	Ramo/R	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
90.1(1)	Folha/L	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
3(4)	Ramo/A	*Glomerella lagenaria*	Ascomicota	Sordariomicetos

Tabela 2.5 - Identificação taxonômica dos 344 isolados fúngicos por meio do sequenciamento da região ITS1-5,8S ITS2 do rDNA, análise via BLASTn e agrupamento em filograma

Isolado	Endófito [1]	Identificação taxonômica considerada [2]	Filo	Classe
14(4)	Ramo/A	*Glomerella lagenaria*	Ascomicota	Sordariomicetos
15(4)	Ramo/A	*Glomerella cingulata*	Ascomicota	Sordariomicetos
27(3)	Folha/A	*Glomerella acutata*	Ascomicota	Sordariomicetos
38(3)	Folha/R	*Glomerella cingulata*	Ascomicota	Sordariomicetos
67(3)	Ramo/L	*Glomerella acutata*	Ascomicota	Sordariomicetos
67(4)	Folha/L	*Glomerella cingulata*	Ascomicota	Sordariomicetos
1.1(2)	Ramo/R	*Glomerella acutata*	Ascomicota	Sordariomicetos
12.11(2)	Folha/A	*Glomerella cingulata*	Ascomicota	Sordariomicetos
68(3)	Folha/L	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
69(4)	Ramo/L	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
82(3)	Ramo/R	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
88(3)	Ramo/A	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
92(3)	Ramo/A	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
99(3)	Folha/L	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
1.1(1)	Folha/R	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
21.1(1)	Folha/L	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
24.1(1)	Folha/L	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
50.1(1)	Folha/R	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
51.3(1)	Folha/R	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
55.1(1)	Folha/L	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
7.4(1)	Folha/R	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
8.1(1)	Folha/R	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
89.1(1)	Folha/L	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
9.3(1)	Ramo/R	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
90.1(1)	Folha/L	*Gibberella moniliformis*	Ascomicota	Sordariomicetos
3(4)	Ramo/A	*Glomerella lagenaria*	Ascomicota	Sordariomicetos
14(4)	Ramo/A	*Glomerella lagenaria*	Ascomicota	Sordariomicetos
15(4)	Ramo/A	*Glomerella cingulata*	Ascomicota	Sordariomicetos
27(3)	Folha/A	*Glomerella acutata*	Ascomicota	Sordariomicetos
38(3)	Folha/R	*Glomerella cingulata*	Ascomicota	Sordariomicetos
67(3)	Ramo/L	*Glomerella acutata*	Ascomicota	Sordariomicetos
67(4)	Folha/L	*Glomerella cingulata*	Ascomicota	Sordariomicetos
1.1(2)	Ramo/R	*Glomerella acutata*	Ascomicota	Sordariomicetos
12.11(2)	Folha/A	*Glomerella cingulata*	Ascomicota	Sordariomicetos
12.17(2)	Folha/L	*Glomerella cingulata*	Ascomicota	Sordariomicetos
48.2(1)	Folha/A	*Glomerella lagenaria*	Ascomicota	Sordariomicetos
49.3(1)	Folha/R	*Glomerella cingulata*	Ascomicota	Sordariomicetos
67.8(1)	Folha/A	*Glomerella acutata*	Ascomicota	Sordariomicetos
73.1(1)	Folha/R	*Glomerella cingulata*	Ascomicota	Sordariomicetos
94.3(1)	Folha/A	*Glomerella acutata*	Ascomicota	Sordariomicetos
19(3)	Folha/L	*Guignardia sp.*	Ascomicota	Dothideomicetos
21(3)	Folha/R	*Guignardia mangiferae*	Ascomicota	Dothideomicetos
30(4)	Ramo/R	*Guignardia mangiferae*	Ascomicota	Dothideomicetos
32(4)	Ramo/R	*Guignardia mangiferae*	Ascomicota	Dothideomicetos
33(4)	Ramo/R	*Guignardia mangiferae*	Ascomicota	Dothideomicetos
34(4)	Ramo/R	*Guignardia mangiferae*	Ascomicota	Dothideomicetos
84(4)	Folha/L	*Guignardia mangiferae*	Ascomicota	Dothideomicetos
12.5(2)	Folha/L	*Guignardia mangiferae*	Ascomicota	Dothideomicetos
13.2(1)	Ramo/R	*Guignardia mangiferae*	Ascomicota	Dothideomicetos
50.6(2)	Folha/L	*Guignardia mangiferae*	Ascomicota	Dothideomicetos

Tabela 2.5 - Identificação taxonômica dos 344 isolados fúngicos por meio do sequenciamento da região ITS1-5,8S ITS2 do rDNA, análise via BLASTn e agrupamento em filograma

Isolado	Endófito [1]	Identificação taxonômica considerada [2]	Filo	Classe
50.8(2)	Folha/A	*Guignardia sp.*	Ascomicota	Dothideomicetos
5a(2)	Folha/L	*Guignardia mangiferae*	Ascomicota	Dothideomicetos
38(4)	Ramo/R	*Hypocrea lixii*	Ascomicota	Sordariomicetos
44(4)	Ramo/R	*Hypocrea koningii*	Ascomicota	Sordariomicetos
46(4)	Ramo/R	*Hypocrea lixii*	Ascomicota	Sordariomicetos
47(4)	Ramo/R	*Hypocrea lixii*	Ascomicota	Sordariomicetos
48(4)	Ramo/R	*Hypocrea lixii*	Ascomicota	Sordariomicetos
61(3)	Ramo/A	*Hypocrea koningii*	Ascomicota	Sordariomicetos
68(4)	Ramo/L	*Hypocrea lixii*	Ascomicota	Sordariomicetos
72(3)	Folha/L	*Hypocrea lixii*	Ascomicota	Sordariomicetos
83(3)	Folha/R	*Hypocrea lixii*	Ascomicota	Sordariomicetos
89(3)	Folha/A	*Hypocrea virens*	Ascomicota	Sordariomicetos
1.14(2)	Ramo/L	*Hypocrea lixii*	Ascomicota	Sordariomicetos
1.16(2)	Ramo/R	*Hypocrea lixii*	Ascomicota	Sordariomicetos
12.6(2)	Folha/L	*Hypocrea lixii*	Ascomicota	Sordariomicetos
12.8(2)	Ramo/L	*Hypocrea lixii*	Ascomicota	Sordariomicetos
15.1(3)	Folha/R	*Hypocrea lixii*	Ascomicota	Sordariomicetos
15.1(2)	Folha/A	*Hypocrea koningii*	Ascomicota	Sordariomicetos
15.15(2)	Folha/R	*Hypocrea koningii*	Ascomicota	Sordariomicetos
19.1(1)	Ramo/L	*Hypocrea koningii*	Ascomicota	Sordariomicetos
2.6(2)	Ramo/L	*Hypocrea lixii*	Ascomicota	Sordariomicetos
36.3(1)	Ramo/A	*Hypocrea koningii*	Ascomicota	Sordariomicetos
6.2(1)	Ramo/R	*Hypocrea koningii*	Ascomicota	Sordariomicetos
8(3)	Ramo/L	*Lasiodiplodia rubropurpurea*	Ascomicota	Dothideomicetos
20(3)	Folha/R	*Leptosphaeria microscopica*	Ascomicota	Dothideomicetos
52(3)	Folha/R	*Leptosphaeria sp.*	Ascomicota	Dothideomicetos
10.27(2)	Folha/A	*Massarina sp.*	Ascomicota	Dothideomicetos
12(3) [3]	Folha/L	*Xilariales*	Ascomicota	Sordariomicetos
13(3) [3]	Folha/L	*Glomerellaceae*	Ascomicota	Sordariomicetos
17(4) [3]	Ramo/A	*Botryosphaeriales*	Ascomicota	Dothideomicetos
18(4) [3]	Folha/R	*Botryosphaeriales*	Ascomicota	Dothideomicetos
22(4) [3]	Folha/R	*Diaporthales*	Ascomicota	Sordariomicetos
25(3) [3]	Folha/A	*Pyrenulales*	Ascomicota	Eurotiomicetos
25(4) [3]	Folha/R	*Glomerellaceae*	Ascomicota	Sordariomicetos
26(4) [3]	Folha/R	*Diaporthales*	Ascomicota	Sordariomicetos
29(3) [3]	Folha/A	*Glomerellaceae*	Ascomicota	Sordariomicetos
43(3) [3]	Ramo/R	*Diaporthales*	Ascomicota	Sordariomicetos
45(4) [3]	Folha/R	*Hypocreales*	Ascomicota	Sordariomicetos
51(4) [3]	Folha/R	*Diaporthales*	Ascomicota	Sordariomicetos
55(4) [3]	Ramo/L	*Diaporthales*	Ascomicota	Sordariomicetos
56(4) [3]	Ramo/L	*Diaporthales*	Ascomicota	Sordariomicetos
71(3) [3]	Folha/L	*Hypocreales*	Ascomicota	Sordariomicetos
73(3) [3]	Ramo/L	*Diaporthales*	Ascomicota	Sordariomicetos
86(3) [3]	Ramo/R	*Hypocreales*	Ascomicota	Sordariomicetos
90(4) [3]	Ramo/A	*Glomerellaceae*	Ascomicota	Sordariomicetos
104(4) [3]	Folha/L	*Pyrenulales*	Ascomicota	Eurotiomicetos
104(2) [3]	Folha/A	*Glomerellaceae*	Ascomicota	Sordariomicetos
10.15(2) [3]	Folha/A	*Xilariales*	Ascomicota	Sordariomicetos
10.20(2) [3]	Folha/A	*Xilariales*	Ascomicota	Sordariomicetos
10.24(2) [3]	Folha/A	*Glomerellaceae*	Ascomicota	Sordariomicetos

Tabela 2.5 - Identificação taxonômica dos 344 isolados fúngicos por meio do sequenciamento da região ITS1-5,8S ITS2 do rDNA, análise via BLASTn e agrupamento em filograma

Isolado	**Endófito [1]**	**Identificação taxonômica considerada [2]**	**Filo**	**Classe**
10.28(2) [3]	Folha/A	*Pleosporales*	Ascomicota	Dothideomicetos
12.13(2) [3]	Folha/L	*Xilariales*	Ascomicota	Sordariomicetos
12.7(2) [3]	Folha/L	*Hypocreales*	Ascomicota	Sordariomicetos
13.1(1) [3]	Folha/R	*Diaporthales*	Ascomicota	Sordariomicetos
15.12(2) [3]	Folha/R	*Xilariales*	Ascomicota	Sordariomicetos
15.14(2) [3]	Folha/R	*Glomerellaceae*	Ascomicota	Sordariomicetos
15.17(2) [3]	Folha/A	*Xilariales*	Ascomicota	Sordariomicetos
1a(2) [3]	Folha/L	*Xilariales*	Ascomicota	Sordariomicetos
2.11(2) [3]	Folha/A	*Diaporthales*	Ascomicota	Sordariomicetos
2.15(2) [3]	Folha/A	*Diaporthales*	Ascomicota	Sordariomicetos
2.7(2) [3]	Ramo/L	*Diaporthales*	Ascomicota	Sordariomicetos
3.11(2) [3]	Ramo/A	*Trichosphaeriales*	Ascomicota	Sordariomicetos
3.36(2) [3]	Folha/R	*Glomerellaceae*	Ascomicota	Sordariomicetos
3.38(2) [3]	Folha/R	*Hypocreales*	Ascomicota	Sordariomicetos
3.4(2) [3]	Ramo/A	*Diaporthales*	Ascomicota	Sordariomicetos
40.1(1) [3]	Ramo/L	*Diaporthales*	Ascomicota	Sordariomicetos
44.2(1) [3]	Folha/R	*Dothideomycetos*	Ascomicota	Dothideomicetos
54.1(1) [3]	Folha/A	*Pleosporales*	Ascomicota	Dothideomicetos
56.1(4) [3]	Folha/A	*Diaporthales*	Ascomicota	Sordariomicetos
59.2(1) [3]	Ramo/R	*Hypocreales*	Ascomicota	Sordariomicetos
80.1(1) [3]	Ramo/L	*Diaporthales*	Ascomicota	Sordariomicetos
9.2(1) [3]	Ramo/R	*Glomerellaceae*	Ascomicota	Sordariomicetos
91.2(1) [3]	Folha/L	*Xilariales*	Ascomicota	Sordariomicetos
6(3)	Ramo/L	*Neofusicoccum ribis*	Ascomicota	Dothideomicetos
15(3)	Folha/L	*Neofusicoccum ribis*	Ascomicota	Dothideomicetos
63(4)	Ramo/L	*Neofusicoccum ribis*	Ascomicota	Dothideomicetos
64(4)	Ramo/L	*Neofusicoccum ribis*	Ascomicota	Dothideomicetos
85(3)	Folha/R	*Neofusicoccum vitifusiforme*	Ascomicota	Dothideomicetos
29.6(3)	Ramo/R	*Neofusicoccum vitifusiforme*	Ascomicota	Dothideomicetos
3.15(2)	Ramo/A	*Neofusicoccum ribis*	Ascomicota	Dothideomicetos
3.43(2)	Folha/R	*Neofusicoccum ribis*	Ascomicota	Dothideomicetos
75.1(1)	Folha/A	*Neosartorya fisheri*	Ascomicota	Eurotiomicetos
77(3)	Ramo/L	*Neurospora cerealis*	Ascomicota	Sordariomicetos
13.1(2)	Folha/A	*Nigrospora oryzae*	Ascomicota	Sordariomicetos
12.9(2)	Ramo/L	*Nodulisporium sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
24(4)	Ramo/R	*Penicillium minioluteum*	Ascomicota	Eurotiomicetos
54(3)	Folha/A	*Penicillium aethiopicum*	Ascomicota	Eurotiomicetos
62(4)	Ramo/L	*Penicillium minioluteum*	Ascomicota	Eurotiomicetos
76(3)	Ramo/L	*Penicillium minioluteum*	Ascomicota	Eurotiomicetos
3.12(2)	Folha/A	*Penicillium sp.*	Ascomicota	Eurotiomicetos
12.18(2)	Folha/A	*Periconia macrospinosa*	Ascomicota	Sordariomicetos
11(3)	Folha/L	*Pestalotiopsis clavispora*	Ascomicota	Sordariomicetos
73(4)	Folha/L	*Pestalotiopsis clavispora*	Ascomicota	Sordariomicetos
77(4)	Folha/L	*Pestalotiopsis theae*	Ascomicota	Sordariomicetos
80(4)	Folha/L	*Pestalotiopsis clavispora*	Ascomicota	Sordariomicetos
5.4(1)	Ramo/L	*Pestalotiopsis microspora*	Ascomicota	Sordariomicetos
56.3(1)	Ramo/R	*Pestalotiopsis adusta*	Ascomicota	Sordariomicetos
61.1(1)	Ramo/L	*Pestalotiopsis microspora*	Ascomicota	Sordariomicetos
62.8(1)	Ramo/L	*Pestalotiopsis clavispora*	Ascomicota	Sordariomicetos
103(2)	Folha/L	*Phaeoramularia saururi*	Ascomicota	Mitospórico

Tabela 2.5 - Identificação taxonômica dos 344 isolados fúngicos por meio do sequenciamento da região ITS1-5,8S ITS2 do rDNA, análise via BLASTn e agrupamento em filograma

Isolado	Endófito [1]	Identificação taxonômica considerada [2]	Filo	Classe
91.4(1)	Folha/L	*Phaeoseptoria musae*	Ascomicota	Mitospórico
2.2(2)	Ramo/L	*Phanerochaete velutina*	Basidiomicota	Agaricomicetos
4(4)	Ramo/A	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
10(4)	Ramo/A	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
18(3)	Folha/L	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
47(3)	Ramo/R	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
50(4)	Ramo/R	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
58(4)	Ramo/L	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
61(4)	Ramo/L	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
63(3)	Folha/L	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
70(4)	Ramo/L	*Phomopsis columnaris*	Ascomicota	Sordariomicetos
72(4)	Folha/L	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
78(4)	Folha/L	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
79(4)	Folha/L	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
80(3)	Ramo/R	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
84(3)	Ramo/R	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
87(3)	Ramo/R	*Phomopsis columnaris*	Ascomicota	Sordariomicetos
91(4)	Ramo/A	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
95(3)	Ramo/A	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
95(4)	Ramo/A	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
100(3)	Folha/A	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
100(4)	Ramo/A	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
102(4)	Folha/A	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
105(4)	Folha/L	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
10.12(2)	Folha/A	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
10.16(2)	Folha/A	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
12.14(2)	Folha/L	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
26.1(1)	Folha/A	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
29.5(1)	Ramo/R	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
40.2(1)	Ramo/L	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
42.4(1)	Ramo/A	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
47.3(1)	Folha/L	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
5.2(1)	Ramo/L	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
6.3(1)	Ramo/R	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
62.5(1)	Ramo/L	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
83.1(1)	Ramo/A	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
8a(2)	Folha/A	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
9.4(1)	Folha/R	*Phomopsis sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
15.23(2)	Folha/R	*Pichia guilliermondii*	Ascomicota	Sacaromicetos
2.4(2)	Ramo/L	*Pichia guilliermondii*	Ascomicota	Sacaromicetos
3.7(2)	Ramo/A	*Pichia guilliermondii*	Ascomicota	Sacaromicetos
17.8(2)	Folha/A	*Pseudallescheria boydii*	Ascomicota	Sordariomicetos
12.19(2)	Folha/L	*Scolecobasidium sp.*	Ascomicota	Mitospórico
60(4)	Ramo/L	*Penicillium sp.*	Ascomicota	Eurotiomicetos
19(4)	Ramo/R	*Trichoderma longibrachiatum*	Ascomicota	Sordariomicetos
1.2(2)	Ramo/R	*Trichoderma asperellum*	Ascomicota	Sordariomicetos
10.29(2)	Folha/A	*Trichoderma asperellum*	Ascomicota	Sordariomicetos
17.3(2)	Folha/A	*Trichoderma sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
3.9(2)	Ramo/A	*Trichoderma sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
1.5(2)	Ramo/R	*Valsa ambiens*	Ascomicota	Sordariomicetos

Tabela 2.5 - Identificação taxonômica dos 344 isolados fúngicos por meio do sequenciamento da região ITS1-5,8S ITS2 do rDNA, análise via BLASTn e agrupamento em filograma

Isolado	Endófito [1]	Identificação taxonômica considerada [2]	Filo	Classe
17(3)	Folha/R	*Xylaria sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
23(4)	Ramo/R	*Xylaria enteroleuca*	Ascomicota	Sordariomicetos
36(4)	Ramo/R	*Xylaria allantoidea*	Ascomicota	Sordariomicetos
43(4)	Ramo/R	*Xylaria enteroleuca*	Ascomicota	Sordariomicetos
58(3)	Ramo/R	*Xylaria polymorpha*	Ascomicota	Sordariomicetos
101(4)	Ramo/A	*Xylaria enteroleuca*	Ascomicota	Sordariomicetos
106(4)	Ramo/A	*Xylaria enteroleuca*	Ascomicota	Sordariomicetos
15.2(2)	Folha/R	*Xylaria sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
33.3(1)	Ramo/A	*Xylaria enteroleuca*	Ascomicota	Sordariomicetos
39.3(1)	Folha/R	*Xylaria enteroleuca*	Ascomicota	Sordariomicetos
47.1(1)	Folha/R	*Xylaria polymorpha*	Ascomicota	Sordariomicetos
47.4(1)	Folha/A	*Xylaria sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
53.2(1)	Folha/A	*Xylaria enteroleuca*	Ascomicota	Sordariomicetos
57.1(4)	Folha/A	*Xylaria sp.*	Ascomicota	Sordariomicetos
68.3(1)	Ramo/A	*Xylaria enteroleuca*	Ascomicota	Sordariomicetos
83.2(1)	Ramo/A	*Xylaria allantoidea*	Ascomicota	Sordariomicetos
93.3(1)	Folha/A	*Xylaria curta*	Ascomicota	Sordariomicetos
98.1(4)	Folha/A	*Xylaria enteroleuca*	Ascomicota	Sordariomicetos

[1] Fungos endofíticos representantes da comunidade fúngica isolados a partir de: Folha/R – folha de *Rhizophora mangle*, Folha/L – folha de *Laguncularia racemosa*, Folha/A – folha de *Avicennia nitida*; Ramo/R – ramo de *Rhizophora mangle*, Ramo/L – ramo de *Laguncularia racemosa*, Ramo/A – ramo de *Avicennia nitida*;
[2] Identificação taxonômica dos isolados fúngicos a partir da comparação das suas sequências de nucleotídeos com sequências conhecidas disponíveis no GenBank, via BLASTn, e agrupamento em filograma;
[3] Isolados fúngicos não identificados em nível de gênero, sendo que o táxon mais próximo (filo, subfilo, classe, subclasse, ordem ou família) está descrito na coluna de identificação taxonômica

2.2.2.2.2 Gêneros fúngicos observados com maior frequência

Os resultados obtidos mostraram que o gênero fúngico que apresentou a maior frequência foi *Phomopsis* (teleomorfo *Diaporthe*), representando 22,67% da população fúngica avaliada nesse estudo. Um trabalho sobre a avaliação da comunidade endofítica de diversas espécies de plantas de florestas tropicais mostrou que o gênero *Phomopsis* foi dominante em 20 das 24 espécies de plantas hospedeiras estudadas (SURYANARAYANAN; VENKATESAN; MURALI, 2003). No presente trabalho, esse gênero incluiu representantes em todos os locais de isolamento (Cananéia, Bertioga – local impactado, Bertioga - local não impactado), estação (verão e inverno), órgãos (ramo e folha) e também nas três espécies (*Rhizophora mangle, Laguncularia racemosa* e *Avicennia nitida*). Diante da alta frequência de isolamento desse gênero, o isolado *Diporthe phaseolorum* 40.1(1) foi selecionado para o estudo da caracterização da estrutura química do antibiótico produzido pelo mesmo (ácido 3-hidroxipropiônico) mediante técnicas

espectroscópicas como Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas (Capítulo 4). Além disso, esse isolado foi transformado geneticamente via *Agrobacterium tumefacies* visando o estudo dos genes da via de biossíntese de antibiótico ácido 3-hidroxipropiônico (Capítulo 3).

A Figura 2.3 mostra a árvore filogenética construída para a região ITS de 78 isolados do gênero *Phomopsis* (teleomorfo *Diaporthe*). O agrupamento em filograma permitiu a seguinte classificação: 10(3), 12.2(1), 97.4(1) foram identificados como *Diaporthe stewartii,* 36(3), 52(4), 97(4), 98(3), 2.2(1), 39.1(1), 41.1(1), 51.5(1) foram identificados como *Diaporthe phaseolorum,* 69.1(4) foi identificado como *Diaporthe neotheicola,* 70(4) e 87(3) foram identificados como *Phomopsis columnaris*. Os isolados restantes apresentaram baixa similaridade com qualquer espécie, desse modo foi adotada a classificação apenas em gênero, sugerindo a existência de espécies ainda não descritas. O gênero *Phomopsis* apresenta importância nas áreas farmacêutica, agrícola e biotecnológica (AGUSTA; OHASHI; SHIBUYA, 2006; BILLS et al., 1992; BRADY et al., 2000; CHEN et al., 2003; DETTARAKUL et al., 2003; HUANG et al., 2008; LIN et al., 2005; PITTAYAKHAJONWUT, 2006). Esse gênero pode ser encontrado como fitopatógeno (MOSTER et a., 2000; RODRIGUEZ, 1993; SAIKKONEN et al., 1998), geralmente não apresenta grande importância econômica, e também é encontrado como endófito de diferentes plantas hospedeiros (AGUSTA; OHASHI; SHIBUYA, 2006; FREIRE; BEZERRA, 2001; SCHWARZ et al., 2004; CHEN et al., 2003; XIAO; CHUN-HUA; YUE-MAO, 2008).

Colletotrichum (teleomorfo *Glomerella*) foi o segundo gênero mais frequente, sendo constituído por 66 isolados fúngicos, representando 19,19% da comunidade descrita de acordo com a árvore filogenética construída para os fungos desse gênero (Figura 2.4) os isolados apresentaram similaridade com 6 espécies diferentes (*Colletotrichum boninense, Colletotrichum fragariae, Colletotrichum gloeosporioides, Glomerella acutata, Glomerella cingulata, Glomerella lagenaria*). Grande parte dos isolados desse gênero apresentou sua espécie identificada (Tabela (2.5), Figura 2.4). Além disso, esse gênero foi observado em todos os tratamentos (órgão, local de isolamento, espécie de planta e estação do ano) (Tabela 2.2, 2.3 e 2.4). O gênero *Colletotrichum* é descrito na literatura como fitopatógeno (CROUCH et al., 2009; BAILEY et al., 1990) e endófito de diversos hospedeiros (MEJÍA et al., 2008; LU et al., 2004). Espécies desse gênero podem produzir antibióticos, enzimas e hormônio vegetal (AIA) (Lu et al., 2000; GUIMARÃES et al., 2010), além de conferir tolerância à seca em plantas como tomate e pimentão (REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001).

O terceiro gênero mais freqüente na comunidade fúngica avaliada foi *Fusarium* (teleomorfo *Gibberella*), representando 11,34% dos isolados. O agrupamento filogenético (Figura 2.5) mostra que dentre os 39 isolados obtidos nesse gênero 22 pertencem a espécie *Gibberella moniliformis* (Tabela 2.5). As outras espécies encontradas para esse gênero foram *Fusarium lateritium, Fusarium sambucinum* (Tabela 2.5, Figura 2.5). O gênero *Fusarium* foi observado em todos os tratamentos (Tabela 2.2, 2.3 e 2.4). Estudos relatam que fitopatógenos do gênero *Fusarium* causam grandes perdas econômicas (TOKESHI; RAGO, 2005). Fungos desse gênero têm sido isolados como endofíticos de vários hospedeiros (BRITZ et al., 2002; LODGE; FISHER; SUTTON, 1996), em alguns casos é citado como gênero mais frequente (CHENG et al., 2009; KUMARESAN; SURYANARAYANAN, 2001). Algumas espécies desse gênero são utilizados como agentes de controle biológico (BENHAMOU; GARAND; GOULET, 2002) e produtores de compostos antitumorais (SHWETA et al., 2010) e hormônios de plantas giberelinas (TSAVKELOVA et al., 2008).

O gênero *Trichoderma* (teleomorfo *Hypocrea*), quarto mais frequente na comunidade fúngica associada aos manguezais, constituiu 8,72% dos isolados, que apresentaram maior similaridade com pelo menos 5 espécies diferentes (*Trichoderma asperellum, Trichoderma longibrachiatum, Hypocrea koningii, Hypocrea lixii, Hypocrea virens*). A árvore filogenética (Figura 2.6) mostra a relação entre os isolados do presente trabalho e espécies mais próximas do gênero *Trichoderma.* A maioria dos isolados fúngicos desse gênero apresentaram sua classificação taxonômica identificada em espécie (Tabela 2.5, Figura 2.6), sendo que esse gênero também foi encontrado em todos os tratamentos avaliados no presente estudo (Tabela 2.2, 2.3 e 2.4). O gênero *Trichoderma* apresenta rápido crescimento em meio de cultivo sendo capaz de utilizar diferentes tipos de substratos (KUBICEK et al., 2003). Eles têm sido descritos como endófitos de vários hospedeiros vegetais (BAILEY; STREM; WOOD, 2009; PHOTITA et al., 2001; SURYANARAYANAM; VIJAYKRISHNA, 2001). Espécies desse gênero são importantes economicamente, pois produzem enzimas e antibióticos (SHAKERI; FOSTER, 2007), e são utilizados como agente de controle biológico (HARMAN, 2006; ROSA; HERRERA, 2009). O gênero *Xylaria* (teleomorfo *Nodulisporium*) foi o quinto gênero mais frequente, representado por 26 isolados, correspondendo a 7,56% da comunidade fúngica. A árvore filogenética apresentada na Figura 2.7 mostra que os isolados desse gênero apresentam similaridade com 4 espécies diferentes (*Xylaria allantoidea, Xylaria curta, Xylaria enteroleuca* e *Xylaria polymorpha*), sendo

que nove isolados desse gênero foram identificados como *Xylaria enteroleuca* (Tabela 3.1, Figura 2.7). Compostos bioativos provenientes do metabolismo secundário de fungos do gênero *Xylaria* apresentam inúmeras funções biológicas como antioxidantes, antitumorais e antimicromianos (PONGCHAROEN et al., 2008; LIU et al., 2007; LUI et al., 2009). Espécies desse gênero tem sido isoladas como endófitos de diferentes plantas (BAYMAN et al., 1998; ARNOLD, 2007). Já o gênero *Guignardia* foi o sexto mais freqüente nessa comunidade, representado por 4,07% dos isolados fúngicos. Dentre os 14 isolados fúngicos desse gênero 10 pertencem a espécie *Guignardia mangiferae* (Figura 2.8, Tabela 3.1). Os gêneros *Xylaria* e *Guignardia* estão distribuídos em todos os tratamentos.

