

DIANA CAROLINA DUQUE CASTAÑO

Diversidade de metabólitos secundários e atividade biológica de *Epicoccum* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2019

DIANA CAROLINA DUQUE CASTAÑO

Diversidade de metabólitos secundários e atividade biológica de *Epicoccum* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Welington Luiz de Araújo

Versão original

São Paulo

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Duque Castaño, Diana Carolina
Diversidade de metabólitos secundários e
atividade biológica de *Epicoccum* spp. / Diana
Carolina Duque Castaño; orientador Wellington Luiz
de Araújo. -- São Paulo, 2019.
p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Endófito. 2. Epicolactona. 3. Policetideos. I.
Luiz de Araújo, Wellington, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Diana Carolina Duque Castaño
Título da Dissertação: Diversidade de metabólitos secundários e atividade biológica de *Epicoccum* spp.
Orientador: Prof. Dr. Wellington Luiz de Araújo

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

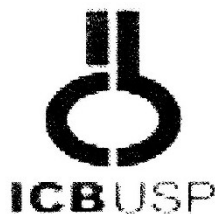
() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Sailes Oliveira", Butantã - São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissao de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **883/2017** referente ao projeto intitulado: "***Diversidade de metabolismos secundários e atividade biológica de Epicoccum spp.***" sob a responsabilidade de ***Diana Carolina Duque Castano*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***Welington Luiz de Araújo***, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 11 de maio de 2017.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo Marinho A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

DEDICO

A Maria Nubia Castaño e Julio Cesar Duque

AGRADECIMENTOS

Ao professor Welington Luiz de Araújo, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pela confiança e pelos bons momentos, minha imperecível gratidão.

Ao professor Marcelo José Pena Ferreira pela sua ajuda como a parte química do projeto.

A minhas caras amigas que me acompanharam neste processo, especialmente a Dilce, Eurides, Katia e Jesmith, obrigada pelo café, o papo e as risadas.

A Leidy e Kleiton, seu apoio foi minha força nos momentos mais difíceis desta viagem.

À equipe do LABMEM que me ajudou e compartilhou bons momentos comigo; Sarina, não teria como agradecer sua amizade e ensinamentos. Leandro, minha eterna admiração e gratidão.

A meus pais pelo carinho e cuidado, mesmo na distância.

Ao Brasil, que me acolheu faz mais de sete anos e me fez uma bióloga e uma cidadã latino-americana. À Universidade de São Paulo e ao Departamento de Microbiologia, sem o apoio do pessoal e a infraestrutura oferecidas, seria impossível ter realizado este trabalho.

AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS FINANCIADORAS DA PESQUISA

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O projeto de pesquisa recebeu auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2017/12510-4).

RESUMO

DUQUE-CASTAÑO, D. C. **Diversidade de metabólitos secundários e atividade biológica de *Epicoccum* spp.** 2019. 59 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019

Nesta dissertação foi avaliada a sistemática filogenética de linhagens de *Epicoccum* spp., incluindo algumas do complexo *E. nigrum*, à luz de avanços recentes na resolução da história evolutiva do gênero. Além disso, foi avaliada a presença de um gene de uma policetídeo sintase (PKS) potencialmente associada à produção da epicolactona, um composto bioativo de grande interesse pela sua estrutura química, identificado no sobrenadante da cultura *E. nigrum* P16. Para compreender melhor a relação entre interação e evolução das linhagens, foi testada a correlação entre distância genética e capacidade de inibição de micro-organismos. Foi usada inferência filogenética pelo método de máxima verossimilhança para avaliara abrangência filogenética das linhagens, dentro do gênero *Epicoccum*. Foram desenhados *primers* específicos para a KS do gene potencialmente associado à rota de biossíntese da epicolactona e testados em todas as linhagens. Foi realizado um teste de correlação entre as matrizes de distância genética e distância de padrão de inibição qual não demonstrou congruência entre os agrupamentos gerados por estas análises. Os resultados indicam prováveis mudanças na classificação de linhagens do complexo *E. nigrum*, para gêneros como *E. italicum* e *E. layuense*. Também foi observada a presença do gene potencialmente associado à rota de biossíntese da epicolactona em muitas das linhagens de *Epicoccum* independente da filogenia e do agrupamento gerado pelo padrão de inibição. Adicionalmente, foram obtidos extratos das linhagens para a avaliação de metabólitos secundários os quais estão sendo caracterizados e serão utilizados para gerar uma filogenia baseada em marcadores químicos.

Palavras-chave: Endófito, Epicolactona, Policetídeos, Quimiotaxonomia, PKS.

ABSTRACT

DUQUE-CASTAÑO, D. C. *Epicoccum* spp. diversity of secondary metabolites and biological activity. 2019. 59 f. Dissertation (Masters in Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019

In this dissertation, we evaluated the phylogenetic systematics of *Epicoccum* spp. strains, including some of the *E. nigrum* complex, in light of recent advances in the resolution of the evolutionary history of the genus. In addition, the presence of a polyketide synthase gene (PKS) potentially associated with the production of epicolactone, a bioactive compound of great interest for its chemical structure, identified in the culture supernatant of *E. nigrum* P16, was evaluated. To better understand the relationship between strains interaction and evolution, the correlation between genetic distance and inhibition capacity of microorganisms was tested. Phylogenetic inference using the maximum likelihood method was used to evaluate the phylogenetic range of the strains within the genus *Epicoccum*. Specific primers were designed for the KS of the gene potentially associated with the epicolactone biosynthesis route and tested in all strains. A correlation test was performed between genetic distance matrix and inhibition pattern distance matrix which did not show congruence among the clusters generated by these analyzes. The results indicate probable changes in the classification of *E. nigrum* complex strains to genera such as *E. italicum* and *E. layuense*. The presence of the gene potentially associated with the epicolactone biosynthesis route, was also observed in many *Epicoccum* strains independent of the phylogeny and the cluster generated by the inhibition pattern. In addition, extracts of the strains were obtained for the evaluation of secondary metabolites that are being characterized and will be used to generate a phylogeny based on chemical markers.

Keywords: Endophyte, Epicolactone, Polyketides, Chemotaxonomy, PKS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Árvore de consenso estrita das árvores mais parcimoniosas inferidas usando sequências ITS1-5.8S-ITS2 de 106 cepas de <i>Epicoccum</i>	17
Figura 2- Exemplo de organização estrutural de domínios de uma poliketídeo sintase fúngica	20
Figura 3- Elementos básicos de processamento de ácidos graxos e poliketídeos	20
Figura 4- Poliketídeos produzidos por <i>Epicoccum</i> spp.	23
Figura 5- Estrutura química da epicolactona desde diferentes perspectivas.	24
Figura 6- Proposta de biossíntese da epicolactona.	25
Figura 7- Organização do cluster gênico PKS12.	25
Figura 8- Análise Filogenética Molecular pelo Método da Máxima Verossimilhança.	33
Figura 9- Distância genética entre linhagens de <i>Epicoccum</i> spp. por neighbor joining (NJ)	34
Figura 10- Cluster da distância genética entre linhagens de <i>Epicoccum</i> spp.	35
Figura 11- Cluster de distância entre atividade inibitória dos extratos de <i>Epicoccum</i> spp.	36
Figura 12- Amplificação da KS do cluster PKS12 sob diferentes condições de PCR	37
Figura 13- Amplificado da KS do cluster PKS12 em linhagens de <i>Epicoccum</i> sp.	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1.	MÉTODOS DE RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA	16
2.2.	SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA DO GÊNERO <i>Epicoccum</i>	16
2.3.	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS	18
2.4.	ASPECTOS EVOLUTIVOS DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	21
2.5.	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE <i>Epicoccum</i> spp.	21
2.6.	A EPICOLACTONA	22
2.7.	GENES ENVOLVIDOS COM A ROTA DE BIOSÍNTESE DA EPICOLACTONA	24
3	OBJETIVOS	26
3.1.	OBJETIVO GERAL	26
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1.	LINHAGENS E CONDIÇÕES DE CULTURA	27
4.2.	EXTRAÇÃO E MANIPULAÇÃO DO DNA GENÔMICO	27
4.3.	AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL E DO GENE DA β -TUBULINA	27
4.4.	ANÁLISE FILOGENÉTICA BASEADA EM MARCADORES MOLECULARES	28
4.5.	DESENHO DE <i>PRIMERS</i> ESPECÍFICOS PARA O CLUSTER PKSi12	28
4.6.	EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE <i>Epicoccum</i> spp.	29
4.7.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE <i>Epicoccum</i> spp.	29
4.8.	CORRELAÇÃO DA DISTÂNCIA GENÉTICA DAS LINHAGENS E OS PERFIS DE INIBIÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS DOS EXTRATOS DE <i>Epicoccum</i> spp.	31
5	RESULTADOS	32
5.1.	ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS LINHAGENS DE <i>Epicoccum</i> spp.	32
5.2.	DISTÂNCIA GENÉTICA DAS LINHAGENS	32
5.3.	PERFIS DE INIBIÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE <i>Epicoccum</i> spp.	35
5.4.	CORRELAÇÃO ENTRE A DISTÂNCIA GENÉTICAS E A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>Epicoccum</i> spp.	36
5.5.	PRESENÇA DO AMPLICON DA KS DA PSKi12	36
6	DISCUSSÃO	38
7	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43
	APÊNDICE A – Linhagens de <i>Epicoccum</i> spp. analisadas	49

APÊNDICE B - Árvore filogenética inferida a partir da análise de máxima verossimilhança da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal.....	52
APÊNDICE C - Árvore filogenética inferida a partir da análise de máxima verossimilhança do gene da β -tubulina.....	53
APÊNDICE D - Árvore filogenética inferida a partir da análise de máxima verossimilhança da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal e o gene da β -tubulina concatenados.....	54
ANEXO A - Resumo dos pontos fortes e fracos dos diferentes métodos de reconstrução de árvores filogenéticas.	55
ANEXO B – Sequências de isolados de outros estudos e seus números de acesso no GenBank.....	57

1 INTRODUÇÃO

Epicoccum é um gênero de fungos ascomicetos anamórficos e ubíquos da classe Dothideomycetes, família Didymellaceae, que coloniza diferentes tipos de solos e plantas (MIMS; RICHARDSON, 2005). Os fungos deste gênero têm sido associados à decomposição primária de tecidos vegetais, apresentando hábito de vida endofítico em espécies de plantas de interesse agrônomico como *Saccharum officinarum* (cana de açúcar) (ROMÃO; ARAÚJO, 2007) e algumas espécies tem sido descritas como patógenos de plantas (BRUTON et al., 1993; LIN et al., 2015). Seu potencial uso como agente de controle biológico tem sido estudado (LAHLALI; HIJRI, 2010), sendo que já foi observada a sua capacidade de inibir o desenvolvimento e germinação conidial de fitopatógenos como *Pythium* spp. (HASHEM; ALI, 2004), *Rhizoctonia solani* (LAHLALI; HIJRI, 2010), *Phytophthora infestans* (LI et al., 2013) e *Sclerotinia sclerotiorum* (PIECKENSTAIN et al., 2001).

Originalmente foram descritas 60 espécies do gênero *Epicoccum* (SCHOL-SCHWARZ, 1959), mas a classificação das espécies foi reduzida a uma única espécie com diferentes tipos morfológicos e fisiológicos (KILPATRICK; CHILVERS, 1981). Contudo, como acontece com espécies crípticas e altamente variáveis de fungos, as diferenças morfológicas frequentemente são interpretadas como variações intraespecíficas (MURILLO et al., 2009). No caso de *Epicoccum nigrum*, a análise polifásica da diversidade intraespecífica de linhagens da espécie, identificou a ocorrência de dois genótipos com fortes evidências morfológicas, fisiológicas e de divergência genética, indicando que representam duas espécies diferentes (FÁVARO et al., 2011). Análises filogenéticas baseadas em diferenças morfológicas e multilocus das sequências da região espaçadora transcrita interna do nrDNA 5.8S (ITS), sequências parciais 28S rDNA da subunidade maior do nrDNA (LSU), sequências parciais da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*rpb2*) e β -tubulina (*tub2*), da família Didymellaceae, revisaram a filogenia de *Epicoccum* e estabeleceram 17 espécies: *E. brasiliense*, *E. camelliae*, *E. dendrobii*, *E. draconis*, *E. duchesneae*, *E. henningsii*, *E. hordei*, *E. huancayense*, *E. italicum*, *E. latusicollum*, *E. layuense*, *E. nigrum*, *E. pimprinum*, *E. plurivorum*, *E. poae*, *E. sorghinum*, *E. viticis*. (CHENG et al., 2015, 2017) e *E. mackenzii* (JAYASIRI et al., 2017).

Uma das características de maior relevância no estudo de *Epicoccum* spp. é sua capacidade de produzir grande número de metabólitos secundários com atividade biológica (FÁVARO; SEBASTIANES; ARAÚJO, 2012). Entre os compostos produzidos por *E. nigrum*, a epicolactona, um policetídeo com atividade antimicrobiana, tem gerado grande interesse por

sua complexa estrutura química (DA SILVA ARAÚJO et al., 2012), levando a estudos de caracterização da via de síntese (ELLERBROCK et al., 2015; KRAVINA; CARREIRA, 2018) e dos genes envolvidos na sua biossíntese, contribuindo assim no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nas interações ecológicas do fungo (BRAGA, 2016).

Os avanços na sistemática filogenética do gênero *Epicoccum* e a diversidade de metabólitos de interesse biotecnológico produzidos por estes fungos (BRAGA; PADILLA; ARAÚJO, 2018), evidenciam a necessidade da resolução do complexo *E. nigrum* (Favaro, 2011), já que é altamente desejável que o nome da espécie faça referência a uma única unidade genômica, e não a complexos com inúmeros genótipos altamente variáveis na sua organização genômica, interação no ambiente e síntese de metabólitos. A disponibilidade de dois genomas de *E. nigrum* tem possibilitando o estudo de genes e possíveis rotas metabólicas relacionadas à biossínteses de metabólitos secundários (FERREIRA, 2016; FOKIN et al, 2017). Na linhagem *E. nigrum* P16, pertencente ao complexo *E. nigrum*, isolada de cana de açúcar e que apresenta atividade antagonista in vitro contra fitopatógenos, foram identificados genes potencialmente envolvidos na biossíntese de epicolactona (BRAGA, 2016).

