

DEMETRIUS PEREIRA MORILLA

***Colletotrichum gloeosporioides* COMO ENDOFÍTICO DE *Mirabilis jalapa* LINN:
DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS, DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E
ANTIOXIDANTE DOS SEUS EXTRATOS**

MACEIÓ - ALAGOAS

2009

DEMETRIUS PEREIRA MORILLA

***Colletotrichum gloeosporioides* COMO ENDOFÍTICO DE *Mirabilis jalapa* LINN:
DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS, DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E
ANTIOXIDANTE DOS SEUS EXTRATOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química e Biotecnologia da Universidade
Federal de Alagoas para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano

MACEIÓ - ALAGOAS

2009

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Maria Auxiliadora G. da Cunha

M857c Morilla, Demetrius Pereira.

Colletotrichum gloeosporioides como endofítico de *Mirabilis jalapa* Linn :
determinação de fenóis totais, da atividade biológica e antioxidante dos
seus extratos / Demetrius Pereira Morilla. – 2009.

164 f. : il. tabs., graf.

Orientador: Luiz Carlos Caetano.

Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade
Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2009.

Bibliografia: f. 121-145.

Apêndices: f. 146-152.

Anexos: f. 153-164.

1. *Colletotrichum*. 2. *Mirabilis*. 3. Endofítico. 4. Espaço de Transcrição
Interna (ITS). 5. Fenol. I. Título.

CDU: 547.9

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA <i>Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia</i> <i>PPGQB</i>	
---	---	---

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de DEMETRIUS PEREIRA MORILLA, sob o título “*Colletotrichum gloeosporioides* como endofítico de *Mirabilis jalapa* LINN: determinação de fenóis totais e da atividade biológica e antioxidante dos seus extratos” apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 04/09/2009.

Comissão julgadora:



Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano
(Orientador – PPGQB, IQB – UFAL)



Prof.ª Dr.ª Ruth Rufino do Nascimento
(Titular – PPGQB, IQB – UFAL)



Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto
(Titular – ICBS – UFAL)



Prof.ª Dr.ª Maria Cristina Cano de Andrade
(Suplente – PPGQB, IQB – UFAL)

DEDICATÓRIA

Primeiramente a DEUS por estar presente em minha vida, aos meus pais, AFONSO e ELENITA, pelo esforço, pela dedicação, pelo amor, pelo carinho e pelo estímulo que me ofereceram em todos estes anos, e a minha esposa, JANAINA, pelo companheirismo, pela compreensão, pela amizade e por acreditar em mim, dedico-lhes essa conquista com muita gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a ajuda prestimosa de meu orientador e amigo, Luiz Carlos, pela paciência e aceitação em seu laboratório;

Agradeço aos professores que fizeram parte da banca de qualificação e de defesa, e a todos os demais que contribuíram para minha formação acadêmica, em especial a Prof.^a Lúcia M^a Conserva, Prof.^a M^a Cristina C. de Andrade, Prof.^a Margarida M^a S. Humberto e ao Prof. Edson de S. Bento.

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Antônio F. da Silva e a todos que compõem o Laboratório de DNA Forense e Diagnóstico Molecular da UFAL.

Agradeço a todos que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Biotecnologia de Plantas e Microrganismos Endofíticos: Aliete, Érica, Elida, Ericson, José Roberto, Júlio, Ricardo, Roberto, Rosangela, Sandra, Sandovânio, Vladmilsa, Tais e Wirla.

Agradeço a todos os funcionários e colegas que compõem o Instituto de Química e Biotecnologia.

Agradeço as entidades financiadoras do projeto, FAPEAL, CNPq e Banco do NORDESTE.

RESUMO

Os microrganismos apresentam grande importância potencial na produção de compostos com atividade ainda não bem conhecida. No presente trabalho, com objetivo geral de estudar o fungo endofítico isolado dos tecidos de *Mirabilis jalapa*, arbusto perene da família *Nyctagineae*, isolou-se o endofítico *Colletotrichum gloeosporioides*. Esse fungo apresenta desenvolvimento favorável em meio líquido batata-dextrose (BD), sob condições de repouso e no escuro em um período de 30 dias, com acúmulo de biomassa de aproximadamente 81,03% da massa total em relação ao período de 70 dias em que cessou seu crescimento. As unidades de frutificação não foram observadas ao microscópio, somente observaram-se conídios e apressórios característicos, tendo sido realizado o seqüenciamento genético, optando pela região ITS da subunidade menor do seu DNA ribossomal, após amplificação do mesmo por PCR pelo uso dos *primers* taxon-específicos ITS1 e ITS4, para confirmar a identificação morfológica. Os extratos brutos obtidos a partir de solventes com diferentes polaridades da matéria seca do endofítico, *C. gloeosporioides*, permitiram avaliar a atividade antimicrobiana frente a patógenos e fitopatógenos, com resultado positivo para os extratos etanólicos das células secas e dos calos no controle de *Escherichia coli*, com halo de inibição de 12 mm e 18 mm, respectivamente para concentração de 33%. O extrato clorofórmico apresentou atividade contra *Pseudomonas sp.*, com halo de inibição de 46 mm para concentração de 500 mg.mL⁻¹, atividade semelhante a nistatina em mesma concentração (52 mm). A análise de três métodos para determinação do teor total de fenóis nos extratos brutos, tendo como reagente Folin-Ciocalteu, apresentou diferenças significativas em relação ao método de Slinkard e Singleton (1977), mas não entre os outros dois métodos: Makkar et al. (1993) e Swain e Hills (1959). A atividade seqüestradora radicalar apresentou-se mais característica para os extratos metanólico e etanólico, apesar dos mesmos não terem apresentado maior teor de fenóis totais quando comparados ao extrato acetato como poderá ser observado no pertinente trabalho.

Palavras-chave: *Colletotrichum*. *Mirabilis*. Endofítico. ITS. Fenol.

ABSTRACT

Microorganisms have great potential importance in the production of compounds with activity still not well known. In this work, with overall objective of studying the endophytic fungus isolated from tissues of *Mirabilis jalapa*, evergreen shrub *Nyctagineae* family, was isolated the endophytic *Colletotrichum gloeosporioides*. This fungus has been favorable in liquid medium potato-dextrose (BD), under resting conditions and darkness in a period of 30 days, with accumulation of biomass of approximately 81.03% of the total mass for the period of 70 days which ceased its growth. Its fruitification units were not observed under the microscope, only observed conidia and appressoria characteristic, they were submitted out the genetic sequencing, opting for the ITS region of its small subunit ribosomal DNA, after amplification by PCR by using primers taxon - specific ITS1 and ITS4, to confirm the morphological identification of *C. gloeosporioides*. The extracts obtained from solvents with different polarities of the dry matter of endophytic, were used to evaluate their antimicrobial activity against pathogens and phytopathogen organisms, with positive results for the ethanolic extracts of the cells and dried calluses in control of *Escherichia coli*, with inhibition zone of 12 mm and 18 mm, respectively, for concentration of 33%. The chloroform extract, on the other hand, presented activity against *Pseudomonas sp.*, with inhibition zone of 46 mm for a concentration of 500 mg.mL⁻¹, activity similar to nystatin in the same concentration (52 mm). The analysis of three methods for determination of total phenols in crude extracts, with Folin-Ciocalteu, showed significant differences in the method of Slinkard and Singleton (1977), but not between the other two methods: Makkar et al. (1993) and Swain and Hills (1959). The radical scavenging activity was more pronounced for methanolic and ethanolic extracts, although not present higher content of total phenols when compared to acetate extract as it can be observed in the relevant study.

Word-key: *Colletotrichum*. *Mirabilis*. Endophytic. ITS. Phenol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotos destacando as variedades de cores da <i>Mirabilis jalapa</i>	24
Figura 2 – Polissacarídeo da raiz de <i>M. jalapa</i> formado por monômeros de β -D-Glicose unidas por ligações β -1,3 e β -1,4.	25
Figura 3 – Estruturas químicas dos compostos isolados da raiz de <i>M. jalapa</i>	26
Figura 4 – Compostos voláteis isolados das flores de <i>M. jalapa</i>	26
Figura 5 – Representação estrutural 3D simulado em programa computacional ChemDraw e Chem3D (CambridgeSoft, versão 10.0) em modelagem bola-bastão das seqüências de Aminoácidos para as duas Proteínas Antivirais da <i>Mirabilis</i> (MAP), onde: a) Sheferina I – com 28 aminoácidos: Gly-Tyr-Gly-Gly-His-Gly-Gly-His-Gly-Gly-His-Gly-Gly-His-Gly-Gly-His-Gly-Gly-His-Gly-Gly-Gly-Gly-His-Gly. b) Sheferina II – com 38 aminoácidos: Gly-Tyr-His-Gly-Gly-His-Gly-Gly-His-Gly-Gly-Gly-Tyr-Asn-Gly-Gly-Gly-Gly-His-Gly-Gly-His-Gly-Gly-Gly-Tyr-Asn-Gly-Gly-Gly-His-His-Gly-Gly-Gly-Gly-His-Gly. Sendo: Gly = Glicina, Tyr = Tirosina, His = Histidina e Asn = Asparagina.	27
Figura 6 – Representação esquemática para biossíntese das betacianinas e betaxantinas.	29
Figura 7 – Levedura endofítica no interior de estômatos de folhas de citros. Fonte: PEIXOTO NETO et al. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Ed. 29, 2002, p. 65.	33
Figura 8 – Foto da planta <i>Taxus brevifolia</i> e estrutura do Paclitaxel. Fonte: www.chemgapedia.de	37
Figura 9 - Antracnose provocada por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em mamoeiro: a) antracnose em fruto; b) antracnose em folha. Fonte: http://www.infonet-biovision.org/res/res/files	39
Figura 10 - Antracnose em <i>Paphiopedilum insigne</i> (Orquidaceae) com destaque para as manchas foliares, lesões circulares, bem delimitadas e deprimidas, com o progresso da lesão evidenciando manchas inicialmente escuras, circundadas por halo de coloração marrom (a) que posteriormente se tornam de centro marrom claro ou branco e com halos escuro (b). (Fonte: Revista de Fitopatologia brasileira. v.30, n.4, jul-ago 2005)	40
Figura 11 – Primeiros compostos isolados em <i>C. gloeosporioides</i> .	41
Figura 12 – Auto-inibidores de germinação conidial isolados em <i>C. gloeosporioides</i> e <i>C. fragariae</i> .	42

Figura 13 – Micosporinas isoladas em <i>C. gloeosporioides</i> .	42
Figura 14 – Fitotóxicas isoladas em <i>C. gloeosporioides</i> .	43
Figura 15 – Compostos isolados de <i>Colletotrichum</i> como endofítico em <i>Artemisia annua</i> , derivados respectivamente do ergosterol e ácido 3-indolilacético .	44
Figura 16 – Visão simplificada das principais vias da biossíntese de metabólitos secundários e inter-relações com o metabolismo primário	45
Figura 17 – Representação de algumas estruturas de metabólitos secundários.	47
Figura 18 – Rotas metabólicas para os compostos fenólicos.	49
Figura 19 – Esquema de alguns compostos fenólicos obtidos a partir da fenilalanina.	50
Figura 20 – Estrutura do núcleo fundamental dos flavonóides.	52
Figura 21 – Representação esquemática do DNA ribossômico, evidenciando os três genes ribossômicos, 18S, 5.8S e 28S (26S) e as regiões espaçadoras, ITS-1 e ITS-2.	54
Figura 22 - Organização dos genes do rRNA dentro do genoma. Organização típica dos genes nucleares do rRNA dos organismos eucariontes. SSU, subunidade pequena; LSU, subunidade grande.	55
Figura 23 – Mapa da região de acoplamento dos <i>primers</i> para estudo do espaço de transcrição interna (ITS).	58
Figura 24 – Prancha 81 do livro <i>Flora brasiliensis</i> destacando a planta em estudo, <i>Mirabilis jalapa</i> .	63
Figura 25 – Halômetro, instrumento usado para medir o halo de inibição em mm. Foto de José Roberto de Oliveira Ferreira.	67
Figura 26 – Esquema de inoculação para teste antimicrobiano. Fonte: www.biotopics.co.uk/microbes/sentes.gif	68
Figura 27 – Disposição dos extratos nos poços na placa de Petri para teste antifúngico contra <i>P. Palmivora</i> inoculado ao centro da placa de Petri.	69
Figura 28 – Disposição dos discos de papel sob placa de Petri para teste antimicrobiano por difusão contra o fitopatógeno <i>Pseudomonas</i> sp. frente aos extratos do fungo endofítico isolado.	70
Figura 29 - Esquema do rDNA eucariótico, onde as caixas representam os genes e as setas indicam as posições onde os <i>primers</i> , em azul, se anelam. As regiões-alvo	

ITS1 e ITS2, em vermelho, também estão indicadas. Fonte: 72
<http://www.truffle.org/tuberex/polimorf.htm>.

Figura 30 – Sementes de *Mirabilis jalapa* mostrando a casca de proteção e o seu interior. 83

Figura 31 – Plântula de *Mirabilis jalapa* em desenvolvimento em meio B5. 83

Figura 32 – a) Formação de explantes a partir de folha e caule. b) Cultura de calos de *M. jalapa* em meio MS + 2,4-D (1mg/L) e cinetina (0,2mg/L). 84

Figura 33 – a) Plântula coberta por endofítico algodonoso – FBS; b) Cultura em meio BDA de endofítico isolado – FBS; c) Camadas do fungo endofítico FBS desenvolvidas em meio líquido BD; d) Vista lateral do fungo desenvolvido em BD. 86

Figura 34 – a) Apressórios de cultura do endofítico (FBS) em meio BDA (1000x); b) Conídios e apressórios de cultura do endofítico (FBS) em meio com extrato da folha de *Mirabilis jalapa* (1000x); c) Conídios, apressórios e hifas de cultura do endofítico (FBS) em meio com extrato da folha de *Mirabilis jalapa* (400x). 90

Figura 35 – Avaliação do potencial antimicrobiano contra cepas de *E. coli*. 91

Figura 36 – Teste de antagonismo entre o endofítico FBS e *P. palmivora*. 93

Figura 37 – Microcultivo para avaliar interpenetração de hifas entre o endofítico FBS e *P. palmivora*. 94

Figura 38 – Teste de antagonismo entre o endofítico isolado (FBS) e *Pseudomonas spp.* 94

Figura 39 – Teste de atividade antimicrobiana dos extratos brutos por difusão em poços contra *Phytophthora palmivora*, fitopatógeno do mamoeiro. a) Cultura de *Phytophthora palmivora* em BDA. Testes: b) extrato hexânico, c) extrato clorofórmico, d) extrato acetato, e) extrato metanólico e f) extrato etanólico. 95

Figura 40 – Teste de atividade antimicrobiana dos extratos brutos por difusão em disco de papel contra *Pseudomonas spp.*, fitopatógeno isolado em tomateiro. Testes: a) extrato hexânico; b) extrato clorofórmico; c) extrato acetato; d) extrato metanólico; e) extrato etanólico. 96

Figura 41 - Representação esquemática da unidade de repetição do rDNA dos eucariontes. ETS: espaçador externo; 18S: região que codifica para rRNA 18S; ITS: espaçador interno; 5,8S região que codifica para rRNA 28S; NTS: espaçador intergênico. 97

Figura 42 – Eletroforese em gel de Agarose 1% para confirmar a extração de rDNA amplificado por PCR das regiões ITS1 e ITS2 do fungo endofítico isolado FBS. 99

Figura 43 – Diferentes telas capturadas do site NCBI HomePage (National <i>Center for Biotechnology Information</i> - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), programa BLAST (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>) após submeter o seqüenciamento do rDNA das regiões ITS1 e ITS2.	100
Figura 44 – Árvore filogenica para resultados do BLASTn de máxima similaridade, 98-99%.	101
Figura 45 – Arvore filogenica destacando fungos de maior similaridade com a do endofítico isolado (FBS) identificado pelo código lcl 19657 gerado pelo programa BLASTn.	102
Figura 46 – Valores de absorbância para os extratos obtidos a partir do endofítico isolado, FBS, para o método de Makkar et al. (1993).	107
Figura 47 – Valores de absorbância para os extratos obtidos a partir do endofítico isolado, FBS, para o método de Slinkard e Singleton (1977).	108
Figura 48 – Valores de absorbância para os extratos obtidos a partir do endofítico isolado, FBS, para o método de Swain e Hills (1959).	109
Figura 49 - Estabilização do radical livre de DPPH.	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Exemplo de interação entre fungos endofíticos e plantas hospedeiras.	35
Tabela 02. Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico	48
Tabela 03. <i>Primers</i> usados para amplificar a região do espaço de transcrição interna (ITS) por PCR, incluindo o gene 5.8S.	57
Tabela 04. Parâmetros para medir a atividade por meio do halo de inibição.	68
Tabela 05. Condições para amplificação mostrando os reagentes constituintes da reação de PCR.	72
Tabela 06. Programa de amplificação do DNA ribossômico, mostrando os ciclos e as condições de termociclagem em cada fase da reação.	73
Tabela 07. Reagentes utilizados na reação para seqüenciamento com suas respectivas quantidades.	74
Tabela 08. Programa utilizado para reação de seqüenciamento, mostrando os ciclos e as condições de termociclagem em cada fase da reação.	74
Tabela 09 – Curva de calibração de ácido tânico.	76
Tabela 10. Tabela de referência para procedimento descrito acima no preparo das alíquotas dos extratos brutos.	77
Tabela 11. Preparo da curva de calibração de ácido tânico.	77
Tabela 12. Tabela de referência para procedimento descrito acima no preparo das alíquotas dos extratos brutos.	78
Tabela 13. Curva de calibração de ácido tânico.	79
Tabela 14. Tabela de referência para procedimento descrito acima no preparo das alíquotas dos extratos brutos.	80
Tabela 15. Preparo da curva de calibração de ácido gálico.	81
Tabela 16. Tabela de referência para procedimento descrito acima no preparo das alíquotas dos extratos brutos.	81
Tabela 17 – Estudo comparativo da média de biomassa acumulada por indução de fatores abióticos por frasco	88

Tabela 18 – Dados estatísticos para os tratamentos de acúmulo de biomassa por fatores abióticos.	88
Tabela 19. Rendimentos dos extratos obtidos em extração da matéria seca do endofítico (FBS) isolado e dos calos de cultura de tecidos para diferentes solventes.	90
Tabela 20 - Atividade dos extratos etanólicos contra cepas de <i>E. coli</i>	91
Tabela 21. Diâmetro médio de cultura isolada em teste de antagonismo entre endofítico (FBS) e <i>P. Palmivora</i> .	93
Tabela 22. Diâmetro de cultura isolada do FBS em teste de antagonismo frente a <i>Pseudomonas</i> sp.	94
Tabela 23. Halo de inibição dos extratos brutos	97
Tabela 24. Descrição das ferramentas da família BLAST.	99
Tabela 25 – Valores de absorbância para os extratos obtidos a partir do endofítico isolado, FBS, para o método de Makkar et al. (1993).	107
Tabela 26. Valores de absorbância para os extratos obtidos a partir do endofítico isolado, FBS, para o método de Slinkard e Singleton (1977).	108
Tabela 27 – Valores de absorbância para os extratos obtidos a partir do endofítico isolado, FBS, para o método de Swain e Hills (1959).	110
Tabela 28 – EAG ¹ e EAT ² dos fenóis totais para os extratos do endofítico isolado, FBS, na concentração de 10 mg mL ⁻¹ apresentando a percentagem média de matéria seca (% _{média} de MS) para AG ¹ e AT ² .	111
Tabela 29 – Fenóis totais em EAG (mg) do extrato hexânico do endofítico FBS e atividade antioxidante expressa em concentração eficiente de AG (CE _{AG})	116

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 - Curva de crescimento do isolado fúngico das sementes de <i>Mirabilis jalapa</i> em meio MS durante cultivo em meio líquido BD sob condições de repouso e escuro.	87
Gráfico 02 - Comparativo entre meio BD e tratamentos para acúmulo de biomassa por meio de fatores abióticos com base nos respectivos desvios padrões.	88
Gráfico 03 – Curva de calibração do ácido gálico para o método de Makkar et al. (1993).	103
Gráfico 04 – Curva de calibração do ácido gálico para o método de Slinkard e Singleton (1977).	104
Gráfico 05 – Curva de calibração do ácido gálico para o método de Swain e Hills (1959).	104
Gráfico 06 – Curva de calibração do ácido tânico para o método de Makkar et al. (1993).	105
Gráfico 07 – Curva de calibração do ácido tânico para o método de Slinkard e Singleton (1977).	105
Gráfico 08 – Curva de calibração do ácido tânico para o método de Swain e Hills (1959).	108
Gráfico 09 – Comparativo para os valores em EAG para os extratos do fungo endofítico isolado, FBS, para os três métodos avaliados.	111
Gráfico 10 – Comparativo para os valores em EAT para os extratos do fungo endofítico isolado, FBS, para os três métodos avaliados.	112
Gráfico 11 – Percentual de DPPH remanescente nos extratos do fungo endofítico isolado, FBS, para a concentração de 40mg mL ⁻¹ e dos padrões (AG, AA e BHT) no decorrer do tempo.	115
Gráfico 12 – Percentagem da atividade antioxidante (AA%) dos extratos brutos obtidos a partir do fungo endofítico FBS nas concentrações de 10, 20 e 40 mg mL ⁻¹ com DPPH para o tempo de 30 min.	116
Gráfico 13 – Correlação entre fenóis totais expressos em equivalente de ácido gálico, EAG, e atividade antioxidante, expressa em concentração eficiente de ácido gálico, CE _{AG} , para o extrato hexânico do endofítico FBS, identificado como <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , isolado de <i>Mirabilis jalapa</i> .	117

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2,4-D – 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético)

AA – Ágar-Água

AA% - Porcentagem de Atividade Antioxidante

AAT – Atividade Anti-oxidante Total

AG – Ácido Gálico

ANA - naftalenoacetic acid (ácido naftaleno-acético)

AT – Ácido Tânico

B5 – meio basal Gamborg (1968)

BD – Batata-Dextrose

BDA – Batata-Dextrose-Ágar

BHA – Brain-Heart-Ágar (Cérebro-Coração-Ágar)

BHI – Brain-Heart-Infusion (infusão de cérebro-coração)

BHT - Butylated hydroxytoluene (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol)

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CE – Concentração Eficiente

CTAB – Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (brometo de cetil-trimetilamônio)

CV – Coeficiente de Correlação

DM – Diferença média

DNA – Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)

dNTP's – deoxyribonucleoside triphosphates (desoxirribonucleotídeos trifosfatados)

DPPH – 2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

EGA – Equivalent Galic Acid (equivalente de ácido gálico)

ETA – Equivalent Tanic Acid (equivalente de ácido tânico)

FBS – Fungo Branco Semente (fungo endofítico de coloração branca isolado da semente de *Mirabilis jalapa*)

FC% - Porcentagem de Frequência de Colonização

FT – Fenóis Totais

HIV – Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)

IAA – indolacetic acid (ácido indol-3-acético)

IBA – indolbutyric acid (Ácido indol-3-butírico)

ITA – inibidor do transporte de auxina

ITS – intergenic transcribed spacer (espaço de transcrição interna)

Lactrimel – Leite-Trigo-Mel

MAP – *Mirabilis* antiviral protein (Proteína antiviral de *Mirabilis*)

MF – Meio Folha

MS – meio Murashige & Skoog (1962)

mtDNA – ácido desoxirribonucléico mitocondrial

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NPA – ácido N-1-naftilftâmico

PCR – Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)

PI% - Porcentagem de Inibição

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso)

rDNA – ácido desoxirribonucléico ribossomal

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição)

RIP – ribosome-inactivating proteins (proteínas de inativação ribossomal)

RNA – Ribonucleic acid (ácido ribonucléico)

RPM – rotações por minuto

SAB – Sabouraud-Dextrose-Ágar

SDS – sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sódio)

TE – tampão obtido da mistura de Tris-HCl e EDTA

TR – Transcriptase Reversa

Tris-HCL – tris(hydroxymethyl)aminomethane Hydrochloride (Cloridrato de Tris-(hidroximetil)-aminometano)

UV – Ultra Violeta

UV-Vis – região do Ultra Violeta-Visível

SUMÁRIO

OBJETIVOS	17
INTRODUÇÃO	19
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
1.1 ESTUDOS SOBRE A PLANTA	24
1.2 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS	30
1.2.1 Estudo da Atividade dos Fungos Endofíticos	33
1.2.2 Metabólitos Secundários e Endofíticos	37
1.2.3 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	38
1.3 A BIOTECNOLOGIA E A METABOLÔMICA	44
1.3.1 Os Metabólitos	45
1.3.2 Compostos fenólicos	47
1.4 CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS	53
2 METODOLOGIA	60
2.1 ESTERILIZAÇÃO	60
2.1.1 Frascos e utensílios	60
2.1.2 Meios de Cultura	61
2.2 MATERIAL VEGETAL E ISOLAMENTO DE ENDOFÍTICOS	62
2.2.1 Desinfestação ou Desinfecção Superficial de Órgãos Vegetais	64
2.2.2 Isolamento e purificação de endofíticos	64
2.2.3 Cultura de tecido vegetal	64
2.3 IDENTIFICAÇÃO DE ENDOFÍTICO	65
2.4 CURVA DE CRESCIMENTO	65
2.4.1 Crescimento micelial	65
2.4.2 Acúmulo de biomassa	66
2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	66
2.5.1 Preparação dos extratos do endofítico	66
2.5.2 Teste de sensibilidade antimicrobiano	67
2.6 ESTUDO DE ANTAGONISMO CONTRA FITOPATOGÊNICOS	68
2.6.1 Teste de cultura pareada	68
2.6.2 Teste antifúngico por difusão em poços	69
2.6.3 Teste antimicrobiano por difusão em disco de papel	70
2.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ENDOFÍTICO	70
2.7.1 Extração do DNA	71
2.7.2 Amplificação do rDNA	71
2.7.3 Sequenciamento	73
2.8 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	75
2.8.1 Reagentes utilizados	75
2.8.2 Determinação de fenóis totais	75

2.8.3 Determinação da Atividade Antioxidante	80
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
3.1 CULTURA DE TECIDOS E ISOLAMENTO DE ENDOFÍTICO	83
3.1.1 Obtenção de plântulas in vitro	83
3.1.2 Formação de calos a partir dos explantes foliares e do caule	84
3.1.3 Obtenção de culturas de raízes	85
3.2 OBTENÇÃO DE ENDOFITÍCOS E MANUTENÇÃO DE CULTURAS	85
3.3 ESTUDO MORFOLÓGICO, MICROCULTIVO E MICROMETRIA	89
3.4 RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS	90
3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA PATÓGENOS	90
3.6 TESTE DE ANTAGOSNISMO CONTRA FITOPATOGÊNICOS	92
3.6.1 Teste de cultura pareada	92
3.6.2 Teste antimicrobiano por difusão em poços	95
3.6.3 Teste antimicrobiano por difusão em discos de papel	96
3.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ENDOFÍTICO	97
3.8 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS	102
3.8.1 Curvas de Calibração	103
3.8.2 Teor de fenóis nos extratos brutos	106
3.8.3 Cálculos para Fenóis Totais (FT)	110
3.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE in vitro	112
3.9.1 Cromatografia em camada delgada comparativa	113
3.9.2 Determinação da atividade sequestrante in vitro	114
CONCLUSÃO	119
REFERÊNCIAS	121
APÊNDICES	146
ANEXOS	153

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Desenvolver a partir da planta *Mirabilis jalapa* Linn um trabalho que isole microrganismo endofítico e permita verificar a potencialidade biológica dos extratos frente a microrganismo patógenos e fitopatógenos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar endofítico a partir da semente da planta;
- b) Estabelecer as condições de desenvolvimento do endofítico isolado;
- c) Identificar o endofítico isolado através de caracterização morfológica e por meio do sequenciamento da região do espaço de transcrição interna (ITS) da subunidade menor do DNA ribossomal;
- d) Avaliar a atividade dos extratos contra microrganismos patógenos;
- e) Estudar o efeito antagonista do endofítico isolado contra fitopatógenos;
- f) Comparar três metodologias para determinação do teor de fenóis totais com base no reagente de Folin-Ciocalteu;
- g) Determinar o teor de fenóis totais nos extratos da matéria seca micelial do endofítico;
- h) Determinar atividade sequestradora de radical livre frente ao DPPH nos extratos da matéria seca micelial do endofítico.

INTRODUÇÃO

Com o objetivo de caracterizar novas substâncias naturais bioativas, a biotecnologia, por meio de técnicas, que usem organismos vivos ou partes destes para produzir e/ou modificar os produtos, bem como de melhorar geneticamente plantas ou animais e desenvolver microrganismos para fins específicos, tem contribuído no desenvolvimento socioeconômico de nossa sociedade. (OLIVEIRA, 2003).

O crescimento do campo da biotecnologia ocorreu a partir da década de 70 por meio do desenvolvimento da engenharia genética (alteração direta do material genético). A tecnologia implica na modificação direta do genoma do organismo alvo pela introdução intencional de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) exógenos (genes exógenos) que possuem uma função conhecida. Exemplos de substâncias ou produtos que têm sido produzidos dessa forma incluem interferon humano (substância natural sintetizada no organismo humano para defesa contra vírus), insulina e hormônios de crescimento humano, plantas resistentes a vírus, plantas tolerantes a insetos e plantas resistentes a herbicidas. Outro uso importante da biotecnologia implica na produção de bactérias, utilizadas para biodegradação de vazamentos de óleos ou lixo tóxicos (OLIVEIRA, 2003).

O estudo de microrganismos endofíticos é um ramo de pesquisa da biotecnologia que se desenvolve de forma crescente. Em levantamento populacional, estimou-se que pode haver em torno de 1 milhão de espécies de fungos diferentes em nosso planeta (HAWKSWORTH e ROSSMAN, 1987). Como parasitas, no último século, muitos dos 100 mil fungos que foram descritos, estiveram associados a vários organismos superiores, como saprófitas em materiais biológicos inoperantes e em decomposição. Nas últimas décadas, os cientistas começaram a observar que as plantas podem servir como um reservatório de inúmeros microrganismos ditos “endofíticos” (BACON e WHITE, 2000). Esses vivem mutualisticamente nos espaços intercelular de tecidos vegetais e podem produzir substâncias com atividade biológica e com potencial de uso farmacológico. Em estudo detalhado foi evidenciado que 51% das substâncias biológicas ativas isoladas dos fungos endofíticos eram previamente desconhecidas quando comparada com aquelas substâncias da microbiótica do solo, que representam 38% de substâncias biologicamente ativas (SHUTZ, 2001).

Dos compostos isolados a partir dos endofíticos, grande parte são metabólitos secundários que possuem diferentes funções: estrutural, defesa, atrativa e interespecífica. Da

classe dos metabólitos que possuem grupos fenólicos, tais como: fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZK e SHAHIDI, 2004), têm importância reconhecida, uma vez que se relacionam principalmente a atividade antioxidante por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM, 1996; SOARES, 2002).

Os radicais livres são controlados nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena, como a enzima superóxido dismutase, ou serem exógenos provenientes normalmente da dieta alimentar. Nesta última destacam tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenoides (VALKO et al., 2004; EL-AGAMEY et al., 2004; OMONI e ALUKO, 2005). Quando há limitação na disponibilidade de antioxidante, podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo (ATOUI et al., 2005), desde ataques às membranas celulares até à moléculas de DNA. Os antioxidantes, portanto, são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres que desencadeiam uma cascata de reações responsáveis pelo envelhecimento, doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (BARREIROS et al., 2006).

Por tudo exposto anteriormente, o presente trabalho, dividido em três capítulos: revisão bibliográfica, metodologia e resultados e discussão; dá ênfase no isolamento de microrganismo endofítico a partir da planta *Mirabilis jalapa* Linn, além do estudo das condições de manutenção desta cultura e seu desenvolvimento em meios nutrientes, a determinação da bioatividade dos extratos brutos frente a espécies patogênicas e fitopatogênicas e a determinação quantitativa de fenóis totais e avaliação da atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) frente aos extratos brutos do endofítico isolado.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ESTUDOS SOBRE A PLANTA

A *Mirabilis jalapa* Linn é uma planta herbácea (50 a 100 cm de altura) pertence à divisão *Magnoliophyta*, da classe *Magnoliopsida*, da ordem *Caryophyllales*, da subclasse *Caryophyllidae* e da família *Nyctaginaceae*. Apresenta folhas simples, pecioladas, limbo de 8-12 cm de comprimento e 3-4,5 cm de largura, ovaladas, com margem lisa, ápice aristado, base cordada, filotaxia de opostas, e desprovidas de estípulas. Inflorescência terminal com poucas flores andrógenas, actinomorfas, com 5 sépalas e 5 pétalas, unidas entre si; com 5 estames; ovário súpero, unicarpelar e unilocular (CORRÊA, 1984). É uma planta perene com raiz tuberosa e flores de coloração diversa (amarelo, vermelho, branco, roxo, cor de rosa e multicolorida – Figura 1) cuja abertura ocorre no fim da tarde, sendo por isso conhecida em alguns países da América como quatro-horas, e apresenta fragrância doce. No Brasil é também conhecida como bonina, maravilha, jalapa falsa e entre outros nomes.

Figura 1. Fotos destacando as variedades de cores da *Mirabilis jalapa*



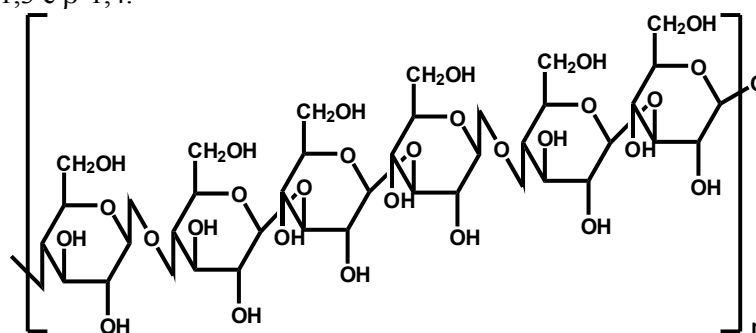
Fonte: Autor, 2009.

Segundo Corrêa (1984), as folhas novas cozidas são comestíveis, a raiz é purgativa, porém venenosa. O caule e a raiz que são espessas e suculentas, produzem mais matéria alcalina do que qualquer outro vegetal apontado como próprio para extração de potássio. O seu fruto se assemelha a uma pimenta do reino, e o seu amido, obtido, que é abundante, serve para eliminar sardas e “panos” do rosto quando preparado com limão, na forma de uma pasta. A planta também é muito preconizada como emético-catártico, cuja raiz tuberosa aparece nas farmacopeias como “*Radix Nyctaginis Mechoacannae*” ou “*Jalapa falsa*”, sendo suas sementes venenosas.

Em estudo com o chá de raízes e sementes, foram demonstradas atividades antibacteriana e antiviral sobre vários patógenos humanos e vegetais (DUARTE et al., 1995; DE BOLLE et al., 1996; VIVANCO et al., 1997; VIVANCO et al., 1999), sendo muito utilizado pela população da região nordeste para o tratamento de úlceras, espinhas, acne, leucorréia, cólicas abdominais, sífilis e como antiinflamatório (CORRÊIA, 1984). Para Andrade Filho (2001), a planta é tida como alucinógena e causadora de problemas intestinais, no caso de intoxicações.

Muitos estudos pertinentes ao uso de extratos de plantas como agentes terapêuticos têm sido relatado, principalmente na busca do controle de microrganismos resistentes a antibióticos. O extrato das sementes de *M. jalapa* mostrou atividade contra os patógenos humanos: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Enterobacter ssp*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri* e *Salmonella typhi* (KUSAMBA et al., 1991), e com os extratos de suas flores foi possível detectar um grande potencial em inibir a contratilidade do músculo liso que constitui o jejuno (ARROYO et al., 2004).

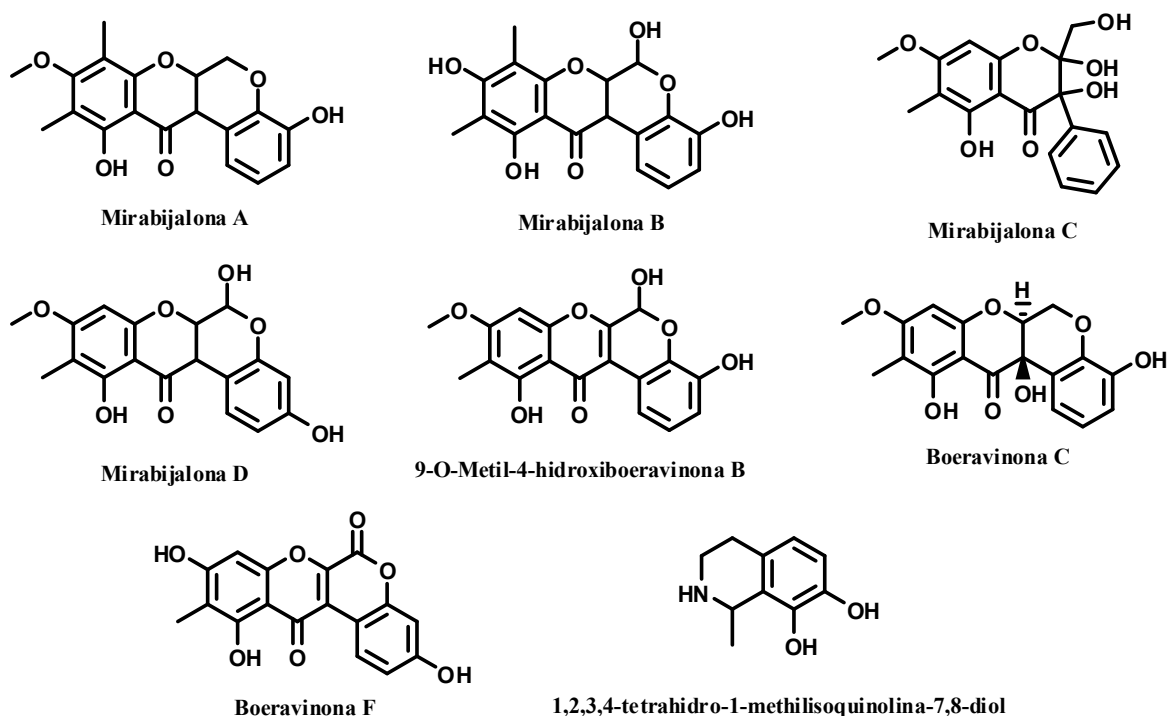
Figura 2. Polissacarídeo da raiz de *M. jalapa* formado por monômeros de β -D-Glicose unidas por ligações β -1,3 e β -1,4.



Fonte: Ray et al., 1987.

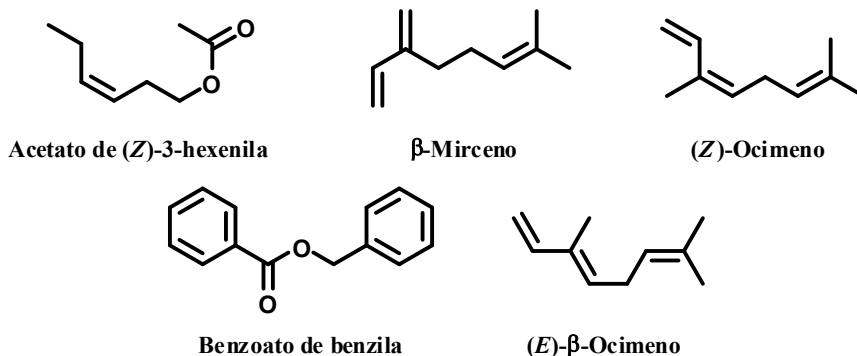
A partir das raízes de *M. jalapa*, Ray et al. (1987) isolaram um polissacarídeo, composto por unidades β -D-glicose, D-glicana, com ligações β -1,3 e β -1,4 (Figura 2).

Das raízes de *M. jalapa* também foram isolados quatro rotenóides denominados Mirabijalona A-D, bem como outros compostos, 9-O-Metil-4-hidroxiboeravinona B, Boeravinona C e F, e 1,2,3,4-Tetrahidro-1-metilisoquinolina-7,8-diol (Figura 3), que apresentaram um grau de 48% de inibição da transcriptase reversa do vírus HIV-1 (WANG et al., 2002).

Figura 3. Estruturas químicas dos compostos isolados da raiz de *M. jalapa*

Fonte: Wang et al., 2002.

Em 2005, Effmert et al., estudaram os compostos voláteis das flores de *M. jalapa* através de cromatografia gasosa acoplado a espectrofotômetro de massa (CG/EM) e isolaram os compostos: Acetato de (Z)-hexenila, β -Mirceno, (Z)-Ocimeno e Benzoato de benzila, sendo o monoterpeneo (*E*)- β -Ocimeno encontrado em maior proporção, ver Figura 4.

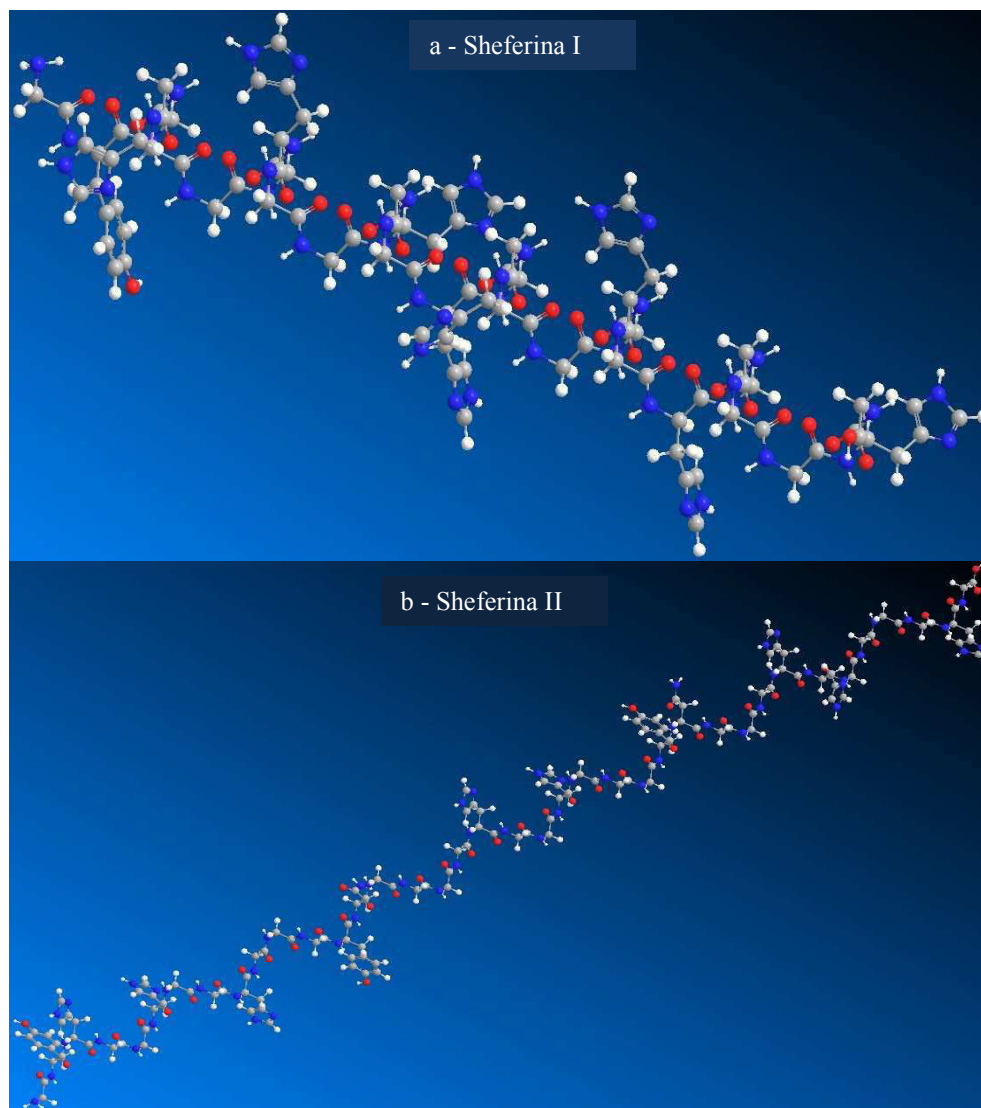
Figura 4. Compostos voláteis isolados das flores de *M. jalapa*

Fonte: Effmert et al., 2005.

Das sementes e raízes de plantas jovens de *M. jalapa* também se isolou um grupo de peptídeos que foram chamadas Proteínas Antivirais de *Mirabilis* (MAP) (Figura 5). Esses compostos demonstraram ação antifúngica e antiviral específicas. As MAP's ajudam a planta a proteger-se contra vírus, contra fungos do solo prejudiciais e a outras variedades cultiváveis

de importância, como o vírus de mosaico do tabaco. As MAP's apresentaram atividade abortiva em ratas gestantes, e inibiram a síntese de proteínas para multiplicação de vírus em células (TAYLOR, 2005).

Figura 5. Representação estrutural 3D simulado em programa computacional ChemDraw e Chem3D (CambridgeSoft, versão 10.0)¹ em modelagem bola-bastão das seqüências de Aminoácidos para as duas Proteínas Antivirais da *Mirabilis* (MAP), onde: a) Sheferina I – com 28 aminoácidos: Gly-Tyr-Gly-Gly-His-Gly-Gly-His-Gly-Gly-His-Gly-Gly-His-Gly-Gly-His-Gly-Gly-His-Gly-His-Gly-Gly-Gly-His-Gly. b) Sheferina II – com 38 aminoácidos: Gly-Tyr-His-Gly-Gly-His-Gly-Gly-His-Gly-Gly-Gly-Tyr-Asn-Gly-Gly-Gly-Gly-His-Gly-Gly-His-Gly-Gly-Gly-Tyr-Asn-Gly-Gly-Gly-His-His-Gly-Gly-Gly-Gly-His-Gly. Sendo: Gly = Glicina, Tyr = Tirosina, His = Histidina e Asn = Asparagina.



Fonte: Taylor, 2005.

