

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

HORTÊNCIA FARIAS DE ANDRADE

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS DA MICOTECA/UFPE E
SCREENING DA PRODUÇÃO DE TAXOL**

**RECIFE
2015**

HORTÊNCIA FARIAS DE ANDRADE

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS DA MICOTECA/UFPE E
SCREENING DA PRODUÇÃO DE TAXOL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final à obtenção do título de Mestra em Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Prof^a. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Co-orientadoras: Prof^a. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira e Gláucia Manoela Lima.

**RECIFE
2015**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Andrade, Hortência Farias de
Caracterização molecular de fungos da Micoteca/UFPE e *screening* da
produção de taxol/ Hortência Farias de Andrade– Recife: O Autor, 2015.

52 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Márcia Vanusa da Silva

Coorientadoras: Maria Betânia Melo de Oliveira e Gláucia
Manoela Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Biotecnologia
Industrial, 2015.

Inclui bibliografia

- 1. Fungos endofíticos 2. Câncer I. Silva, Márcia Vanusa da**
(orientadora) II. Oliveira, Maria Betânia Melo de (coorientadora)
III. Lima, Gláucia Manoela (coorientadora) IV. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-158

HORTÊNCIA FARIAS DE ANDRADE

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS DA MICOTECA/UFPE E
SCREENING DA PRODUÇÃO DE TAXOL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final à obtenção do título de Mestra em Biotecnologia Industrial.

Aprovada em: 11/02/2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Márcia Vanusa da Silva

UFPE

Prof. Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva

UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Janete Magali de Araújo

UFPE

Recife, 11 de Fevereiro de 2015.

Dedico à minha família:
Meus pais Lourdes e Humberto,
Meus irmãos: Igor e Mêncio,
E ao meu noivo, Inhayan.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo, sempre. Por que sem a permissão Dele, nada teria acontecido. Pela força de seguir em frente diante dos obstáculos.

Aos meus pais, pela imensa dedicação e por nunca medirem esforços para contribuir intensamente para a minha formação pessoal e profissional. Agradeço também por compartilharem comigo todos os momentos decisivos da minha carreira acadêmica e sempre estarem dispostos a me ajudar no que fosse preciso.

Aos meus irmãos, Igor e Mêncio, que assim como meus pais, sempre estiveram ao meu lado me dando apoio emocional e financeiro sempre que foi preciso.

Ao meu noivo, Inhayán, que também sempre esteve disposto a me ajudar no que fosse preciso e nos momentos de stress ele sempre esteve presente, com palavras de conforto e carinho.

A minha orientadora, Márcia Vanusa da Silva, por acreditar no meu potencial sem nem me conhecer e estar sempre disposta com ideias inovadoras para contribuir com a realização deste trabalho.

As minhas Co – orientadoras Maria Betânia Oliveira e Glaucia Lima por todo o apoio e disposição de me ajudar sempre que preciso. Em especial a Betânia, que acreditou em mim desde a graduação.

Aos mestres e doutores, professores da UFPE, que tive o prazer de conhecer e conviver em toda minha trajetória e foi com o apoio e orientação deles que cheguei até aqui.

Ao professor Rafael Ximenes por todo apoio e paciência nas técnicas cromatográficas.

As minhas amigas, Rebeca e Daniele que também contribuíram imensamente para que eu chegasse até aqui, correndo atrás de resumos e apresentações. Ufa!

Aos meus amigos de laboratório, Livia, Priscilla, Carol, Elys, Amanda, Monialy, Túlio, Júnior, que me ajudaram no dia a dia do laboratório e em especial a Bruno, que foi quase que meu orientador de bancada. Não poderia deixar de agradecer a Arthur, nosso estagiário, que foi como um anjo para me ajudar, vindo em vésperas de natal e ano novo... Muito obrigada!

A minha turma do mestrado, Nina, Samara, Sabrina, Carla, Helloíse, Laís, Suele, Gabriele e em especial a Raphael por estarmos juntos desde a graduação, lutando juntos!