Os gêneros fúngicos mais frequentes deste estudo também são relatados com alta frequência em trabalhos prévios sobre fungos endofíticos de manguezais, indicando que esses gêneros estão bem adaptados às condições adversas dos manguezais, como a alta salinidade, a umidade e os fortes ventos (CHENG et al., 2009; KUMARESAN; SURYANARAYANAN, 2001; SURYANARAYANAN; MURALI; VENKATESAN, 2002; SURYANARAYANAN; KUMARESAN, 2000). Além disso, esses gêneros de maior frequência apresentaram ampla distribuição entre as diferentes espécies de plantas hospedeiras dos manguezais avaliados, concordando desse modo com dados descritos na literatura (CHENG et al., 2009). Estudos sobre endófitos de florestas tropicais indicam que estas florestas sendo altamente diversas poderiam selecionar contra a especificidade ao hospedeiro, devido a distribuição aleatória (separada) das plantas hospedeiras. Portanto, nas florestas tropicais é esperado ter menos espécies de endófitos específicas aos hospedeiros (CANNON; SIMMONS, 2002; SURYANARAYANAN; VENKATESAN; MURALI, 2003). Entretanto, a composição dos gêneros de endófitos em cada espécie de planta, órgão e estação é diferente (Tabela 2.2, 2.3 e 2.4). Essa diferença também é relatada na literatura (CHENG et al., 2009).

2.2.2.2.3 Gêneros fúngicos observados em menor frequência

A comunidade fúngica associada aos manguezais incluiu ainda outros gêneros dos Filos Ascomiceto e Basidiomiceto. O Filo Basidiomiceto foi representado por duas espécies distintas, *Phanerochaete velutina* (2.2(2)) e *Coprinellus radians* (81(3)) incluídos respectivamente nas ordens Corticiales e Agaricales, sendo que ambos pertencem a classe de Agaricomicetos (Figura

2.9). A classe de Sordariomicetos teve um grande número de representantes na comunidade avaliada, de modo que foi construída uma árvore filogenética (Figura 2.10) para ilustrar a relação entre os isolados dessa classe (excluindo-se os isolados dos gêneros *Trichoderma, Fusarium, Colletotrichum, Diaporthe* e *Xylaria,* já representados anteriormente) com gêneros/espécies fúngicas mais próximas. Assim, foi observado que uma grande diversidade de gêneros compõe a classe Sordariomicetos dessa comunidade, uma vez que pelo menos 14 gêneros diferentes foram identificados *(Valsa, Cytospora, Chrysoporthe, Endothia, Cryphonectria, Podospora, Gelasinospora, Neurospora, Nigrospora, Eutypa, Pestalotiopsis, Pseudallescheria, Periconia, Cylindrocladium).*

A árvore filogenética Figura 2.11 foi construída com isolados do Filo Ascomiceto que não foram incluídos anteriormente nas árvores já apresentadas. Os isolados da classe Dothideomicetos foram agrupados em pelo menos 12 gêneros diferentes (*Epicoccum, Coniothyrium, Massarina, Alternaria, Phaeosphaeriopsis, Leptosphaeria, Botryosphaeria, Neofusicoccum, Lasiodiplodia, Cladosporium, Arthothelium e Curvularia*). Já as classes de Eurotiomicetos e Sacaromicetos foram representadas por 3 gêneros (*Neosartorya, Aspergillus* e *Penicillium*) e 1 gênero (*Pichia*), respectivamente. Os fungos ascomicetos mitospóricos foram representados pelos gêneros (*Phaeoseptoria, Phaeoramularia* e *Scolecobasidium*). A última árvore filogenética foi construída com isolados da ordem Eurotiales representando os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Figura 2.12).

Estudos recentes sobre a comunidade de fungos endofíticos de manguezais revelam a ocorrência de fungos de água doce, solo e marinho (ANANDA; SRIDHAR, 2002; KUMARESAN; SURYANARAYANAN, 2001; SURYANARAYANAN; KUMARESAN, 2000; SURYANARAYANAN; KUMARESAN; JOHNSON, 1998; SURYANARAYANAN; MURALI; VENKATESAN, 2002). No presente estudo foram encontradas principalmente espécies fúngicas de solo. A alta diversidade de fungos de solo como colonizadores pode ser um indicativo de que eles se adaptaram às condições adversas do ecossistema de manguezal (ANANDA; SRIDHAR, 2002).

Um fenômeno recorrente nas análises filogenéticas do presente trabalho é a existência de isolados cujo maior nível de similaridade é encontrado com fungos não identificados. Esses isolados fúngicos que não apresentaram o seu gênero identificado, representam 13,37% da comunidade endofítica associada aos manguezais avaliados e todos pertencem ao filo

Ascomicota. Essa incapacidade de identificar o gênero de uma parte dos fungos avaliados nesse estudo pode ser devida à ausência de sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 disponibilizadas no GenBank, ou uma parte isolados podem representar novas espécies não descritas na literatura. Estudos sobre a análise da diversidade genética de fungos endofíticos possibilitam a descoberta de novas espécies fúngicas, pois as plantas vasculares são consideradas um grande reservatório de novas espécies de fungos (HAWKSWORTH; ROSSMAN, 1997). Além disso, fungos endofíticos associado às plantas tropicais estão entre o grupo de fungos que têm sido estudados para atingir o número estimado de 1,5 milhões de espécies fúngicas (SURYANARAYANAN; VENKATESAN; MURALI, 2003).

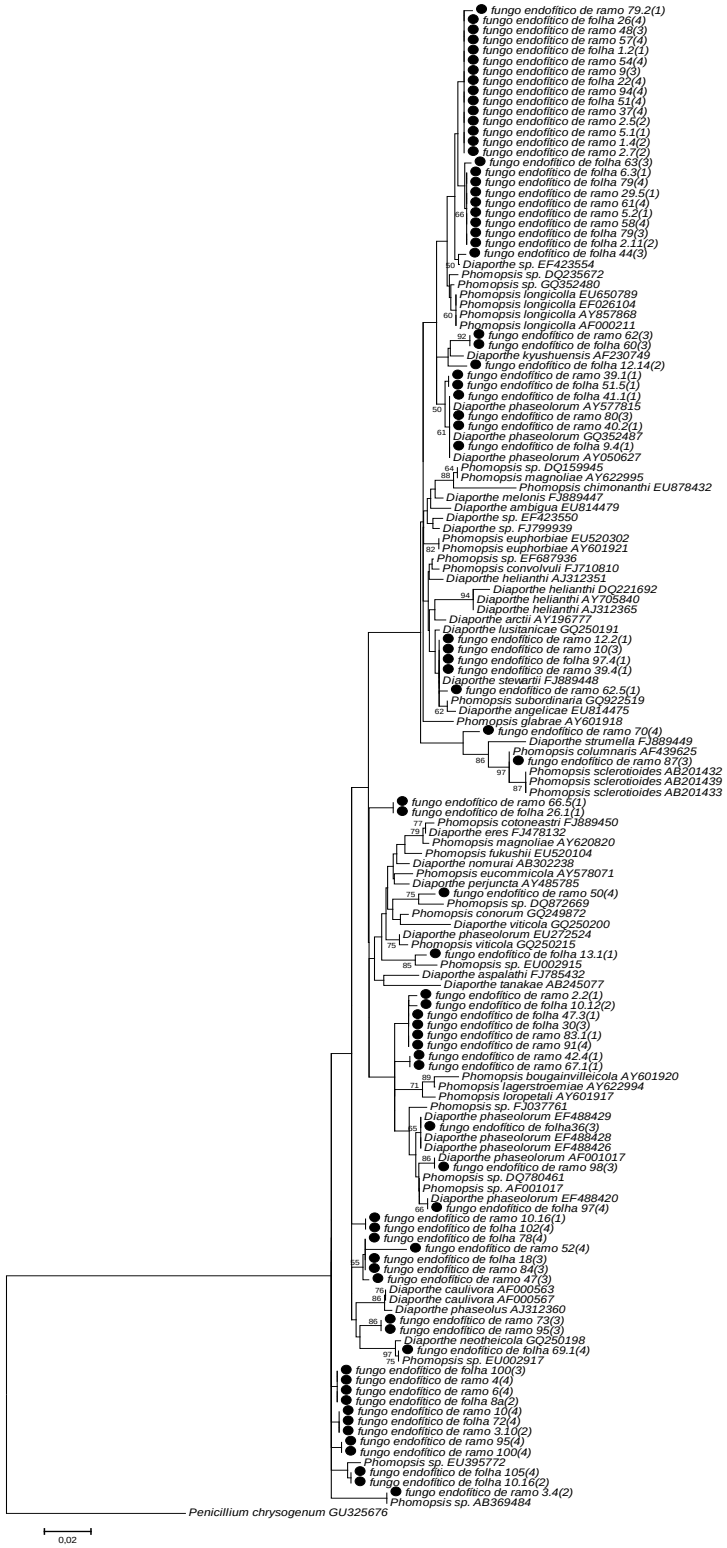

Figura 2.3 – Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-joining* com base na região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 78 fungos endofíticos do gênero *Phomopsis* (teleomorfo *Diaporthe*) e de acessos obtidos do GenBank. O ascomiceto *Penicillium chrysogenum* (GU325676) foi utilizado como grupo externo. Os valores de *bootstrap* (n=1000 repetições) maiores que 50 e escala da distância genética estão indicados. Os isolados avaliados nesse estudo estão indicados com o círculo

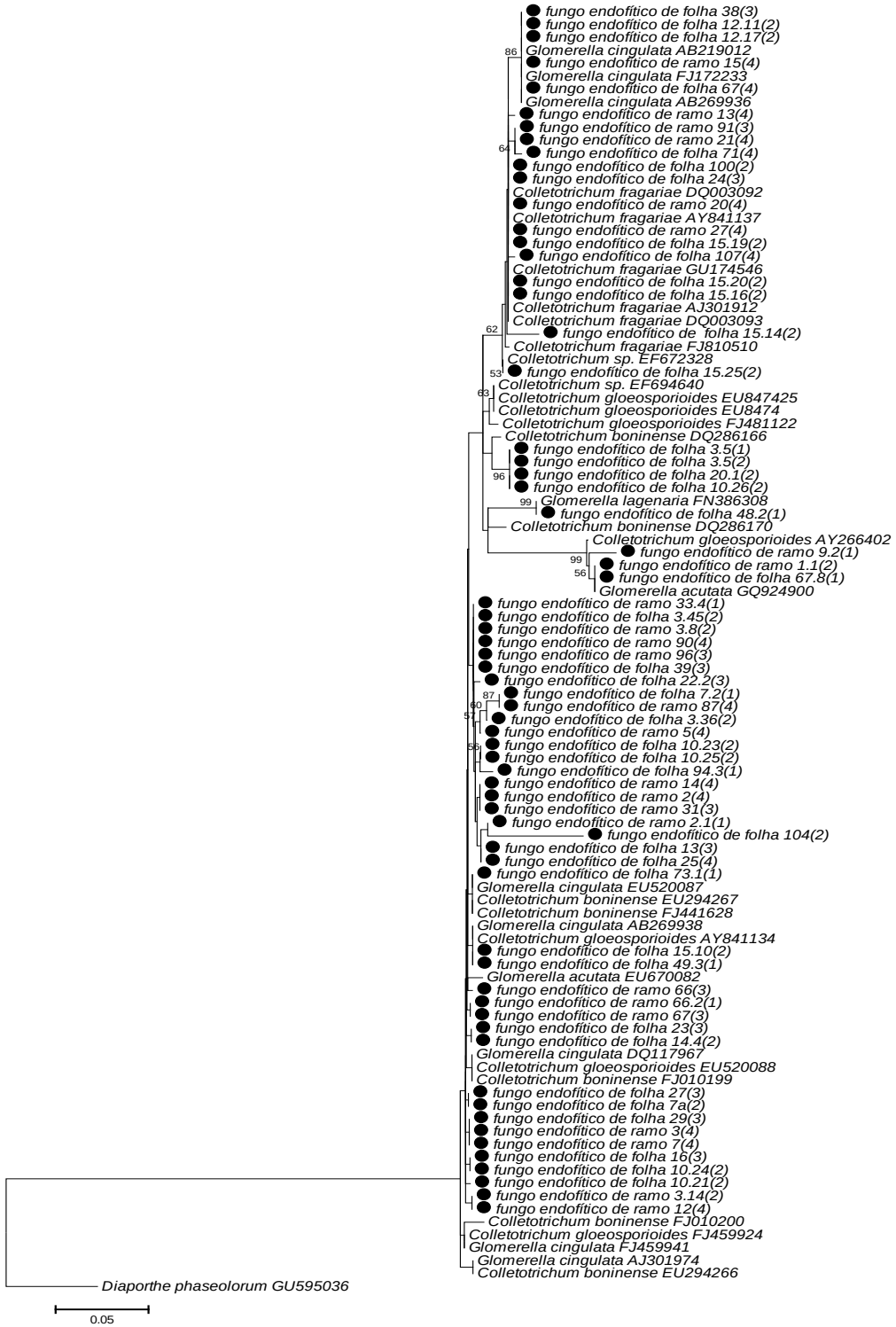

Figura 2.4 – Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-joining* com base na região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 66 fungos endofíticos do gênero *Colletotrichum* (teleomorfo *Glomerella*) e de acessos obtidos do GenBank. O ascomiceto *Diaporthe phaseolorum* (GU595036) foi utilizado como grupo externo. Os valores de *bootstrap* (n=1000 repetições) maiores que 50 e escala da distância genética estão indicados. Os isolados avaliados nesse estudo estão indicados com o círculo

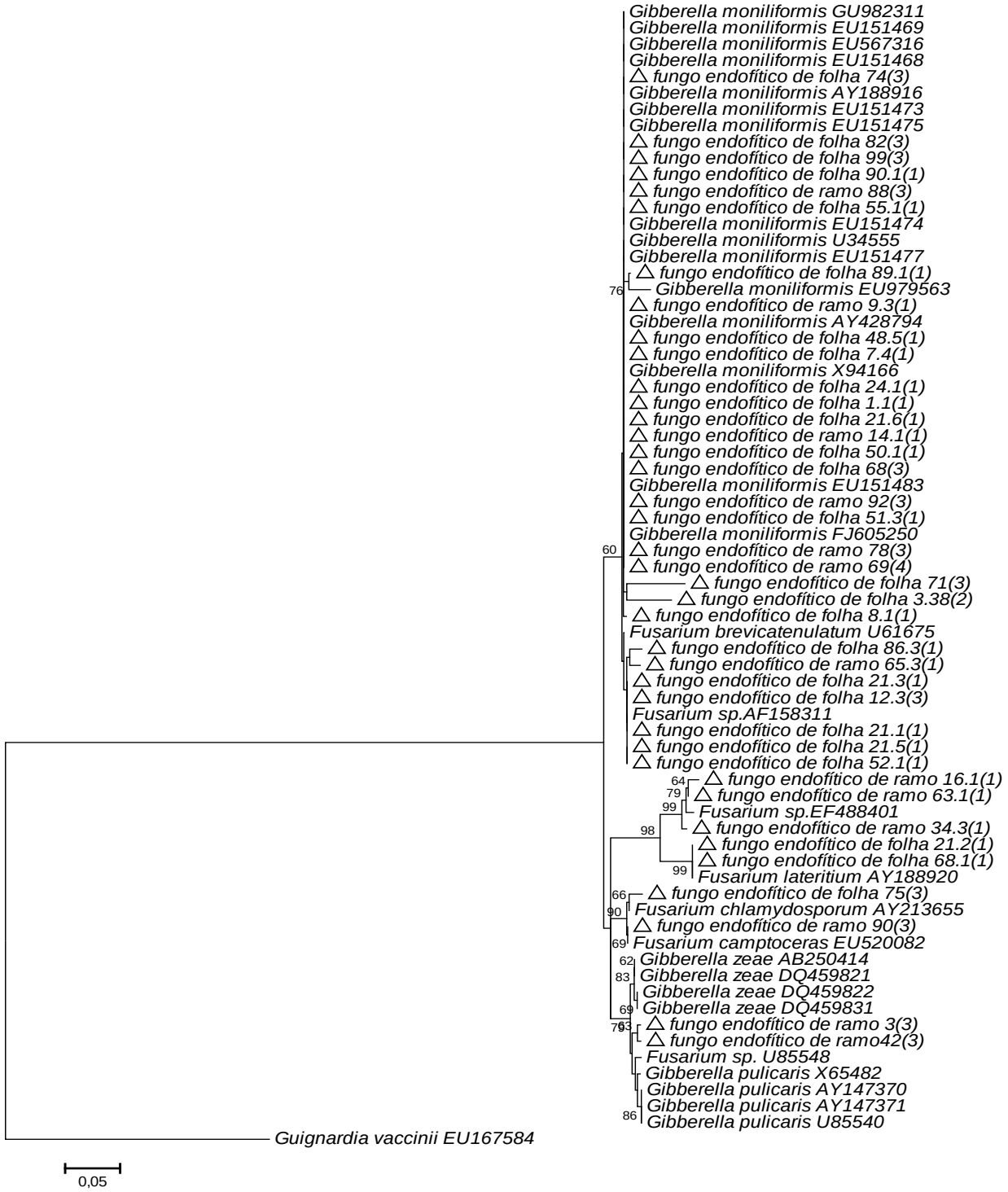

Figura 2.5 – Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-joining* com base na região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 39 fungos endofíticos do gênero *Fusarium* (teleomorfo *Gibberella*) e de acessos obtidos do GenBank. O ascomiceto *Guinardia vaccinii* (EU167584) foi utilizado como grupo externo. Os valores de *bootstrap* (n=1000 repetições) maiores que 50 e escala da distância genética estão indicados. Os isolados avaliados nesse estudo estão indicados com o triângulo

Figura 2.6 – Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-joining* com base na região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 30 fungos endofíticos do gênero *Trichoderma* (teleomorfo *Hypocrea*) e de acessos obtidos do GenBank. O ascomiceto *Aspergillus aculeatus* (GU595032) foi utilizado como grupo externo. Os valores de *bootstrap* (n=1000 repetições) maiores que 50 e escala da distância genética estão indicados. Os isolados avaliados nesse estudo estão indicados com o triângulo

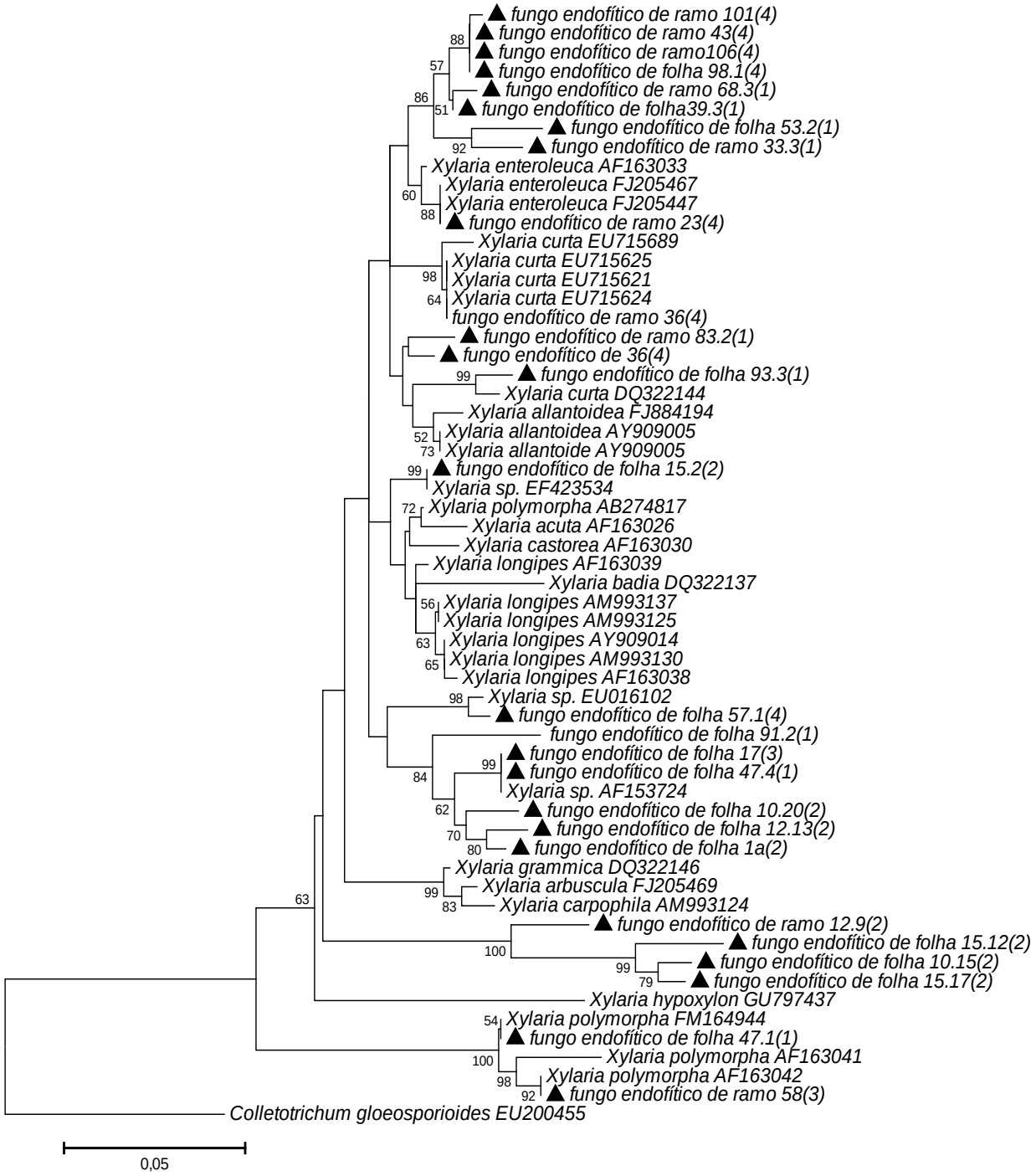

Figura 2.7 – Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-joining* com base na região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 26 fungos endofíticos do gênero *Xylaria* (teleomorfo *Nodulisporium*) e de acessos obtidos do GenBank. O ascomiceto *Colletotrichum gloeosporioides* (EU200455) foi utilizado como grupo externo. Os valores de *bootstrap* (n=1000 repetições) maiores que 50 e a escala da distância genética estão indicados. Os isolados avaliados nesse estudo estão indicados com o triângulo

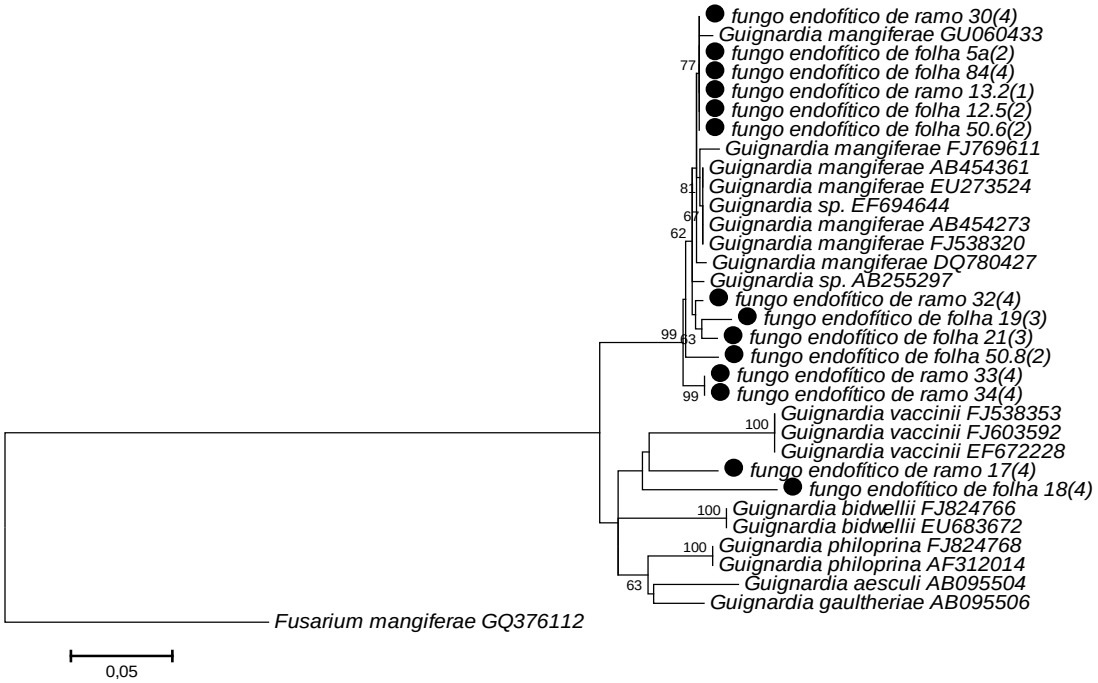

Figura 2.8 – Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-joining* com base na região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 14 fungos endofíticos do gênero *Guignardia* e de acessos obtidos do GenBank. O ascomiceto *Fusarium mangiferae* (GQ376112) foi utilizado como grupo externo. Os valores de *bootstrap* (n=1000 repetições) maiores que 50 e a escala da distância genética estão indicados. Os isolados avaliados nesse estudo estão indicados com o círculo

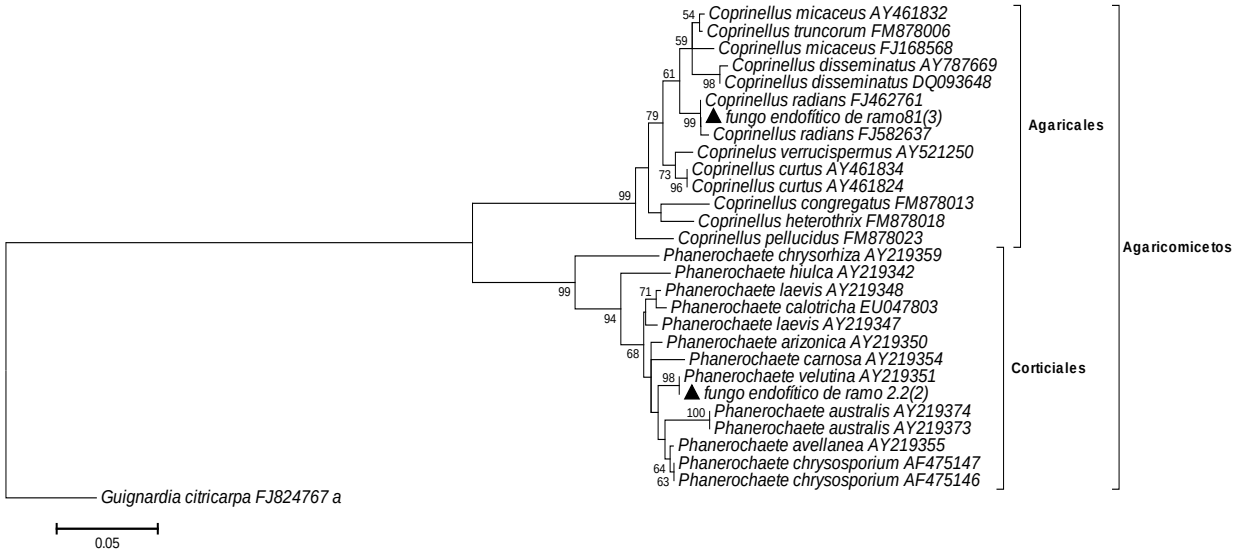

Figura 2.9 – Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-joining* com base na região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 2 basidiomicetos e de acessos obtidos do GenBank. O ascomiceto *Guignardia citricarpa* (FJ824767) foi utilizado como grupo externo. Os valores de *bootstrap* (n=1000 repetições) maiores que 50 e a escala da distância genética estão indicados. Os isolados avaliados nesse estudo estão indicados com o triângulo

Figura 2.10 – Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-joining* com base na região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 39 fungos endofíticos da classe Sordariomicetos e de acessos obtidos do GenBank. O basidiomiceto *Coprinellus disseminatus* (AY787) foi utilizado como grupo externo. Os valores de *bootstrap* (n=1000 repetições) maiores que 50 e a escala da distância genética estão indicados. Os isolados avaliados nesse estudo estão indicados com o losango