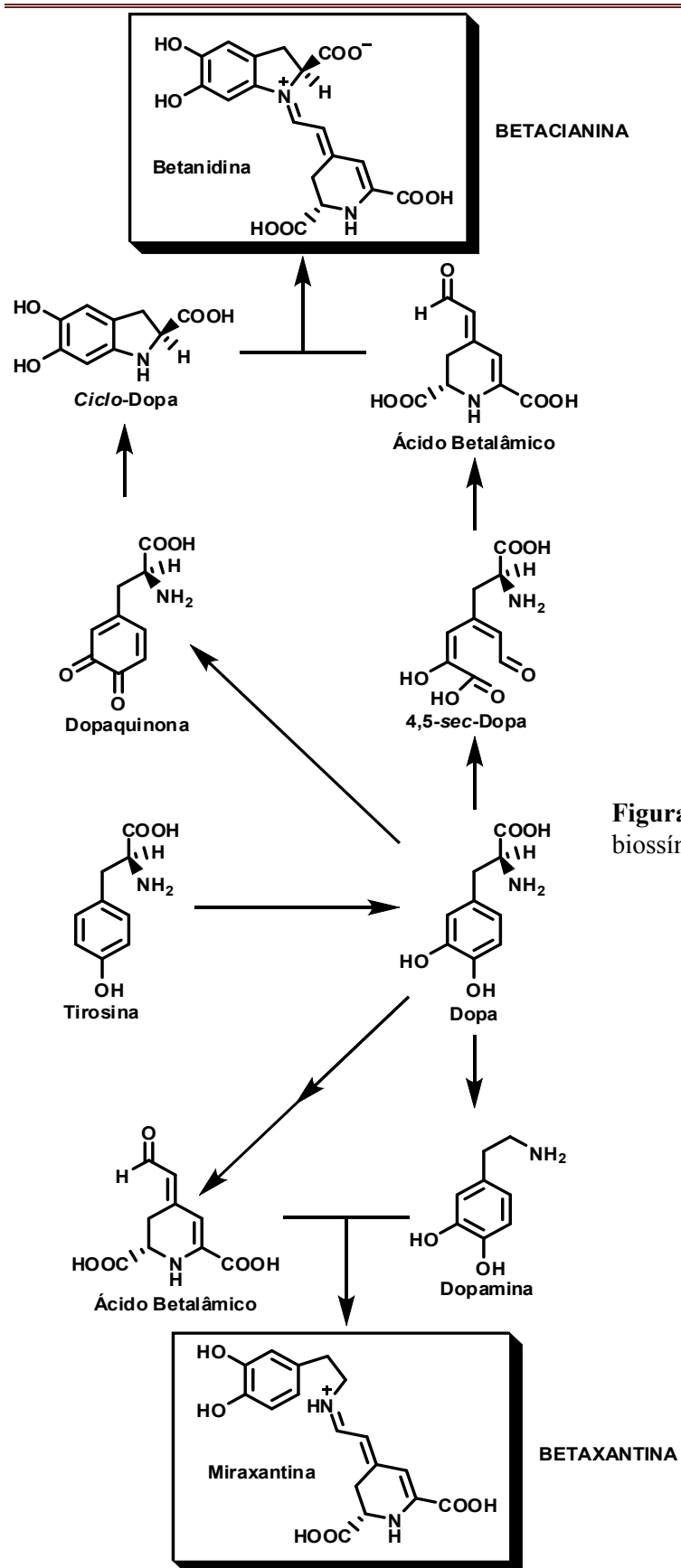
¹ Todos os direitos reservados a CambridgeSoft Corporation® (<http://www.cambridgesoft.com/terms>)

As concentrações mais altas de MAP's são encontradas nas sementes da planta, e em seguida nas raízes e folhas. Esses peptídeos agem de forma semelhante a outros peptídeos denominados RIP (Proteínas de Inativação do Ribossomo), como a ricina, encontrada nas sementes de mamona e são usadas como arma biológica. A ação desses peptídeos se dá pela inativação do ribossomo ao ligar-se ao mesmo paralisando a síntese de proteínas e causando morte celular. Quando comparado com a ricina, os MAP's são considerados 30 vezes menos tóxicos. Por causa desta toxicidade, as sementes não são geralmente utilizadas nos compêndios da medicina herbácea a despeito das ações antimicrobianas atribuídas as mesmas (TAYLOR, 2005).

A família *Nyctaginaceae* é produtora da classe de alcalóides denominada de betalaínas (SIMÕES et al., 2002). Em geral, as betalaínas são pigmentos nitrogenados hidrossolúveis (CAI et al., 2005; GANDIA-HERRERO et al., 2005) e compreendem dois grupos estruturais: as betacianinas de coloração vermelha (latim *Beta*, *Beta vulgaris*; e do grego *Kyanos*, azul), e as betaxantinas coloração amarela (Latim *Beta*, *Beta vulgaris*; e do grego *Xanthos*, amarelo) (STRACK et al., 2003), o que caracteriza a coloração típica das raízes e atuam como importantes substâncias antioxidantes para a dieta humana (VITTI et al., 2004).

As betalaínas acumulam-se em flores, frutos, caules e raízes de famílias da ordem *Caryophyllales*, com as exceções das famílias *Caryophyllaceae* e *Moluginaceae*, nas quais as betalaínas são substituídas por antocianinas (STRACK et al., 2003). Antocianinas são pigmentos, derivados de flavonóides, que ocorrem em todas as outras famílias de plantas (SIMÕES et al., 2002). Devido a esta localização restrita, betalaínas são utilizadas na quimiotaxonomia da ordem *Caryophyllales* (STRACK et al., 2003).

A cor das betalaínas é atribuída ao efeito de ressonância das duplas ligações presentes no esqueleto estrutural. Desta forma, nas betaxantinas, o ácido betalâmico, precursor das betalaínas, é conjugado com um aminoácido ou amina, enquanto, nas betacianinas, este ácido encontra-se condensado com a ciclo-dopa (ciclo-3,4-diidroxi-fenilalanina). A condensação com a ciclo-dopa estende a ressonância eletrônica para o anel aromático difenólico. Com esta conjugação extra, a absorção máxima muda de 480 nm (amarelo, betaxantinas) para 540 nm (violeta, betacianinas) (GANDIA-HERRERO et al., 2005) (Figura 6).



Grande parte dos estudos com betalaínas provém de seu uso como colorante de alimentos. Cai et al. (2005), avaliou o uso de betalaínas da família *Amaranthaceae* na coloração de sorvetes, chegando a resultados promissores quanto à estabilidade. A mais importante fonte da betalaína, betanina, um agente colorante, é a beterraba vermelha, *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* (STRACK et al., 2003).

A extração de betalaínas de tecidos de plantas e cultura de células pode ser feita com metanol e água (1:1), além do acréscimo de ácido ascórbico ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$) ser recomendado por Strack et al. (2003), por saber-se que um potencial hidrogeniônico (pH) levemente ácido estabiliza betacianinas e inibe possíveis oxidações.

Segundo Bruneton et al. (1999), betalaínas não possuem interesse terapêutico, todavia, a partir dos trabalhos de Pedreño et al. (2000); Kranner et al. (2001) e Cai et al. (2005), que demonstraram a atividade antioxidante de betalaínas, ficou claro que esta família de compostos possuem ação farmacoterápica.

As betalaínas da família *Amaranthaceae* foram testadas com o método do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH $\cdot$), os resultados mostraram atividade antioxidante comparadas à do ácido ascórbico (CAI et al., 2005). O potencial antioxidante das betalaínas deve-se aos grupos fenólicos, principalmente na posição *para*, que, frente ao radical do DPPH, têm seus hidrogênios removidos, levando a radicais estabilizados por ressonância eletrônica.

Na parte seguinte, será apresentado revisão sobre os microrganismos endofíticos, destacando o interesse de seus estudos e suas principais características.

1.2 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Os microrganismos endofíticos foram considerados assintomáticos, ou seja, sem produzir efeitos benéficos ou prejudiciais aos seus hospedeiros, até o final da década de 70. Em 1886, descobriu-se que microrganismos também vivem sistematicamente no interior das partes aéreas das plantas, sem causarem doenças, sendo estes chamados de endofíticos (CARROLL, 1986; PETRINI et al., 1991). Neste conceito, foram excluídas as bactérias fixadoras de nitrogênio, os fungos micorrízicos, e microrganismos que colonizam o interior das raízes, que embora por definição sejam endofíticos, eram tratados separadamente. Esta comunidade endofítica é constituída principalmente por fungos, bactérias e actinomicetos (HALLMANN et al, 1997).

Os endofíticos revelaram propriedades de interesse, como proteção contra predadores e patógenos desempenhando função para a sanidade vegetal, já que atuam como agentes controladores de microrganismos fitopatogênicos, além de poder funcionar também no controle de insetos e até proteger a planta contra herbívoros. Atualmente, atribuem-se outras características importantes a estes organismos, como o aumento da resistência a condições de estresse, alteração em propriedades fisiológicas, produção de fito-hormônio, toxinas, fármacos (como antibióticos), imunossupressores, antitumorais, e compostos de interesse biotecnológico, como enzimas, movimentando em torno de 61 bilhões de dólares anuais. (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO et al., 2000; STAMFORD et al., 2001; STAMFORD et al., 2002; SUTO et al., 2002; STROBEL, 2003).

Na década de 80 deu-se início a pesquisas de bioprospecção em fungos endofíticos, visando isolar, identificar e verificar a potencialidade biológica das substâncias produzidas por estes fungos, que podem ser os verdadeiros produtores de substâncias terapêuticas que antes eram identificadas como sendo da planta hospedeira.

Devido à íntima associação entre os endofíticos e espécies vegetais, tem sido sugerido que estes microrganismos coevoluiram com seus hospedeiros (MISAGHI e DONNDELINGER, 1990), confirmando a hipótese de interação mutualística, onde os endófitos utilizar-se-iam de nutrientes e proteção da planta hospedeira, e esta receberia em troca compostos químicos como: enzimas, compostos bioativos e metabólitos secundários (TAYLOR e TAYLOR, 2000). É possível imaginar que alguns destes microrganismos endofíticos podem ter favorecido e sofrido a transferência de informação genética com a planta e vice-versa (STIERLE et al., 1993). Obviamente, isto permitiu maior compatibilidade com a planta hospedeira, ocasionando a evolução das rotas bioquímicas conjunta dos organismos, tendo por resultado a produção de hormônios de crescimento da planta, por exemplo, que podem ser sintetizadas por fungos e bactérias endofíticas (GOODMAN, 1986).

Da interação planta-endófito destaca-se também a maior resistência em ambientes com intenso estresse, causado por fatores bióticos ou abióticos (SAIKKONEN et al., 1998; CLAY, 1992), resistência contra patógenos (LEMANCEAU e ALABOUVETTE, 1993; HALLMANN et al., 1997; M'PIGA et al., 1997) e/ou aumento do crescimento vegetal (HALLMANN et al., 1997; BENT e CHANWAY, 1998; SHISHIDO et al., 1999). Estas constatações despertaram interesse biotecnológico, com o estudo direto dos endofíticos e o papel dos metabólitos secundários extraídos e suas aplicabilidades para os homens. Além disso, trabalhos recentes têm demonstrado que estes microrganismos endofíticos podem ser

utilizados como vetores para a introdução de características de interesse biotecnológico na planta (DOWNING et al., 2000; TOMASINO et al., 1995).

As plantas, no geral, são hospedeiras de um ou mais endófitos, que podem ser detectados no interior de tecidos vegetais por meio de microscopia ótica (WHITE Jr. et al., 1993) ou eletrônica (VIRET e PETRINI, 1994), ou ainda por métodos sorológicos (SINCLAIR, 1991). A infecção dá-se por meio de fissuras e a colonização ocorre nos espaços intercelulares, abaixo das camadas de células epidermeais, vasos condutores e, em alguns casos, colônias intracelularmente a esses tecidos, sendo dificilmente observada penetração nas células em condições naturais (BACON e WHITE, 2000; STROBEL, 2003).

A ocorrência de endófitos varia bastante de acordo com o clima da região onde foi realizado o isolamento. A maioria dos estudos descreve a microbiota de vegetais isolados de regiões de clima temperado, que se revela bastante diversa das espécies encontradas em regiões tropicais, tanto em termos quantitativos quanto qualitativos (RODRIGUES e PETRINI, 1997). Os principais ou mais freqüentes grupos, gêneros e espécies de microrganismos endofíticos têm sido descritos em vários trabalhos nos últimos dez anos, alguns deles apresentando extensas revisões sobre o assunto, nos mais diversos aspectos. Os fungos predominam em número de trabalhos na literatura científica, seguidos de bactérias e actinomicetos, não por isso, menos importantes (PETRINI, 1991; FISHER et al., 1992; CHANWAY, 1996; HALLMANN et al., 1997; RODRIGUES e PETRINI, 1997; AZEVEDO, 1998; OKANE et al., 1998; AZEVEDO et al., 2000; STROBEL, 2002; STROBEL, 2003).

Embora os endófitos possam ser encontrados em sementes, e após a germinação, colonizam outras partes da planta como geralmente ocorre em gramíneas, não é regra geral. Sua penetração nesses casos dá-se principalmente por aberturas naturais, tais como: estômatos (Figura 7), região de emissão de raízes secundárias, microferimentos nas raízes pelo atrito com as partículas dos solos e enjúrias causadas por manuseio agrícola, entre outros fatores (PEIXOTO NETO et al., 2002).

Devido os fatos apresentados acima, o processo de isolamento de endófitos envolve cuidados especiais para que sejam excluídos os microrganismos que vivem na superfície do hospedeiro, os epífitos. A desinfestação da superfície das folhas, caules e outros órgãos vegetais é uma etapa fundamental para o adequado isolamento destes microrganismos. Os tempos de tratamento e a concentração do agente desinfetante podem variar de acordo com a textura do material a ser utilizado, razão pela qual devem ser feitos testes preliminares para a

adequação da metodologia de isolamento, para que apenas os microrganismos epifíticos, mas não os endofíticos sejam eliminados (BLANCO, 1999).

Figura 7. Levedura endofítica no interior de estômatos de folhas de citros.



Fonte: Neto et al. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Ed. 29, 2002, p. 65.

Os meios de cultura devem ser apropriados, de acordo com o grupo de endófitos que se deseja isolar, podendo ser acrescentadas substâncias seletivas, como antibióticos, que inibem o crescimento de bactérias, ou fungicidas, que restringem o crescimento de fungos. Também podem ser utilizados meios específicos que permitem o crescimento de apenas um determinado tipo de microrganismo que se deseja isolar em particular. Outras variáveis igualmente importantes devem ser levadas em consideração, como a idade da planta e dos órgãos utilizados, o local e a época da coleta, a temperatura de incubação das placas para o isolamento, além da recorrência do isolado, revelando o seu verdadeiro estado endofítico (PETRINI, 1991; AZEVEDO, 1998).

É interessante salientar que, devido a desequilíbrios no metabolismo da planta, causados por situações de estresse, como culturas mal realizadas e uso excessivo de insumos agrícolas (fertilizantes e agroquímicos), a microbiota endofítica pode ser alterada levando a uma invasão por fitopatógenos. Mesmo um microrganismo endofítico que não produz danos em uma determinada espécie ou variedade de planta, em condições de desequilíbrio, pode assumir sua patogenicidade para o mesmo hospedeiro (DI FIORI e DEL GALLO, 1995).

1.2.1 Estudo da Atividade dos Fungos Endofíticos

Os endofíticos são encontrados em todas as divisões dos fungos, presumindo-se que evoluíram independentemente em muitas ocasiões. Os endófitos mais comuns são membros anamórficos de Ascomycota, e freqüentemente são relacionados próximos aos fitopatógenos,

sendo sugerido que evoluíram a partir destes e vice-versa (REDLIN e CARRIS, 1996). Como exemplo desta relação pode-se citar o caso de plantas cítricas como *Citrus sinensis*, na qual o fungo endofítico *Guignardia mangiferae* (syn. *G. endophyllicola*) é filogeneticamente relacionado à *G. citricarpa*, o agente causal da mancha preta do citros (BAAYEN et al., 2002). Em outro caso, a mutação de um único gene transformou uma linhagem patogênica do fungo *Colletotrichum magna* em uma linhagem endofítica, mostrando que a diferença entre estes dois grupos pode ser muito tênue (FREEMAN e RODRIGUEZ, 1993).

Em alguns casos, plantas conhecidas como tóxicas são, na verdade, hospedeiras de microrganismos produtores de alcalóides tóxicos, sendo estes compostos responsáveis por intoxicações em animais silvestres provocando anorexia, depressão, uremia e lipomatoses abdominais, como já observado em cervídeos (WOLFE et al., 1998). Embora estes fungos confirmem vantagens para a planta hospedeira, do ponto de vista econômico, podem resultar em sérios prejuízos para pecuaristas, pois podem ser responsáveis por casos de intoxicação em ruminantes, afetando de forma negativa o desempenho ou até causando a morte destes animais (PEIXOTO NETO et al., 2002).

Estes microrganismos são também capazes de proteger as plantas contra insetos-pragas e contra patógenos, aumentar o crescimento e enraizamento da planta hospedeira e aumentar a sua resistência a estresses bióticos e abióticos produzindo metabólitos específicos (HALLMANN et al., 1997). Estas moléculas podem possuir atividade hormonal, antibiótica e antitumoral, entre outras, e apresentam grande interesse industrial e biotecnológico, sendo por esse motivo alvo de importantes pesquisas.

Webber (1981) foi provavelmente o primeiro pesquisador a relatar a proteção de uma planta, a árvore de olmo (designação comum às árvores caducifólias do gênero *Ulmus*, da família das ulmáceas), por meio do fungo endofítico *Phomopsis oblonga*, contra o besouro *Physocnemum brevilineum*, agente causal da doença do olmo Alemão (que dizimou esta espécie entre 1965 e 1980), devido o fungo *Ophiostoma* (*Ceratocystis ulmi*) por ele transmitido. Isto foi confirmado quatro anos mais tarde, por Claydon et al. (1985), que mostrou que aquele fungo endofítico pertencente à família *Xylariaceae* biossintetiza metabólitos secundários nos hospedeiros do gênero *Fagus*, e que estas substâncias afetam as larvas do besouro.

Outros trabalhos pioneiros da década de 80 também destacam a presença de fungos endofíticos que diminuíam a herbivoria no hospedeiro pela produção de compostos que reduzia a atratividade da planta (KOGA et al. 1997), aumento da susceptibilidade do inseto a

doenças ou inibindo o seu desenvolvimento (BULTMAN e CONARD, 1998). Estes estudos foram realizados principalmente em gramíneas dos gêneros *Lolium* e *Festuca* em associação com o fungo do gênero *Acremonium*, hoje classificado como *Neotyphodium*. Este endofítico apresenta a característica de diminuir a incidência de insetos de diferentes ordens como afídios, coleópteros, hemípteros e lepidópteros (AZEVEDO et al., 2000).

Tabela 01. Exemplo de interação entre fungos endofíticos e plantas anfitriãs³.

Tipo de Interação	Referência
1 Controle de insetos	Wagner e Lewis (2000)
Endofítico: <i>Beauveria bassiana</i>	
Hospedeiro: <i>Zea mays</i> (milho)	
Ação: Proteção contra a broca do colmo	
2 Proteção contra herbívoros	White e Cole (1985)
Endofítico: <i>Acremonium spp.</i>	
Hospedeiro: <i>Lolium spp.</i> (gramíneas) e outras	
Ação: Produção de toxinas	
3 Efeitos fisiológicos	Varma et al. (1999)
Endofítico: <i>Piriformospora indica</i>	
Hospedeiro: <i>Zea mays</i> (milho)	
Ação: Promoção de crescimento	
4 Produção de fármaco	Stierle et al. (1993)
Endofítico: <i>Taxomyces andreanae</i>	
Composto: Anticâncer (Taxol [®])	
Endofítico: <i>Fusarium subglutinans</i>	
Composto: Imunossupressivo Subglutinol	Lee et al. (1995)

Os alcaloides produzidos por fungos endofíticos quando associados com seus hospedeiros podem apresentar atividade inseticida e nematicida (DAHLMAN et al., 1991). Em alguns casos o controle de pragas por fungos endofíticos é indireto, pois o metabólito produzido pelo fungo retarda o desenvolvimento da larva, e este aumento do tempo de desenvolvimento leva o inseto à morte. Neste caso, a morte da larva ocorre, como observado em árvores de carvalho, quando o inseto é eliminado juntamente com as folhas velhas do hospedeiro (ARAÚJO et al., 2002).

É importante salientar também que fatores ambientais podem estar envolvidos, pois foi verificado que em baixos níveis de nutrientes para a planta, o endófito *Neotyphodium*

³ Tabela construída com as informações contidas em Azevedo et al. (2000) e Azevedo (1998).

coenophialum torna o hospedeiro resistente a larvas de *Spodoptera frugiperda*. Entretanto, quando o nível de nutrientes é elevado não foi verificada significativa redução da herbivoria (BULTMAN e CONARD, 1998).

Um aspecto interessante da relação endófito-planta-inseto fica por conta da disseminação de sementes. Estudos mostraram que sementes infestadas de endófito podem ser menos atrativas para formigas do deserto, sendo que, estas formigas só percebem a infestação após terem coletado as sementes, as quais são descartadas pelo caminho. Este fato possibilita a dispersão das sementes com favorecimento para sua germinação longe da competição com a planta mãe (ARAUJO et al. 2002).

De maneira geral, tem sido observado que fungos endofíticos podem apresentar um efeito negativo sobre os nematóides patogênicos, contudo, os relatos de controles mais efetivos estão associados à utilização das bactérias endofíticas combinadas a compostos como a quitina, que aumenta a população bacteriana com atividade negativa sobre os nematóides patogênicos (ARAUJO et al., 2002).

O primeiro trabalho relatando o estudo de bactérias endofíticas foi realizado por Colombo (1978), no qual se observou a ocorrência destas bactérias no talo de algas, entre sílfes, e dentro dos filamentos cenocíticos. Este autor sugeriu a ocorrência de um equilíbrio fisiológico entre a bactéria e seu hospedeiro. Supondo ainda, que o fato dos endofíticos se encontrarem próximos aos cloroplastos e nas zonas mais jovens dos talos, indicaria uma ligação com a atividade fotossintética da alga e sua provável dependência de oxigênio.

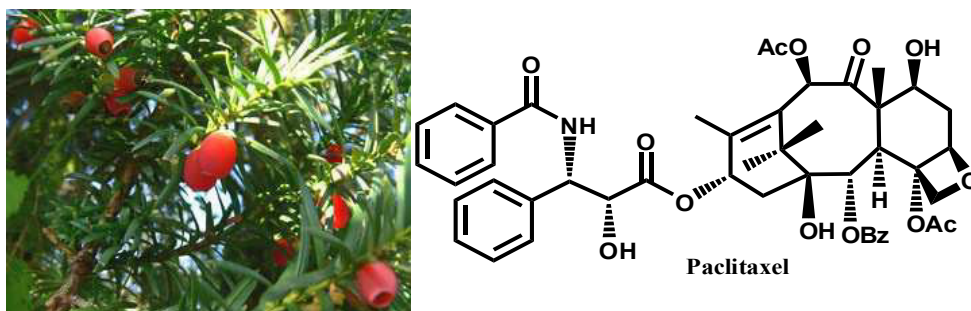
Outros trabalhos abordando a forma de ocorrência das bactérias endofíticas, empregando métodos e técnicas mais aperfeiçoadas de estudo e análise foram realizados, como o de Jacobs et al. (1985), onde os autores enumeraram, localizaram e caracterizaram bactérias endofíticas de raízes de beterraba açucareira utilizando técnicas imunológicas e microscopia eletrônica de varredura e, desta forma, verificaram um aumento na população de bactérias nas regiões centrais e periféricas da raiz. Os autores sugeriram que as regiões de maior ocorrência constituem uma rota de colonização das bactérias. Os mesmos autores relataram ainda a ocorrência de um grande número de diferentes espécies, dentre elas: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium sp.* e *Erwinia herbicola*. Este trabalho, pioneiro na época, mais uma vez demonstrava a ocorrência de bactérias não patogênicas estabelecendo uma relação simbiótica intracelular em raiz de plantas de beterraba.

1.2.2 Metabólitos Secundários e Endofíticos

A maioria dos microrganismos produtores de antibióticos é comumente encontrada no solo, sendo que, certos endófitos têm-se mostrado potentes produtores de antibióticos, dos quais, muitos com propriedades de uso na agricultura e na medicina.

O paclitaxel, vendido sob o nome comercial de taxol[®], um diterpenóide produzido pela planta *Taxus brevifolia* (Figura 8) e largamente utilizado no tratamento de câncer mamário e de útero, é também produzido por um fungo endofítico, o *Taxomyces andreamae* encontrado dentro de *T. brevifolia* (STIERLE et al., 1993). Trabalhos posteriores também mostraram que outro fungo endofítico, *Pestalotiopsis microspora* isolado da *T. wallachiana* também produz taxol (STROBEL et al., 1996). Em 1998, Strobel e Long, observam que diversos fungos endofíticos produzem comumente mais taxol[®] do que muitas plantas superiores. Foi acrescentado também que a distribuição destes endofíticos produtores desta substância não estaria confinados a árvores da família *Taxaceae*.

Figura 8. Foto da planta *Taxus brevifolia* e estrutura do Paclitaxel.



Fonte: http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/drug_design/leitstruktur.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/drug_design/leads_plant.vscml.html

Azevedo (1998) observa que alguns compostos de origem vegetal, também são produzidos por fungos que habitam esses vegetais, indicando haver uma transposição de genes entre plantas e fungos em uma verdadeira engenharia genética *in vivo*.

Atividades antibióticas foram relatadas por Fisher et al. (1984), em 10 de um total de 24 isolados de fungos endofíticos obtidos de 5 espécies de *Ericaceae*, onde 5 apresentaram atividades antifúngicas e antibacterianas simultaneamente. Isolados de *Coniothyrium* sp., produziram uma ampla faixa de atividade antibiótica, que confirmam a hipótese de que os endofíticos estariam aptos a competirem com os antagonistas (FISHER et al., 1984).

Biis & Pollshook (1991) apesar de não darem destaque especial a qualquer fungo, fizeram observações importantes ao afirmarem que esses microrganismos, em relação às suas aplicações biotecnológicas, poderiam ser encontrados não entre os endofíticos mais freqüentes, mas entre os mais especializados, raros e restritos a certos hospedeiros.

Não restam dúvidas que os endofíticos possuem a capacidade em sua grande maioria de produzirem antibióticos e outros metabólitos que podem ser usados para controle de doenças. *Acremonium caenophilum*, um endofítico de gramíneas, têm efeito inibitório sobre vários patógenos (WHITE e COLE, 1985). Bactérias do gênero *Erwinia* ocorrem no interior de plantas de soja e produzem metabólitos que protegem a planta contra o ataque de *Pseudomonas syringae* pr. *glycinea* (VÖLKSCH et al., 1992).

Actinomicetos, bactérias e fungos estão entre os produtores mais conhecidos de substâncias que apresentam bioatividade. A maioria de antibióticos em uso é produzida por actinomicetos e em particular por membros do gênero *Streptomyces*. Entre os fungos, o *Penicillium* e *Cephalosporium* spp. são os mais conhecidos. Bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são também estudados como produtoras de potentes antibióticos, como *B. colistinus*, produtor da colistina; *B. brevis* (tirotricina); *B. licheniformis* (gramicidinas); *B. polymyxa* (polimixina).

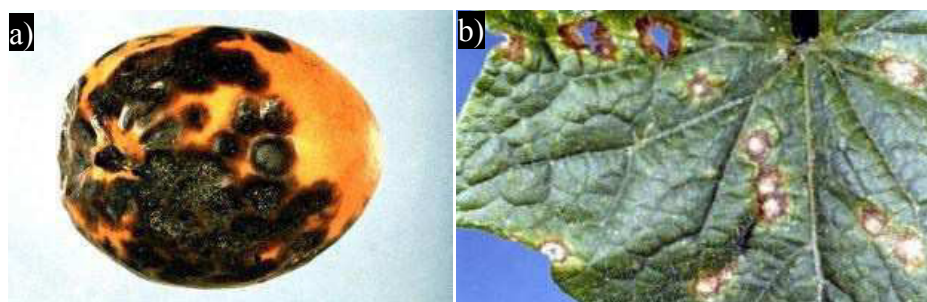
1.2.3 *Colletotrichum gloeosporioides*

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo, é um fungo Mitospórico, da ordem Melanconiales, família Melanconiaceae que se encontra em sua fase anamórfica (assexuada). A fase teleomórfica (fase sexuada) foi descrita como *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spaulding & von Schrenk, no filo Ascomycota, classe Ascomycetes ordem Phyllachorales e família Glomerellaceae (KIRK et al., 2001).

Os fungos do gênero *Colletotrichum* são fitopatógenos importantes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Esses fungos são os causadores de uma diversidade de doenças como antracnose, podridão de pedúnculo e varicela (BAILEY e JEGER, 1992), possuindo uma ampla gama de hospedeiros, infectando goiabeira, mangueira, mamoeiro, cajueiro, jaqueira, certas aonáceas como pinha, biribá, cherimóia, condessa e frutíferas do grupo das Spondias como cajazeira, cajarana, serigüela, umbu e embugüela (MENEZES, 2002; SANTOS FILHO e SANTOS, 2003). No Brasil, a perda pós-colheita de frutos tropicais

devido a doenças ocasionadas por fitopatógenos, situa-se na ordem de 30% dos produtos comercializados (TAVARES, 2004).

Figura 9. Antracnose provocado por *Colletotrichum gloeosporioides* em mamoeiro:
a) antracnose em fruto; b) antracnose em folha.



Fonte: <http://www.infonet-biovision.org/print/images/84/pests>.

A antracnose causada por espécies de *Colletotrichum* é a principal doença de frutos em pós-colheita, sendo considerada doença de elevada importância econômica no Nordeste do Brasil (SERRA e SILVA, 2004). O sintoma típico da doença é caracterizado por lesões arredondadas, grandes, necróticas, com o centro dos tecidos deprimidos, onde são produzidas massas de conídios de coloração alaranjada (BAILEY et al., 1992), podendo ocorrer uma podridão-mole nos frutos, prejudicando a sua comercialização (LIMA FILHO et al., 2003) (Figura 9). Esta fitopatogenidade não é somente característica dos frutos, atacando todos os órgãos da parte aérea da planta, como ramos, gavinhas, folhas e botões florais (SANTOS FILHO et al., 2004). Nestes, as lesões são deprimidas, com podridão seca, causando um enrugamento precoce da área afetada e servindo de entrada para outros fungos oportunistas e coleobrocas (SANTOS FILHO et al., 2004).

As manchas foliares são circulares, bem delimitadas e deprimidas, inicialmente escuras e circundadas por halo de coloração marrom. Com o progresso da lesão, o centro assume cor marrom clara ou esbranquiçada e o halo apresenta-se escuro (Figura 10).

O gênero *Colletotrichum* é um fungo descrito como fitopatógeno, porém apresenta-se como endofítico em diferentes hospedeiros. ARAÚJO et al. (2001) observaram maior abundância de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Guignardia citricarpa* e *Cladosporium sp.* entre os isolados endofíticos de folhas e porta-enxertos de Citrus.

Figura 10. Antracnose em *Paphiopedilum insigne* (Orquidaceae) com destaque para as manchas foliares, lesões circulares, bem delimitadas e deprimidas, com o progresso da lesão evidenciando manchas inicialmente escuras, circundadas por halo de coloração marrom (a) que posteriormente se tornam de centro marrom claro ou branco e com halos escuro (b).



Fonte: Revista de Fitopatologia brasileira. v.30, n.4, jul-ago 2005.

SANTAMARIA e BAYMAN (2005) compararam comunidades de fungos epifíticos e endofíticos associadas com folhas de café (*Coffea arabica*) em Porto Rico. Foram isolados 821 microrganismos agrupados em 131 morfoespécies. *Pestalotia* e *Botryosphaeria* foram os gêneros mais comuns entre os epifíticos, enquanto *Colletotrichum*, *Xylaria* e *Guignardia* foram isolados com maior frequência entre os endófitos. *Guignardia* não foi isolado como epifítico, apenas como endófito. Os autores observaram que fragmentos de folha com *Colletotrichum* são menos prováveis de conter *Xylaria* e *Guignardia* do que os sem *Colletotrichum*, sugerindo a possibilidade de competição ou antagonismo entre os endófitos, ou seja, *Xylaria* pode estar restringindo o crescimento de *Colletotrichum*, importante patógeno de muitas plantas.

Espécies de *Colletotrichum* são tradicionalmente diferenciadas com base em caracteres morfológicos e culturais. Características como morfologia de conídios, presença de setas e do teleomorfo, coloração de colônia, produção de pigmentos e taxa de crescimento têm sido usadas para diferenciar espécies morfológicamente próximas, como *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* J.H. Simmonds (SUTTON, 1992; FREEMAN et al., 1998). As dificuldades encontradas na identificação das espécies de *Colletotrichum* estão relacionadas à grande diversidade fenotípica, influência de fatores ambientais na estabilidade dos caracteres morfológicos e culturais, existência de formas intermediárias e falta de padronização de condições culturais empregadas nos diferentes estudos (SUTTON, 1992; FREEMAN et al., 1998; LOPEZ, 2001).

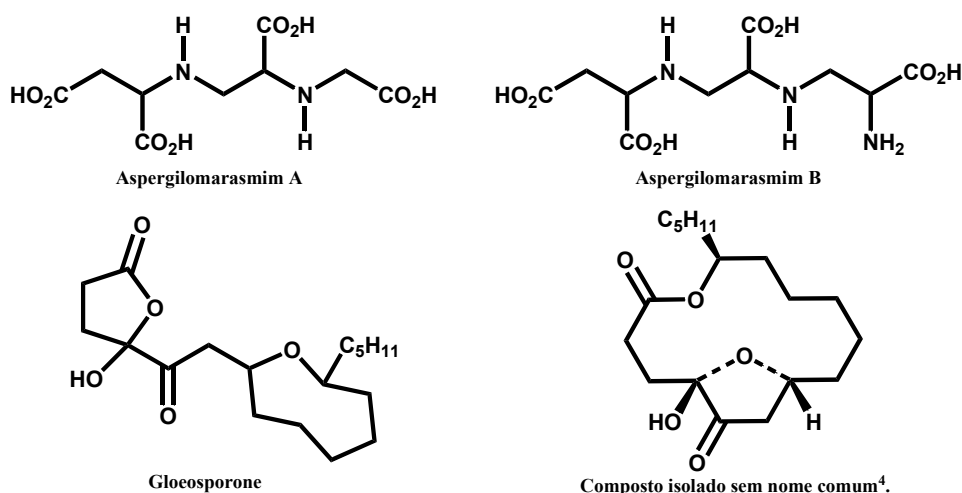
A diferenciação entre espécies com base no círculo de hospedeiros ou hospedeiro de origem também não é um critério confiável para espécies como *C. gloeosporioides* e *C.*

acutatum que infectam diferentes hospedeiras (FREEMAN et al., 1998; PERES et al. 2005). É freqüente a ocorrência de mais de uma espécie de *Colletotrichum* associada a uma mesma hospedeira e uma mesma espécie pode atacar múltiplas hospedeiras (FREEMAN et al., 1998). *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. acutatum* causam, em geral, sintomas semelhantes como as podridões de frutos em pós-colheita (PERES et al., 2002). O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.), por exemplo, pode ser infectado por *C. fragariae* Brooks, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* (GUNNEL e GUBLER, 1992). As três espécies causam antracnose, mas a podridão do pedúnculo, inflorescências e frutos conhecida como “Flor Preta” é atribuída a *C. acutatum*.

Devido à grande importância desse microrganismo, *C. gloeosporioides*, seja devido, sua fitopatogenicidade ou sua presença como endofítico, existem vários estudos sobre seus metabólitos.

Os primeiros compostos isolados que se tem relato foram aspergilomarasim A e B, que tinha sido isolado previamente em espécies de *Aspergillus*. (BALLIO et al., 1969; BOUSQUET et al., 1971). A extração com clorofórmio da solução aquosa, com a presença de conídios em grande densidade, permitiu a cristalização de um metabólito puro, a gloeosporona (MEYER et al, 1983). Também permitiu isolar e identificar a estrutura de um macrocíclico desconhecido, que teve a estrutura identificada por dados espectroscópicos e raio X (Figura 11).

Figura 11. Primeiros compostos isolados em *C. gloeosporioides*.⁴

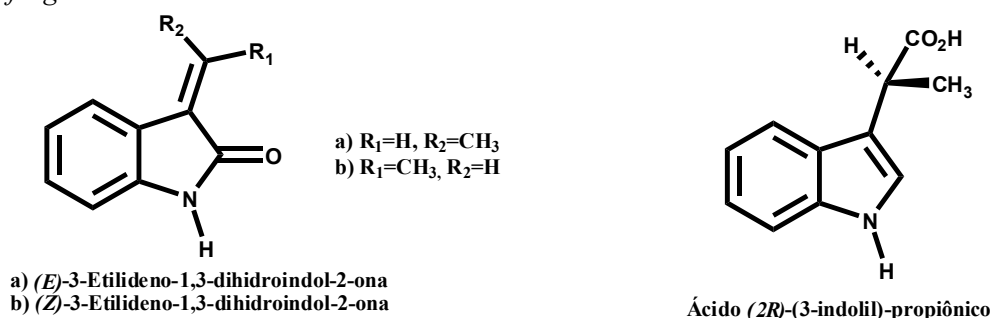


Fonte: Ballio et al., 1969; Bousquet et al., 1971; Meyer et al, 1983.

⁴ Nome seguindo as regras da IUPAC: (1*R*,6*S*,12*S*)-1-hidroxi-6-pentil-5,15-dioxabicyclo[10.2.1]pentadecan-4,14-dione.

Tsurushima et al. (1995) isolaram, da mesma espécie, três auto-inibidores de germinação conidial: (*E*) e (*Z*)-3-etilideno-1,3-dihidroindol-2-ones e o ácido (2*R*)-(3-indolil)-propiónico. Entre dezesseis espécies de fungos que provocam antracnose testados, os compostos isolados, anteriormente, foram detectados somente em *C. gloeosporioides* e *C. fragariae* (Figura 12).

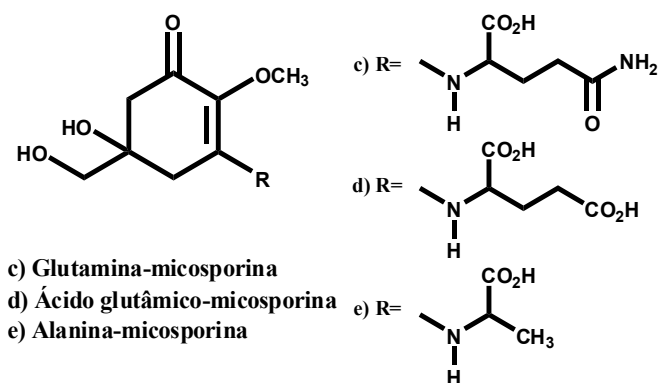
Figura 12. Auto-inibidores de germinação conidial isolados em *C. gloeosporioides* e *C. fragariae*.



Fonte: Tsurushima et al., 1995.

Micosporinas é o nome genérico dado a uma série de compostos solúveis em água que absorvem UV onde os metabólitos apresentam estruturas que contêm uma cicloexenona substituída ligada a um aminoácido ou a um aminoálcool correspondente. Estes compostos são envolvidos no processo de produção de conídios. Estes compostos apesar de terem sido isolados em *C. gloeosporioides*, os compostos glutamina-micosporina e ácido glutâmico-micosporina tiveram sua predominância em: *Pyronema omphalodes* e *Glomerella cingulata*, e alanina-micosporina que mostrou atividade fitotóxica foi isolada em maior quantidade de *C. graminicola* (FAVRE-BONVIN, ARPIN e BREVARD, 1975; YOUNG e PETTERSON, 1982; BERNILLON et al., 1984; LEITE e NICHOLSON, 1992) (Figura 13).

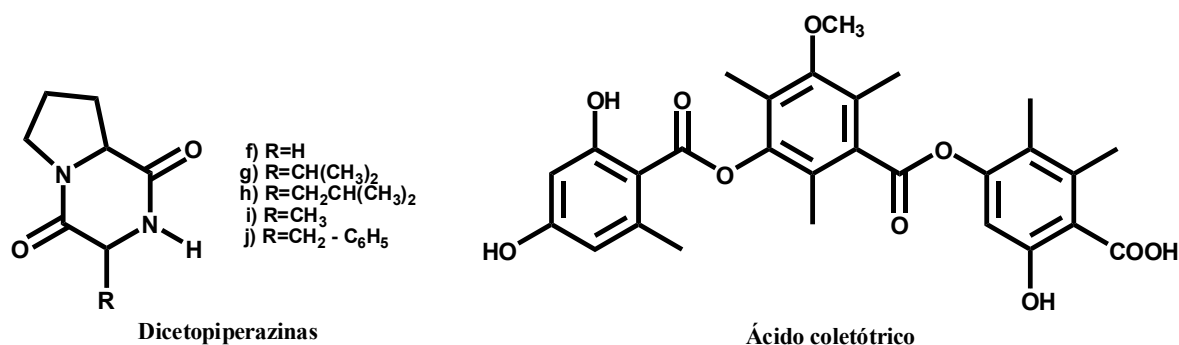
Figura 13. Micosporinas isoladas em *C. gloeosporioides*.



fonte: Favre-Bonvin, Arpin e Brevard, 1975; Young e Petterson, 1982; Bernillon et al., 1984; Leite e Nicholson, 1992.

Pesquisas indicaram que as fitotoxinas produzidas por muitos fitopatógenos, como as espécies de *Colletotrichum*, tem grande potencial de uso como bioherbicidas. Além do que outros metabolitos com atividade fitotóxica foram relatados em *C. gloeosporioides*: dicetopiperazinas, com atividade fitotóxica elevada (OHRA et al., 1995). ZOU et al. (2000) isolaram o *C. gloeosporioides* como fungo endofítico de *Artemisia mongolica*, da família Asteraceae, que produziu uma substância antimicrobiana chamada ácido coletótrico, constatando atividade contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* e *Pseudomonas* sp., atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Aspergillus niger*, e inibição de crescimento de fungos patogênicos como *Gaeumannomyces graminis*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum* e *Phytophthora capsici* (Figura 14).

Figura 14. Fitotóxicas isoladas em *C. gloeosporioides*.

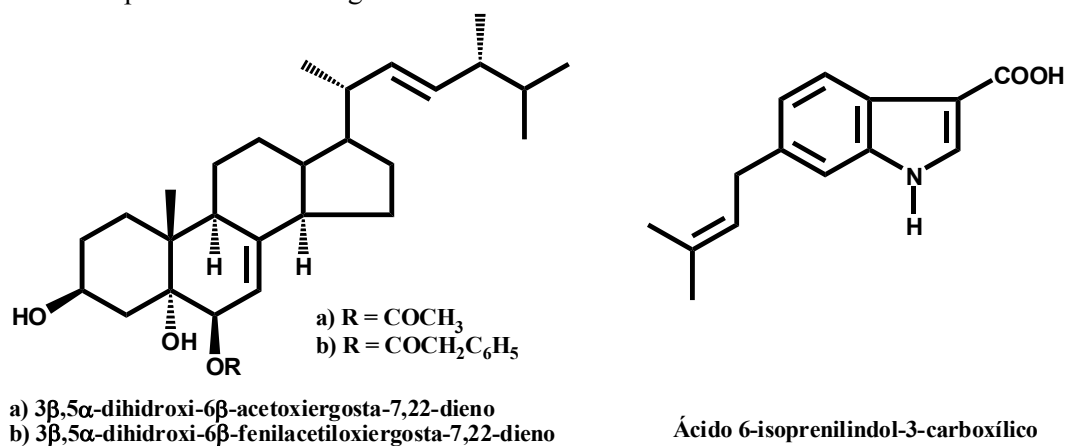


Fonte: Zou et al., 2000.

Lu et al. (2000) obtiveram compostos de uma espécie não identificada de *Colletotrichum* isolado como endofítico de *Artemisia annua*. Estes compostos incluíam 3β,5α-dihidroxi-6β-acetoxiergosta-7,22-dieno, 3β,5α-dihidroxi-6β-fenilacetiloxiergosta-7,22-dieno e ácido 6-isopropenilindol-3-carboxílico (Figura 15).

Diferentes técnicas de isolamento e identificação de metabólitos secundários tem sido estudadas e usadas na produção de novos fármacos. Assim, o próximo sub-tópico será discutido as rotas metabólicas.

Figura 15. Compostos isoladas de *Colletotrichum* como endofítico em *Artemisia annua*, derivados respectivamente do ergosterol e ácido 3-indolilacético.



Fonte: Lu et al. (2000).

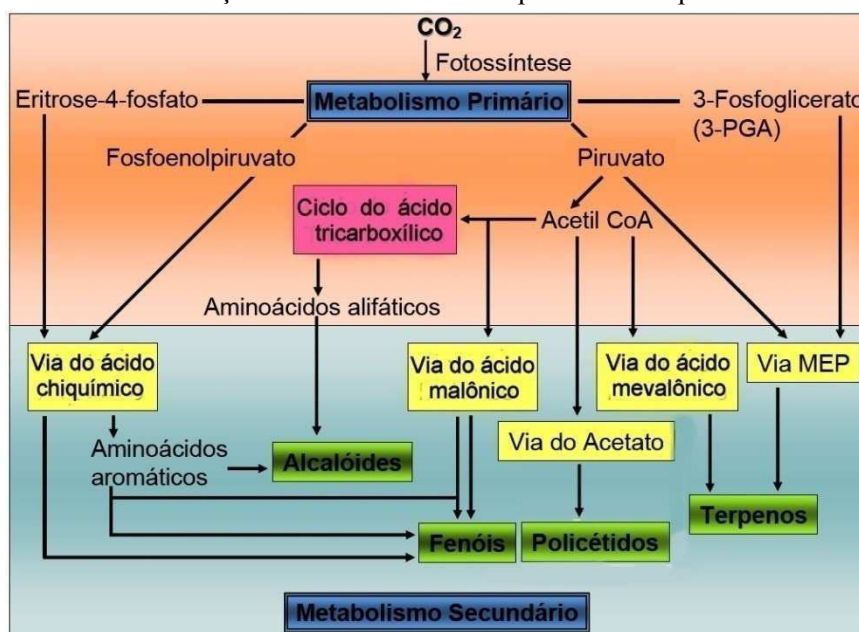
1.3 A BIOTECNOLOGIA E A METABOLÔMICA

Os metabólitos estão divididos em: primários ou secundários. Os primários estão relacionados diretamente as rotas de síntese e degradação das macromoléculas em qualquer ser vivo (DIXON, 2001). Os secundários são, em sua maioria, exclusivos em plantas e fungos, produzidos em rotas específicas a partir dos metabólitos primários (CHALLIS e HOPWOOD, 2003; HALL, 2006) (Figura 16). Eles atuam sobre diferentes formas nos organismos: deste estrutural, defesa contra herbívoros e/ou patógenos, atrativos para polinizadores e agentes em interações interespecíficas, como a alelopatia (ENGEL et al, 2002; CHALLIS e HOPWOOD, 2003).