O presente estudo buscou avaliar a sistemática filogenética de linhagens de *Epicoccum* spp., incluindo algumas do complexo *E. nigrum*, à luz dos avanços na resolução da inferência filogenética do gênero. Avaliar a presença nas linhagens de *Epicoccum* spp. de um gene potencialmente associado à produção da epicolactona, descoberto e descrito na linhagem *E. nigrum* P16. Caracterizar os metabólitos secundários de *Epicoccum* spp. e avaliar a correlação entre história evolutiva, características químicas e padrões de inibição de micro-organismos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. MÉTODOS DE RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA

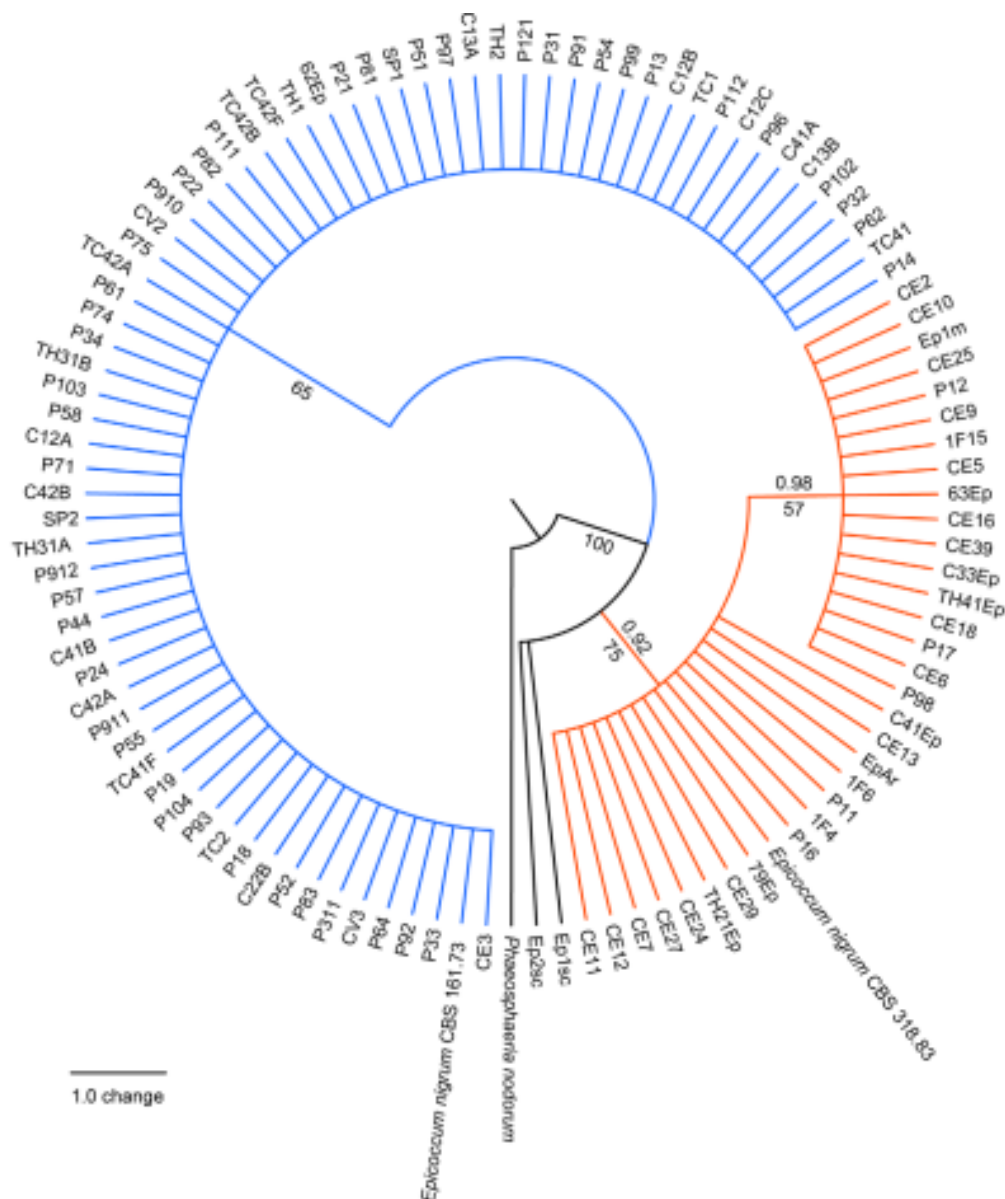
A relação evolutiva entre genes ou espécies é avaliada mediante inferência filogenética. Existem dois tipos de métodos de reconstrução filogenética, os baseados em distâncias e os baseados em caracteres (SWOFFORD; SULLIVAN, 2003). Nos métodos baseados em distâncias é construída uma matriz de distâncias a partir do cálculo da distância entre cada par de sequências, essa matriz é usada para a reconstrução da árvore. Um exemplo dos métodos baseados em distâncias é *neighbour joining*, que aplica um algoritmo de agrupamento à matriz para resolver a filogenia. Os métodos baseados em caracteres comparam simultaneamente todas as sequências no alinhamento, base por base, para calcular um *score*. O *score* da árvore depende do método, por exemplo, o mínimo número de mudanças no caso de Máxima Parcimônia. Entre os métodos baseados em caracteres, Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança usam modelos de substituição, por isso são considerados métodos baseados em modelos, enquanto Máxima Parcimônia não possui um modelo explícito. Todos os métodos tem fortalezas e debilidades (ANEXO A). Quatro critérios devem ser levados em consideração na escolha e avaliação dos métodos de reconstrução de árvores filogenéticas: consistência, eficiência, robustez e velocidade computacional (YANG; RANNALA, 2012).

2.2. SISTEMÁTICA FILOGENÉTICA DO GÊNERO *Epicoccum*

O gênero *Epicoccum* pertence à família Didymellaceae, a maior dentro da ordem Pleosporales (DE GRUYTER et al., 2009). As espécies presentes em Didymellaceae, são cosmopolitas e distribuídas em uma ampla gama de ambientes, sendo que muitos dos membros são classificados como fitopatógenos de um grande número de plantas hospedeiras (AVESKAMP; DE GRUYTER; CROUS, 2008). A definição se uma espécie é simbiote mutualista, um endófito mutualista ou um parasita é bastante difusa e há evidências crescentes de que até patógenos arquetípicos também podem existir em relacionamentos não infecciosos com plantas (NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019). As relações evolutivas e a identificação de espécies da família Didymellaceae se mostrou difícil, baseada por longo tempo em caracteres morfológicos e associação com plantas hospedeiras (CHENG et al., 2015). No entanto, uma análise filogenética baseada na região espaçadora transcrita interna do nrDNA 5.8S (ITS), sequências parciais 28S rDNA da subunidade maior do nrDNA (LSU), sequências parciais da segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*rpb2*) e β -tubulina (*tub2*),

forneceram uma árvore filogenética robusta, redefinindo alguns gêneros como *Epicoccum* (CHEN et al., 2017). Atualmente são reconhecidas 18 espécies no gênero *Epicoccum*. O complexo *Epicoccum nigrum*, com dos genótipos bem definidos por caracteres morfológicos, fisiológicos e divergência genética (Figura 1) requer uma avaliação mais aprofundada para esclarecer suas relações filogenéticas (FÁVARO et al., 2011; CHEN et al., 2017).

Figura 1- Árvore de consenso estrita das árvores mais parcimoniosas inferidas usando sequências ITS1-5.8S-ITS2 de 106 cepas de *Epicoccum*.



As cores representam os dois genótipos; linhas laranjas representam as cepas de *Epicoccum* do grupo 1. As linhas azul e preta representam as cepas do grupo 2. Duas cepas de referência de *E. nigrum* (CBS 318.83 e CBS 161.73) foram incluídas e o acesso de *P. nodorum* AF250830 foi usado como grupo externo. O *bootstrap* e os valores de probabilidade posteriores são mostrados próximos aos nós elevadores. Fonte: Favaro et al. (2011).

2.3. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS

Os metabólitos secundários (MSs) são compostos químicos que geralmente possuem baixo peso molecular e frequentemente têm atividade biológica. Estes MSs são produzidos como famílias de compostos relacionados em momentos específicos do ciclo de vida, associados à estágios de diferenciação morfológica. Os organismos produtores podem crescer sem sintetizar esses metabólitos e somente um pequeno grupo de organismos produz cada metabólito (BENNETT; BENTLEY, 1989). Os MSs de fungos podem ser divididos em quatro classes químicas principais: policetídeos, terpenóides, compostos derivados do ácido chiquímico e peptídeos não ribossomais, os quais são derivados de quatro classes de enzimas: policetídeosintases (PKS), sintases de peptídeos não ribossomais (NRPS), terpeno sintases (TS) e dimetilalil difosfato triptofanosintase (DMATS). Além disso, os metabólitos híbridos compostos de partes de diferentes classes são comuns (PUSZTAHELYI; HOLB; PÓCSI, 2015). Uma característica dos genes de metabólitos secundários é a tendência de serem agrupados (clusters) e frequentemente localizados perto dos telômeros. Esses genes não são expressos de forma constitutiva e sua regulação depende de fatores de transcrição (BRAKHAGE, 2013). Uma análise de genomas fúngicos revelou que os ascomicetos têm mais genes de metabólitos secundários do que os basidiomicetos, os arquimicetos e os quitridiomicetos, enquanto os hemiascomycetes e os zigomicetos não possuem nenhum. O genoma de ascomicetos codifica aproximadamente 16 PKS, 10 NRPS, duas TS e 2 DMATS. Os PKS-NRPSs foram identificados apenas em ascomicetos, com uma média de três genes por espécie (COLLEMARE et al., 2008).

Os peptídeos não ribossomais são derivados de aminoácidos proteínogênicos e não proteínogênicos e são montados por NRPS, enzimas multidomínios e multimodulares. Cada módulo em um NRPS contém vários domínios que permitem o reconhecimento, a ativação e a ligação covalente de um aminoácido específico através de um domínio de serina conservado. Posteriormente são formadas ligações entre aminoácidos ligados, formando peptídeos, os quais são liberados por um domínio localizado na extremidade terminal C do módulo final (MARAHIEL; STACHELHAUS; MOOTZ, 1997). O primeiro NRPS fúngico identificado, δ -(1- α -aminoadipil) -l-cisteinil-d-valina sintetase (ACVS), catalisa a primeira etapa comprometida na biossíntese dos antibióticos β -lactâmicos penicilina e cefalosporina (SMITH; EARL; TURNER, 1990). A diversidade entre os peptídeos não ribossomais depende do comprimento dos peptídeos produzidos, se o peptídeo é cíclico, e nas variações na funções dos domínios das NRPS (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005).

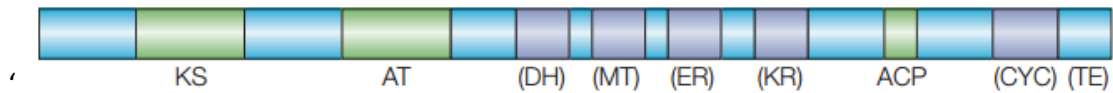
Os terpenóides são talvez os metabólitos secundários mais variáveis estruturalmente. Todos os terpenóides são compostos por várias unidades de isopreno, podem ser lineares ou cíclicos, saturados ou insaturados e podem ser modificados de várias maneiras. São classificados pelo número de unidades de isopreno que contêm, alguns dos mais comuns são os monoterpenos, com duas unidades isopreno, os sesquiterpenos, com três unidades isopreno e os diterpenos, com quatro unidades isopreno. Sintetizados a partir de produtos da via do mevalonato, as TS, são essenciais para a produção de diferentes terpenos a partir de diferentes difosfatos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Os fungos sintetizam vários terpenos importantes, incluindo os aristoloquenos, carotenóides, giberelinas, diterpenos indólicos e tricotecenos. Vários ascomicetos fitopatogênicos, produzem terpenóides como fatores de virulência e micotoxinas. Em contraste, os basidiomicetos, são uma fonte de terpenóides bioativos com uso potencial na indústria farmacêutica (WAWRZYN; BLOCH; SCHMIDT-DANNERT, 2012).

Os alcalóides indólicos são uma das maiores classes de metabólitos secundários que contem nitrogênio, sendo os fungos, especialmente os ascomicetos, bons produtores destes metabólitos, muitos dos quais possuem potente atividade biológica (XU; GAVIA; TANG, 2014). São geralmente derivados do triptofano e do difosfato de dimetilalil, embora às vezes outros aminoácidos além do triptofano possam ser usados como precursores. A via mais bem compreendida é a síntese de ergotamina em *Claviceps purpúrea*. A biossíntese começa com dimetilalil triptofano que é convertido, através de vários intermediários, em ácido lisérgico. A condensação sucessiva da porção de ácido D-lisérgico com três aminoácidos e modificação e ciclização do tripeptídeo D-Lisergilo resultante, produz os alcalóides peptídicos (ergopeptinas) (TUDZYNSKI et al., 1999).

Os policetídeos constituem a classe de metabólitos secundários mais abundante nos fungos e alguns possuem atividade biológica relevante. As PKSs têm sido objeto de extensa revisão e atualmente estão divididas em três classes gerais (tipo I, tipo II e tipo III), embora a troca e a evolução da informação genética entre os organismos tenha levado a classes mistas (MÜLLER, 2004). As PKSs fúngicas são geralmente sistemas multidomínio (tipo I) que alongam interativamente seus produtos e são relacionadas com as sintases de ácidos graxos eucariotos e contêm domínios semelhantes (Figura 2 e Figura 3). Para ambas as enzimas, ácidos carboxílicos de cadeia curta - geralmente acetil coenzima A (acetil CoA) e malonil CoA são condensados para formar cadeias de carbono de vários comprimentos (COX, 2007). Os policetídeos geneticamente melhor caracterizados incluem a cancerígena aflatoxina e a

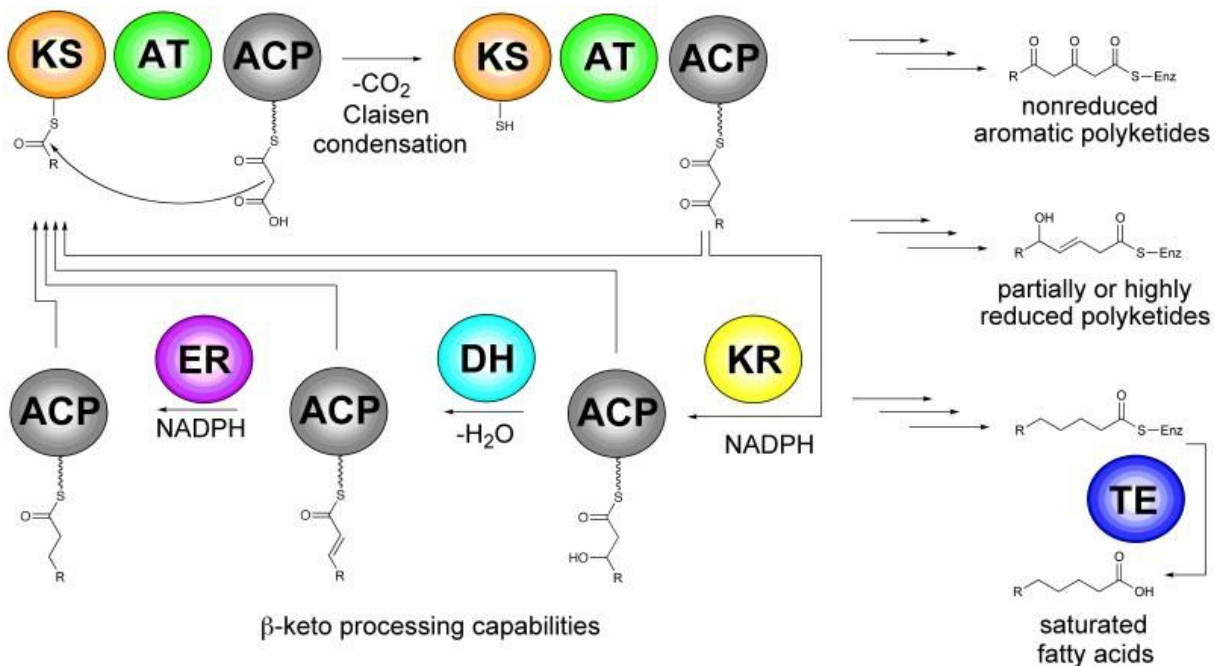
lovastatina, componente comercialmente importante, usado como medicamento para redução do colesterol (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005).

Figura 2- Exemplo de organização estrutural de domínios de uma policetídeo sintase fúngica



A estrutura mínima é KS – AT – ACP. Domínios opcionais estão entre parênteses. A síntese de policetídeos é iniciada quando acetil e malonil coenzima A (CoA) são carregados como tioésteres na 4'-fosfopanteteína de um domínio transportador de acilas (ACP) por meio do domínio de aciltransferase (AT). A condensação ocorre então com outro intermediário tioéster ligado ao domínio da cetoacil-CoA sintase (KS) e ocorre a descarboxilação do intermediário ligado ao ACP. O β -cetotioéster resultante pode então ser reduzido pela ação do domínio ketoreductase (KR), seguido por desidratação pelo domínio desidratase (DH). Se um domínio enoil redutase (ER) estiver presente, um intermediário insaturado é formado. Algumas PKSs contêm um domínio metiltransferase (MT) que metila o carbono α do tioéster. CYC, ciclase; TE, tioesterase (Fonte: Keller; Turner; Bennett, 2005).

