

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

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.

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.

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.