Segundo Challis e Hopwood (2003), o estudo desses metabólitos visando à obtenção de produtos efetivos contra diversas doenças e passíveis de comercialização já é realizado desde o início do século XX, sendo que, a idéia de analisar todo o conjunto de metabólitos em qualquer nível de complexidade (organismo, órgão, tecido ou mesmo compartimentos celulares) só começou a ganhar destaque nos últimos anos.

A metabolômica tem sido empregada em diversas áreas e com inúmeros propósitos, todavia, em qualquer âmbito existem dificuldades a ser superadas tanto na extração e separação das amostras quanto na análise dos resultados (WECKWERT e MORGENTHAL, 2005).

Figura 16. Visão simplificada das principais vias da biossíntese de metabólitos secundários e inter-relações com o metabolismo primário⁵ em plantas.



Fonte: O Autor, adaptado de Taiz e Zeiger (2004), pag. 312.

1.3.1 Os Metabólitos

No citosol de qualquer célula encontram-se milhares de pequenas moléculas dissolvidas conhecidas como metabólitos primários. Essas moléculas estão envolvidas nas principais rotas metabólicas que ocorrem nas células (DIXON, 2001).

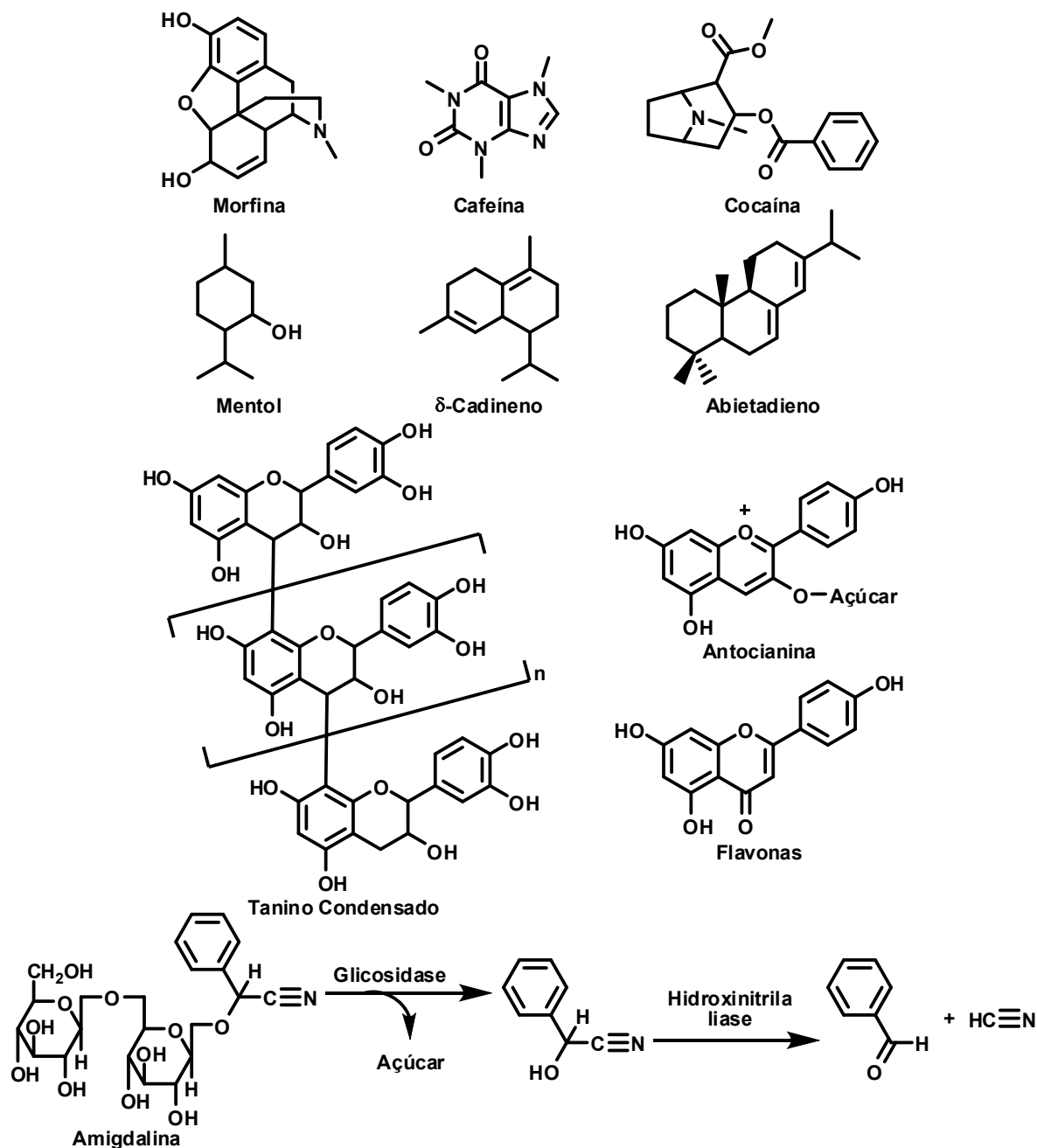
Dentre os metabólitos primários encontram-se: os aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos, carboidratos e seus derivados fosforilados, além de um grande número de ácidos mono-, di- e tri-carboxílicos. Esses metabólitos são altamente polares ou carregados eletricamente, solúveis em água e presentes nas células em concentrações variadas (entre milimolar e micromolar). Sua retenção dentro das células deve-se ao fato da membrana plasmática ser impermeável a eles, embora existam transportadores nas membranas celulares que possibilitem a entrada e/ou saída desses compostos na célula, ou em compartimentos subcelulares (células eucarióticas). A presença bastante similar dos mesmos grupos de metabólitos em qualquer célula viva demonstra a conservação evolucionária dessas rotas metabólicas (SMEDSGAARD e NIELSEN, 2005).

Destaca-se a ocorrência de um grupo de pequenas biomoléculas que, ao contrário dos metabólitos primários, são específicos de certos tipos de células ou organismos. Estas

⁵ Adaptado de TAIZ, L. e ZEIGER, E. Fisiologia vegetal, 3º ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, pag. 312

moléculas comumente chamadas de metabólitos secundários (DIXON, 2001), que geralmente não estão envolvidas em funções vitais, ou seja, não fazem parte do metabolismo básico e possuem características químicas muito variadas e, às vezes, complexas (HALL, 2006). Durante muito tempo acreditou-se que os metabólitos secundários fossem produzidos sem uma função específica, seriam produtos finais de reações, chegando a ser considerados até como anomalias (MARASCHIN e VERPOORTE, 1999), porém, a visão sobre essas substâncias mudou radicalmente e a cada dia descobre-se um pouco mais sobre a função destas substâncias, sua utilidade para o desenvolvimento fisiológico das plantas e seu papel como mediadores das interações entre as plantas e outros organismos (NEWMAN et al., 2003; ZHANG et al., 2003).

Os principais grupos de metabólitos secundários são os alcalóides, terpenos, taninos, flavonóides e glicosídeos (HALL, 2006). (Figura 17). Os alcalóides são bases nitrogenadas com grande variação na estrutura molecular. Nas plantas tem função de regulação do crescimento e de proteção. Os terpenos são moléculas classificados de acordo com o número de átomos de carbono presentes na cadeia em: mono, sesqui, di e triterpenos. Os mono e sesquiterpenos de estruturas cíclicas representam os óleos essenciais, que por serem voláteis são responsáveis pelos odores dos vegetais, tendo a função de polinização e proteção nas plantas. Os taninos são compostos fenólicos (polifenóis) de estrutura variável, apresentam atividade adstringente, ou seja, se ligam a proteínas, e nos vegetais, tem função de proteção. Os flavonóides são heterosídeos, ou seja, contém uma porção de açúcar (diferente da glicose) ligada a uma porção não-glícídica (aglicônio), que neste caso é um pigmento. Esses compostos possuem cores de acordo com o cromóforo presente na molécula, por exemplo, as flavonas são amarelas e os flavonóides antociânicos são azuis, atuam na coloração dos órgãos vegetais nas plantas e na diferenciação celular. Por fim, os glicosídeos são compostos que contém um açúcar ligado a um aglicônio, sendo esse a porção ativa da molécula. Por exemplo: glicosídeos alcoólicos (o aglicônio é um álcool); glicosídeos cianogênicos (liberam ácido cianídrico quando hidrolisados); glicosídeos esteróides (o aglicônio é um esteróide); glicosídeos antraquinônicos (o aglicônico é uma antraquinona). Nos vegetais, a função varia de acordo com a porção não-glícídica (MARASCHIN e VERPOORTE, 1999; ZHANG et al., 2003).

Figura 17. Representação de algumas estruturas de metabólitos secundários.

Fonte: Hall, 2006.

1.3.2 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos pertencem a uma grande classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por uma hidroxila (SIMÕES et al., 2002).

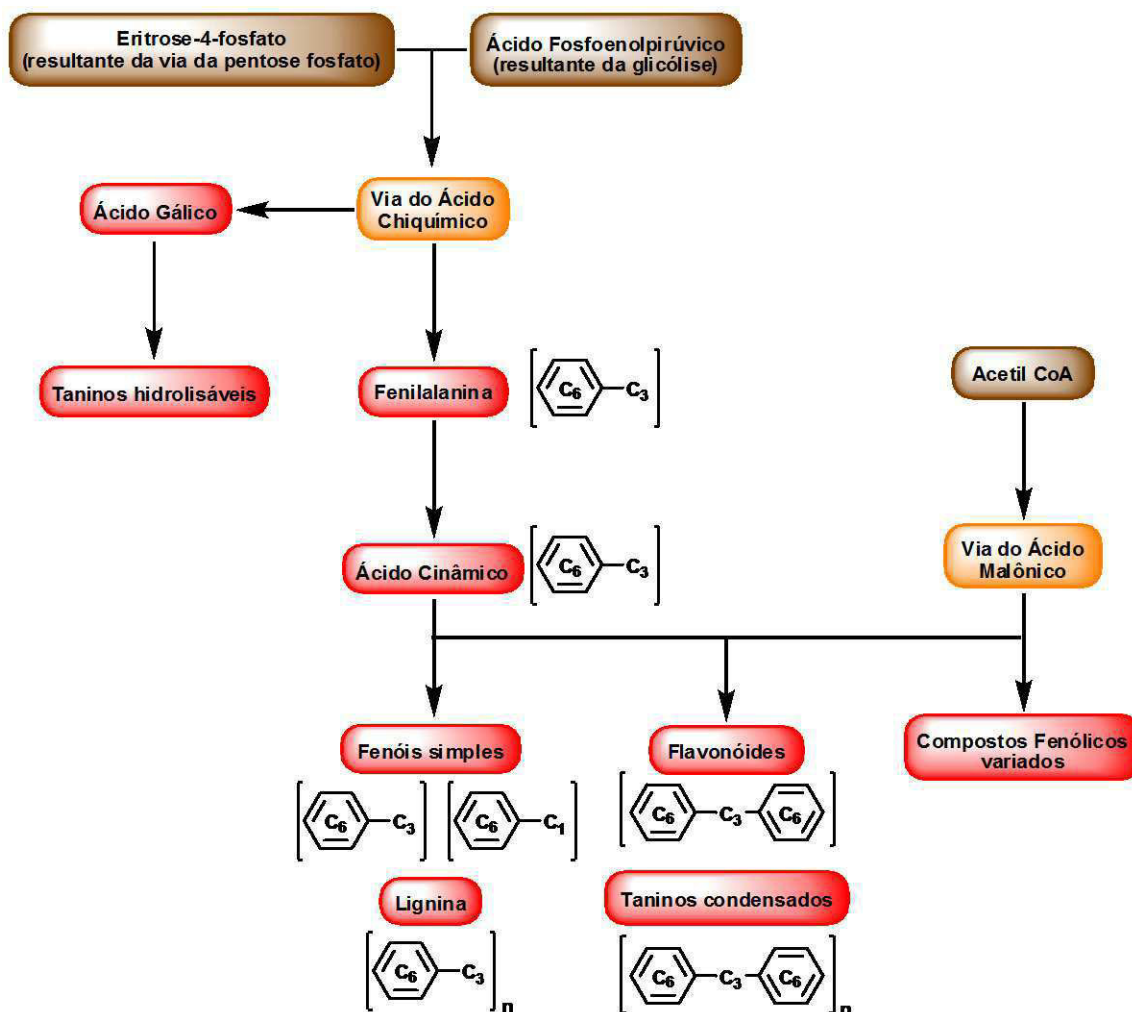
Os compostos fenólicos são classificados de acordo com seu esqueleto principal onde C6 representa o anel benzênico e Cx a cadeia substituinte com o número de átomos de carbono correspondente, conforme descrito na tabela 02 segundo Simões et al. (2002).

Tabela 02. Classificação dos compostos fenólicos de acordo com esqueleto básico

Esqueleto básico	Classe de compostos fenólicos
C6	fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	ácidos fenólicos
C6-C2	acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	fenilpropanóides (cumarinas, cromonas, fenilpropenos, etc)
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	estilbenos e antraquinonas
C6-C3-C6	flavonóides e isoflavonóides
(C6-C3) ₂	Lignanas
(C6-C3-C6) ₂	Diflavonóides
(C6) _n	melaninas vegetais
(C6-C3) _n	Ligninas
(C6-C1) _n	taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	taninos condensados

Devido ser um grupo quimicamente tão heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos, sendo alguns solúveis apenas em solventes orgânicos, outros por serem ácidos ou glicosídeos são solúveis em água e, há, ainda, aqueles que são grandes polímeros insolúveis, estes compostos apresentam uma grande variedade de funções nos vegetais e microrganismos, onde, muitos agem como compostos de defesa contra herbívoros e patógenos, outros tem função de suporte mecânico, atrativo de polinizadores ou dispersores de frutos, na proteção contra a radiação ultravioleta ou reduzindo o crescimento de plantas competidoras (alelopátia).

Por apresentar tão grande variedade estrutural entre os compostos fenólicos, sua biossíntese segue duas rotas, pela via do ácido chiquímico a partir de carboidratos, ou pela via do ácido malônico a partir da acetil-coenzima A, como mostrado no esquema a seguir (Figura 18) adaptado de Taiz e Zeiger (2004).

Figura 18. Rotas metabólicas para os compostos fenólicos.

Fonte: O autor, adaptado de Taiz e Zeiger (2004), pág. 332.

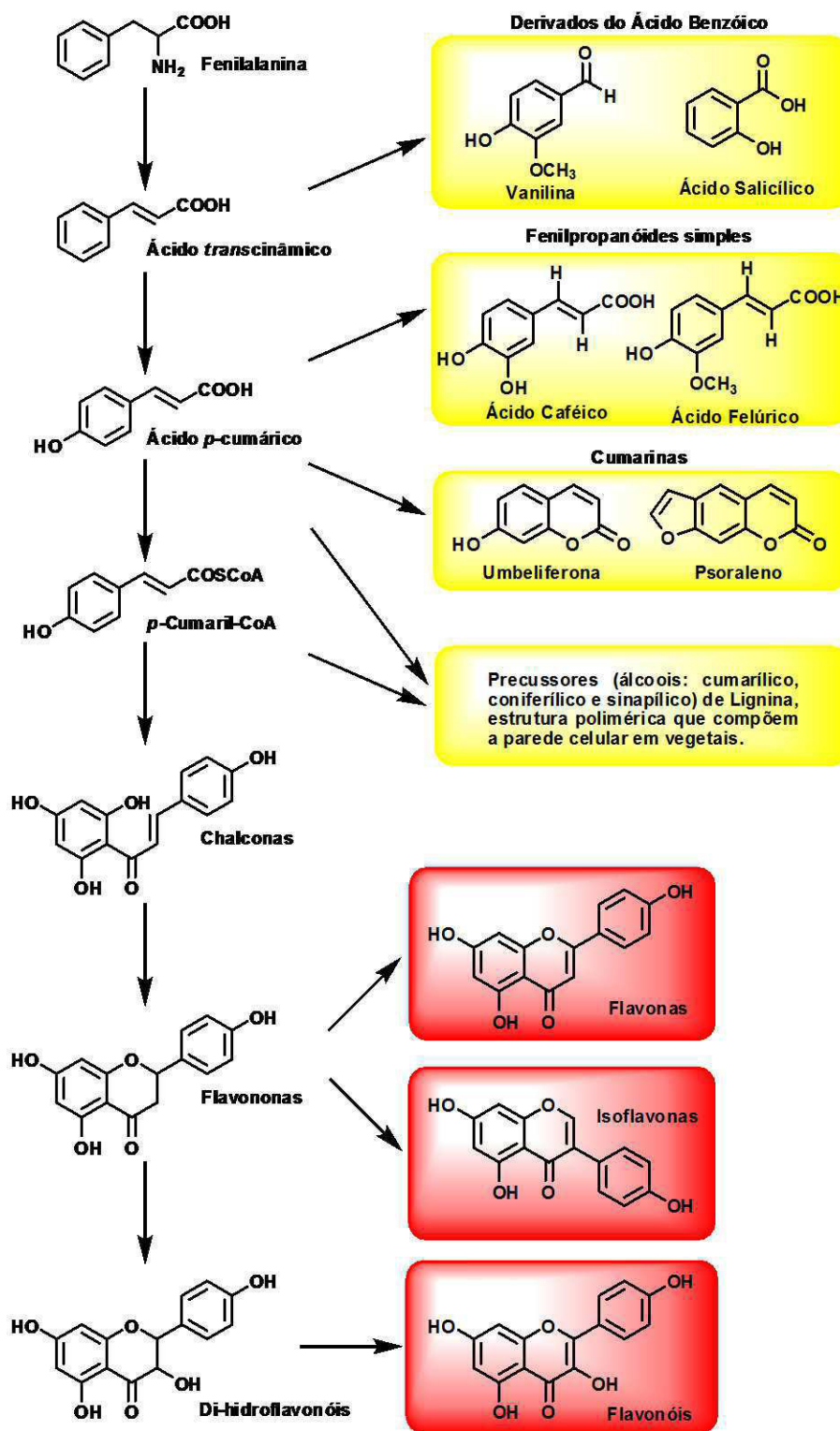
A origem biossintética determina o padrão de substituição dos compostos fenólicos, sendo que, para a rota do ácido chiquímico resulta hidroxila em posição *orto* formado a partir do ácido cinâmico, enquanto, a rota do ácido malônico origina compostos com grupos hidroxilas dispostos em *meta*.

Como destaque tem-se que a biossíntese dos compostos fenólicos caracteriza-se por apresentar rotas alternativas para produção de um mesmo composto e a possibilidade de acoplamentos oxidativos que originam ligações C-C ou C-O intermoleculares com formação de polímeros, como lignanas e neo-lignanas (DEWICK, 1998).

A maioria dos fenóis é derivado, em parte, da fenilalanina, um produto da rota do ácido chiquímico (Figura 18), é o precursor da grande maioria dos compostos fenólicos como: fenilpropanóides, cumarinas, derivados do ácido benzóico, lignina, antocianinas, taninos

condensados e flavonóides. A figura 19 traz a representação de alguns desses compostos a partir da fenilalanina.

Figura 19. Esquema de alguns compostos fenólicos obtidos a partir da fenilalanina.⁶



⁶ Adaptado de TAIZ, L. e ZEIGER, E., Fisiologia vegetal, 3º ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 318

A maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada livremente na natureza, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos. A hidroxila fenólica contribui para a reatividade destas moléculas e as características ácidas associadas às mesmas, permitindo que seja isolados através da solubilidade em soluções fracamente básicas. Outra característica dos compostos fenólicos é a formação de ligação de hidrogênio, que podem ser intramolecular ou intermolecular. Essa última importante na ligação com proteínas, que podem ser utilizadas na detecção de taninos por precipitação. Os compostos fenólicos formam com metais, quelatos metálicos, importantes nos sistemas biológicos e na quantificação por absorbância na região do ultravioleta (UV) (SIMÕES et al., 2002).

Muitos compostos fenólicos presentes em vegetais fazem com que ocorra alelopatia entre espécies vegetais adjacentes. Exemplos são o ácido caféico e o ácido ferúlico (Figura 19) que são fenilpropanóides simples que demonstraram inibir a germinação e crescimento de plantas em laboratório (INDERJIT et al., 1995). A alelopatia tem despertado interesse devido a possíveis aplicações potenciais na agricultura, como diminuição de plantas invasoras. Outra perspectiva interessante é o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas para serem alelopáticas às plantas invasoras.

Outros compostos fenólicos simples apresentam diferentes funções, como o psoraleno (furanocumarina) que apresenta efeito fitotóxico em insetos herbívoros, e o ácido salicílico (derivado do ácido benzóico), regulador de crescimento vegetal que está envolvido na resistência sistêmica a patógenos vegetais (Figura 19).

Dos compostos derivados da fenilalanina destaca-se as ligninas que são substâncias que se depositam na parede das células vegetais, conferindo a estas notável rigidez. As ligninas apresentam esqueleto fenilpropânico $(C_6-C_3)_n$, onde n possibilita formar diferentes lignóides, designação genérica para ligninas. Com base em fitoquímica comparada, Gottlieb (op. cit. SIMÕES, 2002) mostrou que os lignóides são indicadores do processo evolutivo em angiospermas e desempenham um papel importante na adaptação ecológica. Existem evidências que esse grupo de substâncias esteja envolvido em interações de plantas com fungos, insetos ou com outras plantas. Como exemplo, podemos citar a formação de lignina em folhas de *Coffea arabica* L., em resposta à inoculação do fungo *Hemileia vastatrix*, que provoca a ferrugem-do-café.

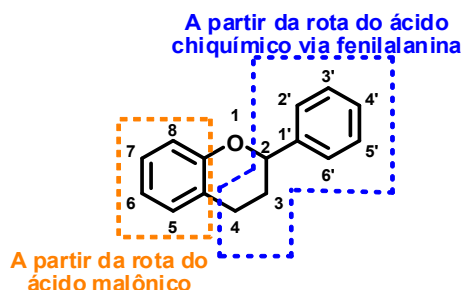
Os flavonóides constituem a maior classe de fenólicos vegetais. O esqueleto de carbono dos flavonóides contém 15 carbonos organizados em dois anéis aromáticos, ligados por uma cadeia de três carbonos (Figura 20).

Os flavonóides são classificados em grupos diferentes em função do grau de oxidação, como se pode ver na figura 19 que apresenta algumas classes de flavonóides.

A grande abundância e diversidade dos flavonóides sugere que sejam importantes para as plantas superiores. As flavonas e flavonóis encontrados geralmente em flores atuam como atrativos para insetos que enxergam na faixa do ultravioleta promovendo a polinização. Existem estudos que evidenciam que estas duas classes de flavonóides atuam:

- no solo como mediadores de interação das plantas com os microrganismos simbiotes fixadores de nitrogênio;
- na planta como inibidores do transporte de auxina (ITA) agindo como reguladores endógenos do transporte polar da auxina por competirem com o ácido N-1-naftilftâmico (NPA) por seu sítio de ligação nas membranas⁷.

Figura 20. Estrutura do núcleo fundamental dos flavonóides.



Fonte: O autor.

As isoflavonas apresentam atividades biológicas diversas como potente ação inseticida, atividade antiestrogênica e possível efeito anticancerígeno encontrado em alimentos à base de soja. Nos últimos anos, as isoflavonas têm se tornado conhecidas por sua ação como antimicrobianos sintetizados em resposta à infecções por fungos ou bactérias, limitando a propagação do patógeno invasor.

Em seguida apresentaremos sobre a caracterização taxonômica e as técnicas moleculares utilizando a região ribossômica do DNA empregado para a identificação de microrganismos ou descobrir possíveis variações entre espécies.

⁷ Os flavonóides agliconas estão tipicamente localizados na membrana plasmática das extremidades basais das células, onde os transportadores de efluxo estão concentrados (PEER et al., 2001).

1.4 CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

A identificação completa dos fungos endofíticos não é fácil, devido à carência de especialistas em taxonomia das diferentes espécies e de conhecimento sobre seu micro *habitat*, podendo haver, entre eles muitas espécies inéditas, uma vez que a taxonomia baseia-se em características macro e micromorfológicas, além de químicos, bioquímicos e fisiológicos. A identificação e classificação dos microrganismos tem sido realizada pela análise de suas estruturas reprodutivas aplicadas às chaves de identificação (LOGUERCIO-LEITE, 2004).

Para a identificação dos fungos, talvez tenha-se as condições mais difíceis, uma vez que apresentam uma grande variedade fenotípica de fatores ambientais, tornando, muitas vezes complexa a distinção de espécies próximas e de linhagens intra-específicas (FIGUEIREDO et al., 2003), como também, as formas sexuadas (teleomórficas) e assexuadas (anamórficas) de uma mesma espécie são classificadas como distintas apresentando capacidades diferentes de troca do material genético (CARLILE et al., 2001).

Outro fator que implica na determinação taxonômica são as condições de reprodução *in vitro* onde pode não ocorrer a esporulação espontânea, sendo necessário induzir por meio de favoráveis condições ambientais (luminosidade, temperatura, umidade relativa, entre outros) e nutricionais (meios naturais, sintéticos ou específicos) (NOZAKI et al., 2004).

Com o advento da biologia molecular, técnicas baseadas na análise do DNA permitem a detecção de polimorfismo utilizando marcadores moleculares a fim de melhorar a identificação e classificação desses microrganismos (FIGUEIREDO et al., 2003). Duas regiões genômicas têm sido utilizadas para caracterização entre espécies: o DNA ribossômico (rDNA) e o DNA mitocondrial (mtDNA). O rDNA é a região gênica mais estudada por ser altamente conservada (JONES; PHILLIPS; ARMSTRONG, 1997; POWERS, 2004), permitindo solucionar problemas taxonômicos quanto ao gênero e espécie (BAYER et al., 1996). Esta região consiste de três genes ribossomais, 18S, 5.8S e 28S (26S), que contêm duas regiões espaçadoras (ITS-1 e ITS-2) entre eles, separadas pelo gene 5.8S (HILLIS; DIXON, 1991; DORRIS, DE LEY e BLAXTER, 1999) (Figura 21).

Figura 21. Representação esquemática do DNA ribossômico, evidenciando os três genes ribossômicos, 18S, 5.8S e 28S (26S) e as regiões espaçadoras, ITS-1 e ITS-2.



Fonte: Hillis; Dixon, 1991; Dorris, De Ley e Blaxter, 1999.

Análises comparativas dos diferentes genes do rDNA têm sido utilizadas para a construção de árvores filogenéticas e para determinação das relações evolucionárias entre e dentro de espécies de plantas (LASHERMES et al., 1997; MARSHALL et al., 2001), répteis (HEDGES; POLING, 1999), bactérias (SNAIDR et al., 1999), fungos (COOK; DUNCAN, 1997), insetos (MALLOCH; FENTON; GOODRICH, 2001), platelmintos (LITTLEWOOD et al., 1999) e nematóides (POWERS et al., 1997; BLAXTER et al., 1998; BELLOCQ et al., 2001; DE LEY; BLAXTER, 2002; OLIVEIRA et al., 2004).

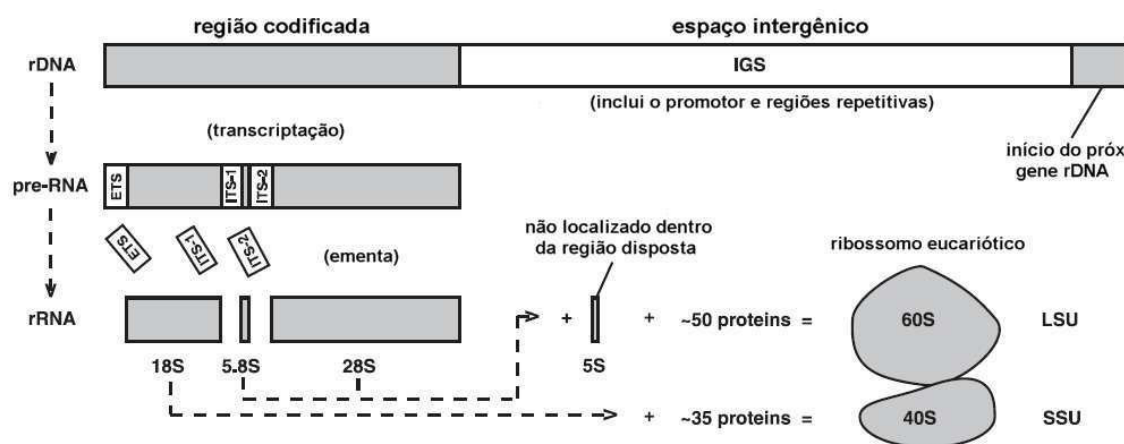
Antigamente, utilizava-se o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – “polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição”) para estudo do genoma total. Esta técnica era pouco exequível e perigosa, devido ao emprego de substâncias tóxicas. Hoje, através do desenvolvimento de métodos que levem em conta caracteres menos variáveis, existe a possibilidade de empregar o RFLP juntamente com a PCR (Polymerase Chain Reaction – “reação em cadeia de polimerase”) ou empregar outras técnicas como: PCR-RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – “polimorfismo de DNA amplificação ao acaso”), PCR *nested*, PCR *multiplex*, PCR em tempo real e PCR-TR (Transcriptase Reversa). Todas as técnicas mencionadas têm a vantagem de utilizar-se de material genético mínimo, e possibilitar concentrar-se numa determinada região do DNA (OLIVEIRA et al., 2004).

Existem vários protocolos que permitem a extração de DNA, alguns mais laboriosos e outros mais simplificados. Para fins de PCR (Polymerase Chain Reaction) é possível utilizar métodos rápidos e simplificados, uma vez que essa técnica requer quantidades mínimas de DNA e este não precisa apresentar alto grau de pureza, podendo ser extraído a partir de amostras de ambientes complexos, tais como solos, rios e açudes, alimentos e amostras clínicas. Para a detecção de um dado fungo em qualquer tipo de amostra é necessário se ter *primers* que propiciem a amplificação de um gene ou segmento específico daquela espécie ou daquela função que se deseja identificar. Assim, o desenvolvimento de procedimentos de diagnóstico baseados em PCR requer o conhecimento de sequências de nucleotídeos de pelo menos parte da região alvo a fim de que *primers* específicos possam ser desenhados. Neste

sentido, algumas regiões tais como aquelas que codificam para RNA ribossômico têm sido bastante úteis (FUNGARO, 2000).

As sequências de nucleotídeos das regiões ITS têm sido analisadas por RFLP para o estudo das estruturas populacionais e para fins de diagnóstico (VRAIN et al., 1992; ZIJLSTRA et al., 1995; POWERS et al., 1997; FLEMING et al., 1998; HOYER; BURGERMEISTER; BRAASCH, 1998; IWAHORI et al., 1998; KNOETZE; BURGER; MEYER, 2000; WAYENBERGE et al., 2000; NGUYEN; MARUNIAK; ADAMS, 2001). Além disso, as regiões ITS podem ser úteis no desenvolvimento de *primers* específicos (UEHARA et al., 1998; WANG et al., 2003; HÜBSCHEN et al., 2004 a,b; OLIVEIRA et al., 2005) e para estudar as relações filogenéticas entre espécies (BECKENBACH; BLAXTER; WEBSTER, 1999; SUBBOTIN et al., 2001; KANZAKI; FUTAI, 2002; SABO et al., 2002). Levantamento realizado por Alvarez e Wendel (2003) revelou que um terço (34%) das análises filogenéticas publicadas nos últimos cinco anos foram baseadas exclusivamente em sequências da região ITS.

Figura 22. Organização dos genes do rRNA dentro do genoma. Organização típica dos genes nucleares do rRNA dos organismos eucariontes. SSU, subunidade pequena; LSU, subunidade grande.⁸



A região 18S é a mais conservada e por isso é utilizada apenas para comparação de organismos distantemente relacionados. A porção 28S é mais variável e, portanto, é apropriada para a comparação de diferentes gêneros ou, em alguns casos, de diferentes espécies. As regiões ITS evoluem rapidamente e, então, são apropriadas para discriminar

⁸ Adaptado de *Insect Molecular Biology*. vol. 15, n. 5, 2006, p. 657-686.

espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. O fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos conservados, serem relativamente curtas (500 a 800pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade. Como consequência disso, é grande o número de sequências ITS de diferentes fungos que estão atualmente disponíveis nos bancos de dados de sequências de nucleotídeos. A PCR realizada com *primers* que são suficientemente homólogos para permitir a amplificação dos organismos alvos, mas que por outro lado não pareiam com organismos não alvos, permitirá a detecção específica do que se deseja. As sequências de DNA que são polimórficas, ou seja, frequentemente variáveis, entre espécies fúngicas, tais como as sequências ITS, são boas candidatas para a detecção de uma espécie e exclusão de todas as demais. Por exemplo, diferenças na região ITS têm sido usadas para desenvolver testes, baseados em PCR, para o diagnóstico de fungos causadores de micose na espécie humana, produtores de toxinas em amostras de alimentos, bem como patógenos de plantas, sem o prévio isolamento do fungo (FUNGARO, 2000).

Entretanto, a região ITS acumula mutações, inserções e deleções ao longo do processo evolutivo da espécie, gerando variabilidade genética, que pode interferir na eficiência de métodos. Além disso, pelo fato dessa variação poder resultar em alelos funcionais divergentes, alelos não funcionais e pseudogenes (RAZAFIMANDIMBISON; KELLOGG; BREMER, 2004), os resultados obtidos podem ser falsos e levar a conclusões duvidosas.

Cópias do rDNA podem se transformar em pseudogenes quando um locus ribossômico torna-se inativo ou quando uma cópia solitária do rDNA é deslocada para outra região genômica (BUCKLER; IPOLLITO; HOLTSFORD, 1997). Apesar das evidências de ocorrência de pseudogenes em plantas e animais, o polimorfismo da região ITS não é estudado; este tem sido detectado e investigado somente quando a amplificação do DNA produz mais que uma banda ou quando o sequenciamento direto do produto de PCR de bandas aparentemente uniformes resulta em mistura de sequências (RAZAFIMANDIMBISON; KELLOGG; BREMER, 2004). Esses pseudogenes são excluídos a priori de análises filogenéticas (YANG et al., 1999), devido ao fato de produzirem os chamados “long-branch”, descaracterizando os resultados (FELSENSTEIN, 1978). No entanto, geralmente, essas falhas são corrigidas durante o processo de homogeneização do rDNA, permitindo que as sequências de nucleotídeos seja preservada entre indivíduos da mesma espécie e até entre espécies, a despeito do processo evolucionário (DOVER, 1982).

Uma estratégia importante que tem sido realizada para aumentar o poder de detecção de certos microrganismos em amostras de alimentos, animais ou plantas é o uso da NESTED-PCR. Esta técnica, que é uma PCR em duas etapas, é útil quando impurezas que inibem a amplificação do DNA estão presentes nas amostras ou quando a quantidade de DNA do agente que se deseja detectar é muito pequena. A estratégia para diminuir problemas relacionados a impurezas é diluir, consideravelmente, a amostra que contém o DNA molde e consequentemente as impurezas que inibem a *Taq* polimerase. Em consequência do baixo número frequência na amostra em investigação. Este tipo de PCR em duas etapas chega a ser 1.000 vezes mais sensível que a PCR única.

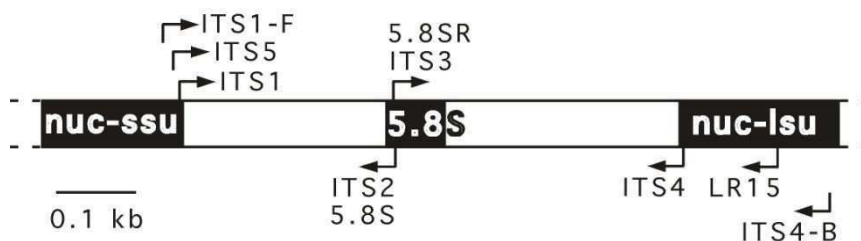
Os *primers* mais utilizados em estudos para o amplificação do fragmento do DNA que contém as regiões ITS's e 5.8S são o ITS1 e ITS4 usados na sequência do código do rDNA. *Primer* ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') anela-se perto do começo da região 28S do rDNA, quando o *primer* ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') anela-se no fim da região 18S do rDNA, assim abrangendo a região de interesse durante a reação de amplificação. Abaixo se tem os *primers* normalmente usados para a região ITS e o mapa de polimerização destes na região estudada (Figura 23).

Tabela 03. *Primers* usados para amplificar a região do espaço de transcrição interna (ITS) por PCR, incluindo o gene 5.8S.

<i>Primer</i>	Sequência de Bases	Posição	Patentes
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	1773-1791 (18S)	White et al., 1990
ITS1-F	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	1735-1756 (18S)	Gardes & Bruns, 1993
ITS2	GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC	53-34	White et al., 1990
ITS3	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	34-53	White et al., 1990
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	57-38 (25S)	White et al., 1990
ITS4-B	CAG GAG ACT TGT ACA CGG TCC AG	194-172 (25S)	Gardes & Bruns, 1993
ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	1749-1770 (18S)	White et al., 1990
5.8S	CGC TGC GTT CTT CAT CG	54-38	Vilgalys lab
5.8SR	TCG ATG AAG AAC GCA GCG	37-54	Vilgalys lab

Para identificação por PCR, os *primers* ITS1 e ITS4 são os mais usados por abranger toda a região de domínio conservado (ITS 1 e 2) e o gene 5.8S.

Figura 23. Mapa da região de acoplamento dos *primers* para estudo do espaço de transcrição interna (ITS).



Fonte: O autor.

Atualmente, mesmo identificando morfológicamente a espécie estudada, se faz uso de técnicas de sequenciamento para cobrir possíveis variações genéticas não perceptíveis no estudo morfológico ou evidenciar novas espécies.

Nos próximos capítulos apresentaremos a parte metodológica do trabalho seguido dos resultados e discussões.

2 METODOLOGIA

2.1 ESTERILIZAÇÃO

2.1.1 Frascos e utensílios

- a) Os frascos e demais utensílios foram devidamente limpos e esterilizados em autoclave a uma pressão de 1KgF cm^{-2} (121°C) durante 15-20 min. Da mesma forma, os meios de cultura foram autoclavados.
- b) Frascos, utensílios e meios de culturas, antes de serem manuseados para execuções posteriores de trabalhos, foram transferidos para a capela de fluxo laminar, devidamente limpa com hipoclorito de sódio e álcool 70% (v/v, 750 mL L^{-1}), e o conjunto foi exposto sob radiação UV durante 15 min.

2.1.2 Meios de Cultura

2.1.2.1 Meios de cultura para isolamento e manutenção de endofíticos

2.1.2.1.1 Meio Ágar-Água (AA) (KELMAN et al., 1967)

Meio usado para isolar e induzir esporulação em fungos endofítico isolados.

2.1.2.1.2 Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) (RIKER e RIKER, 1936)

Meio usado para inocular sementes com intuito de desenvolvimento de plântula e no isolamento, purificação e manutenção dos endofíticos isolados.

2.1.2.1.3 Meio líquido Batata-Dextrose (BD)

Meio usado para inocular os endofíticos após serem purificados para aumento de biomassa em frascos de erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio.

2.1.2.1.4 Meio Leite-Trigo-Mel-Ágar (Lactrimel) (KAMINSKI, 1985)

Meio usado para induzir a esporulação de fungos endofíticos.

2.1.2.1.5 Meio Sabouraud-Dextrose-Agar (SAB) (TUIITE, 1969)

Meio usado para inocular sementes com intuito de desenvolvimento de plântula e no isolamento, purificação e manutenção dos endofíticos isolados.

2.1.2.1.6 Meio de Folhas (MF)

Meio usado para induzir a esporulação dos fungos endofíticos simulando uma condição de seu habitat ao usar solução obtida pela trituração da folha da planta de onde foi isolado o microrganismo.

Ver o preparo dos meios no apêndice A.

2.1.2.2 Meios de cultura para tecidos vegetais

Os meios de cultura utilizados foram MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e B-5 (GAMBORG, MILLER e OJIMA, 1968) de marcas comerciais, sendo necessário somente sua dissolução em 1 L de água destilada para preparo da solução estoque (10 mg L^{-1}), sendo autoclavado ($121^\circ\text{C}/20 \text{ min.}$) e armazenado na geladeira em potes plásticos de 50 mL devidamente esterilizados, contendo cerca de 25 mL do meio cada.

As concentrações de sacarose, ágar-ágar e reguladores de crescimento em cada um dos meios dependeram da natureza dos experimentos a serem executados. Assim:

- Meio semissólido sem reguladores de crescimento foi utilizado para germinação das sementes e crescimento de plântulas *in vitro*.
- Meio semissólido com reguladores de crescimento foi utilizado para a manutenção de calos, organogênese (diferenciação), dediferenciação ou indução ao acúmulo dos metabólitos secundários.
- Meio líquido com reguladores de crescimento foi usado para indução do crescimento de raízes.

Ver o preparo dos meios semi-sólidos no apêndice A.

2.1.2.3 Meios de cultura para teste antimicrobiano

O meio líquido usado foi à infusão de cérebro-coração (Brain-Heart Infusion - BHI) vendido comercialmente tendo uso nos laboratórios de patologias clínicas. O meio semissólido é obtido pela adição de Ágar (Brain-Heart-Ágar – BHA).

Ver o preparo do meio no apêndice A.

2.2 MATERIAL VEGETAL E ISOLAMENTO DE ENDOFÍTICOS

O material vegetal usado para desenvolver o trabalho, como raízes, folhas, caule e sementes, foram coletadas de plantas adultas com cerca de 45-60 cm de altura que encontravam-se em desenvolvimento na região do Tabuleiro dos Martins – Maceió-AL, no período de dezembro de 2004, evitando às que apresentavam manchas ou qualquer tipo de lesão, sejam causadas por patógenos, insetos ou mesmo danos mecânicos. A parte área

coletada da planta não estava em contato com solo para evitar possível contaminação com epífitos do solo, tendo sido todo o material separado e guardado em sacos plásticos, a fim de reduzir a contaminação externa.

A planta encontra-se catalogada no livro *Flora brasiliensis* que foi produzida entre 1840 e 1906 pelos editores Carl Friedrich Philipp von Martius, August Wilhelm Eichler e Ignatz Urban, com a participação de 65 especialistas de vários países. Contém tratamentos taxonômicos de 22.767 espécies, a maioria de angiospermas brasileiras, reunidos em 15 volumes, divididos em 40 partes, com um total de 10.367 páginas. A descrição taxonômica da planta está no Vol. XIV, Part II, Fasc. 58 Prancha 81 Publicado em 01-Mai-1872, com detalhes quanto a: **Família: Nyctagineae, Tribo: Mirabileae Choisy, Gênero: Mirabilis L., espécie: Mirabilis jalapa L** (Figura 24).

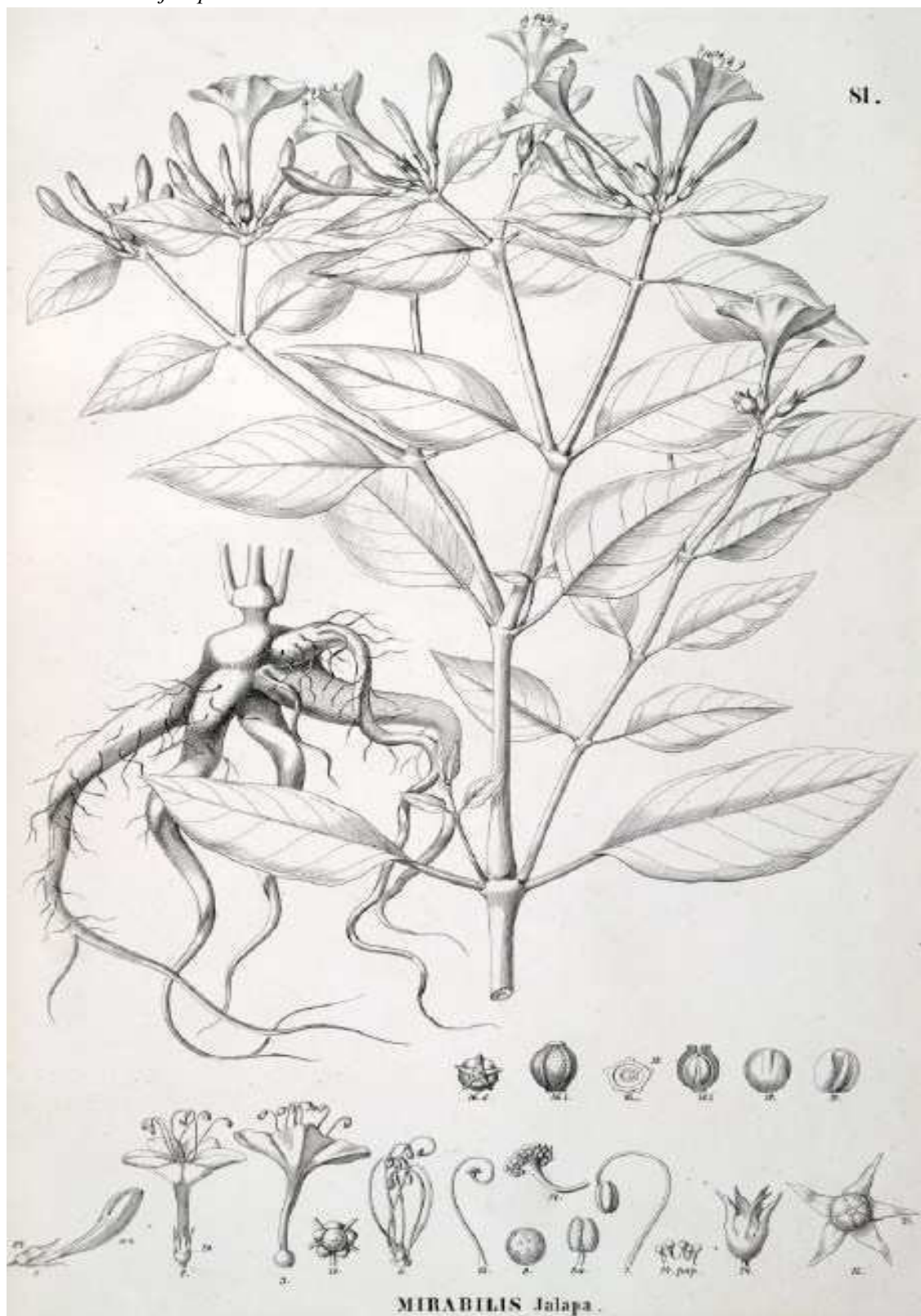
A planta foi levada para identificação no herbário MAC do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas tendo sido confirmada a espécie em estudo e registrada sob MAC 39969, como consta em anexo A.