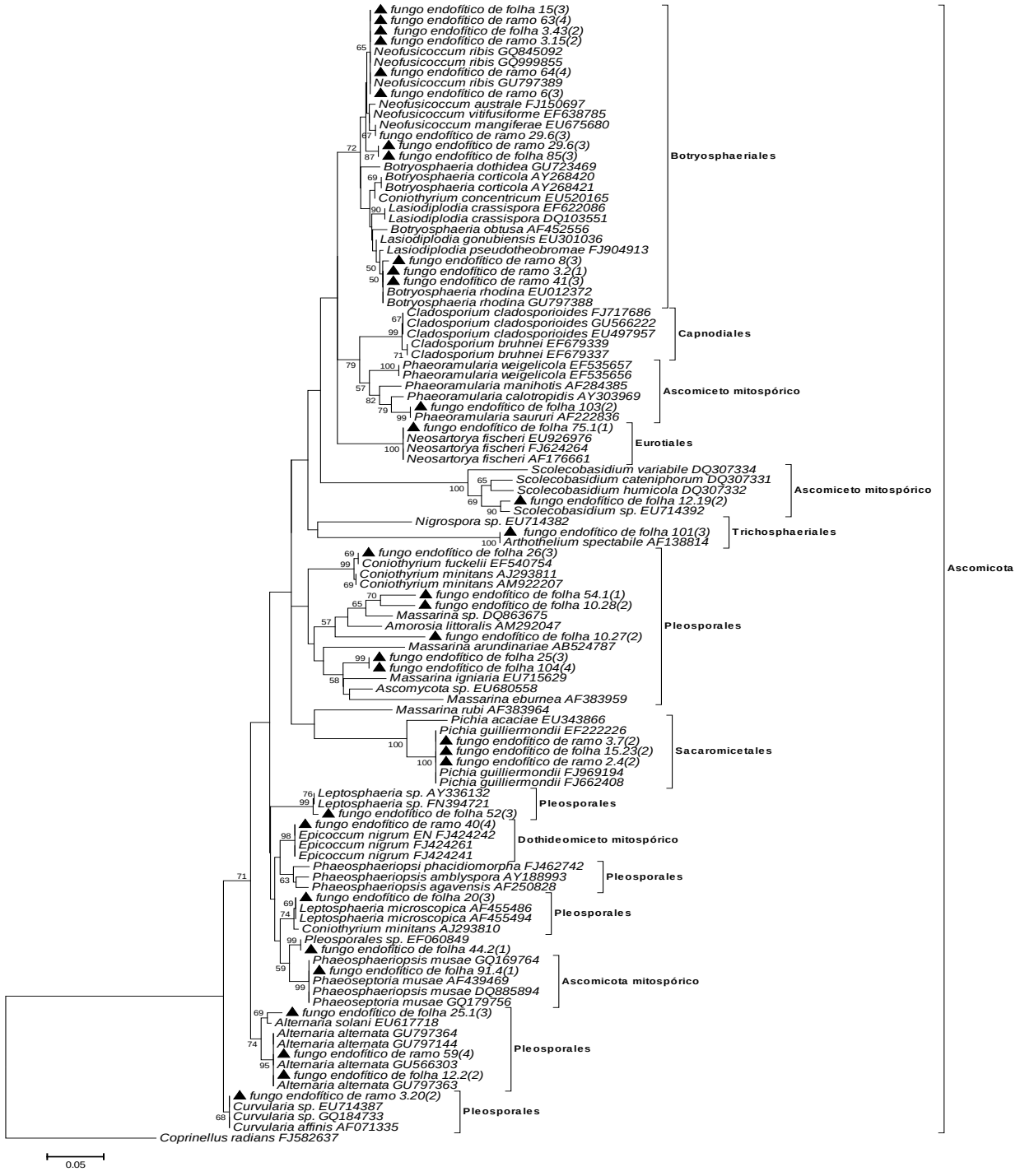

Figura 2.11 – Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-joining* com base na região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 33 ascomicetos e de acessos obtidos do GenBank. O basidiomiceto *Coprinellus radians* (FJ582637) foi utilizado como grupo externo. Os valores de *bootstrap* (n=1000 repetições) maiores que 50 e a escala da distância genética estão indicados. Os isolados avaliados nesse estudo estão indicados com o triângulo

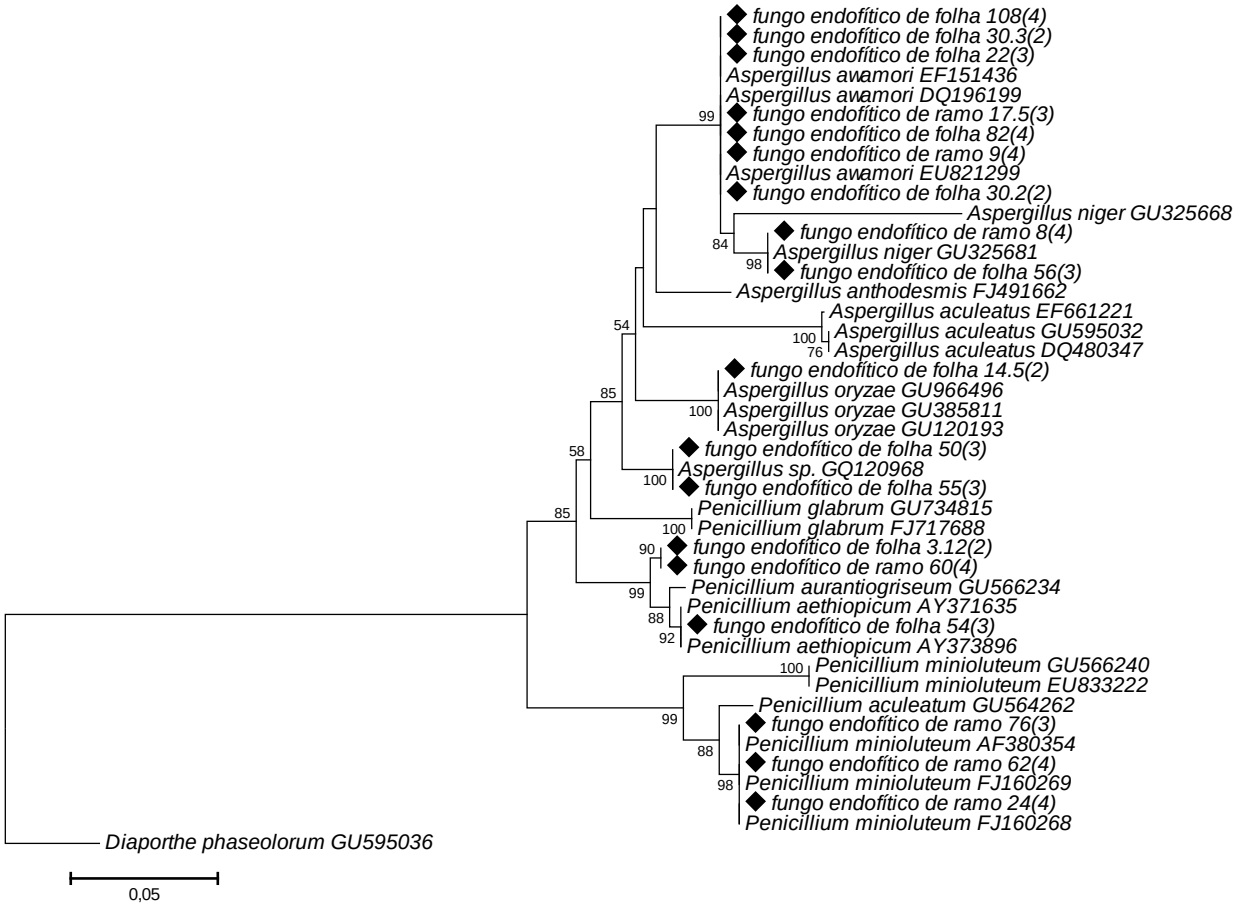

Figura 2.12 – Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-joining* com base na região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 17 isolados da ordem Eurotiales e de acessos obtidos do GenBank. O ascomiceto *Diaporthe phaseolorum* (GU595036) foi utilizado como grupo externo. Os valores de *bootstrap* (n=1000 repetições) maiores que 50 e a escala da distância genética estão indicados. Os isolados avaliados nesse estudo estão indicados com o losango

2.2.2.4 Diversidade, riqueza e rarefação da comunidade endofítica

A determinação da diversidade, riqueza e rarefação da comunidade fúngica associada às três espécies de plantas dos manguezais de Bertioga e Cananéia foi realizada por meio do programa DOTUR, que utilizou as sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA dos isolados para calcular o índice de diversidade de Shannon-Wienner (*H'*), o índice de riqueza de Chao1 e a rarefação. Essas análises foram realizadas com as sequências de 344 isolados, agrupadas de acordo com os fatores de variação avaliados (órgão vegetal, estação do ano, espécie de planta e local de isolamento).

As curvas de rarefação (Figura 2.13) construídas para os diferentes grupos de sequências (tratamentos) revelaram que a amostragem adotada no presente trabalho foi suficiente para representar a comunidade fúngica em nível de gênero. Isso porque, considerando as sequências dos fungos presentes nos diferentes tratamentos, foi possível observar que as curvas de rarefação (para 95% e 97% de similaridade) começam a estabilizar. Visando evitar interpretações equivocadas, as conclusões acerca da diversidade e riqueza da comunidade fúngica associada aos manguezais foram baseadas apenas nos valores obtidos para as similaridades de 95% e 97%.

A Tabela 2.6 contém os valores encontrados para os índices de Shannon-Wienner e Chao1 para os diferentes tratamentos. Os resultados mostraram que nas comparações entre a diversidade dos diferentes órgãos (ramo e folha), locais (Bertioga e Cananéia) e estações (verão e inverno) em nível de similaridade de 100% foram observadas diferenças significativas, sendo que nesse caso os valores de diversidade seguem a seguinte ordem: ramo>folha; Cananéia>Bertioga e verão>inverno.

Os ramos além de possuírem maior frequência de colonização também apresentaram maior diversidade fúngica. No estudo de Gazis e Chaverri (2010) foi encontrado também que partes inferiores das plantas apresentam maior diversidade de endófitos. Além disso, foi encontrada maior diversidade fúngica em Cananéia que é um manguezal com menor efeito antropogênico, isso indica a importância da preservação dos manguezais que podem fornecer novos compostos ativos por meio do metabolismo secundário de microrganismos que sobrevivem às condições adversas dos manguezais.

Os resultados mostraram que a estação do ano (verão e inverno) influencia a riqueza da comunidade de fungos associadas às plantas de manguezais, uma vez no verão foi observado maior índice de riqueza, do que no inverno. Entretanto, não houve alteração na diversidade e na riqueza da comunidade fúngica comparando as três espécies de plantas entre si e locais impactado e não impactado de Bertioga. Indicando que o derramamento de petróleo pode não ter influenciado na diversidade de fungos, ou houve tempo suficiente para que a comunidade fúngica seja restabelecida. Entretanto no estudo de Hyde (2004) houve perda da diversidade fúngica do manguezal poluído com petróleo quando comparado ao manguezal sadio.

No presente trabalho a frequência de isolamento, diversidade e riqueza foram maiores no verão indicando que a alta umidade e temperatura favorecem a maior infecção da planta por endófitos permitindo também o isolamento de um maior número de espécies fúngicas. Estudos

relatam que a infecção fúngica endofítica é aumentada no verão, mas as mesmas espécies fúngicas colonizam a planta hospedeira, não alterando dessa forma a diversidade (SURYANARAYANAN; KUMARESAN; JOHNSON, 1998; SURYANARAYANAN; MURALI; VENKATESAN, 2002).

Tabela 2.6 - Índices de diversidade (Shannon-Wienner) e riqueza (Chao1) obtidos a partir da análise das sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 344 isolados

Índices	**Grupo de sequências**	**Similaridade considerada ***			
		100%	**99%**	**97%**	**95%**
Diversidade (Shannon-Wienner)	**Ramo**	4,69(±0,14)	4,39(±0,15)	4,00(±0,15)	3,89(±0,15)
	Folha	4,12(±0,18)	3,81(±0,21)	3,51(±0,21)	3,22(±0,22)
	Rhizophora	4,38(±0,15)	4,17(±0,17)	3,85(±0,19)	3,59(±0,21)
	Laguncularia	4,52(±0,14)	4,33(±0,15)	3,95(±0,20)	3,68(±0,18)
	Avicennia	4,35(±0,17)	4,22(±0,18)	3,75(±0,21)	3,57(±0,26)
	Ber Impactado	4,33(±0,16)	3,98(±0,17)	3,54(±0,22)	3,30(±0,22)
	NãoImpactado	4,17(±0,17)	3,85(±0,20)	3,32(±0,24)	3,08(±0,25)
	Bertioga	4,75(±0,12)	4,37(±0,14)	3,65(±0,17)	3,34(±0,19)
	Cananéia	5,08(±0,11)	4,62(±0,13)	4,08(±0,14)	3,69(±0,14)
	Verão	5,03(±0,11)	4,69(±0,14)	4,22(±0,16)	4,00(±0,17)
	Inverno	4.85(±0,12)	4,54(±0,14)	3,87(±0,16)	3,65(±0,15)
Riqueza (Chao1)	**Ramo**	4498(328-812)	239(176-358)	127(100-185)	115(90-168)
	Folha	335(189-670)	186(104-272)	109(74-196)	94(53-131)
	Rhizophora	666(328-1469)	254(157-462)	170(105-324)	215(92-506)
	Laguncularia	642(346-1285)	318(175-575)	135(95-225)	92(68-251)
	Avicennia	391(216-785)	181(118-318)	154(90-320)	120(68-266)
	Impactado	752(347-1763)	146(99-250)	62(81-136)	67(48-121)
	NãoImpactado	372(197-783)	220(122-462)	109(63-238)	72(46-146)
	Bertioga	583(319-787)	287(194-469)	140(86-205)	103(68-156)
	Cananéia	766(521-1185)	320(239-462)	185(137-282)	143(101-243)
	Verão	1745(884-3610)	640(389-1127)	603(196-533)	204(138-342)
	Inverno	599(423-897)	358(255-546)	164(119-262)	103(81-157)

***** Valores para intervalo com 95% de confidência são apresentados entre parênteses

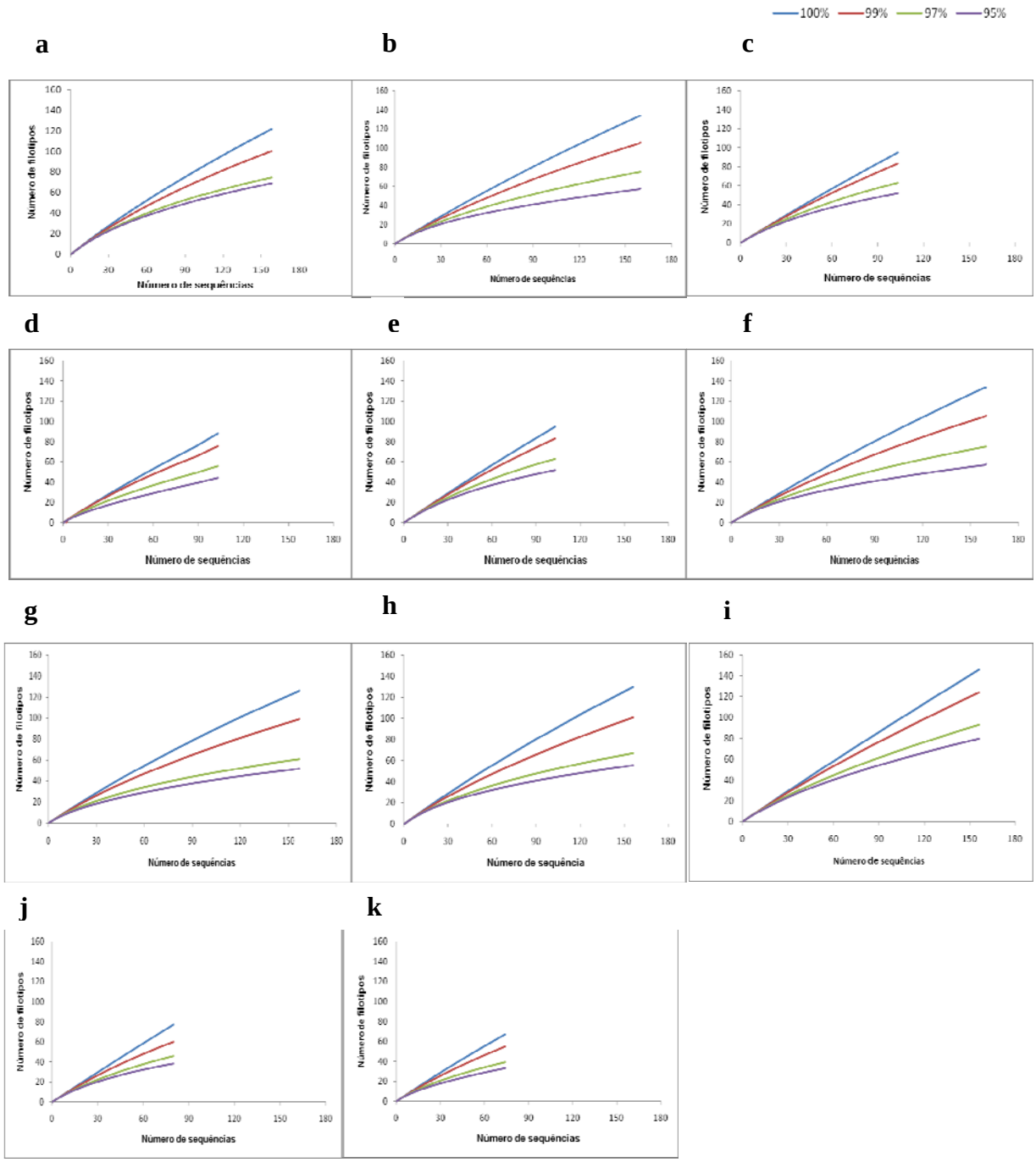

Figura 2.13 - Análise de rarefação de filotipos componentes das comunidades fúngicas isoladas dos órgãos: **(a)** ramo e **(b)** folha; em diferentes espécies: **(c)** - *Rhizophora mangle*, **(d)** - *Laguncularia racemosa*, **(e)** *Avicennia nitida;* nos locais **(f)** Cananéia e **(g)** Bertioga, em diferentes estações **(h)** – verão e **(i)** inverno, e em diferentes ambientes **(j)** impactado e **(k)** não impactado. As análises são baseadas em sequências parciais da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA dos isolados fúngicos. Foram consideradas 100%, 99%, 97% e 95% de similaridades entre as sequências para determinar as rarefações

2.3 Conclusão

Os manguezais avaliados são colonizados por uma diversa comunidade de fungos endofíticos pertencentes a pelo menos cinco classes taxonômicas (Sordariomicetos, Eurotiomicetos, Dothideomicetos, Sacaromicetos e Agaricomicetos), sendo que os Sordariomicetos predominaram. Os gêneros mais frequentes nesse estudo foram *Phomopsis, Trichoderma, Colletotrichum, Fusarium e Xylaria*, sendo que *Phomopsis* foi o gênero dominante. Além disso, parte da comunidade fúngica avaliada não apresentou o seu gênero identificado, podendo tratar-se de novas espécies. Grande parte dos gêneros fúngicos avaliados não apresentaram especificidade com relação a planta hospedeira. Os ramos apresentaram maior frequência e diversidade fúngica quando comparados com as folhas. A frequência de colonização pode ser afetada pela estação do ano em que é realizada a coleta, e o efeito depende do manguezal considerado. A análise da comunidade fúngica mostrou que a diversidade entre diferentes tecidos vegetais, estações do ano e locais de isolamento é diferente. O manguezal de Cananéia, o qual possui menor efeito antropogênico, mostrou maior diversidade fúngica indicando a importância da preservação desse ecossistema que pode ser fonte de princípios ativos de grande interesse biotecnológico. A maioria dos gêneros encontrados são de fungos do solo indicando que esses estão bem adaptados às condições adversas dos manguezais.

Referências

AGRIOS, G.N. Plant disease caused by fungi. In: AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. London: Academic Press, 1997. p. 245-406.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; SOBRAL, J.K.; LACAVA, P. T. **Manual:** isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: CALQ, 2002. 86 p.

ARNOLD, AE. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers.**Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 21, p. 51-66, 2007.

ANANDA, K; SRIDHAR, K.R. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the West coast of India. **Canadian Journal Microbiology**, Saskatoon, v. 48, p. 871-878, 2002.

ANANDA, K.; SRIDHAR, K.R. Diversity of filamentous fungi on decomposing leaf and woody litter of mangrove forests in the southwest coast of India. **Current science**, Bangalore, v. 87, p. 1431-1437, 2004.

BANDARANAYAKE, W.M. Traditional and medicinal uses of mangroves. **Mangroves and Salt Marshes**, Netherlands, v. 2, p. 133-148, 1998.

BANDARANAYAKE, W.M. Survey of mangrove plants from Northern Australia for phytochemical constituents and UV-absorbing compounds**. Current Topics in Phytochemistry,** Netherlands, v. 14, p. 69-78, 1995.

BANDARANAYAKE, W.M. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. **Wetlands Ecology and Management**, Netherlands, v. 10, p. 421-452, 2002.

BAILEY, J.A.; NASH, C.; O'CONNELL, R.J.; SKIPP, R.A. Infection process and host specificity of a *Colletotrichum* species causing anthracnose disease of cowpea, Vigna unguiculata. **Mycological Research**, Cambridge, v. 94, p. 810-814, 1990.

BAILEY, B.A.; STREM, M.D.; WOOD, D. *Trichoderma* species form endophytic associations within *Theobroma cacao* trichomes. **Mycological Research**, Cambridge, v. 113, p. 1365-1376, 2009.

BAYMAN, P.; ANGULO-SANDOVAL, P.; BÁEZ-ORTIZ, Z.; JEAN LODGE, D. Distribution and dispersal of *Xylaria* endophytes in two tree species in Puerto Rico. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, p. 944-948, 1998.

BRITZ, H.; STEENKAMP, E.T.; COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, B.D.; MARASAS, W.F.; WINGFIELD, M.J. Two new species of *Fusarium* section Liseola associated with mango malformation. **Mycologia**, Lancaster, v. 94, p. 722-730, 2002.

CANNON, P.F.; SIMMONS, C.M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, Lancaster, v. 94, p. 210-220, 2002.

CAVALCANTE, R.M.; SOUSA, F.W.; NASCIMENTO, R.F.; SILVEIRA, E.R.; FREIRE, G.S.S. The impact of urbanization on tropical mangroves (Fortaleza, Brazil): Evidence from PAH distribution in sediments. **Journal of Environmental Management**, New York, v. 91, p. 328-335, 2009.

CHENG, Z.; PAN, J.; TANG, W.; CHEN, Q.; LIN, Y. Biodiversity and biotechnological potential of mangrove associated fungi. **Journal of Forestry Research**, New York, v. 20, p. 63-72, 2009.

CROUCH, J.A.; BEIRN, L.A.; CORTESE, L.M.; BONOS, S.A.; CLARKE, B.B. Anthracnose disease of switchgrass caused by the novel fungal species *Colletotrichum navitas*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 113, p. 1411-1421, 2009.

FREIRE, C.O.; BEZERRA, J.L. Foliar endophytic fungi of Ceara State (Brazil): A preliminary study. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 27, p. 304-308, 2001.

GAZIS, R.; CHAVERRI, P. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. **Fungal Ecology**, New York, v. 3, p. 240-254, 2010.

GILBERT, G.S.; GOROSPE, J.; RYVARDEN, L. Host and habitat preferences of polypore fungi in Micronesian tropical flooded forests. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, p. 674-680, 2008.

GOH, T.K.; YIPP, M.W. In vivo and in vitro studies of three new species of *Trimmatostroma* associated with sooty spots of the mangrove *Aegiceras corniculatum* in Hong Kong. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, 1489-1497, 1996.

GUIMARÃES, D.O.; BORGES, W.S.; VIEIRA, N.J.; OLIVEIRA, L.F.; SILVA, C.H.T.P.; LOPES, N. P.; DIAS, L.G.; DURÁN-PATRÓN, R.; COLLADO, I.G.; PUPO, M.T. Diketopiperazines produced by endophytic fungi found in association with two Asteraceae species. **Phytochemistry**, Netherlands, v. 71, p. 1423-1429, 2010.

HARMAN, G.E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Lancaster, v. 96, p. 190-194, 2006.

HARVEY, J.B.J.; GOFF, L.J. Genetic covariation of the marine fungal symbiont *Haloguignardia irritans* (Ascomycota, Pezizomycotina) with its algal hosts *Cystoseira* and *Halidrys* (Phaeophyceae, Fucales) along the west coast of North America. **Fungal Biology**, Amsterdam, v. 114, p. 82-95, 2010.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, p. 641-655, 1991.

HAWKSWORTH, D.L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 50, p. 9–18, 2004.

HAWKSWORTH, D. L.; ROSSMAN, A. Y. Where are all the undescribed fungi? **Phytopathology**, Lancaster, v. 87, p. 888-891, 1997.

HYDE, K.D. Ecology of tropical marine fungi. **Hydrobiologia**, Netherlands, v. 178, p. 199-208, 2004.

HYDE, K.D.; LEE, S.Y. Ecology of mangrove fungi and their role in nutrient cycling: what gaps occur in our knowledge? **Hydrobiologia,** Netherlands, v. 295, p. 107-118, 1995.

KUBICEK, C.P.; BISSETT JOHN, D.I.; KULLNIG-GRADINGER, C.; SZAKACS, G. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, p. 310-319, 2003.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

KUMAR, S.; HATHA, A.A.; CHRISTI, K. S. Diversity and effectiveness of tropical mangrove soil microflora on the degradation of polythene carry bags. **Revista de Biologia Tropical**, Costa Rica, v. 55, p. 777-786, 2007.

KUMARESAN, V.; SURYANARAYANAN, T.S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 1388-1391, 2001.

LU, H.; ZOU, W.X.; MENG, J.C.; HU, J.; TAN, R.X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*
Plant Science, New York, v. 151, p. 67-73, 2000.

LI, M. Y.; XIAO, Q.; PAN, J. Y.; WU, J. Natural products from semi-mangrove flora: source, chemistry and bioactivities. **Natural Product,** Cambridge, v. 26, p. 281-298, 2009.

LIU, X.; DONG, M.; CHEN, X.IAOHONG, J.M.; LV, X.; YAN, G. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*
Food Chemistry, New York, v. 105, p. 548-554, 2007.

LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; SUN, Y.; LU, Z.; ZENG, X. Production, characterization and antioxidant activities *in vitro* of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Carbohydrate Polymers**, New York, v. 78, p. 275-281, 2009.

LODGE, D. J.; FISHER, P. J.; SUTTON, B. C. Endophytic fungi of *Manikara bidentata* leaves in Puerto Rico. **Mycologia**, Lancaster, v. 88, p. 733-738, 1996.

LU, G.; CANNON, P.F.; REID, A.; SIMMONS, C.M. Diversity and molecular relationships of endophytic Colletotrichum isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana**. Mycological Research**, Cambridge, v. 108, p. 53-63, 2004.

MEJÍA, L.C.; ROJAS, E.I.; MAYNARD, Z.; BAEL, S. V.; ARNOLD, A.E.; HEBBAR, P.; SAMUELS, G.J.; ROBBINS, N.; HERRE, E.A. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 4-14, 2008.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ARAUJO, W.L.; RAAIJMAKERS, J.M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 7259-7267, 2007.

MILES, D.H.; KOKPOL, U.; CHITTAWONG, V.; TIP-PYANG, S.; TUNSUWAN, K.; NGUYEN, C. Mangrove Forests – The importance of conservation as a bioresource for ecosystem diversity and utilization as a source of chemical constituents with potential medicinal and agricultural value**. Pure Applied Chemical**, Berlin, v. 70, p. 23-27, 1999.

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, K. D. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 1508-1513, 2001.

PONGCHAROEN, W.; RUKACHAISIRIKUL, V.; PHONGPAICHIT, S.; KÜHN, T.; PELZING, M.; SAKAYAROJ, J.; TAYLOR, W.C. Metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-D14. **Phytochemistry**, Netherlands, v. 69, p. 1900-1902, 2008.

ROSA, D.R.; HERRERA, C.J.L. Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agents against avocado white root rot. **Biological Control**, Orlando, v. 51, p. 66-71, 2009.

REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis: from mutualism to parasitism, who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist**, London, v. 151, p. 705-716, 2001.

RODRIGUEZ, R.J.; WHITE JR, J.F.; ARNOLD, A.E.; REDMAN, R.S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, London, v. 182, p. 314-330, 2009.

SARMA, V.V.; HYDE, K.D.; VITTAL, B.P.R. Frequence of occurrence of mangrove fungi from the east coast of India. **Hydrobiologia**, Netherlands, v. 455, p. 41-53, 2001.

SHAKERI, J.; FOSTER, H.A. Proteolytic activity and antibiotic production by *Trichoderma harzianum* in relation to pathogenicity to insects. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, p. 961-968, 2007.

SHARAF, M.; EL-ANSARI, M.A.; SALEH, N.A.M. New flavonoids from *Avicennia marina*. **Fitoterapia**, Novara, v. 71, p. 274-277, 2000.