Figura 3- Elementos básicos de processamento de ácidos graxos e policetídeos



Os substratos em crescimento são passados de um lado para o outro entre o KS e o ACP através de transferências tioéster (Enz = enzima: KS ou ACP). A acil-transacilase (AT) carrega o ACP de substratos acil-CoA iniciadores ou extensores. A complexidade do produto decorre do número de ciclos (controle de comprimento da cadeia) e do processamento redutivo seletivo que podem ocorrer durante a montagem do produto por uma ketoreductase (KR), desidrase (DH) ou enoil-redutase (ER). O TE é frequentemente usado para encerrar a síntese e liberar o produto final. Os sistemas do tipo II são proteínas isoladas, que se associam para formar um complexo multienzimático, ao passo que os sistemas do tipo I são fundidos em proteínas únicas com múltiplos domínios (Fonte: Crawford, Townsend, 2010).

2.4. ASPECTOS EVOLUTIVOS DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os motivos pelos quais os micro-organismos possuem um metabolismo secundário tem sido objeto de intenso debate por muitas décadas, assim como sua expressão sob condições experimentais, já que alguns metabólitos secundários possuem atividade biológica muito potente, mas a maioria não apresenta atividade sob condições de laboratório (FIRN; JONES, 2000). Os *clusters* de genes de metabólitos secundários são cassetes independentes para a produção de metabólitos. A expressão dos *clusters* de metabólitos secundários está tipicamente sob controle ambiental e/ou do desenvolvimento e, é mediada por cascatas regulatórias complexas (HOFFMEISTER; KELLER, 2007). Refletindo isso, os *clusters* são frequentemente "silenciados" sob condições de laboratório que não fornecem os gatilhos ecológicos apropriados. *Clusters* gênicos silenciosos (ou "crípticos") são aqueles implicados na síntese de metabólitos secundários baseados em suas anotações de sequência, mas para os quais as condições necessárias para desencadear a expressão e, portanto, a biossíntese dos intermediários e produtos da via, não são ainda conhecidas (OSBOURN, 2010). É provável que a evolução das vias metabólicas secundárias tenha sido impulsionada pela necessidade de sobreviver em nichos ambientais complexos. A troca metabólica no ambiente poderia, portanto, mediar as interações entre os micro-organismos de uma comunidade (YANG et al., 2009). No caso de clusters de PKS, espécies dentro de diferentes classes de Pezizomycotina compartilham os mesmos grupos de genes de PKS. Sendo que diferentes genomas fúngicos compartilham poucos genes putativos de PKS ortólogos, mesmo entre genomas estreitamente relacionados na mesma classe ou gênero. As distribuições descontínuas de PKSs ortólogas entre espécies fúngicas podem ser explicadas por duplicação gênica, divergência, perda gênica, e por transferência horizontal de genes entre os fungos (KROKEN et al., 2003).

2.5. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Epicoccum* spp.

Muitos metabólitos secundários produzidos por *Epicoccum* spp. como policetídeos, híbridos de policetídeos, terpenóides e dicetopiperazinas, foram isolados e caracterizados. Entre esses metabólitos se encontram pigmentos e compostos que apresentam atividade antimicrobiana, antioxidante, anticâncer, e de inibição da replicação viral, fazendo das espécies do gênero *Epicoccum* importantes produtores de compostos com potenciais aplicações biotecnológicas (BRAGA; PADILLA; ARAÚJO, 2018). Muitos policetídeos são produzidos por *Epicoccum* spp. (Figura 4), entre eles a flavipina (BAMFORD; NORRIS; WARD, 1961),

um composto com uma ampla gama de atividades biológicas e que tem sido postulado como precursor de compostos antimicrobianos como a epicolactona e as epicoccolidas A e B, e relacionada com a biossíntese de epicoccona A, epicoccona B, epicoccina e epicolactona (EL AMRANI et al., 2013; TALONTSI, et al., 2013). Entre os metabólitos híbridos de policetídeos descritos em *Epicoccum* spp. destacam as epicoccarinas A e B e a epipiridona, que são metabólitos híbridos de peptídeos não-ribossomais e policetídeos, provavelmente relacionados biossinteticamente e que apresentam atividade contra bactérias gram-positivas (KENAMI WANGUN; HERTWECK, 2007). As epicoccamidas A-D são metabólitos híbridos policetídeo-carboidrato-peptídeo não ribossomal, entre eles a epicoccamida D apresenta atividade citotóxica (WRIGHT; OSTERHAGE; KÖNIG, 2003). Também tem sido recentemente isolado um meroterpenoide, de origem terpenóide e policetídeo, com atividade antimicrobiana (PERVEEN et al., 2017). As dicetopiperazinas (DKP) provavelmente são sintetizadas por NPRs e apresentam diversas funções biológicas, entre estas DKPs têm sido isoladas a triornicina e a isotriornicina, assim como as epicorazinas A-B e as epicoccinas A-D, algumas com atividade antimicrobiana (FREDERICK et al., 1981; GUO et al., 2009). Entre os terpenóides produzidos por *Epicoccum* spp. estão os pigmentos carotenóides: β -caroteno (amarelo), γ -caroteno (laranja), rodoxantina (vermelho) e torularodina (violeta) (GRIBANOVSKI-SASSU; FOPPEN, 1967)

O sequenciamento e anotação do genoma da linhagem *E. nigrum* P16, pertencente ao complexo *E. nigrum*, isolada de cana de açúcar e que apresenta atividade antagonista in vitro contra fitopatógenos, levou a identificação de 38 clusters de metabólitos secundários. Entre esses clusters foram identificados 13 envolvidos na produção de NRPS, 9 de policetídeos do tipo 1 (T1PKS), 1 de policetídeos tipo 3 (T3PKS), 5 de terpenóides e 2 de indol (FERREIRA, 2016). Neste mesmo genoma, uma análise da arquitetura de domínio revelou cinco PKSs não redutoras (NR-PKSs), duas PKSs parcialmente redutoras (PR-PKSs), quatro PKSs altamente redutoras (HR-PKSs) e uma PKS tipo III. Além disso, também foi anotado o gene de uma sintase híbrida PKS-peptídeo não ribossomal (PKS-NRPS) (BRAGA, 2016).

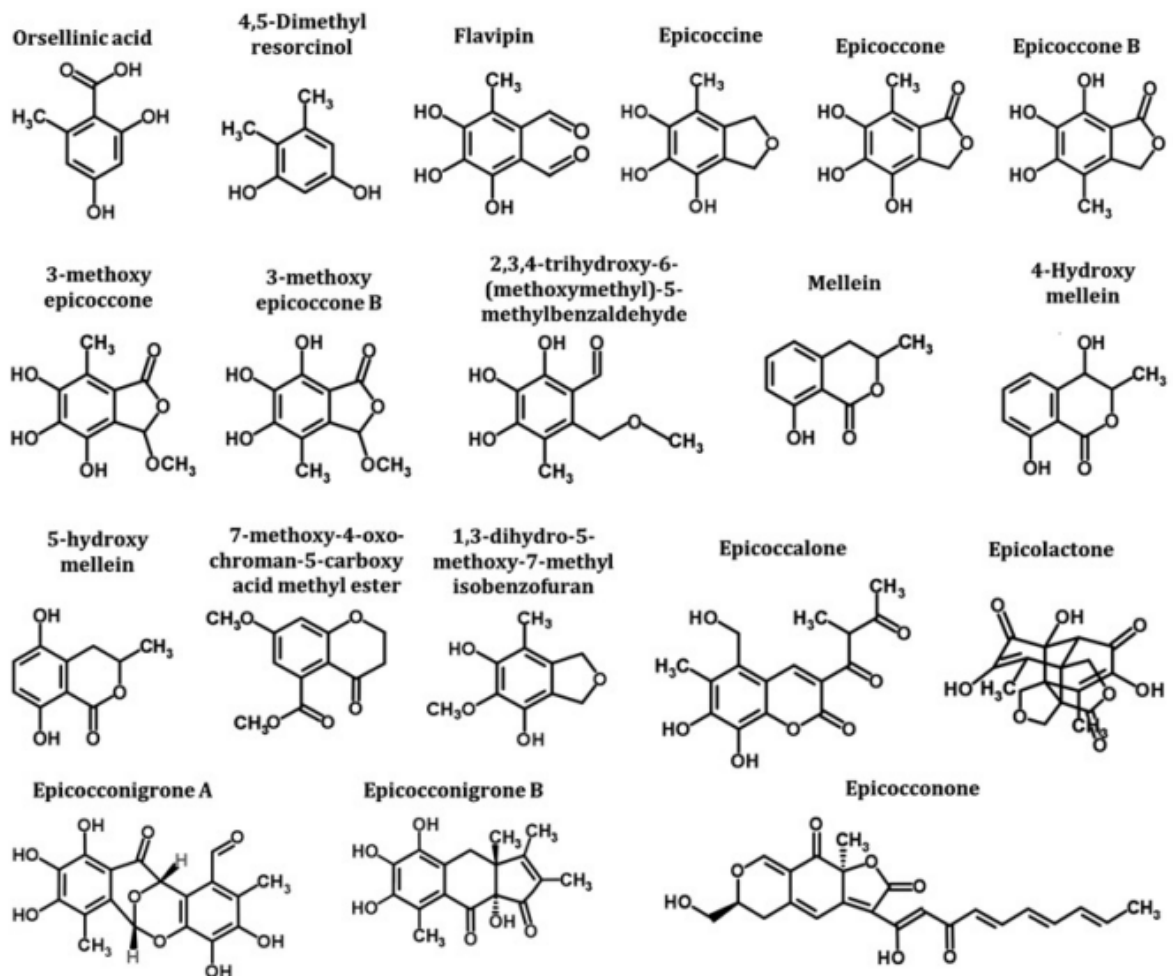
2.6. A EPICOLACTONA

A epicolactona é um policetídeo com uma estrutura química pouco usual e com atividade antimicrobiana, isolado pela primeira vez da linhagem *Epicoccum nigrum* P16, endofítica de cana de açúcar (DA SILVA ARAÚJO et al., 2012). A epicolactona apresenta

atividade antimicrobiana nas bactérias *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, assim como inibição do crescimento do micélio dos fitopatógenos *Pythium ultimum*, *Aphanomyces cochlioides* e *Rhizoctonia solani* (TALONTSI et al., 2013).

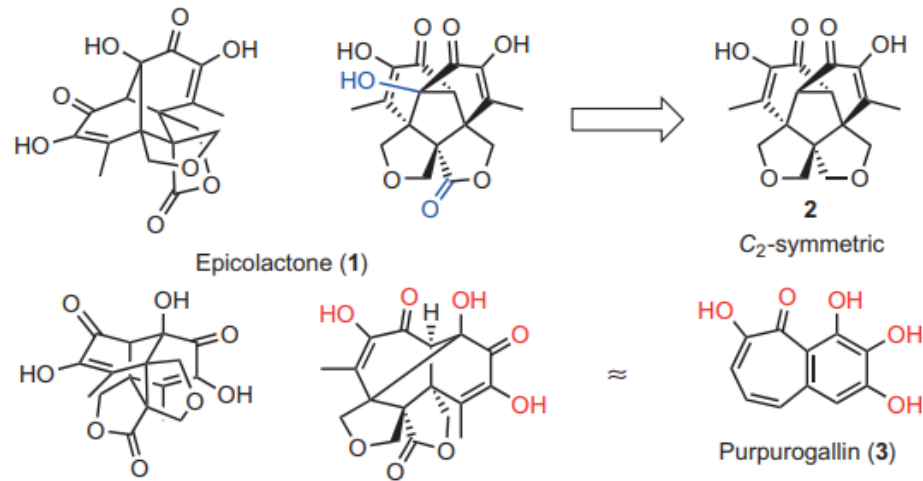
A estrutura da epicolactona compreende cinco anéis interconectados que formam um esqueleto de carbono simétrico com cinco estereocentros contíguos, três dos quais são quaternários (Figura 5), fazendo da epicolactona uma molécula natural única e gerando um grande interesse nos genes relacionados à sua biossíntese (DA SILVA ARAÚJO et al., 2012; CASINI et al., 2018).

Figura 4- Policetídeos produzidos por *Epicoccum* spp.



Estrutura química de policetídeos produzidos por *Epicoccum* spp. (Fonte: Braga; Padilla; Araújo, 2018)

Figura 5- Estrutura química da epicolactona desde diferentes perspectivas.

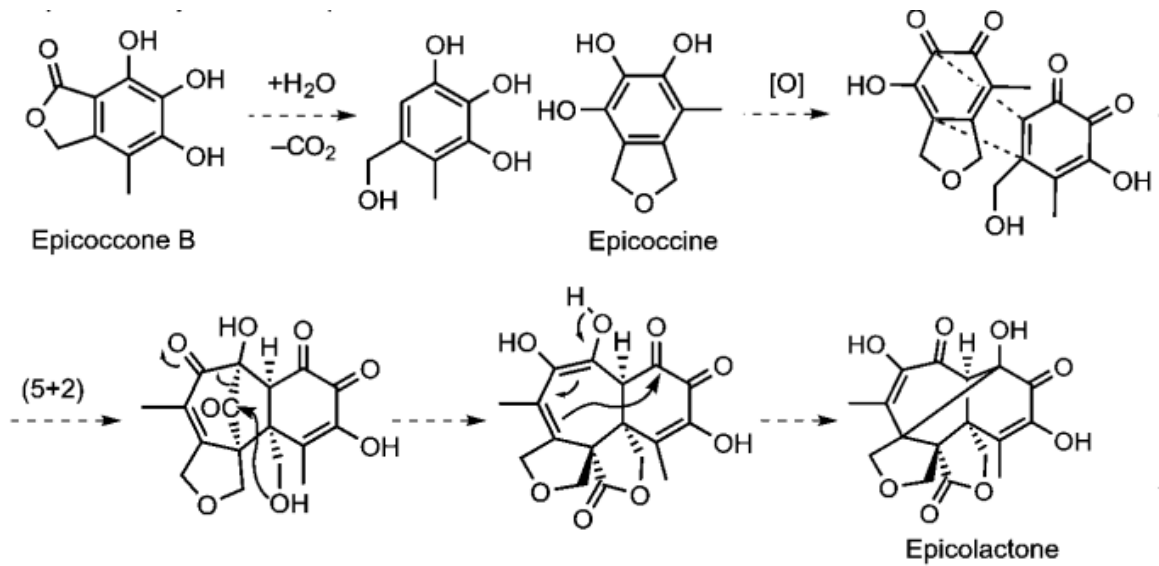


Das quatro perspectivas (esquerda), a vista superior direita revela a estrutura central simétrica em C₂ e a vista inferior direita revela a semelhança com outro produto natural, a purpurogalina. Fonte: Ellerbrock et al., 2015.

2.7. GENES ENVOLVIDOS COM A ROTA DE BIOSÍNTESE DA EPICOLACTONA

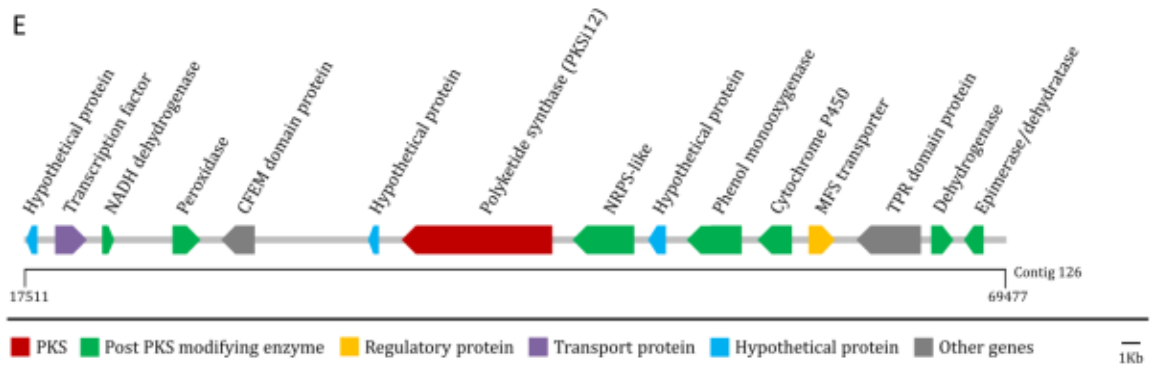
No estudo realizado por Braga (2016), que teve por objetivo a identificação de genes potencialmente envolvidos na síntese de epicolactona e seus precursores, foram identificados no genoma de *E. nigrum* P16, com ferramentas bioinformáticas, 12 genes que codificam PKSs dispersos entre 11 *clusters* gênicos. A deleção do gene PKSi12 mostrou que seus produtos estão relacionados à atividade antagônica de *E. nigrum* contra fitopatógenos fúngicos e uma análise química permitiu identificar que a produção dos precursores da epicolactona, propostos por Ellerbrock et al. (2015), epicoccina e epicoccona B (Figura 6) foi afetada no mutante Δ PKSi12 (Figura 7), sugerindo então que este gene poderia estar envolvido na via de biossíntese da epicolactona em *E. nigrum* P16.