2.2.1 Desinfestação ou Desinfecção Superficial de Órgãos Vegetais

Todo material vegetal, como: caule, folhas e sementes; foram lavados em água corrente com detergente neutro, em seguida foram imersas em solução aquosa de etanol 70% por 30 seg. para quebra da tensão superficial existente sob o tecido vegetal. Decorrido o tempo, foram postas em uma solução de água destilada e hipoclorito de sódio a 10% por 20 min. Após desinfecção, colocou-se o material vegetal em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada, onde foram novamente lavados com água destilada autoclavada e semeados nos meios de cultura semi-sólidos: para obtenção de endofíticos - AA (Ágar-água), SAB (Sabouraud-Dextrose-Agar) e BDA (Batata-Dextrose-Ágar); para obtenção de tecidos vegetais - meio básico MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) e meio B5 (GAMBORG, MILLER e OJIMA, 1968) suplementados respectivamente com sacarose 3 e 2%, e o pH ter sido ajustado para 5,6. Os frascos devidamente tampados foram vedados com filme de PVC para evitar contaminação ou perda de água, sendo datados e transferidos para estantes de crescimento.

O controle de eficiência de esterilização superficial dos tecidos vegetais foi realizado pela inoculação da última água de lavagem em placas de Petri com os meios de culturas AA, SAB e BDA.

Figura 24. Prancha 81 do livro *Flora brasiliensis* destacando a planta em estudo, *Mirabilis jalapa*.



Fonte: *Flora brasiliensis*, Vol. XIV, Part. II, Fasc. 58, Prancha 81.

2.2.2 Isolamento e purificação de endofíticos

Os endofíticos que foram isolados a partir dos tecidos vegetais ou semente de *Mirabilis jalapa* foram transferidos para placas com meio BDA e/ou SAB consecutivamente até obter uma cultura homogênea de apenas um dos isolados.

A frequência de colonização (FC%) foi calculada como o número de isolados obtidos (N_i) pelo número total de fragmentos (N_f) (Araújo et al. 2002a).

$$FC_{\%} = \frac{N_i}{N_f} \times 100$$

A manutenção das culturas se fez regularmente de 10 em 10 dias com transferência para outras placas com os meios de cultura semi-sólidos: BDA, SAB, MF; e meio líquido BD, para acúmulo de biomassa.

2.2.3 Cultura de tecido vegetal

A partir dos tecidos das plântulas, caules e folhas, após terem seus tecidos cortados transversalmente para aumentar a área de contato com o meio, foram semeados em meios semi-sólidos MS e B5 suplementados com reguladores de crescimento: 2,4D (1 mg L^{-1}) e cinetina ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$) tendo sido mantidos sob iluminação constante a temperatura ambiente ($25 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

Os calos primários obtidos foram separados, com auxílio de pinça esterilizada em câmara de fluxo laminar estéril, dos tecidos remanescentes (folhas e caules) para os respectivos meios, MS e B5 suplementados com reguladores de crescimento. A cada 20 dias as culturas de calos foram transferidas para os meios citados acima, MS e B5 suplementados para manutenção.

As raízes foram inoculadas em meio MS + IBA (1 mg L^{-1}) tendo sido mantidas sob agitação de 100 rpm em frascos de erlenmeyer sob iluminação e sem iluminação.

2.3 IDENTIFICAÇÃO DE ENDOFÍTICO

Foram preparadas lâminas com o isolado cultivado em meio sólido por sete dias em condição estéril e fixadas com lactofenol e outras com azul de metileno. Foi utilizada análise morfológica microscópica (aumento de 100x e 400x, em microscópio óptico) para sua

identificação. A estrutura morfológica macroscópica, o crescimento e comportamento dos isolados em meios de cultura BDA, Lactrimel, Folha e BD, foram utilizados para a caracterização.

Devido à dificuldade de esporulação dos endofíticos, a técnica de microcultivo ou microcultura foi realizado adaptando-o a partir de Sutton (1980) utilizando-se placas de Petri com lâminas e lamínulas em seu interior sobre um canudo com formato de um triângulo equilátero e um papel filtro no fundo, sendo estes esterilizados em autoclave (121°C/20 min.). Na câmara de fluxo foram retirados cubos de BDA com 1 cm³ e colocados sobre a lâmina, um fragmento do fungo foi inoculado nas bordas do cubo com um leve contato, colocou-se a lamínula sobre o cubo de BDA e 400 µL de água destilada estéril foi depositada sobre o papel filtro para manter a umidade e as placas foram fechadas com papel filme. Foram feitas 10 placas de microcultivo observando a partir do segundo dia as lamínulas em microscópio óptico (aumento de 100x e 400x) até um total de 15 dias.

As dimensões de partes características do fungo (conídios, hifas, apressórios, e outros) constituem elementos fundamentais na identificação das espécies, tendo sido realizado a Micrometria, técnica que permite a determinação dos objetos ao microscópio, onde as medições ocorreram após aferimento do micrômetro ocular através da lâmina micrométrica. Como os conídios apresentaram aspecto uniforme, foram medidos 50 conídios principais da lâmina de microcultivo com 7 dias em aumento de 400x. Os comprimentos e alturas foram multiplicados pelo fator de correção 1,666; e foi calculada sua média aritmética.

2.4 CURVA DE CRESCIMENTO

2.4.1 Crescimento micelial

Em placas de Petri com 10 cm de diâmetro foi colocado ao centro discos de BDA (Ø 5 mm, com aproximadamente 0,03 g) contendo micélios do endofítico tendo sido medida sua taxa de crescimento por meio de paquímetro a cada 24 horas até um total de 7 dias. Para isto foi utilizado triplicadas tendo sido feito a média de crescimento micelial.

2.4.2 Acúmulo de biomassa

Para 100 mL de meio BD em Erlenmeyer de 250 mL, o inóculo (Ø 5 mm, com aproximadamente 0,03 g) do isolado foi transferido ao meio e os frascos mantidos a 25 ± 3°C

no escuro, durante 30 dias para acúmulo de biomassa, sendo inoculados em torno de 50 Erlenmeyer a cada mês.

Por meio da massa seca obtido nas culturas em meio líquido BD, possibilitou-se a elaboração da curva de crescimento com o uso de 21 meios de frascos de Erlenmeyer de 250 mL, utilizando 3 repetições para análise do crescimento de 10 em 10 dias até completar um total de 70 dias. A cultura foi filtrada em camada dupla de tecido de algodão após a aplicação de etanol 70% e repouso de 30 min., o micélio retido foi seco em estufa a 60 °C.

Em frascos, com meio BD, foram adicionados 10 µL de solução estoque (1000 mg mL⁻¹) de *l*-fenilalanina, ácido benzóico, ácido gálico e sulfato de amônio, para ao final ter-se a concentração de 0,1 mg mL⁻¹ em cada 100 mL de meio para estudar o comportamento do endofítico quanto ao acúmulo de massa no fim de 30 dias comparando a cultura somente com BD no mesmo período de tempo.

2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

2.5.1 Preparação dos extratos do endofítico

A cultura do fungo em meio BD (30 dias de incubação) foi filtrada em camada dupla de tecido de algodão. A matéria celular retida foi colocada para secar em estufa a 60°C. O filtrado foi descartado e a matéria seca (50g) foi extraído, através de maceração, com n-hexano (10 x 100 mL), clorofórmio (10 x 100 mL), acetato de etila (10 x 100 mL) e metanol (10 x 100 mL), respectivamente, e 30g de matéria seca foi macerado com etanol (10 x 100 mL), obtendo assim os extratos brutos que foram concentrados em evaporador rotatório. Para cultura de calos, 10 g, foram macerados com etanol (10 x 50 mL) e concentrado em evaporador rotatório.

O rendimento para os extratos foram calculados pela expressão:

$$R_{\%} = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{células}}} \times 100$$

onde, m_{extrato} é a massa do extrato após evaporação do solvente e $m_{\text{células}}$ é a massa de células secas usadas para realizar a extração.

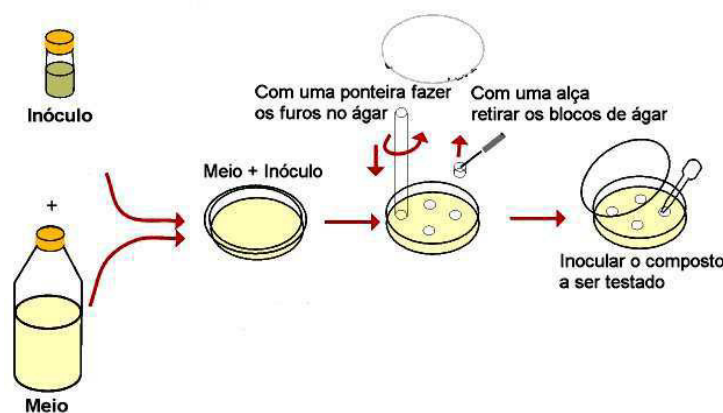
2.5.2 Teste de sensibilidade antimicrobiano

O teste de sensibilidade antimicrobiano foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alagoas (L@MA), sob orientação do Prof. Zenaldo Porfírio, onde utilizou-se cepas (Cepa/Resistente) depositadas nesse laboratório das espécies: *Staphylococcus aureus* (198/51), *Pseudomonas aeruginosa* (61/63), *Candida albicans* (F13/62) e *Escherichia coli* (36/10).

As cepas citadas foram inoculadas em meio líquido BHI, previamente preparado, individualmente. Decorrido duas horas, tempo necessário a multiplicação, retirou-se 1 mL e inoculou-se em BHA, tendo sido suspenso totalmente sobre a placa com as ponteiras, retirando-as para ficarem os pequenos poços formados. Veja um esquema semelhante ao descrito na ilustração abaixo (Figura 25).

Pesaram-se 200 mg dos extratos secos e solubilizou-os em 1 mL de metanol a 33%. Em cada poço foi colocado 40 µL do respectivo extrato (Figura 25). Para controle no poço central foi posto metanol 33%, observado que nessa concentração não há inibição do crescimento do microrganismo. Após 24 horas, as placas que estavam em estufa a 37°C, foram retiradas para medição do halo de inibição. Para isso, foi utilizado um halômetro (Figura 26), como também poderia ter sido usado um paquímetro, e se seguiu o critério conforme Kusamba et al. (2000), como consta na tabela 04, para interpretar as medidas dos halos de inibição.

Figura 25. Esquema de inoculação utilizado para o teste de sensibilidade antimicrobiano.



Fonte: www.biotopics.co.uk/microbes/sentes.gif.

Figura 26. Halômetro, instrumento usado para medir o halo de inibição em mm.

Fonte: Foto de José Roberto de Oliveira Ferreira.

Tabela 04. Parâmetros para medir a atividade por meio do halo de inibição.

Halo de inibição (mm)	Significado
0 – 9	Sem atividade
10 – 15	Sensível, mas pequena inibição
16 – 22	Sensível, com real inibição
> 22	Muito sensível, com grande poder de inibição

2.6 ESTUDO DE ANTAGONISMO CONTRA FITOPATOGÊNICOS

Um levantamento inicial utilizando a Técnica de Cultura Pareada (MARIANO,1993) foi realizado para avaliação do antagonismo dos isolados endofíticos contra fitopatógenos, respeitando o tempo de crescimento dos isolados e fitopatógenos avaliados.

2.6.1 Teste de cultura pareada

Em placas de Petri contendo BDA, colocou-se um disco ($\varnothing$ 5 mm) da cultura do fitopatógeno e no lado oposto, um disco com o isolado endofítico a ser avaliado, ambos a 1,0 cm da borda. Após o pareamento, as placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas durante cinco dias com três replicas por tratamento. O controle recebeu apenas o fitopatógeno, com três replicas. A avaliação foi realizada mediante medição do diâmetro da colônia por meio de paquímetro, comparando-se com a média do controle e observando-se das interações entre as colônias.

Os discos ($\varnothing$ 5 mm) que foram usados nos ensaios de antagonismo contendo micélios e/ou conídios, do isolado endofítico ou dos fitopatógenos ensaiados, foram obtidos de colônias crescidas em BDA, durante sete dias.

A avaliação para determinar a porcentagem de inibição do crescimento foi obtida medindo-se o diâmetro das colônias, subtraindo-se o diâmetro do disco de micélio inicial (QUIROGA et al., 2001) e foi calculada de acordo com EDGINTON et al. (1971), pela fórmula:

$$PI_{\%} = \frac{Dc - Dt}{Dc} \times 100$$

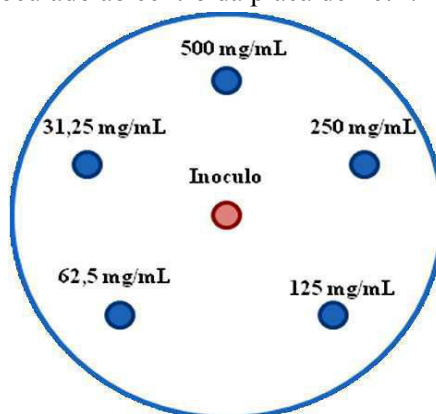
na qual, **PI%** é a Porcentagem de Inibição, **Dc** é o diâmetro médio da colônia do fitopatógeno no controle e **Dt** é o diâmetro médio da colônia do isolado endofítico nos tratamentos testados.

Para os testes de antagonismo foram usados *Phytophthora palmivora* (agente causal da doença “podridão-do-pé” em culturas de mamoeiro) e *Pseudomonas* sp. (agente causal de diferentes doenças no tomateiro).

2.6.2 Teste antifúngico por difusão em poços

O extrato da matéria seca, com concentração inicial de 500 mg mL⁻¹, foi esterilizado em filtro Millipore 0.22 µm e diluído com metanol 33% em diferentes concentrações (250 mg mL⁻¹, 125 mg mL⁻¹, 62,5 mg mL⁻¹ e 31,25 mg mL⁻¹) sob câmara de fluxo laminar. Três replicas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro contendo meio BDA, devidamente esterilizadas, foram utilizadas para crescimento do fitopatógeno *P. palmivora* (0,5 cm de diâmetro). Nestas placas, foram distribuídos 20 µL de cada concentração do extrato testado em poços feitos com ponteiros esterilizados a 3 cm de raio de distância do inóculo centralizado e com uma distância de 3,5 cm entre eles (Figura 27).

Figura 27. Disposição dos extratos nos poços na placa de Petri para teste antifúngico contra *P. palmivora* inoculado ao centro da placa de Petri.



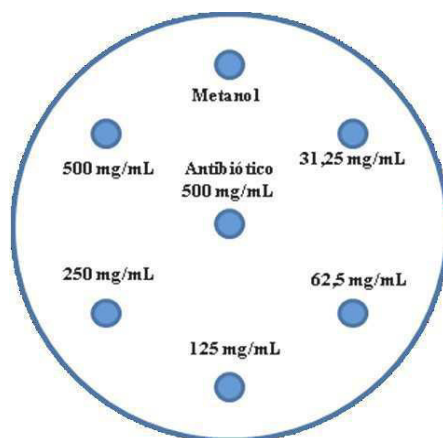
Fonte: O autor.

2.6.3 Teste antimicrobiano por difusão em disco de papel

O método de difusão em discos foi usado para avaliar a atividade dos extratos contra *Pseudomonas* sp., tendo Nistatina (500 mg mL^{-1}) como antibiótico (controle positivo) e Metanol 33% para controle negativo. Este fitopatógeno foi inoculado por meio da diluição de uma suspensão de células sobre a placa com BDA.

O extrato do material seco do endófito, com concentração inicial de 500 mg mL^{-1} , foi esterilizado em filtro Millipore $0.22 \mu\text{m}$, e diluído com metanol 33% para obter diferentes concentrações (250 mg mL^{-1} , 125 mg mL^{-1} , $62,5 \text{ mg mL}^{-1}$, $31,25 \text{ mg mL}^{-1}$). Posteriormente, colocou-se $20 \mu\text{L}$ de cada concentração em discos de papel filtro Whatman nº5, com 5 mm de diâmetro, devidamente esterilizados e distribuiu-se sobre o meio BDA contido na placa de Petri de 10 cm de diâmetro (Figura 28). Todo o procedimento ocorreu em câmara de fluxo laminar esterilizada, sendo o halo de inibição medido a partir da extremidade de cada disco com um paquímetro.

Figura 28 – Disposição dos discos de papel sob placa de Petri para teste antimicrobiano por difusão contra o fitopatógeno *Pseudomonas* sp. frente aos extratos do fungo endofítico isolado.



Fonte: O autor.

2.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ENDOFÍTICO

Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de DNA Forense da UFAL, chefiado pelo Prof. Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva.

A caracterização molecular do endofítico pode ser dividida em três etapas que se seguem abaixo.

2.7.1 Extração do DNA

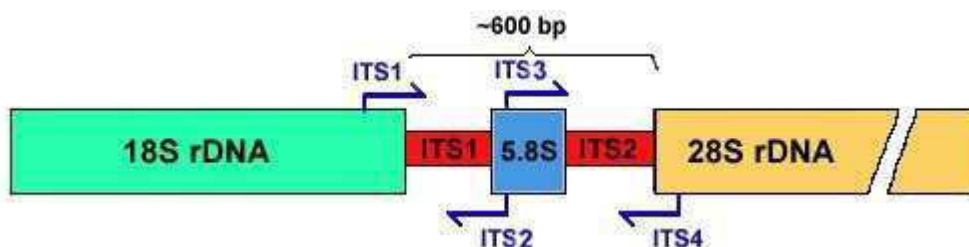
Para a extração de DNA de fungos filamentosos foi utilizado o protocolo de Saghai-Marooft *et al.* (1984) com adaptações, onde utilizou-se aproximadamente cerca de 0,20 g de micélio colocado individualmente em tubos para microcentrifuga de 2,0 mL. Os tubos foram então colocados em nitrogênio líquido por 5 min. e macerou-se bem o micélio com auxílio de uma ponteira para pipeta. Foi repetido este processo mais uma vez. Em seguida, foram adicionados 700 µL de solução de extração de DNA (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA e 100 mM NaCl). Acrescentaram-se ainda 80µL de SDS (Dodecilsulfato de sódio) 1% e 15µL de Proteinase K (20 mg/mL), homogeneizando. Os tubos foram incubados em banho-maria a 65°C por 1 h. Decorrido esse tempo, acrescentou-se cerca de 10% do volume, o que correspondeu a aproximadamente 88 µL, de solução de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) 10% e incubaram-se as misturas por mais 30 min. Depois, adicionou-se igual volume de fenol (aprox. 850 µL) e homogeneizou-se vigorosamente por 3 minutos. Os tubos foram centrifugados a 14.500 rpm por 7 minutos. A mistura apresentou a formação de duas fases, a fenólica (inferior) e uma aquosa (superior). Retirou-se cuidadosamente a fase aquosa transferindo-a para novo tubo de 2 mL. Repetiu-se o processo de lavagem com fenol por mais uma vez. A fase aquosa resultante foi acrescentado igual volume de isopropanol 100%. Homogeneizou-se muito suavemente a solução até a visualização de um discreto aglomerado, indicando ali a presença de DNA. Centrifugou-se o conteúdo a 14.500 rpm por 10 minutos, sendo os tubos depois incubados a -20°C por 30 minutos. Logo após, o isopropanol foi descartado, invertendo-se os tubos. Adicionaram-se 600 µL de etanol 70 % e homogeneizou-se levemente. Centrifugaram-se os tubos a 14.500 rpm por 7 minutos. Descartou-se o etanol invertendo-se os tubos, os quais foram deixados secar a naturalmente até o dia seguinte. O DNA precipitado foi ressuspenso em 40 µL de tampão TE (Tris-EDTA). Para confirmação do sucesso do protocolo de extração de DNA foi feito gel de agarose 1% onde as amostras foram aplicadas.

2.7.2 Amplificação do rDNA

A técnica empregada para a amplificação do DNA ribossomal (rDNA) foi PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Foram utilizados nesta reação *primers* específicos,

conforme descritos por White et al. (1990). Os *primers* ITS1-ITS2 amplificaram a região ITS1 do rDNA, e os *primers* ITS3-ITS4 para região correspondente ao ITS2 (Figura 29).

Figura 29. Esquema do rDNA eucariótico, onde as caixas representam os genes e as setas indicam as posições onde os *primers*, em azul, se anexam. As regiões-alvo ITS1 e ITS2, em vermelho, também estão indicadas.



Fonte: <http://www.truffle.org/tuberex/polimorf.htm>.

A reação base de PCR consistiu em um volume final de 25 µL, onde os reagentes e as concentrações de *primers* utilizadas estão representados na Tabela 05.

Tabela 05. Condições para amplificação mostrando os reagentes constituintes da reação de PCR.

REAGENTES	VOLUME / REAÇÃO
Tampão Universal (1,5 Mm MgCl ₂ e 0,2 mM dNTP's)	5,0 µL
Primer 1 (10 pmol/µL)	2,0 µL
Primer 2 (10 pmol/µL)	2,0 µL
Taq Polimerase (1U/0,2 µL)	0,2 µL*
DNA	1,0 µL
H ₂ O Mili-Q	10,0 µL
Volume final	25,00 µL

*O volume de Taq Polimerase não é considerado no volume final da reação.

A PCR foi feita em termociclador TC-412 (Techne), sendo as condições de termocilagem utilizadas mostradas na Tabela 06.

Tabela 06. Programa de amplificação do DNA ribossômico, mostrando os ciclos e as condições de termociclagem em cada fase da reação.

FASES	TEMPO	TEMPERATURA (°C)
Desnaturação inicial	5 min.	94
Desnaturação	1 min.	94
Anelamento	1 min.	59
Extensão	1 min.	72
Extensão Final	5 min.	72

Após a amplificação das regiões-alvo, estas amostras foram purificadas utilizando-se isopropanol 65% para a precipitação do DNA (20 µL de produtos da PCR, dispostos individualmente em tubos de 1,5 mL para microcentrífuga acrescidos de 72 µL de isopropanol 65%). Esta mistura foi vigorosamente homogeneizada, sendo depois os tubos mantidos em descanso à temperatura ambiente por 20 min. para a amostra ser centrifugadas a 14.500 rpm por 15 min. O isopropanol foi descartado cuidadosamente invertendo-se os tubos. Foram adicionados 250 µL de etanol 60% e homogeneizou-se a mistura delicadamente. Centrifugaram-se os tubos a 14.500 rpm por 5 minutos. Descartou-se o etanol cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta. Os tubos foram deixados secar a naturalmente até o dia seguinte. O DNA precipitado foi ressuscitado em 20 µL de tampão TE.

A purificação é um procedimento necessário para retirar o excesso de *primers* e dNTP's dos produtos de PCR. O excesso de *primers* pode competir com os reagentes da reação de sequenciamento por sítios de ligação do DNA. E as elevadas quantidades de dNTP's podem afetar o balanço da reação de sequenciamento (Applied Biosystems 2000).

2.7.3 Sequenciamento

Foi utilizado nesta reação o Kit BigDye™ Terminator v3.1 (Applied Biosystems). A reação base de sequenciamento consistiu em um volume final de 10 µL, onde os reagentes utilizados podem ser vistos na Tabela 07. Enquanto as condições de termociclagem utilizadas estão apresentadas na Tabela 08.

Após a reação de sequenciamento, o produto da reação foi purificado seguindo-se o mesmo protocolo de precipitação com isopropanol a 65% descrito no processo de amplificação, salvo o uso de 25 µL de formamida Hi-Di para a ressuspensão do precipitado ao invés de 20 µL de tampão TE.

Tabela 07. Reagentes utilizados na reação para sequenciamento com suas respectivas quantidades.

REAGENTES	VOLUME / REAÇÃO
Big Dye Mix	2,0 µL
Sequencing Buffer 2,5X (Tampão Save)	2,0 µL
Primer (2,5 pmol/µL)	1,0 µL
Taq Polimerase (1U/0,2 µL)	0,2 µL*
DNA	1,0 µL
H ₂ O Mili-Q	4,0 µL
Volume final	10,00 µL

*O volume de Taq Polimerase não é considerado no volume final da reação.

Tabela 08. Programa utilizado para reação de sequenciamento, mostrando os ciclos e as condições de termociclagem em cada fase da reação.

FASES	TEMPO	TEMPERATURA (°C)
Desnaturação inicial	-	-
Desnaturação	10 seg.	96
Anelamento	5 seg.	50
Extensão	4 seg.	60
Extensão Final	-	-

A purificação nesta etapa é importante, pois os corantes fluorescentes não incorporados aos produtos da reação podem afetar a qualidade do sequenciamento. Os picos formados pelo excesso de corantes podem obscurecer porções do eletroferograma gerado pelo *software*, resultando na formação de picos incorretos (Applied Biosystems 2002).

O sequenciamento dos fragmentos, ITS1 e ITS2, foi realizado mediante eletroforese capilar em sequenciador automático ABI Prism 310 Genetic Analyzer, utilizando o polímero POP6 (Applied Biosystems), conforme as recomendações do fabricante.

Após a eletroforese, os dados gerados pelo *software* 310 Data Collection v3.0.0 foram analisados e alinhados, respectivamente pelos programas Sequencing Analysis v5.2 e SeqScape v2.5, ambos da Applied Biosystems. Posteriormente, as seqüências consenso de cada fungo foram analisadas através do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do NCBI HomePage (*National Center for Biotechnology Information*).

O programa BLASTn utiliza o método de algoritmo de máxima subsequência, onde compara a percentagem de similaridade genética entre uma sequência de nucleotídeos em estudo com uma base de dados de sequências nucleotídicas disponíveis no GenBank NCBI. Desta forma, assim foi realizado o processo de identificação molecular dos fungos endofíticos utilizados neste trabalho.

2.8 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2.8.1 Reagentes utilizados

- 1) *Reagente de Folin-Ciocalteu*: marca Fluka – concentração 2N.
- 2) *Solução de Carbonato de sódio* - Na_2CO_3 (20%).
- 3) *Solução de Carbonato de sódio* - Na_2CO_3 (2%).
- 4) *Solução de Carbonato de sódio saturado* - Na_2CO_3 .
- 5) *Solução estoque de ácido tânico* (1 mg/mL).
- 6) *Solução estoque de ácido gálico* (1 mg/mL).
- 7) *Solução tampão ácido acético/acetato de sódio* pH=4,5.
- 8) *Solução estoque de 2,2-Difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)* (40 mmol/L).

Ver apêndice B para preparo de soluções.

2.8.2 Determinação de fenóis totais

Foram escolhidas três metodologias para estudar de maneira comparativa, uma vez que existem várias situações e procedimentos diferentes para a execução do teste de fenóis totais, porém, todos os testes tiveram como reagente ativo a solução de Folin-Ciocalteu (constituído de tungstato de sódio, molibdato de sódio, ácido clorídrico, ácido fosfórico e sulfato de lítio), e a construção da curva de calibração tiveram como reagentes: ácido gálico e ácido tânico. O teor de fenóis totais dependem da eficiência da extração pelos solventes.

2.8.2.1 Método de MAKKAR et al. (1993)

2.8.2.1.1 Curva de calibração

Para a curva de calibração, foram preparados 100 mL de solução estoque de ácido tânico ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) realizando em seguida as diluições para obter as concentrações de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, e foi usando metanol como branco. A cada tubo da curva e do branco (metanol) foram adicionados 250 μL de Folin-Ciocalteu (2N) e 1250 μL de solução de carbonato de sódio (20%), completando-se o volume para 2000 μL com água destilada. Deixou-se os frascos sob agitação por 40 min. medindo a absorbância a 725 nm em espectrofotômetro monofeixe da marca Bioespectro mod. SP-220.

Tabela 09 – Curva de calibração de ácido tânico.

Tubos	[conc.] _{final} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Solução estoque (μL)	H ₂ O destilada (μL)	Folin-Ciocalteu (μL)	Na ₂ CO ₃ (20%) (μL)
1	0	0	500	250	1250
2	1	2	498	250	1250
3	5	10	490	250	1250
4	10	20	480	250	1250
5	15	30	470	250	1250
6	20	40	460	250	1250
7	25	50	450	250	1250
8	30	60	440	250	1250
9	35	70	430	250	1250
10	40	80	420	250	1250
11	45	90	410	250	1250
12	50	100	400	250	1250

2.8.2.1.2 Procedimento para análise de fenóis totais (FT)

Para elaborar as alíquotas do extrato (10, 20 e 40 mg mL^{-1}), partiu-se de uma solução estoque (500 mg mL^{-1}) dos respectivos extratos: n-hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e etanol. Retirou-se as alíquotas (40, 80 e 160 μL) da solução estoque dos extratos, e adicionou-se 250 μL de Folin-Ciocalteu 2N e 1250 μL de solução Na₂CO₃ (20%), completando-se o volume para 2000 μL com água destilada. Deixou-se os frascos em agitação por 40 min. medindo a absorbância a 725 nm em espectrofotômetro monofeixe da marca Bioespectro mod. SP-220. O cálculo da concentração de fenóis totais (FT) foi expresso em equivalente de ácido tânico (ETA) a partir da curva de calibração. A fim de assegurar a

validação do método, procurou-se trabalhar com triplicata de cada amostra realizando a média dos valores de absorbância.

Tabela 10. Tabela de referência para procedimento descrito acima no preparo das alíquotas dos extratos brutos.

Amostra	[conc.] _{final} (mg mL ⁻¹)	Solução estoque (μL)	H ₂ O destilada (μL)	Folin-Ciocalteu (μL)	Na ₂ CO ₃ (20%) (μL)
1	10	40	460	250	1250
2	20	80	420	250	1250
3	40	160	340	250	1250

2.8.2.2 Método de SLINKARD E SINGLETON (1977)

2.8.2.2.1 Curva de calibração

Para a curva de calibração foi preparados 100 mL de solução estoque de ácido tânico (1000 μg mL⁻¹) realizando em seguida as diluições para obter as concentrações de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 μg mL⁻¹. A cada tubo da curva e do branco (metanol) foram adicionados 40 μL de Folin-Ciocalteu 2N e após 3 min. 120 μL de solução de carbonato de sódio (2%), completando-se o volume para 2000 μL com água destilada. De forma esporádica agitar os frascos em um tempo total de 2 h. e medir a absorbância a 760 nm em espectrofotômetro monofeixe da marca Bioespectro mod. SP-220.

Tabela 11. Preparo da curva de calibração de ácido tânico.

Tubos	[conc.] _{final} (μg mL ⁻¹)	Solução estoque (μL)	H ₂ O destilada (μL)	Folin-Ciocalteu (μL)	Na ₂ CO ₃ (2%) (μL)
1	0	0	1840	40	120
2	1	2	1838	40	120
3	5	10	1830	40	120
4	10	20	1820	40	120
5	15	30	1810	40	120
6	20	40	1800	40	120
7	25	50	1790	40	120
8	30	60	1780	40	120
9	35	70	1770	40	120
10	40	80	1760	40	120
11	45	90	1750	40	120
12	50	100	1740	40	120

2.8.2.2.2 Procedimento para análise de fenóis totais (FT)

Para elaborar as alíquotas do extrato (10, 20 e 40 mg mL⁻¹), partiu-se de uma solução estoque (500 mg mL⁻¹) dos respectivos extratos: n-hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e etanol. Retirou-se as alíquotas (40, 80 e 160 µL) da solução estoque dos extratos, adicionou-se 40 µL de Folin-Ciocalteu e após 3 min. 120 µL de solução de carbonato de sódio (2%), completando-se o volume para 2000 µL com água destilada. De forma esporádica agitar os frascos em um tempo total de 2 h. e medir a absorbância a 760 nm em espectrofotômetro monofeixe da marca Bioespectro mod. SP-220. O cálculo da concentração de fenóis totais (FT) foi expresso em equivalente de ácido tânico (ETA) a partir da curva de calibração. A fim de assegurar a validação do método, procurou-se trabalhar com triplicata de cada amostra realizando a média dos valores de absorbância.

Tabela 12. Tabela de referência para procedimento descrito acima no preparo das alíquotas dos extratos brutos.

Amostra	[conc.] _{final} (mg mL ⁻¹)	Solução estoque (µL)	H ₂ O destilada (µL)	Folin-Ciocalteu (µL)	Na ₂ CO ₃ (20%) (µL)
1	10	40	1800	40	120
2	20	80	1760	40	120
3	40	160	1680	40	120

2.8.2.3 Método de SWAIN e HILLS (1959)

2.8.2.3.1 Curva de calibração

Na construção da curva de calibração foi preparado 100 mL de solução estoque de ácido tânico (1000 µg mL⁻¹) realizando em seguida as diluições para obter as concentrações de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 µg mL⁻¹. Aos tubos, como também ao “branco” (metanol), foram adicionados 100 µL de Folin-Ciocalteu completando-se o volume para 2000 µL com solução de carbonato de sódio saturado. Deixou-se os frascos sob agitação por 45 min. medindo a absorbância a 725 nm em espectrofotômetro monofeixe da marca Bioespectro mod. SP-220.

Tabela 13. Curva de calibração de ácido tânico.

Tubos	[conc.] _{final} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Solução estoque (μL)	H ₂ O destilada (μL)	Folin-Ciocalteu (μL)	Na ₂ CO ₃ satur. (μL)
1	0	0	1840	40	120
2	1	2	1838	40	120
3	5	10	1830	40	120
4	10	20	1820	40	120
5	15	30	1810	40	120
6	20	40	1800	40	120
7	25	50	1790	40	120
8	30	60	1780	40	120
9	35	70	1770	40	120
10	40	80	1760	40	120
11	45	90	1750	40	120
12	50	100	1740	40	120

2.8.2.3.2 Procedimento para análise de fenóis totais (FT)

As alíquotas do extrato foi preparado a parti de uma solução estoque (500 mg mL^{-1}) dos respectivos extratos: n-hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e etanol. O método proposto por Swain e Hills (1953), prevê tratar a amostra, com solução tampão ácido acético/acetato de sódio, para eliminar interferentes. Transferiu-se para um Becker $400 \mu\text{L}$ da solução estoque do extrato (500 mg mL^{-1}), adicionando em seguida $2000 \mu\text{L}$ de solução tampão e $1600 \mu\text{L}$ de água destilada, resultando em uma solução estoque 2, com 50 mg mL^{-1} de extrato. A partir da solução estoque 2, preparou-se as amostras com 10, 20 e 40 mg mL^{-1} de extrato adicionando $100 \mu\text{L}$ de Folin-Ciocalteu e completando o volume para $2000 \mu\text{L}$ com solução saturada de carbonato de sódio. Agitou-se os frascos por 45 min. medindo a absorbância a 725 nm em espectrofotômetro monofeixe da marca Bioespectro mod. SP-220. O cálculo da concentração de fenóis totais (FT) foi expresso em equivalente de ácido tânico (ETA) a partir da curva de calibração. A fim de assegurar a validação do método, procurou-se trabalhar com triplicata de cada amostra realizando a média dos valores de absorbância.

Tabela 14. Tabela de referência para procedimento descrito acima no preparo das alíquotas dos extratos brutos.

Amostra	[conc.] _{final} (mg mL ⁻¹)	Sol. estoque (μL)	2 Folin-Ciocalteu (μL)	Na ₂ CO ₃ saturado (μL)
1	10	400	100	1500
2	20	800	100	1100
3	40	1600	100	300

2.8.3 Determinação da Atividade Antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos foi confirmada por cromatografia em camada delgada (CCD) e a capacidade de seqüestro de radicais livres foi quantificada por espectrofotometria na faixa do UV-Vis.

2.8.3.1 Cromatografia em Camada delgada

Na avaliação cromatográfica, foi aplicado o padrão do ácido gálico (500 μg mL⁻¹) e as frações dos extratos (500 μg mL⁻¹) em placa de sílica gel 60 F₂₅₄ usando um capilar de vidro, utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (3:7; v/v) e, como revelador, soluções de cloreto férrico 1% em metanol e de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) a 0,4 mmol/L em metanol.

2.8.3.2 Espectrofotometria UV-Vis

A atividade seqüestrante de radicais de DPPH (1,1-difenil-1,2-picril-hidrazila) foi determinada de acordo com o método de Brand-Williams et al. (1995), que produz um decréscimo da absorbância a 520 nm, sendo a atividade seqüestrante de DPPH ou percentual de atividade antioxidante, representado por AA%, foi determinada com base na equação:

$$\%AA = \frac{\{[Abs_{Controle} - (Abs_{Amostra} - Abs_{Branco})] \times 100\}}{Abs_{Controle}}$$

onde, Abs_{controle} é a absorbância do controle, Abs_{amostra} é a absorbância da amostra em estudo e Abs_{branco} é a absorbância do branco.

2.8.3.2.1 Curva de Calibração

A quantificação da capacidade de sequestro de radicais livres foi realizada espectrofotometricamente utilizando os padrões de ácido gálico, ácido ascórbico e BHT nas concentrações de 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para construção das curvas de calibração.

Tabela 15. Preparo da curva de calibração de ácido gálico.

Tubos	[conc.] _{final} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Solução estoque dos padrões (100 $\mu\text{g/mL}$) (μL)	Metanol (μL)	Estoque (μL)	DPPH
1	0	0	990	10	
2	1	10	980	10	
3	5	50	940	10	
4	10	100	890	10	
5	15	150	840	10	
6	20	200	790	10	
7	25	250	740	10	
8	30	300	690	10	

2.8.3.2.2 Procedimento para análise da Atividade Anti-oxidante Total (AAT)

Os extratos diluídos em metanol foram testados nas concentrações de 10, 20 e 40 mg mL^{-1} , obtidos a partir da diluição de uma solução estoque de 500 mg mL^{-1} . Nas cubetas, de capacidade de 1 mL e percurso óptico de 1 cm, foram adicionadas as alíquotas dos extratos, 10 μL da solução estoque de DPPH (40 mmol/L) e o volume foi completado com metanol. A concentração de DPPH nas cubetas ao final é de 0,4 mmol/L . As soluções foram mantidas no escuro a temperatura ambiente. A leitura foi feita a 520 nm, em espectrofotômetro monofeixe da marca Biospectro mod. SP-220. Como controle foi utilizado a solução de metanol e DPPH, com concentração final de 0,4 mmol/L . A atividade anti-radicalar foi calculada como a porcentagem de descoloração do radical DPPH, e expresso em equivalentes dos padrões. Os testes com os padrões e extratos foram realizados em triplicata.

Tabela 16. Tabela de referência para procedimento descrito acima no preparo das alíquotas dos extratos brutos.

Amostra	[conc.] _{final} (mg mL^{-1})	Solução Estoque (μL)	Metanol (μL)	DPPH (μL)
1	10	20	970	10
2	20	40	950	10
3	40	80	910	10

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CULTURA DE TECIDOS E ISOLAMENTO DE ENDOFÍTICO

3.1.1 Obtenção de plântulas *in vitro*

A germinação das sementes de *Mirabilis jalapa* ocorreu após três dias de inoculação, em todos os meios utilizados, AA, BDA, SAB, MS e B-5, havendo formação completa da plântula entre 7 e 10 dias depois (Figura 31). O desenvolvimento destas foi satisfatório nos meios basais MS e B-5 e pouco no AA, certamente por este último carecer de macro e micronutrientes para manter a plântula por mais tempo.

Figura 30. Sementes de *Mirabilis jalapa* mostrando a casca de proteção e o seu interior.



Fonte: Autor, 2009.

Em torno de 15-20 dias as plântulas apresentaram bom desenvolvimento de folhas, ramos e raízes, servindo então de fonte de explantes para a obtenção da cultura de calos e de raízes.

Figura 31. Plântula de *Mirabilis jalapa* em desenvolvimento em meio B5.

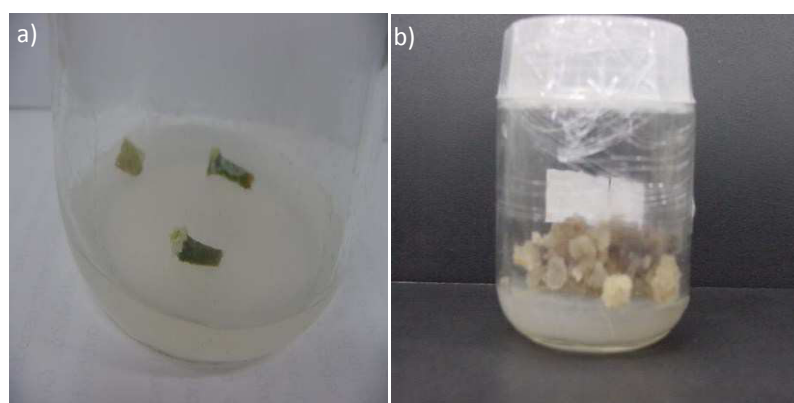


Fonte: Autor, 2009.

3.1.2 Formação de calos a partir dos explantes foliares e do caule

Aos 25 dias da germinação das sementes, as folhas e os caules das plântulas obtidas, forneceram explantes com cerca de 2 cm. Após cortes transversais, objetivando aumentar a área de contato com o meio e assim aumentar a absorção dos nutrientes, foram inoculados em meio semissólido MS. Os calos primários obtidos cerca de 10 dias da inoculação apresentaram cores variadas (verde, roxo e branco).

Figura 32. a) Formação de explantes a partir de folha e caule. b) Cultura de calos de *M. jalapa* em meio MS + 2,4-D (1mg/L) e cinetina (0,2mg/L).



Fonte: Autor, 2009.

Trinta dias após a formação dos calos primários e transferências sucessivas a cada 20 dias para o mesmo meio e reguladores, contudo, foi verificado que os calos obtidos tinham um período de vida muito curto e que o aumento de biomassa não foi conseguido, já que não havia desenvolvimento dos calos.

Paralelamente, as transferências para meio basal B5 dos calos sob pouca iluminação permitiram ter-se melhor crescimento e melhor conservação, sendo possível mantê-los por trinta dias até transferência. Assim as culturas de calos que estavam em meio MS foram transferidas para o meio B5 para desenvolvimento e acúmulo de biomassa dos caules para testes de atividade microbiana.

3.1.3 Obtenção de culturas de raízes

A biossíntese de metabólitos secundários em cultivo de células ou em suspensão de tecidos depende de algum grau de diferenciação celular ocorrendo em organelas celulares específicas. Com base neste princípio, pensou-se na realização da pesquisa de cultura de raízes de *Mirabilis jalapa*.

As raízes após terem sido transferidas para meio de MS + IBA (1 mg L^{-1}) a partir da plântula, não teve desenvolvimento satisfatório porque as raízes sofriam oxidação rapidamente. Melhores resultados, no entanto, foram obtidos quando as raízes foram cultivadas em meio MS + IBA (2 mg L^{-1}) acrescido de ácido ascórbico (200 mg), agente antioxidante. A substituição do meio basal MS por B5, não evitou o baixo desenvolvimento das raízes. Tais limitações deveram-se, em parte, ao fato das raízes de *Mirabilis jalapa* serem tuberosas, ou seja, indicam que são específicas para armazenamento de nutrientes. O desenvolvimento de um trabalho com meios e nutrientes específicos e uso de *Agrobacterium rhizogenes*, provavelmente ter-se-ia resultados melhores, apesar de não ter sido executado.

3.2 OBTENÇÃO DE ENDOFITÍCOS E MANUTENÇÃO DE CULTURAS

Em plântulas que estavam se desenvolvendo em meio AA e MS mostraram o aparecimento de um fungo algodinoso de coloração branca cerca de 15 dias após germinação das sementes, sendo registrado como FBS (fungo branco-semente). A água de controle da lavagem apresentou resultado negativo para aparecimento de qualquer microrganismo, indicando-se desta maneira tratar-se de um endófito. Para o melhor desenvolvimento e afim de isolar e identificar, este endofítico foi transferido para meio semi-sólido apropriado, BDA.

A frequência de colonização foi de 65%, pois em 20 frascos semeados com a semente de *Mirabilis jalapa*, 13 frascos apresentaram o desenvolvimento deste fungo.

Após várias repicagens obteve-se uma cultura homogênea. Este fungo apresentou uma taxa de crescimento micelial de 20,2% por dia em medições realizadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro.

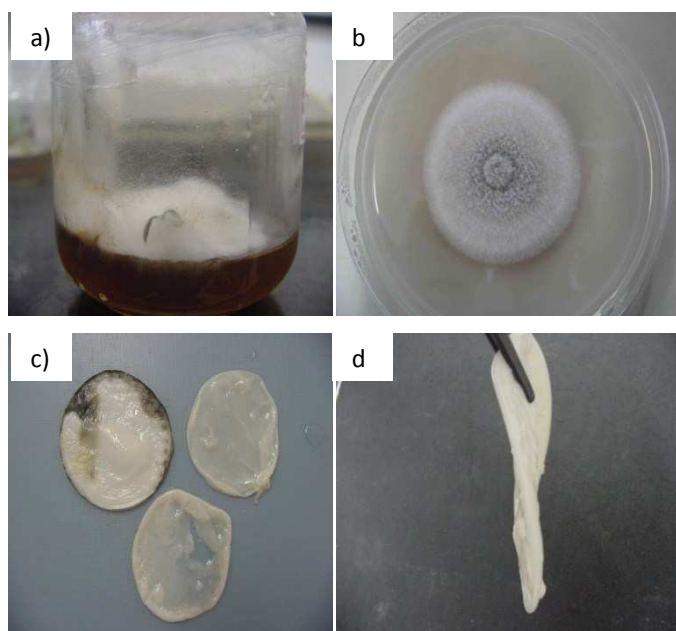
O desenvolvimento deste endofítico em meio líquido BD, visando o acúmulo de biomassa, seguiu dois procedimentos:

- 1º) Culturas, sob agitação orbital de 100 rpm mantidas sob iluminação ambiente;
- 2º) Cultura mantida sem agitação, no escuro.