SHWETA, S.; ZUEHLKE, S.; RAMESHA, B.T.; PRITI, V.; MOHANA KUMAR, P.; RAVIKANTH, G.; SPITELLER, M.; VASUDEVA, R.; UMA SHAANKER, R. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani,* from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. **Phytochemistry,** Netherlands, v. 71, p. 117-122, 2010.

SURYANARAYANAN, T.S.; KUMARESAN, V. Endophytic fungi of some halophytes from an estuarine mangrove forest. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 1465-1467, 2000.

SURYANARAYANAN, T.S.; MURALI, T.S.; VENKATESAN, G. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. **Canadian Journal of Botany**, Ontario, v. 80, p. 818-826, 2002.

SURYANARAYANAM, T. S.; VIJAYKRISHNA, D. Fungal endophytes of aerial roots of *Ficus benghalensis*. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 8, p. 155-161, 2001.

SURYANARAYANAN, T.S.; VENKATESAN, G.; MURALI, T.S. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: Diversity and distribution patterns. **Current Science**, Bangalore, v. 85, p. 489-493, 2003.

SURYANARAYANAN, T.S.; KUMARESAN, V.; JOHNSON, J.A. Foliar fungal endophytes from two species of the mangrove *Rhizophora.* **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 1003–1006, 1998.

SURYANARAYANAN, T.S.; VENKATESAN, G.; MURALI, T.S. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: Diversity and distribution patterns. **Current Science**, Bangalore, v. 85, p. 489-493, 2003.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KITAMI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 246-257.

TREMBLAY L.B.; DITTMAR, T.; MARSHALL, A.G.; COOPER, W. J.; COOPER, W.T. Molecular characterization of dissolved organic matter in a North Brazilian mangrove porewater and mangrove-fringed estuaries by ultrahigh resolution Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance mass spectrometry and excitation/emission spectroscopy. **Marine Chemistry**, New York, v. 105, p.15-29, 2007.

TSAVKELOVA, E.A.; BÖMKE, C.; NETRUSOV, A.I.; WEINER, J.; TUDZYNSKI, B. Production of gibberellic acids by an orchid-associated *Fusarium proliferatum* strain **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 45, p. 1393-1403, 2008.

WU, J.**;** XIAO, Q.**;** XU, J.**;** LI, M. Y.**;** PAN, J.Y.**;** YANG, M.H**.** Natural products from true mangrove flora: source, chemistry and bioactivities. **Natural Products Reports,** Cambridge, v. 25, p. 955-981, 2008.

3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO FUNGO *Diaphorte phaseolorum* MEDIADA PELA *Agrobacterium tumefaciens*

Resumo

Nos últimos anos a transformação genética de fungos mediada pela *Agrobacterium tumefaciens* tem sido empregada como um método importante para identificar genes interrompidos. Técnicas de mutagênese insercional aleatória têm sido consideradas ferramentas eficientes para investigar a função de genes fúngicos, principalmente com o crescente interesse nos estudos de genômica funcional. Estudos sobre o sistema *Agrobacterium* na transformação de fungos demonstram que o T-DNA se insere em sítios aleatórios no genoma do hospedeiro principalmente como cópia única. Dessa forma, a agrotransformação vem sendo empregada para identificar genes relacionados com o potencial biotecnológico fúngico, obtendo informações da via metabólica do mesmo. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivos: a) avaliar a atividade antimicrobiana da comunidade de fungos endofíticos de manguezais obtidos no presente trabalho (Capítulo 2) contra os patógenos humanos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e contra o fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis citri;* b) estabelecer a metodologia de transformação genética pelo sistema *Agrobacterium tumefaciens* para o fungo endofítico *Diaporthe phaseolorum*; c) gerar e caracterizar uma biblioteca de transformantes de *D. phaseolorum* permitindo o estudo de genes relacionados com a via de biossíntese do antibiótico ácido 3-hidroxipropiônico produzido por meio do metabolismo secundário desse fungo. Os resultados mostraram que dentre as linhagens produtoras de antibiótico, 29,41% pertencem ao gênero *Diaporthe*, o qual apresentou maior frequência na comunidade fúngica avaliada. Para a agrotransformação de *D. phaseolorum* foram avaliadas dois tipos de membranas (náilon e papel de filtro), dois períodos de co-cultivo (24 e 48 horas) e duas concentrações de acetoseringona no meio de co-cultivo (200 e 400 µM), sendo que todas as condições testadas apresentaram a mesma eficiência de transformação. Os transformantes gerados apresentaram 100% de estabilidade mitótica. A integração do T-DNA foi identificada nos transformantes por meio das técnicas de PCR e *Southern blot*. Foi obtida uma biblioteca de 520 transformantes sendo que 31 apresentaram ausência da atividade antimicrobiana contra o patógeno *S. aureus*. A análise das sequências que flanqueiam o T-DNA mediante TAIL-PCR mostraram que os genes interrompidos nos transformantes apresentaram similaridades com proteínas de domínios conservados envolvidos com diferentes funções como: translação de proteínas, homeostase do íon orgânico Mg^{2+}, transporte intracelular, migração, adesão e proliferação celular. O uso da mutagênese insercional aleatória mediante *Agrobacterium tumefaciens* é uma ferramenta importante na identificação de genes relacionados com a biossíntese de metabólitos secundários de interesse biotecnológico. O presente estudo descreve pela primeira vez a transformação genética do gênero *Diaporthe* pelo sistema *Agrobacterium tumefaciens*.

Palavras-chave: *Diaporthe phaseolorum*; Agrotransformação; Antibiótico; Endofítico; Microscopia; Mutagênese insercional aleatória

3 GENETIC TRANSFORMATION OF THE FUNGUS *Diaporthe phaseolorum* MEDIATED BY *Agrobacterium tumefaciens*

Abstract

Recently, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated fungal transformation has been used as an important tool to disclose disrupted genes. As a result of the increasing number of studies on functional genomics, insertional mutagenesis techniques are now considered efficient tools to investigate the function of fungal genes. Reports on *Agrobacterium*-mediated fungal transformation have demonstrated that the T-DNA is randomly inserted in the host genome, mostly as a single copy. The agro-transformation has also been employed to identify genes that are related to the biological potential of fungi and to obtain information about the metabolic pathway. This study aimed: a) to evaluate the antibiotic activity of mangrove endophytic fungi (Chapter 2) against the human pathogens *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, and against the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis citri* ; b) to set up an *A. tumefaciens*-mediated transformation system for the endophytic fungus *Diaporthe phaseolorum*; c) to generate and characterize a *D. phaseolorum* transformants library, in order to study genes related to the biosynthesis pathway of the antibiotic 3-hydroxipropionic acid, produced by the secondary metabolism of this fungus. The results revealed that 29.41% of the antibiotic producing strains belonged to the genus *Diaporthe*, which was the most frequently found in the assessed fungal community. Two different types of membranes (nylon and filter paper), co-cultivation periods (24 and 48 hours) and concentrations of acetosyringone in the co-cultivation plates (200 and 400 µM) were employed to the agro-transformation of *D. phaseolorum*. All the tested conditions had the same transformation efficiency. The generated transformants presented 100% of mitotic stability. The T-DNA integration in the fungal genome was checked by PCR and *Southern blot* techniques. A library of 520 transformants was generated, in which 31 had no antibiotic activity against the pathogen *S. aureus*. The analysis of the T-DNA flanking sequences by TAIL-PCR showed that the disrupted genes in the transformants showed similarity to proteins from conserved domains that have different functions, such as: protein translation, Mg^{2+} homeostasis, intracellular transport, migration, adhesion and cellular proliferation. The use of *Agrobacterium*-mediated transformation for insertional mutagenesis is an important tool in the search for genes related to the biosynthesis of secondary metabolites with biotechnological potential. This is the first study to describe the genetic transformation of the fungal genus *Diaporthe* using the *A. tumefaciens* system.

Keywords: *Diaporthe phaseolorum*; *Agrobacterium*-mediated transformation; Antibiotic; Endophytic; Microscopy; Insertional mutagenesis

3.1 Introdução

Nos últimos anos, há interesse crescente nos estudos sobre a genômica funcional de fungos. Técnicas de mutagênese insercional aleatória e de mutagênese sítio-específica têm sido adaptadas e empregadas como uma ferramenta eficiente para investigar a função dos genes fúngicos. Além disso, o genoma de um número significativo de fungos tem sido sequenciados (http://www.genomesonline.org/) (WELD et al., 2006). A transformação mediada pela *Agrobacterium tumefaciens* tem sido utilizada como um método poderoso para identificar genes interrompidos, inclusive, tem sido preferida como o sistema de tranformação para muitos fungos (AMEY et al., 2002; BUNDOCK; HOOYKAAS, 1996; CAMPOY et al., 2003; FITZGERALD et al., 2003; MICHIELSE et al., 2005; MULLINS et al., 2001; RODRÍGUEZ-TOVAR et al., 2005;). Grande parte dos trabalhos sobre o sistema *Agrobacterium* adaptados na transformação de fungos demonstra que o T-DNA se insere em sítios aleatórios, e que inserções únicas no genoma do hospedeiro são predominantes (COVERT et al., 2001; DE GROOT et al., 1998; MORIOKA et al., 2006). Nesse contexto, a agrotransformação vem sendo muito empregada para obter fenótipos mutantes e identificar os genes a estes relacionados, permitindo obter informações do fluxo metabólico de fungos de importância industrial (MEYER, 2007).

Os fungos são amplamente utilizados na biotecnologia como "fábricas celulares" para a produção de compostos ativos de aplicação principalmente farmacêutica e agronômica. Técnicas relacionadas à engenharia genética podem ser utilizadas visando o aumento da produtividade desses princípios ativos. Os antibióticos β-lactâmicos, incluindo penicilinas e cefalosporinas, foram o primeiro grupo que se beneficiou com os progressos realizados com técnicas moleculares para fungos filamentosos. O conhecimento crescente da biossíntese e genética molecular de antibióticos β-lactâmicos permitiu o aumento na produção do metabólito, bem como a engenharia de novas vias de biossíntese (BRAKHAGE; CARUSO, 2004; MEYER, 2007).

Estudos de genômica em vários fungos revelam que o número previsto de genes relacionados à síntese de metabólitos secundários é maior do que o número de metabólitos encontrados em meio de fermentação padrão para uma determinada espécie fúngica (BERGMANN et al., 2007; BRAKHAGE et al., 2008). Isso indica que esses genes silenciosos podem ser induzidos, por meio da manipulação genética, visando a identificação de novos metabólitos ativos, como os observados em *Aspergillus nidulans* (BERGMANN et al., 2007).

O gênero *Phomopsis* (*Diaporthe*) é uma fonte rica de metabólitos secundários com várias atividades farmacológicas incluindo: phomopsidinas inibidoras de microtúbulos (KOBAYASHI et al., 2003), phomoxantonas antimalárica e antituberculose (ISAKA et al., 2001), phomoxantona A e phomodol, antifúngicos (ELSAESSER et al., 2005; HORN et al., 1994), éter biraril herbicida (DAI et al., 2005), derivados de phomalactona inibidores da produção de citoquinas (WRIGLEY et al., 1999), phomopsichalasina antimicrobiana (HORN et al., 1995) e citochalasina H como reguladora do crescimento de plantas (WELLS et al., 1976).

Embora o gênero *Phomopsis* (*Diaporthe*) tenha grande aplicação biotecnológica, não há relatos na literatura sobre os mecanismos genéticos relacionados com a síntese de metabólitos secundários produzidos pelo mesmo. Além disso, também não existem trabalhos na literatura que descrevam um sistema de transformação genética para os fungos deste gênero. Dessa forma, o presente trabalho buscou estabelecer as condições para transformação genética do fungo *Diaporthe phaseolorum* pelo sistema *A. tumefaciens* para então tentar identificar possíveis genes relacionados com a biossíntese do antibiótico ácido 3-hidroxipropiônico (produzido pelo fungo em questão e identificado no Capítulo 4 deste trabalho) através da análise de transformantes deficientes para produção do antibiótico via TAIL-PCR.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e métodos

3.2.1.1 Linhagens patogênicas e condições de cultivo

Os patógenos humanos testados nesse estudo foram *Staphylococcus aureus* (gram-positiva) e *Escherichia coli* (gram-negativa), sendo que o meio de cultivo utilizado para esses patógenos foi Luria Bertani (LB) (10 g de triptona, 10 g de cloreto de sódio, 5 g de extrato de levedura, 1000 mL de água destilada; pH 7,0). O fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis citri* também foi avaliado utilizando o meio de cultivo NA (3 g de extrato de carne, 5 g de peptona, 1000 mL de água destilada; pH 6,8) Essas bactérias pertencem ao banco de linhagens do Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”, Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, São Paulo.

3.2.1.2 Seleção de fungos endofíticos produtores de antibióticos

A seleção de fungos endofíticos produtores de antibióticos foi realizada por meio do teste em blocos de ágar (ICHIKAWA et al., 1971). Primeiramente, 344 fungos endofíticos foram crescidos em 15 mL de meio BDA sólido (Difco) por toda a superfície da placa durante 15 dias, na ausência de luz. No preparo das culturas bacterianas foram inoculadas colônias isoladas de patógenos humanos e do fitopatógeno respectivamente em 10 mL de meio de cultura LB e NA (Difco), os quais foram incubados durante 18 horas a 37º C sob agitação constante de 100 rpm. No dia do teste foram semeados 100 µL da suspensão de cada bactéria com DO_{660nm} de 0,01 em 10 mL dos respectivos meios de cultura sólido próprio de cada patógeno descrito no item 3.2.1.1. Com o auxílio de um furador de rolha de 5 mm, blocos de ágar foram removidos de placas contendo cultura fúngica e transferidos com o micélio voltado para cima para as placas onde as bactérias patogênicas tinham sido previamente inoculadas. As placas foram incubadas em geladeira durante 20 min, para permitir a difusão dos metabólitos para o meio de cultura das bactérias. Em seguida, as placas foram incubadas a 37º C durante 24 horas. Após esse período, a atividade antimicrobiana foi determinada pela avaliação do diâmetro do halo de inibição observado ao redor dos blocos de ágar contendo o fungo. O controle consistiu da inoculação do disco de BDA sem o micélio de fungos.

3.2.1.3 Transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

3.2.1.3.1 Isolado transformado

A linhagem 41.1(1), identificada como *Diaporthe phaseolorum,* é um endófito de folha de *Laguncularia racemosa* presente no local não impactado de Bertioga no verão. A classificação taxonômica dessa linhagem foi realizada por métodos moleculares e encontra-se descrita no Capítulo 2 desse trabalho.

3.2.1.3.2 Otimização do protocolo de agrotransformação

O protocolo descrito por de Groot et al. (1998) para fungos filamentosos foi adotado como base para avaliar as condições mais adequadas de transformação do fungo *D. phaseolorum*. Foram realizados testes para avaliar o melhor tipo de membrana (papel de filtro 8 µm de porosidade e nitrocelulose 0,45 µm de porosidade), o melhor tempo de co-cultivo (24 ou 48 horas), e a concentração de acetoseringona no meio de indução (200 µM e 400 µM). A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada com o auxílio do programa SAS - *Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA*. Foram avaliados nove tratamentos, sendo que cada tratamento era composto pela combinação dos três parâmetros avaliados. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com cinco repetições, onde cada placa constituía uma repetição. Micélio de *D. phaseolorum* foi utilizado como inóculo fúngico, sendo cultivado em meio BDA (Difco) a 28º C durante 7 dias de crescimento. Esse micélio foi inoculado na membrana 8 horas antes do co-cultivo com a *Agrobacterium tumefaciens.*

3.2.1.3.3 Linhagem de *Agrobacterium tumefaciens*, vetor de transformação e condições de cultivo

A transformação genética do fungo *D. phaseolorum* linhagem 41.1(1) foi realizada segundo o protocolo descrito por de Groot et al. (1998) empregando as modificações determinadas no item anterior (3.2.1.3.2). A linhagem de *A. tumefaciens* utilizada nesse trabalho é a EHA105, a qual carrega o plasmídio pFAT-gfp (Figura 3.1). Ela foi cedida gentilmente pela Dr^{a}. Léia Cecília de Lima Fávaro (Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP). Essa linhagem foi recuperada do estoque em glicerol, cultivada durante 72 horas a 28º C em meio YEP (WALKERPEACH; VELTEN, 1994) sólido suplementado com espectinomicina (200 $\mu g.mL^{-1}$) e rifampicina (100 $\mu g.mL^{-1}$). Uma colônia isolada foi transferida para frasco de vidro contendo 30 mL de meio YEP líquido suplementado com espectinomicina (200 $\mu g.mL^{-1}$) e rifampicina (100 $\mu g.mL^{-1}$), incubada a 28º C por 24 horas sob agitação (180 rpm). A suspensão de células da agrobactéria foi diluída para um densidade óptica (DO) a 660 nm de 0,15 em meio de indução (10 mM de K_2HPO_4, 10mM KH_2PO_4, 2,5 mM de NaCl, 2,0 mM de $MgSO_4$, 0,7 mM de $CaCl_2$, 9 µM de $FeSO_4$, 4 mM

de $(NH_4)_2SO_4$, 40 mM de MES, 0,5% (v/v) de glicerol e 10 mM de glucose; pH 5,3) na presença ou na ausência de acetoseringona (AS) (Fluka) (200 μM) em um volume final de 20 mL. As células foram incubadas à 28º C sob agitação (180rpm) até atingir a DO_{660nm} de 0,7. O tempo para induzir a competência foi de aproximadamente 12 horas. Durante o crescimento da cultura bacteriana, micélios do fungo *D. phaseolorum* linhagem 41.1(1) foram inoculados em papel filtro inseridos previamente em meio de indução. Em seguida, suspensões de agrobactéria (DO_{660nm} = 0,7), com AS (200 μM), foram inoculadas (100 μL) sobre a membrana de papel de filtro (8,0 μm de porosidade e 90 mm de diâmetro, Quanty®, Germany) que estava posicionada sobre meio de indução sólido (10 mM de K_2HPO_4, 10 mM KH_2PO_4, 2,5 mM de NaCl, 2,0 mM de $MgSO_4$, 0,7 mM de $CaCl_2$, 9 μM de $FeSO_4$, 4 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 40 mM de MES, 0,5% (v/v) de glicerol, 5 mM de glucose e 20 g de ágar; pH 5,3) contendo AS (200 μM) ou não (controle negativo), junto com o inóculo do fungo crescido em 5 mm. As placas foram incubadas à 25º C durante 48 horas. Após este período de co-cultivo, as membranas foram transferidas para placas contendo meio de cultivo BDA suplementado com 100 $\mu g.mL^{-1}$ de higromicina B (Invitrogen Life Technologies) e 200 μg/mL de cefoxitina sódica (Eurofarma) e incubadas a 28º C por 15 dias. A cefoxitina sódica foi utilizada para eliminar a bactéria e a higromicina B para selecionar os transformantes. As placas foram avaliadas 5, 10, 15 e 30 dias após a transferência das membranas. As colônias resistentes a higromicina B foram contadas e repicadas para placas de Petri contendo meio de cultivo seletivo BDA suplementado com 100 $\mu g.mL^{-1}$ de higromicina B, para posterior purificação e armazenamento. A reprodutibilidade desse protocolo de transformação foi avaliada realizando dois experimentos independentes.

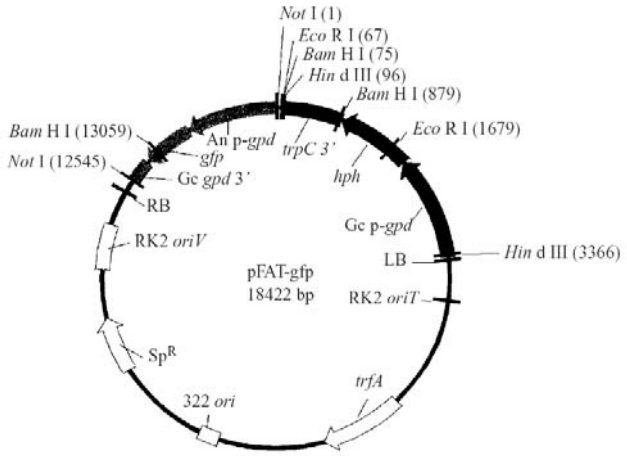

Figura 3.1 - Mapa do vetor de agrotransformação de fungos pFAT-gfp, desenvolvido por Fitzgerald et al. (2003). (RB) borda direita do T-DNA; (LB) borda esquerda do T-DNA; (*hph*) gene de resistência a higromicina B de *E. coli*; (*trpC* 3') sinal de terminação transcricional do gene *trpC* de *A. nidulans*; (An p-*gdp*) promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato de *A. nidulans*; (Gc p-*gpd*) promotor do gene *gpd* de *G. cingulata*; (Gc *gpd* 3') sinal de terminação transcricional do gene *gpd* de *G. cingulata*; (Sp^R) gene de resistência a espectinomicina; (RK2 *oriV*) origem de replicação vegetativa RK2; (RK2 *oriT*) origem de transferência RK2; (322 *ori*) origem de replicação de pBR322; (*trfA*) gene de replicação *trfA* de RK2; (*gfp*) gene da proteína verde fluorescente pGreen Lantern (Life Technologies). Fonte: Fitzgerald et al. (2003)

3.2.1.3.4 Teste de sensibilidade a higromicina B

O fungo *D. phaseolorum* linhagem 41.1(1) foi inoculado em placas de Petri com meio BDA (Batata Dextrose Ágar, Merck) contendo diferentes concentrações (0; 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 $\mu g.mL^{-1}$) de higromicina B (Invitrogem, Brasil) para determinar a CIM (concentração inibitória mínima). As linhagens foram incubadas a 28º C por 7 dias. A concentração de higromicina escolhida foi a que inibiu totalmente o crescimento fúngico utilizada posteriormente para a transformação.

3.2.1.3.5 Purificação e Estoque de Fungos

A purificação dos transformantes foi realizada por meio de diluição em série e semeadura em meio de cultura BDA. Com o auxílio de alça metálica esterilizada foram coletados micélios da colônia e transferidos para tubo de 2 mL contento 1 mL de solução de salina (8,5 g de NaCl em 1 L de água), após, o tubo foi intensamente agitado utilizando-se agitador (Vortex). Após a agitação a suspensão foi diluída até 10^{-5} e 10^{-6} e 100 μL dessas diluições foram semeadas em

placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram incubadas em estufa a 28º C para o crescimento e obtenção de colônias isoladas. As colônias isoladas foram armazenadas de acordo com o método Castellani (ARAÚJO et al., 2002), no qual os fungos foram crescidos em meio BDA, e então foram coletados discos de meio de cultura com micélios e colocados em frascos de 10 mL contendo água esterilizada. Os frascos foram identificados e armazenados à temperatura ambiente.

3.2.1.3.6 Confirmação da transformação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A confirmação da agrotransformação foi realizada mediante amplificação do gene *gfp* por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). O DNA genômico de 8 transformantes escolhidos aleatoriamente e da linhagem selvagem 41.1(1) de *Diaporthe phaseolorum* foi extraído conforme protocolo descrito por Raeder e Broda (1985). A amplificação do gene *gfp* foi realizada com os primers glGFP5 (5'-GCCGGAATTCATGAGCAAGGGCGAGGAACTGTTC-3') e glGFP3 (5'-GCCGAGCTCAGATCTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3') (FITZGERALD et al., 2003). As amplificações foram realizadas em termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94º C por 5 min, seguido de 32 ciclos de 94º C por 30 s, 60º C por 30 s e 72º C por 30 s, após os ciclos, uma extensão final a 72º C por 7 min. Cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo Tampão 1x (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl; pH 8,4), 3,7 mM de $MgCl_2$, 1 mM de dNTP, 0,05 $U.\mu L^{-1}$ de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 0,4 µM de cada iniciador e 3 ng de DNA. O fragmento amplificado (700 pb) foi observado por eletroforese em gel de agarose 1,4% a 3 $V.cm^{1}$, juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb (Fermentas). Após a eletroforese o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1 $mg.mL^{-1}$) e fotodocumentado.

3.2.1.3.7 Análise da estabilidade mitótica dos transformantes

A análise da estabilidade mitótica foi realizada com 20 transformantes (4, 8, 9, 12, 14, 20, 28, 30, 35, 40, 47, 49, 50, 57, 60, 64, 70, 78, 80, 83) escolhidos de forma aleatória. Colônias monospóricas (monoconidiais) dos transformantes foram crescidas durante 5 dias a 28º C em meio BDA suplementado com 100 $\mu g.mL^{-1}$ de higromicina B. Os transformantes foram repicados

durante cinco gerações consecutivas em meio BDA sem adição do agente seletivo (higromicina B). Após as repicagens sucessivas, fragmentos de micélio provenientes das colônias da última passagem foram semeados em meio BDA (Difco) suplementado com higromicina B (100 $\mu g.mL^{-1}$) e incubados a 28º C durante 5 dias. Foi avaliado o número de transformantes estáveis que mantiveram o fenótipo higromicina resistente e também a expressão de fluorescência da proteína verde fluorescente (GFP) sob microscópio óptico de epifluorescência (Zeiss Axiophot-2) sob filtro FITC (459-490 nm).

3.2.1.3.8 Análise dos transformantes por *Southern blot*

A análise por *Southern blot* foi realizada para confirmar a inserção do T-DNA no genoma dos transformantes e determinar o número cópias inseridas. O DNA genômico de 2 transformantes (733 e 570) e da linhagem selvagem 41.1(1) foram clivados com a enzima de restrição *Eco*RI (Invitrogen, Life Technologies) a 10 $U.\mu L^{-1}$. A região do T-DNA do vetor pFAT-gfp apresenta dois sítios de reconhecimento para essa endonuclease, ambos localizados no cassete de expressão do gene de resistência a higromicina B (FITZGERALD et al., 2003). A utilização do gene *gfp* como sonda na análise de *Southern blot*, na ausência de sítios de reconhecimento para a enzima *Eco*RI no cassete de expressão desse gene, resulta na origem de uma única banda de 15 kb a partir da digestão do DNA do vetor pFAT-gfp e uma ou mais bandas de tamanhos variados, dependendo do local da inserção e do número de cópias inseridas.

O DNA genômico dos transformantes e da linhagem selvagem foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Raeder e Broda (1985). A restrição foi feita em um volume total de 250 µL, contendo 10 µg de DNA, 25 µL de tampão React$^{@}$ 3 10X e 40 U da enzima *Eco*RI. A reação foi incubada a 37° C durante 12 horas. Para concentrar a amostra, foi feita uma precipitação adicionando-se 25 µL de acetato de amônio (7,8 M) e 625 µL de álcool absoluto. Após incubação a -20° C por 12 horas, o material foi centrifugado (14.000 rpm por 40 min a 4º C). O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 700 µL de álcool 70%. As amostras foram centrifugadas por mais 10 min (14.000 rpm, 4º C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco a 37º C. Após a secagem, o DNA foi ressuspenso em 32 µL de TE e 8 µL de sacarose 40%. O DNA foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 1% de brometo de etídio (p/v) (1 $mg.mL^{-1}$). Foi utilizado como marcador de peso molecular 40 µL do DNA Ladder 1kb

(0,2 µg.µL^{-1}) (Fermentas). A eletroforese foi realizada a 3 V.cm^{-1} de modo a obter uma corrida lenta.

Após a eletroforese o gel foi submetido a depurinização em solução depurinizante HCl 0,25 M (10 mL de HCl em 490 mL de água ultrapura) por 10 min. Após este período o gel foi lavado com água destilada e transferido para 500 mL de solução desnaturante (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) por 30 min. O gel foi lavado com água destilada e em seguida neutralizado através da incubação por 15 min em 250 mL de solução neutralizadora (Tris-HCl 0,5 M; NaCl 1,5 M; EDTA 0,001 M; pH 7,2), com agitação branda à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido. A transferência do DNA contido no gel para a membrana de náilon (HYBOND-N – AMERSHAM) foi feita por 12 horas em um aparato de transferência tradicional, utilizando-se a solução de transferência SSC 20X (NaCl 3 M; citrato de sódio 0,3 M; pH 7,0). A membrana foi seca por 2 horas em forno a 80º C.

3.2.1.3.9 Extração do plasmídio pFAT-gfp, preparo da sonda e hibridação molecular

Células de *Escherichia coli* transformadas com o vetor pFAT-gfp foram inoculadas em 5 mL de meio LB líquido com espectinomicina 200 µg.mL^{-1} e incubadas a 37º C, 200 rpm, por 12 horas. Posteriormente, foi extraído o plasmídio com uso do kit Mobio (Ultra Clean 6 minute mini plasmid prep kit) conforme orientações do fabricante. O plasmídio de 18,4 kb foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,4% a 3 V.cm^{-1}. Após a eletroforese o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1 mg.mL^{-1})e fotodocumentado.