A Meiriana, que sempre esteve disposta a me ajudar, me ensinando a pipetar e a fazer as inúmeras PCR's.

Aos colegas do Centro de tecnologias estratégicas do Nordeste, Kelvin, Joana e Esteban por toda ajuda no finalzinho do 2º tempo com o uso do HPLC.

Aos colegas do laboratório de Engenharia metabólica, em especial a Zé Nunes, por toda a ajuda nas minhas fermentações, sempre disposto.

Aos colegas do departamento de antibióticos, em especial aos do laboratório da professora Norma, que foram essenciais no início do trabalho... Sempre tão solícitos na ajuda com os equipamentos.

AO secretário da pós graduação, Klayton Cabral, por ser extremamente competente no que faz e estar sempre disposto, com toda calma, pra ajudar.

ACAPES, pelo incentivo financeiro.

Enfim... **A** todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a execução do meu trabalho.

“A mente que se abre a uma ideia,
jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que até 2030 sejam previstos 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, convivendo com esta doença. No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, válidas também para o ano de 2013, apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Apesar da inserção de novos fármacos na terapia contra o câncer, vários tumores sólidos ainda não dispõem de tratamento adequado. Assim, é necessária a busca de novas alternativas medicamentosas para melhorar a eficácia do tratamento de doenças neoplásicas avançadas. Uma das principais áreas estudadas atualmente no mundo é a pesquisa de novos medicamentos com propriedades antitumorais. Microorganismos endofíticos podem ser entendidos como aqueles que vivem no interior das plantas, habitando, suas partes aéreas, como folhas e caules sem causar aparentemente nenhum dano a seus hospedeiros e conseguem viver nos tecidos internos das plantas e dispõem de uma riqueza bioquímica ainda não muito bem explorada. Os metabólitos secundários são compostos de baixo peso molecular, produzidos por fungos endofíticos em resposta às condições ambientais. Esses compostos apresentam potencial aplicação como os antibióticos. O objetivo do presente estudo foi avaliar seis gêneros da micoteca/URM quanto à produção do taxol. Os gêneros foram cultivados em meio BD (Batata Dextrose) por 72 horas em temperatura ambiente seguida de filtração a vácuo para extração do DNA. As reações de PCR foram realizadas com iniciadores e condições específicas para a amplificação do gene *ITS* do *rDNA*. Os produtos do gene *ITS rDNA* amplificados foram purificados e sequenciados. Os dados obtidos pelo sequenciamento do gene *ITS rDNA* foram analisados e comparados, pelo programas BLAST. Após a confirmação foram realizadas fermentações, seguidas da extração do metabólito secundário com acetato de etila. Os extratos foram analisados em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) que mostrou um resultado satisfatório quando correlacionada a técnica Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Dessa forma, se faz necessário uma continuidade desse estudo para otimização do processo de fermentação e extração do produto bioativo.

Palavras-chave: Endofítico, ITS, Paclitaxel, CCD e HPLC.

ABSTRACT

The World Health Organization estimates that by 2030 are provided 27 million incident cases of cancer, 17 million deaths from cancer and 75 million people alive each year living with this disease. In Brazil, the estimates for the year 2012, also valid for the year 2013 indicate the occurrence of approximately 518,510 new cases of cancer, reinforcing the magnitude of the cancer problem in the country. Despite the inclusion of new drugs in cancer therapy, several solid tumors still lack appropriate treatment. Thus, the search for new medicinal alternative is needed to improve the effectiveness of treatment of advanced malignancies. One of the main areas currently studied in the world is the search for new drugs with antitumor properties. Endophytic microorganisms can be understood as those who live within the plant, dwelling, its aerial parts such as leaves and stems without apparently causing any damage to their hosts and can live in the internal tissues of plants and have a biochemical wealth yet very well traveled. Secondary metabolites are low molecular weight compounds produced by endophytes in response to environmental conditions. These compounds have potential application as antibiotics. The aim of this study was to evaluate six genera of mycology collection / URM for the production of taxol. The genera were cultured in BD (Potato Dextrose) for 72 hours at room temperature followed by vacuum filtration for DNA extraction. PCR reactions were performed with specific primers and conditions for the gene amplification of the rDNA ITS. The STI gene amplified rDNA products were purified and sequenced. The data obtained by sequencing of the ITS rDNA were analyzed and compared by BLAST programs. After confirming fermentations were performed, followed by secondary metabolite extraction with ethyl acetate. The extracts were analyzed by Thin Layer Chromatography, which showed a satisfactory result when correlated Liquid Chromatography Technical High Efficiency. Thus, if a continuation of this study to optimize the process of fermentation and extraction of bioactive product is necessary.