O desenvolvimento sob agitação de 100 rpm, produziu uma baixa biomassa, porém ao passar a velocidade para 150 rpm, o crescimento se deu em média duas vezes maior do que a cultura em repouso, provavelmente devido a maior aeração do meio.

Ao final, visando-se estabelecer-se as condições de cultivo do endofítico, se deu preferência a cultura em repouso, pois o desenvolvimento do fungo sob agitação, ocorre de forma perfilhada, resultando uma suspensão filamentosa que dificultou a filtragem para acúmulo de biomassa, quando comparado as condições em repouso, onde seu crescimento se dá em camadas.

Figura 33. a) Plântula coberta por endofítico algodonoso – FBS; b) Cultura em meio BDA de endofítico isolado – FBS; c) Camadas do fungo endofítico FBS desenvolvidas em meio líquido BD; d) Vista lateral do fungo desenvolvido em BD.



Fonte: Autor, 2009.

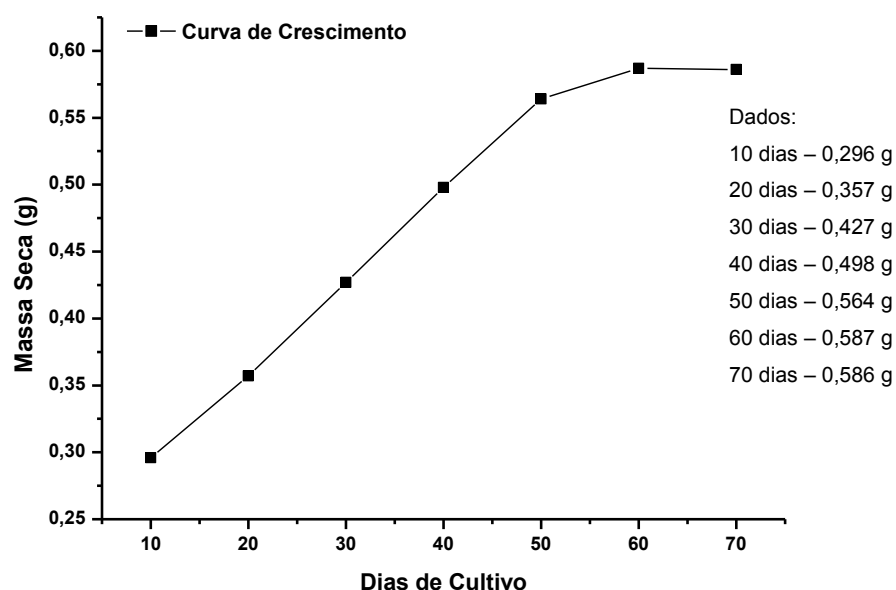
O endófito (FBS) isolado apresentou uma taxa de crescimento de 7,6 % ao dia em meio BD com acúmulo de biomassa até 50 dias, não apresentando variação em sua massa de forma significativa até 70 dias, como pode ser observado na curva de crescimento representada pelo gráfico 01.

Tendo como base 30 dias para o desenvolvimento do fungo, obteve-se uma média de 0,47 g de matéria seca, que corresponde a 81,03 % da média de matéria seca (0,58 g) obtida

para 70 dias de incubação em erlenmeyer, que corresponde ao período que deixa de haver um aumento da biomassa.

Para as culturas com 30 dias, 22 % de sua constituição é água, ou seja, sua massa fresca era de aprox. 0,60 g, sendo 0,13 g de água e restando como matéria seca 0,47 g (78 %).

Gráfico 01 - Curva de crescimento do isolado fúngico das sementes de *Mirabilis jalapa* em meio MS durante cultivo em meio líquido BD sob condições de repouso e escuro.



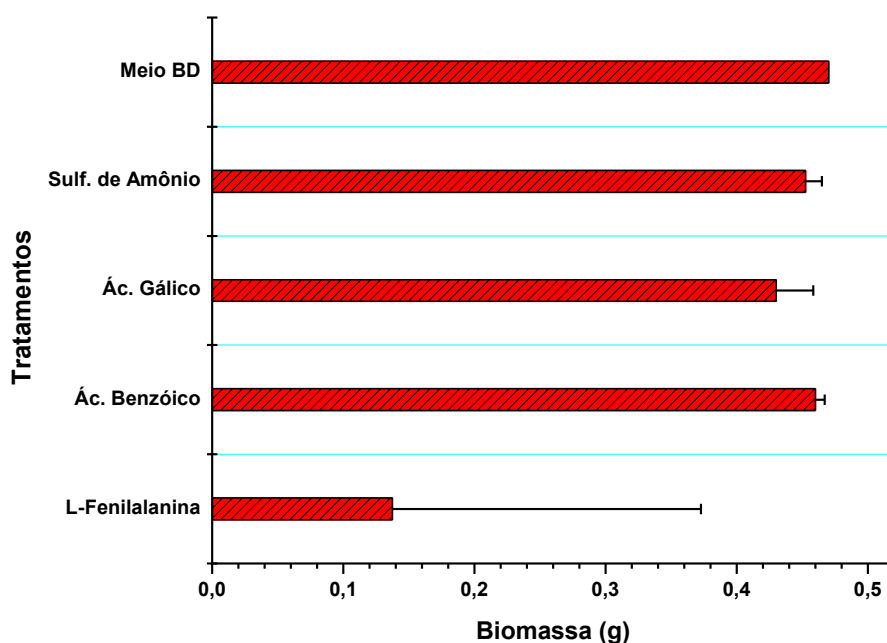
Fonte: Autor, 2009.

Como parte do trabalho tinha por base testes antimicrobianos e antifúngicos, foi necessário um acúmulo de matéria seca para elaboração dos extratos, com esta base, procurou-se mecanismos de ação abióticos para indução do aumento de biomassa durante a fase de crescimento do fungo. Para isso usou-se: *l*-fenilalanina, ácido benzóico, ácido gálico e sulfato de amônio. A tabela 17 apresenta a variação de biomassa média por frasco, comparada à cultura desenvolvida no mesmo período em meio BD para 30 dias.

Tabela 17. Estudo comparativo da média de biomassa acumulada por indução de fatores abióticos por frasco

Meio BD + Indutor				Meio BD
<i>ℓ</i> -fenilalanina	ácido benzóico	ácido gálico	sulfato de amônio	
0,14 g	0,46 g	0,43 g	0,45 g	0,47 g

A análise estatística para os tratamentos de acúmulo para biomassa demonstra que o coeficiente de correlação (CV) difere para a *ℓ*-fenilalanina comparando aos demais, enquanto os outros tratamentos mantêm uma diferença menos significativa quanto comparado ao padrão, meio BD, como observado na tabela 18.

Gráfico 02 - Comparativo entre meio BD e tratamentos para acúmulo de biomassa por meio de fatores abióticos com base nos respectivos desvios padrão.

Fonte: Autor, 2009.

Tabela 18. Dados estatísticos para os tratamentos de acúmulo de biomassa por fatores abióticos.

Parâmetros	<i>ℓ</i> -Fenilalanina	Ác. Benzóico	Ác. Gálico	Sulf. de Amônio	Meio BD
Média	0,304	0,465	0,450	0,461	0,470
Desvio Padrão	0,235	0,007	0,028	0,124	0,000
Erro Padrão	0,166	0,005	0,020	0,008	0,000
CV (%)	77,40	1,52	6,29	2,68	0,00

Nota: Dados estatísticos obtidos com o programa Microcal Origin 7.5⁹

⁹ Direitos reservados a OriginLab Corporation® 2007.

Os tratamentos com ácido benzóico, ácido gálico e sulfato de amônio não diferenciaram-se do padrão (meio BD), é a pequena diferença se deve a alterações discretas de pH e competição na absorção de carboidratos. Para *l*-fenilalanina, por tratar-se de um aminoácido, provavelmente induziu a produção de metabólitos inibidores de crescimento ou impediu diretamente seu desenvolvimento, apesar de não haver relatos em literatura que estabeleçam tais fatos ou discussões.

3.3. ESTUDO MORFOLÓGICO, MICROCULTIVO E MICROMETRIA

O problema encontrado para execução dos trabalhos com o endófito ficou por conta de sua identificação. Entre os diferentes procedimentos para estudo morfológico, como utilização de meios específicos para obtenção de estruturas de frutificação, como meio Lactrimel, microcultura, inoculação em meio líquido estéril de folhas de *M. jalapa* e em meio sólido com extrato de suas folhas, não foram o suficiente para o estudo taxonômico, obtendo somente apressórios. Em germinação realizada em 10 meios semi-sólido de AA + suco das folhas de *M. jalapa*, obteve-se em dois frascos, estruturas parecidas com de frutificação, ao observa-se em microscópio, notou-se tratar-se de conídios binucleados, porém não se encontrou nenhuma condição em especial para confirmar o gênero e espécie do endofítico. Por este motivo optou para análise genotípica da região dos espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2).

Os apressórios foram classificados em irregulares e lobados, com as margens onduladas, enquanto os conídios foram classificados em cilíndricos, com ambas as extremidades arredondadas.

A micrometria dos 50 conídios, medidos em microscópio com 400x de aumento e fator de correção de 1,666, permitiu determinar a média de comprimento e largura, 15,2 x 4,60 μm .

Figura 34. a) Apressórios de cultura do endofítico (FBS) em meio BDA (1000x); b) Conídios e apressórios de cultura do endofítico (FBS) em meio com extrato da folha de *Mirabilis jalapa* (1000x); c) Conídios, apressórios e hifas de cultura do endofítico (FBS) em meio com extrato da folha de *Mirabilis jalapa* (400x).



Fonte: Autor, 2009.

3.4 RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS

O processo de extração com solventes de diferentes polaridades para as células secas do endófito isolado (FBS) e calos obtidos dos explantes, foram usados no preparo das soluções para os testes de atividade antimicrobiana e antifúngica. A tabela 19 traz os rendimentos obtidos no processo de extração com os solventes de diferentes polaridades ao usar a expressão:

$$R\% = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{células}}} \times 100$$

Tabela 19. Rendimentos dos extratos obtidos em extração da matéria seca do endofítico (FBS) isolado e dos calos de cultura de tecidos para diferentes solventes.

Material	Solvente	Células Secas (g)	Extrato (g)	Rendimento (%)
FBS	n-Hexano	50	7,65	15,30
FBS	Clorofórmio	50	2,80	5,60
FBS	Acetato de etila	50	5,32	10,64
FBS	Metanol	50	8,87	17,74
FBS	Etanol	30	9,22	18,44
Calos	Etanol	10	2,42	24,20

3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA PATÓGENOS

O extrato etanólico do endofítico isolado, FBS, e o extrato etanólico dos calos foram submetidos à avaliação do potencial inibitório antimicrobiano.

Figura 35. Avaliação do potencial antimicrobiano contra cepas de *E. coli*.

Fonte: Autor, 2009.

O extrato etanólico bruto do FBS utilizado não demonstrou atividade contra as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*, enquanto, o extrato etanólico do calo, produziu halo de inibição igual a 12 mm para a cepa 198 de *S. aureus* mostrando razoável sensibilidade e atividade contra as cepas de *Escherichia coli*, como mostrado na tabela 20.

Tabela 20. Atividade dos extratos etanólicos contra cepas de *E. coli*

	Bactérias							
	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>		<i>E. coli</i>	
Cepa	198	51	61	63	F13	62	36	10
FBS	-	-	-	-	-	-	12 mm	-
Calo	12 mm	-	-	-	-	-	18 mm	18 mm

Os resultados obtidos demonstram semelhança com os dados obtidos da literatura que denotam a grande atividade antibacteriana de *Mirabilis jalapa* L., frente a bactérias entéricas como a *E. coli*, o que condiz também com o uso popular para problemas intestinais.

Um fato a se ressaltar é o da atividade do extrato dos calos contra a *E. coli* e contra *S. aureus*. Os calos representam células indiferenciadas, sem nenhuma especialização, diferentes dos tecidos desenvolvidos (diferenciados) existentes nas plantas ou induzidos *in vitro*. Isto

mostra a produção de metabólitos secundários capaz de apresentar ação contra bactérias *Gram positivas*, como *S. aureus*, indicando também, que alguma parte da planta deva produzir tais substâncias.

Por tratar-se de extratos brutos, se faz necessária a partição para assim verificar que fração reside à ação antimicrobiana e com isso isolar e identificar o composto, bem como refinar os resultados para outras espécies e cepas, além de determinar a concentração inibitória mínima dos extratos.

3.6 TESTE DE ANTAGOSNISMO CONTRA FITOPATOGÊNICOS

Os fitopatógenos *Phytophthora palmivora* e *Pseudomonas* sp. foram escolhidos para realizar os testes de antagonismo devido os problemas associados a ambos na agricultura, sendo o seu controle economicamente importante.

Phytophthora palmivora é um fungo fitopatogênico, sendo o gênero conhecido por causar “podridão” em plantas, praga na cultura do mamoeiro, provocando a doença conhecida como “podridão-do-pé”. A doença geralmente ocorre em solos mal drenados e mamoeiros de qualquer idade (BERGAMIN FILHO & KIMATI, 1980), seu agente etimológico também afetar outras culturas como: citrus, cacau e mamona.

A bactéria *Pseudomonas* sp. é característica em tomateiros provocando diferentes doença que dependem da espécie, como por exemplo: *P. syringae* pv. *tomato*, *P. corrugata* e *P. syringae* pv. *Syringae*, responsáveis na planta, respectivamente por: pinta bacteriana, necrose da medula e queima bacteriana, sendo as duas últimas pouco conhecidas e estudadas no Brasil (BARRETO e SCALOPPI, 1999).

3.6.1 Teste de cultura pareada

Na placa de Petri com BDA onde foram inoculados o endófito (FBS) e *P. palmivora* simultaneamente, uma vez que ambos apresentam mesma taxa de crescimento, acompanhando o desenvolvimento de ambos de forma isolada também em BDA.

Com 5 dias após, foram medidos os diâmetros das culturas isoladas de ambos, FBS e *P. Palmivora*, e destes no teste, que permitiu calcular a média de desenvolvimento para a porcentagem de inibição (PI%)¹⁰ (tabela 21), por meio da equação:

¹⁰ Ver Metodologia pág. 71, capítulo 2.

$$PI_{\%} = \frac{Dc - Dt}{Dc} \times 100$$

Tabela 21. Diâmetro médio de cultura isolada em teste de antagonismo entre endofítico (FBS) e *P. Palmivora*.

Fungo	Dc ¹ (mm)	Dt ² (mm)	PI (%)
FBS	5,54	2,79	49,64
<i>P. palmivora</i>	4,95	2,71	45,26

¹Dc é o diâmetro médio da colônia do fitopatógeno no controle;

²Dt é o diâmetro médio da colônia do isolado endofítico nos tratamentos.

Em tratamento estatístico com o Programa Origem 7.5 ao aplicar ANOVA e teste de Turkey ($P > 0,050$), as diferenças nos valores médios entre os grupos do tratamento foram irrelevantes, o que exclui a possibilidade que acha diferença devido à variabilidade da amostragem aleatória, ou seja, não há uma diferença estatística significativa ($P = 0.868$), com isso, os metabólitos dispersos no meio ou os voláteis não apresentaram fator de inibição para ambos.

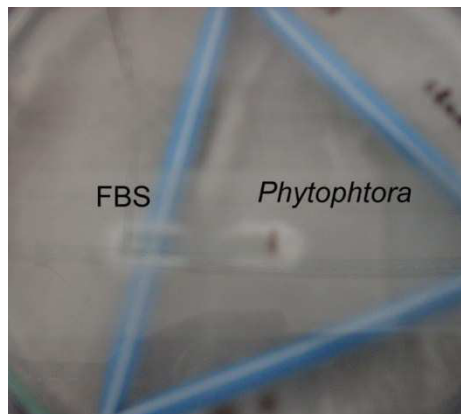
Figura 36. Teste de antagonismo entre o endofítico FBS e *P. palmivora*.



Fonte: Autor, 2009.

Para confirmar o observado acima foi realizado microcultivo, onde a lamínula foi corada com azul de metileno e observada em microscópio óptico (400x), onde permitiu observar entrelaçamento das hifas, porém, não foi visível rompimento destas, uma vez que se poderiam liberar outros metabólitos ao meio que produzissem um efeito antagônico.

Figura 37 – Microcultivo para avaliar interpenetração de hifas entre o endofítico FBS e *P. palmivora*.



Fonte: Autor, 2009.

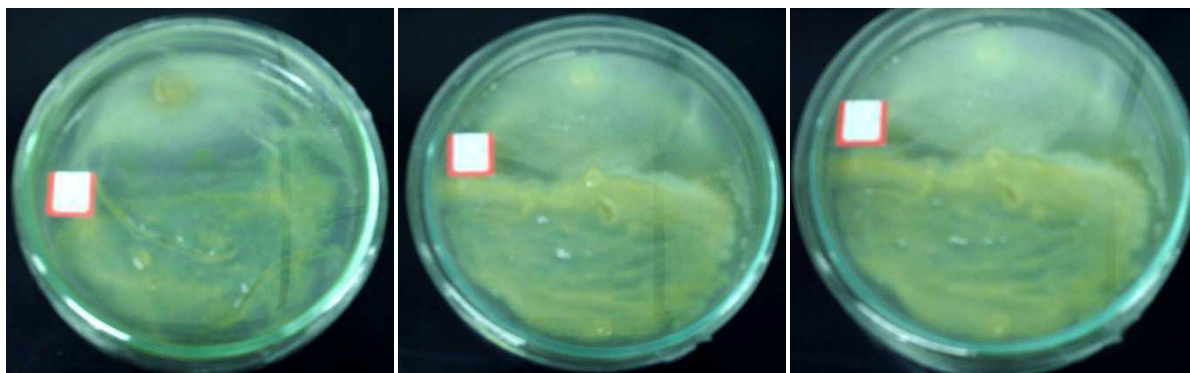
O teste de antagonismo também foi realizado frente à bactéria *Pseudomonas sp.* isolada em tomateiro.

Por tratar-se de uma bactéria, a porcentagem de inibição foi calculada apenas para o endófito (FBS), mediante a bactéria ter uma área limite para seu desenvolvimento. Após 5 dias foram medidos os diâmetros para o endófito. Na tabela 22, tem-se a taxa de inibição apresentada pelo FBS frente à bactéria *Pseudomonas*.

Tabela 22. Diâmetro de cultura isolada do FBS em teste de antagonismo frente a *Pseudomonas sp.*

Fungo	Dc (mm)	Dt (mm)	PI (%)
FBS	5,27	2,47	53,13

Figura 38 – Teste de antagonismo entre o endofítico isolado (FBS) e *Pseudomonas spp.*



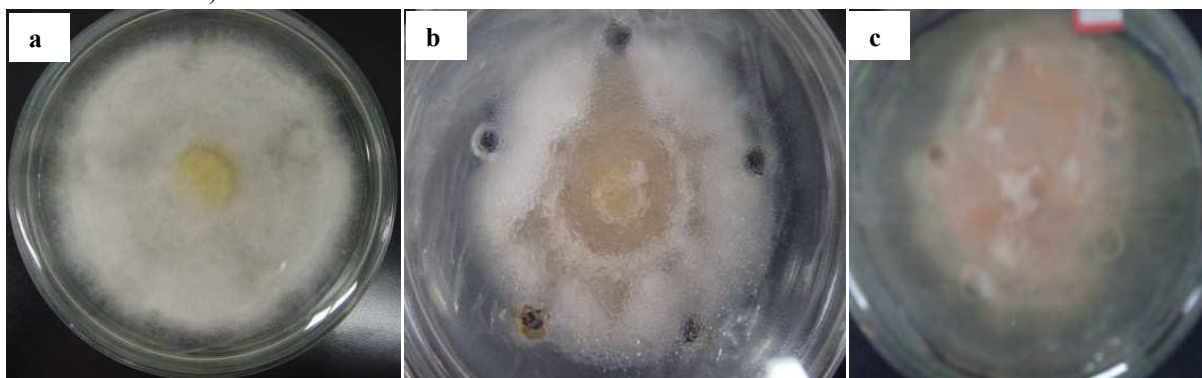
Fonte: Autor, 2009.

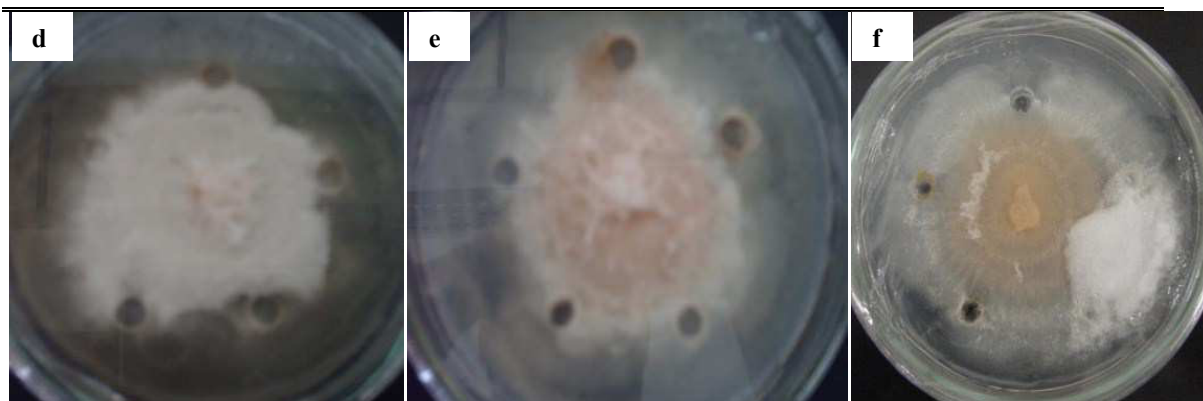
Segundo Robbers et al. (1997), no geral compostos com ação antibiótica são excretados para o meio nutriente, entretanto, em certos casos como ocorre com os peptídeos, só são liberados após lise celular, visto que pertencem ao compartimento intracelular, quer seja organela ou de membrana. Visivelmente não há interpenetração das hifas na colônia de *Pseudomonas*, bem como não apareceram halos de inibição, manchas escuras, pois de acordo com Zacchino et al (2005), tal característica indicaria inibidores da parede celular fúngica, isto porque os fungos crescem sem a parede celular, ou seja, como protoplasma, e ao microscópio apresentaria deformações nas hifas como encurtamento, fato também não observado.

3.6.2 – Teste antimicrobiano por difusão em poços

Após 3 dias de inoculado o fungo (*Phytophthora palmivora*) os extratos brutos obtidos a partir das células do endófito (FBS), nas concentrações de 500 mg/mL, 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62,5 mg/mL e 31,25 mg/mL, foram aplicados aos poços, não havendo formação de halo de inibição completo. Em alguns extratos (hexano e acetato) foi observado sensibilidade, e mudanças macromorfológicas para todos os extratos ao compararmos a cultura de *P. palmivora* em meio BDA.

Figura 39 – Teste atividade antimicrobiana dos extratos brutos por difusão em poços contra *Phytophthora palmivora*, fitopatógeno do mamoeiro. a) Cultura de *Phytophthora palmivora* em BDA. Testes: b) extrato do hexano, c) extrato clorofórmico, d) extrato acetato, e) extrato metanólico e f) extrato etanólico.



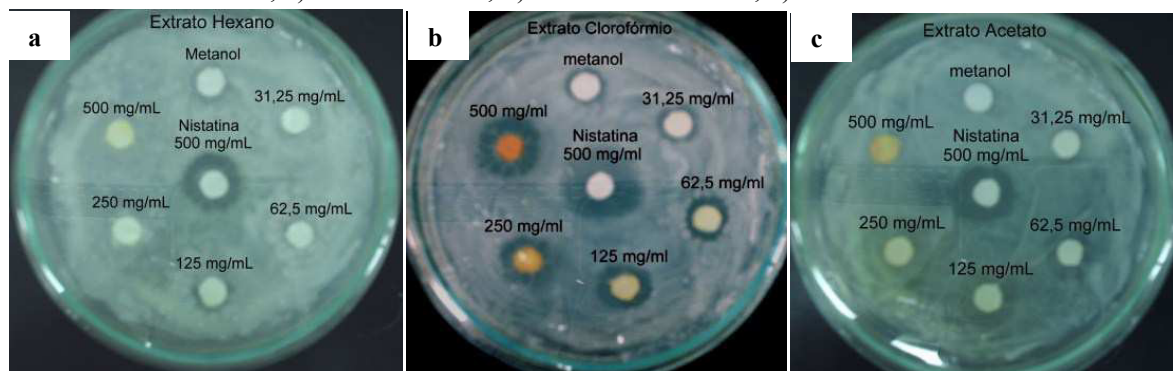


Fonte: O autor, 2009.

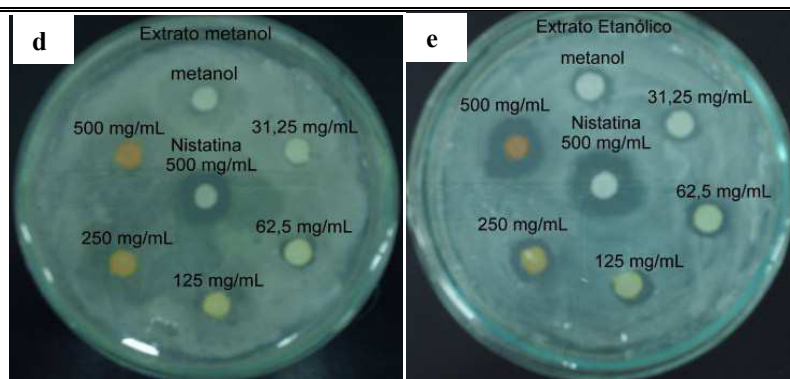
3.6.3 – Teste antimicrobiano por difusão em discos de papel

O teste de antagonismo não apresentou resultado positivo frente à *Pseudomonas sp.*, porém, podemos notar que houve sensível atividade com real inibição pelos parâmetros de Kusamba et al (2000)¹¹ para os extratos clorofórmico e etanólico, que apresentaram halos de inibição para todas as concentrações (tabela 23), tendo apresentado atividade semelhante ao antifúngico Nistatina, uma vez que não há diferenças estatísticas para a concentração de 500 mg mL⁻¹. A inibição observada deve-se pela lise que as células do endófito (FBS) sofreram no processo de extração que permitiram a liberação de metabólitos que atuaram na inibição bacteriana de *Pseudomonas sp.*

Figura 40 – Teste atividade antimicrobiana dos extratos brutos por difusão em disco de papel contra *Pseudomonas spp.*, fitopatógeno isolado em tomateiro. Testes: a) extrato do hexano; b) extrato clorofórmico; c) extrato acetato; d) extrato metanólico; e) extrato etanólico.



¹¹ Ver Metodologia pág. 70, Capítulo 2.



Fonte: O autor, 2009.

Tabela 23. Halo de inibição dos extratos brutos

Extrato	Halo de inibição (mm) / conc. de extrato (mg mL ⁻¹)					Nistatina 500 mg/mL
	31,25	62,5	125	250	500	
Hexano	0	0	0	0	0	49
Clorofórmio	11	17	21	29	46	52
Acetato	0	0	0	0	0	51
Metanol	0	0	0	0	0	48
Etanol	9	12	17	22	45	52

3.7. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO ENDOFÍTICO

Os genomas dos eucariotos podem apresentar grande complexidade, devido à presença de regiões espaçadoras, introns, regiões repetitivas, elementos de transposição e famílias multigênicas (OLIVEIRA & MENCK, 2004). Dentre os genes mais representativos da classe do DNA estão os que codificam o RNA ribossômico, que constituem uma família gênica. As seqüências de genes agrupados, de famílias gênicas, tendem a ser mantida relativamente uniforme, a partir de processos coevolutivos, como a conversão gênica (FERREIRA, 1996).

Em fungos, a maioria dos estudos filogenéticos fundamentados em seqüência de DNA foi baseada exclusivamente no gene ribossomal ou nas regiões espaçadoras internas transcritas (Intergenic Transcribed Spacer - ITS) (KAUSERUD *et al.*, 2004).

Figura 41 - Representação esquemática da unidade de repetição do rDNA dos eucariontes. ETS: espaçador externo; 18S: região que codifica para rRNA 18S; ITS: espaçador interno; 5,8S região que codifica para rRNA 28S; NTS: espaçador intergênico.

NTS	ETS	18S	ITS 1	5,8S	ITS 2	28S
-----	-----	-----	-------	------	-------	-----

Álvarez e Wendel (2003), em seu trabalho, explicam as vantagens da utilização da região de ITS para estudos filogenéticos:

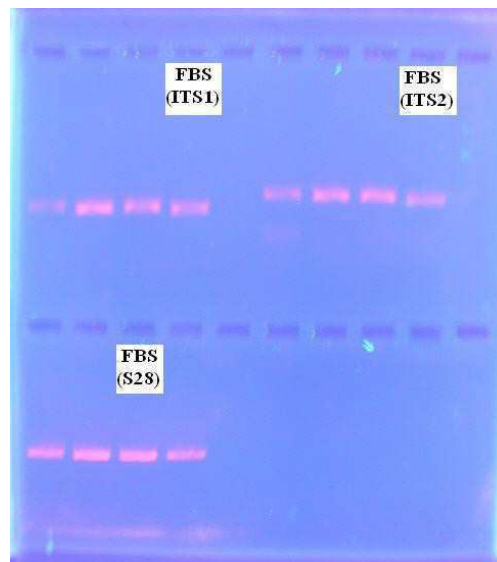
- herança biparental: revela casos passados de reticulação, especiação híbrida, e parentesco de poliplóides, o que não pode ser observado em genoma de organelas;
- universalidade: as regiões dos genes do rRNA são altamente conservadas. White et al. (1990), com base nessa informação, descreveram um grupo de primers que se alinham nessas regiões, úteis para amplificar seqüências a partir de plantas e fungos permitindo que a seqüência de ITS seja rapidamente obtida;
- simplicidade: devida à repetição esses são mais facilmente isolados do que locos de baixo número de cópias;
- uniformidade intragenômica: famílias multigênicas podem estar sujeitos a processos de coevolução. Esse processo elimina variações da seqüências dentro do genoma dando forma para reconstruções filogenéticas;
- variabilidade intergenômica: o nível de variação da região de ITS é adequado para inferências filogenéticas em nível de espécie, gênero ou família.
- baixa pressão funcional: como a região de ITS é removida durante o processamento do transcrito, ela está sujeita a baixa pressão de seleção, oferecendo preponderância de sítios de nucleotídeos que poderão evoluir essencialmente de forma neutra.

Essas vantagens explicam o fato observado por Álvarez & Wendel (2003), para os quais a grande maioria dos trabalhos de comparações em nível de gênero e abaixo desse nível, incluem dados da seqüência de ITS e justificando a escolha dessa região para identificação do endofítico isolado usando os *primers* ITS1-ITS2 e ITS3-ITS4 para amplificação do rDNA por meio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

O seqüenciamento gerou duas seqüências de rDNA correspondentes respectivamente as regiões ITS1 (416 pares de bases) e ITS2 (382 pares de bases). Por meio dos programas BioEdit Sequence Alignment Editor e ClustalW Multiple Alignment, foi feito o complemento inverso para o seqüenciamento ITS2 alinhando com ITS1 e complementando a seqüência de bases para obter uma região com 462 pares de bases. Esta seqüência salva no formato Fasta foi usada para pesquisa no GenBank do NCBI HomePage (National Center for Biotechnology

Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para identificação do endofítico.

Figura 42 – Eletroforese em gel de Agarose 1% para confirmar a extração de rDNA amplificado por PCR das regiões ITS1 e ITS2 do fungo endofítico isolado FBS.



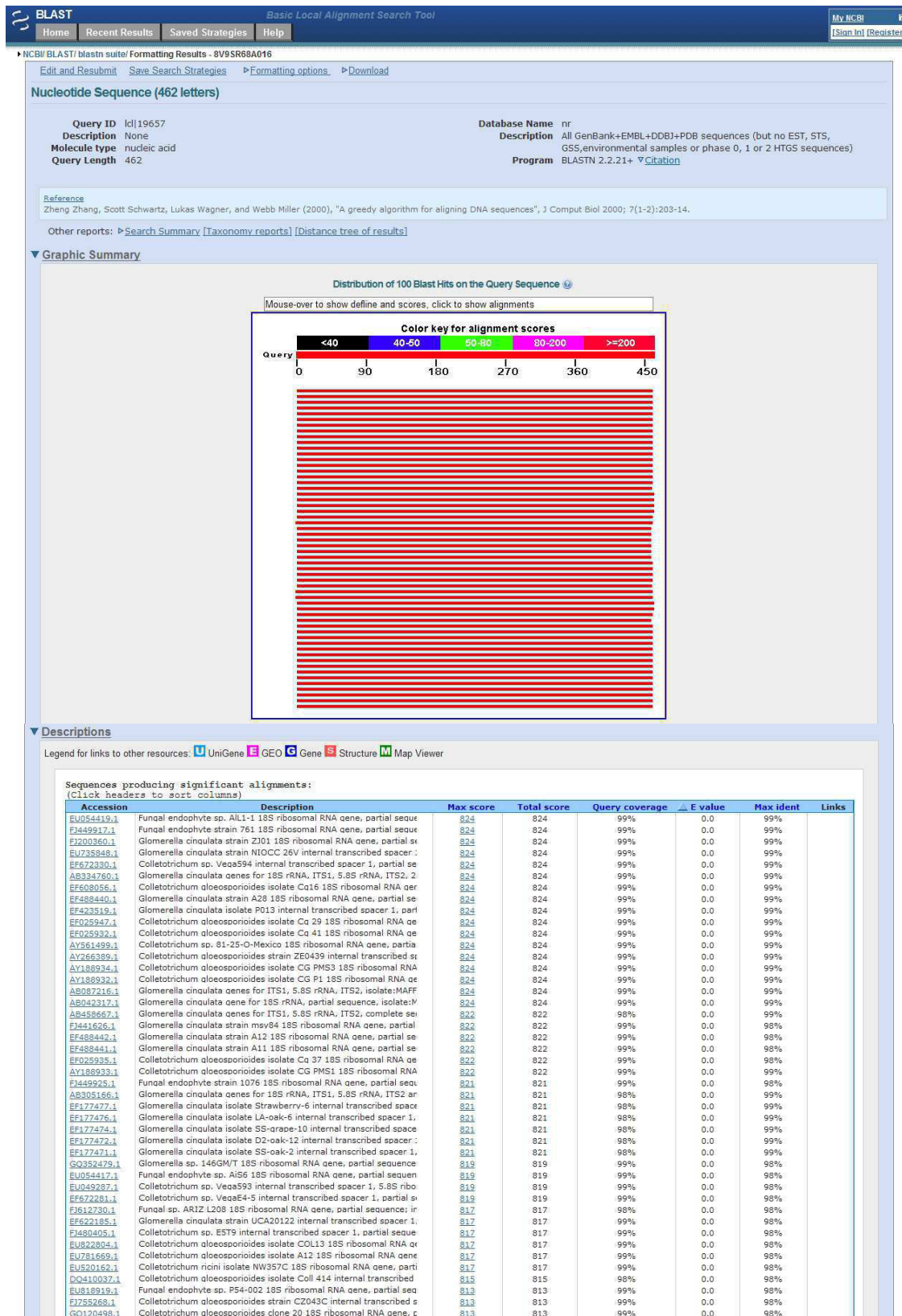
Fonte: O autor, 2009.

Tabela 24. Descrição das ferramentas da família BLAST.

FAMÍLIA DE PROGRAMAS BLAST	
blastp	compara uma sequência de aminoácido vs banco de dados de proteínas
blastn	compara uma sequência de nucleotídeos vs banco de dados de nucleotídeos
blastx	compara seis fases de leitura de um nucleotídeo vs banco de dados de proteína
tblastx	compara todas as seis fases de leitura abertas da sequência de nucleotídeos vs banco de dados de nucleotídeos

Usando a ferramenta **BLASTn** do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), encontrou-se 99% de similaridade por meio de mais de 200 pares de bases, tendo como classificação taxonômica molecular *Colletotrichum gloeosporioides* sendo este a fase anamórfica, e sua fase teleomorfa *Glomerella cingulata*.

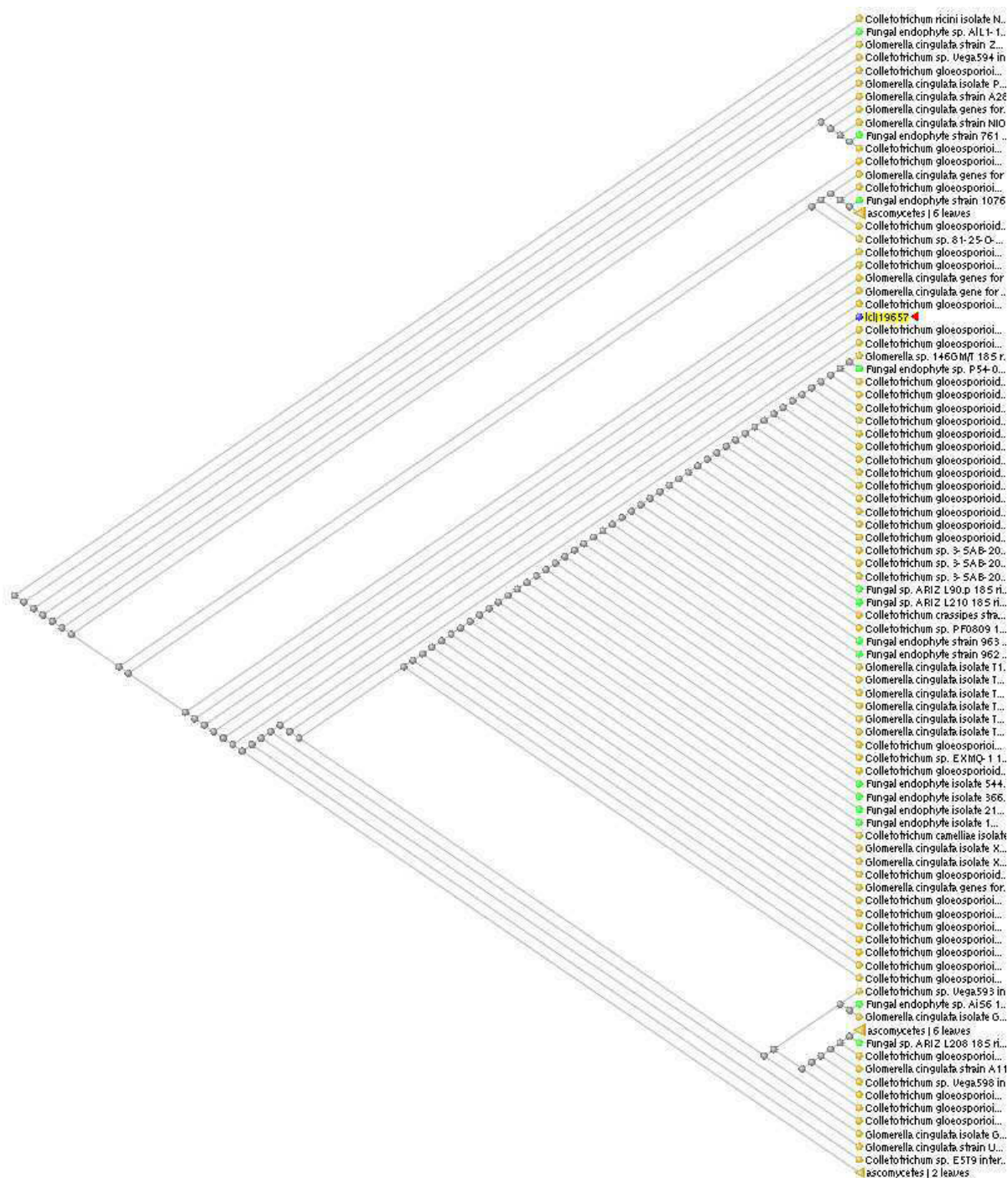
Figura 43 – Diferentes telas capturadas do site NCBI HomePage (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) após submeter seqüenciamento do rDNA das regiões ITS1 e ITS2.



Fonte: O autor, 2009.

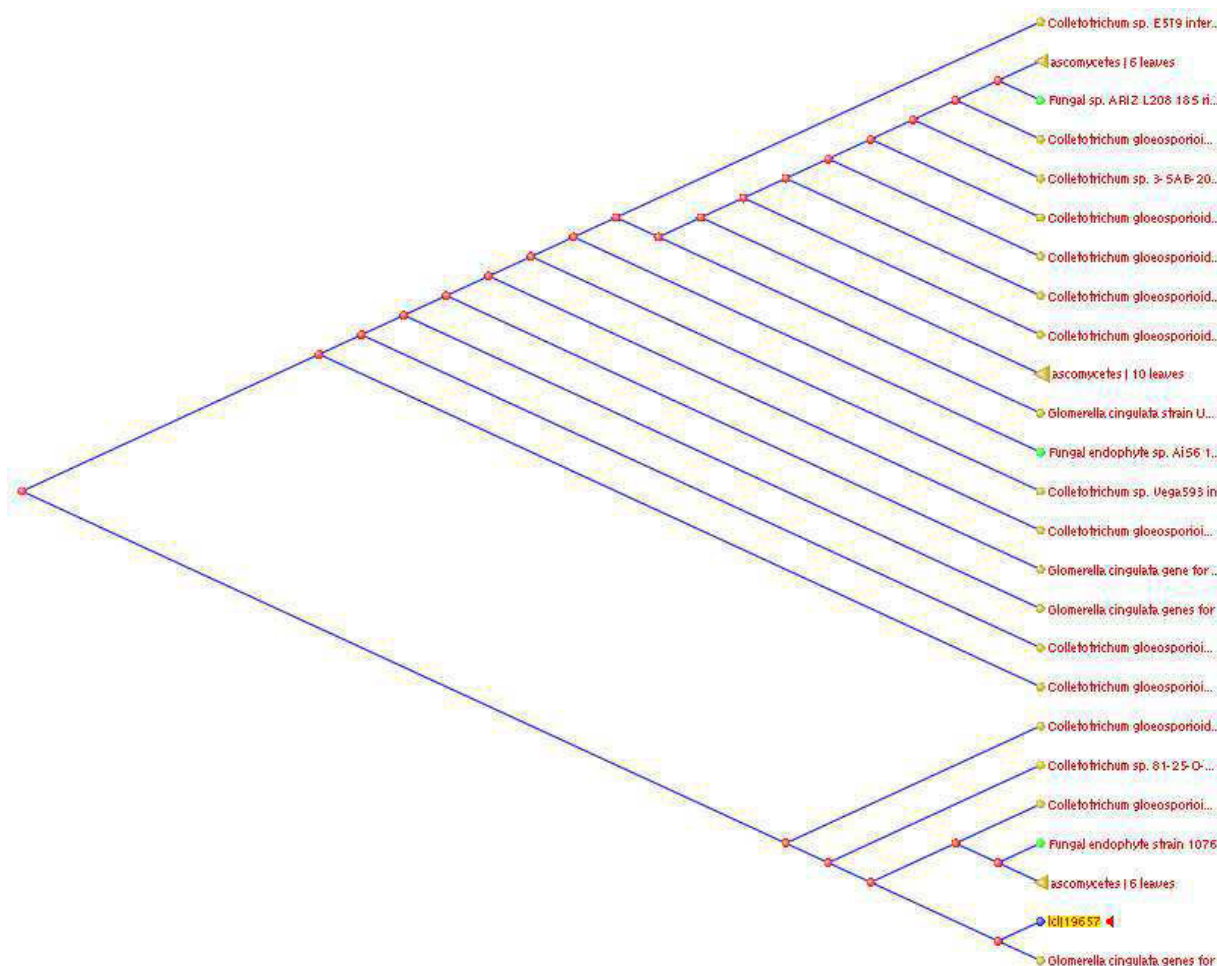
Com base nos resultados do GenBank-NCBI, foi gerado a árvore filogenética de similaridade para 99-98% de identidade com um escore máximo de 824 a 813.

Figura 44 – Árvore filogenética para resultados do BLASTn máxima similaridade, 98-99%.



Fonte: O autor, 2009.

Figura 45 – Arvore filogenética destacando fungos de maior similaridade com a o endofítico isolado (FBS) identificado pelo código lcl 19657 gerado pelo programa BLASTn.



Fonte: O autor, 2009.

No anexo F encontra-se o alinhamento gerado pelo programa BLASTn para a sequência de microrganismos apresentado na figura 45.

3.8. DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

Devido os metabolitos de *Colletotrichum gloeosporioides* apresentarem compostos fenólicos, muitas vezes derivados diretamente do fenol ou ácido benzóico, como o ácido coletótrico, sendo sua quantificação possível pelo uso do reagente de Folin-Ciocalteu que se baseia em reações de oxi-redução mediante a formação de um complexo de coloração azul ocorre em meio alcalino, derivado da redução do reagente pelas hidroxilas fenólicas e sendo quantificado por espectrofotometria (FOLIN; CIOCALTEU, 1927; SCALBERT, 1992).

Para determinação desses fenóis totais foram testados três métodos: Makkar et al. (1993), Slinkard e Singleton (1977) e Swain e Hills (1959) para estudo comparativo, já que apresentam diferentes procedimentos com base no mesmo reagente, Folin-Ciocalteu.

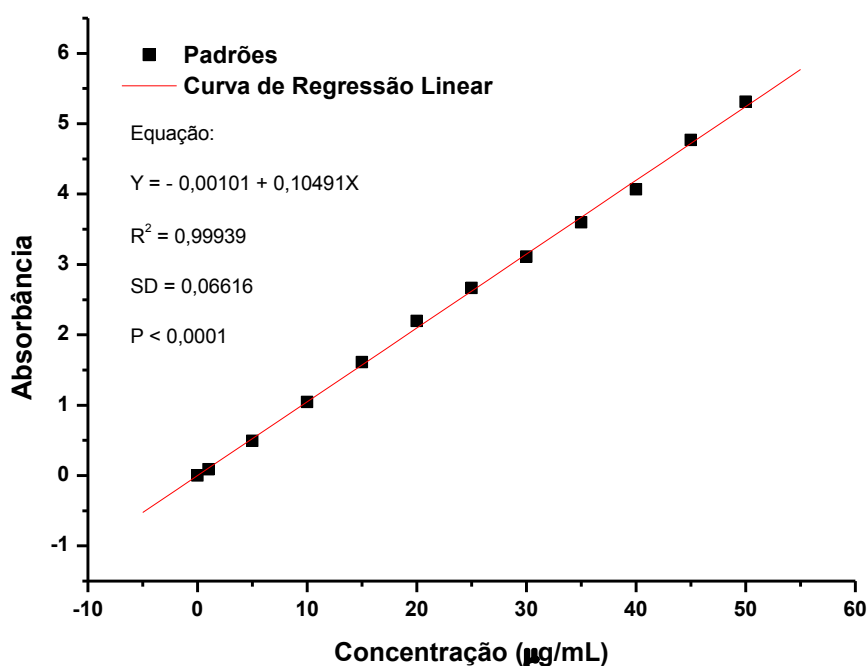
Os métodos aqui estudados para determinar fenóis totais foram identificados por:

- Método 1 - Makkar et al. (1993);
- Método 2 - Slinkard e Singleton (1977);
- Método 3 - Swain e Hills (1959).