Um fragmento de DNA de 700 pb apresentando sequência do gene *gfp* foi utilizado como sonda na hibridação. Este fragmento foi obtido por PCR com os iniciadores glGFP5 (5'-GCCGGAATTCATGAGCAAGGGCGAGGAACTGTTC-3') e glGFP3 (5'-GCCGAGCTCAGATCTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'). A marcação da sonda e a hibridação foram realizadas de acordo com as instruções do kit Gene Images™ AlkPhos Direct™ Labelling and Detection System (GE Healthcare).

3.2.1.4 Clonagem e sequenciamento das regiões que flanqueiam o T-DNA

A técnica TAIL-PCR (*Thermal Asymmetic Interlaced Polymerase Chain Reaction*) foi utilizada para identificar as regiões que flanqueiam a inserção do T-DNA de *A. tumefaciens* no genoma dos fungos transformados. Esse método consiste de três reações de amplificações consecutivas, mediante o uso de *primers* específicos para as sequências das bordas do T-DNA conjuntamente com um *primer* arbitrário e degenerado (AD). Foram construídos *primers* específicos para as sequências das bordas esquerda e direita do T-DNA do vetor pFAT-gfp. Os *primers* da borda esquerda foram: LB1-1 (5'-GTCAGCTCCGGCACCTTATCCTTG-3'), LB2-2(5'CCTCGTTACATCAGCTCGCAGCTAC-3') e LB3-1 (5'CGTCCGCATGTGTTATTAAGTTGTC-3'), já os *primers* da borda direita foram os seguintes: RB1 (5'AAGATGGGCAGTCTTTCAGAAGGG-3), RB2-2 (5'-ATCGCAAAGTGAAGTCTTGCTGCC-3') e RB3-2 (5'-CCAAACGTAAAACGGCTTGTCCCGC-3').

A extração do DNA genômico dos transformantes seguiu o protocolo estabelecido por Raeder e Broda (1985). A amplificação por TAIL-PCR seguiu as condições descritas por Mullins et al. (2001). Os *primers* degenerados (AD1, AD2 e AD3) utilizados e os componentes das reações de PCR apresentaram as mesmas condições propostas por Liu et al. (1995). Os produtos das reações terciárias foram purificados do gel de agarose, clonados em plasmídio pGEM-T Easy (Promega, Brasil) e transformados em células de *E. coli* HD5α. Para a amplificação do inserto foram utilizados primers universais M13 na reação de PCR de colônia. As reações de amplificação foram realizada em um volume final de 50 μL, contendo Tampão 1x (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl; pH 8,4), 3,7 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP, 0,05 $U.\mu L^{-1}$ de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 0,2 μM de cada *primer*. As amplificações foram realizadas em termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94º C por 4 min, seguido de 30 ciclos de 94º C por 1 min, 60º C por 1min e 72º C por 2 min, após os ciclos, uma extensão final a 72º C por 10 min. Os fragmentos amplificados foram purificados (Ultra Clean™ PCR Clean-Up Kit, MOBIO Laboratories) e enviados para o Centro de Estudos do Genoma Humano, São Paulo. A região do T-DNA foi removida e as sequências flanqueadoras restantes foram analisadas por meio da ferramenta BLASTx contra a base de dados do GenBank.

3.3 Resultados e discussões

3.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos fungos endofíticos de manguezais do estado de São Paulo

No ensaio de antagonismo, a partir da análise de 344 fungos endofíticos foi possível identificar 18 linhagens produtoras de antibióticos (Tabela 3.1, Figura 3.1), por meio do método de blocos de ágar (ICHIKAWA et al., 1971). Três linhagens apresentaram atividade antimicrobiana contra o patógeno humano gram positivo *S. aureus*, quatro isolados produzem antibióticos contra o patógeno gram negativo *E. coli*, e onze linhagens foram ativas ao fitopatógeno *X. axonopodis citri*. Dentre as linhagens produtoras de antibiótico, 29,41% pertencem ao gênero *Diaporthe*, o qual apresentou alta frequência na comunidade fúngica avaliada (Capítulo 2). Esse gênero tem sido descrito como grande produtor de metabólitos secundários com inúmeras atividades farmacológicas (BILLS et a., 1992; CHEN et al., 2003; DETTARAKUL et al., 2003; PITTAYAKHAJONWUT, 2006) entre elas a antimicrobiana (AGUSTA; OHASHI; SHIBUYA, 2006; BRADY et al., 2000; HUANG et al., 2008; LIN et al., 2005). O fungo *D. phaseolorum* linhagem 41.1(1) apresentou o maior halo de inibição no teste de antibiose (Tabela 3.1), com capacidade de limitar o crescimento do patógeno humano *S. aureus*, e por isso foi selecionado para transformação genética mediante *A. tumefaciens.* A bactéria *S. aureus* vem apresentando resistência aos antibióticos utilizados na prática clínica, inclusive ao antibiótico vancomicina o qual apresenta espectro de ação à esse patógeno. Isso vem ocorrendo devido ao uso indiscriminado de antibióticos favorecendo o aparecimento de linhagens cada vez mais resistentes.

Tabela 3.1 - Fungos endofíticos de manguezais produtores de antibióticos

Isolado	**Identificação**	**Isolamento**	**Órgão**	**Patógeno inibido (concentração do extrato)**	**Tamanho do halo (mm) ***
40.1(1)	*Diaporthales*	Bertioga/verão	Ramo/L	*Staphylococcus aureus*	1,5
39.1(1)	*Diaporthe phaseolorum*	Bertioga/verão	Ramo/R	*Staphylococcus aureus*	1,5
41.1(1)	*Diaporthe phaseolorum*	Bertioga/verão	Folha/L	*Staphylococcus aureus*	4,0
99(3)	*Gibberella moniliformis*	Bertioga/inverno	Folha/L	*Escherichia coli*	3,0
89(3)	*Hypocrea virens*	Bertioga/inverno	Folha/A	*Escherichia coli*	3,0
36(3)	*Colletotrichum gloeosporioides*	Bertioga/inverno	Folha/R	*Escherichia coli*	3,5
60(4)	*Penicillium sp.*	Cananéia/verão	Ramo/L	*Escherichia coli*	3,5
36(3)	*Diaporthe phaseolorum*	Bertioga/inverno	Folha/R	*Xanthomonas axonopodis citri*	1,0
9.3(1)	*Gibberella moniliformis*	Bertioga/verão	Ramo/R	*Xanthomonas axonopodis citri*	2,0
8(3)	*Lasiodiplodia rubropurpurea*	Bertioga/inverno	Ramo/L	*Xanthomonas axonopodis citri*	2,0
29.6(3)	*Neofusicoccum vitifusiforme*	Bertioga/inverno	Ramo/R	*Xanthomonas axonopodis citri*	2,5
101(3)	*Arthothelium spectabile*	Bertioga/inverno	Folha/R	*Xanthomonas axonopodis citri*	1,5
50(3)	*Aspergillus sp.*	Bertioga/inverno	Folha/A	*Xanthomonas axonopodis citri*	2,5
36(4)	*Xylaria allantoidea*	Cananéia/verão	Ramo/R	*Xanthomonas axonopodis citri*	2,0
22(3)	*Aspergillus awamori*	Bertioga/inverno	Folha/R	*Xanthomonas axonopodis citri*	1,0
82(4)	*Aspergillus awamori*	Cananéia/verão	Folha/L	*Xanthomonas axonopodis citri*	1,5
54(4)	*Diaporthe sp.*	Cananéia/verão	Ramo/L	*Xanthomonas axonopodis citri*	1,0
17.5(3)	*Aspergillus awamori*	Bertioga/inverno	Ramo/A	*Xanthomonas axonopodis citri*	2,0

* Atividade antimicrobiana avaliada pela medida do tamanho do halo de inibição observado por meio da técnica bloco de ágar. Os valores são médias de três repetições

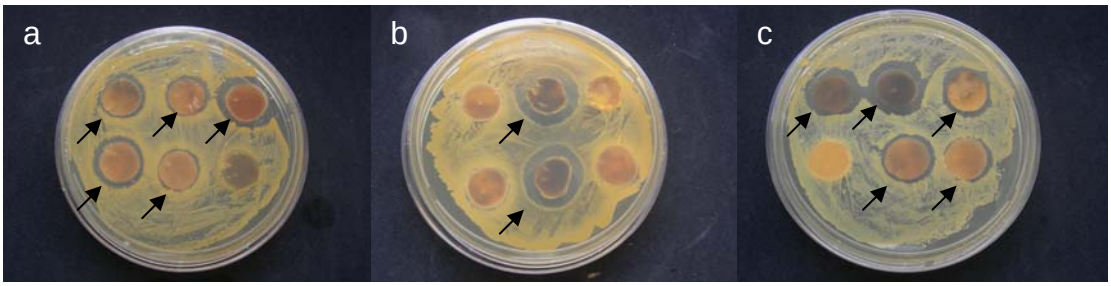

Figura 3.1 – Ensaio de antagonismo das linhagens fúngicas por meio da técnica de bloco de ágar. As setas indicam os halos formados ao redor dos blocos de fungos endofíticos produtores de antibiótico efetivo contra a) *Staphylococcus aureus*, b) *Escherichia coli* e c) *Xanthomonas axonopodis citri*

3.3.2 Transformação genética do fungo endofítico *D. phaseolorum*

3.3.2.1 Sensibilidade de *D. phaseolorum* linhagem 41.1(1) à higromicina B

Antes de iniciar os experimentos de transformação foi testada a resistência da linhagem 41.1(1) ao antibiótico higromicina B em diferentes concentrações (6,25; 12,5; 25; 50; 100, 200 e 400 $\mu g.mL^{-1}$). A concentração de 100 $\mu g.mL^{-1}$ do antibiótico inibiu totalmente (concentração mínima inibitória) o crescimento da linhagem, sendo assim, essa concentração foi adotada para a seleção dos transformantes nos ensaios de agrotransformação.

3.3.2.2 Transformação genética de *D. phaseolorum* mediada por *A. tumefaciens*

Inicialmente, as condições de transformação foram avaliadas em busca de maior eficiência de transformação, uma vez que não há relatos sobre o sistema de transformação para o o fungo *D. phaseolorum*. Foram obtidas colônias resistentes ao antibiótico higromicina após 5 a 30 dias de crescimento em meio de cultivo seletivo (Figura 3.2). A presença de acetoseringona durante o cultivo da bactéria e no co-cultivo foi essencial para a formação de colônias transformadas, já que na ausência de acetoseringona não foi obtido nenhum transformante. A importância do uso desse composto fenólico se deve a indução de genes de virulência da *Agrobacterium* durante a transformação (GORFER et al., 2007; MATA et al., 2007; MICHIELSE et al., 2005; MIKOSCH et al., 2001; ZHONG et al., 2007; WANG; LI, 2008). A acetoseringona inicia o processo de transferência e integração do T-DNA no genoma da célula hospedeira (SUGUI; CHANG; KNOW-CHUNG, 2005). Entretanto, para alguns fungos a acetoseringona não está relacionada com o aumento da eficiência da transformação (COMBIER et al., 2003; KARUNAKARAN et al., 2008; MICHIELSE et al., 2005; MULLINS et al., 2001). Embora a temperatura de 28º C seja ótima para o crescimento da *A. tumefaciens*, essa temperatura não é apropriada para a transferência de T-DNA (SUGUI; CHANG; KNOW-CHUNG, 2005; WANG; LI, 2008). Tem sido proposto que a maquinaria de transferência do T-DNA seja afetada pela temperatura. A temperatura que tem sido indicada pela literatura é a de 25º C para o período de interação entre célula bacteriana e fúngica (WANG; LI, 2008). Outro fator que influencia na frequência da transformação é a idade do material fúngico utilizado na

transformação. Culturas fúngicas mais velhas apresentam menor eficiência na transformação (MICHIELSE et al., 2005; SULLIVAN et al., 2002). Portanto no presente trabalho foi utilizado micélio novo com 8 horas de crescimento para interagir com a *A. tumefaciens*.

Três parâmetros de co-cultivo foram avaliados quanto à eficiência de transformação. A análise de variância (ANOVA) para os fatores de variação: tempo de co-cultivo (24 e 48 horas), concentração de acetoseringona (200 e 400 μM) e tipo de membrana (nitrocelulose e papel de filtro), foi realizada a partir dos dados de frequência fúngica e os resultados estão listados na Tabela 3.2. Há muitos relatos sobre a descrição dos diferentes fatores sendo determinantes na eficiência de agrotransformação (CARDOZA et al., 2006; DE GROOT et al., 1998; LI et al., 2005; MICHIELSE et al., 2005; VIJN; GOVERS, 2003; ZEILINGER, 2004; ZHONG et al., 2007). De maneira geral, todas as condições testadas foram capazes de dar origem a colônias transformadas e com a mesma eficiência de transformação.

Muitos trabalhos indicam que a duração do período de co-cultivo interfere na eficiência da agrotransformação. O co-cultivo por 48 horas é utilizado em muitos fungos (DE GROOT et al., 1998; KARUNAKARAN et al., 2008; LEAL et al., 2004; MICHIELSE et al., 2005; MULLINS et al., 2001; RHO; KANG; LEE, 2001; ZHONG et al., 2007). Para alguns fungos, a extensão desse período gera maior número de transformantes (COMBIER et al., 2003; KARUNAKARAN, et al., 2008; ZHANG et al., 2008). Entretanto, o aumento da extensão do período de co-cultivo tem sido associado a integração múltipla de T-DNA (RHO; KANG; LEE, 2001). No presente trabalho a análise do período de co-cultivo de 24 e 48 horas apresentaram a mesma eficiência. Outro parâmetro investigado em muitos estudos é o tipo de membrana utilizado na transformação, tais como, celofane, nitrocelulose, náilon, e papel de filtro. As propriedades químicas das membranas e o diâmetro dos poros podem estar relacionados com a interação entre célula bacteriana e fúngica, interferindo desse modo na eficiência da agrotransformação (SUGUI; CHANG; KNOW-CHUNG, 2005; ZEILINGER, 2004). O aumento da concentração de acetoseringona, representa em muitos estudos, um efeito positivo sobre o número de transformantes recuperados (FANG et al., 2004; TSUJI et al., 2003). Entretanto, no presente trabalho não houve diferença significativa no número de transformantes obtidos quando foram testados diferentes concentrações de acetoseringona e tipos de membranas. A eficiência das transformações obtidas no primeiro e segundo experimento foi de 6,0 e 6,25 transformantes,

respectivamente. Esses valores não foram estatisticamente diferentes como mostrados na Tabela 3.2.

Figura 3.2 - Transformantes de *D. phaseolorum* crescendo em meio seletivo (placa à direita) contendo 100 µg.mL^{-1} de higromicina B e placa controle sem acetoseringona (placa à esquerda)

Tabela 3.2 - ANOVA para os fatores tempo de co-cultivo (24 e 48 horas), membrana (papel de filtro e nitrocelulos) e concentração de acetoseringona (200 e 400 µM)

Fator de variação	**GL**	**SQ**	**QM**	**F**	**P > F**
Repetição	4	0,05652210	0,01413053	1,59	0,2054 ^{ns}
Tempo de co-cultivo	1	0,00141254	0,00141254	016	0,6935 ^{ns}
Membrana	1	0,00002753	0,00002753	0,00	0,9561 ^{ns}
Temperatura*membrana	1	0,02024531	0,02024531	2,27	0,1429 ^{ns}
Acetoseringona	1	0,00993129	0,00993129	1,11	0,3000 ^{ns}
Interação temperatura*acetoseringona	1	0,06372215	0.,06372215	7,15	0,0123 ^{ns}
Interação membrana*acetoseringona	1	0,03574833	0,03574833	4,01	0,0549 ^{ns}
Interação temperatura*membrana*acetoseringona	1	0,03169777	0,03169777	3,56	0,0696 ^{ns}

^{ns} - indica que não existe diferença significativa entre os valores de F encontrados e os valores da tabela F (PEARSON; HARTLEY, 1966) a 1 % de probabilidade

As condições mais rápidas e baratas foram adequadas para a transformação de *Diaporthe phaseolorum,* sendo que os experimentos de transformação subsequentes foram realizados adotando-se o papel de filtro como membrana, a menor concentração de AS (200µM), e 24 horas de co-cultivo. Considerando as condições de transformação previamente determinadas foram obtidos 520 transformantes do endófito *D. phaseolorum* resistentes ao antibiótico higromicina B. Essas condições de agrotransformação podem ser utilizadas em estudos que buscam identificar genes envolvidos com o potencial biotecnológico do fungo *D. phaseolorum*.

3.3.2.3 Análises dos transformantes relacionadas à estabilidade mitótica e expressão de GFP

Após 5 gerações sucessivas em meio não seletivo, ausência de higromicina B, micélio resultante da última passagem foi cultivado em placas com meio BDA suplementado com 100 $\mu g.mL^{-1}$ de higromicina B. Dos transformantes avaliados, 100% mantiveram o fenótipo de resistência à higromicina B e emissão de fluorescência verde (observação em microscópio de epifluorescência sob filtro FITC – 459 a 490 nm). Essa análise dos transformantes mostrou que a integração do T-DNA no genoma do fungo *D. phaseolorum* é mitoticamente estável. A alta porcentagem de estabilidade mitótica têm sido reportada em trabalhos com diferentes espécies de fungos transformados via *Agrobacterium* (GORFER et al., 2007; MARTINO et al., 2007; MICHIELSE et al., 2005; MIKOSCH et al., 2001; WANG; LI, 2008).

Os vinte transformantes que foram escolhidos de forma aleatória para o teste de estabilidade mitótica, também foram analisados por microscopia óptica de epifluorescência (sob filtro FITC – 459 a 490 nm) (Figura 3.3). As análises confirmaram a expressão do gene GFP nas estruturas dos transformantes e a ausência da emissão de fluorescência verde no micélio da linhagem selvagem. A expressão de GFP foi observada na parede das hifas, e no citoplasma podendo representar núcleos (Figura 3.3), como já descrito na literatura em outros fungos (MULLER et al.,2006; RODRIGUEZ-TOVAR et al., 2005).

A

B

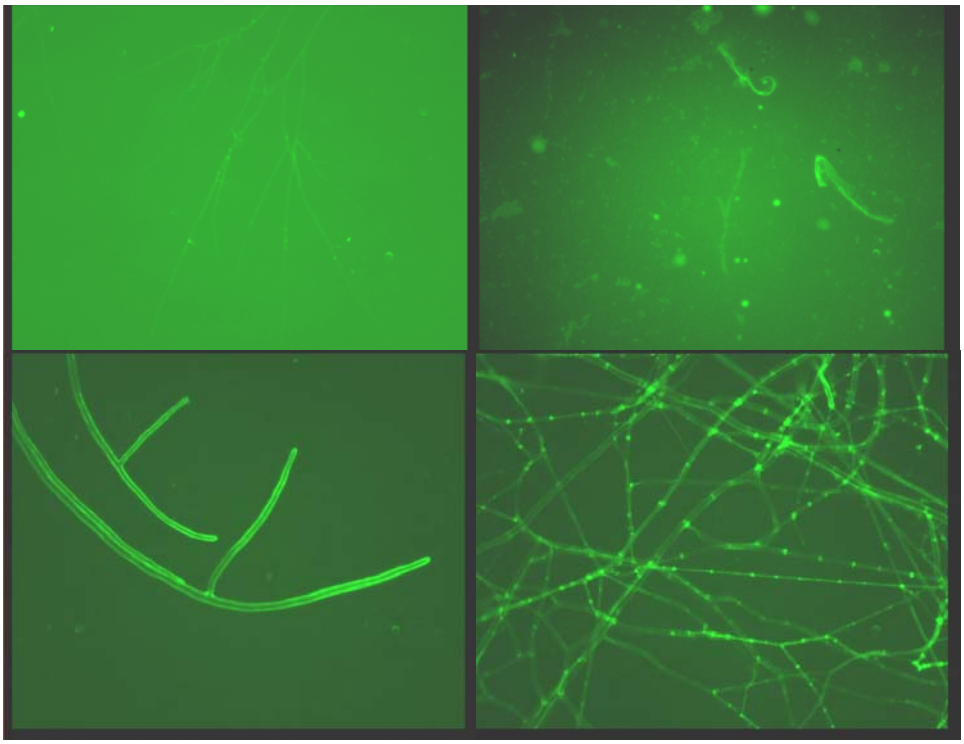

Figura 3.3 - Análise de microscopia óptica de epifluorescência sob filtro FITC (459-490nm). (**A)** Micélio da linhagem selvagem de *Diaporthe phaseolorum* 41.1(1) não emite fluorescência sob luz ultravioleta. **(B)** Micélio da linhagem transformada 25 emite fluorescência. Forte fluorescência pode ser observada em toda a parede das hifas (foto à esquerda) e citoplasma (foto à direita)

3.3.2.4 Confirmação da transformação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Amplificação por PCR foi utilizada para confirmar a presença do gene *gfp* do plasmídio pFAT-gfp. Para essa análise foram selecionados de forma aleatória oito transformantes resistentes a higromicina B e mitoticamente estáveis. Com o uso do par de iniciadores glGFP5 e glGFP3 foi amplificado um fragmento de aproximadamente 700 pb, correspondente ao gene *gfp,* a partir do DNA genômico dos transformantes e do vetor pFAT-gfp, entretanto ausente na linhagem selvagem 41.1(1) de *D. phaseolorum* (Figura 3.4).

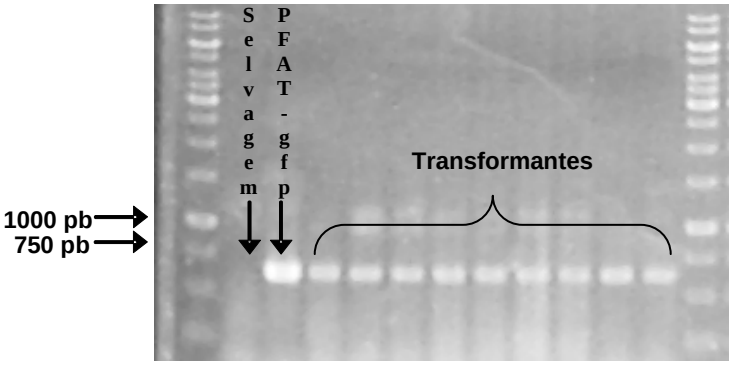

Figura 3.4 – Produtos de amplificação do gene *gfp* utilizando os iniciadores glGFP5 e glGFP3. A linhagem selvagem 41.1(1) não apresentou amplificação da banda de 700 pb correspondente ao gene *gfp*. O vetor pFAT-gfp foi utilizado como controle positivo. DNA amplificado dos transformantes escolhidos de forma aleatória confirma a presença do gene *gfp*. As laterais do gel de agarose são constituídas pelo marcador de peso molecular DNA Ladder 1Kb (Fermentas)

3.3.2.5 Análise dos transformantes por *Southern blot*

A determinação do número de cópias inseridas do T-DNA foi avaliada por meio da técnica de *Southern blot*, utilizando como sonda um fragmento de 700 pb do gene *gfp*. Foram analisados dois transformantes que apresentaram a síntese de antibiótico interrompida (733 e 570). A integração de cópia única de T-DNA geralmente é preferida, pois permite associar um fenótipo observado com a alteração em um loci único no genoma (KARUNAKARAN, et al., 2008; MICHIELSE et al., 2005). A análise de *Southern blot* revelou que os dois transformantes avaliados apresentaram inserções de cópia única do T-DNA. A linhagem selvagem não mostrou nenhum sinal de hibridização, já o vetor pFAT-gfp apresentou fragmento hibridizado pela sonda do gene *gfp* representado por uma banda próxima de 15 kb (Figura 3.6).

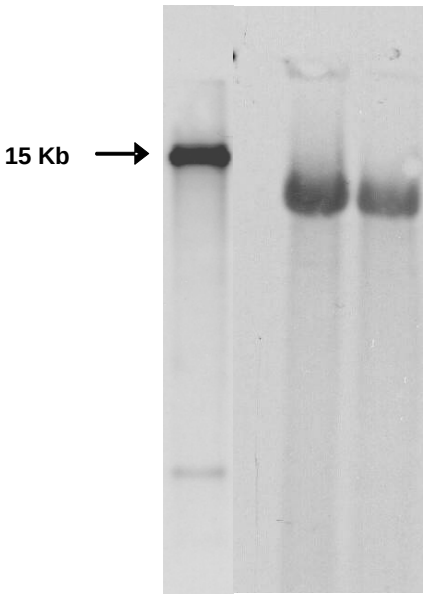

Figura 3.6 - Hibridização de *Southern blot* de dois transformantes de *D. phaseolorum*. Cerca de 10 µg de DNA genômico dos isolados foi clivado com a enzima de restrição *Eco*RI, corrido em gel de agarose 0,8%, transferido para membrana de náilon e hibridizado com fragmento de 700 pb do gene *gfp*. Analisando o gel da direita para a esquerda a primeira mostra representa o vetor pFAT-gfp; segunda amostra representa a linhagem selvagem de *D. phaseolorum* 41.1(1); as duas últimas amostras representam linhagens transformadas (733 e 570**)**

Há muitos relatos na literatura sobre a integração de cópia única de T-DNA em transformantes fúngicos obtidos via *Agrobacterium tumefaciens* (KARUNAKARAN et al., 2008; MEYER et al., 2003; MICHIELSE et al., 2005; MIKOSCH et al., 2001; SUGUI; CHANG; KNOW-CHUNG, 2005; ZHANG et al., 2008; WANG; LI, 2008), indicando que uma única cópia do gene de seleção, por exemplo à higromicina, é suficiente para conferir resistência ao micélio heterocariótico (MIKOSCH et al., 2001). A integração aleatória de cópia única de T-DNA é uma condição importante para os estudos sobre a identificação de genes interrompidos de importância biotecnológica como os que atuam na via de biossíntese de antibióticos. Os dados apresentados nesse trabalho sugerem que a agrotransformação é um método eficiente para conduzir a mutagênese insercional aleatória do fungo *D. phaseolorum* em estudos de genômica funcional.

3.3.3 Teste de antagonismo

Foi avaliada a atividade antimicrobiana de 520 transformantes gerados nos ensaios de agrotransformação, por meio da técnica de bloco de gelose, a fim de identificar os isolados que

apresentaram a inserção do T-DNA em alguma sequência relacionada com a via de biossíntese de antibiótico. A síntese de antibiótico foi interrompida em 31 transformantes (Figura 3.5).

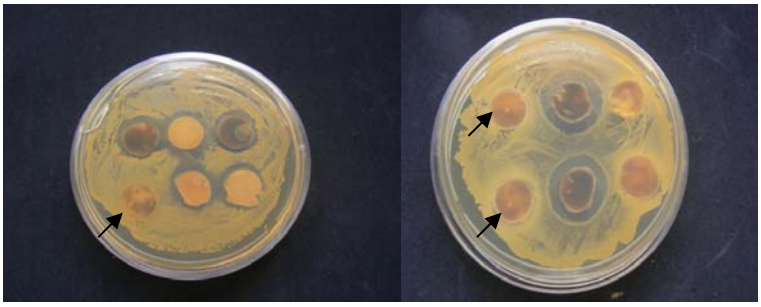

Figura 3.5 - Ensaio de antagonismo com os agrotransformantes utilizando a técnica de bloco de ágar. Transformantes que tiveram a síntese de antibiótico interrompida estão indicados nas setas. A linhagem selvagem 41.1(1) foi utilizada como controle positivo e bloco de ágar sem o fungo foi utilizada como controle negativo

3.3.4 Análise das sequências flanqueadoras do T-DNA por TAIL-PCR

A técnica TAIL-PCR foi utilizada para identificar as sequências que flanqueiam os sítios de inserção do T-DNA em 31 transformantes que perderam a atividade antimicrobiana, a fim de identificar os genes que atuam na via de biossíntese do antibiótico ácido 3-hidroxipropiônico. Dentre os 31 transformantes não inibidores, 25 apresentaram produtos de amplificação por meio da técnica TAIL-PCR, entretanto apenas 15 transformantes apresentavam produtos de PCR únicos. Os produtos amplificados apresentavam de 250 a 2000 pb. Esses produtos de PCR de cópia única foram clonados, transformados e sequenciados para determinação das sequências que flanqueiam o T-DNA inserido no genoma dos agrotransformantes que perderam a atividade antimicrobiana.