Keywords: endophytic, ITS, Antitumor, Paclitaxel, CCD and HPLC.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Histórico, formas e aspectos morfológicos das espécies associadas à produção de Paclitaxel	15
3.2 Fungos Endofíticos	18
3.3 Interação Fungo-Planta	19
3.4 Fungos endofíticos como fonte de produtos bioativos	20
3.5 O Paclitaxel (Taxol).....	21
3.6 Mecanismo de ação (Uso terapêutico).....	22
3.7 A importância da identificação Molecular.....	24
3.8 Identificação do composto alvo.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Micro-organismos	26
4.2 Extração de DNA	26
4.3 Amplificação e purificação do gene ITS 1 e 4 por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	27
4.4 Screening primário da produção de taxol, por fungo, baseado na amplificação Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	29
4.5 Análises dos dados	30
4.6 Obtenção dos extratos da fase orgânica.....	30
4.7 Extração do metabólito secundário	31
4.7.1 Extração do metabólito bioativo da massa celular	31
4.7.2 Extração de substâncias bioativas do líquido metabólico	32
4.8 Análise de cromatografia em camada delgada (CCD)	32
4.9 Análise de Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Extração do DNA ribossômico	33
5.2 Amplificação do gene <i>ITS</i> 1 e <i>ITS</i> 4 por PCR	33
5.3 Análises das sequências do gene ITS	34
5.4 Análises Filogenéticas	36

5.5 Screening primário da produção de taxol, por fungo, baseado em PCR.....	37
5.6.1. Líquido Fermentado (Extracelular)	38
5.6.2. Biomassa (Intracelular)	39
5.7. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	40
5.8. Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC)	41
6. CONCLUSÃO	47
7. REFERÊNCIAS	48
ANEXOS.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida do <i>P. guepinii</i> , agente causador da Mancha Foliar.....	17
Figura 2	Antagonismo balanceado entre fungo endofítico e planta hospedeira.....	19
Figura 3	Estrutura química do Taxol.....	20
Figura 4	Espécie vegetal de <i>Taxus bravifolia</i>	21
Figura 5	Mecanismo de ação do taxol sobre as células cancerígenas.....	23
Figura 6	Diagrama esquemático da região ITS, que inclui o ITS 1, ITS2 e 5.8S rDNA e os primer's universais ITS1 e ITS4.....	24
Figura 7	Metodologia de cultivo e obtenção dos extratos brutos para isolamento dos metabólitos produzidos pelos fungos.....	31
Figura 8	Extração de DNA dos gêneros com importância para produção de taxol.....	33
Figura 9	Produto da amplificação do gene ITS, correspondente a região ITS1-5.8S-ITS2 dos gêneros da Micoteca –URM.....	34
Figura 10	Dendrograma construído pelo método ClustalW a partir de fragmentos obtido da região ITS rDNA dos gêneros estudados.....	36
Figura 11	Produto da amplificação dos genes <i>ts</i> , <i>dbat</i> e <i>bapt</i> . A: Amplificação dos genes <i>bapt</i> na ordem: 6852, 5552, 5796, 5764, 5628 e 5576. B: Amplificação dos genes <i>ts</i> na ordem: 5576, 5552, 5796, 6852, 5628 e 5764. C: Amplificação dos genes <i>dbat</i> na ordem: 5576, 5628, 5552, 6852, 5764 e 5796.....	37/ 38
Figura 12	Imagem das cromatografias dos extratos da fermentação. A1: 5552 e A2: 5628; B1: 5764 e B2: 6852.....	40
Figura 13	Verificação do taxol pelo cromatograma de HPLC da espécie 5552 , onde A: Corresponde ao produto da fermentação no 7° dia; B: 14° dia e C: 21° dia.....	42
Figura 14	Verificação do taxol pelo cromatograma de HPLC da espécie 5628, onde A: Corresponde ao produto da fermentação no 7° dia; B: 14° dia e C: 21° dia.....	43
Figura 15	Verificação do taxol pelo cromatograma de HPLC da espécie 5764, onde A: Corresponde ao produto da fermentação no 7° dia; B: 14° dia e C: 21° dia.....	44
Figura 16	Verificação do taxol pelo cromatograma de HPLC da espécie 6852 , onde A: Corresponde ao produto da fermentação no 7° dia; B: 14° dia e C: 21° dia.....	45
Figura 17	Curva padrão do padrão do taxol com diluições seriadas a partir da concentração de 1mg/mL.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variedade de endofíticos produtores de taxol (antitumoral).....	18
Tabela 2	Amostras oriundas da Coleção Micoteca –UFPEURM.....	26
Tabela 3	Componentes das reações de amplificação dos genes ITS 1 e 4 por PCR.....	28
Tabela 4	Primers e condições de amplificação do gene ITS 1 e 4 das amostras da Micoteca –URM.....	28
Tabela 5	Componentes das reações de restrição do gene rDNA das linhagens de <i>Z.mobilis</i> UFPEDA.....	29
Tabela 6	Primers e condições de amplificação dos genes <i>ts</i> , <i>bpat</i> e <i>bapt</i> por PCR.....	30
Tabela 7	Similaridade entre as amostras estudadas e gêneros depositadas no banco de dados Genbank.....	35
Tabela 8	Peso seco referente ao rendimento dos extratos do líquido fermentado.	38
Tabela 9	Rendimento da Biomassa no processo de fermentação dos fungos.....	39