3.8.1 – Curvas de Calibração

As curvas de calibração obtidas para ácido gálico e ácido tânico, mostraram similaridade quanto ao coeficiente (inclinação) da reta para os métodos de 1 (Makkar) e 3 (Swain), porém, para o método 2 (Slinkard) observa-se decréscimo na linearidade com o aumento da concentração dos padrões, isto deve-se a solução de carbonato de sódio que não permite ter-se um meio alcalino ideal para a formação do complexo estável com o grupamento fenólico.

Gráfico 03 – Curva de calibração do ácido gálico para o método de Makkar et al. (1993).



O método 2 pode ser usado para determinação de baixos teores de fenóis, próximo de $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, que esta na faixa de absorbância até 0,8, onde se mantém a linearidade fazendo com que o valor de R^2 seja de 0,99682.

Gráfico 04 – Curva de calibração do ácido gálico para o método de Slinkard e Singleton (1977).

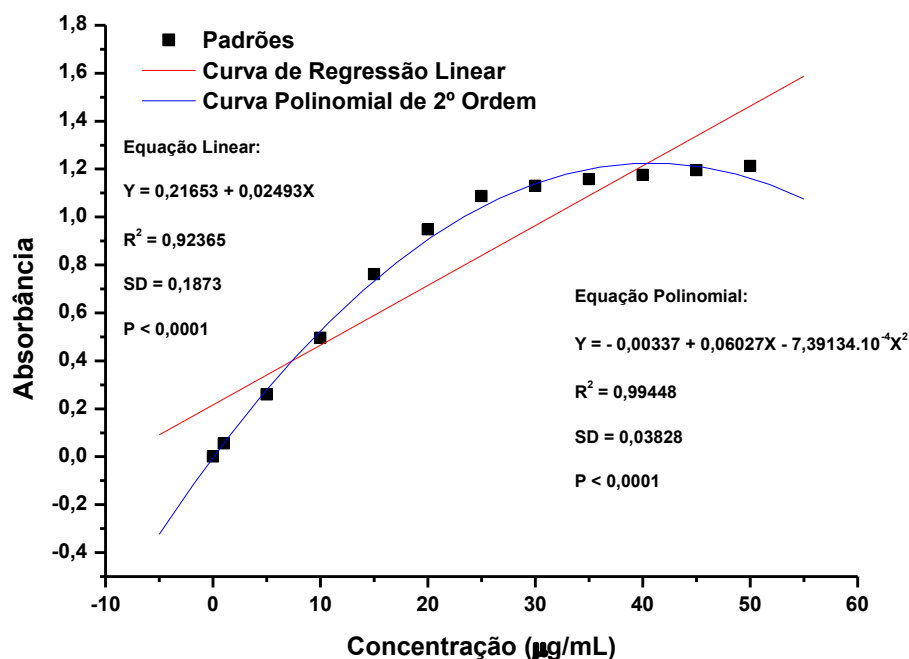
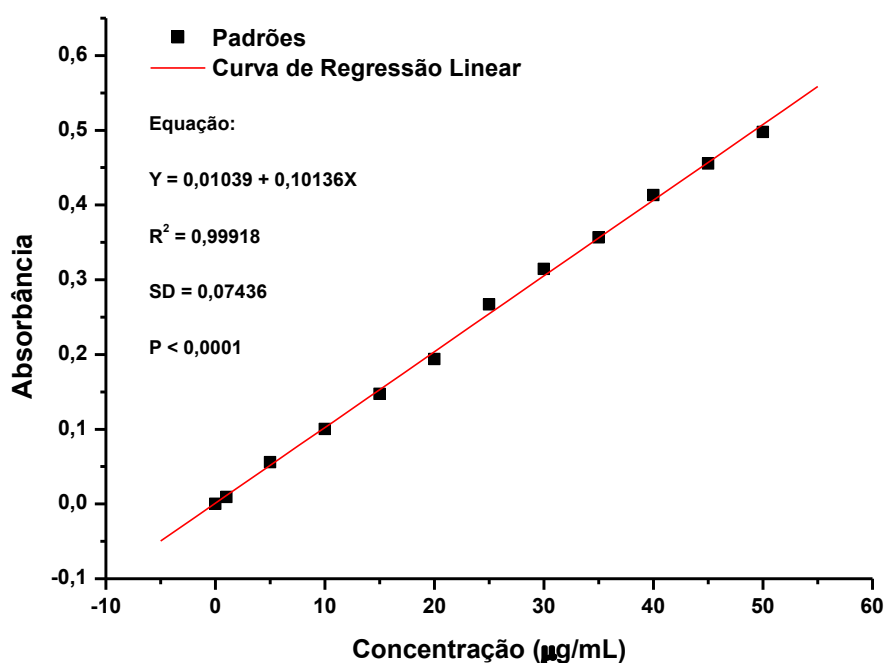


Gráfico 05 – Curva de calibração do ácido gálico para o método de Swain e Hills (1959).



Uma das limitações em geral dos métodos relaciona-se a escolha de uma substância de referência para expressar o teor de fenóis. Se a capacidade de redução da substância selecionada como padrão não é precisamente a mesma do extrato analisado, a concentração calculada a partir da curva padrão não refletirá, obviamente, o teor de fenóis da amostra (APPEL et al., 2001).

Gráfico 06 – Curva de calibração do ácido tânico para o método de Makkar et al. (1993).

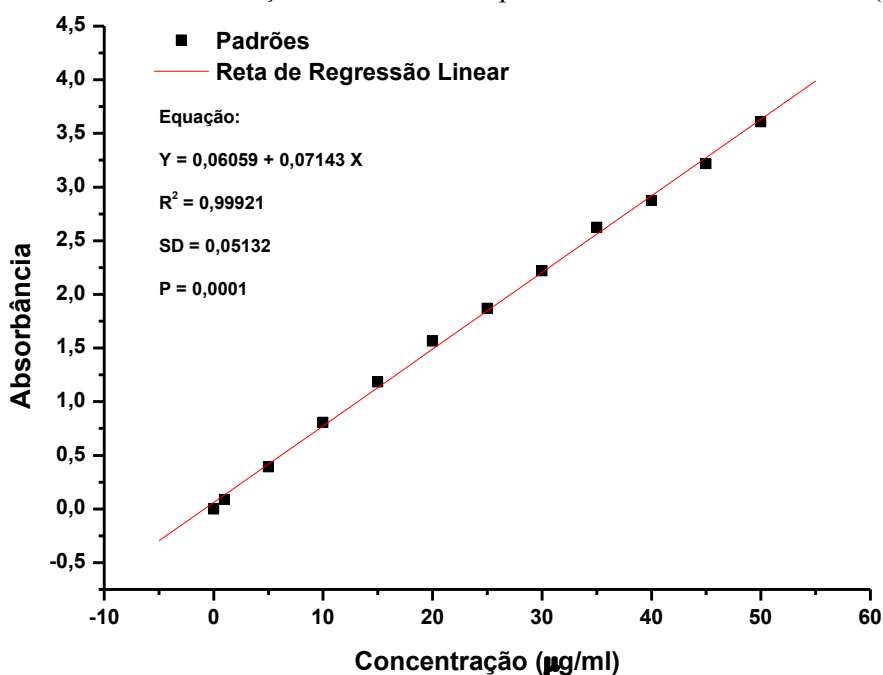


Gráfico 07 – Curva de calibração do ácido tânico para o método de Slinkard e Singleton (1977).

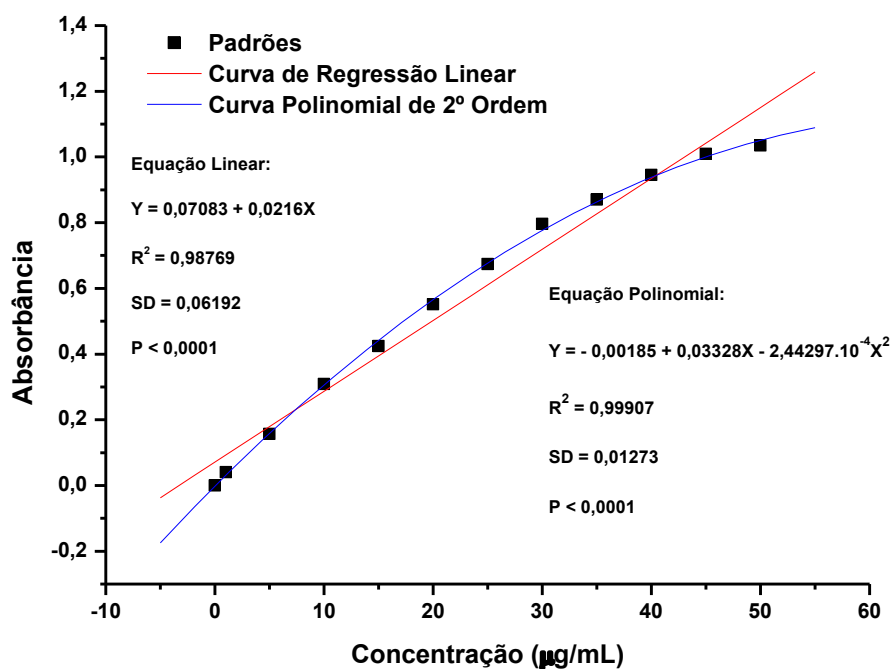
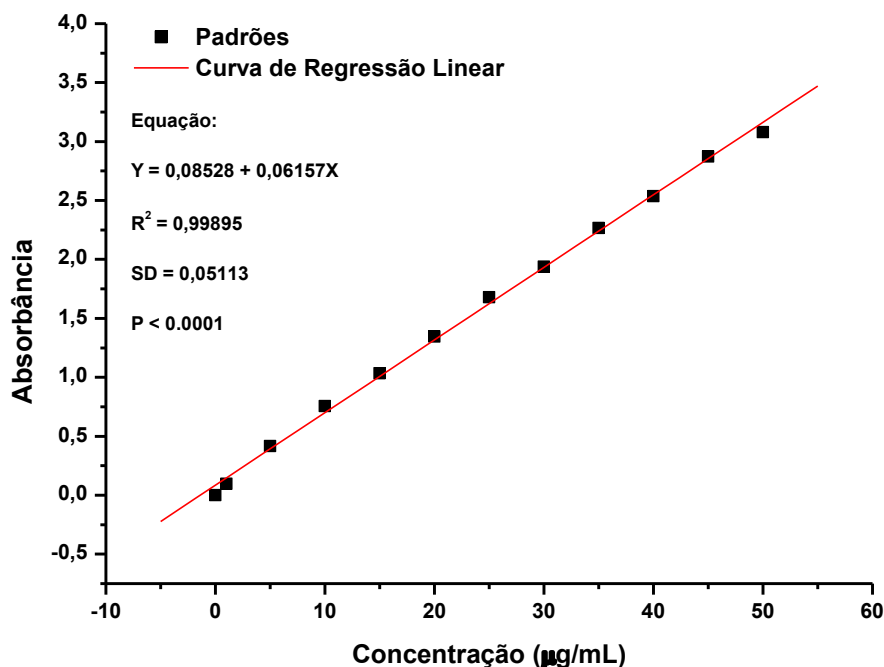


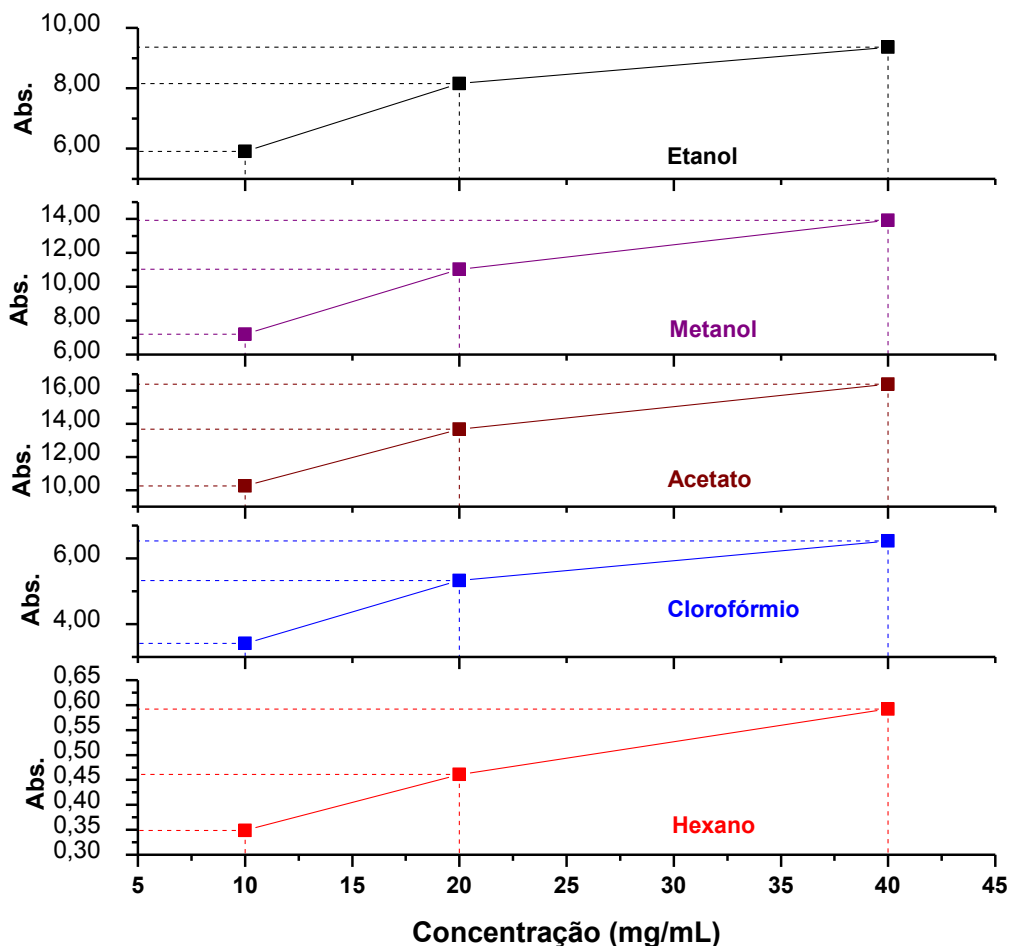
Gráfico 08 – Curva de calibração do ácido tânico para o método de Swain e Hills (1959).

3.8.2 – Teor de fenóis nos extratos

Outra limitação atribuída aos métodos de quantificação que se utilizam dos reagentes de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu, encontra-se no fato de os reagentes serem inapropriados para a comparação do conteúdo fenólico de amostras de diferentes extratos vegetais. Embora o reagente seja reduzido pelas hidroxilas aromáticas, características de todos os fenóis, a redução depende da estrutura fenólica, além do fato de o reagente poder ser reduzido por outros constituintes do extrato, como alcalóides e proteínas, por exemplo. Dessa forma, a composição e a quantidade de fenóis podem ser diferentes, mesmo quando a absorvância é semelhante. Por essa razão, os reagentes de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu não fornecem uma idéia exata da quantidade de fenóis, mas sim da capacidade de redução da amostra analisada (APPEL et al., 2001).

As leituras de absorvância foram todas feitas dentro da escala dos padrões e do feixe espectrométrico do aparelho, leituras de 0 a 2 em absorvância. Os valores apresentados acima dessa escala foram obtidos pela diluição da amostra até estar dentro da escala sendo os valores da leitura corrigidos pelo Fator de Diluição (FD).

Figura 46 – Valores de absorbância para os extratos obtidos a partir do endofítico isolado, FBS, para o método de Makkar et al. (1993).



Fonte: O autor, 2009.

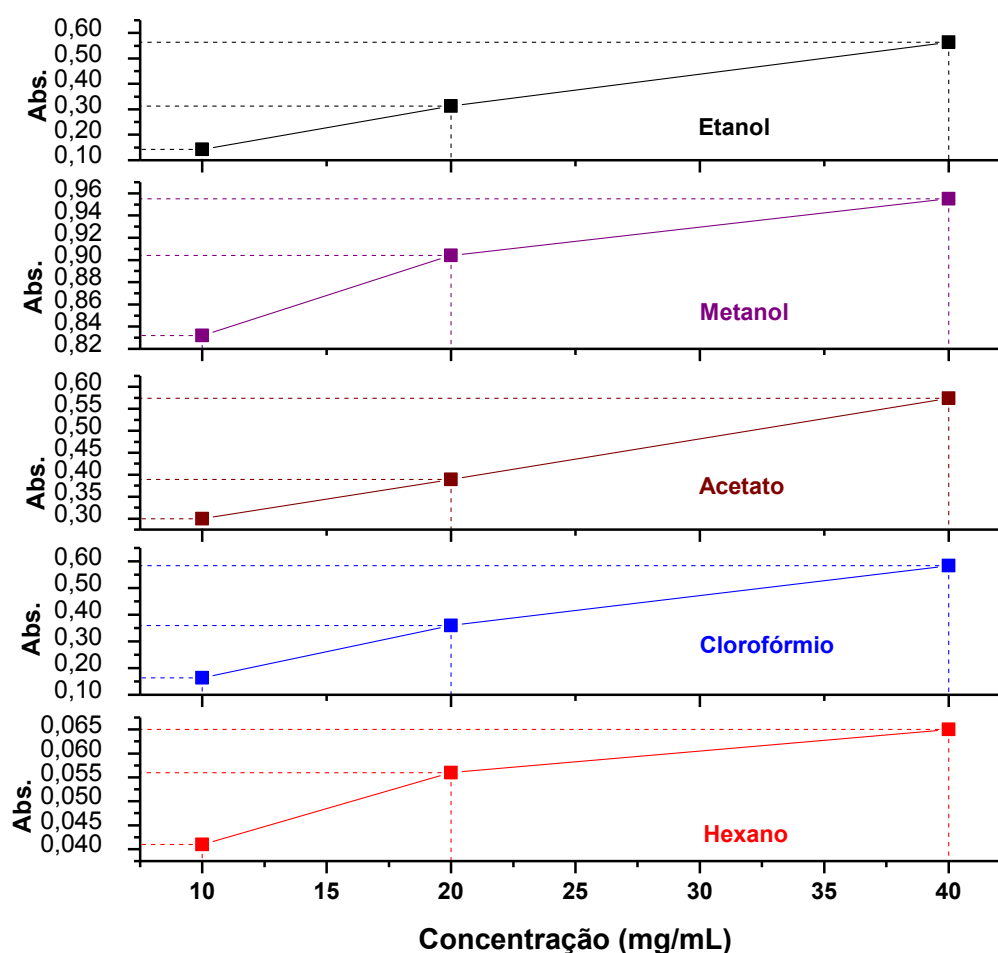
Tabela 25. Valores de absorbância para os extratos obtidos a partir do endofítico isolado, FBS, para o método de Makkar et al. (1993).

Concentração (mg mL ⁻¹)	Absorbância				
	Hexano	Clorofórmio	Acetato	Metanol	Etanol
10	0,349	3,408	10,254	7,198	5,907
20	0,461	5,324	13,679	11,028	8,156
40	0,592	6,533	16,387	13,921	9,358

O extrato bruto da fração acetato apresentou a melhor capacidade redutiva comparado aos demais, devendo conter maior teor de compostos fenólicos, provavelmente flavonóides. A fração metanol, por ser uma fração final do processo de extração, apresenta

muitos compostos glicosilados, sendo assim uma explicação para a capacidade reductiva do extrato.

Figura 47 – Valores de absorbância para os extratos obtidos a partir do endofítico isolado, FBS, para o método de Slinkard e Singleton (1977).



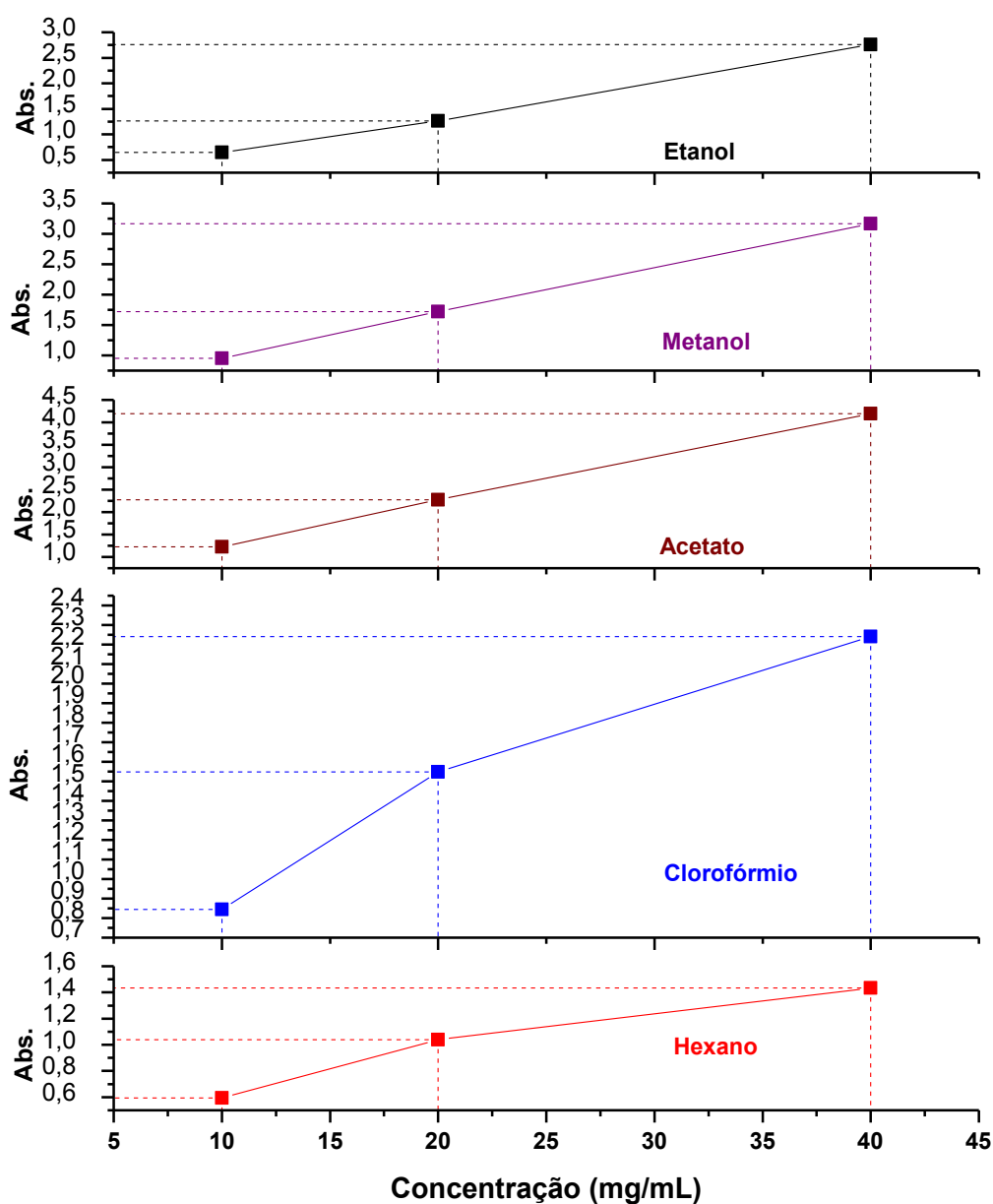
Fonte: O autor, 2009.

Tabela 26. Valores de absorbância para os extratos obtidos a partir do endofítico isolado, FBS, para o método de Slinkard e Singleton (1977).

Concentração (mg mL ⁻¹)	Absorbância				
	Hexano	Clorofórmio	Acetato	Metanol	Etanol
10	0,041	0,164	0,300	0,832	0,142
20	0,056	0,359	0,503	0,904	0,313
40	0,065	0,584	0,574	0,955	0,564

Como o extrato etanólico não foi fracionado, seu extrato equivale a todas as frações dos demais extratos, ou seja, seu extrato contém uma mistura rica em substâncias de todos os outros, tendo sua capacidade redutiva equiparada à fração clorofórmica, que apresentaria compostos fenólicos com menor número de hidroxilas, provavelmente derivados do ácido benzóico, fenilpropanóides e cumarinas.

Figura 48 – Valores de absorbância para os extratos obtidos a partir do endofítico isolado, FBS, para o método de Swain e Hills (1959).



Fonte: O autor, 2009.

Tabela 27 – Valores de absorvância para os extratos obtidos a partir do endofítico isolado, FBS, para o método de Swain e Hills (1959).

Concentração (mg/mL)	Absorvância				
	Hexano	Clorofórmio	Acetato	Metanol	Etanol
10	0,595	0,845	1,225	0,954	0,647
20	1,058	1,917	2,276	1,718	1,264
40	1,435	2,240	4,196	3,167	2,758

O extrato hexânico é a fração mais pobre em compostos fenólicos já que não possui polaridade, sendo responsável pela remoção de ceras, óleos e gorduras das células secas do fungo, tanto que sua fração é viscosa comparada as demais, tendo densidade ($d=0,890 \text{ g cm}^{-3}$) comparável ao óleo de soja ($d \approx 0,914 \text{ g cm}^{-3}$).

3.8.3 – Cálculos para Fenóis Totais (FT)

Os valores de fenóis totais (FT) são expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) e/ou ácido tânico (EAT) que se encontram na tabela 28 para os métodos utilizados. Abaixo temos o exemplo de como foi realizada a conversão para EAG para o extrato acetato na concentração de 10 mg mL^{-1} para o método de Makkar et al (1993).

1. O extrato utilizado no ensaio contém $40 \mu\text{L}$ de FT que resultou em uma absorvância de 10,254 que equivale a $1,074 \mu\text{g/mL}$ de AG (dado obtido a partir da curva padrão).
2. Para 50 g de células secas, usa-se 1000 mL de solvente, logo, 500 mg de célula é extraído com 10 mL de solvente, então, 500 mg de extrato terá $1,074 \times 10 = 10,74 \mu\text{g} = 0,01074 \text{ mg}$ AG.
3. Se para 500 mg de extrato tem-se $0,01074 \text{ mg}$ AG, para 500 g terá $0,01074 \text{ g}$ de AG.
4. As células do fungo contém $81,03 \%$ de matéria seca (MS), isto implica, que $1,326 \%$ é de AG.

Tabela 28 – EAG¹ e EAT² dos fenóis totais para os extratos do endofítico isolado, FBS, na concentração de 10 mg mL⁻¹ apresentando a percentagem média de matéria seca (%_{média} de MS) para AG¹ e AT².

Extrato	EAG (mg)			% _{média} MS de AG	EAT (mg)			% _{média} MS de AT
	Método 1	Método 2	Método 3		Método 1	Método 2	Método 3	
Hexano	0,356	2,176	0,707	0,133	0,855	0,717	1,219	0,115
Clorofórmio	3,565	2,206	3,558	0,384	3,040	0,744	2,951	0,277
Acetato	10,747	2,240	10,497	0,966	7,930	0,775	7,166	0,653
Metanol	7,541	2,373	7,396	0,712	5,747	0,888	5,282	0,490
Etanol	6,187	2,201	6,091	0,596	4,825	0,739	4,490	0,414

¹ AG = Ácido Gálico

² AT = Ácido Tânico

Como afirmado anteriormente, o método 2 é limitado para determinação de fenóis totais devido não se ter a faixa ideal de pH no meio por causa da baixa concentração de carbonato de sódio, que não permite uma reação de oxi-redução total, não permitindo o complexo fosfotúngstico-fenol se estabilizar para a leitura de absorbância. Aplicando-se ANOVA e teste de Tukey, verificaram-se diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os métodos, porém, os métodos 1 e 3 apresentam-se equivalentes quando comparado com os valores de diferença média (DM=0,0294), enquanto que para o método 2 tem-se DM=3,440 e DM=3,411, respectivamente para os métodos 1 e 3.

Gráfico 09 – Comparativo para os valores em EAG para os extratos do fungo endofítico isolado, FBS, para os três métodos avaliados.

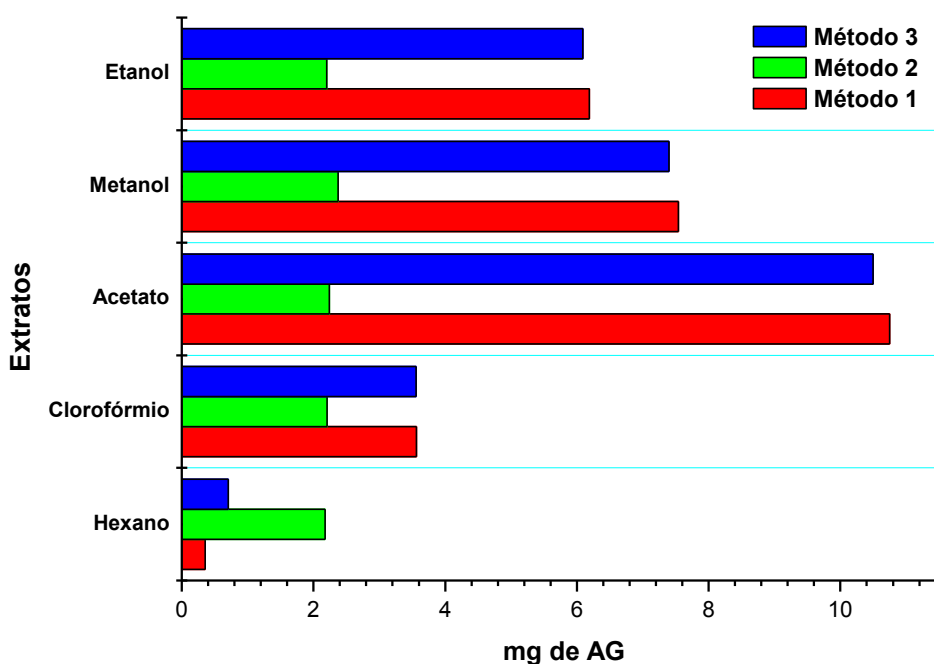
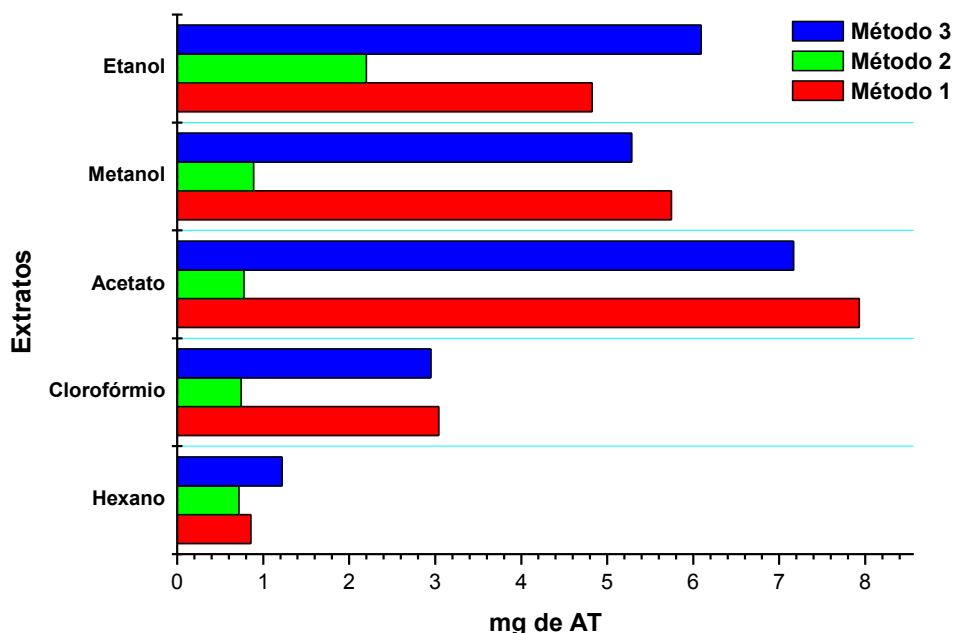


Gráfico 10 – Comparativo para os valores em EAT para os extratos do fungo endofítico isolado, FBS, para os três métodos avaliados.

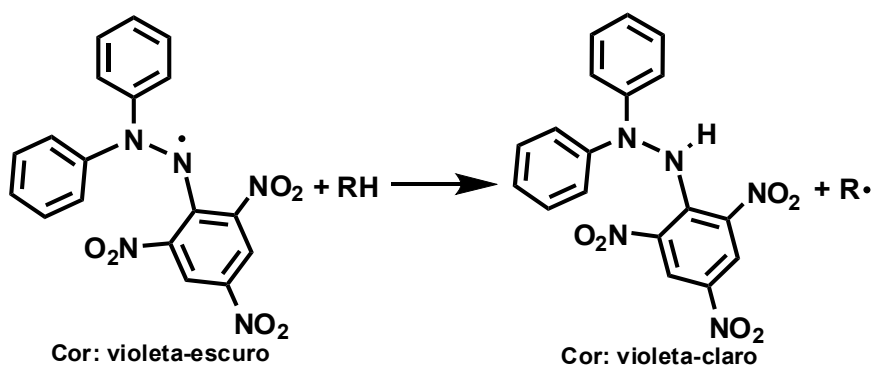


3.9. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro*

Evidências crescentes do papel dos antioxidantes na prevenção de certas doenças têm conduzido ao desenvolvimento de grande número de métodos para determinar a capacidade antioxidante (PÉREZ-JIMÉNEZ e CALIXTO, 2006).

Os métodos *in vitro* são avaliações potenciais da atividade antioxidante de um determinado composto puro ou extrato, já que a interação fisiológica entre o organismo e o antioxidante não é estudada, como ocorre nos métodos *in vivo*. Para a utilização de antioxidantes em alimentos, para fins tecnológicos, a avaliação *in vitro*, se bem conduzida, fornece uma estimativa importante do potencial antioxidativo do composto em análise.

Figura 49 - Estabilização do radical livre de DPPH.



O princípio do ensaio do DPPH é a redução do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila, que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico, o qual apresenta o máximo de absorção a 515-520 nm. Ao abstrair um radical hidrogênio do antioxidante em estudo, observa-se uma diminuição da absorbância e da coloração.

O ensaio do DPPH é um teste rápido e simples, com boa reprodutibilidade dos resultados, que não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação. Entretanto, algumas precauções devem ser tomadas quanto à utilização do método e interpretação dos resultados, dentre eles, o tipo e concentração do composto analisado (composto puro ou mistura de compostos), cinética de reação do antioxidante, características do meio reacional (pH, tipo de solvente), presença de interferentes, afinidade solvente-substrato e maneira de expressar os resultados (ARNAO,2000; BONDET, BRAND-WILLIAMS e BERSET, 1997; BRANDWILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995; LLESUY et al. , 2001; MOLYNEUX,2004).

A evolução dos diferentes tipos de cinética de reação depende da natureza do antioxidante que está sendo testado. Três comportamentos cinéticos são observados: **rápido**, em que os compostos antioxidantes reagem imediatamente com os radicais livres DPPH, atingindo o estado estacionário em menos de um minuto; **intermediário**, em que este comportamento ocorre entre 5 e 30 minutos; e **lento**, em que o tempo necessário para os compostos alcançarem o estado estacionário se encontra entre 1 e 6 horas (BRANDWILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995). Neste último caso, a determinação da atividade antioxidante dos compostos no intervalo de 30 minutos de reação pode ser errônea e comprometer a veracidade dos resultados, pois a reação entre os radicais livres DPPH e estes compostos ainda pode estar progredindo após este período.

A comparação da atividade antioxidante foi feita frente aos padrões de ácido gálico (AG), cinética rápida; ácido ascórbico (AA), cinética intermediária e 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol (BHT), cinética lenta.

3.9.1 – Cromatografia em camada delgada comparativa

A CCDC dos extratos revelada com cloreto férrico 1% em metanol confirmou a presença de substâncias fenólicas derivadas da classe dos taninos pela apresentação de

coloração azul escura tal qual a substância utilizada como padrão de taninos, ácido gálico (WAGNER et al., 1984; TOLEDO, 2000). O ácido gálico apresentou uma mancha com $R_f=0,42$ e os extratos apresentaram uma mancha no ponto de aplicação e apenas os extratos polares apresentaram outra com $R_f=0,39$.

Quando reveladas com DPPH, as amostras dos extratos revelaram manchas amarelas, sobre um fundo violeta, da mesma forma que o padrão de ácido gálico apresentou. Todos os extratos apresentaram uma mancha amarela no ponto de aplicação e os extratos polares apresentaram outra mancha no $R_f 0,39$, referente à mancha de derivados de taninos revelada anteriormente com cloreto férrico 1% em metanol.

A determinação da capacidade de seqüestro de radicais livres indicou que os extratos polares têm potencial maior do que o extrato obtido com clorofórmio.

3.9.2 – Determinação da atividade seqüestrante *in vitro*

A cinética de reação foi estudada com base no monitoramento do decréscimo de absorbância dos radicais livres DPPH presentes no meio da reação em virtude da redução destes radicais pelos compostos antioxidantes dos extratos brutos calculando-se o percentual de DPPH remanescente (%DPPH_{REM}) e plotando-se os valores no gráfico (%DPPH_{REM}) em função do tempo.

$$\%DPPH_{REM} = \left[\left(\frac{Abs_{Amostra} - Abs_{Controle}}{Abs_{Controle}} \right) + 1 \right] \times 100$$

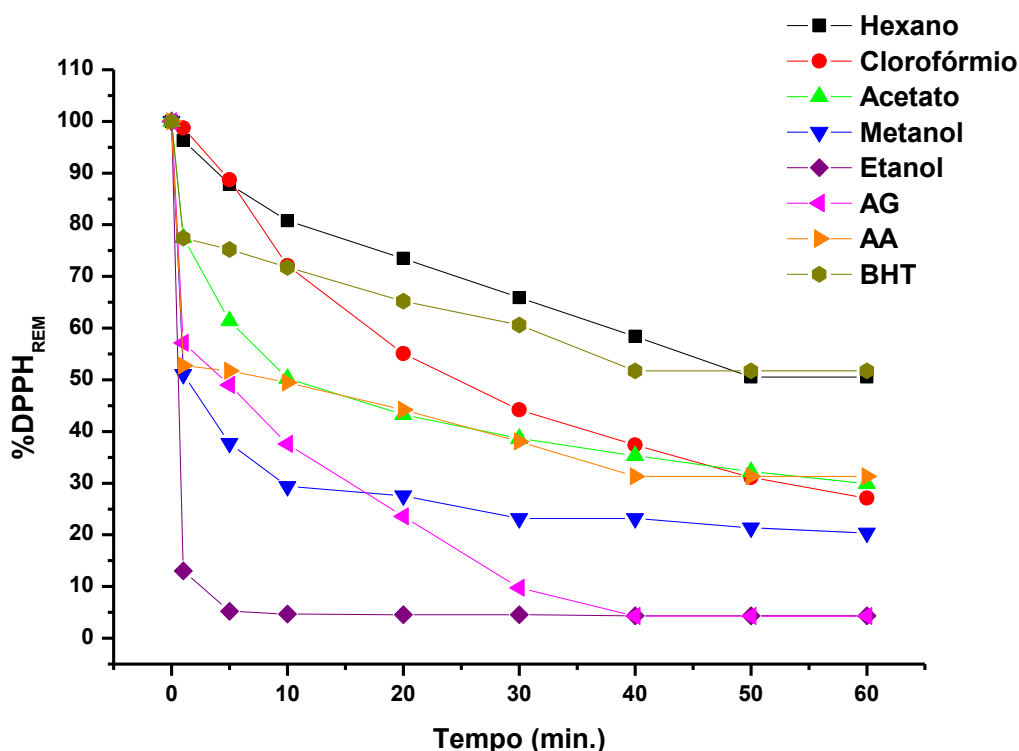
O extrato hexânico teve mesma cinética lenta similar ao BHT, enquanto os extratos de baixa polaridade (clorofórmio e acetato) e metanol, tiveram cinética intermediária similar ao Ácido ascórbico. O extrato etanólico por não ter sido particionado apresentou a cinética mais rápida, tendo se estabilizado em torno de 10 min., ou seja, tempo em que foi consumido por completo os compostos com atividade antioxidante presente no extrato pelo DPPH.

A atividade seqüestrante de DPPH ou percentual de atividade antioxidante dos extratos e padrões foram expressas segundo a equação:

$$\%AA = \frac{\{[Abs_{Controle} - (Abs_{Amostra} - Abs_{Branco})] \times 100\}}{Abs_{Controle}}$$

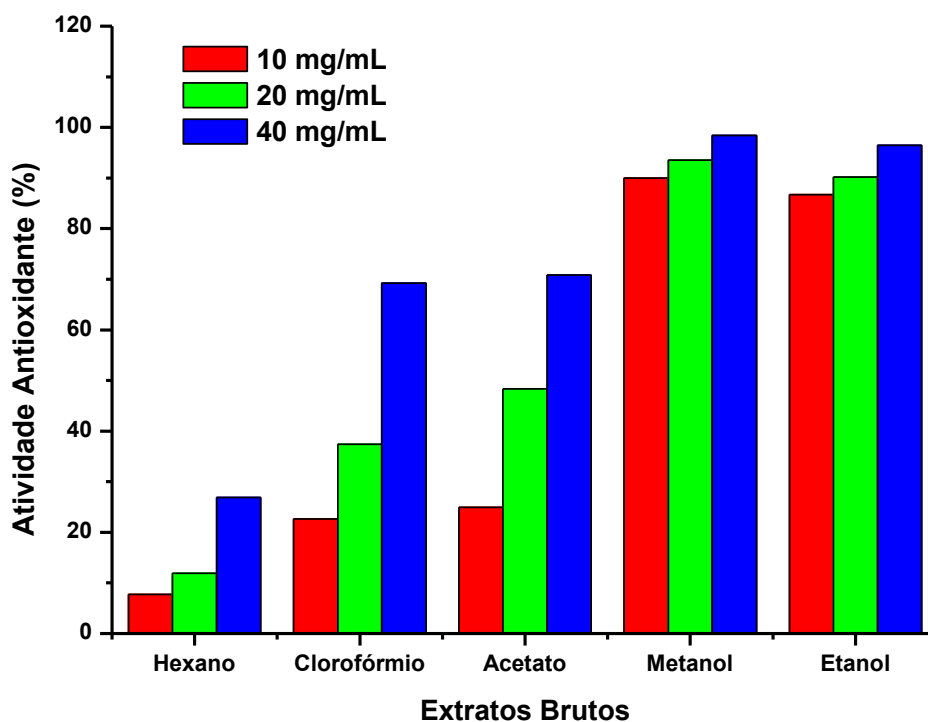
onde, $Abs_{controle}$ é a absorbância do controle (DPPH+Metanol), que não foi incubado com o extrato bruto e padrões, $Abs_{Amostra}$ é a absorbância das amostras incubadas com diferentes concentrações dos extratos e padrões e Abs_{Branco} que é a absorbância do branco (Metanol+Extrato Bruto).

Gráfico 11 – Percentual de DPPH remanescente nos extratos do fungo endofítico isolado, FBS, para a concentração de 40 mg mL^{-1} e dos padrões (AG, AA e BHT) no decorrer do tempo.



Os resultados da avaliação do percentual de atividade antioxidante (%AA) dos extratos, nas concentrações de 10, 20 e 40 mg mL^{-1} determinado pelo ensaio de DPPH, estão representados no gráfico12, mostrando que todos os extratos tiveram AA, contudo o extrato hexano apresentou menor atividade, como previsto por ser a fração apolar, os extratos clorofórmio e acetato apresentaram atividade equivalente, e os extratos mais polares (metanol e etanol) atingiram um máximo de 98,41% e 96,48% respectivamente para as concentrações de 40 mg/mL .

Gráfico 12 – Percentagem da atividade antioxidante (AA%) dos extratos brutos obtidos a partir do fungo endofítico FBS nas concentrações de 10, 20 e 40 mg mL⁻¹ com DPPH para o tempo de 30 min.

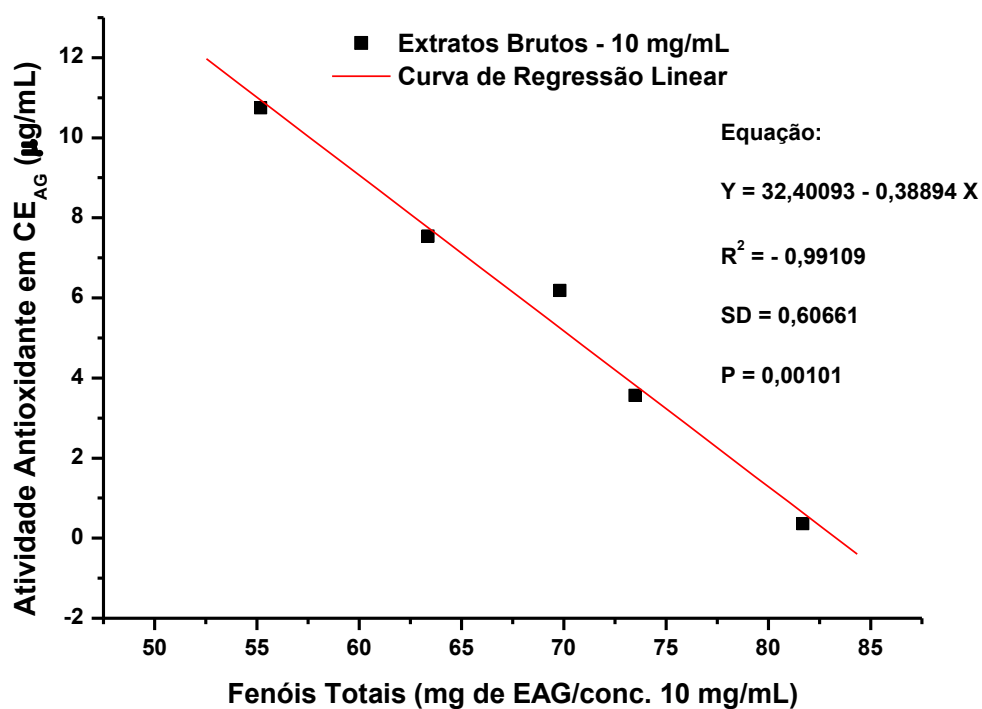


Observou-se correlação positiva entre a concentração de fenóis totais (FT) em equivalentes de ácido gálico (EAG) com a atividade antioxidante (AA) expressa pela concentração eficiente (CE) de ácido gálico (AG) ($\mu\text{g/mL}$), obtendo-se $R^2 = -0,99109$. Para isso, substituiu-se X na equação de %AA para o AG: $Y = 82,58699 - 2,54994X$, com $R^2 = -0,99354$, pelas massas de FT obtidas no método de Makkar et al. (1993), contidos na tabela 29, obtêm-se a concentração eficiente (CE) de AG ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Tabela 29 – Fenóis totais em EAG (mg) do extrato hexânico do endofítico FBS e atividade antioxidante expressa em concentração eficiente de AG (CE_{AG})

Extrato	FT em EAG (mg)*	CE _{AG} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)**
Hexano	0,356	81,68
Clorofórmio	3,565	73,49
Acetato	10,747	55,18
Metanol	7,541	63,36
Etanol	6,187	69,81

Gráfico 13 – Correlação entre fenóis totais expressos em equivalente de ácido gálico, EAG, e atividade antioxidante, expressa em concentração eficiente de ácido gálico, CE_{AG}, para o extrato hexânico do endofítico FBS, identificado como *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de *Mirabilis jalapa*.



CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos e apresentados neste trabalho permitem concluir que o fungo endofítico associada à planta *Mirabilis jalapa* encontra-se presente na semente, logo podem ser disperso em diferentes áreas pelo transporte de formigas ou aves.

As propriedades terapêuticas associadas a planta, também podem estar associados aos metabolitos secundários produzidos pelo endofítico isolado, uma vez que os extratos brutos de diferentes frações polares da matéria seca apresentaram atividade contra patógenos. O endofítico isolado a partir da *Mirabilis jalapa* foi identificado por técnicas de biologia molecular como sendo do gênero *Colletotrichum gloeosporioides*, fitopatôgeno que ocasiona a antracnose em frutos, porém a planta aqui estudada não apresentou em nenhuma fase a doença.

A cultura de tecidos vegetais de *Mirabilis jalapa* só permitiu obter a cultura de calos, onde seu extrato etanólico apresentou atividade antimicrobiana contra *Escheria coli*. Não sendo possível obter a cultura de raízes, para isolamento de metabólitos secundários, uma vez que estas, raízes, são tuberosas e não se desenvolveram.

Os estudos de cultura pareada permitiram avaliar que não houve inibição de *Phytophthora palmivora* e *Pseudomonas* sp. pelo endofítico, *Colletotrichum gloeosporioides*.

O estudo dos extratos, obtidos a partir de partição com solventes de diferentes polaridades permitiram avaliar a quantidade de fenóis totais, presente na fração acetato, e a avaliação do potencial de atividade antioxidante presente nos extratos metanólico e etanólico.

Tem-se expectativa que possa ser purificado e isolado compostos que comprovem a atividade antifúngica e antibacteriana, já que os extratos clorofórmicos e etanólicos apresentaram atividade contra *Pseudomonas* sp. e discreta atividade contra *P. palmivora*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, A. E. e ROOZEN, J. P. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. **Food Chemistry**, n.64, p.323–329, 1999.

ALASALVAR, C.; AL-FARSI, M.; QUANTICK, P. C.; SHAHIDI, F. WIKTOROWICZ, R. Effect of chill storage and modified atmosphere packaging (MAP) on antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, phenolics and sensory quality of ready-to-eat shredded orange and purple carrots **Food Chemistry** n.89 p. 69–76, 2005.

ALEXANDER, D. B; ZUMBERER, D. A. $^{15}\text{N}_2$ fixation by bacteria associated with maize roots at low partial O_2 pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, v.55, p. 1748-53, 1989.

ALI, M.; ANSARI, S. H. e PORCHEZHIAN, E. Constituents of the flowers of *Mirabilis jalapa*. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**. v.23, n.4, p.662-665, 2001.

ALONSO, A. M.; DOMINGUEZ, C.; GUILLEN, D. A.; BARROSO, C. G. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content **J. Agric. Food Chem.** n.50, p. 3112-3115, 2002.

ALONSO, A. M.; CASTRO, R.; RODRÍGUEZ, M. C.; GUILLÉN, D. A.; BARROSO, C. G. Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols **Food Research International** n.37, p. 715–721, 2004.

ÁLVAREZ, L.; WENDEL, J. F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v.29, p.417-434, 2003.

ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofarmacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, No 3, Maio de 2003.

AMIN, I.; NORAZAIDAH, Y.; HAINIDA, K. I. E. Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus* species **Food Chemistry**, n.94, p.47-52, 2006.

ANDRADE FILHO, A.; CAMPOLINA, D.; DIAS, M. B. **Toxicologia na Prática Clínica**. Ed. Folium: Belo Horizonte-MG, 2001.

AOAC - Association of official analytical chemists **Official Methods of analysis**. 16 ed. Washington AOAC. 2000 p., 1995

APPEL, H. M.; GOVENOR, H. L.; D'ASCENZO, M.; SISK, E. e SCHULTZ J. C. Limitations of Folin assays of foliar phenolics in ecological studies. **Journal of Chemical Ecology**. v.27, p.761-778, 2001.

APPLIED BIOSYSTEMS. 2000. Performing DNA sequencing reactions, Section 3, p.2-6. In: Automated DNA Sequencing – Chemistry Guide.

APPLIED BIOSYSTEMS. 2002. Precipitation method to remove unincorporated dye terminators from ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.0 Cycle Sequencing Reactions. Disponível em: <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041276.pdf> Acesso em 25 jun. 2008.

ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in Vegetable Foods Commonly Consumed in Brazil and Estimated Ingestion by the Brazilian Population **J. Agric. Food Chem.** n. 52, p. 1124-1131, 2004.

ARAÚJO, J. M. de; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, n.4, p.447-451, 2000.

ARAÚJO, M.A.V.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; HAGLER, A.N.; VAN ELSAS, J.D. Selection of rhizosphere-competent *Pseudomonas* strains as biocontrol agents in tropical soils. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.12, 589-593, 1996.

ARAÚJO, W. L. de; MACCHERONI Jr., W.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**. v.47, n.3; p.229-236, 2001.

ARAÚJO, W. L. de; MARCON, J.; MACCHERONI, W. Jr; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, J. W.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied Environmental Microbiology**. v.68, n.10, p.4906-4914, 2002.

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

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, p. 419 – 421, 2000.

ARROYO, A. R. C.; CHACON, B. L. and MAKI, K. A. Screening and selection of plantas by positive pharmacologic effect on jejunum muscular contractility. **Pharmaceutical Biology**, v.42, n.1, p.24-29, 2004.

ASSIS, T. C. de; MENEZES, M.; ANDRADE, D. E. G. T.; COELHO, R. S. B.; OLIVEIRA, S. M. A. Estudo comparativo de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* quanto ao efeito da nutrição de carboidratos no crescimento, esporulação e patogenicidade em frutos de três variedades de mangueira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, p. 208-212, 2001.

ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G. e KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chem.**, v.89, p.27-36, 2005.

AUW, J. M.; BLANCO, V.; O'KEEFE, S. F.; SIMS, C. A. Developmental changes of procyanidins in grapes of red *Vitis vinifera* varieties and their composition in respective wines. **Am. J. Enol. Vitic.** n.4, v. 51, p. 397-403, 2000.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L., eds. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, p.117-137, 1998.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI-Jr., W.; PEREIRA, J. O. e ARAÚJO, W. L. Endopytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology – EJB** [online] v.3, n.1, 15 April 2000. Endereço: <<http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/3/4>> ISSN: 0717-358. Acessado em: 13 de fevereiro de 2007.

BAAYEN, R. P.; BONANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G. C.; VANDERAA, H. A.; DEWEERDT, M.; VANBROUWERSHAVEN, I. R.; SCHUTTE, G. C.; MACCHERONI Jr., W.; GLIENKE DE BLANCO, C.; AZEVEDO, J. L. Nonpathogenic Isolates of the Citrus Black Spot Fungus, *Guignardia citricarpa*, Identified as a Cosmopolitan Endophyte of Woody Plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, v.92, p.464-477, 2002.

BACON, C. W. and WHITE, J. F. **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Deker, 2000.

BAILEY, J. A. e JEGER, J. M. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Oxford: British Society for Plant Pathology. p.388, 1992.

BAILEY, J. A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J. e NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, A. J.; JEGER, J. M. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Oxford: British Society for Plant Pathology, p.88-120, 1992.

BALBACH, A. **A Flora Nacional na Medicina Doméstica**. 23^a ed. Itaquaquecetuba, SP: EDEL, 1991. Vol. II.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R. e DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, v.29, n.5/6, p.911- 922, 1997.

BALLIO, A., BOTTALICO, A., BUONOCORE, V., CARILLI, A., DI VITTORIO, V., GRANITI, A. **Phytopathol. Mediterr.** v.8, p.187, 1969.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. e DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BARRETO, M. e SCALOPPI, E. A. G., Doenças do Tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) **Boletim técnico**, 1999. Disponível em <<http://www.agroalerta.com.br/Tomateiro.htm>> Acesso: 02 de fevereiro de 2007.

BAUBLIS, A., DECKER, E. A., e CLYDESDALE, F. M. Antioxidant effect of aqueous extracts from wheat based ready-to-eat breakfast cereals. **Food Chemistry**, n.68, p.1-6, 2000.

BAYER, R. J.; SOLTIS, D. E. and SOLTIS, P. S. Phylogenetic Inferences in *Antennaria* (Asteraceae: Gnaphalieae: Cassiniinae) Based on sequences from Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed spacers (ITS). **American Journal of Botany**. v.83, n.4, p.516-527, 1996.

BECKENBACH, K.; BLAXTER, M. L.; WEBSTER, J. M. Phylogeny of *Bursaphelenchus* species derived from analysis of ribosomal internal transcribed spacer DNA sequences. **Nematology**, Flórida, v.1, p.539-548, 1999.

BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects **Eur Food Res. Technol**- Review, n. 219, p. 561-571, 2004.

BECKING, J. H. Identification of the endophyte of *Dryas* and *Rubus* (Rosaceae). **Plant and Soil**, v.78, p. 105-28, 1984.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; LORENTE, J; ORTUNO, A.; DEL RIO, J. A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves **Food Chemistry** n.68 p.457-462, 2000.

BENT, E. e CHANWAY, C. P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**. v.44, p.980-988, 1998.

BENTO, J. M. S.; VILELA, F. E.; DELLA LUCIA, T. M. C.; LEAL, W. S.; NOVARETTI, W. R. T. *Migdolus: Biologia, Comportamento e Controle*. Salvador: Bento JMS, 58p, 1995.

BERGAMIN FILHO, A. & KIMATI, H. Doenças do mamoeiro - *Carica papaya* L. In: GALLI, F., coord. **Manual de fitopatologia**. São Paulo, Ceres, v.2, p.338-346, 1980.

BERNILLON, J.; BOUILLANT, M. L.; PITTET, J. L.; FAVRE-BONVINAND, J. and ARPIN, N. **Phytochemistry**, v.23, p.1083–1087, 1984.

BILLS, G. F. e POLISHOOK, J. D. Microfungi from *Carpinus caroliniana*. **Canadian Journal of Botany**. v.69, p.1477-1482, 1991.

BISBY'S DICTIONARY OF THE FUNGI. 9th ed. Wallingford: CAB International, 624 p, 2001.

BLANCO, C. G. ***Guignardia citricarpa* Kiely: análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro.** Piracicaba, 1999. 200 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo.

BLANCO, M. C. S. G.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M.; BOVI, O. A. Drying temperature effects in peppermint essential oil content and composition. **Acta Horticulturae**, n.569, p.95-98, 2002.

BLAXTER, M. L.; De LEY, P.; GAREY, J. R.; LIU, L. X.; SCHELDAMAN, P.; VIERSTRAETE, A.; VANFLETEREN, J.R.; MACKKEY, L.Y.; DORIS, M.; FRISSE, L.M.; VIDA, J.T.; THOMAS, W.K. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. **Nature**, London, v.392, p.71-75, 1998.

BOCCARDO, L.; CRUZ-Jr, D. O.; PAULA, V. F.; BARBOSA, L. C. A.; SOARES, J. M. Toxicidade de extratos de *Piper nigrum* e da piperina no diplópodo neotropical *Orthoporus fuscipes* (Porat, 1888). Resumo 1202 p.298 Myriapoda **XXV CBZ** fev / 2004.

BOLOGNESI, A.; POLITO, L.; LUBELLI, C.; BARBIERI, L.; PARENTE, A.; and STIRPE, F. Ribosome-inactivating and adenine polynucleotide glycosylase activity in *Mirabilis jalapa* L. Tissues. **The Journal of Biological Chemistry**. v.277, n.16, p.13709–13716, 2002.

BOLZANI, M. da S.; BOLZANI, V. da S. **Do Peru à Java a trajetória da quinina ao longo dos séculos.** Disponível em <<http://www.sbq.org.br/PN-net:causo4.htm>>, Acessado em 16 de abril de 2006.

BONDET, V. BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, n. 30, p. 609–615, 1997.

BOUSQUET, J. F.; VEGH, I.; POUTEAU-THOUVENOT, M. and BARBIER, M. **Ann. Phytopathol.**, v.3, 407–408, 1971.

BOWDITCH, B. M.; ALBRIGHT, D. G.; WILLIAMS, J. G. K.; BRAUN, M. J. Use of random amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. **Methods in Enzymology**, v.224-309, 1991.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, n.28, v.1, p.25-30. 1995.

BRUNETON, J. **Phytochemistry Medicinal Plants.** 2º ed. Londres: Intercept LTDA. 1999.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica. Ed. McGraw-Hill, Rio de Janeiro: 2006.

BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Biochemistry & Molecular Biology. **American Society of Plant Physiologist**, p.1250-1316, 2000.

BUCKLER, E.S.; IPOLLITO, A.; HOLTSFORD, T.P. The evolution of ribosomal DNA: Divergent paralogues and phylogenetic implications. **Genetics**, Austin, v.145, p.821-832, 1997.

BULTMAN, T. L. e CONARD, N. J. Effects of endophytic fungus, nutrient level and plant damage on performance of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**. v.27, p.631-635, 1998.

BUSSABAN, B.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; McKENZIE, E. H.; HYDE, K. D. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. **Canadian Journal of Microbiology**. v.47, n.10, p.943-948, 2001.

BUYER, J. S. Identification of bacteria from single colonies by fatty acid analysis. **Journal of Microbiological Methods**. v.48, p.259-265, 2002.

BUYER, J. S. Improved fast gas cromatography for FAME analysis of bacteria. **Journal of Microbiological Methods**. v.54, p.117-120, 2003.

CAI, Y. Z.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**. v.74, p.2157-2184, 2004.

CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity of betalains from plants in the *Amaranthaceae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, p. 2288-2294, 2003.

_____. Characterization and aplication of betalain pigments from plants of the *Amaranthaceae*. **Trends in Food Science & Techonology**. v.16, p.370-376, 2005.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer **Life Sciences** n.74 , p. 2157–2184, 2004.

CAMATTI-SARTORI, V.; SILVA-RIBEIRO, R. T. da; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; PAGNOCCA, F. C.; ECHEVERRIGARAY, S.; AZEVEDO, J. L. Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. **Journal of Basic Microbiology**. v.45, n.5, p.397-402, 2005.

CAMMEU, B. P. A.; DE BOLLE, M. F. C.; TERRAS, F. R. G.; PROOST, P.; VANDAMME, J.; REES, S. B. VANDER, EYDEN, F.; BROEKAET, W. F. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. **Journal of Biological Chemistry**. v.267, n.4, p. 2228-2233, 1992.

CAMPOS, A. M.; ESCOBAR, J.; LISSI, E. A. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant activity (TAR) of *Ilex paraguayensis* extracts and red wine. **J. Braz. Chem. Soc.** n.7, p.43-49, 1996.

CAMPOS, A. M.; LISSI, E. A. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. **Int J Chem Kinetics** n.29, p.219-224, 1997.

CARLILE, M. J., WATKINSON, S. C. e GOODAY, G.W. **The Fungi**. 2nd ed. London, Academic Press, 603p, 2001.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogens to mutualistic symbionts. **Ecology**. v.69, n.2-9, 1988.

_____. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N.J. e VAN DER HEAVEL, J. (eds). **Microbiology of the Phylloplane**. Cambridge University Press, London, UK. p.205-222, 1986.

CATUNDA, P. H. A.; VIEIRA, H. D.; DA SILVA, R. F.; POSSE, S. C. P. Influência do teor de água, da embalagem e das condições de armazenamento na qualidade de sementes de maracujá amarelo. **Rev. Bras.Sementes** v.25, n.1 Pelotas Julho/2003. ISSN 0101-3122.

CHALLIS, G. L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **National Academy of Science of the United States**, Washington, v. 100, p. 14555-14561, 2003.

CHANG, M. J.; COLLINS, J. L.; BAILEY, J. W.; COLEY, D. L. Cowpea tannins related to cultivar, maturity, dehulling and heating. **Journal of Food Science**, n. 59, p.1034-1036, 1994.

CHANWAY, C. P. Endophytes: they're not just fungi! **Canadian Journal of Botany**. v.74, p.321-322, 1996.

CHAVAN, U. D., SHAHIDI, F. e NACZK, M. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. **Food Chemistry** n.75 p.509-512, 2001.

CLAY, K. Fungal endophytes of plants: biological and chemical diversity. **Natural Toxins**. v.1; p.147-149, 1992.

CLAY, K.; MARKS, S. e CHEPTICK, G. P. Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. **Ecology**. v.74, p.1767-1777, 1993.

CLAYDON, N.; GROVE, J. F. and POPLE, M. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. **Phytochemistry**. v.24, p.937-943, 1985.

COLOMBO, P. M. Occurrence of endophytic bacteria in *Siphonous* algae. **Phycologia**, v.17, p.148-151, 1978.

COOK, D. E. L.; DUNCAN, J. M. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS-1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, p. 667-677, 1997.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, vol. V, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.

COTHER, E. J.; DOWLING, V. Bacteria associated with internal breakdown of onion bulbs and their role in disease expression. **Plant Pathology**, v.35, p.329-36, 1986.

DAHLMAN, D. L.; EICHENSEER, H. e SIEGEL, M. R. Chemical perspectives on endophyte Grass interactions and their applications to insect herbivory. In: BARBOSA, P.; KRISCHICK, V. A. and JONES, C. G., eds. **Microbial Mediation of Plant-herbivore Interaction**. Cambridge University Press, London, UK, p. 205-222, 1991.

DAVIS, M. J., GILLASPIE, A. G, HAVIS, R. W., LAWSON, R. H. Studing disease of sugar cane: Isolation of the casual bacterium. **Science**, v.22, p.1365-7, 1980.

DE ARAÚJO, J. M.; da SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of mayze (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 43: 447-451, 2000.

DE BOLLE, M.F.C.; OSBORN, R.W.; GODERIS, I.J.; NOE, L.; ACLAND, D.; HART, C.A.; TORREKENS, S.; VAN LEUVEN, F. and BROEKAERT, W.F. Antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* and *Amaranthus caudatus*: expression processing, localization and biological activity in transgenic tobacco. **Plant Mol. Biol.**, v.31, p.993-1008, 1996.

DE BOLLE, M.F.C.; TERRAS, F.R.G.; CAMMUE, B.P.A.; REES, S.B. and BROEKAERT, W.F. *Mirabilis jalapa* antibacterial peptides and *Raphanus Sativus* antifungal proteins: a aomparative atudy of their structure and biological activities. **Dev. Plant. Pathol.** v.2, p.433-436, 1993.

DE LEY, I.T.; BLAXTER, M.L. Systematic position and phylogeny. In: LEE, D.L. (ed). **The biology of nematodes**. London: Taylor & Francis, p. 1-30, 2002.

DECKER, E. A.; WARNER, K.; RICHARDS, M. P., SHAHIDI, F. Measuring Antioxidant Effectiveness. **Food Journal of Agricultural and Food Chemistry**. n.53, p.4303-4310, mar/ 2005.

DESHPANDE, S. S.; CHERYAN, M. Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. **Journal of Food Science**, n. 50, p.905-910, 1985.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products a Biosynthetic Approach**, John Willey & Sons, N. York, 1998.

DI FIORI, S. e DEL GALLO, M. Endophytic bacteria: their possible role in the host plants. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; DEZAMAROCZY, M., eds. **Azospirillum VI and related microorganisms**. Berlin: Springer-Verlag, p. 169-187, 1995.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2º ed., São Paulo: UNESP, 165p., 2002.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, London, v. 411, p. 843-847, 2001.

DÖBEREINER, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis*, v.13, p.1-13, 1992.

DÖBEREINER, J., PEDROSA, F.O. Nitrogen - Fixing Bacteria in Non leguminous. Crop Plants. Springer-Verlag, New York, 1987.

DORRIS, M.; DE LEY, P.; BLAXTER, M.L. Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 15, p. 188-193, 1999.

DOVER, G. Molecular drive: A cohesive mode of species evolution. **Nature**, London, v. 299, p. 111-117, 1982.

DOWNING, K. J.; LESLIE, G. and THOMSON, J. A. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac7 and *Serratia marcescens* chiA gene in sugarcane-associated bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** v.66, p.2804-2810, 2000.

DUARTE, L. M. L.; NORONHA, A. B.; ALEXANDRE, M. A. V.; VICENTE, M. e CHAGAS, C.M. Action of three plant-virus inhibitors on potato virus X. **Microbios**, v.84, n.338, p.13-20, 1995.

EDGINTON, L. V.; KNEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phitopathology**, v. 62, n. 7, p. 42-44, 1971.

EFFMERT, U.; GROSSE, J.; ROESE, U. S. R.; EHRIG, F.; KAEGI, R.; PIECHULLA, B. Volatile composition, emission pattern, and localization of floral scent emission in *Mirabilis jalapa* (Nyctaginaceae). **American Journal of Botany**. V.92, n.1, p.2-12, 2005.

EL-AGAMEY, A.; LOWE, G. M.; MCGARVEY, D. J.; MORTENSEN, A.; PHILLIP, D. M.; TRUSCOTT, T. M. e YOUNG, A. J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Arch. Biochem. Biophys.** V.430, n.1, p.37-48, 2004.

ELISABETSKY, E. **Etnofarmacologia**. Ciência e Cultura, vol.55, n.3, p.35-36, 2003.

ENGEL, S.; JENSEN, P. R.; FENICAL, W. Chemical ecology of marine microbial defense. **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, Netherlands, v. 28, n. 10, p. 1971-1985, 2002.

FAVRE-BONVIN, J.; ARPIN, N. and BREVARD, C. **Can. J. Chem.** V.54, p.1105, 1976.

FELSENSTEIN, J. Cases in which parsimony and compatibility methods will be positively misleading. **Systematics Zoology**, Göteborg, v. 27 p. 401-410, 1978.

FELSENSTEIN, J.; CHURCHILL, G. A. A hidden Markov model approach to variation among sites in rate of evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Orlando, v. 13, p. 93-104, 1996.

FERREIRA, D. F. **Análise multivariada**. 1996. 368 f. Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FIGUEIREDO, J. E. F.; PAOLI, H.C.; COELHO, V. T. S.; PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F. T.; BRESSAN, W.; GUIMARÃES, C. T. e GOMES, E. A. Caracterização molecular de microrganismos do ecossistema agrícola do Cerrado: III *Acremonium strictum*. **Comunicado Técnico 69**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sete Lagoas, 10p, 2003.

FISHER, P. J., PETRINI, O., PETRINI, L. E., e SUTTON, B. C. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca and Switzerland. **New Phytol.** v.127; p.133-137, 1994.

FISHER, P. J.; ANSON, A. E.; PETRINI, O. Antibiotic activity of some endophytic fungi from ericaceous plants. **Bot. Helv.**, 94: 249-253, 1984.

_____, O. Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex galli*. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, 86: 153-156, 1986.

FISHER, P. J.; PETRINI, O. e LAPPIN SCOTT, H. M. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, v.122, p.299-305, 1992.

FLEMING, C. C.; TURNER, S. J.; POWERS, T. O.; SZALANSKI, A. L. Diagnostics of cyst nematodes: use of the polymerase chain reaction to determine species and estimate population levels. **Aspects of Applied Biology**, Oxford, v. 52, p. 375-382, 1998.

FOLIN, O. e CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. **Journal Biol. Chem.** v.73, p.424-427, 1927.

FOSTER, J. L. M.; FOGLEMAN, J. C. Identification and ecology of bacterial communities associated with necroses of three cactus species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.1-6, 1993.

FREEMAN, S., KATAN, T. e SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**. v.82, p.596-605, 1998.

FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, R.J. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. **Science**, v.260, p.75-78, 1993.

FRIGHETTO, R.T.S.; MELO, I.S. Produção de antibióticos por microrganismos. In: MELO, I.S. & SANHUEZA, R.M.V. (coord.). **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos**. Manual Técnico, EMBRAPA/CNPMA, p. 40-46, 1995.

FUNGARO, M. H. P. PCR na Micologia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.14, p.12-16, 2000.

GAMBORG, O. L.; MURASHIGE, T.; THORPE, T. A. e VASIL, I. K. Plant tissue culture media. **In Vitro**. v.12, p.473-478, 1976.

GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell research**, n.50, p.151-158, 1968.

GANDIA-HERRERO, F.; CARMONA, F. G.; ESCRIBANO, J. Fluorescent pigments: new perspectives in betalain research and applications. **Food Research International**. v.38, p.879-884, 2005.

GARCÍA-PAJÓN, C. M. e COLLADO, I. G. Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species. **Natural Product Report**. v.20, p.426-431, 2003

GARDES, M. and BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Mol. Ecol**. v.2, p.113-118, 1993.

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. Curitiba, 1995. 115 f. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas - Genética) – Universidade Federal do Paraná.

GOES, A. **Queda prematura de *Citrus*: Caracterização do agente causal, *Colletotrichum gloeosporioides* PENZ [SENSU ARX, 1957 e controle da doença]**. 1995. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP, 1995.

GOODMAN, R. N.; KIRALY, Z. and WOOD, R. K. S. **The Biochemistry and Physiology of plant Disease**. Univ. of Missouri, Columbia, 1986.

GUNNEL, P. & GUBLER, W.D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. **Mycologia** v.84; p.157-165, 1992.

HABUKA, N.; MIYANO, M.; KATAOKA, J; TSUGE, H.; AGO, H. and NOM, M. Substantial Increase of the Inhibitory Activity of Mirabilis Antiviral Protein by an Elimination of the Disulfide Bond with Genetic Engineering. **The Journal of**

Biological Chemistry, v.266, n.35, p.23558-23560, 1991.

HALL, R. D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist**, Oxford, v.169, p.453-468, 2006.

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

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tanins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v.59, p.205-215, 1996.

HAWKSWORTH, D. C. e ROSSMAN, A. Y. Where are the undescribed fungi? **Phytopathology**, v.87, p.888-891, 1987.

HEDGES, S. B.; POLING, L. L. A molecular phylogeny of reptiles. **Science**, London, v.283, p.998-1001, 1999.

HELANDER M. L.; RATIO-LEHTIMAKI. Effects of watering and simulated acid rain on quality of phyllosphere fungi of Birch leaves. **Microbial Ecology**, v. 19, p. 119-125, 1990.

HERRERA, G.; SNYMAN, S.J.; THOMSON, J.A. Construction of a bioinsecticidal strain of *Pseudomonas fluorescens* active against the sugarcane borer, *Eldana saccharina*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.682-690, 1994.

HERRERO, F. G.; CARMONA, F. G.; ESCRIBANO, J. Fluorescent pigments: new perspectives in betalain research and applications. **Food Research International**, v.38, p.879-884, 2005.

HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA : molecular evolution and phylogenetic inference. **The Quarterly Review of Biology**, New York, v. 66, p. 441-453, 1991.

HOPKINS, D. L. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.271-279, 1989.

HOYER, U.; BURGERMEISTER, W.; BRAASCH, H. Identification of *Bursaphelenchus* species (Nematoda, Aphelenchoididae) on the basis of amplified ribosomal DNA (ITS-RFLP). **Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes**, Stuttgart, v. 50, p. 273-277, 1998.

HÜBSCHEN, J.; KLING, L.; IPACH, U.; ZINKERNAGEL, V.; BOSSELUT, N.; ESMENJAUD, D.; BROWN, D.J.F.; NEILSON, R. Validation of the specificity and sensitivity of species-specific primers that provide a reliable molecular diagnostic for *Xiphinema diversicaudatum*, *X. index* and *X. vuittenezi*. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 110, p. 779-788, 2004a.

HÜBSCHEN, J.; KLING, L.; IPACH, U.; ZINKERNAGEL, V.; BROWN, D.J.F.; NEILSON, R. Development and validation of species-specific primers that provide a molecular diagnostic for virusvector longidorid nematodes and related species in German viticulture. **European Journal of Plant Pathology**, Netherlands, v. 110, p. 883-891, 2004b.

INDERJIT, D. K. M. M. e EINHELLIG, F. A. Eds. Allelopathy: organisms, processes and application. **ACS Symposium series American Chemical Society**, Washington, DC. 1995.

IWAHORI, H.; TSUDA, K.; KANZAKI, N.; IZUI, K.; FUTAI, K. PCR-RFLP and sequencing analysis of ribosomal DNA of *Bursaphelenchus* nematodes related to pine wilt disease. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge, v. 21, p. 655-666, 1998.

JACOBS, M. J.; BUGBEE, W. M. and GABRIELSON, D. A. Enumeration, location and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian Journal of Botany**. v.63, P.1262-1265, 1985.

JONES, J. T.; PHILLIPS, M. S.; ARMSTRONG, M. R. Molecular approaches in plant Nematology. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge, v.20, p.1-14, 1997.

KAMINSKI, G. W. The routine use of modified Borelli's Lactrimel agar (MBLA). **Mycopathology**, v.91, p.57-59, 1985.

KANNER, K.; HAREL, S.; GRANIT, R. Betalains – a new classes of dietary cationized antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.49, p.5178-5185, 2001.

KANZAKI, N.; FUTAI, K. A PCR primer set for determination of phylogenetic relationships of *Bursaphelenchus* species within the *xylophilus* group. **Nematology**, Leiden, v.4, p.35-41, 2002.

KAUSERUD H, HÖGBERG N, KNUDSEN H, ELBORNE SA, SCHUMACHER T. Molecular phylogenetics suggest a North American link between the anthropogenic dry rot fungus *Serpula lacrymans* and its wild relative *S. himantioides*. **Molecular Ecology**, v.13, p.3137–3146, 2004.

KELMAN, A. ed. **Sourcebook of Laboratory Exercises in Plant Pathology**. San Francisco and London, W.H. Freeman & Co. 1967.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J. A. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. 9th ed. Wallingford: CAB International, 624 p. 2001.

KLEIN, W.; WEBER, M. H. V.; MARAHIEL, M. A. Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. **Journal of Bacteriology**. v.181, n.17, p.5341-5349, 1999.

KNOETZE, R.; BURGER, J.T.; MEYER, A.J. Discrimination of some *Xiphinema* species from South Africa by rDNA-RFLP analysis. **African Plant Protection**, Arcádia, v. 6, p. 25-30, 2000.

KOGA, H.; HIRAI, Y.; KANDA, K.; TSUKIBOSHI, T. and UEMATSU, T. Successive transmission of resistance to bluegrass webworm to perennial ryegrass and tall fescue plants by artificial inoculation with *Acremonium* endophytes. **Japan Agricultural Research Quarterly**. v.3, p.109-115, 1997.

KRANNER, K.; HAREL, S.; GRANIT, R. Betalains – anew classes of dietary cationized antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.49, p.5178-5185, 2001.

KÜSTER, E., WILLIAMS, S.T. Selection of media for isolation of streptomycets. **Nature**. v.202, p.928-29, 1964.

KUSAMBA, C.; BYAMANA, K. and MBUYI, W. M. Antibacterial activity of *Mirabilis jalapa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.35, n.IV7, p.199, 1991.

LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; TROUSLOT, P.; CHARRIER, A. Phylogenetic relationships of coffee-tree species (*Coffea* L.) as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.94, p.947-955, 1997.

LEE, J. C.; LOBKOVSKY, E.; PLIAM, N. B.; STROBEL, G.; CLARDY, J. Subglutinin-A and subglutinin-B-immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. **Journal of Organic Chemistry**, v.60, p.7076-7077, 1995.

LEELAMANIT, W.; LERTKUNAKORN, P.; PRAPAITRKUL, S.; WATTANACHAIYINGCHAROEN, R.; LUANRAT, O.; RUANGWISES, N. and SUPPAKPATANA, P. Biochemical properties of proteins isolated from *Mirabilis jalapa*. **Warasan Phesatchasat**. v.29, n.1-2, p.17-22, 2002.

LEITE, B. e NICHOLSON, R. L. Mycosporine-alanine: a self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Experimental mycology**. v.16, p.76–86, 1992.

LEMANCEAU, P. and ALABOUVETTE, C. Suppression of *Fusarium* with by fluorescent *Pseudomonads* mechanisms and applications. **Biocontrol Science and Technology**. v.3, p.219-234, 1993.

LEVINSON, W. e JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunologia**. Artmed: Porto Alegre, 2005.

LIMA FILHO, R. M.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Caracterização Enzimática e Patogenicidade Cruzada de *Colletotrichum* spp. Associados a Doenças de Pós-Colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.6, p.620-625, 2003.

LITTLEWOOD, D.T.J.; ROHDE, K.; BRAY, R.A.; HERNIOU, E.A. Phylogeny of the Platyhelminthes and the evolution of parasitism. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 68, p. 257-287, 1999.

LIU, Y.; LUO, J.; XU, C.; REN, F.; PENG, C.; WU, G. and ZHAO, J. Purification, Characterization, and Molecular Cloning of the Gene of a Seed-Specific Antimicrobial Protein from Pokeweed. **Plant Physiology**. v.122, p.1015–1024, 2000.

LLESUY, S, EVELSON, P, CAMPOS, AM, LISSI, EA. Methodologies for evaluation of total antioxidant activities in complex mixtures. **A critical review. Biol Res.**, v.34, p.51-73, 2001.

LOGUERCIO-LEITE, C.L. Taxonomia dos fungos. In: Elisa Esposito; João Lúcio de Azevedo (Org.). **Fungos: uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. Caxias do Sul, RS, p.47-90, 2004.

LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v.9, p.291-337, 2001.

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

M'PIGA, P.; BÉLANGER, R. R.; PAULITZ, T. C. and BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. radcis-lycopersi in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.50, p. 301-320, 1997.

MAGALHÃES, A. A. da S. **Isolamento e variabilidade genética detectada por RAPD do fungo endofítico *Guignardia* sp. de *Himatanthus sucuuba* SPRUCE (WOOD) Apocynaceae**. São Carlos, 2001. 130 f. Tese (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos.

MAKKAR, H. P. S., BECKER, K. Do tannins in leaves of tree and shrubs from African and Himalayan regions differ in level and activity? **Agroforestry Syst** v.40, p.59-68, 1998.

MAKKAR, H. P. S; BLUMMEL, M.; BECKER, K. Gravimetric determination of tannins and their correlation with chemical and protein precipitation methods. **Journal Science of Food Agriculture**, v.61, p.161-165, 1993.

MALLOCH, G.; FENTON, B.; GOODRICH, M.A. Phylogeny of raspberry beetles and other Byturidae (Coleoptera). **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 10, p. 281-291, 2001.

MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Engenharia do metabolismo secundário. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 23, p. 24-28, 1999.

MARSHALL, J. A.; KNAPP, S.; DAVEY, M. R.; POWER, J. B.; COCKING, E. C.; BENNET, M. D.; COX, A. V. Molecular systematics of *Solanum* section *Lycopersicum* (*Lycopersicon*) using the nuclear ITS rDNA region. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 103, p. 1216-1222, 2001.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Ceará: Ed. UFC, p.45-55, 1999.

McINROY, J. A.; KLOPPER, J. W. Analysis of population densities and identification of endophytic bacteria of maize and cotton in the field. **Bulletin Srop.**, v.14, p.328-31, 1991.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 23-27, 2002.

MEYER, W. L., SCHWEIZER, W. B., BECK, A. K., SCHEIFELE, W., SEEBACH, D., SCHREIBER, S. L., KELLY, S. E. **Helv. Chim. Acta.** v.70, p.281, 1987.

MEYER, W. L.; LAX, A. R.; TEMPLETON, G. E. AND BRANNON, M. J. **Tetrahedron Lett.**, v.24, p.5059–5062, 1983.

MISAGHI, I. J. e DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free Cotton plants. **Phytopathology**, v.80, p.808-11, 1990.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NACZK, M. e SHAHIDI, F.; Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A.** v.1054, n.1-2, p.95-111, 2004.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2008. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Bethesda, National Library of Medicine. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em 17 ago. 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as a source of new drugs over the period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NGUYEN, K.B.; MARUNIAK, J.; ADAMS, B.J. Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of *Steinernema*. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 33, p. 73-82, 2001.

NOZAKI, M.H., CAMARGO, M. & BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em meios de cultura e diferentes condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira** v.29, p.429-432, 2004.

OHRA, J.; MORITA, K.; TSUJINO, Y.; TAZAKI, H.; FUJIMORI, T.; GOERING, M.; EVANS, S. and ZORNER, P. **Biosci., Biotech., Biochem.**, v.59, p.113–114, 1995.

OKANE, I.; NAKAGIRI, A.; ITO, T. Endophytic fungi in leaves of ericaceous plants. **Canadian Journal of Botany.** v.76, p.657-663, 1998.

OLIVEIRA, A. B. (2003) **Entendendo a Biotecnologia**. Web-site adaptado do CD-ROM "**Entendendo a Biotecnologia**", pela KL3 Publicações em setembro/2003. Acessado em 12 de Janeiro de 2008. Em <<http://www.biotecnologia.com.br/biocd/main.asp>>

OLIVEIRA, C. M. G.; FENTON, B.; MALLOCH, G.; BROWN, D.J.F.; NEILSON, R.. Development of species-specific primers for the ectoparasitic nematode species *Xiphinema brevicolle*, *X. diffusum*, *X. elongatum*, *X. ifacolum* and *X. longicaudatum* (Nematoda: Longidoridae) based on ribosomal DNA sequences. **Annals of Applied Biology**, Lawrence, v. 146, p. 281-288, 2005.

OLIVEIRA, M. C.; MENCK, C.F. O mundo de RNA e a origem da complexidade da vida.. In: Sérgio Russo Matioli. (Org.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, Editora Ltda-ME, p. 15-26, 2001.

OLIVEIRA, R. C.; NUNES, F. M. F.; CAMPOS, A. P. S.; VASCONCELOS, S. M.; ROUBIK, D.; GOULART, L. R.; KERR, W. E. Genetic divergence in *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, p.181-186, 2004.

OMONI, A. O. e ALUKO, R. E. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. **Trends Food Sci. Technol.** v.16, p.344-350, 2005.

PEDREÑO, M. A. e ESCRIBANO, J. Studying the oxidation and antiradical activity of betalain from beetroot. **Journal of Biological Education**. v.35, p. 49-51, 2000.

PEER, W.A.; BROWN, D.E.; TAGUE, B.W.; MUDAY, G.K.; TAIZ, L.; MURPHY, A.S. Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** v.126, p.536-548, 2001.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L. and ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. Ano V, n.29, p.62-76, 2002.

PEREIRA, J. O. **Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guinamensis* e *Musa cavandish***. Piracicaba, 1993. 105p. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

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

PERES, N. A. R.; KURAMAE, E. E.; DIAS, M. S. C.; SOUZA, N. L. de. Identification and Characterization of *Colletotrichum* spp. Affecting Fruit after Harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, p. 128-134, 2002.

PERES, N. A., TIMMER, L. W., ADASKAVEG, J. E. and CORRELL, J. C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**. v.89, p.784-796, 2005.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v.39, p.791-800, 2006.

_____. Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 5036-5040, 2005.

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

PHOTITA, W.; TAYLOR, P. W. J., FOTO, R.; RYCE, K. D.; LUMYONG, S. Morfological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. **Fungal Diversity**. v.18, p.117-1333, 2005.

PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; MÜHLEN, G. S. Aplicações da técnica de eletroforese de campo pulsado para separação de cromossomos de microrganismos. In: **Ecologia Microbiana**. MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (eds.). Jaguariúna: Embrapa - CNPMA, 1998, p. 229-251.

POWERS, T. Nematode molecular diagnostics: from bands to barcodes. **Annual Review of Phytopathology**, Califórnia, v. 42, p. 367-383, 2004.

POWERS, T.; TODD, T. C.; BURNELL, A.M.; MURRAY, P.C.B.; FLEMING, C.C.; SZALANSKI, A.L.; ADAMS, B.A.; HARRIS, T.S. The rDNA internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 29, p. 441-450, 1997.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. Screening antifungal activitis of selected medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 89-96, 2001.

RAY, B.; GHOSAL, P. K.; TRAKUR, S. and MAJUMDAR, S. Structural studies of a neutral polysaccharide from the root bulbo of *Mirabilis jalapa*. **Carbohydrate Research**. v.176, p.324-328, 1987.

RAZAFIMANDIMBISON, S. G.; KELLOGG, E. A.; BREMER, B. Recent origin and phylogenetic utility of divergent ITS putative pseudogenes: A case study from Naucleaeae (Rubiaceae). **Systematic Biology**, Washington, v. 53, n. 2, p. 177-192, 2004.

REDLIN, S. C. e CARRIS, L. M. **Endophytic fungi in grasses and Woody plants**. St. Paul: The American Phytopathological Society Press. 223 p., 1996.

RIKER, A. J. e RIKER, R.S. **Introduction do Research on Plant Diseases**. St. Louis, Mo., John S. Swift Co. 1936.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E.; **Farmacognosia e Farmacobioteecnologia**, Tradução Benedetti, I. C.; Editorial Premier: São Paulo, cap. 9, 1997.

RODRIGUES, K. F. e PETRINI, O. Biodiversity of endophytic fungi in tropical regions. In: HYDE, K. D. **Diversity of Tropical Microfungi**. Hong Kong, University of Hong Kong Press, p.57-69, 1997.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R. dos; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**. v.1, p.24-33, 2005.

SABO, A.; REIS, L.G.L.; KRALL, E.; MUNDO-OCAMPO, M.; FERRIS, V.R. Phylogenetic relationships of a distinct species of *Globodera* from Portugal and two *Punctodera* species. **Journal of Nematology**, Riverside, v. 34, p. 263-266, 2002.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M. and SULLIVAN, T. J. Fungal endophytic: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v.29, p.319-343, 1998.

SANTAMARIA, J; BAYMAN, P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). **Microbial Ecology**. v.50, n.1, p.1-8, 2005

SANTOS FILHO, H. P.; LARANJEIRA, F. F.; SANTOS, C. C. F. dos; BARBOSA, C. J. Doenças do maracujazeiro. In: LIMA, A. A. org. **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p.241-280, 2004.

SANTOS FILHO, H. P.; SANTOS, C. C. F. dos. Doenças causadas por fungos. In: SANTOS FILHO, H. P.; JUNQUEIRA, N. T. V. (Org.). **Maracujá: fitossanidade**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca Fruticultura; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 12-25, 2003.

SCALBERT, A. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. Hemingway R. W. Laks P. E. eds. **Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance**. Plenum Press New York, NY, p.259-280, 1992.

SCHUTZ, B. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. British Mycological Society, **International Symposium Proceedings**, Bioactive Fungal Metabolites - Impact and Exploitation. University of Wales, April of 2001.

SELINGER, L. B.; KHACHATOURIANS, G. G.; BYERS, J. R.; HYNES, M. F. Expression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gene by *Bacillus pumilis*. **Canadian Journal Microbiology**, v.44, 259-269, 1998.

SERRA, I. M. R. de S.; SILVA, G. S. da. Caracterização Morfofisiológica de Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* Agentes de Antracnose em Frutíferas no Maranhão. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 4, p. 475-480. 2004.

SHISHIDO, M.; BREUIL, C. and CHANWAY, C. P. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**. v.29, p.191-196, 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. GOSMANN, G. MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, p.443-457 e 651-665, 2002.

SINCLAIR, J. B. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. **Plant Disease**. St. Paul, v.75, n.3, p. 20-224, 1991.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 28, n. 4, p. 49-55, 1977.

SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 410, p. 273-286, 2005.

SMITH, S. B.; GURRIERI, S.; BUSTAMANTE, C. Fluorescence microscopy and computer simulations of DNA molecules in conventional and pulsed-field gel electrophoresis. In: **Electrophoresis of large DNA molecules: theory and applications**. LAI, E; Birren, B.W. (eds.). Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p. 55-79, 1990.

SNAIDR, J.; FUCHS, B.; WALLNER, G.; WAGNER, M.; SCHLEIFER, K.H.; AMANN, R. Phylogeny and *in situ* identification of a morphologically conspicuous bacterium, *Candidatus* Magnospira bakii, present at a very low frequency in activated sludge. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 125-135, 1999.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 5, n.1, p.71-81, 2002.

SOONG, Y-Y; BARLOW, P. J. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. **Food Chemistry**, n.88, p.411-417, 2004.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAUJO, J. M. Production and characterization of a thermostable -amylase from *Nocardiopsis* sp. endophyte of yam bean. **Bioresource Technology**. v.76, p.137-141, 2001.

_____. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. **Bioresource Technology**. v.83, p. 105-109, 2002.

STIERLE, A.; STROBEL, G. A. and STIERLE, D. Taxol and taxne production by *Taxomyces andreanae*. **Science**. v.260, p.214-216, 1993.

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

STRACK, D.; VOGT, T. and SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**. v.62, p.247-269, 2003.

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

_____. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**. v.22, n.4, p.315-333, 2002.

STROBEL, G. A.; LONG, D. M.; SMIDMANSKY, E. D.; ARCHER, A. J.; In vivo addition of telomeric repeats to foreign DNA generates chromosomal DNAs in the taxol-producing fungus *Pestalotiopsis microspora*, **Fungal Genet. & Biol.** v.24; p.335-344, 1998.