A análise das sequências que flanqueiam o T-DNA dos mutantes de *D. phaseolorum* negativos para a síntese de antibiótico está descrita na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - A análise das sequências que flanqueiam o T-DNA dos mutantes de *D. phaseolorum* negativos para a síntese de antibiótico

Transformante	BlastX	Domínios conservados da proteína
533	Proteína hipotética NIH2624 (*Aspergillus terreus*); XP001212781; E value:9e-19, Ident.:56%.	Domínio conservado TrkA envolvido no transporte de K^+
490	Flavonol 6-hidroxilase (*Chrysosplenium americanum*); AAU04696; E value: 0.60; Ident.: 84%.	Super família 2OG-FeII Oxi catalisa a reações de L-prolina Procolageno + 2-oxoglutarato + O_2
375	Ceto redutase (bactéria de solo V167); ACX83621; E value: 0.47; Ident.: 36%	Super família NADB Rossmann: domínio NADB é encontrado em muitas dehidrogenases como glicolisis, e muitas outras enzimas redox.
623	Sintase Antranilato (*Aspergillus nidulans* FGSC A4); CBF89063; E value: 3e-07; Ident.: 76%.	Domínio conservado IGPS: Indol-3-glicerol fosfato sintase: enzima da via de biossíntese de triptofano
347	Lipoxigenase (*Capsicum annuum*); CAQ58078; E value: 0,80; Ident.: 45%.	Super família PLAT: esse domínio facilita o acesso a membrana
636	α-kinase 2 (*Taeniopygia guttata*); XP_002186785; E value: 8.6; Ident.: 35%.	Super família alfa-kinases: atua na translação de proteínas, homeostase de Mg^{2+}, transporte intracelular, migração celular, adesão e proliferação
423	Proteína hipotética TTHERM_00763060 (*Tetrahymena thermophila*); XP_001025364; E value: 2.3; Ident.: 35%.	-

A análise de *Southern blot* mostrou que os transformantes 733 e 570 apresentaram uma única cópia do T-DNA inserida no seu genoma indicando que a perda da atividade antimicrobiana pode estar relacionada com a inserção de T-DNA em genes relacionados com a síntese de antibióticos. Entretanto, as regiões que flanqueiam o T-DNA inserido nesses transformantes estão sendo seqüenciadas e serão avaliadas futuramente. As sequências avaliadas até o momento (Tabela 3.3) apresentaram similaridade com proteínas hipotéticas (transformante 533 e 423) envolvidas com o transporte do íon inorgânico K^+ e com função desconhecida respectivamente. Já as outras cinco linhagens avaliadas apresentaram similaridade com sequências de proteínas de domínios conservados envolvidos com inúmeras funções, tais como, translação de proteínas, homeostase do íon orgânico Mg^{2+}, transporte intracelular, migração, adesão e proliferação celular. Entretanto, para que o fenótipo observado nesses transformantes seja associado com as sequências amplificadas por TAIL-PCR torna-se necessário avaliá-los via *Southern blot* para determinar se a inserção do T-DNA foi única.

3.4 Conclusão

O presente trabalho permitiu estabelecer um protocolo de transformação genética para o fungo *D. phaseolorum* pelo sistema *A. tumefaciens* tornando possível o uso dessa ferramenta para estudos de mutagênese insercional aleatória visando a identificação de genes de importância biotecnológica, como aqueles relacionados com a biossíntese de antibióticos. Análise mediante TAIL-PCR permitiu identificar proteínas de domínios conservados envolvidas com diferentes funções como, translação de proteínas, homeostase do íon orgânico Mg^{2+}, transporte intracelular, migração, adesão e proliferação celular. Além disso, foi possível selecionar linhagens com potencial para a produção de antibiótico, sendo que dentre as linhagens produtoras 29,41% pertencem ao gênero *Diaporthe*, o qual foi o gênero dominante na comunidade fúngica avaliada.

Referências

AGUSTA, A.; OHASHI, K.; SHIBUYA, H. Bisanthraquinone metabolites produced by the endophytic fungus *Diaporthe sp*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 54, p. 579-582, 2006.

AMEY, R.C.; ATHEY-POLLARD, A.; BURNS, C.; MILLS, P.R.; BAILEY, A.; FOSTER, G. D. PEG-mediated and *Agrobacterium*-mediated transformation in the mycopathogen Verticillium fungicola. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 4-11, 2002.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; SOBRAL, J.K.; LACAVA, P. T. **Manual:** isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: CALQ, 2002. 86 p.

BERGMANN, S.; SCHUMANN, J.; SCHERLACH, K.; LANGE, C.; BRAKHAGE, A.A.; HERTWECK, C. Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. **Nature Chemical Biology**, London, v. 3, p. 213-217, 2007.

BILLS, G.F.; GIACOBBE, R.A.; LEE, S.H.; PELAEZ, F.; TKACZ, J.S. Tremorgenic mycotoxinas, paspalitrem A and C, from a tropical *Phomopsis*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, p. 977-983, 1992.

BRADY, S.F.; WAGENAAR, M.M.; SINGH, M.P.; JANSO, J.E.; CLARDY, J. The cytosporones, new osctacetide antibiotics isolated from an endophytic fungus. **Organic Letters**, Washington, v. 2, p. 4043-4046, 2000.

BRAKHAGE, A.A.; CARUSO, M.L. Biotechnical genetics of antibiotic biosynthesis. In:_____ **The Mycota** II Genetic and Biotechnology. London: Springer-Verlag, 2004. chap. 4, p. 317-353.

BRAKHAGE, A.A.; SCHUEMANN, J.; BERGMANN, S.; SCHERLACH, K.; SCHROECKH, V.; HERTWECK, C. Activation of fungal silent gene cluster: a new avenue to drug discovery. **Progress in Drug Research**, Basel, v. 66, p. 3-12, 2008.

BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P. J.J. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the Saccharomyces cerevisiae genome by illegitimate recombination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 26, p. 15272-15275, 1996.

COMBIER, J.P.; MELAYAH, D.; RAFFIER, C.; GAY, G.; MARMEISSE, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 220, p. 141-148, 2003.

CAMPOY, S.; PEREZ, F.; MARTIN, J.F.; GUTIERREZ, S.; LIRAS, P. Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Current Genetics**, Berlin, v. 43, p. 447-452, 2003.

CARDOZA, R.E.; VIZCAINO, J.A.; HERMOSA, M.R.; MONTE, E.; GUTIÉRREZ, S.A comparison of the phenotypic and genetic stability of recombinant *Trichoderma* spp. generated by protoplast- and *Agrobacterium*-mediated transformation. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 44, p. 383-395, 2006.

CHEN, G.; LIN, Y.; WEN, L.; VRIJMOED, L.L.P.; JONES, E.B. G. Two new metabolites of a marine endophytic fungus from an estuarine mangrove on the South China Sea coast. **Tetrahedron**, Oxford, v. 59, p. 4907-4909, 2003.

COVERT, S.F.; KAPOOR, P.; LEE, M.; BRILEY, A.; NAIRN, C.J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 259-264, 2001.

DAI, J.; KROHN, K.; FLOERKE, U.; GEHLE, D.; AUST, H.J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; RHEINHEIMER, J. Novel highly substituted biraryl ethers, phomopsines D-G, isolated from endophytic fungus *Phomopsis sp.* from *Adenocarpus foliolosus*. **European Journal Organic Chemistry**, Weinheim, v. 23, p. 5100-5105, 2005.

DE GROOT, M.J.A.; BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P.J.J.; BEIJERSBERGEN, A.G.M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. **Nature Biotechnology**, New York, v. 16, p. 839-842, 1998.

DETTRAKUL, S.; KITTAKOOP, P.; ISAKA, M.; NOPICHAI, S.; SUYARNSESTAKORN, C.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Antimycobacterial Pimarane Diterpenes from the fungus *Diaporthe sp*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 13, p. 1253-1255, 2003.

ELSAESSER, B.; KROHN, K.; FLOERKE, U.; ROOT, N.; AUST, H. J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; ANTUS, S.; KURTAN, T. X ray structure determination absolute configuration and biological activity of phomoxanthone A. **European Journal Organic Chemistry**, Weinheim, v. 21, p. 4563-4570, 2005.

FANG, W.; ZHANG, Y.; YANG, X.; ZHENG, X.; DUAN, H.; LI, Y.; PEI, Y. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection marker. **Journal Invertebral Pathology**, New York, v. 85, p. 18-24, 2004.

FITZGERALD, A.M.; MUDGE, A.M.; GLEAVE, A.P.; PLUMMER, K.M. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 803-810, 2003.

GORFER, M.; KLAUBAUF, S.; BANDIAN, D.; STRAUSS, J. *Cadophora finlandia* and *Phialocephala fortinii*: *Agrobacterium*-mediated transformation and functional GFP expression. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, p. 850-855, 2007.

HORN, W.S.; SCHWARTZ, R.E.; SIMMONDS, M.S.J.; BLANEY, W.M. Isolation and characterization of phomodiol, new antifungal from *Phomopsis*. **Tetrahedron**, Oxford, v. 35, p. 6037-6040, 1994.

HORN, W.S.; SIMMONDS, M.S.J.; SCHWATZ, R.E.; BLANEY, W.M.; Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis sp*. **Tetrahedron**, Oxford, v. 51, p. 3969-3978, 1995.

HUANG, Z.; CAI, X.; SHAO, C.; SHE, Z.; XIA, X.; CHEN, Y.; YANG, J.; ZHOU, S.; LIN, Y. Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis sp.* ZSU-H76. **Phytochemistry**, Netherlands, v. 69, p. 1604-1608, 2008.

ICHIKAWA, T.; DATE, M.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and protroph method. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 16, p. 218-224, 1971.

ISAKA, M.; JATURAPAT, A.; RUKSEREE, K.; DANWISETHANJANA, K.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Phomoxanthones A and B, novel xanthone dimmers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. **Journal Natural Products**, Washington, v. 64, p. 1015-1018, 2001.

KARUNAKARAN, M.; NAIR, V.; RHO, H.; CHOI, J.; KIM, S.; LEE, Y. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation in *Colletotrichum falcatum* and *C. acutatum*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 18, p. 234-241, 2008.

KOBAYASHI, H.; MEGURO, S.; YOSHIMOTO, T.; NAMIKOSHI, M. Absolute structure, biosynthesis, and anti-microtubule activity of phomopsidin, isolated from a marine derived fungus *Phomopsis sp*. **Tetrahedron,** Oxford, v. 59, p. 455-459, 2003.

LEAL, C.V.; MONTES, B.A.; MESA, A.C.; RUA, A.L.; CORREDOR, M.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, Philadelphia, v. 42, p. 391-395, 2004.

LI, M.; GONG, X.; ZHENG, J.; JIANG, D.; FU, Y.; HOU, M. Transformtion of *Coniothyrium minitans*, a parasite of *Sclerotinia sclerotiorum*, with *Agrobacterium tumefaciens*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdan, v. 243, p. 323-329, 2005.

LIN, X.; HUANG, Y.; FANG, M.; WANG, J.; ZHENG, Z.; SU, W. Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungi, *Diaporthe sp*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdan, v. 251, p. 53-58, 2005.

MARTINO, E.; MURAT, C.; VALLINO, M.; BENA, A.; PEROTTO, S.; SPANU, P. Imaging mycorrhizal fungal transformants that express e GFP during ericoid endosymbiosis. **Current Genetics**, Berlin, v. 52, p. 65-75, 2007.

MATA, M.M.; TANIWAKI, M.H.; IAMANAKA, B.T.; SARTORI, D.; OLIVEIRA, A.L.M.; FURLANETO, M.C.; FUNGARO, M.H.P. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, p. 148-151, 2007.

MEYER, V.; MUELLER, D.; STROWIG, T.; STAHL, U. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. **Current Genetics**, Berlin, v. 43, p. 371-377, 2003.

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi – Progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, p. 177-185, 2007.

MICHIELSE, C.B.; HOOYKAAS, P.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.; RAM, A.F. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Current Genetics**, Berlin, v. 48, p. 1-17, 2005.

VIJN, I.; GOVERS, F. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, p. 459-467, 2003.

MIKOSCH, T.S.; LAVRIJSSEN, B.; SONNENBERG, A.S.; VAN GRIENSVEN, L.J. Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. **Current Genetics**, Berlin, v. 39, p. 35-39, 2001.

MORIOKA, L.R.; FURLANETO, M.C.; BOGAS, A.C.; POMPERMAYER, O.S.; DUARTE, R. T.; CARNEIRO, M.L.; WATANABE, M.A.E.; FUNGARO, M.H.P. Efficient genetic transformation system for the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. **Current Microbiology**, New York, v. 52, p. 469-472, 2006.

MULLER, T.; BENJDIA, M.; AVOLIO, M.; VOIGT, B.; MENZEL, D.; PARDO, A.; FROMMER, W.B.; WIPF, D. Functional expression of the Green fluorescent protein in the ectomycorrhizal model fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 16, p. 437-442, 2006.

MULLINS, E.D.; CHEN, X.; ROMAINE, C.P.; RAINA, R.; GEISER, D.M.; KAMG, S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. **Phytopathology**, Lancaster, v. 91, p. 173-180, 2001.

PITTAYAKHAJONWUT, P.; DRAMAE, A.; MADLA, S.; LARTPORNMATULEE, N.; BOONYUEN, N.; TANTICHAROEN, M. Depsidones from the endophytic fungus BCC 8616. **Journal Natural Products**, Washington, v. 69, p. 1361-1363, 2006.

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

RHO, H.S.; KANG, S.; LEE, H. Y. *Agrobacterium tumefaciens* mediated-transformation of the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecules and Cells**, London, v. 12, p. 407-411, 2001.

RODRÍGUEZ-TOVAR, A.V.; RUIZ-MEDRANO, R.; HERRERA-MARTÍNEZ, A.; BARRERA-FIGUEROA, B.E.; HIDALGO-LARA, M.E.; REYES-MÁRQUEZ, B.E.; CABRERA-PONCE, J.L.; VALDÉZ, M.; XOCONOSTLE-CÁZARES, B. Stable genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 63, p. 45-54, 2005.

SUGUI, J.A.; CHANG, Y.U.; KNOW-CHUNG, K.J. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption. **Applied and environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1798-1802, 2005.

SULLIVAN, T.D.; ROONEY, P.J.; KLEIN, B.S. *Agrobacterium timefaciens* integrates trsnsfers DNA into single chromosomal sites of dimorphic fungi and yields homokariotics progeny from multinucleate yeast. **Eukaryot Cell**, New York, v. 1, p. 895-905, 2002.

TSUJI, G.; FUJII, S.; FUJIHARA, N.; HIROSE, C.; TSUGE, S.; SHIRAISHI, T.; KUBO, Y. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation for random insertional mutagenesis in *Colletotrichum lagenarium*. **Journal Genetics Plant Pathology**, Tokyo, v. 69, p. 230-239, 2003.

WALKERPEACH, C. R.; VELTEN, J. *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. In: GELVIN, S. B.; SCHILPEROORT, R. A. (Ed.). **Plant molecular biology manual**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994, p. 1-19.

WANG, J.; LI, H. *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of the phytopatogenic fungus *Penicillium digitatum*. **Journal of Zhejiang University Science**, Hangzhou, v. 10, p. 823-828, 2008.

WELD, R.J.; PLUMMER, K.M.; CARPENTER, M.A.; RIDGWAY, H.J. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. **Cell Research**, New York, v. 16, p. 31-44, 2006.

WELLS, J.M.; CUTLER, H.G.; COLE, R.J. Toxicity and plant growth regulator effects of cytochalasin H isolated from *Phomopsis sp*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 22, p. 1137-1143, 1976.

WRIGLEY, S.K.; SADEGHI, R.; BAHL, S.; WHITING, A.J.; AINSWORTH, A.M.; MARTIN, S.; KATZER, W.; FORD, R.; KAU, D.A.; ROBINSON, N.; HAYES, M.A.; ELCOCK, C.; MANDER, T.; MOORE, M.J. A novel (6S)-4,6-dimethyldodeca-2E,4E-dienoyl ester of phomalactone and related α-pyrone esters from a *Phomopsis sp*. with cytokine production inhibitory activity. **Journal Antibiotic**, New York, v. 52, p. 862-872, 1999.

ZHANG, P.; XU, B.; WANG, Y.; LI, Y.; QIAN, Z.; TANG, S.; HUAN, S.; REN, S. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the fungus *Penicillium marneffei*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, p. 943-949, 2008.

ZEILINGER, S. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. **Current Genetics**, Berlin, v. 45, p. 54-60, 2004.

ZHONG, Y.H.; WANG, X.L.; WANG, T.H.; JIANG, Q. *Agrobacterium*-mediated transformation (AMT) of *Trichoderma reesei* as an efficient tool for random insertional mutagenesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 73, p. 1348-1354, 2007.

4 IDENTIFICAÇÃO DO ANTIBIÓTICO ÁCIDO 3-HIDROXIPROPIÔNICO PRODUZIDO PELO FUNGO ENDOFÍTICO *Diaporthe phaseolorum* POR MEIO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Resumo

Os fungos são conhecidos como uma rica fonte de princípios ativos provenientes do seu metabolismo secundário. Nos últimos anos, há interesse crescente nos estudos sobre a identificação de produtos de importância farmacêutica e agronômica produzidos por fungos endofíticos, uma vez que um grande número de estruturas químicas inéditas tem sido isolada a partir desses microrganismos. Fungos de ambiente marinho crescem em um habitat de condições únicas e extremas que podem contribuir para a ativação de vias metabólicas de síntese de compostos com novas estruturas. A produção destes metabólitos pode favorecer a adaptação do fungo no ecossistema marinho, pois pode permitir a sobrevivência do microrganismo no seu nicho ecológico. Assim, o presente trabalho teve como objetivos: a) identificar a estrutura química do antibiótico produzido pelo fungo endofítico *Diaporthe phaseolorum* linhagem 41.1(1) mediante técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas e b) modificar a estrutura química do antibiótico identificado por meio de reação química de esterificação de Fischer-Speier em meio ácido na presença de etanol para avaliar a relação da estrutura química e atividade biológica desse composto. Os resultados mostraram que o antibiótico ácido 3-hidroxipropiônico isolado, purificado e identificado nesse estudo, apresentou atividade frente a dois patógenos humanos *Staphylococcus aureus* e *Salmonella tiphy*. O produto final da reação química de esterificação do antibiótico ácido 3-hidroxipropiônico (3-hidroxipropionato de etila) apresentou ausência de atividade antimicrobiana, indicando que o grupo hidroxila, removido na reação é importante na atividade farmacológica desse composto. Este é o primeiro relato sobre a atividade antimicrobiana do composto ácido 3-hidroxipropiônico.

Palavra-chave: Fungo; Endofítico; Antibiótico; Ressonância Magnética Nuclear; *Diaporthe phaseolorum*; Esterificação de Fischer-Speier

4 IDENTIFICATION OF THE ANTIBIOTIC 3-HYDROXIPROPIONIC ACID PRODUCED BY THE ENDOPHYTIC FUNGUS *Diaporthe phaseolorum* BY ESPECTROSCOPICAL TECHNIQUES OF NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE AND MASS ESPECTROPHOTOMETRY

Abstract

Fungi are considered a rich source of active compounds resulting from their secondary metabolism. Lately, there has been an increasing interest on studies regarding endophytic fungi molecules showing pharmaceutical and agronomic properties, since a vast number of new molecules have been isolated from these microorganisms. Fungi from marine environment grow in a habitat with unique conditions that can contribute to the activation of metabolic pathways of synthesis of different unknown molecules. The production of these compounds may support the adaptation and survival of the fungi in the marine ecosystem. This study aimed to: a) identify the antibiotic produced by the endophytic fungi *Diaporthe phaseolorum* strain 41.1(1), using the spectroscopic techniques of nuclear magnetic resonance and mass spectrometry; and (b) modify the chemical structure of the identified antibiotic by the chemical reaction of Fischer-Speier sterification in an acid medium with ethanol, in order to analyze the chemical structure and the biological activity of this compound. The results showed that the antibiotic 3-hydroxipropionic acid, which was purified and identified in this study, presented activity against two human pathogens, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella tiphy*. The final product of the chemical reaction of sterification of the 3-hydroxipropionic acid (3-hydroxipropionate of etil) had no antibiotic activity, suggesting that the hydroxil group, which was removed in the chemical reaction, is important to the antibiotic activity of this molecule. This is the first report on the antibiotic activity of the 3-hydroxipropionic acid molecule.

Keywords: Fungi; Endophytic; Antibiotic; Nuclear Magnetic Resonance; *Diaporthe phaseolorum*; Sterification of Fischer-Speier

4.1 Introdução

A produção de metabólitos secundários úteis para a indústria farmacêutica e agronômica é comum entre os fungos endofíticos (DAVIS et al., 2005; KUMAR et al., 2004; SURYANARAYANAN et al., 2009). O princípio ativo antitumoral taxol, descoberto inicialmente em plantas do gênero *Taxus*, pode ser produzido por muitos gêneros de fungos endofíticos como *Alternaria, Fusarium, Monochaetia, Pestalotia*, *Pestalotiopsis, Pithomyces,* e *Taxomyces* (ANANDA; SRIDHAR, 2002; STROBEL et al., 1996).

Desde 1970, mais de quinze mil produtos naturais com inúmeras atividades biológicas têm sido isolados de ambientes marinhos (WANG, 2006; ZHONG-SHAN et al., 2009). Há um interesse crescente sobre a identificação de produtos naturais de fungos marinhos, conhecidos por serem uma fonte rica de metabólitos bioativos de interesse biotecnológico, pois eles crescem em um habitat de condições únicas e extremas, podendo contribuir para a ativação de vias metabólicas de síntese de compostos com novas estruturas (SCHULZ et al., 2002; ZHONG-SHAN et al., 2009). A produção desses metabólitos pode contribuir com a adaptação do fungo no ecossistema marinho, permitindo a sobrevivência do microrganismo no seu nicho ecológico (BILLS et al., 2008; FOX; HOWLETT, 2008).

Na busca por novos metabólitos secundários bioativos é relevante considerar que os compostos ativos que um fungo produz podem estar relacionados com o seu respectivo nicho ecológicos (GLOER, 1997), além de interações metabólicas com o seu ambiente que podem ampliar a síntese de metabólitos secundários (SCHULZ et al., 2002). Assim, os fungos endofíticos podem ser considerados como uma fonte de princípios ativos, que preenchem ambos os critérios, crescimento e desenvolvimento dentro da planta hospedeira, envolvendo uma contínua interação metabólica entre eles (GLOER, 1997).

Há uma necessidade crescente com relação à descoberta de novos compostos antimicrobianos, devido à resistência dos microrganismos patogênicos como consequência do uso abusivo e indiscriminado de antibióticos. Dentre os 20 medicamentos mais prescritos comumente, 6 são de origem fúngica (GLOER, 1997; SCHULZ et al., 2002). Estima-se, porém, que menos de 7% dos fungos existentes já foram descritos (HAWKSWORTH, 1991, 2001, 2004). Dessa maneira, os fungos apresentam um enorme potencial na busca de novos produtos naturais. Das 300.000 espécies de plantas existentes poucas têm sido completamente estudadas

com relação à presença de endófitos. Consequentemente, torna-se grande a oportunidade de descobrir novos fungos endofíticos e compostos ativos, entre a diversidade de plantas hospedeiras em diferentes ecossistemas (STROBEL et al., 2004). A diversidade estrutural de compostos químicos provenientes de fungos endofíticos é grande, incluindo inúmeras atividades farmacológicas, tais como antitumoral, antioxidantes, antinflamatórias, antimicrobiana, dentre outras (ALY et al., 2008; OWEN; HUNDLEY, 2004; PITTAYAKHAJONWUT et al., 2006; ZHONG-SHAN et al., 2009).

Neste estudo foi isolado, purificado e identificado o antibiótico, ácido 3-hidroxipropiônico, produzido pelo fungo endofítico *D. phaseolorum* linhagem 41.1(1). A estrutura do antibiótico foi elucidada por meio de técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas. A transformação genética dessa linhagem via *Agrobacterium tumefaciens* (Capítulo 3) foi realizada visando o estudo dos genes da via metabólica do antibiótico identificado.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e métodos

4.2.1.1 Linhagens patogênicas e condições de cultivo

Os patógenos que causam doenças em humanos testados neste estudo foram *Staphylococcus aureus* (gram-positiva) e *Escherichia coli* (gram-negativa). O meio de cultivo utilizado para o crescimento desses patógenos foi Luria Bertani. Além desses patógenos humanos, o fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis citri* também foi avaliado. Ele foi cultivado em meio NA (3g de extrato de carne, 5g de peptona, 1000 mL de água destilada; pH 6,8). Essas bactérias pertencem ao banco de linhagens do Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”, Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, São Paulo. Além disso, foi testado o antibiótico ácido 3-hidroxipropiônico, purificado e identificado nesse estudo, frente aos patógenos humanos *Salmonella tiphy* e *Staphylococcus aureus* pertencentes ao banco de linhagens da Universidade

de Valência, Departamento de Farmacologia, Laboratório de Farmacognosia do professor Dr. Diego Miguel Cortes Martinez, Valência, Espanha.

4.2.1.2 Avaliação do potencial biotecnológico do fungo endofítico *D. phaseolorum*

A seleção de fungos endofíticos produtores de antibióticos foi realizada por meio do teste em blocos de ágar (ICHIKAWA et al., 1971). Essa técnica foi descrita no Capítulo 3 (item 3.2.1.2).

4.2.1.3 Condições de cultivo para obtenção de extratos orgânicos fúngicos em pequena escala

As linhagens que apresentaram atividade antimicrobiana no teste de antagonismo foram cultivadas em pequena escala, em meio líquido para obter o extrato bruto de metabólitos secundários. Os fungos endofíticos foram cultivados, primeiramente, em meio de cultura BDA (Difco) sólido, durante 7 dias a 28º C para confirmar a sua pureza. Posteriormente, foi realizada a inoculação de 3 discos de micélio (8 mm de diâmetro), provenientes de culturas crescidas em BDA, utilizando Erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL de meio de cultura BD (caldo de 200 g de batata e 20 g de dextrose em 1 L de água destilada; pH 6,0) enriquecido com 2% de extrato de levedura, os quais foram incubados por um período de 15 dias à 27ºC, sob condições estáticas e na ausência de luz. Após o período de fermentação, o meio de cultura foi separado do micélio por filtração à vácuo. O filtrado foi submetido à partição líquido-líquido com o solvente orgânico diclorometano, por três vezes, numa proporção de (1:1) v/v (solvente orgânico/fase aquosa). Posteriormente, o extrato orgânico foi concentrado em evaporador rotativo e seco em nitrogênio líquido. A quantidade de extrato bruto foi mensurada. Para o controle negativo foi utilizado extrato proveniente do meio de cultivo sem inoculação de fungo endofítico. Esses extratos foram armazenados em geladeira, e posteriormente foram submetidos à análise de RMN de ^{1}H no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Professor Dr. Antônio Gilberto Ferreira, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, São Paulo.

4.2.1.4 Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos orgânicos

Após a obtenção do extrato bruto, foi realizado o teste de antibiose com os mesmos patógenos utilizados no teste de antagonismo para confirmar a presença de antibiótico na amostra. Em placas com o patógeno, previamente inoculado foram inseridos discos de papel de filtro esterilizados e, nestes foram aplicados 20 µL de extrato com uma concentração de 50 $mg.mL^{-1}$. Para o controle negativo foi inoculado somente os discos de papel contendo apenas o solvente dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado para dissolver os extratos brutos. Já para controle positivo foram inoculadas alíquotas de 20 µL do antibiótico tetraciclina (Sigma) numa concentração de 10 mg/mL. As placas foram incubadas à 37º C, durante 18 horas. Este experimento foi realizado em triplicata, e os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados.

4.2.1.5 Cultivo em grande escala do fungo endofítico *D. phaseolorum*

A linhagem 41.1(1) identificada como *D. phaseolorum* foi selecionada para o cultivo em grande escala com o objetivo de isolar a substância bioativa em uma quantidade suficiente para realizar todos os experimentos necessários para a sua determinação química estrutural, e para os testes de antibiose confirmando se a mesma é a responsável pela atividade biológica do extrato bruto. Este experimento foi conduzido na Universidade de Valência, Departamento de Farmacologia, Laboratório de Farmacognosia, Valência, Espanha, sob a supervisão do Professor Dr. Diego Miguel Cortes Martinez, visando à identificação da estrutura química do antibiótico por meio de técnicas espectroscópicas como Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas.