1. INTRODUÇÃO

Micro-organismos endofíticos podem ser entendidos como aqueles que vivem no interior das plantas, habitando, suas partes aéreas, como folhas e caules sem causar aparentemente nenhum dano a seus hospedeiros. Os fungos endofíticos se diferenciam dos patogênicos por não causar doenças às plantas. Essa classificação pode mudar se o equilíbrio entre a virulência do fungo e a defesa da planta sofrer algum tipo de alteração (ARAÚJO, 1995). A maioria das plantas superiores apresenta colonização endofítica. Estes micro-organismos já foram encontrados em diferentes habitat's (TAN & ZOU, 2001).

Acredita-se que existam cerca de 300.000 espécies de plantas em todo o planeta e espera-se que cada uma abrigue uma variedade de espécies de fungos endofíticos (GUO et al., 2008). Os micro-organismos endofíticos, em geral, são fábricas celulares para produção de enzimas e vários metabólitos. Esses metabólitos produzidos por fungos têm sido largamente utilizados e tem servido para inspiração para fármacos inovadores (JIANG e NA, 2000). Atualmente as plantas possuem mecanismos promissores, evolutivamente, e que propiciam uma excelente integração no que diz respeito planta-micro-organismos (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; CAETANO, 2004).

Muitos endofíticos já foram descritos com potencial para o emprego na agricultura e à indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica. Metabólitos secundários são produzidos quando o crescimento microbiano se encontra na fase estacionária, devido ao esgotamento de nutrientes e por isso é causado um estresse ao micro-organismo e há um declínio no crescimento. São frequentemente bioativos e de baixo peso molecular, possui uma extrema importância médica, por apresentar atividade antibiótica, antitumorais e importância farmacêutica, bem como atividades imunossupressoras e tóxicas.