Figura 6- Proposta de biossíntese da epicolactona.



Fazendo um paralelo com a biossíntese da purpurogalina, foi proposto que a epicolactona é biossintetizada através da dimerização oxidativa da epicoccona B e da epicoccina, dois policetídeos previamente isolados de *Epicoccum* spp. Fonte: Ellerbrock et al., 2015.

Figura 7- Organização do cluster gênico PKS12.



A anotação foi baseada em domínios e proteínas homólogas. Fonte: Braga (2016).

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a filogenética de linhagens de *Epicoccum* spp. baseada em caracteres moleculares e verificar sua correlação o padrão de inibição do crescimento de micro-organismos e a presença de genes associados à rota de biossíntese da epicolactona.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma reconstrução filogenética das linhagens de *Epicoccum* spp. com base nas sequências parciais do espaçador interno transcrito (ITS) e o gene da β -tubulina (*tub2*).
- Desenhar *primers* específicos para o domínio KS da PKS12 e avaliar a presença deste gene nas linhagens de *Epicoccum* spp.
- Extrair os metabólitos secundários das linhagens de *Epicoccum* spp. e avaliar o padrão de inibição de bactérias e fungos.
- Avaliar a correlação entre a distância genética e o perfil de inibição de bactérias e fungos.
- Realizar uma análise cromatográfica dos extratos de *Epicoccum* spp. e determinar as relações evolutivas de cepas realizando análises quimiométricas multivariadas com seus perfis metabólicos e mapeando isso para uma análise filogenética baseada em dados de quimiotaxonomia.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. LINHAGENS E CONDIÇÕES DE CULTURA

A maioria das 77 linhagens de *Epicoccum* spp. utilizadas, foram isoladas de diferentes tecidos de cana de açúcar tradicional e transgênica, as linhagens 1F15, 1F4 e 1F6 foram isoladas de *Vitis labrusca* (APÊNDICE A). As linhagens isoladas de culturas do estado de São Paulo foram identificadas morfológicamente por Romão & Araújo (2007), Brum (2008) e Fávoro, (2009) e fazem parte da coleção de micro-organismos do Laboratório de Biologia Molecular e Ecologia Microbiana (LABMEM ICB/USP). Para reativar as linhagens, preservadas em água destilada (CASTELLANI, 1939), os *plugs* de micélio foram transferidos para placas contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e incubadas a 28°C por 7 a 15 dias.

4.2. EXTRAÇÃO E MANIPULAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Fragmentos das culturas dos fungos mantidos por 7 a 15 dias em meio BDA a 28°C, foram inoculadas sobre membranas de celofane esterilizadas em autoclave e colocadas na superfície de placas com meio BDA (VOLCAN, 1973). A cultura foi incubada por 7 a 15 dias a 28°C. Após o cultivo, o micélio foi triturado em nitrogênio líquido e o DNA genômico foi extraído com “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” (Promega) e a qualidade do DNA avaliada em gel de agarose (1% p/v) com “SYBR® Safe DNA Gel Stain” (Thermo Fisher Scientific).

4.3. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL E DO GENE DA β -TUBULINA

A região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal foi amplificada com os *primers* universais para o reino Fungi, ITS-1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), o gene da β -tubulina foi amplificado com os *primers* Bt2 (5'GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') e Bt2b (5'ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') (GLASS; DONALDSON, 1995), os quais amplificam regiões de aproximadamente 600 pb e 350 pb, respectivamente (WHITE et al., 1990; FAVARO et al., 2011). As reações foram preparadas em volume final de 50 μ L, contendo DNA genômico (1,0 ng/ μ L), 1X de buffer da enzima, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 μ M de cada *primer* e 2,5 U de *Easy®Taq DNA polimerase*. O termociclador foi programado para uma desnaturação

inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos; 30 segundos a 55°C para a região ITS1-5,8S-ITS2 e 58°C para o gene da β -tubulina; 1 minuto a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C em termociclador (VERITI 96-WELL THERMAL CYCLER, 0.2ML, Applied Biosystems) (GARDES; BRUNS, 1993).

Os produtos da PCR da região ITS1-5,8S-ITS2 e do gene da β -tubulina, foram analisados em gel de Agarose (1% p/v e 3% p/v respectivamente) com “SYBR® Safe DNA Gel Stain” (Thermo Fisher Scientific), junto com o marcador de peso molecular “1 Kb Plus DNA Ladder” (Thermo Fisher Scientific) e posteriormente, purificados utilizando “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) e sequenciados pelo método de Sanger na Macrogen Inc. (Coreia do Sul).

4.4. ANÁLISE FILOGENÉTICA BASEADA EM MARCADORES MOLECULARES

As sequências de nucleotídeos dos genes de interesse (item 4.3) foram inicialmente analisadas com o software Geneious® 7.0.6 (KEARSE et al., 2012) para eliminar bases de baixa qualidade e, uma comparação de cada sequência com a base de dados do GenBank foi realizada usando a ferramenta *Basic Logical Alignment Search Tool* (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A análise filogenética foi realizada com os *datasets* das 77 linhagens juntamente com sequências referência do GenBank (ANEXO B). Alinhamentos subsequentes para cada locus foram gerados com o MAFFT v.7 (KATO; ROZEWICKI; YAMADA, 2017) e manualmente corrigidos quando necessário. O conjunto de dados alinhados concatenados e cada locus, foi analisado separadamente usando Máxima Verossimilhança (MV) no MEGA7 usando um modelo de distribuição gama com 1000 réplicas de *bootstrap*. A robustez das análises foi avaliada pelo suporte de *bootstrap* (considerando como significativos valores maiores do que 70, SBMV>70) (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

4.5. DESENHO DE *PRIMERS* ESPECÍFICOS PARA O CLUSTER PKSi12

Com base na anotação do *cluster* NR-PKSi12 (BRAGA, 2016), foram desenhados *primers* específicos para o gene da policetídeo sintase (ORF_7_PKSi12), utilizando o software Geneious® 7.0.6 (KEARSE et al., 2012) com algoritmo do Primer 3. Os *primers* denominados PKSi12_4F (5'-GCTTGGTGTCCACGAACAAC-3') e PKSi12_4R (5'-

CTGGGACGAGACATGGATCG-3') geraram um amplicon com tamanho esperado de 1246 bases, com base na otimização das condições da PCR utilizando o DNA da linhagem P16. As reações com DNA das 77 linhagens de *Epicoccum* foram preparadas em volume final de 25 µL, contendo DNA genômico (1,0 ng/µL), 1X de buffer da enzima, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de cada *primer* (PKSi12_4F e PKSi12_4R) e 1,25 U de *Easy®Taq DNA polimerase*. Os ciclos de PCR foram: desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; 30 segundos a 62°C; 1 minuto e 30 segundos a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C em termociclador (VERITI 96-WELL THERMAL CYCLER, 0.2ML, Applied Biosystems).

Os produtos da PCR foram analisados em gel de Agarose (1% p/v) com “SYBR® Safe DNA Gel Stain” (Thermo Fisher Scientific), junto com o marcador de peso molecular “1 Kb Plus DNA Ladder” (Thermo Fisher Scientific) para determinar a presença do amplicon.

4.6. EXTRAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Epicoccum* spp.

As linhagens de *Epicoccum* sp. foram cultivadas em placas de Petri de 90 mm contendo 25 mL de meio BDA a 28°C por 30 dias. Após crescimento, o conteúdo de cada placa, meio de cultura e micélio, foram transferidos para frascos de Erlenmeyer contendo 70 mL de acetato de etila (MOORER, 1984; VANDERMOLEN, 2013) e a extração foi realizada com agitação constante durante 2 dias. A fase orgânica foi filtrada e evaporada a pressão reduzida até obtenção do extrato seco, o extrato foi ressuscitado em metanol e transferido para tubo âmbar de 20 mL e deixado para secar. Depois de seco foi determinado o peso do extrato seco (APÊNDICE A). Parte de cada extrato foi usada nos testes de antagonismo com bactérias e fungos, a massa restante foi armazenada para análises cromatográficas.

4.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE *Epicoccum* spp.

Para avaliar a atividade antagônica do extrato de acetato de etila das linhagens de *Epicoccum* sp. contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, foi usado o método de microdiluição em caldo (CLSI, 2015). Para estabelecer as concentrações de extrato a ser usado com cada bactéria foi estabelecida a

concentração inibitória mínima do extrato da linhagem de *E. nigrum* P16 como padrão para as quatro bactérias.

O extrato de cada fungo foi inicialmente diluído em dimetilsulfóxido (DMSO), a fim de garantir a total solubilização do extrato e evitar sua interferência nos ensaios, os extratos foram diluídos de forma que a concentração de DMSO na solução final de uso fosse inferior que 1,2%. Posteriormente essa diluição inicial foi usada para preparar uma solução do extrato a uma concentração de 2048 µg/mL em meio Müeller-Hinton, meio padrão para a realização do ensaio. Para isso, as bactérias desafiadas foram inoculadas em meio Luria-Bertani por 16 a 20 horas a 37°C e 150 RPM, posteriormente foram centrifugadas e ressuspendidas em meio Müeller-Hinton e foi determinada sua densidade ótica (D_{600nm}).

Foram usadas microplacas de 96 poços de fundo plano Jetbio (Guangzhou, China) com o extrato a ser testado diluído no meio Müeller-Hinton, os quais foram inoculados com as culturas das bactérias para obter uma concentração bacteriana inicial de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. Foram avaliadas as concentrações 512 µg/mL, 256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL e 1 µg/mL do extrato de *E. nigrum* P16 por duplicata e linha dupla por réplica. As placas de microdiluição foram incubados a 37°C por 16 a 20 horas e após a incubação, a leitura da placa, com a determinação da CIM, foi realizada visualmente. Para avaliar a correlação entre os padrões de inibição de cada par de bactérias e entre cada bactéria e a presença do amplicon da KS do PKSi12, foi usada a matriz de presença ausência de estas variáveis (APÊNDICE A) e a ferramenta *Draftsman plot* do PRIMER (Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research) *statistical software* (v 7.0.113 PRIMER-E Ltd., UK) (CLARKE; GORLEY, 2015) que gerou uma matriz de correlação e calculou os coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis.

Para avaliar a atividade antagônica dos extratos das linhagens contra os fungos *Fusarium verticillioides*, *Ceratocystis fimbriata*, *Curvularia lunata*, *Hyphodontia microspora* e duas linhagens de *Ceratocystis paradoxa*. Alíquotas de 20µL de soluções 512 µg/mL dos extratos em DMSO, foram colocadas em discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro, deixadas para secar e colocados em placas com BDA a 3 cm de distância de discos de 7 mm de diâmetro de culturas dos fungos a serem testados. Os controles negativos consistiram em placas de cultura dos fungos com discos impregnados com DMSO. As placas foram incubadas a 28°C por 6 a 7 dias (SCORZONI et al., 2007). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.8. CORRELAÇÃO DA DISTÂNCIA GENÉTICA DAS LINHAGENS E OS PERFIS DE INIBIÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS DOS EXTRATOS DE *Epicoccum* spp.

Para avaliar a correlação entre a distância genética e o perfil de inibição de micro-organismos pelos extratos das linhagens de *Epicoccum* spp., foi realizado um teste pareado de correlação entre a matriz de distância genética e a matriz de distâncias do padrão de inibição, com o uso da ferramenta RELATE do PRIMER (Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research) *statistical software* (v 7.0.113 PRIMER-E Ltd., UK) (CLARKE; GORLEY, 2015). A matriz de distância genética, em termos de *p-distance*, foi obtida da árvore de *neighbor joining* (NJ) com o modelo evolutivo de Jukes-Cantor, das sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal e do gene da β -tubulina concatenadas, no MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). A matriz de distâncias do padrão de inibição foi obtida com a ferramenta *Resemblance* do PRIMER (Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research) *statistical software* (v 7.0.113 PRIMER-E Ltd., UK), usando como medida de distância *Modified Gower*. A matriz de presença-ausência de inibição foi construída escolhendo o valor 1 para a capacidade de inibir e o valor 0 para a incapacidade de inibir.