O cultivo em escala ampliada segue a mesma metodologia do de pequena escala. Para tanto, foram inseridos 10 discos miceliais (6 mm de diâmetro) do fungo endofítico *D. phaseolorum* em frascos de Erlenmeyers de 1000 mL, contendo 500 mL de meio de cultura BD (caldo de batata), enriquecido com 2% de extrato de levedura. Os frascos de Erlenmeyers, perfazendo no total 6 L de meio de cultivo, foram incubados à 28º C, em condição estática, durante 14 dias na ausência de luz. Após o período de cultivo, o micélio foi separado do meio aquoso por filtração a vácuo. Os 6 L de meio de fermentação foram concentrados em evaporador rotativo, com temperatura de 40º C, até obter 1 L de meio de cultivo, o qual foi submetido três

vezes a partição líquido-líquido com os solventes orgânicos acetato de etila e diclorometano. A proporção de meio de cultivo e solvente orgânico foi de (1:1) v/v. Posteriormente, foi adicionada à fase orgânica o sulfato de sódio, para remoção da fase aquosa residual. Depois de filtrado, o extrato orgânico foi concentrado em evaporador rotativo e seco em nitrogênio líquido. A quantidade de extrato bruto foi mensurada. Tal procedimento foi realizado também com os transformantes, obtidos via *Agrobacterium tumefaciens*, 787, 374 e 423 para avaliar possíveis modificações na estrutura do antibiótico em relação à linhagem selvagem. Entretanto, no presente trabalho será mostrado somente o resultado sobre o antibiótico produzido pela linhagem selvagem, pois os extratos dos transformantes, ainda estão sendo avaliados no Departamento de Farmacologia da Universidade de Valência. Foi avaliada a atividade antimicrobiana do extrato obtido em grande escala utilizando a metodologia descrita no item 4.2.1.4.

4.2.1.6 Determinação do sistema de solventes utilizado como fase móvel na coluna

Foram avaliadas várias combinações de solventes, com o objetivo de encontrar o sistema que possibilita a melhor separação dos metabólitos fúngicos na coluna. As combinações de eluentes utilizadas foram às seguintes: hexano:acetato de etila (8:2 v/v), hexano:acetato de etila (5:5 v/v), hexano:acetato de etila (4:6 v/v), diclorometano:metanol (9:1 v/v), essa ordem aumenta a polaridade do sistema de solventes. Alíquotas de 3 µL do extrato da linhagem selvagem 41.1(1) foram aplicadas em placas de cromatografia de alumínio com gel de sílica, as quais foram inseridas em cubas contendo a fase móvel. Após a corrida, as placas foram evaporadas com o auxílio de um secador, e reveladas em luz ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm, e com os reveladores químicos (ácido fosfomolíbdico e anisaldeído sulfúrico). Na revelação, as placas foram inseridas em estufas a 120ºC durante 5 minutos e, em seguida os valores de R_f (índice de retenção de um composto) foram calculados. Na coluna os compostos apresentam o mesmo comportamento que o observado na cromatografia de camada delgada utilizando o mesmo sistema de solventes.

4.2.1.7 Purificação do antibiótico em coluna

O extrato bioativo obtido em grande escala foi purificado por cromatografia de coluna (sílica gel 60 - *flash*) com 4 cm de diâmetro e 130 cm de comprimento. O extrato bruto foi completamente dissolvido em solventes hexano:acetato de etila (8:2 v/v), o mesmo sistema de solventes utilizado como fase móvel da coluna, e inserido cuidadosamente pela parede da coluna, com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Acima do extrato foi adicionado areia para evitar o retorno do extrato inserido na coluna. A coluna foi eluída em sistema de gradiente crescente de polaridade (hexano:acetato de etila (8:2 v/v), hexano:acetato de etila (7:3 v/v) e hexano:acetato de etila (5:5 v/v) garantindo a remoção de todos os metabótitos presentes na coluna. As frações obtidas na coluna foram avaliadas por cromatografia de camada delgada, sendo que as frações que apresentaram o mesmo R_f foram reunidas. Posteriormente, essas frações foram avaliadas com relação a sua atividade antimicrobiana e por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN de 1H).

Foi avaliado um segundo sistema de solvente para a fração ativa [171-180] mediante técnica de Cromatografia de Camada Delgada para obter uma melhor separação das substâncias, permitindo maior eficiência na separação do antibiótico presente na fração [171-180]. Os sistemas de solventes avaliados foram hexano:acetato de etila (8:2 v/v), diclorometano:metanol (98:2 v/v), diclorometano:metanol (95:5 v/v). Foram aplicados 139,74 mg da fração ativa [171-180] na coluna de 1,5 cm de diâmetro e 70 cm de comprimento. A fase estacionária utilizada foi a sílica *Flash.* Já fase móvel foi constituída por diclorometano:metanol (CH_2Cl_2:MeOH) (98:2 v/v).

4.2.1.8 Análises de Ressonância Magnética Nuclear

As amostras foram dissolvidas em 0,6 mL de clorofórmio deuterado e transferidas para o tubo de ressonância de 5mm de diâmetro.

Os espectros de RMN unidimensionais (RMN de ^{1}H e ^{13}C) e bidimensionais (*g*HSQC) foram adquiridos em um equipamento Bruker DRX400 de 9,4 Tesla (500 MHz para a frequência do hidrogênio e 125 MHz para a do carbono), utilizando-se sondas de 5 mm com detecção direta (BBO) e com detecção inversa (BBI), equipadas com gradiente de campo no eixo z e a temperatura de 298 K.

4.2.1.9 Espectrometria de massas (EM)

A massa molecular da substância bioativa foi obtida por espectrometria de massas, utilizando o aparelho 1200 L - Quadrupole EM/EM - Varian. A massa molecular obtida por esta técnica confirmou os dados de RMN, os quais foram utilizados para determinação da estrutura química do antibiótico.

4.2.1.10 Modificação da estrutura química do antibiótico

Depois de determinada a estrutura química do antibiótico, este foi submetido à reação química de esterificação de Fischer-Speier na presença de álcool em meio ácido (ácido clorídrico concentrado) com temperatura de 50°C (MCMURRY, 1997) para remoção do grupo hidroxila do ácido 3-hidroxipropiônico. Essa reação química foi realizada com o intuito de analisar a atividade biológica da hidroxila (OH) do grupo ácido (R-COOH) em relação ao grupo éster (R-COO-R) (grupo produzido pela reação de esterificação). O produto de reação (éster do ácido 3-hidroxipropiônico) foi monitorado mediante cromatografia em camada delgada, pois o éster formado tem menor polaridade que o produto de partida (ácido), apresentando, dessa maneira, maior R_f.

Após a reação de esterificação, o produto de reação foi concentrado em rotaevaporador rotativo para remoção do etanol e ácido clorídrico. Em seguida, foram adicionados 10 mL de água pura e de diclorometano para extração do produto de reação mediante partição líquido/líquido. Esse processo de extração foi repetido três vezes, utilizando diclorometano. Depois das lavagens foi adicionada à fase orgânica (diclorometano) o sulfato de sódio anidro, a fim de remover restos aquosos residuais. O produto de reação foi novamente evaporado, pesado e submetido à análises de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e RMN de ^{1}H, sendo comparado com o produto de partida ácido 3-hidroxipropiônico.

4.2.1.11 Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos orgânicos

A avaliação da atividade antimicrobiana do ácido 3-hidroxipropiônico e do éster do ácido 3-hidroxipropiônico foi realizada mediante teste de difusão em ágar utilizando diferentes massas desses compostos puros (0,025 mg, 0,050 mg, 0,10 mg, 0,25 mg, 0,50 mg, 1 mg, 2 mg e 4 mg) aplicadas em discos de papel de filtro inseridos em meio de cultivo previamente inoculado com os patógenos *S. aureus* e *S. tiphy* pertencentes ao banco de linhagens da Universidade de Valência, Departamento de Farmacologia, no Laboratório do Prof. Dr. Diego Cortes. Estes experimentos foram realizados em triplicatas, e os diâmetros dos halos de inibição mensurados.

4.2.2 Resultados e discussão

4.2.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos obtidos em pequena escala

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos das linhagens produtoras de antibióticos está representada na Tabela 4.1, mostrando que foram extraídos os antibióticos de todos os isolados selecionados no bioensaio mediante o teste bloco de ágar (Figura 4.1). Os halos de inibição resultantes da atividade dos extratos obtidos em pequena escala estão representados na Figura 4.2. Posteriormente, todas as amostras foram submetidas à técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

O gênero *Diaporthe* tem sido descrito como grande produtor de metabólitos secundários (AGUSTA; OHASHI; SHIBUYA, 2006; BILLS et al., 1992; BRADY et al., 2000; CHEN et al., 2003; DETTARAKUL et al., 2003; HUANG et al., 2008; LIN et al., 2005; PITTAYAKHAJONWUT, 2006). Dessa forma, foi selecionada a linhagem 41.1(1) pertencente ao gênero *Diaporthe* para ser cultivada em grande escala, com o objetivo de isolar e determinar a estrutura química do antibiótico responsável pela atividade farmacológica. Essa linhagem foi transformada mediante *A. tumefaciens* visando o estudo dos genes da via de biossíntese do antibiótico ácido 3-hidroxipropiônico identificado nesse estudo (Capítulo 3). Além disso, a

linhagem 41.1(1) apresentou maior halo de inibição no teste de antibiose (Tabela 4.1), e apresenta atividade contra o patógeno *Staphylococcus aureus* de grande importância para a área médica. A bactéria *Staphylococcus aureus* vem apresentando resistência aos antibióticos utilizados na prática clínica, inclusive ao antibiótico vancomicina o qual apresenta espectro de ação à esse patógeno, isso vem ocorrendo devido ao uso indiscriminado de antibióticos favorecendo o aparecimento de linhagens cada vez mais resistentes.

Tabela 4.1 Fungos endofíticos de manguezais produtores de antibióticos

Isolado	Fungos endofíticos[1]	Local de Isolamento	Parte da planta	Patógeno inibido[2]	Halo em mm
40.1(1)	*Diaporthales*	Bertioga/verão	Ramo	*Staphylococcus aureus*	1,5[3](1,5[4])
39.1(1)	*Diaporthe phaseolorum*	Bertioga/verão	Ramo	*Staphylococcus aureus*	1,0[3](1,0[4])
41.1(1)	*Diaporthe phaseolorum*	Bertioga/verão	Folha	*Staphylococcus aureus*	4,0[3](4,0[4])
99(3)	*Gibberella moniliformis*	Bertioga/inverno	Folha	*Escherichia coli*	2,0[3](2,5[4])
89(3)	*Hypocrea virens*	Bertioga/inverno	Folha	*Escherichia coli*	3,0[3](3,0[4])
36(3)	*Colletotrichum gloeosporioides*	Bertioga/inverno	Folha	*Escherichia coli*	3,0[3](3,0[4])
60(4)	*Penicillium sp.*	Cananéia/verão	Ramo	*Escherichia coli*	3,0[3](3,0[4])
36(3)	*Diaporthe phaseolorum*	Bertioga/inverno	Folha	*Xanthomonas axonopodis citri*	1[3](1,5[4])
9.3(1)	*Gibberella moniliformis*	Bertioga/verão	Ramo	*Xanthomonas axonopodis citri*	2[3](2,5[4])
8(3)	*Lasiodiplodia rubropurpurea*	Bertioga/inverno	Ramo	*Xanthomonas axonopodis citri*	2[3](2[4])
29.6(3)	*Neofusicoccum vitifusiforme*	Bertioga/inverno	Ramo	*Xanthomonas axonopodis citri*	2,5[3](2,5[4])
101(3)	*Arthothelium spectabile*	Bertioga/inverno	Folha	*Xanthomonas axonopodis citri*	1,5[3](2,0[4])
50(3)	*Aspergillus sp.*	Bertioga/inverno	Folha	*Xanthomonas axonopodis citri*	2,5[3](2,5[4])
36(4)	*Xylaria allantoidea*	Cananéia/verão	Ramo	*Xanthomonas axonopodis citri*	2,0[3](2,5[4])
22(3)	*Aspergillus awamori*	Bertioga/inverno	Folha	*Xanthomonas axonopodis citri*	1,0[3](1,5[4])
82(4)	*Aspergillus awamori*	Cananéia/verão	Folha	*Xanthomonas axonopodis citri*	1,5[3](2,0[4])
54(4)	*Diaporthe sp.*	Cananéia/verão	Ramo	*Xanthomonas axonopodis citri*	1,0[3](1,5[4])
17.5(3)	*Aspergillus awamori*	Bertioga/inverno	Ramo	*Xanthomonas axonopodis citri*	1,0[3](1,5[4])

[1]Identificação taxonômica dos isolados fúngicos a partir da comparação das suas sequências de nucleotídeos com sequências conhecidas disponíveis no GenBank, via BLASTn, e agrupamento em filograma; [2]A concentração de extrato foi ajustada para 50mg.mL^{-1} com solvente DMSO, e alíquotas de 20µL foram aplicadas nos discos de papel de filtro inseridos sobre os seguintes patógenos previamente inoculados; [3]Atividade antimicrobiana avaliada pela medida do tamanho do halo de inibição observado por meio da técnica bloco de ágar; [4]Atividade antimicrobiana de extratos obtidos em pequena escala das linhagens fúngicas avaliadas. Os valores são médias das três repetições realizadas

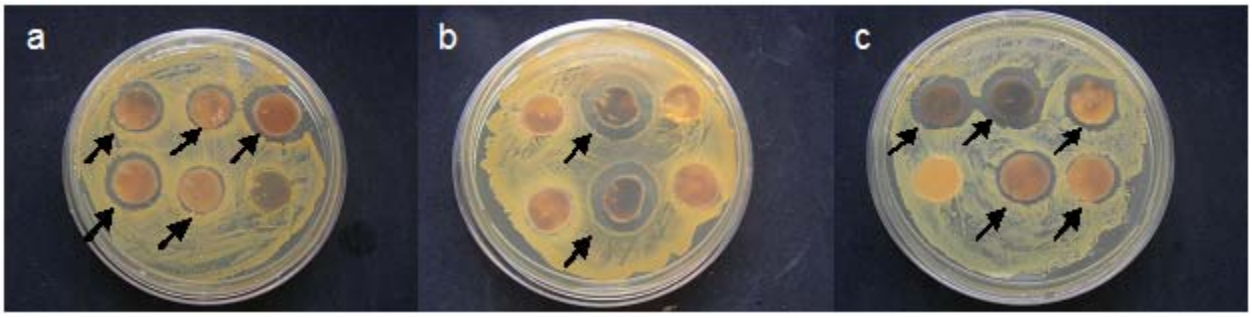

Figura 4.1 - Ensaio de antagonismo das linhagens fúngicas por meio da técnica de bloco de ágar. A setas indicam os halos formados ao redor dos blocos de fungos endofíticos produtores de antibiótico efetivo contra a) *Staphylococcus aureus*, b) *Escherichia coli* e c) *Xanthomonas axonopodis citri*

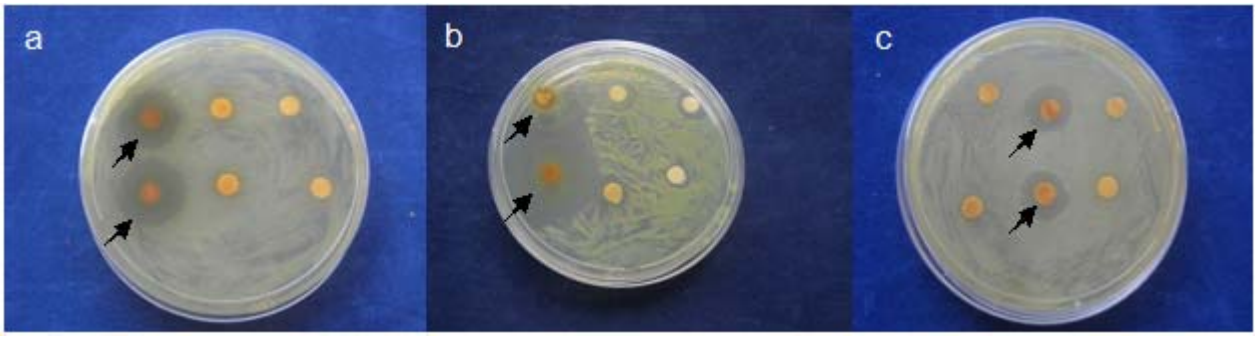

Figura 4.2 - Atividade antimicrobiana dos extratos obtidos em pequena escala de isolados fúngicos produtores de antibiótico. A concentração de extrato foi ajustada para 50mg.mL^{-1}, e alíquotas de 20 µL foram aplicadas nos discos de papel de filtro inseridos sobre os seguintes patógenos previamente inoculados: a) *Escherichia coli* b) *Staphylococcus aureus* e c) *Xanthomonas axonopodis citri*

4.2.2.2 Purificação do antibiótico em coluna

O rendimento do processo de extração em grande escala do extrato bruto da linhagem 41.1(1) foi de 1,0 g. A Cromatografia de Camada Delgada desse extrato ativo revelou várias manchas, indicando que a amostra apresentava vários compostos secundários. A proporção de solvente hexano:acetato de etila (8:2 v/v) mostrou a melhor separação dos metabólitos presentes no extrato bruto. Esse sistema de solventes foi utilizado como fase móvel para purificação do antibiótico em coluna. Foram obtidas 18 frações com diferentes perfis cromatográficos. As condições da coluna estão representadas na Tabela 4.2.

4.2.2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana das frações obtidas da coluna

As frações ativas foram detectadas por meio de ensaio de antagonismo. Das 18 frações obtidas (item 4.2.2.2), 6 delas apresentaram atividade contra as bactérias patogênicas *S. aureus* e *S. tiphy* (Figura 4.3). As frações ativas biologicamente foram: [122-150], [151-160], [161-170], [171-180], [181-190] e [191-200]. A fração [171-180] apresentou menor conteúdo de impurezas que as demais frações de acordo com dados de RMN de ^{1}H. Assim, foi realizada uma segunda coluna com essa fração [171-180] para purificar o antibiótico de acordo com o item 4.2.1.7.

Tabela 4.2 - Frações obtidas da coluna com o extrato bruto da linhagem 41.1(1) *D. phaseolorum*

Fração	[1]Fase Móvel	[2]Massa	[3]Observação
[1-80]	Hexano/Acetato de etila (8:2 v/v)	8,30 mg	RMN de ^{1}H, S-
[81-89]	Hexano/Acetato de etila (8:2 v/v)	99,82 mg	RMN de ^{1}H, S-
[90-93]	Hexano/Acetato de etila (8:2 v/v)	0,66 mg	RMN de ^{1}H, S-
[94-105]	Hexano/Acetato de etila (8:2 v/v)	1,64 mg	RMN de ^{1}H, S-
[106-110]	Hexano/Acetato de etila (8:2 v/v)	0,73 mg	RMN de ^{1}H, S-
[111-113]	Hexano/Acetato de etila (8:2 v/v)	3,61 mg	RMN de ^{1}H, S-
[114-115]	Hexano/Acetato de etila (8:2 v/v)	1,36 mg	RMN de ^{1}H, S-
[116-117]	Hexano/Acetato de etila (8:2 v/v)	0,25 mg	RMN de ^{1}H, S-
[118]	Hexano/Acetato de etila (8:2 v/v)	0,62 mg	RMN de ^{1}H, S-
[119]	Hexano/Acetato de etila (8:2 v/v)	0,62 mg	RMN de ^{1}H, S-
[121]	Hexano/Acetato de etila (8:2 v/v)	1,32 mg	RMN de ^{1}H, S-
[122-150]	Hexano/Acetato de etila (8:2 v/v)	38,74 mg	RMN de ^{1}H, S+
[151-160]	Hexano/Acetato de etila (8:2 v/v)	1,68 mg	RMN de ^{1}H, S+
[161-170]	Hexano/Acetato de etila (8:2 v/v)	0,94 mg	RMN de ^{1}H, S+
[171-180]	Hexano/Acetato de etila (8:2 v/v)	149,74 mg	RMN de ^{1}H e ^{13}C, S+
[181-190]	Hexano/Acetato de etila (8:2 v/v)	176,29 mg	RMN de ^{1}H, S+
[191-200]	Hexano/Acetato de etila (7:3 v/v)	75,83 mg	RMN de ^{1}H, S+
[201-205]	Hexano/Acetato de etila (5:5 v/v)	2,68 mg	RMN de ^{1}H, S-

[1]Fase móvel utilizada na coluna para separação dos metabólitos secundários presentes na amostra; [2]Massa das frações separadas pela coluna; [3] Avaliação da atividade antimicrobiana das frações: S+ (Frações que apresentaram atividade biológica frente aos patógenos *S. aureus* e *S. tiphy*), e S- (não apresentou atividade antimicrobiana frente aos patógenos *S. aureus* e *S. tiphy*. RMN de ^{1}H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e RMN de ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

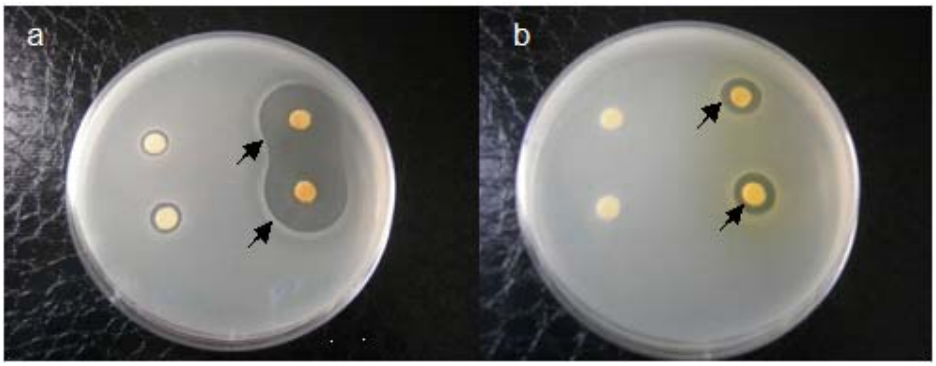

Figura 4.3 – Avaliação da atividade antimicrobiana das frações obtidas da coluna com o extrato bruto da linhagem 41.1(1) de *D. phaseolorum*. A concentração das frações foi ajustada para 50 mg.mL^{-1}, e alíquotas de 20 µL foram aplicadas nos discos de papel de filtro inseridos sobre os seguintes patógenos previamente inoculados: a) *S. aureus* e b) *S. tiphy*

4.2.2.4 Coluna com a fração [171-180]

A Tabela 4.3 mostra os dados da coluna com a fração ativa [171-180] realizada para a purificação do antibiótico (item 4.2.1.7). De acordo, com os dados de RMN de ^{1}H a fração [6-44] apresentou-se pura (Figura 4.4 B). Devido a essa pureza, essa fração foi analisada por RMN de ^{13}C, Espectrometria de Massas e ensaio de antibiose com os patógenos humanos *S. aureus* e *S. tiphy,* confirmando a estrutura química e atividade antimicrobiana do composto puro.

Tabela 4.3 - Frações obtidas da coluna com a fração [171-180]

Fração	Fase móvel[1]	Massa[2]	Observação[3]
[1-5]	CH_2Cl_2:MeOH (98:2 v/v)	10,2 mg	RMN de ^{1}H, S-
[6-44]	CH_2Cl_2:MeOH (98:2 v/v)	62,42 mg	RMN de ^{1}H e ^{13}C, S+
[45-64]	CH_2Cl_2:MeOH (98:2 v/v)	32,25 mg	RMN de ^{1}H, S+
[65-81]	CH_2Cl_2:MeOH (98:2 v/v)	10,05 mg	RMN de ^{1}H, S+
[82-101]	CH_2Cl_2:MeOH (98:2 v/v)	9,25 mg	RMN de ^{1}H, S+
[102-120]	CH_2Cl_2:MeOH (98:2 v/v)	9,85 mg	RMN de ^{1}H, S-
[121-150]	CH_2Cl_2:MeOH (5:5 v/v)	10,5 mg	RMN de ^{1}H,S-

[1] Fase móvel utilizada na coluna para separação dos metabólitos secundários presentes na amostra; [2] Massa das frações separadas pela coluna; [3] Observações sobre a atividade antimicrobiana das frações: S+ (Frações que apresentaram atividade aos patógenos *S. aureus* e *S. tiphy*), e S- (não apresentou atividade antimicrobiana aos patógenos *S. aureus* e *S. tiphy*), RMN de ^{1}H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e RMN de ^{13}C - Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

4.2.2.5 Análise da fração pura [6-44] por meio da técnica de Ressonância Magnética Nuclear

A estrutura química encontrada com atividade antimicrobiana foi o ácido 3-hidroxipropiônico (3-HPA). Essa estrutura química foi determinada de acordo com dados espectroscópicos de RMN (500 MHz para ^{1}H e 125 MHz para ^{13}C). A amostra foi solubilizada em clorofórmio deuterado ($CDCl_3$), o qual apresenta um deslocamento químico (no espectro) em 7,26 ppm, que pode ser utilizado como referência para calibração. O espectro de RMN de ^{1}H (Figura 4.4 B) apresentou dois sinais com multiplicidade de *tripleto*, ambos com constante de acoplamente J = 6,2 Hz (com a mesma intensidade). Estes sinais apresentaram deslocamentos químicos em 4,65 ppm e 3,00 ppm. Enquanto, que o espectro de RMN de ^{13}C apresentou três sinais em 30,8, 69,8 e 171,7 ppm, sendo este último sinal, é refente a um carbono não ligado a hidrogênio (carbono-quaternário) (Figura 4.5). Os experimentos de 2Ds (duas dimensões) mostraram que os dois *tripletos* acoplam entre si (*g*COSY-^{1}H x ^{1}H), e que os prótons de sinais 4,65 e 3,00 ppm estão ligados aos carbonos com deslocamentos em 69,8 e 30,8 ppm, respectivamente (*g*HMQC-^{1}H x ^{13}C), que estão representados na Figura 4.6. Já o carbono com deslocamento químico em 171,7 ppm, é referente ao carbono carbonílico do grupo ácido (COOH). Esses dados foram comparados com os descritos na literatura para o composto ácido 3-hidroxipropiônico (Schwarz et al., 2004), confirmando a estrutura determinada.

No trabalho de Schwarz et al., 2004 foi isolado o ácido 3-hidroxipropiônico do fungo endofítico *P. phaseoli*, o qual apresentou atividade nematicida contra *Meloidogyne incognita*. Entretanto, nenhum trabalho relatou até o momento, a atividade antimicrobiana do ácido 3-hidroxipropiônico. Desta forma, o presente estudo demonstra pela primeira vez o efeito farmacológico desse princípio ativo.

O ácido 3-hidroxipropiônico pode ser obtido por meio de síntese química, entretanto o custo é muito alto para a indústria (JIANG; MENG; XIAN, 2009). Assim, uma fonte alternativa na obtenção deste composto químico seria por meio do metabolismo secundário de fungos, tais como: *Phomopsis phaseoli, Melanconium betulinum, Byssochlamys sp., Geotrichum sp.,* e *Trichoderma sp.* (JIANG; MENG; XIAN, 2009). As bactérias também vêm sendo descritas como produtoras do ácido 3-hidroxipropiônico como: *Chloroflexus aurantiacus, Acidianus brierleyi,*

Acidianus ambivalens, Sulfolobus metallics, Metallosphaera sedula, Alcaligenes latus, Ralstonia eutropha, Pseudomonas oleovorans (JIANG; MENG; XIAN, 2009). A utilidade deste composto para a indústria está relacionada com a produção de polímeros biodegradáveis, e também pode ser substituto do ácido acrílico (SAUER et al., 2008). A produção microbiana de ácidos orgânicos vem se expandindo no mercado, sendo uma fonte de carbono renovável, representando dessa forma, um grande passo para o desenvolvimento de uma sociedade industrial sustentável (SAUER et al., 2008).