Os genes específicos envolvidos na biossíntese dos metabólitos são organizados em grupos nomeados de *Clusters*, que incluem além das enzimas chaves, as proteínas regulatórias, resistentes à ação tóxicas de outros metabólitos secundários que podem existir (MARTÍN et al., 2005). Na natureza, plantas podem conter micro-organismos que mimetizam a química de sua planta hospedeira, sendo capazes de produzirem o mesmo produto natural da planta (STROBEL, 2003). O fato de o endofítico produzir metabólitos típicos de seu hospedeiro leva a crer que ocorra uma recombinação genética

entre o fungo e a planta (STROBEL, 2003). Em 1993 foi registrado pela primeira vez um fungo produtor de taxol. A planta que pode ser extraída tem um lento crescimento e baixa produção e por isso a importância dos estudos de Stierle, Strobel e Stierle, onde se verificou que o fungo endofítico *Taxomyces andreanea*, encontrado no interior da planta *Taxus brevifolia* produzia taxol em maior quantidade, quando produzido em meio semi-sintético. O taxol é um diterpenóide e tem efeito contra o câncer de mama e o útero.

Alguns trabalhos demonstraram que diferentes espécies de fungos endofíticos produzem taxol. Alguns fungos realizam hibridização com suas plantas hospedeiras e dessa forma propiciam uma diversidade genética no próprio fungo. Isso acontece com *Pestalotiopsis microspora* e essa espécie está relacionada com a produção de taxol (STROBEL, 2002). Geralmente a identificação de fungos se baseia em análises morfológicas, microscópica e macroscópica, porém variâncias como hibridização podem contribuir para que a análise não seja muito confiável e gerar resultados incorretos. O fato é que alguns pesquisadores nem sempre possuem o conhecimento específico para uma análise profunda e por isso não utilizam métodos como o molecular (HORISA, et al., 2009).

Devido a sua especificidade e sensibilidade a PCR é uma ferramenta molecular muito importante para identificação de fungos. A identificação molecular a nível de espécie tem sido baseada na região *ITS* do DNA ribossômico. As regiões *ITS* evoluem muito rápido e por isso são apropriadas a relacionar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. As amostras estudadas nesse trabalho são oriundas da micoteca URM/UFPE, fundada em 1954 pelo Prof^o Augusto Chaves Batista, localizada no Centro de Ciências Biológicas (CCB). Quando fundada, todo o acervo era conservada apenas por óleo mineral e água destilada, mas de acordo com as exigências, foi se adequando a ISO 17025 que prevê a normatização de laboratórios e agora possui técnicas de liofilização e ultracongelamento (-80°C). A micoteca URM identifica, fornece e preserva culturas de fungos e por isso, seis diferentes gêneros foram selecionados para verificação da produção de taxol, através de técnicas moleculares (marcadores específicos) e técnicas que avaliaram a presença/ausência (CCD) e a quantidade (HPLC) do composto em questão.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar molecularmente os gêneros: *Pestalotiopsis guepinii*, *Nigrospora sphaerica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani* e *Glomerella cingulata* depositados na micoteca da UFPE e avaliar o seu potencial para produção de taxol.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Comprovar, mediante resultados moleculares, os gêneros oriundos da micoteca;
- ✓ Investigar nos gêneros fungicos selecionados, três genes específicos para biossíntese do taxol;
- ✓ Avaliar qualitativa e quantitativamente a produção de taxol nos gêneros estudados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Histórico, formas e aspectos morfológicos das espécies associadas à produção de Paclitaxel.

Os fungos pertencem a um vasto grupo de organismos com uma alta diversidade e por isso podem ser encontrados em vários nichos ecológicos, como nos vegetais, animais, solo e água (ALEXOPOULOS et al., 1996). Segundo Hawksworth (2001) o reino Fungi possui cerca de 1,5 milhões de espécies, eles possuem importante papel, como a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas através da decomposição de matéria orgânica, importância econômica para a indústria alimentícia, farmacêutica e para a agricultura (MUELLER et al., 2004). Os mesmos apresentam uma importante associação entre fungos-planta e também podem se apresentar como importantes patógenos de plantas. Esses micro-organismos podem gerar compostos secundários e que são de suma importância para a indústria farmacêutica, como antibióticos, esteróides, e inúmeras outras substâncias bioativas que apresentam diversas aplicações biotecnológicas (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Ainda sobre esses micro-organismos, há uma classe que vem sendo bastante discutida e que deve ser distinguidos dos fungos patogênicos, os endofíticos. Os endofíticos são organismos que sobrevivem em endossimbiose e não produzem sintomas de doenças visíveis em seus hospedeiros. Esse termo é utilizado para descrever a microbiota interna das plantas vivas. Segundo CAO (2012) esses organismos podem passar parte ou todo o ciclo de vida colonizando assintomaticamente os tecidos internos de plantas vivas. Os endofíticos constituem um grupo pouco estudado de organismos produtores de metabólitos secundários com potencial para serem empregados na medicina, na agricultura e na indústria (STROBEL & DAISY, 2003; GUO et al., 2008).