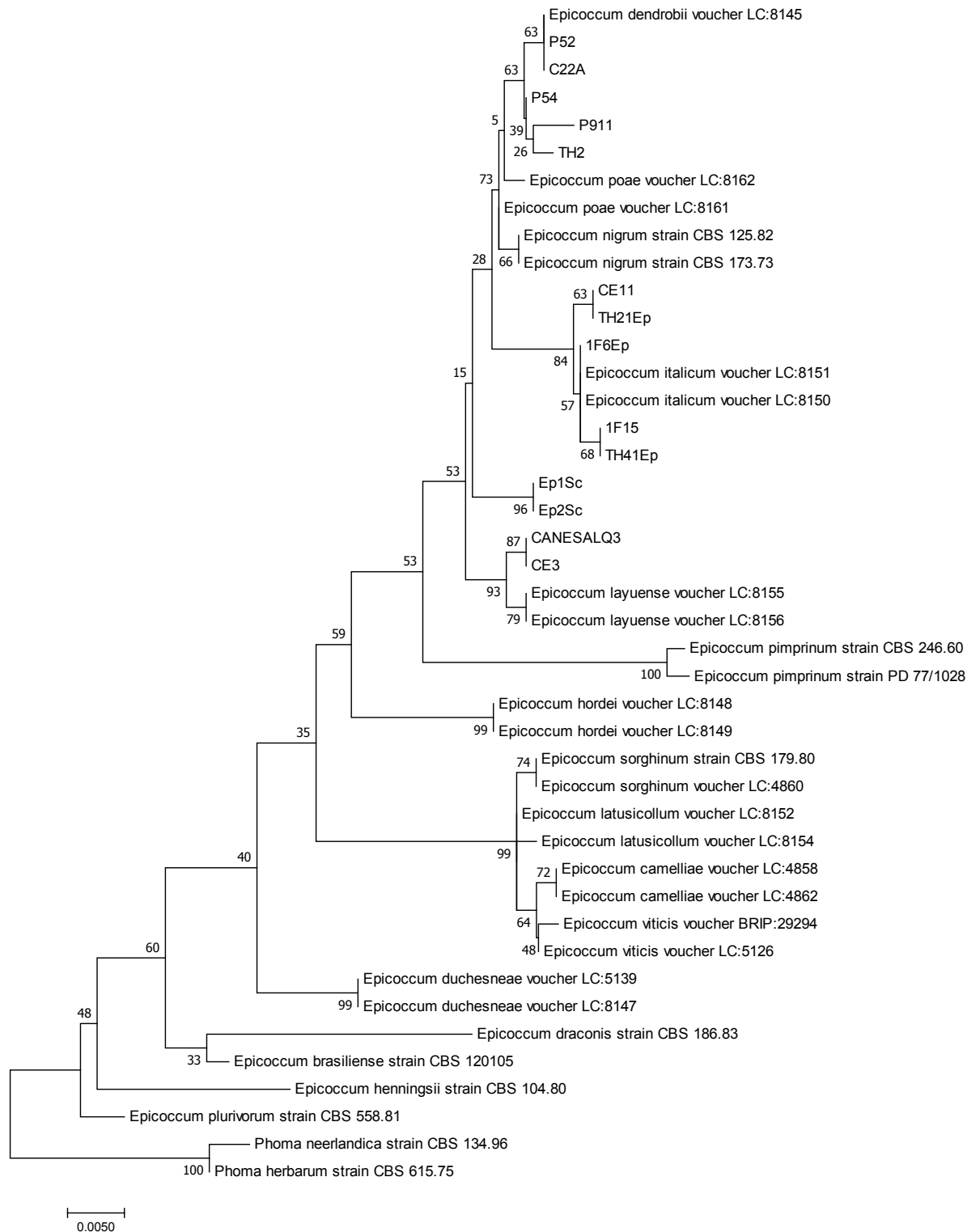
5 RESULTADOS

5.1. ANÁLISE FILOGENÉTICA DAS LINHAGENS DE *Epicoccum* spp.

A filogenia, baseada em caracteres moleculares (região ITS1-5,8S-ITS2 do gene rRNA e o gene da β -tubulina), foi usada para avaliar a abrangência filogenética da população de *Epicoccum* spp.. As árvores de máxima verossimilhança analisadas dos loci originais e a concatenada contendo 77 isolados de *Epicoccum* spp., não tiveram sucesso em resolver as relações filogenéticas entre as linhagens (APÊNDICES B, C e D), sendo necessário escolher sequências filogeneticamente divergentes para resolver a filogenia. A filogenia, baseada na região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal e o gene da β -tubulina concatenados, foi usada para avaliar a abrangência filogenética de *Epicoccum* spp. (Figura 8). O *dataset* concatenado resultante das 41 linhagens, 14 das linhagens de *Epicoccum* spp. avaliadas e 27 de espécies tipo do gênero *Epicoccum*, consistiu de 583 caracteres (454 da região ITS1-5,8S-ITS2 e 129 do gene da β -tubulina) dos quais 508 foram conservados e 75 foram informativos. A árvore baseada em máxima verossimilhança das sequências concatenadas possui os valores de suporte de *bootstrap* em cada ramo e foi enraizada usando sequências de três espécies do gênero *Phoma*. Nesta filogenia, linhagens de *Epicoccum* spp. consideradas no complexo *Epicoccum nigrum* se apresentaram monofiléticas com outras espécies do gênero como *E. dendrobii*, *E. italicum* e *layuense*, nos dois últimos casos o valor de SBMV que dá suporte aos clados, é significativo (SBMV>70) (Figura 8).

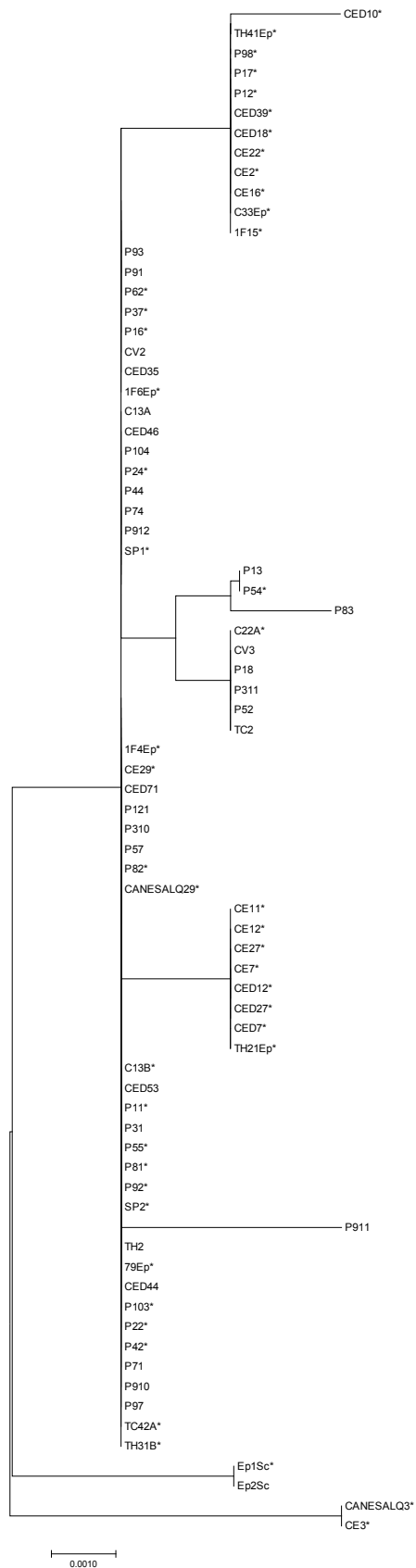
5.2. DISTÂNCIA GENÉTICA DAS LINHAGENS

A árvore de *neighbor joining* (NJ) com o modelo evolutivo de Jukes-Cantor com as sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal e do gene da β -tubulina concatenadas (Figura 9) mostra que não é possível a resolução das relações evolutivas entre muitas das linhagens pelas suas distâncias genéticas, como acontece com análise de máxima verossimilhança. Como o foco da análise de correspondência foi usar o padrão, a árvore foi usada para gerar uma matriz de distância genética, em termos de *p-distance*. Essa matriz de distância foi avaliada visualmente pelo agrupamento hierárquico dos valores (Figura 10).

Figura 8- Análise Filogenética Molecular pelo Método da Máxima Verossimilhança

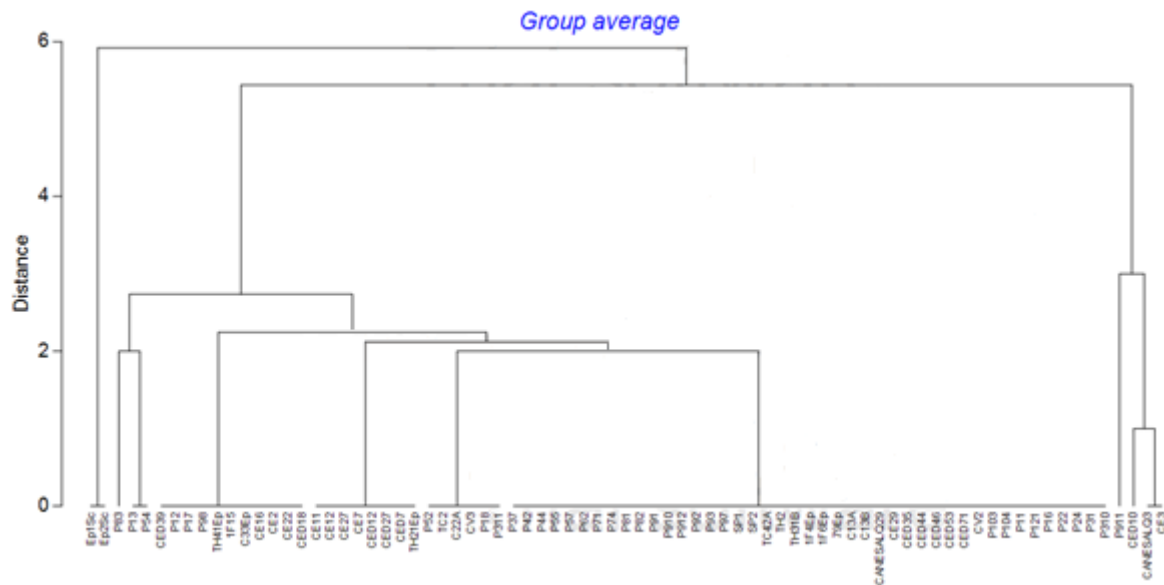
Árvore filogenética inferida a partir da análise de máxima verossimilhança baseada no alinhamento concatenado das sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal e do gene da β -tubulina de 41 linhagens do gênero *Epicoccum*. Os valores de suporte de *bootstrap* (SBMV) aparecem nos ramos. Três espécies do gênero *Phoma* foram utilizadas como grupo externo.

Figura 9- Distância genética entre linhagens de *Epicoccum* spp. por *neighbor joining* (NJ)



Distância evolutiva inferida usando o método *neighbor joining*. A análise envolveu sequências concatenadas das 77 linhagens de *Epicoccum* spp. Como um total de 591 posições *dataset* final. O “*” indica a presença do amplicon da KS da PKSi_12.

Figura 10- Cluster da distância genética entre linhagens de *Epicoccum* spp.



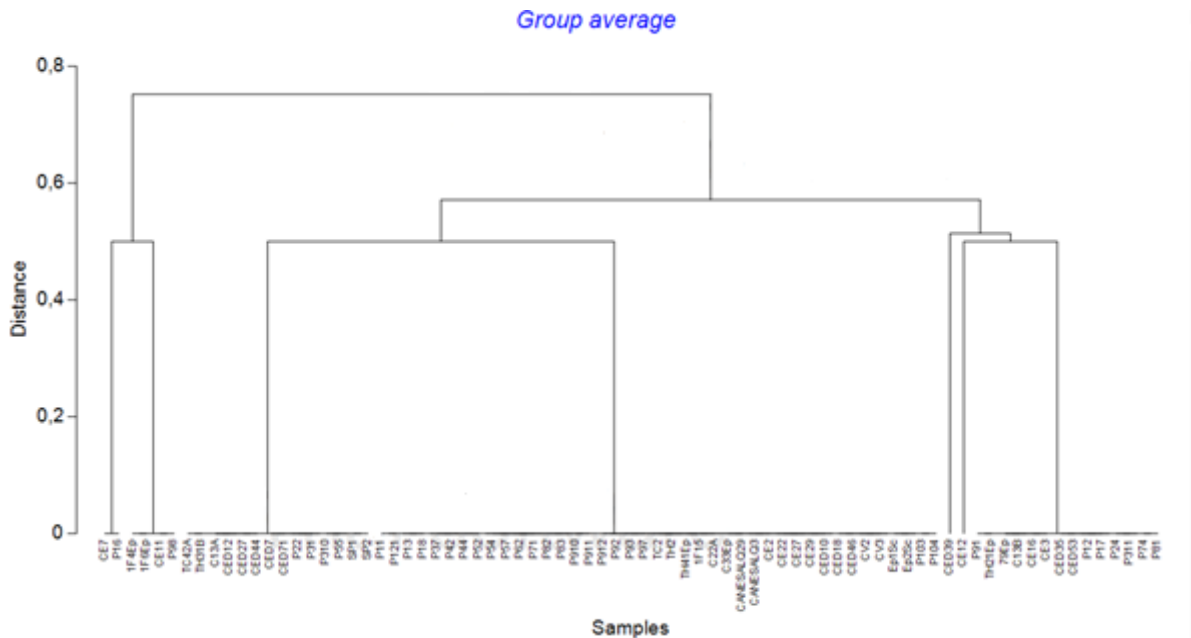
Análise de *cluster* das distâncias genéticas das linhagens de *Epicoccum* spp. obtido mediante a ferramenta *Cluster analysis* do programa PRIMER versão 7.0.13 (CLARKE; GORLEY, 2015). Como modelo de agrupamento foi usada a distância média do grupo.

5.3. PERFIS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE *Epicoccum* spp.

Os valores concentração inibitória mínima (MIC) do extrato da linhagem *E. nigrum* P16 a diferentes patógenos, foram usados para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos das outras linhagens de *Epicoccum* spp. A MIC do extrato de *E. nigrum* P16 para bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) foi de 512µg/mL e para bactérias Gram-positivas entre 512µg/mL e 256µg/mL para *Bacillus subtilis* e de entre 128µg/mL e 256µg/mL para *Staphylococcus aureus*. Dessa forma, foram usadas as concentrações de 256µg/mL e 512µg/mL para avaliar a atividade inibitória no crescimento das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. Entre as 77 linhagens de *Epicoccum* spp. avaliadas, 61 apresentaram atividade inibitória do crescimento de *Bacillus subtilis*, 21 inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus*, sete inibiram o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e duas inibiram o crescimento de *Escherichia coli* (APÊNDICE A). Não foi observada correlação entre os padrões de inibição das bactérias. O teste correlação de Pearson entre cada par de bactérias não apresentou correlação; *E. coli* e *B. subtilis* ($r = 0,083633$), *E. coli* e *P. aeruginosa* ($r = 0,5164$), *E. coli* e *S. aureus* ($r = 0,26667$), *B. subtilis* e *P. aeruginosa* ($r = 0,050611$), *B. subtilis* e *S. aureus* ($r = 0,24175$), *P. aeruginosa* e *S. aureus* ($r = 0,41496$). Nenhum dos extratos apresentou atividade inibitória ao crescimento dos fungos avaliados. A

matriz de distâncias pareadas do perfil inibitório dos extratos, gerada com a ferramenta *Resemblance operation* e a métrica *Modified Gower* foi avaliada visualmente pelo agrupamento hierárquico dos valores (Figura 11).

Figura 11- Cluster de distância entre atividade inibitória dos extratos de *Epicoccum* spp.



Análise de *cluster* das distâncias entre atividade inibitória dos extratos de *Epicoccum* spp. obtido mediante a ferramenta *Cluster analysis* do programa PRIMER versão 7.0.13 (CLARKE; GORLEY, 2015). Como modelo de agrupamento foi usada a distância média do grupo.

5.4. CORRELAÇÃO ENTRE A DISTÂNCIA GENÉTICAS E A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Epicoccum* spp.

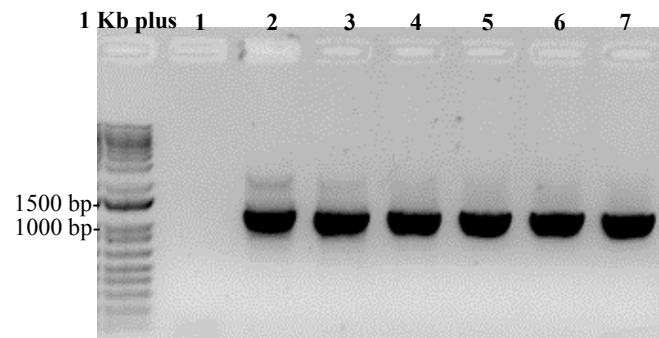
Com base na análise de correlação entre as árvores geradas com marcadores moleculares e o padrão de inibição (marcador fisiológico), não foi observada correlação entre a distância genética e a atividade microbiana. O teste pareado de correlação entre a matriz de distância genética e a matriz de distâncias do padrão de inibição mostrou que a correlação entre as duas matrizes não é estatisticamente significativa ($P = 0,722$, $\rho = -0,041$).

5.5. PRESENÇA DO AMPLICON DA KS DA PSKi12

As condições de PCR para amplificação da KS da PKSi2, utilizando os *primers* PKSi12_4F e PKSi12_4R foram otimizadas com o DNA da linhagem P16 (Figura 12) permitindo a obtenção do fragmento de aproximadamente 1240 pb. Posteriormente, utilizando

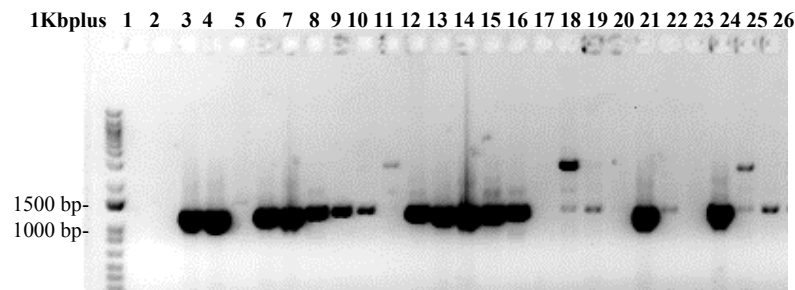
estas condições, foi possível detectar este gene em 47 das 77 linhagens avaliadas, incluindo a mais basal das linhagens (Figura 10) (APÊNDICE A). A amplificação da região sugere a presença do potencialmente associado à rota de biossíntese da epicolactona em isolados de *Epicoccum* sp. incluindo aqueles que se apresentaram monofiléticos com espécies diferentes a *Epicoccum nigrum*. Com base na análise de correlação entre o padrão de inibição de cada microrganismo e a presença do amplicon da KS, não foi observada correlação entre a presença do gene e a atividade microbiana. O teste correlação de Pearson entre a presença da KS e o padrão de inibição de *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* não apresentou correlação ($r = 0,13047$, $r = -0,080982$, $r = 0,25265$, $r = 0,19026$, respectivamente).