STROBEL, G.; YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R.S.; HESS, W.M. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology**, v.142; p.435-440, 1996.

SUBBOTIN, S.A.; VIERSTRAETE, A.; DE LEY, P.; ROWE, J.; WAEYENBERGE, L.; MOENS, M.; VANFLETEREN, J.R. Phylogenetic relationships within the cyst-forming nematodes (Nematoda, Heteroderidae) based on analysis of sequences from the ITS regions of ribosomal DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 21, p. 1-16, 2001.

SUBBOTIN, S.A.; WAEYENBERGE, L.; MALOKANOVA, I.A.; MOENS, M. Identification of *Heterodera avenae* group species by morphometrics and rDNA-RFLPs. **Nematology**, Leiden, v. 1, p. 195-207, 1999.

SUTO, M.; TAKEBAYASHI, M.; SAITO, K.; TANAKA, M.; YOKOTA, A.; TOMITA, F. Endophytes as producers of xylanase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.93, n.1, p.88-90, 2002.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A. & JEGER, M. J., eds. **Colletotrichum: Biology, Pathology, and Control**. Wallingford: CAB International. p.1-26, 1992.

SWAIN, T. e W. E. HILLS. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. **J. Agric. Food Chem.** v.10, p.63-68, 1959.

TAIZ, L. e ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Trad. Eliane Romanato Santarém et al. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAVARES, G. M. **Controle químico e hidrotérmico da antracnose em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) na pós-colheita**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2004. 55p.

TAYLOR, L. **The Healing Power of Rainforest Herbs: a guide to understanding and using herbal medicinals**. Square One Publishers, 2005. Endereço: <<http://www.rain-tree.com/clavillia.htm>> Acessado em: 25 março de 2007.

TAYLOR, T. N. and TAYLOR, E. L. The rhynie chert ecosystem: a model for understanding fungal interactions. In: BACON, C. W. and EHITE, J. F., Eds. **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Decker, 2000.

TOLEDO, C. E. M. **Estudos anatômico, químico e biológico de cascas e extratos obtidos de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae)** [Dissertação] Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP; 2000.

TOMASINO, S. F.; LEISTER, R. T.; DIMOCK, M. B.; BEACH, R. M. and KELLY, J. L. Field performance of *Clavibacter xyli* subsp *cynodontis* expressing the insecticidal protein gene cry1A(C) of *Bacillus thuringiensis* against european corn borer in fiels corn. **Biological Control**. v.5, p.442-448, 1995.

TSURUSHIMA, T.; UENO, T.; FUKAMI, H.; IRIE, H. AND INOUE, M. Germination self-inhibitors from Colletotrichum gloeosporioides f. sp. jussiaea **Molecular plant-microbe interactions**. v.8, p.652-657, 1995.

TUITE, J. **Plant Pathological Methods. Fungi and Bacteria**. Minn., Burgess Publish. Co. 1969.

UEHARA, T.; KUSHIDA, A.; MOMOTA, Y. Rapid and sensitive identification of *Pratylenchus* spp. using reverse dot blot hybridization. **Nematology**, Leiden, v.1, n.5, p.549-555, 1999.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C.J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.266, p.37-56, 2004.

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

VILGALYS, R., AND D. GONZALEZ. Organization of ribosomal DNA in the basidiomycete *Thanatephorus praticola*. **Curr. Genet**. v.18; p.277-280, 1990.

VILGALYS, R., J. S. HOPPLE, JR., AND D. S. HIBBETT. Phylogenetic implications of generic concepts in fungal taxonomy: The impact of molecular systematic studies. **Mycologica Helvetica**. v.6; p.73-91, 1994.

VIRET, O.; PETRINI, O. Colonization of beech leaves (*Fagus sylvatica*) by the endophyte *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomonina errabunda*). **Mycological Research**. v.98, p.423-432, 1994.

VITTI, M. C. D.; KLUGE, R. A.; GALLO, C. R.; MORETTI, C. L. e JACOMINO, A. P. Efeito do momento de sanitização sobre atributos físico-químicos e microbiológicos de beterrabas minimamente processadas. **Horticultura Brasileira**. v.22, n.4, p.718-721, out-dez 2004.

VIVANCO, J. M.; QUERCI, M. e FLORES, H. E. Inhibitory effect of the *Mirabilis jalapa* against potato virus infection. **Plant Physiology**. v.114, n.3, p.1192-1192, 1997.

VIVANCO, J. M.; QUERCI, M.; SALAZAR, L. F. Antiviral and antiviroid activity of MAP-containing extracts from *Mirabilis jalapa* roots. **Plant Disease**. v.83, n.12, p.1116-1121, 1999.

VIVANCO, J. M.; SAVARY, B. J. and FLORES, H. E. Characterization of Two Novel Type I Ribosome-Inactivating Proteins from the Storage Roots of the Andean Crop *Mirabilis expansa*. **Plant Physiology**. v.119, p.1447-1456, April 1999.

VÖLKSCH, B.; ULLRICH, M. and FRITSCH, W. Identification and Population Dynamics of Bacteria in Leaf Spots of Soybean. *Microb. Ecol.* v.24, p.305-311, 1992.

VRAIN, T.C.; WAKARCHUK, D.A.; LÈVESQUE, A.C.; HAMILTON, R.I. Intraspecific rDNA restriction fragment polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. **Fundamental and Applied Nematology**, Montrouge, v. 15, p. 563-573, 1992.

WAEYENBERGE, L.; RYSS, A.; MOENS, M.; PINOCHET, J.; VRAIN, T.C. Molecular characterisation of 18 *Pratylenchus* species using rDNA restriction fragment length polymorphism. **Nematology**, Leiden, v. 2, p. 135-142, 2000.

WAGNER, B. L. e LEWIS, L. C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3468-3473, 2000.

WAGNER, H., BLADT, S., ZGAINSKI, E.M. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer-Verlag; 1984.

WANG, X.; BOSSELUT, N.; CASTAGNONE, C.; VOISIN, R.; ABAD, P. ; ESMENJAUD, D. Multiplex polymerase chain reaction identification of single individuals of the Longidorid nematodes *Xiphinema index*, *X. diversicaudatum*, *X. vuittenezi*, and *X. italiae* using specific primers from ribosomal genes. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, p. 160-166, 2003.

WANG, Y.; CHEN, J.; YANG, Y.; ZHENG, Y.; TANG, S. and LUO, S. New rotenoids from roots of *Mirabilis jalapa*. **Helvetica Chimica Acta**. v.85, n.8, p.2342-2348, 2002.

WEBBER, J. A natural control of Dutch elm disease. **Nature**. v.292, p.449-451, 1981.

WEBER, A.; SARSA, M.-L.; SUNDMAN, V. Frankia-Alnus incana symbiosis: effect of endophyte on nitrogen fixation and biomass production. **Plant and Soil**, v.120, p.291-7, 1989.

WECKWERTH, W.; MORGENTHAU, K. Metabolomics: from patterns recognition to biological interpretation. **Drug Discovery Today: Targets**, v. 10, n. 22, p. 1551-1558, 2005.

WHITE, J. F. e COLE, G. T. Endophyte host associations in forage grasses. 3. In vitro inhibition of fungi by *Acremonium coenophialum*. **Mycologia**, v.77; p.487-489, 1985.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. e TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al., eds. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, New York. p.315-322, 1990.

WHITE-Jr., J. F.; MORGAN-JONES, G.; MORROW, A. C. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. **Agriculture Ecosystems & Environment**. Amsterdam, v.44, p.13-37, 1993.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBLELIK, A. R.; LIVAK, K. J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research**, v.18, p. 6531-5, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Methods in Enzymology**, v.218, p.704-40, 1990.

WOLFE, B.A.; BUSH, M.; MONFORT, S.L.; MUMFORD, S.L.; PESSIER, A.; MONTALI, R.J. Abdominal lipoma-tosis attributed to tall fescue toxicosis in deer. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.213, p.1783-1786, 1998.

WONG, R.N.S.; NG, T.B.; CHAN, S.H.; DONG, T.X.; YEUNG, H.W. Characterization of Mirabilis antiviral protein: A ribosome inactivating protein from *Mirabilis jalapa* L. **Biochemistry International**. v.28, p.585-93, 1992.

SHU-WEI, Y.; UBILLAS, R.; McALPINE, J.; STAFFORD, A.; ECKER, D. M.; TALBOT, M. K. e ROGERS, B. Three New Phenolic Compounds from a Manipulated Plant Cell Culture, *Mirabilis jalapa* Bioassay-guided fractionation of an organic extract of the cell mass from a manipulated plant cell culture. **Journal Nat. Prod.**, n.64, p.313-317, 2001.

YANG, Y. W.; LAI, K. N.; TAI, P. Y.; MA, D. P.; LI, W. H. Molecular phylogenetic studies of Brassica, Rorippa, Arabidopsis, and allied genera based on the internal transcribed region of 18S-26S rDNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 13, p. 455-462, 1999.

YEN, G. C. e DUH, P. D. Antioxidant activity of methanolic extracts of peanut hulls from various cultivars. **Journal of the American Oil Chemists Society**, n.72, p.1065-1067, 1995.

YOUNG, H. AND PATTERSON, V. J. A UV-protective compound from *Glomerella cingulata* - a mycosporine. **Phytochemistry**, v.21, p.1075-77, 1982.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (org.). Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó, SC: Ed. Argos, 523p., 2001.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V.; Pharmaceutics and phytotherapies: the need for development of the industry of phytopharmaceutics and phytotherapies in Brazil. **Química Nova** v.24, n.1, p.147-152. ISSN 0100-4042. Jan./Fev. 2001.

ZACCHINO, S.A.; LÓPEZ, S.N.; CASTELLI, M.V.; DE CAMPOS, F.; CORRÊA, R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; ZAMORA, M.A.; ENRIZ, R.D.; RIBAS, J.C.; FURLÁN, R.L. In vitro Antifungal Properties, Structure - Activity Relationships and Studies on the Mode of Action of N-Phenyl, N-Aryl, N-Phenylalkyl Maleimides and Related Compounds. **Chem. Inform.** v.36, n.26, 2005.

ZHANG, Q.; ZHAO, Y.; WANG, B.; TU, G. New Triterpenoid Saponins from *Stelmatocrypton khasianum*. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, Tokyo, v.51, n.5, p.574-578, 2003.

ZIJLSTRA, C.; LEVER, A.E.M.; VENK, B.J.; VAN SILFHOUT, C.H. Differences between ITS regions of isolates of root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. **Phytopathology**, Lancaster, v.85, p.1231-1237, 1995.

ZOU, W. X.; MENG, J. C.; LU, H.; CHEN, G. X.; SHI, G. X.; ZHANG, T. Y., TAN, R. X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**. v.63, n.11, p.1529-1530, 2000.

APÊNDICE A

PREPARO DE MEIOS

1. PREPARAÇÃO DO MEIO PARA CULTURA DE TECIDOS

O preparo de 500 mL de meio nutritivo para cultura de tecidos foi efetuado de acordo com o protocolo:

- a) Em proveta de 500 mL adicionou-se 400 mL de água destilada;
- b) Adicionou 50 mL de solução estoque de sais MS ou B5;
- c) Adicionou 15 mg de sacarose (3%) para o meio MS e/ou 10 mg de sacarose (2%) para o meio B5;
- d) Ajustou o pH da solução ao valor de 5,7 por meio de NaOH (1 mol/L) ou HCl (1 mol/L);
- e) Completou o volume para 500 mL com água destilada;
- f) Transferiu 25 mL da solução para todos os frascos de cultura de tecidos;
- g) Adicionou 0,5g de ágar-ágar em cada frasco (exceto no preparo de meio líquido);
- h) Fechou-se os frascos e colocou-os na autoclave por 20 min. a 1 KgF/cm².
- i) Transferiu-se os frascos autoclavados para a capela de fluxo laminar, ligando-se a luz UV por 15 min., esperando o meio de cultura gelificar ou atingir a temperatura ambiente vedando os frascos com filme PVC.

2. PREPARO DE MEIOS DE CULTURA PARA FUNGOS

2.1 – Meio Batata-dextrose-ágar (BDA)

Discos de batata descascada	200 g
Dextrose	20 g
Ágar-ágar	10 g
Água destilada	1000 mL

Preparo: Ferva por 40 min. os discos de batatas descascadas em 500 ml de água destilada, e após filtrar em gaze ou similar. Solubilizar a dextrose em água, adicionando ao caldo, misturar o ágar e completar com água destilada para 1000 mL. Autoclavar por 20 min., transferir para capela de fluxo laminar, previamente esterilizada. Verter nos tubos de ensaios, placas de Petri ou frascos Erlenmeyer fechando e vedando com filme PVC quando gelificar e esfriar.

2.2 – Meio Batata-dextrose (BD)

Discos de batata descascada	200 g
Dextrose	20 g
Água destilada	1000 mL

Preparo: Procedimento semelhante ao meio BDA, porém sem adição de ágar.

2.3 – Meio Leite-trigo-mel-ágar (Lactrimel-ágar)

Leite em pó integral	20 g
Farinha de trigo	20 g
Mel	7 g
Ágar-agar	20 g
Água destilada	800 mL

Preparo: Dissolver o leite em 200 mL de água destilada, reservando. Em outro recipiente dissolver a farinha de trigo, o mel e o ágar em 800 mL de água destilada e levar para banho-maria. Levar os dois recipientes para autoclavar (121°C/15 min.). Deixar esfriar ao toque da pele misturando as duas soluções na capela de fluxo laminar vedando com filme PVC.

2.4 – Meio de Folhas (MF)

Peptona	5 g
Glicose	15 g
Ágar	15 g
Extrato da Folha	400 mL
Água destilada – completar para	1000 mL

Preparo: O extrato da folha é obtido pela trituração de 100 g de folha do qual se isolou o endofítico em 400 mL de água sendo filtrada com gaze. Dissolver as demais substâncias completando o volume para 1L e regular o pH para 7,9. Autoclavar (121°C/15 min.). Deixar esfriar ao toque para verter sobre as placas de Petri em capela.

2.5 – Meio Sabouraud (SAB)

Peptona	10 g
Maltose	40 g
Ágar	15 g
Extrato de levedura	10 mL
Água destilada – completar para	1000 mL

Preparo: Dissolver as substâncias em um béquer completando o volume para 1L e regular o pH para 6,8. Autoclavar (121°C/15 min.). Deixar esfriar ao toque para verter sobre as placas de Petri em capela.

2.6 – Meio Ágar-Ágar (AA)

Ágar	15 g
Água destilada – completar para	1000 mL

Preparo: Misturar o ágar em um béquer com água completando o volume para 1L e regular o pH para 6,5. Autoclavar (121°C/15 min.). Deixar esfriar ao toque para verter sobre as placas de Petri em capela.

3. PREPARO DE MEIO DE CULTURA PARA TESTE ANTIMICROBIANO

Infuso de coração bovino	10 g
Infuso de cérebro de bezerro	7,5 g
Peptona	10 g
Dextrose	2 g
NaCl	5 g
Fosfato dissódico	2,5 g
Ágar-agar	15 g

Preparo: Suspender 52 g do meio em 1 L de água destilada misturando. Sob aquecimento e agitação freqüente, ferver por 1 min. Corrigir o pH para 7,4. Esterilizar o meio em autoclave (121°C/15 min.). Antes de usar o meio BHA (CREITZ e PUCKET, 1954) delicadamente distribuir o precipitado possível. Conservar refrigerado, e antes do uso aquecer até 50°C e se necessário resuspender o sedimento. O meio BHI não leva ágar-aga, servindo para multiplicar as cepas de bactéria.

APÊNDICE B

PREPARO DE SOLUÇÕES

- 1) *Solução de Carbonato de sódio (20%)*: dissolver com H₂O dest. em béquer 20 g de carbonato de sódio (x10 H₂O), transferir para balão volumétrico de 100 mL completando com H₂O dest. até a marca do menisco. Homogeneizar e guardar em frasco de cor âmbar.
- 2) *Solução de Carbonato de sódio (2%)*: dissolver com H₂O dest. em béquer 2 g de carbonato de sódio (x10 H₂O), transferir para balão volumétrico de 100 mL completando com H₂O dest. até a marca do menisco. Homogeneizar e guardar em frasco de cor âmbar.
- 3) *Solução de Carbonato de sódio saturado*: em béquer, com 100 mL H₂O dest. adicionou-se carbonato de sódio (x10 H₂O) sob agitação até formação de corpo de fundo. Filtrou-se a solução e transferir para frasco de cor âmbar.
- 4) *Solução estoque de ácido tânico (1 mg/mL)*: dissolver 1,0 g ácido tânico (Sigma-Aldrich) em água suficiente e transferir para balão volumétrico de 100 mL completando com H₂O dest. até a marca do menisco. Homogeneizar e guardar em frasco de cor âmbar.
- 5) *Solução estoque de ácido gálico (1 mg/mL)*: dissolver 1,0 g ácido gálico (Sigma-Aldrich) em água suficiente e transferir para balão volumétrico de 100 mL completando com H₂O dest. até a marca do menisco. Homogeneizar e guardar em frasco de cor âmbar.
- 6) *Solução tampão ácido acético/acetato de sódio pH=4,5*: preparar 50 mL de uma solução 1 mol/L de acetato de sódio. Medir 43 mL em proveta da solução de acetato de sódio transferindo para béquer de 250 mL e adicionar 57 mL de ácido acético. Homogeneizar e guardar em frasco de cor âmbar. Verificar o pH, se necessário corrigir.
- 7) *Solução estoque de 2,2-Difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (40 mmol/L)*: em balança analítica de precisão, pesou-se 0,1578 g de DPPH (*Sigma*, código 095K1452), solubilizando com metanol P.A., para HPLC, e transferindo para balão volumétrico de 10 mL e completando o volume. A solução foi armazenada em frasco de cor âmbar, envolvido em papel alumínio e em congelador. Retirando-se 15 min. antes do uso para atingir a temperatura ambiente.

8) *Solução de álcool etílico 70%*: 750 mL de álcool etílico 92,5 °INPM e 250 mL de água para preparar um litro da solução.

9) *Lactofenol*: 20g de fenol misturados a 40 mL de ácido láctico e 40 mL de glicerina homogeneizando vigorosamente e fazendo a adição de 20 mL de água destilada.

10) *Azul de metileno*: misturar em proveta 5 mL de azul de metileno em 195 mL de água. Após o preparo usar em até uma semana.

11) *Solução estoque de meio basal B5* (Gamborg, Miller, Ojima; 1968) (250x)

- Adicionou-se 125 mL solução estoque (8x) de macronutrientes do meio B5
- Adicionou-se 5 mL de solução estoque (200x) de micronutrientes do meio B5
- Adicionou-se vitaminas do meio B5;
- Adicionou-se 10 mL de solução estoque (100x) de Fe-EDTA;
- Completou-se volume para 1 L.

12) *Solução estoque de Macronutrientes* (Meio B5) (8x)

Soluções	Sais	Massa em g
A1	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,2
A2	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,072
A3	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,2
A4	KNO_3	20,0
A5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0

- Dissolveu-se as respectivas massas de cada sal em béquer transferindo para balão volumétrico de 1 L e completando-se o volume com água destilada.
- Utilizar 125 mL dessa solução para cada litro de solução estoque MS.

13) *Solução estoque de Micronutrientes* (Meio B5) (200x)

Soluções	Sais	Massa em g
B1	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,0
B2	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,4
B3	H_3BO_3	0,6
B4	KI	0,15
B5	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,05
B6	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,005
B7	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,005

- Dissolveu-se as respectivas massas de cada sal em béquer transferindo para balão volumétrico de 1 L e completando-se o volume com água destilada.
- Utilizar 5 mL dessa solução para cada litro de solução estoque MS.

14) *Solução de Vitaminas (Meio B5)*

Vitaminas	Concentração na solução estoque (g / 200 mL)	Concentração no meio de cultura (mg L ⁻¹)
Mio-inositol	5	100
Ácido nicotínico*	0,05	1
Piridoxina	0,05	1
Tiamina	0,5	10

*Dissolver previamente em NaOH 1 mol L⁻¹

- Dissolveu-se cada vitamina em volumes individuais de 40 mL juntando-as todas em uma proveta de 200 mL e completou o volume com água destilada para 200 mL.
- Utilizar **4 mL** dessa solução para cada litro do meio de cultura.

Obs: A água utilizada no preparo dessa solução ser previamente esterilizada em autoclave a 120 °C por 20 minutos.

15) *Preparo de 1 litro de solução estoque MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962)*

- Adicionou-se 125 mL solução estoque (8x) de macronutrientes do meio MS
- Adicionou-se 5 mL de solução estoque (200x) de micronutrientes do meio MS
- Adicionou-se 10 mL de solução estoque (100x) de FeEDTA
- Adicionou-se vitaminas de Nitch;
- Completou-se volume para 1 L;

16) *Solução estoque de Macronutrientes (Meio MS) (8x)*

Soluções	Sais	Massa em g
A1	CaCl ₂ · 2H ₂ O	3,52
A2	KH ₂ PO ₄	1,36
A3	NH ₄ NO ₃	13,20
A4	KNO ₃	15,20
A5	MgSO ₄ · 7H ₂ O	2,96

- Dissolveu-se as respectivas massas de cada sal em béquer transferindo para balão volumétrico de 1 L e completando-se o volume com água destilada.
- Utilizar 125 mL dessa solução para cada litro de solução estoque MS.

17) *Solução estoque de Micronutrientes (Meio MS) (200x)*

Soluções	Sais	Massa em g
B1	MnSO ₄ . H ₂ O	3,38
B2	ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	1,72
B3	H ₃ BO ₃	1,24
B4	NiSO ₄ . 6 H ₂ O	0,0104
B5	Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,05
B6	CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,005
B7	CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,005

- Dissolveu-se as respectivas massas de cada sal em béquer transferindo para balão volumétrico de 1 L e completando-se o volume com água destilada.
- Utilizar 5 mL dessa solução para cada litro de solução estoque MS.

18) *Solução estoque de vitaminas de Nitch (Meio MS) (250x)*

Substância	Concentração na solução estoque (g/200mL)	Concentração no meio de cultura (mg/L)
Glicina	0,1	2
Mio-inositol	5	100
Acido nicotínico*	0,25	5
Piridoxina	0,025	0,5
Tiamina	0,025	0,5
Biotina	0,0025	0,05
Acido fólico	0,025	0,5

* Dissolver previamente com gotas de NaOH 1mol/L

- Dissolver cada vitamina em volumes individuais de 20 mL, juntas todas elas e completar para 200 mL da solução estoque.
- Utilizar 4 mL dessa solução para cada litro de solução estoque MS.

Obs: A água utilizada na confecção deve ser previamente esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos.

19) *Solução estoque de Fe-EDTA (100x)*

Solução	Sais	Massa em g
C1	Na ₂ EDTA	3,72
C2	FeSO ₄ . 7 H ₂ O	2,78

- Dissolveu-se o Na₂EDTA em 100 mL de água quente;
- Em outro recipiente, dissolveu-se o FeSO₄ . 7H₂O;
- Colocou-se a primeira solução em um balão de 1 L acrescentando 200 mL de água e adicionou-se a segunda solução;
- Agitou e completou-se para um litro.
- Utilizar 10 mL dessa solução para cada litro de solução estoque MS.

ANEXO A

A dissertação foi escrita com base na ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) seguindo as NBR's (Normas Brasileiras de Redação).

NBR 6021 – Informação e documentação – Publicação periódica científica impressa – Apresentação.

NBR 6022 – Informação e documentação – Artigo em publicação científica impressa – Apresentação.

NBR 6023 – Informação e documentação – Referências – Elaboração.

NBR 6024 – Informação e documentação – Numeração progressiva das seções de um documento escrito – Apresentação.

NBR 6027 – Informação e documentação – Sumário – Apresentação.

NBR 6028 – Resumos – Procedimentos.

FURASTÉ, P. A. Normas Técnicas para o Trabalho Científico: Elaboração e Formatação. Explicitação das Normas da ABNT. 14 ed. Porto Alegre: s.n., 2006.

ANEXO B

Trabalhos apresentados em Congressos.



5º Congresso
Brasileiro de Micologia

Certificado

Certificamos que Sandra Kamei
apresentou o trabalho Colletotrichum gloeosporioides endofítico de
sementes de Mirabilis jalapa L. identificação e testes de atividade
antimicrobiana de seus extratos
de autoria de Sandra Kamei, Demetrius Morilla, Luiz Silva, Francisco
Pancho, Iede Silva & Luiz Caetano
durante o 5º Congresso Brasileiro de Micologia, realizado no período de
12 a 16 de novembro de 2007 em Recife, Pernambuco, Brasil.

Recife, 16 de novembro de 2007

Uíded Maaze T. Cavalcante
Uíded Maaze T. Cavalcante
1ª Secretária

Leonor Costa Maia
Leonor Costa Maia
Presidente do 5º CBMicologia



CÓPIA



Certificado

A Sociedade Brasileira de Genética declara que o trabalho intitulado "Isolamento e identificação molecular do endofítico *Colletotrichum sp.* de sementes de *Mirabilis jalapa L.*", autoria de KAMEI, SH; MORILLA, DP; SILVA, IE; SILVA, LAF; TOVAR, FJ; CAETANO, LC, foi apresentado no 53º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, em ÁGUAS DE LINDÓIA - SP, no período de 02 a 05 de setembro de 2007

GM021

Horácio Schneider
Horácio Schneider
Presidente da SBG



Nílice Maria Martinez Rossi
Nílice Maria Martinez Rossi
1ª Secretária da SBG

CÓPIA

ANEXO C



ESTADO DE ALAGOAS
SECRETARIA EXECUTIVA DE MEIO AMBIENTE-RECURSOS HIDRICOS
INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE - IMA

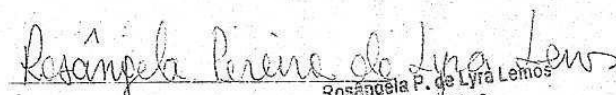
134

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que a planta enviada para identificação no herbário MAC do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas, por Demétrius Pereira Morilla do curso de Pós-graduação em Química e biotecnologia – UFAL trata-se de:

- *Mirabilis jalapa* L.. pertencente a família Nyctaginaceae registrada sob o MAC 39969;

Maceió, 14 de junho de 2009


Rosângela P. de Lyra Lemos
Mat. 56329-3
CURADORA HERBÁRIO MAC - IMA/AL
Curadora do herbário MAC

ANEXO D

Alinhamento do sequenciamento das regiões ITS1 e ITS2 destacando a região diferenciada (em amarelo) que foram usadas para complementar o sequenciamento usando no GeneBank NCBI – BLAST.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
ITS1  T G A C A T A C C T A T A C T G T T G C T T C G G C G G G T A G G G T A C G T C C G C G A C C C T C C C G G C C T C C C G C C T C C G G G C G G G T C G G C G C C G C C G G A G G A T A A C C A A A C
ITS2  -----
Comp. T G A C A T A C C T A T A C T G T T G C T T C G G C G G G T A G G G T A C G T C C G C G A C C C T C C C G G C C T C C C G C C T C C G G G C G G G T C G G C G C C C G C C G G A G G A T A A C C A A A C

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
ITS1  T C T G A T T T A A C G A C G T T T C T T C T G A G T G G T A C A A G C A A A T A A T C A A A A C T T T T A A C A A C G G A T C T C T T G G T T C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T
ITS2  T C T G A T T T A A C G A C G T T T C T T C T G A G T G G T A C A A G C A A A T A A T C A A A A C T T T T A A C A A C G G A T C T C T T G G T T C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T
Comp. T C T G A T T T A A C G A C G T T T C T T C T G A G T G G T A C A A G C A A A T A A T C A A A A C T T T T A A C A A C G G A T C T C T T G G T T C T G G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A A T

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ITS1  G C G A T A A G T A A T G T G A A T T G C A G A A T T C A G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C G C C A G C A T T C T G G C G G G C A T G C C T G T T C G A G C G T C A
ITS2  G C G A T A A G T A A T G T G A A T T G C A G A A T T C A G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C G C C A G C A T T C T G G C G G G C A T G C C T G T T C G A G C G T C A
Comp. G C G A T A A G T A A T G T G A A T T G C A G A A T T C A G T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C A T T G C G C C C G C C A G C A T T C T G G C G G G C A T G C C T G T T C G A G C G T C A

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
ITS1  T T T C A A C C C T C A A G C T C T G C T T G G T G T T G G G G C C C T A C A G C T G A T G T A G G C C C T C A A A G G T A G T G G C G G A C C C T C T C G G A G C C T C C T T T G C G T A G T A A C T
ITS2  T T T C A A C C C T C A A G C T C T G C T T G G T G T T G G G G C C C T A C A G C T G A T G T A G G C C C T C A A A G G T A G T G G C G G A C C C T C T C G G A G C C T C C T T T G C G T A G T A A C T
Comp. T T T C A A C C C T C A A G C T C T G C T T G G T G T T G G G G C C C T A C A G C T G A T G T A G G C C C T C A A A G G T A G T G G C G G A C C C T C T C G G A G C C T C C T T T G C G T A G T A A C T

      410     420     430     440     450     460
ITS1  T T A C G T C T C G C A C T G G -----
ITS2  T T A C G T C T C G C A C T G G G A T C C G G A G G G A C T C T T G C C G T A A A A C C C C C A A T T T C C A A A G G T G A
Comp. T T A C G T C T C G C A C T G G G A T C C G G A G G G A C T C T T G C C G T A A A A C C C C C A A T T T C C A A A G G T G A

```

ANEXO E

CLUSTAL 2.0.5 MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

```

ITS1      TGACA7ACCTA7ACTGT7GCT7CGGC6GGGTAGGGTAAGTCCGCGACCCCTCCCGGCTCCCGGCT7CGGGGCGGGT7CGGCGC 80
ITS2
Completo  TGACA7ACCTA7ACTGT7GCT7CGGC6GGGTAGGGTAAGTCCGCGACCCCTCCCGGCTCCCGGCT7CGGGGCGGGT7CGGCGC 80
1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80

*****
ITS1      CCGCCGGAGGATACCCAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAGCAAA7AATCAAAAC7TTTAAACAACG 160
ITS2      CCGCCGGAGGATACCCAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAGCAAA7AATCAAAAC7TTTAAACAACG 80
Completo  CCGCCGGAGGATACCCAACTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAGCAAA7AATCAAAAC7TTTAAACAACG 160
.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150.....160

*****
ITS1      GATCTCT7GGT7CTGGCTCGATGAAAGAACGACGAAATGCCATAGTAA7GTGAATTGCAAA7TTCAGTGAA7CA7CG 240
ITS2      GATCTCT7GGT7CTGGCTCGATGAAAGAACGACGAAATGCCATAGTAA7GTGAATTGCAAA7TTCAGTGAA7CA7CG 160
Completo  GATCTCT7GGT7CTGGCTCGATGAAAGAACGACGAAATGCCATAGTAA7GTGAATTGCAAA7TTCAGTGAA7CA7CG 240
.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240

*****
ITS1      AATCTTTGAACGCACT7GCGCCCGCCAGCAATTCTGGCGGGCA7GCC7G7TTCGAGCG7CATTTCAAACCC7CAAAC7CT7GC 320
ITS2      AATCTTTGAACGCACT7GCGCCCGCCAGCAATTCTGGCGGGCA7GCC7G7TTCGAGCG7CATTTCAAACCC7CAAAC7CT7GC 240
Completo  AATCTTTGAACGCACT7GCGCCCGCCAGCAATTCTGGCGGGCA7GCC7G7TTCGAGCG7CATTTCAAACCC7CAAAC7CT7GC 320
.....250.....260.....270.....280.....290.....300.....310.....320

*****
ITS1      T7GGTGT7GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCT7CAAGGTA7GTGGGGGACCC7CT7CGGA7GCC7CCTTTGCGTGTAACT 400
ITS2      T7GGTGT7GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCT7CAAGGTA7GTGGGGGACCC7CT7CGGA7GCC7CCTTTGCGTGTAACT 320
Completo  T7GGTGT7GGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCT7CAAGGTA7GTGGGGGACCC7CT7CGGA7GCC7CCTTTGCGTGTAACT 400
.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400

*****
ITS1      TTACGTCTCGCACTGGG----- 416
ITS2      TTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAACCCCCAATT7CCAAAGGTGA 382
Completo  TTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAACCCCCAATT7CCAAAGGTGA 462
.....410.....420.....430.....440.....450.....460..

*****

```

ANEXO F**SEQUÊNCIA DE PARES DE BASES DO ARQUIVO FASTA****>REGIÃO ITS1 – FBS (416 pares-bases)**

TGACATACCTATACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTACGTCCGCGACCCTCCC
GGCCTCCCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCT
GATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAACTTTTAAC
AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCA
AGCTCTGCTTGGTGTGTTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGT
GGCGGACCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTGG

>REGIÃO ITS2 – FBS (382 pares-bases)

CCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTAC
AAGCAAATAATCAAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCT
GTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGTTGGGGCCCTACAGC
TGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGTGGCGGACCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGT
AGTAACTTTACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCC
CCAATTTCCAAAGGTGA

>REGIÃO ITS COMPLETA – FBS (462 pares-bases)

TGACATACCTATACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTACGTCCGCGACCCTCCC
GGCCTCCCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCT
GATTTAACGACGTTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAACTTTTAAC
AACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCA
AGCTCTGCTTGGTGTGTTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAAGGTAGT
GGCGGACCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACTTTACGTCTCGCACTGG
GATCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCAATTTCCAAAGGTGA

ANEXO G

BLAST

Blast Tree View

Mouse over the sequence identifier for sequence title

Alignment view for RID: 8V9SR68A016, query ID: lcl|19657, database: nr

19657	1	TGACATACCTAT-ACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTACGTCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	58
EF025932	56	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGTA--TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	110
AY561499	45	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	99
AY266389	84	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	138
AY188934	35	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	89
AY188932	35	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	89
AB087216	30	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	84
AB042317	60	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	114
AB458667	30	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	84
FJ441626	86	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	140
EF488442	85	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	139
EF488441	86	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	140
EF025935	58	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGGCCCTC	113
FJ449925	34	TGAC-TACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	89
AB305166	26	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	80
EF177477	30	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	84
EF177476	30	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	84
EF177474	30	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	84
EF177473	30	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	84
EF177471	30	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	84
GQ352479	61	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	115
EU054417	60	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	114
EU049287	484	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	430
EF672281	55	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	109
FJ612730	60	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	114
EF622185	4	TGACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	60
FJ480405	22	TGACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	78
EU822804	60	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	114
EU781669	60	--ACATACCTATAACAGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	114
DQ410037	26	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	80
FJ755268	12	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	66
GQ120498	61	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	115
GQ120497	60	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	114
GQ120496	61	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	115
GQ120493	54	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	108
GQ120492	60	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	114
GQ120491	60	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	114
GQ120490	61	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	115
GQ120488	60	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	114
GQ120487	59	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	113
GQ120486	61	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	115
GQ120485	60	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	114
GQ120482	60	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	114
FJ799936	70	--ACATACCTATAACTGTTGCTTCGGCGGGTAGGGT-C-TCCGCGACCCCTCCCGG-CCTC	124
19657	59	CCGCCCTCCGGGCGGGTCCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	118
EF025932	111	CCGCCCTCCGGGCGGGTCCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	170
AY561499	100	CCGCCCTCCGGGCGGGTCCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	159
AY266389	139	CCGCCCTCCGGGCGGGTCCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	198
AY188934	90	CCGCCCTCCGGGCGGGTCCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	149
AY188932	90	CCGCCCTCCGGGCGGGTCCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	149
AB087216	85	CCGCCCTCCGGGCGGGTCCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	144
AB042317	115	CCGCCCTCCGGGCGGGTCCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	174
AB458667	85	CCGCCCTCCGGGCGGGTCCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	144
FJ441626	141	CCGCCCTCCGGGCGGGTCCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	200
EF488442	140	CCGCCCTCCGGGCGGGTCCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	199
EF488441	141	CCGCCCTCCGGGCGGGTCCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	200
EF025935	114	CCGCCCTCCGGGCGGGTCCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	173
FJ449925	90	CCGCCCTCCGGGCGGGTCCGGCGCCCGCCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	149

AB305166	81	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	140
EF177477	85	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	144
EF177476	85	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	144
EF177474	85	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	144
EF177472	85	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	144
EF177471	85	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	144
GQ352479	116	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	175
EU054417	115	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	174
EU049287	429	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	370
EF672281	110	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	169
FJ612730	115	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	174
EF622185	61	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	120
FJ480405	79	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	138
EU822804	115	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	174
EU781669	115	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	174
DQ410037	81	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	140
FJ755268	67	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	126
GQ120498	116	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	175
GQ120497	115	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	174
GQ120496	116	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	175
GQ120493	109	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	168
GQ120492	115	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	174
GQ120491	115	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	174
GQ120490	116	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	175
GQ120488	115	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	174
GQ120487	114	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	173
GQ120486	116	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	175
GQ120485	115	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	174
GQ120482	115	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	174
FJ799936	125	CCGCCTCCGGGCGGGTCGGCGCCCGCGGAGGATAACCAAACCTCTGATTTAACGACGTTT	184
19657	119	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	178
EF025932	171	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	230
AY561499	160	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	219
AY266389	199	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	258
AY188934	150	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	209
AY188932	150	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	209
AB087216	145	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	204
AB042317	175	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	234
AB458667	145	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	204
FJ441626	201	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	260
EF488442	200	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	259
EF488441	201	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	260
EF025935	174	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	233
FJ449925	150	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	209
AB305166	141	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	200
EF177477	145	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	204
EF177476	145	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	204
EF177474	145	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	204
EF177472	145	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	204
EF177471	145	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	204
GQ352479	176	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	235
EU054417	175	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	234
EU049287	369	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	310
EF672281	170	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	229
FJ612730	175	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	234
EF622185	121	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	180
FJ480405	139	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	198
EU822804	175	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	234
EU781669	175	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	234
DQ410037	141	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	200
FJ755268	127	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	186
GQ120498	176	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	235
GQ120497	175	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	234
GQ120496	176	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	235
GQ120493	169	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	228
GQ120492	175	CTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	234

GQ120491	175	CTTCTGAGTGGTACAAAGCAAATAATCAAACCTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	234
GQ120490	176	CTTCTGAGTGGTACAAAGCAAATAATCAAACCTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	235
GQ120488	175	CTTCTGAGTGGTACAAAGCAAATAATCAAACCTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	234
GQ120487	174	CTTCTGAGTGGTACAAAGCAAATAATCAAACCTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	233
GQ120486	176	CTTCTGAGTGGTACAAAGCAAATAATCAAACCTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	235
GQ120485	175	CTTCTGAGTGGTACAAAGCAAATAATCAAACCTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	234
GQ120482	175	CTTCTGAGTGGTACAAAGCAAATAATCAAACCTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	234
FJ799936	185	CTTCTGAGTGGTACAAAGCAAATAATCAAACCTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA	244

19657	179	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	238
EF025932	231	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	290
AY561499	220	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	279
AY266389	259	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	318
AY188934	210	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	269
AY188932	210	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	269
AB087216	205	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	264
AB042317	235	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	294
AB458667	205	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	264
FJ441626	261	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	320
EF488442	260	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	319
EF488441	261	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	320
EF025935	234	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	293
FJ449925	210	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	269
AB305166	201	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	260
EF177477	205	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	264
EF177476	205	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	264
EF177474	205	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	264
EF177472	205	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	264
EF177471	205	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	264
GQ352479	236	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	295
EU054417	235	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	294
EU049287	309	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	250
EF672281	230	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	289
FJ612730	235	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	294
EF622185	181	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	240
FJ480405	199	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	258
EU822804	235	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	294
EU781669	235	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	294
DQ410037	201	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	260
FJ755268	187	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	246
GQ120498	236	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	295
GQ120497	235	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	294
GQ120496	236	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	295
GQ120493	229	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	288
GQ120492	235	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	294
GQ120491	235	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	294
GQ120490	236	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	295
GQ120488	235	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	294
GQ120487	234	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	293
GQ120486	236	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	295
GQ120485	235	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	294
GQ120482	235	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	294
FJ799936	245	TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT	304

19657	239	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	298
EF025932	291	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	350
AY561499	280	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	339
AY266389	319	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	378
AY188934	270	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	329
AY188932	270	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	329
AB087216	265	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	324
AB042317	295	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	354
AB458667	265	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	324
FJ441626	321	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	380
EF488442	320	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	379
EF488441	321	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	380
EF025935	294	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	353

FJ449925	270	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	329
AB305166	261	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	320
EF177477	265	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	324
EF177476	265	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	324
EF177474	265	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	324
EF177472	265	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	324
EF177471	265	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	324
GQ352479	296	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	355
EU054417	295	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	354
EU049287	249	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	190
EF672281	290	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	349
FJ612730	295	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	354
EF622185	241	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	300
FJ480405	295	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	318
EU822804	295	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	354
EU781669	295	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	354
DQ410037	261	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	320
FJ755268	247	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	306
GQ120498	296	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	355
GQ120497	295	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	354
GQ120496	296	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	355
GQ120493	289	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	348
GQ120492	295	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	354
GQ120491	295	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	354
GQ120490	296	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	355
GQ120488	295	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	354
GQ120487	294	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	353
GQ120486	296	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	355
GQ120485	295	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	354
GQ120482	295	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	354
FJ799936	305	CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT	364
19657	299	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	358
EF025932	351	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	410
AY561499	340	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	399
AY266389	379	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	438
AY188934	330	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	389
AY188932	330	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	389
AB087216	325	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	384
AB042317	355	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	414
AB458667	325	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	384
FJ441626	381	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	440
EF488442	380	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	439
EF488441	381	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	440
EF025935	354	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	413
FJ449925	330	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	389
AB305166	321	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	380
EF177477	325	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	384
EF177476	325	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	384
EF177474	325	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	384
EF177472	325	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	384
EF177471	325	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	384
GQ352479	356	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	415
EU054417	355	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	414
EU049287	189	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	130
EF672281	350	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	409
FJ612730	355	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	414
EF622185	301	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	360
FJ480405	319	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	378
EU822804	355	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	414
EU781669	355	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	414
DQ410037	321	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	380
FJ755268	307	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	366
GQ120498	356	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	415
GQ120497	355	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	414
GQ120496	356	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	415
GQ120493	349	CATTTC AACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	408

GQ120492	355	CATTTCAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	414
GQ120491	355	CATTTCAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	414
GQ120490	356	CATTTCAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	415
GQ120488	355	CATTTCAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	414
GQ120487	354	CATTTCAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	413
GQ120486	356	CATTTCAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	415
GQ120485	355	CATTTCAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	414
GQ120482	355	CATTTCAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	414
FJ799936	365	CATTTCAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA	424

19657	359	GGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	418
EF025932	411	GGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	470
AY561499	400	GGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	459
AY266389	439	GGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	498
AY188934	390	GGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	449
AY188932	390	GGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	449
AB087216	385	GGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	444
AB042317	415	GGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	474
AB458667	385	GGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	444
FJ441626	441	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	500
EF488442	440	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	499
EF488441	441	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	500
EF025935	414	GGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	473
FJ449925	390	GGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	449
AB305166	381	GGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	440
EF177477	385	GGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	444
EF177476	385	GGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	444
EF177474	385	GGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	444
EF177472	385	GGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	444
EF177471	385	GGTAGTGGCGGACCCCTCTCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	444
GQ352479	416	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	475
EU054417	415	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	474
EU049287	129	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	70
EF672281	410	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	469
FJ612730	415	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	474
EF622185	361	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	420
FJ480405	379	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	438
EU822804	415	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	474
EU781669	415	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	474
DQ410037	381	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	440
FJ755268	367	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	426
GQ120498	416	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	475
GQ120497	415	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	474
GQ120496	416	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	475
GQ120493	409	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	468
GQ120492	415	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	474
GQ120491	415	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	474
GQ120490	416	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	475
GQ120488	415	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	474
GQ120487	414	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	473
GQ120486	416	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	475
GQ120485	415	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	474
GQ120482	415	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	474
FJ799936	425	GGTAGTGGCGGACCCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACCTTTACGTCTCGCACTGGGA	484

19657	419	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTT-CCAAAGGTGA	462
EF025932	471	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTTCCAAAGGT--	513
AY561499	460	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTTCCAAAGGT--	502
AY266389	499	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTTCCAAAGGT--	541
AY188934	450	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTTCCAAAGGT--	492
AY188932	450	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTTCCAAAGGT--	492
AB087216	445	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTTCCAAAGGT--	487
AB042317	475	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTTCCAAAGGT--	517
AB458667	445	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTTCCAAAGG---	486
FJ441626	501	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTT-CCAAAGGTGA	545
EF488442	500	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTT-CCAAAGGTGA	544
EF488441	501	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTT-CCAAAGGTGA	545

EF025935	474	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTTCCAAAGGTGA	518
FJ449925	450	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTTCCAAAGGT--	492
AB305166	441	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTTCCAAAG----	481
EF177477	445	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTTCCAAAG----	485
EF177476	445	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTTCCAAAG----	485
EF177474	445	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTTCCAAAG----	485
EF177472	445	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTTCCAAAG----	485
EF177471	445	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTTCCAAAG----	485
GQ352479	476	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTTCCAAAGGT--	518
EU054417	475	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTTCCAAAGGT--	517
EU049287	69	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTTCCAAAGGT--	27
EF672281	470	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCC-AATTTACCAAAGGT--	512
FJ612730	475	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTT-CCAAAGG---	516
EF622185	421	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGT--	464
FJ480405	439	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGT--	482
EU822804	475	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTT-CCGAAGGTGA	519
EU781669	475	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTT-CCAAAGGTGA	519
DQ410037	441	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTT-CCAAAG----	481
FJ755268	427	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGT--	470
GQ120498	476	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGT--	519
GQ120497	475	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGT--	518
GQ120496	476	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGT--	519
GQ120493	469	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGT--	512
GQ120492	475	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGT--	518
GQ120491	475	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGT--	518
GQ120490	476	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGT--	519
GQ120488	475	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGT--	518
GQ120487	474	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGT--	517
GQ120486	476	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGT--	519
GQ120485	475	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGT--	518
GQ120482	475	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGT--	518
FJ799936	485	TCCGGAGGGACTCTTGCCGTAAAACCCCCCAATTTTCCAAAGGT--	528