O taxol, paclitaxel, é um tipo de metabólito secundário produzido por alguns fungos que são amplamente discutidos na literatura, como os: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Glomerella cingulata*, *Nigrospora sphaerica*, *Pestalotiopsis guepinii*, *Alternaria alternata* e *Fusarium solani*. O gênero *Colletotrichum* foi descrito em 1837 e compreende várias espécies, podendo se enquadrar entre saprófitas ou patogênicas. Essas espécies podem ser responsáveis por uma doença conhecida como antracnose e podem causar malefícios as plantas. Esse táxon possui coloração muito variada e as

células podem ser encontradas com ramificações laterais do micélio ou agregadas em conidiomatas (células conidiogênicas) (MENEZES, 2002).

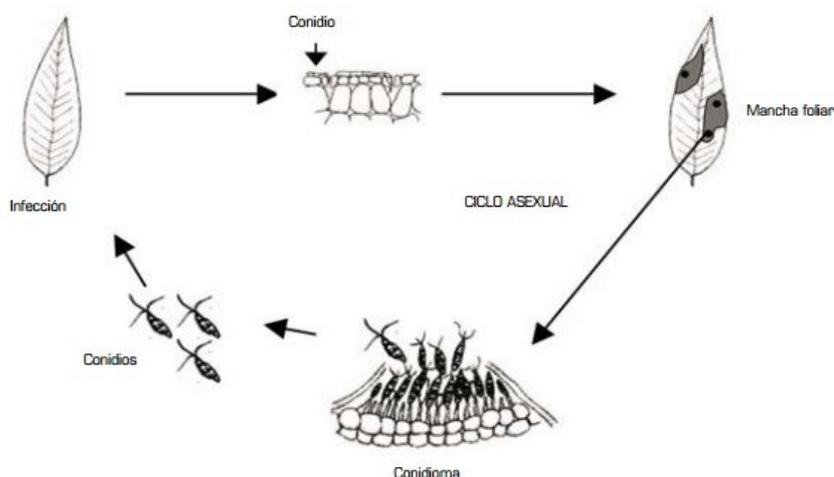
O trabalho de Von arx (1957) explica que em 1898 Stoneman percebeu a ocorrência da espécie *Gloeosporium*, que possui a forma ascógena em antracnose e as colocou em um novo gênero, o *Gnomoniopsis*. O que não se sabia era que esse nome já havia sido ocupado por outro nome em 1892. Então Von Schrenk em 1903, mudou a classificação para *Glomerella*. Logo após, em 1992, Sutton reorganizou o gênero *Vermicularia*. Mais tarde houve ainda uma nova reorganização, onde cinco novos nomes foram empregados. São eles: *Dicladium*, *Ellisieola*, *Vermicularia*, *Colletotrichum* e *Gloeosporium*. O gênero *Colletotrichum* é amplamente distribuído geograficamente, especialmente em lugares quentes e úmidos. São considerados um dos principais patógenos mundiais. A característica de patogenicidade é favorecida em altas temperaturas, entre 22 e 25°C.