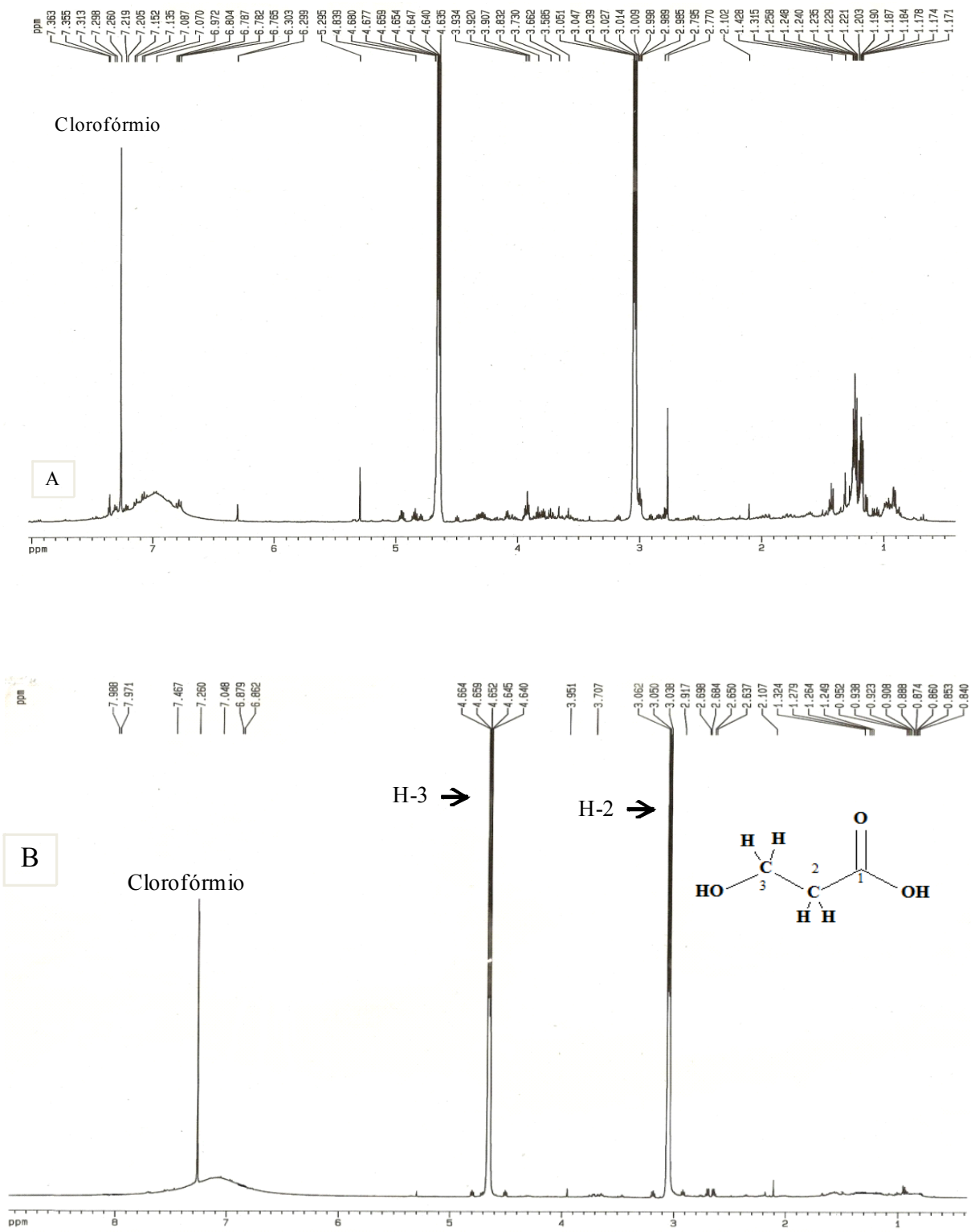

Figura 4.4 - Espectros de RMN de ^{1}H, na frequência de 500 MHz, em clorofórmio deuterado ($CDCl_3$). A) Fração [171-180] e B) composto puro ativo biologicamente contra os patógenos *S. aureus* e *S. tiphy*

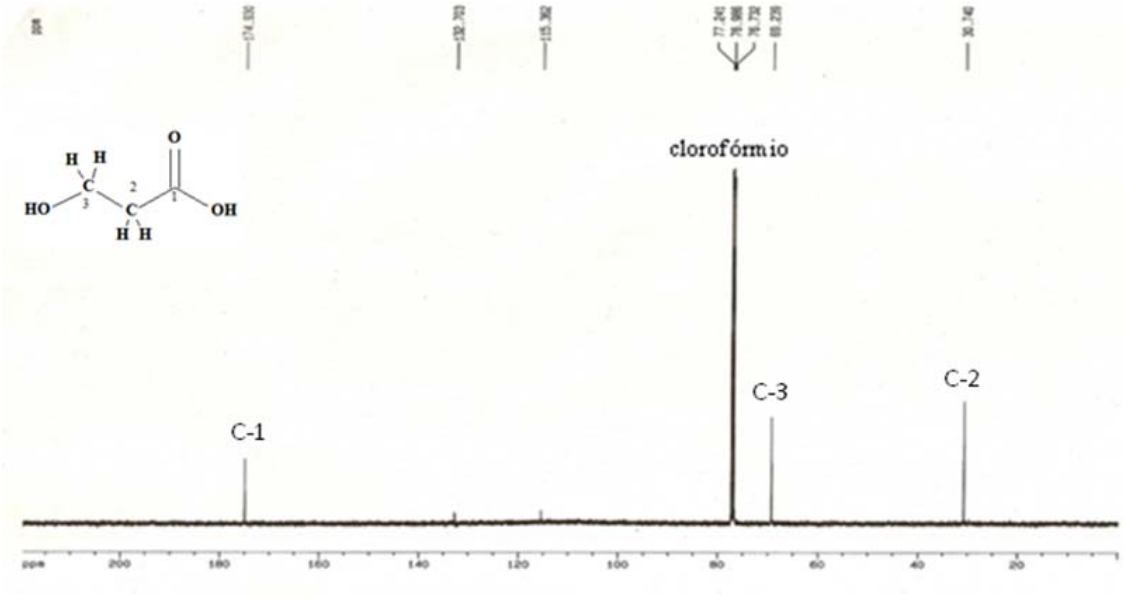

Figura 4.5 - Espectro de RMN de ^{13}C, na frequência de 125 MHz, em clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) apresentando deslocamento químico em 76 ppm

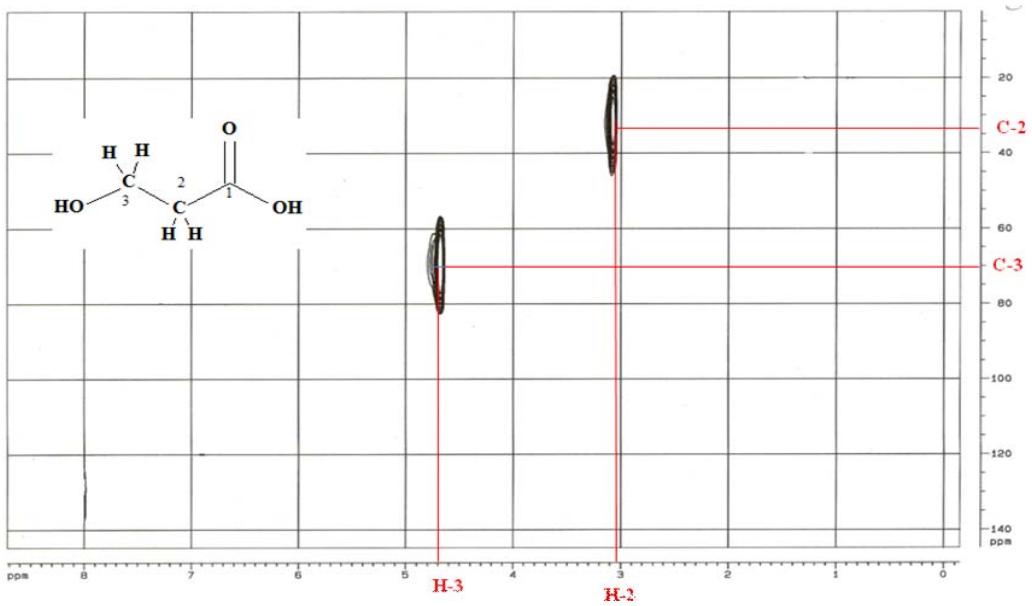

Figura 4.6 – Espectro de *g*HMQC (2D) que mostrou que os hidrogênios em 4,65 e 3,00 ppm ligados aos seus respectivamente carbonos 69,8 e 30,8 ppm, Esses dados permitiram a identificação do ácido 3-hidroxipropiônico

4.2.2.6 Espectrometria de massa (MS)

A espectrometria de massas por *Electrospray* é de fundamental importância na determinação da massa molecular de um composto químico, pois os espectros de massa de biomoléculas apresentam a predominância de íons moleculares, multiplamente carregados e muitas vezes com ausência de fragmentação, permitindo, desse modo, a determinação de massas moleculares (CLARKE et al., 2007; OLAH; MCLOUGHLIN; GILBERT, 1997; ZHANG et al., 2000). O espectro de massas do composto (Figura 4.7) mostrou o íon base (aproximado) *m/z* 89 $[M-H]^+$ (100 % de intensidade), referente à perda do hidrogênio da hidroxila do grupo ácido. O pico do íon molecular, aproximadamente de *m/z* 91 $[M+H]^+$ referente à massa molecular mais um hidrogênio, acrescentado no modo de ionização positivo, confirmando a estrutura determinada através de dados obtidos pela técnica de RMN para o princípio ativo, ácido 3-hidropropiônico.

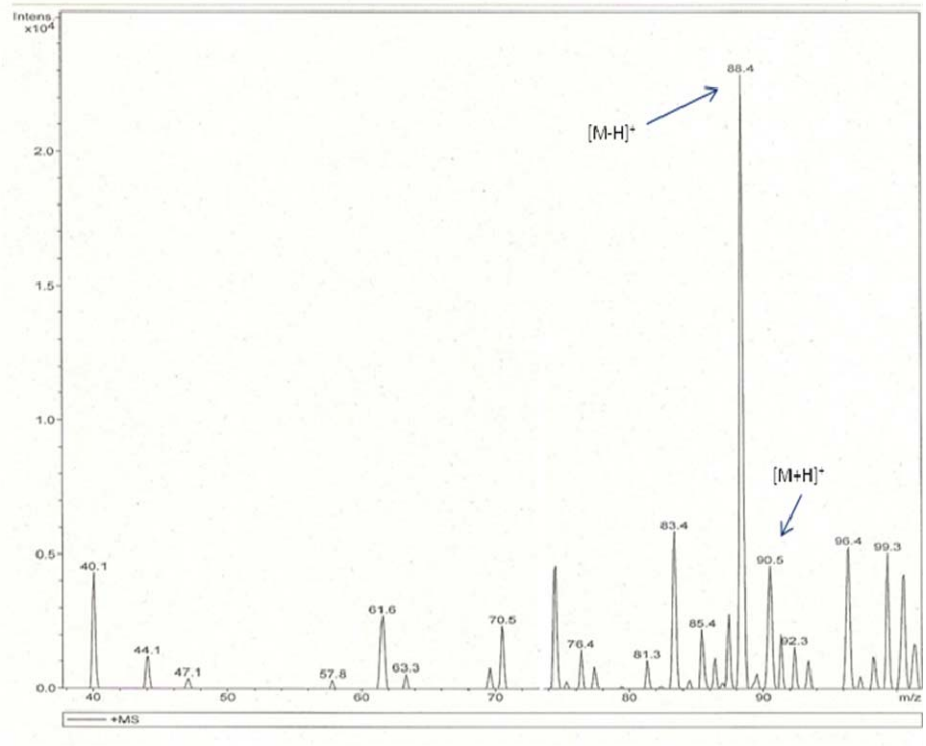

Figura 4.7 - Espectro de massas *full-scan* por *Electrospray* modo de ionização positivo do ácido 3-hidroxipropiônico

A estrutura e a massa molecular do princípio ativo isolado neste trabalho, ácido 3-hidroxipropiônico, estão representadas na Figura 4.8.

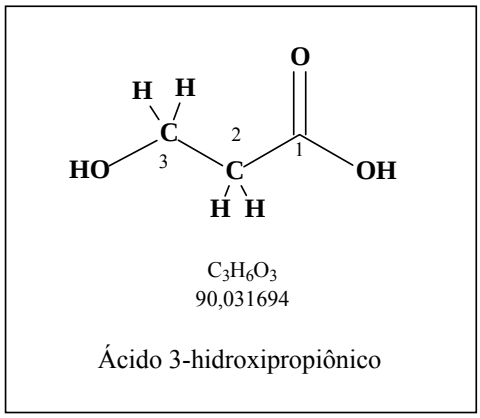

Figura 4.8 - Estrutura química do ácido 3-hidroxipropiônico

4.2.2.7 Reação química de esterificação do antibiotico ácido 3-hidroxipropiônico

Estudos sobre a relação estrutura química e atividade da molécula são importantes para identificar o grupo farmacofórico o qual corresponde a porção da molécula responsável pelo seu efeito farmacológico (El Aouad et al., 2009; González et al., 1996; Cabedo et al., 2006). Essa informação é importante, pois possibilita a alteração da molécula, a fim de melhorar características farmacocinéticas, sem que ocorra a perda da atividade biológica de um composto químico. A Figura 4.9 mostra a reação de esterificação do ácido 3-hidroxipropiônico com etanol.

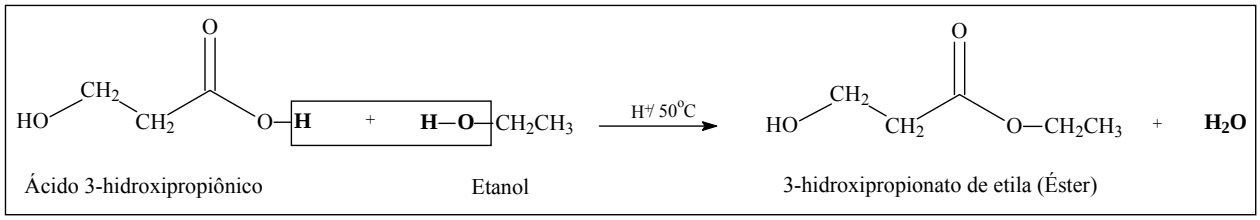

Figura 4.9 - Reação química de esterificação de Fischer-Speier do princípio ativo ácido 3-hidroxipropiônico na presença de etanol em meio ácido. O produto (3-hidroxipropionato de etila) formado apresentou ausência de atividade antimicrobiana contra os patógenos humanos *S. aureus* e *S. tiphy*

A presença da formação do grupo éster no produto da reação foi confirmada pelo espectro de RMN (Figura 4.10 B) em comparação com o espectro do ácido 3-hidroxipropriônico apresentado na Figura 4.10 A. O espectro de RMN de ^{1}H (Figura 4.10 B) do produto formado mostrou os dois sinais referentes aos hidrogênios H-3 e H-2, como *tripletos*, com deslocamentos químicos em 4,65 ppm e 3,00 ppm. Já os sinais observados em 4,15 ppm e 1,15 ppm correspondem, respectivamente aos hidrogênios pertencentes aos grupos CH_2 e CH_3 (grupo etila), provenientes da molécula de etanol mostrado na reação de esterificação (Figura 4.9).

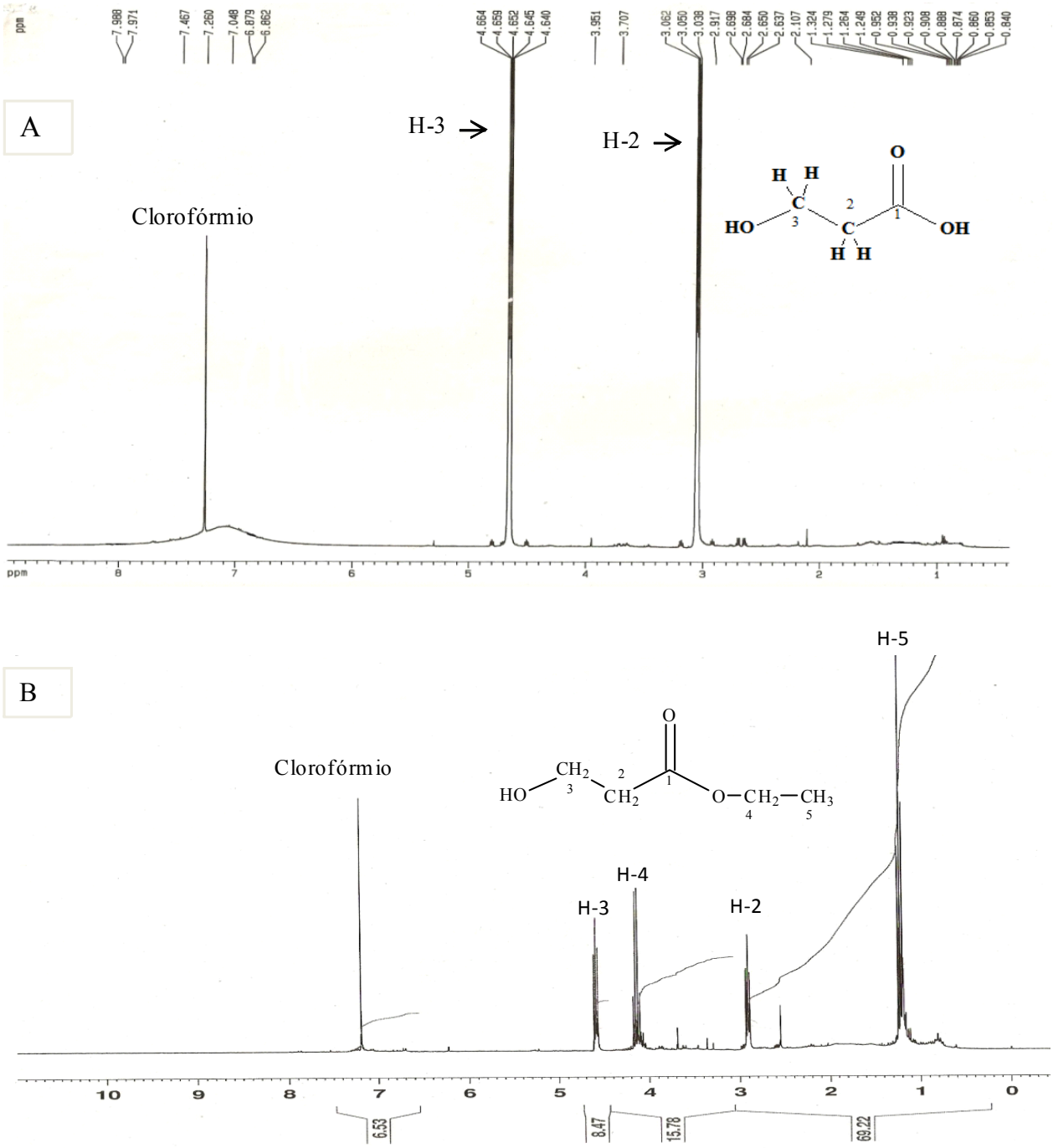

Figura 4.10 - Espectros de RMN de ^{1}H, na frequência de 500 MHz, em clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) apresentando deslocamento químico em 7.26 ppm (A) Antibiótico ácido 3-hidroxipropiônico e (B) Éster (3-hidroxipropionato de etila), formado a partir da reação química de esterificação de Fischer-Speier, o qual apresentou ausência de atividade antimicrobiana aos patógenos *S. aureus* e *S. tiphy*

Na Figura 4.11 estão mostrados os resultados do teste de antibiose com ácido 3-hidroxipropiônico e com o 3-hidroxipropionato de etila. A ausência de atividade do 3-hidroxipropionato de etila mostra que a hidroxila perdida na reação era responsável pela atividade biológica do mesmo.

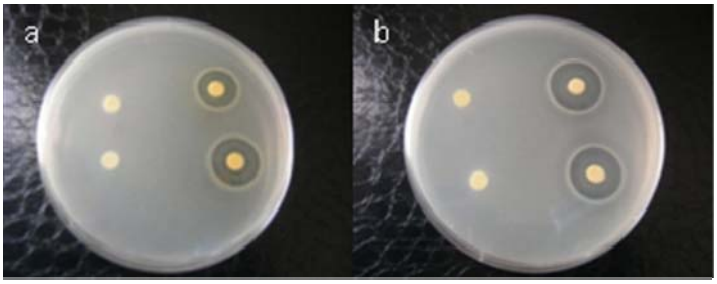

Figura 4.11 – Atividade antimicrobiana do composto puro ácido 3-hidroxipropiônico (halos ao redor dos discos de papel de filtro à direita das fotos) e produto da reação aplicado em papel de filtro inseridos à esquerda nas fotos. A massa dos compostos foram ajustadas para 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mg sendo aplicadas nos discos de papel de filtro inseridos sobre os seguintes patógenos previamente inoculados: a) *S. aureus* e b) *S. tiphy*

Tabela 4.4 – Atividade antimicrobiana da fração [6-44] pura correspondente ao antibiótico ácido 3-hidroxipropiônico

		Halo de inibição (mm)				**Tetraciclina (+)**		
Bactérias	**[1]Fração: [6-44]**	**R1**	**R2**	**R3**	**Média**	**Dose: (µg.mL^{-1})**	**Halo**	**Controle (-)**
Staphylococcus aureus	0,025mg	0	0	0	0,00	10	6	0
	0,05mg	0,5	0,5	0,5	0,50	10	6	0
	0,1mg	1	1	1	1,00	10	6	0
	0,2 mg	1,5	2	2	1,83	10	6	0
	0,5 mg	2,5	3	3	2,83	10	6	0
	1,0 mg	4	5	5	4,66	10	6	0
	2,0 mg	5,5	6	6	5,83	10	6	0
Salmonella tiphy	0,025mg	0	0	0	0,00	10	6	0
	0,05mg	0,5	0,5	0,5	0,50	10	6	0
	0,1mg	1	1	1	1,00	10	6	0
	0,2 mg	2	2	2	2,00	10	6	0
	0,5 mg	3	3	3	3,00	10	6	0
	1,0 mg	4	5	5	4,66	10	6	0
	2,0 mg	5	6	6	5,66	10	6	0

[1] Massa testada da fração pura aplicada em discos de papel de filtro inseridos sobre os patógenos *S. aureus* e *S. tiphy*. O controle positivo consistia da tetraciclina na concentração de 10 µg.mL^{-1}. Já o controle negativo corresponde ao solvente dimetilsulfóxido (DMSO). Esse bioensaio foi conduzido com três repetições (R1, R2, e R3)

4.3 Conclusão

De acordo com os dados obtidos conclui-se que a estrutura química do antibiótico purificado em coluna corresponde ao ácido 3-hidroxipropiônico, o qual apresentou atividade antimicrobiana frente aos patógenos humanos *Staphylococcus aureus* e *Salmonella tiphy.* Ainda, pode-se concluir através da reação de esterificação que a atividade biológica da substância isolada esta relacionada com grupo ácido (R-CO-OH), ou seja com a hidroxila (OH) ligada a carbonila (C=O).

Referências

AGUSTA, A.; OHASHI, K.; SHIBUYA, H. Bisanthraquinone metabolites produced by the endophytic fungus *Diaporthe sp*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 54, p. 579-582, 2006.

ALY, H.A.; EDRADA-EBEL, R.A.; WRAY, V.; MULLER, W.E.G.; KOZYTSKA, S.; HENTSCHEL, U.; PROKSCH, P.; EBEL, R. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces sp*., isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. **Phytochemistry**, Netherlands, v. 69, p. 1716-1725, 2008.

ANANDA, K; SRIDHAR, K.R. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the West coast of India. **Canadian Journal Microbiology**, Saskaton, v. 48, p. 871-878, 2002.

BILLS, G.F.; PLATAS, G.; FILLOLA, A.; JIMÉNEZ, M.R.J. Enhancement of antibiotic and secondary metabolite detection from filamentous fungi by growth on nutritional arrays. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, p. 1644-1658, 2008.

BILLS, G.F.; GIACOBBE, R.A.; LEE, S.H.; PELAEZ, F.; TKACZ, J.S. Tremorgenic mycotoxinas, paspalitrem A and C, from a tropical *Phomopsis*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, p. 977-983, 1992.

BRADY, S.F.; WAGENAAR, M.M.; SINGH, M.P.; JANSO, J.E.; CLARDY, J. The cytosporones, new osctacetide antibiotics isolated from an endophytic fungus. **Organic Letters**, Washington, v. 2, p. 4043-4046, 2000.

CABEDO, N.; EL AOUAD, N.; BERENGUER, I.; ZAMORA, M.; ARELLANO, M.C.R.; SUVIRE, F.; BERMEJO, A.; ENRIZ, D.; CORTES, D. Efficient synthesis and structural analysis of new dioxopiperazine isoquinolines. **Tetrahedron**, Oxford, v. 62, p. 4408-4418, 2006.

CHEN, G.; LIN, Y.; WEN, L.; VRIJMOED, L.L.P.; JONES, E.B. G. Two new metabolites of a marine endophytic fungus from an estuarine mangrove on the South China Sea coast. **Tetrahedron**, Oxford, v. 59, p. 4907-4909, 2003.

CLARKE, N.J.; RINDGEN, D.; KORFMACHER, W.A.; COX, K.A. Systematic LC/MS metabolite identification in drug discovery: a four-step strategy to characterize metabolites by LC/MS techniques early in the pharmaceutical discovery process. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 73, p. 431-439, 2007.

DAVIS, R.A.; ANDJIC, V.; KOTIW, M.; SHIVAS, R.G. Phomoxins B and C: Polyketides from an endophytic fungus of the genus *Eupenicillium*. **Phytochemistry**, Netherlands, v. 66, p. 2771-2775, 2005.

DETTARAKUL, S.; KITTAKOOP, P.; ISAKA, M.; NOPICHAI, S.; SUYARNSESTAKORN, C.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Antimycobacterial Piraname diterpenes from the fungus *Diaporthe sp*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 13, 1253-1255, 2003.

EL AOUAD, N.; BERENGUER, I.; ROMERO, V.; MARÍN, P.; SERRANO, A.; ANDUJAR, S.; SUVIRE, F.; BERMEJO, A.; IVORRA, M.D.; ENRIZ, R.D.; CABEDO, N.; CORTES, D. Structure–activity relationship of dopaminergic halogenated 1-benzyl-tetrahydroisoquinoline derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 44, p. 4616-4621, 2009.

FOX, E.M.; HOWLETT, B.J.; Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 11, p. 481-487, 2008.

GLOER, J.B. The chemistry of fungal antagonism and defence. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 1265-1274, 1997.

GONZÁLEZ, M.C.; SENTANDREU, M.A.K.; RAO, S.; ZAFRA-POLO, M.C.; CORTES, D. Prenylated benzopyran derivatives from two *Polyalthia* species. **Phytochemistry**, Netherlands, v. 43, p. 1361-1364, 1996.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, p. 641-655, 1991.

HAWKSWORTH, D.L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 50, p. 9-18, 2004.

HUANG, Z.; CAI, X.; SHAO, C.; SHE, Z.; XIA, X.; CHEN, Y.; YANG, J.; ZHOU, S.; LIN, Y. Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis sp*. ZSU-H76. **Phytochemistry**, Netherlands, v. 69, 1604-1608, 2008.

ICHIKAWA, T.; DATE, M.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and protroph method. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 16, p. 218-224, 1971.

JIANG, X.; MENG, X.; XIAN, M. Biosynthetic pathways for 3-hydroxypropionic acid production. **Applied Microbiol Biotechnology**, Berlin, v. 82, p. 995-1003, 2009.

KUMAR, D.S.S.; CHEUNG, H.; YEUNG, C.S.L.; CHEN, F.; HYDE, K.D. In vitro studies of endophytic fungi from Tripterygium wilfordii with anti-proliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v. 94, p. 295-300, 2004.

LIN, X.; HUANG, Y.; FANG, M.; WANG, J.; ZHENG, Z.; SU, W. Cytotoxic and antimicrobial metabolites from marine lignicolous fungi, *Diaporthe sp*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdan, v. 251, p. 53-58, 2005.

MCMURRY, J. **Química Orgânica**. Rio de Janeiro: Técnicos e Científicos, 1997. 1362 p.

OLAH, T.V.; MCLOUGHLIN, D.A.; GILBERT, J.D. The simultaneous determination of mixtures of drug candidates by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry as an in vivo drug screening procedure. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, Berlin, v. 11, p. 17-23, 1997.

OWEN, N.L.; HUNDLEY, N. Endophytes – the chemical synthesizer inside plants. **Science Progress,** New York, v. 87, p. 79-99, 2004.

PITTAYAKHAJONWUT, P.; DRAMAE, A.; MADLA, S.; LARTPORNMATULEE, N.; BOONYUEN, N.; TANTICHAROEN, M. Depsidones from the endophytic fungus BCC 8616. **Journal Natural Products**, Washington, v. 69, p. 1361-1363, 2006.

SAUER, M.; PORRO, D.; MATTANOVICH, D.; BRANDUARDI, P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. **Trends in Biotechnology**, New York, v. 26, p. 100-108, 2008.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Reserch**, Cambridge, v. 106, p. 996-1004, 2002.

STROBEL, G.A.; HESS, W.M.; FORD, E.; SIDHU, R.S.; YANG, X. Taxol from fungal endophytes from fungal endophytes and the issue of biodiversity. **Journal of Industrial Microbiology**, New York, v. 17, p. 417-423, 1993.

SURYANARAYANAN, T.S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU M.B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; MURALI, T. S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 23, p. 9-19, 2009.

SCHWARZ, M.; KOPCKE, B.; WEBER, R.W.S.; STERNER, O.; ANKE, H. 3-Hydroxypropionic acid as a nematicidal principle in endophytic fungi. **Phytochemistry**, Netherlands, v. 65, p. 2239-2245, 2004.

WANG, G.Y. Diversity and biotechnological potential of the sponge associated microbial consortia. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 33, p. 545-551, 2006.

ZHANG, N.; FOUNTAIN, S.T.; BI, H.; ROSSI, D.T. Quantification and rapid metabolite identification in drug discovery using API Time-of-Flight LC/MS. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 72, p. 800-806, 2000.

ZHONG-SHAN, C.; JIA-HUI, P.; WEN-CHENG, T.; QI-JIN, C.; YONG-CHENG, L. Biodiversity and biotechnological potential of mangrove associated fungi. **Journal of forestry Research**, New York, v. 20, p. 63-72, 2009.