Figura 12- Amplificação da KS do cluster PKSi12 sob diferentes condições de PCR



Amplicons de aproximadamente 1246 bases gerados com os *primers* PKSi12_4F e PKSi12_4R a partir de DNA da linhagem P16. Diferentes temperaturas de anelamento dos *primers* foram testadas e comparadas; 1-branco, 2-50°C, 3-52°C, 4-54°C, 5-56°C, 6-60°C e 7-62°C.

Figura 13- Amplificado da KS do cluster PKSi12 em linhagens de *Epicoccum* sp.



Amplicons de aproximadamente 1246 bases gerados a partir de DNA de diferentes linhagens de *Epicoccum* spp.; 1-branco, 2-contrôle negativo (*Phlebia* sp.), 3-P16, 4-1F15, 5-P18, 6-CE11, 7-CE29, 8-1F4Ep, 9-CED27, 10-CED2, 11-CED71, 12-CED18, 13-CED10, 14-CE22, 15-CED7, 16-C33Ep, 17-CV2, 18-P103, 19-P82, 20-P83, 21-P98, 22-C22A, 23-C13A, 24-CE2, 25-P62, 26-TH31B. A temperatura de anelamento foi 62°C.

6 DISCUSSÃO

A família Didymellaceae foi estabelecida em 2009 num esforço por melhorar o sistema de classificação de *Phoma* e gêneros estreitamente relacionados, para delinear grupos naturais (clados) com a adição de dados filogenéticos de DNA (TORRES et al., 2005). Por anos a classificação das espécies de *Phoma* e gêneros relacionados como *Epicoccum* permaneceu controversa, baseada em caracteres confusos relatados entre várias seções de *Phoma* (muitas consideradas ambíguas) e gêneros relacionados (DE GRUYTER et al., 2009). As relações evolutivas entre as espécies da família Didymellaceae passou por revisões baseada em análises multiloci (CHENG et al., 2015, 2017) e permitiu melhorar e definição das relações evolutivas entre gêneros como *Epicoccum*, levando a uma filogenia robusta incluindo 18 espécies deste gênero. Porém, as relações evolutivas entre o complexo *Epicoccum nigrum*, estabelecido com linhagens endofíticas de *Epicoccum* spp. e formado por dois clados com distâncias genéticas e diferenças morfológicas e fisiológicas, compatíveis com diferenças entre espécies (FÁVARO et al., 2011), não foram resolvidas.

Para avaliar a relação evolutiva entre as linhagens de *Epicoccum* spp e as espécies de *Epicoccum* recentemente descritas, foi realizada uma análise filogenética de ITS1-5.8S-ITS2 e β -tubulina, assim como as sequências concatenadas de 77 linhagens de *Epicoccum* spp., 62 pertencentes ao complexo *E. nigrum*, usando como referência 27 sequências de 14 espécies do gênero *Epicoccum* (APÊNDICE B, C e D). Estas filogenias não conseguiram resolver as relações evolutivas entre as linhagens, nem entre as espécies mais derivadas do gênero, isto provavelmente devido ao baixo conteúdo de informação de sequências divergentes, as linhagens de *Epicoccum* spp. são filogeneticamente muito próximas, o que gerou ruído e resultou numa inferência filogenética fraca. Para diminuir o ruído, foi gerada uma filogenia usando poucas linhagens de *Epicoccum* spp. (Figura 8). Esta filogenia foi parcialmente congruente com aquela gerada também por análise de máxima verossimilhança para as espécies da família Didymellaceae (Chen et al., 2017). Em ambas das filogenias *E. draconis*, *E. brasiliense*, *E. plurivorum* e *E. henningsii* representam as espécies mais basais do gênero (variando nas árvores a relação entre elas). As espécies mais derivadas como *E. nigrum*, *E. poae*, *E. dendrobii* são as que mais incongruências apresentam entre as duas filogenias. As linhagens de *Epicoccum* spp. se apresentaram monofiléticas com espécies do gênero como *E. dendrobii*, *E. italicum* e *E. layuense* (Figura 8). Associadas a *E. dendrobii*, linhagens como P52, CV3, P18, P311 e TC2 foram já apresentadas por Favaro et al., 2011, como um grupo dentro do clado de *Epicoccum* que apresenta as características morfológicas típicas de *E. nigrum* (Figura 1), tanto

nesse estudo como no presente trabalho a medida de suporte do clado não é robusta o suficiente para dar suporte a uma classificação destas linhagens de *Epicoccum* spp. No mesmo clado de *E. italicum* aparecem linhagens como CE11, TH21Ep, 1F6Ep, 1F15 e TH41Ep estreitamente relacionadas com a linhagem P16, apresentadas no clado de *Epicoccum* com características morfológicas típicas de *E. nigrum*. O valor de SBMV que dá suporte a este clado é significativo (SBMV>70). As linhagens CANESALQ3 e CE3 se apresentaram monofiléticas com *E. layuense* com um suporte significativo para esta associação. Outras linhagens como Ep1Sc e Ep2Sc estreitamente relacionadas, se apresentaram como monofiléticas, com um suporte significativo, mas sem associação a uma espécie descrita de *Epicoccum* (Figura 8). A filogenia das linhagens de *Epicoccum* spp. à luz da nova filogenia do gênero, gerou evidência molecular de que o complexo *E. nigrum* possui membros que parecem a outras espécies do gênero. Caracteres diagnósticos usados na delimitação das novas espécies, devem ser usados para confirmar a identidade das linhagens e deve se continuar na procura da resolução completa da história evolutiva das linhagens de *Epicoccum* spp, ainda não totalmente resolvida.

Como apresentado por Chen et al., 2017, se requer uma melhor resolução das relações evolutivas das linhagens do complexo *E. nigrum*, neste contexto, a utilização de dados moleculares pode auxiliar na maximização da informação sobre linhagens estreitamente relacionadas, pelo que a utilização ou desenho de outros marcadores para este complexo se apresenta como uma alternativa a ser explorada (CHATTOPADHYAY et al., 2017).

Os resultados da análise de atividade inibitória dos extratos do acetato de etila estão sumarizados no (APÊNDICE A). Como apresentado anteriormente por Fávoro, 2009, existe uma grande variação no rendimento do extrato entre as linhagens de *Epicoccum* spp., mesmo em condições idênticas de crescimento e extração. De maneira geral, os testes de atividade inibitória mostraram que os extratos orgânicos de duas linhagens inibiram as quatro bactérias testadas (linhagens CE7 e P16) em quanto os de quatro linhagens inibiram três das bactérias (linhagens 1F4, 1F6, CE11, CE3), 14 inibiram duas das bactérias, 43 inibiram uma das bactérias e 14 não tiveram atividade inibitória. Muitos dos extratos das linhagens de *Epicoccum* spp. (61 de 77) apresentaram atividade inibitória de *B. subtilis*, 21 inibiram o crescimento de *S. aureus*, 7 inibiram o crescimento de *P. aeruginosa* e 2 inibiram o crescimento de *E. coli*. A variabilidade fisiológica dos isolados de *Epicoccum* spp. já tinha sido observada e faz com que a atividade biológica destes e seus extratos seja altamente dependente das condições de cultura e metodologia utilizadas para avaliá-la (FÁVARO, 2009).

A falta de correlação entre os padrões de inibição das bactérias, sugere a presença de diferentes compostos inibidores nos extratos. Entre os metabólitos secundários de *Epicoccum*, muitos exibem atividade antibacteriana; as epicocaccinas A-D mostraram atividade seletiva contra *B. subtilis* (ZHANG et al., 2007), as epicorazinas A e B apresentaram atividade contra *S. aureus* (BAUTE et al., 1978), as epirodinas A e B inibiram *Bacillus megaterium* e a epirodona e a epicocarina B mostraram atividade contra bactérias gram-positivas (KENAMI WANGUN; HERTWECK, 2007).

Não foi observada correlação entre a distância genética e o padrão de inibição de bactérias pelos extratos orgânicos de *Epicoccum* spp. Algumas espécies de fungos como *Penicillium* e *Aspergillus*, possuem um perfil homogêneo de produção de metabólitos secundários, o que permite seu uso em estudos taxonômicos da espécie (FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008), mas também existem casos em que existe diferença significativa na produção de metabólitos entre isolados de uma mesma espécie (MÖLLER, WEBER; DREYFUS, 1996; SEYMOUR et al., 2004). As diferenças significativas na produção de metabólitos entre as linhagens do complexo *E. nigrum*, podem indicar a presença de diferentes espécies do gênero com metabólitos homogêneos, ou espécies com uma grande diversidade na produção de metabólitos. As análises químicas dos extratos e sua correlação com a filogenia e o padrão de inibição de bactérias, permitiram uma melhor compreensão do padrão de produção de metabólitos secundários do gênero *Epicoccum* e das moléculas potencialmente associadas à inibição de bactérias (YANG et al., 2009).

Os extratos das linhagens de *Epicoccum* spp. não apresentaram atividade inibitória contra os fungos avaliados. A alta variabilidade fisiológica das linhagens e o silenciamento de clusters de MS associados a interação com fungos nas condições de cultura podem ter influenciado o ensaio (OSBOURN, 2010). Favaro et al., 2012, mostraram que extratos de acetato de etila de *E. nigrum* em altas concentrações inibiram o crescimento dos fitopatógenos *C. paradoxa* e *F. verticillioides*, mas foi observado que a produção de moléculas com atividade antifúngica como flavipina e epicorazinas foi máxima até 12 dias de cultivo, diminuindo após este período (BROWN; FINLAY; WARD, 1987).

A presença do gene associado à rota de biossíntese da epicolactona parece ser amplamente estendida no gênero *Epicoccum* spp. O gene é detectado inclusive em espécies de clados basais como Ep1Sc. Por conta da sua aparição no grupo mais externo avaliado, não é possível determinar sua aparição, mas sua detecção em uma linhagem do gênero *Allophoma* (dados não apresentados), poder dar conta de uma história evolutiva muito mais antiga na

família Didymellaceae. Dentro do gênero *Epicoccum*, alguns grupos monofiléticos apresentam o gene, mas constitui um caráter que sofre múltiplas perdas independentes ao longo da história evolutiva do gênero, fenômeno já observado com outros cluster gênicos de MS em fungos (TRALAMAZZA et al., 2019). Amplicons não específicos foram observados na análise (dados não reportados) e mesmo que não tenham sido levados em consideração, se deve lembrar que os cluster são altamente polimórficos e que a compressão da sua natureza e evolução ainda permanecem evasivos (LIND et al., 2017). A presença do gene potencialmente associado à rota de biossíntese da epicolactona em várias linhagens do gênero *Epicoccum* levanta a questão da potencial produção da molécula por outras espécies do gênero e a possibilidade, devido à natureza dinâmica dos cluster gênicos de metabólitos secundários na sua formação e mudança de função, de descobrir novas rotas nas que este cluster de MS, faça parte.

7 CONCLUSÃO

- A análise filogenética baseada na região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal e do gene da β -tubulina concatenadas, usada pra avaliar a relação evolutiva entre as linhagens de *Epicoccum* spp. e as espécies de *Epicoccum* recentemente descritas, ofereceram evidência molecular de espécies do complexo *E. nigrum*, potencialmente pertencentes às recentemente estabelecidas espécies *E. layuense* e *E. italicum*, mas se requer uma melhor resolução das relações evolutivas entre as linhagens do complexo *E. nigrum*.
- Os extratos orgânicos das linhagens de *Epicoccum* apresentaram atividade heterogênea na inibição de bactérias o que sugere a presença de diferentes compostos antibacterianos nos extratos.
- A capacidade dos extratos em inibir outros micro-organismos não apresenta correlação com a distância genética das linhagens, o que pode indicar que existe diferença significativa na produção de metabólitos nas linhagens do gênero *Epicoccum* ou a presença de caracteres que podem ser usados na taxonomia das espécies do gênero.
- Foram desenhados *primers* específicos para a KS do pksi12 e testados nas linhagens de *Epicoccum* spp. O amplicon foi detectado no 61% das linhagens, incluindo as mais basais, o que pode indicar que o cluster pode ser compartilhado por diferentes espécies do gênero *Epicoccum* e outros gêneros relacionados, e que sofreu vários eventos de perda ao longo da história evolutiva dentro do gênero.

REFERÊNCIAS¹

- AVESKAMP, M. M.; DE GRUYTER, J.; CROUS, P. W. Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. **Fungal Diversity**, v. 31, p. 1-18, 2008.
- BAMFORD, P. C.; NORRIS, G. L. F.; WARD, G. Flavipin production by *Epicoccum* spp. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 44, n. 3, p. 354-356, 1961.
- BAUTE, M.-A. et al. New antibiotics from the fungus *Epicoccum nigrum*. **The journal of Antibiotics**, v. 31, n. 11, p. 1099-1101, 1978.
- BENNETT, J. W.; BENTLEY, Ronald. What's in a name?—microbial secondary metabolism. **Advances in applied microbiology**. Academic Press, 1989. p. 1-28.
- BRAGA, R M.; PADILLA, G.; ARAÚJO, W. L. The biotechnological potential of *Epicoccum* spp.: diversity of secondary metabolites. **Critical reviews in microbiology**, v. 44, n. 6, p. 759-778, 2018.
- BRAGA, R. M. **Identificação de genes possivelmente envolvidos na biossíntese da epicolactona em *Epicoccum nigrum***. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2016.
- BRAKHAGE, A.A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 21, 2013.
- BROWN, A. E.; FINLAY, R.; WARD, J. S. Antifungal compounds produced by *Epicoccum purpurascens* against soil-borne plant pathogenic fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 657-664, 1987.
- BRUM, M.C.P. **Potencial biotecnológico de fungos endofíticos da videira**. 95p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2008.
- BRUTON, B. D. et al. Postharvest decay of cantaloupe caused by *Epicoccum nigrum*. **Plant Disease (USA)**, 1993.
- CASINI, A. et al. A pressure test to make 10 molecules in 90 days: external evaluation of methods to engineer biology. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 12, p. 4302-4316, 2018.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 225, p. 65-72, 1939.
- CHATTOPADHYAY, A. et al. Genic Molecular Markers in Fungi: Availability and Utility for Bioprospection. In: **Molecular Markers in Mycology**. Springer, Cham, 2017. p. 151-176.
- CHEN, Q. et al. Resolving the *Phoma* enigma. **Studies in Mycology**, v. 82, p. 137-217, 2015.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- CHEN, Q. et al. Didymellaceae revisited. **Studies in Mycology**, v. 87, p. 105-159, 2017.
- CLSI, 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 10th ed. CLSI M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLARKE, K.; GORLEY, R. PRIMER v7: User manual/tutorial (p. 300). **Plymouth, UK: PRIMER-E Ltd**, 2015.
- COLLEMARE, J. et al. Biosynthesis of secondary metabolites in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: the role of hybrid PKS-NRPS in pathogenicity. **Mycological research**, v. 112, n. 2, p. 207-215, 2008.
- COX, R. J. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 5, n. 13, p. 2010-2026, 2007.
- CRAWFORD, J. M.; TOWNSEND, C. A. New insights into the formation of fungal aromatic polyketides. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 879, 2010.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). **Biochemistry and molecular biology of plants**, v. 24, p. 1250-1319, 2000.
- DA SILVA ARAÚJO, F. D. et al. Epicolactone - Natural Product Isolated from the Sugarcane Endophytic Fungus *Epicoccum nigrum*. **European Journal of Organic Chemistry**, v 2012, n 27, p 5225–5230, 2012.
- DE GRUYTER, J. et al. Molecular phylogeny of Phoma and allied anamorph genera: towards a reclassification of the Phoma complex. **Mycological research**, v. 113, n. 4, p. 508-519, 2009.
- EL AMRANI, M. et al. Protein kinase and HDAC inhibitors from the endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. **Journal of natural products**, v. 77, n. 1, p. 49-56, 2013.
- ELLERBROCK, P. et al. An eight-step synthesis of epicolactone reveals its biosynthetic origin. **Nature chemistry**, v. 7, n. 11, p. 879-882, 2015.
- FÁVARO, L. C. de L. **Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2009.
- FÁVARO, L. C. de L. et al. Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. **PLoS ONE**, v 6, n 8, p e14828, 2011.
- FÁVARO, L. C. de L.; SEBASTIANES, F. L.; ARAÚJO, W. L. *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. **PLoS One**, v 7, n 6, p e36826, 2012.
- FERREIRA, A. J. **Análise e anotação do genoma de *Epicoccum nigrum* e metabolismo secundário**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2016.
- FIRN, R. D.; JONES, C. G. The evolution of secondary metabolism—a unifying model. **Molecular microbiology**, v. 37, n. 5, p. 989-994, 2000.

- FOKIN, M. et al. Genome Sequence of the Saprophytic Ascomycete *Epicoccum nigrum* Strain ICMP 19927, Isolated from New Zealand. **Genome Announc.**, v. 5, n. 24, p. e00557-17, 2017.
- FREDERICK, C. B. et al. Production and isolation of siderophores from the soil fungus *Epicoccum purpurascens*. **Biochemistry**, v. 20, n. 9, p. 2432-2436, 1981.
- FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological research**, v. 112, n. 2, p. 231-240, 2008.
- GARDES, M.; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular ecology**, v. 2, n. 2, p. 113-118, 1993.
- GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995.
- GRIBANOVSKI-SASSU, O.; FOPPEN, F. H. The carotenoids of the fungus *Epicoccum nigrum* link. **Phytochemistry**, v. 6, n. 6, p. 907-909, 1967.
- GUO, H. et al. Diketopiperazines from the *Cordyceps*-colonizing fungus *Epicoccum nigrum*. **Journal of natural products**, v. 72, n. 12, p. 2115-2119, 2009.
- HASHEM, M.; ALI, E. *Epicoccum nigrum* as biocontrol agent of *Pythium* Damping-Off and Root-Rot of Cotton Seedlings. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v 37, n 4, p 283–297, 2004.
- HOFFMEISTER, D.; KELLER, N. P. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. **Natural product reports**, v. 24, n. 2, p. 393-416, 2007.
- JAYASIRI, S. C. et al. Taxonomy and multigene phylogenetic evaluation of novel species in *Boeremia* and *Epicoccum* with new records of Ascochyta and Didymella (Didymellaceae). **Mycosphere**, v. 8, n. 8, p. 1080-1101, 2017.
- KATO, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in bioinformatics**, 2017.
- KEARSE, M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.
- KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. **Nature reviews. Microbiology**, v 3, n 12, p 937–47, 2005.
- KENAMI WANGUN, H. V.; HERTWECK, C. Epicoccarines A, B and epipyridone: tetramic acids and pyridone alkaloids from an *Epicoccum* sp. associated with the tree fungus *Pholiota squarrosa*. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 5, n. 11, p. 1702-1705, 2007.
- KILPATRICK, J. A.; CHILVERS, G. A. Variation in a natural population of *Epicoccum purpurascens*. **Transactions of the British Mycological Society**, v 77, n 3, p 497-508, 1981.

- KRAVINA, A. G.; CARREIRA, E. M. Total Synthesis of Epicolactone. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 57, n. 40, p. 13159-13162, 2018.
- KROKEN, S. et al. Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 26, p. 15670-15675, 2003.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.
- LAHLALI, R.; HIJRI, M. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. **FEMS microbiology letters**, v 311, n 2, p 152–9, 2010.
- LI, Y. et al. The inhibitory effect of *Epicoccum nigrum* strain XF1 against *Phytophthora infestans*. **Biological Control**, v 67, n 3, p 462–468, 2013.
- LIN, Z. et al. Identification and characterization of a new fungal pathogen causing twisted leaf disease of sugarcane in China. **Plant disease**, v. 99, n. 3, p. 325-332, 2015.
- LIND, A. L. et al. Drivers of genetic diversity in secondary metabolic gene clusters within a fungal species. **PLoS biology**, v. 15, n. 11, p. e2003583, 2017.
- MARAHIEL, M. A.; STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H. D. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. **Chemical reviews**, v. 97, n. 7, p. 2651-2674, 1997.
- MIMS, C. W.; RICHARDSON, E. A. Ultrastructure of sporodochium and conidium development in the anamorphic fungus *Epicoccum nigrum*. **Canadian Journal of Botany**, v 83, p 1354-1363, 2005.
- MÖLLER, C.; WEBER, G.; DREYFUSS, M. M. Intraspecific diversity in the fungal species *Chaunopycnis alba*: Implications for microbial screening programs. **Journal of industrial microbiology**, v. 17, n. 5-6, p. 359-372, 1996.
- MOORER, W. R. Sampling of solid spent agar media for gas chromatography of diffused acidic fermentation products. **FEMS microbiology letters**, v 24, n 2-3, p 307-312, 1984.
- MÜLLER, R. Don't classify polyketide synthases. **Chemistry & biology**, v. 11, n. 1, p. 4-6, 2004.
- MURILLO, C. et al. Molecular data indicate that *Rhytidhysterium rufulum* (ascomycetes, Patellariales) in Costa Rica consists of four distinct lineages corroborated by morphological and chemical characters. **Mycological research**, v 113, n 4, p 405-416, 2009.
- NARANJO-ORTIZ, M. A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: major ecological adaptations and evolutionary transitions. **Biological Reviews**, 2019.
- OSBOURN, A. Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation. **Trends in Genetics**, v. 26, n. 10, p. 449-457, 2010.

- PERVEEN, I. et al. Isolation of anticancer and antimicrobial metabolites from *Epicoccum nigrum*; endophyte of *Ferula sumbul*. **Microbial pathogenesis**, v. 110, p. 214-224, 2017.
- PIECKENSTAIN, F. L. et al. *Epicoccum purpurascens* for biocontrol of *Sclerotinia* head rot of sunflower. **Mycological Research**, v 105, n 1, p 77-84, 2001.
- PUSZTAHELYI, T.; HOLB, I. J.; PÓCSI, I. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 573, 2015.
- ROMÃO, A. S.; ARAÚJO, W. L. Efeito do cultivo de cana-de-açúcar geneticamente modificada sobre a comunidade fúngica associada. **Micologia: avanços no conhecimento. Recife: UFPE**, p 150-159, 2007.
- SCHOL-SCHWARZ, M. B. The genus *Epicoccum* Link. **Transactions of the British Mycological Society**, v 42, n 2, p 149-173, 1959.
- SCORZONI, L. et al. The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp. and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 391-397, 2007.
- SEYMOUR, F. A. et al. The influence of genotypic variation on metabolite diversity in populations of two endophytic fungal species. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 7, p. 721-734, 2004.
- SMITH, D. J.; EARL, A. J.; TURNER, G. The multifunctional peptide synthetase performing the first step of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* is a 421,073 dalton protein similar to *Bacillus brevis* peptide antibiotic synthetases. **The EMBO journal**, v. 9, n. 9, p. 2743-2750, 1990.
- SWOFFORD, D.L.; SULLIVAN, Jack. Phylogeny inference based on parsimony and other methods using PAUP*. **The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny**, cap, v. 7, p. 160-206, 2003.
- TALONTSI, F.M. et al. Epicoccolides: antimicrobial and antifungal polyketides from an endophytic fungus *Epicoccum* sp. associated with *Theobroma cacao*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2013, n. 15, p. 3174-3180, 2013.
- TORRES, M. S. et al. A new species and its phylogenetic placement in the *Didymella/Phoma* complex (Phaeosphaeriaceae, Pleosporales). **Mycotaxon**, v. 93, p. 297-308, 2005.
- TRALAMAZZA, S. et al. Complex evolutionary origins of specialized metabolite gene cluster diversity among the plant pathogenic fungi of the *Fusarium graminearum* species complex. **bioRxiv**, p. 639641, 2019.
- TUDZYNSKI, P. et al. Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. **Molecular and General Genetics**, v. 261, n. 1, p. 133-141, 1999.
- VANDERMOLEN, K. M. et al. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. **Amb Express**, v. 3, n. 1, p. 71, 2013.

- VOLCAN, G. S. Common cellophane wrapping as supporting substrate for the cultivation of fungi and obtention of permanent mycological preparations. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 15, n. 5, p. 310-315, 1973.
- WAWRZYN, G. T.; BLOCH, S. E.; SCHMIDT-DANNERT, C. Discovery and characterization of terpenoid biosynthetic pathways of fungi. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, 2012. p. 83-105.
- WHITE, T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.
- WRIGHT, A. D.; OSTERHAGE, C.; KÖNIG, G. M. Epicoccamide, a novel secondary metabolite from a jellyfish-derived culture of *Epicoccum purpurascens*. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 1, n. 3, p. 507-510, 2003.
- XU, W.; GAVIA, D. J.; TANG, Y. Biosynthesis of fungal indole alkaloids. **Natural product reports**, v. 31, n. 10, p. 1474-1487, 2014.
- YANG, Y. et al. Translating metabolic exchange with imaging mass spectrometry. **Nature chemical biology**, v. 5, n. 12, p. 885, 2009.
- YANG, Z.; RANNALA, Bruce. Molecular phylogenetics: principles and practice. **Nature reviews genetics**, v. 13, n. 5, p. 303, 2012.
- ZHANG, Y. et al. Epicoccins A–D, epipolythiodioxopiperazines from a Cordyceps-colonizing isolate of *Epicoccum nigrum*. **Journal of natural products**, v. 70, n. 9, p. 1522-1525, 2007.

APÊNDICE A – Linhagens de *Epicoccum* spp. analisadas

(Continua)

Linhagem ²	Amplicon KS da PKSi_12 ³	Massa de extrato (mg/placa)	Inibição ⁴			
			<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1F15	1	47,7	0	1	0	0
1F4	1	18,7	0	1	1	1
1F6	1	16,6	0	1	1	1
79Ep	1	24,9	0	0	0	0
C13A	0	8,2	0	1	0	1
C13B	1	6	0	0	0	0
C22A	1	4,6	0	1	0	0
C33Ep	1	11,1	0	1	0	0
CANESALQ3	1	11,6	0	1	0	0
CANESALQ29	1	17,8	0	1	0	0
CE11	1	54,1	0	1	1	1
CE12	1	33,3	0	0	0	1
CE16	1	10	0	0	0	0
CE2	1	11,1	0	1	0	0
CE22	1	6,6	0	1	0	0
CE27	1	18,6	0	1	0	0
CE29	1	8,8	0	1	0	0
CE3	1	9,8	0	0	0	0
CE7	1	35,5	1	1	1	1
CED10	1	19	0	1	0	0
CED12	1	11,4	0	1	0	1
CED18	1	17,1	0	1	0	0
CED27	1	19,4	0	1	0	1
CED35	0	5	0	0	0	0
CED39	1	20	0	0	1	0

² Isolados obtidos nos trabalhos de Romão & Araújo (2007), Brum (2008) e Favaro (2009)

³ Valor de 1 para presença do amplicon e de 0 para ausência

⁴ Valor de 1 para inibição de crescimento e 0 para não inibição

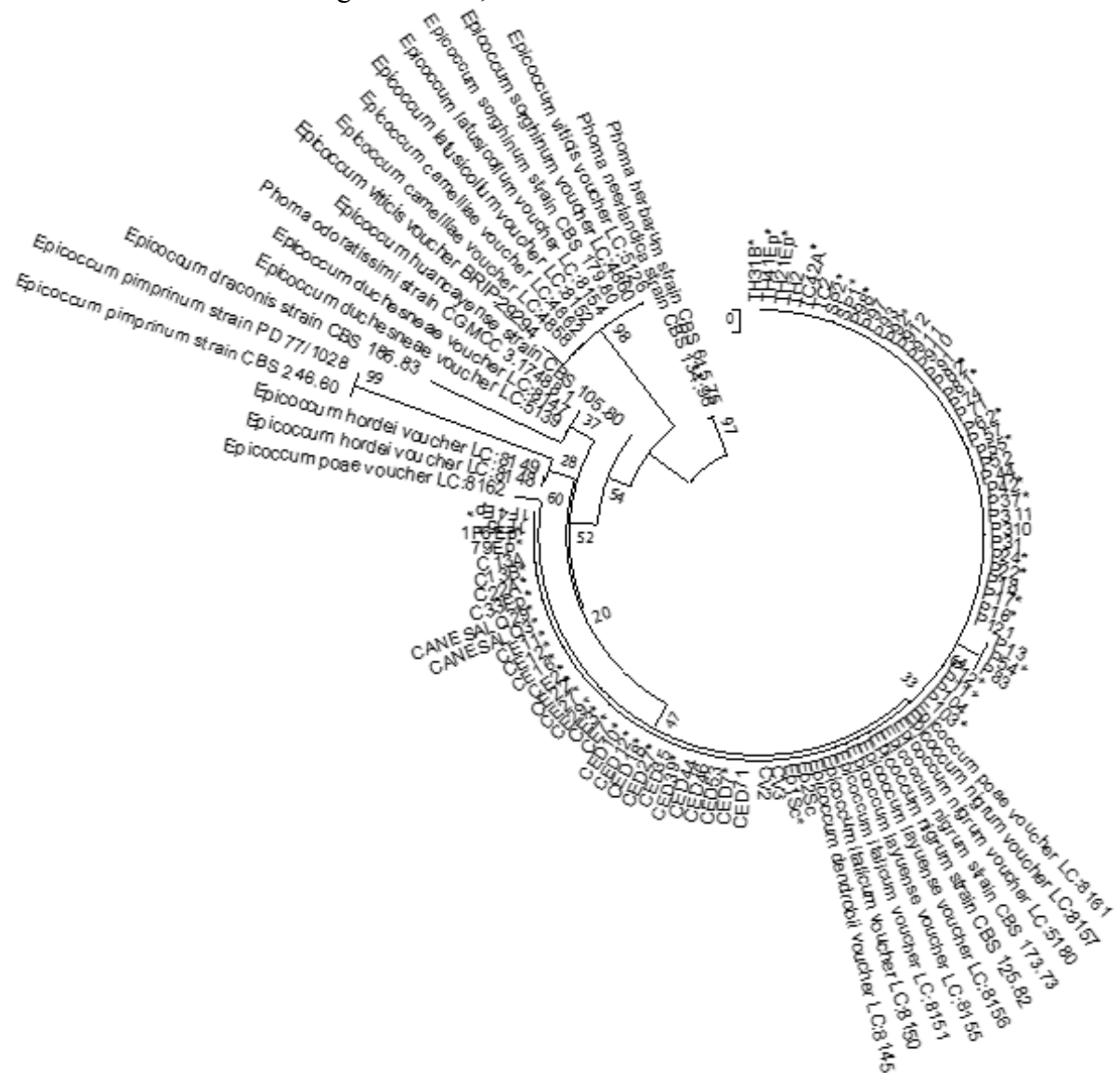
(Continuação)

Linhagem	Amplicon KS da PKSi_12 ³	Massa de extrato (mg/placa)	Inibição ⁴			
			<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
CED44	0	10,4	0	1	0	1
CED46	0	16,8	0	1	0	0
CED53	0	6,5	0	0	0	0
CED7	1	28,5	0	1	0	1
CED71	0	8,3	0	1	0	1
CV2	0	5,6	0	1	0	0
CV3	0	3,4	0	1	0	0
Ep1sc	1	13	0	1	0	0
Ep2sc	0	30,5	0	1	0	0
P103	1	6,8	0	1	0	0
P104	0	15	0	1	0	0
P11	1	13,4	0	1	0	0
P12	1	14,7	0	0	0	0
P121	0	3,4	0	1	0	0
P13	0	5	0	1	0	0
P16	1	19,3	1	1	1	1
P17	1	29,1	0	0	0	0
P18	0	8	0	1	0	0
P22	1	7,5	0	1	0	1
P24	1	3,2	0	0	0	0
P31	0	6	0	1	0	1
P310	0	13,7	0	1	0	1
P311	0	16,1	0	0	0	0
P37	1	6,8	0	1	0	0
P42	1	3,2	0	1	0	0
P44	0	8,3	0	1	0	0
P52	0	3,9	0	1	0	0
P54	1	4,2	0	1	0	0
P55	1	6,4	0	1	0	1

(Conclusão)

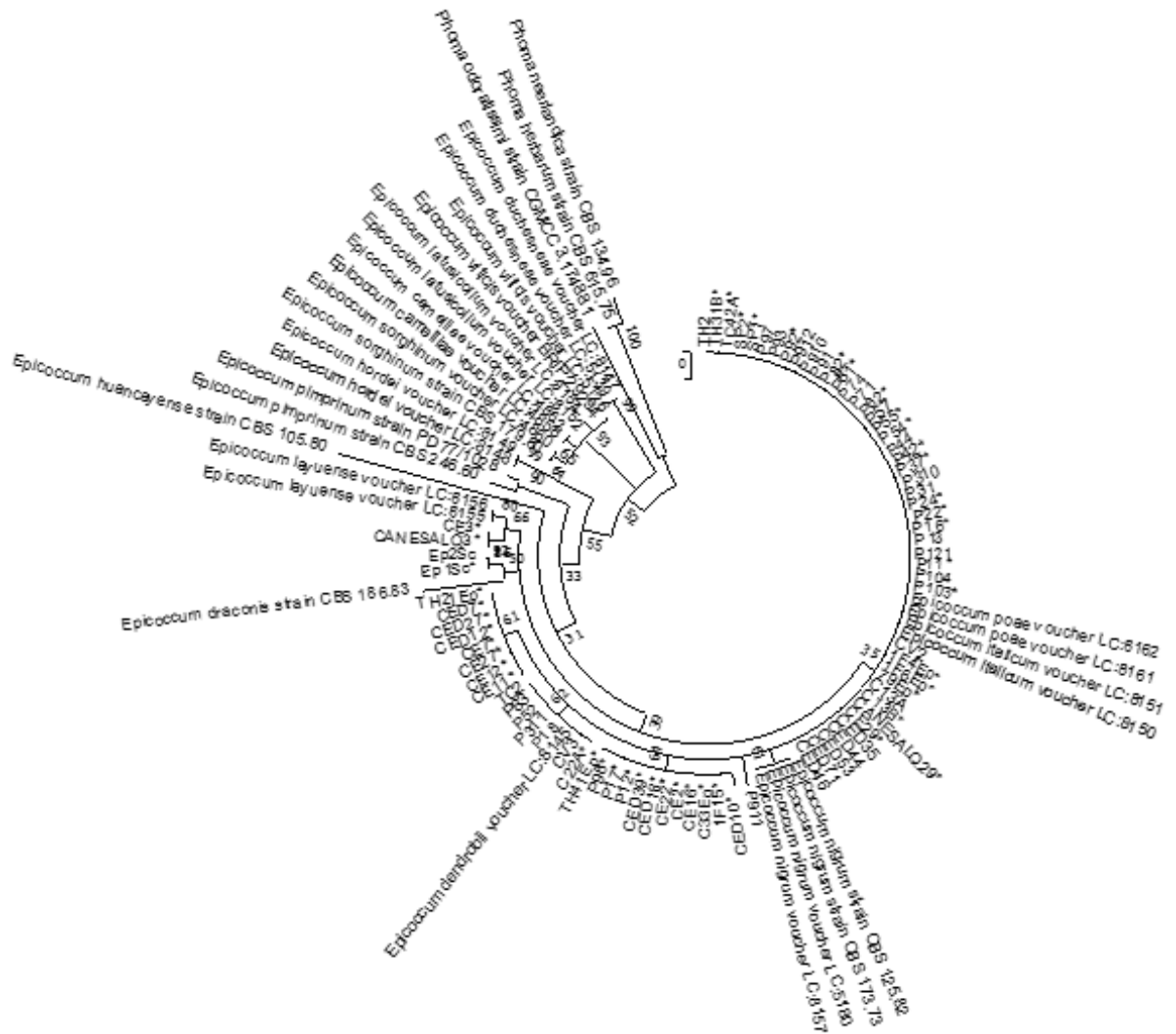
Linhagem	Amplicon KS da PKSi_12 ³	Massa de extrato (mg/placa)	Inibição ⁴			
			<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
P57	0	13,8	0	1	0	0
P62	1	6,6	0	1	0	0
P71	0	1,9	0	1	0	0
P74	0	11,7	0	0	0	0
P81	1	6	0	0	0	0
P82	1	8	0	1	0	0
P83	0	4,3	0	1	0	0
P91	0	17,5	0	0	0	0
P910	0	4,2	0	1	0	0
P911	0	7,7	0	1	0	0
P912	0	4,7	0	1	0	0
P92	1	6,2	0	1	0	0
P93	0	3,8	0	1	0	0
P97	0	5,8	0	1	0	0
P98	1	27,1	0	1	1	1
SP1	1	11,3	0	1	0	1
SP2	1	21	0	1	0	1
TC2	0	5,5	0	1	0	0
TC42A	1	9,8	0	1	0	1
TH2	0	18,8	0	1	0	0
TH21Ep	1	20,5	0	0	0	0
TH31B	1	8,3	0	1	0	1
TH41Ep	1	8,9	0	1	0	0

APÊNDICE B - Árvore filogenética inferida a partir da análise de máxima verossimilhança da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal

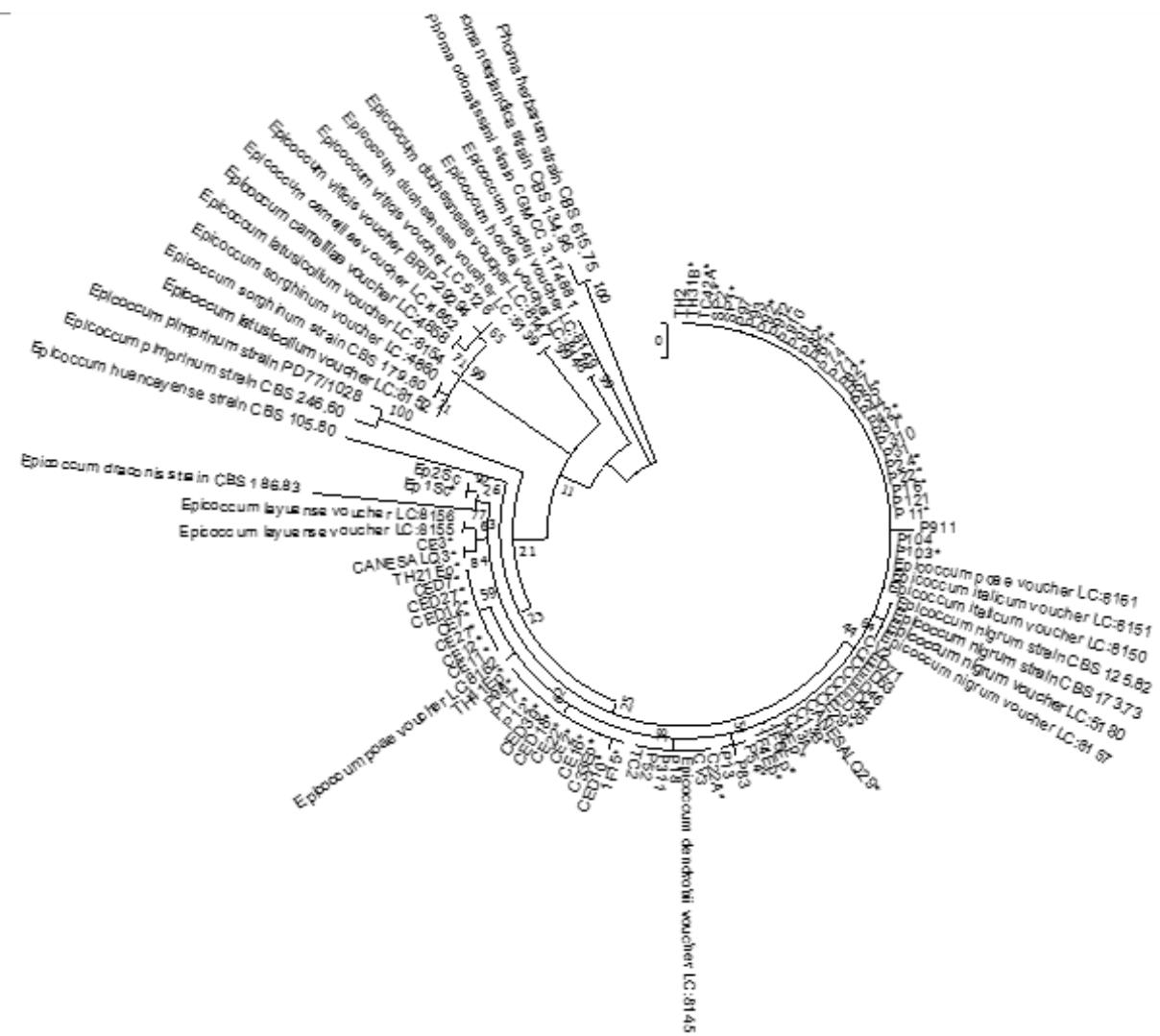


A presença do amplicon da KS do PKSi₁₂ está indicada com “*”

APÊNDICE C - Árvore filogenética inferida a partir da análise de máxima verossimilhança do gene da β -tubulina



APÊNDICE D - Árvore filogenética inferida a partir da análise de máxima verossimilhança da região ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal e o gene da β -tubulina concatenados



ANEXO A - Resumo dos pontos fortes e fracos dos diferentes métodos de reconstrução de árvores filogenéticas.

(Continua)

Pontos fortes	Pontos fracos
Parcimônia	
<ul style="list-style-type: none"> • Simplicidade e apelo intuitivo • A única estrutura apropriada para alguns dados 	<ul style="list-style-type: none"> • As suposições são implícitas e mal compreendidas • A falta de um modelo torna quase impossível incorporar conhecimento da evolução da sequência • Comprimentos dos ramos são substancialmente subestimados quando as taxas de substituição são altas • Máxima parcimônia pode sofrer de atração de ramificações longas
Métodos baseados em distâncias	
<ul style="list-style-type: none"> • Velocidade computacional rápida • Pode ser aplicado a qualquer tipo de dados, desde que seja possível definir a distância genética • Modelos para cálculo de distância podem ser escolhidos para se adequar aos dados 	<ul style="list-style-type: none"> • A maioria dos métodos, como <i>neighbour joining</i>, não considera variações de estimativas de distância • O cálculo da distância é problemático quando as sequências são divergentes e envolvem muitas lacunas de alinhamento • Comprimentos de ramificação negativos não são significativos
Verossimilhança	
<ul style="list-style-type: none"> • Pode usar modelos complexos de substituição para abordar a realidade biológica • Estrutura poderosa para estimar parâmetros e testar hipóteses 	<ul style="list-style-type: none"> • As iterações da máxima verossimilhança envolvem cálculos pesados • A topologia não é um parâmetro, de modo que é difícil aplicar a teoria da máxima verossimilhança para sua estimação. Proporções de <i>bootstrap</i> são difíceis de interpretar

(Conclusão)

Pontos fortes	Pontos fracos
Inferência bayesiana	
<ul style="list-style-type: none"> • Pode usar modelos de substituição realistas, como em máxima verossimilhança • Probabilidades prévias permitem a incorporação de informações ou conhecimento especializado • Probabilidades posteriores de árvores e clados têm interpretações fáceis 	<ul style="list-style-type: none"> • Monte Carlo via cadeias de Markov (MCMC) envolve computação pesada • Em grandes conjuntos de dados, os problemas de convergência e mistura do MCMC podem ser difíceis de identificar ou retificar • Probabilidades anteriores não informativas podem ser difíceis de especificar. Precedentes multidimensionais podem ter influência indevida na posterior sem o conhecimento do investigador • Probabilidades posteriores geralmente aparecem muito altas • Seleção de modelos envolve computação desafiadora

Fonte: Yang e Rannala (2012)

ANEXO B – Sequências de isolados de outros estudos e seus números de acesso no GenBank.

(Continua)

Espécie	Linhagem	País	Número de acesso GenBank	
			ITS	TUB
<i>Epicoccum brasiliense</i>	CBS 120105	Brasil	GU237760	GU237588
<i>Epicoccum camelliae</i>	CGMCC 3.18343; LC 4858	China	KY742091	KY742333
<i>Epicoccum camelliae</i>	LC 4862	China	KY742092	KY742334
<i>Epicoccum dendrobii</i>	CGMCC 3.18359; LC 8145	China	KY742093	KY742335
<i>Epicoccum draconis</i>	CBS 186.83; PD 82/47	Ruanda	GU237795	GU237607
<i>Epicoccum duchesneae</i>	CGMCC 3.18345; LC 5139	China	KY742095	KY742337
<i>Epicoccum duchesneae</i>	LC 8147	China	KY742096	KY742338
<i>Epicoccum henningsii</i>	CBS 104.80; PD 74/1017	Quênia	GU237731	GU237612
<i>Epicoccum hordei</i>	CGMCC 3.18360; LC 8148	Austrália	KY742097	KY742339
<i>Epicoccum hordei</i>	LC 8149	Austrália	KY742098	KY742340
<i>Epicoccum huancayense</i>	CBS 105.80; PD 75/908	Peru	GU237732	GU237615
<i>Epicoccum italicum</i>	CGMCC 3.18361; LC 8150	Italia	KY742099	KY742341
<i>Epicoccum italicum</i>	LC 8151	Italia	KY742100	KY742342

(Continuação)

Espécie	Linhagem	País	Número de acesso GenBank	
			ITS	TUB
<i>Epicoccum latusicollum</i>	LC 8152	Japão	KY742104	KY742346
<i>Epicoccum latusicollum</i>	LC 8154	Japão	KY742106	KY742348
<i>Epicoccum layuense</i>	CGMCC 3.18362; LC 8155	China	KY742107	KY742349
<i>Epicoccum layuense</i>	LC 8156	China	KY742108	KY742350
<i>Epicoccum nigrum</i>	CBS 125.82; IMI 331914; CECT 20044	Holanda	FJ426995	FJ427106
<i>Epicoccum nigrum</i>	CBS 173.73; ATCC 24428; IMI 164070	Estados Unidos	FJ426996	FJ427107
<i>Epicoccum nigrum</i>	LC 5180	China	KY742109	KY742351
<i>Epicoccum nigrum</i>	LC 8157	China	KY742110	KY742352
<i>Epicoccum pimprinum</i>	CBS 246.60; ATCC 22237; ATCC 16652; IMI 81601	India	FJ427049	FJ427159
<i>Epicoccum pimprinum</i>	PD 77/1028	India	FJ427050	FJ427160
<i>Epicoccum poae</i>	LC 8161	Estados Unidos	KY742114	KY742356
<i>Epicoccum poae</i>	LC 8162	Estados Unidos	KY742115	KY742357
<i>Epicoccum sorghinum</i>	CBS 179.80; PD 76/1018	Porto Rico	FJ427067	FJ427173
<i>Epicoccum sorghinum</i>	LC 4860	China	KY742116	KY742358
<i>Epicoccum viticis</i>	BRIP 29294; LC 5257	Austrália	KY742117	KY742359
<i>Epicoccum viticis</i>	CGMCC 3.18344; LC 5126	China	KY742118	KY742360

(Conclusão)

Espécie	Linhagem	País	Número de acesso GenBank	
			ITS	TUB
<i>Phoma herbarum</i>	CBS 615.75	Holanda	NR_135967.1	KF252703.1
<i>Phoma neerlandica</i>	CBS 134.96	Holanda	KT389535.1	KT389834.2
<i>Phoma odoratissimi</i>	CGMCC 3.17488	China	KP330435.1	KP330391.1

Fonte: Chen et al., 2017.