Já a variedade *Glomerella cingulata* é um grupo de fungos que estão ligados, principalmente, a patogenicidade e tem uma ampla ocorrência em espécies hospedeiras (CANNON, 2012). Também é conhecido como a forma sexuada da espécie *Colletotrichum gloeosporioides* e causa a principal doença pós-colheita da goiaba, por exemplo, a chamada antracnose ou mancha-chocolate. Além disso, essa variedade tem sido frequentemente isolado de endofíticos (DAMM, 2012). Durante a fase assexuada (mitose), em seu ciclo de vida, as espécies produzem acérvulos dentro do tecido do hospedeiro, contendo conídios curvados e alongados. A reprodução sexuada desse gênero tem baixa ocorrência. Taxonomistas sugerem que o nome desse gênero seja mantido o da forma assexuada, que é o mais utilizado (GAZIS, 2011). Segundo Hersh (2012) a maioria dos membros deste gênero são mal compreendidos em termos de biologia, patogenia e preferência hospedeira.

A espécie *Nigrospora sphaerica* é um fungo filamento demácio e é amplamente distribuído no solo, plantas em decomposição e sementes. Também é considerado um patógeno por causar uma grave doença em vegetais, a podridão radicular vermelha (PVR). Segundo Sehgal (1978) essa espécie foi isolada a partir de lesões cutâneas de um paciente leucêmico, sendo essa espécie a mais conhecida desse gênero. Apesar de ter sido isolado de amostras clínicas, a sua patogenicidade no homem ainda não foi comprovada (FILGUEIRAS et al., 2000). O fungo é denominado como demáceo quando possuem hifas, esporos e blastoconídeos pigmentados. A coloração está

diretamente ligada à presença de melanina. A espécie *Pestalotiopsis guepinii* é o sinônimo do patógeno *Pestalotiopsis maculans* e causa a mancha foliar. Esse patógeno atinge, preferencialmente, arbustos ornamentais e árvores. Apesar de não causar a morte das plantas atacadas, retardam seu crescimento e reduz, significativamente, o seu valor ornamental. Esse gênero se caracteriza por formar conidiomas acervuloides que se formam nas lesões necróticas do limbo foliar (Figura 1).

Figura 1: Ciclo de vida do *P. guepinii*, agente causador da ManchaFoliar.



Fonte: TRAPERO, 2003.

A espécie *Alternaria alternata* também é conhecida como um importante patógeno vegetal. São ubíquas no ambiente, ou seja, seus esporos espalham-se pelo ar e podem ser encontradas no solo e na água (Weber, 2001). Os esporos podem ser encontrados de forma simples ou em longas cadeias. Esse micro-organismo pode atacar o estado de plântula, e provocar desfolhação e redução dos rendimentos. A doença se caracteriza pela produção de manchas e necroses foliares. Esse patógeno tem um amplo círculo de hospedeiros, podendo causar sintomas em espécies de diversas famílias de plantas.

Segundo Luginbuhl (2010) o gênero *Fusarium* pertence a um grande grupo de fungos importantes para a indústria farmacêutica e tecnológica. A espécie *Fusarium solani* está representada por 32 espécies e 18 variedades, e tem como sinônimo denominada de *Fusarium javanicum* (INDEX FUNGORUM,2011). Essa espécie foi descrita pela primeira vez por Von Martius em 1842 com o nome de *Fusisporium solani*. Com o tempo à espécie foi mudada para o gênero *Fusarium* pelo micologista A. Saccardo em 1881, e *F. solani* foi descrito por Snyder e Hansen em 1941, que completa um amplo campo de espécies distribuídas por todo o mundo que apodrece raízes e

caules em varias espécie de plantas (LUGINBUHL, 2010). É um fungo patogênico, responsável por causar o apodrecimento do caule de ervilha, síndrome da morte súbita da soja, podridão do pé de feijão e podridão seca de batata (LUGINBUHL, 2010). *F. solani* é uma das poucas espécies desse gênero que são encontrados no solo, são observados em campos úmidos e áreas temperadas.

3.2 Fungos Endofíticos

Os fungos endofíticos foram descobertos por Darnel, na Alemanha, em 1904. Desde então, diversos pesquisadores vem estabelecendo definições para melhor descrever esse termo. Há vários relatos de que endofíticos podem se tornar parasitas sob determinadas condições (SCHULZ; BOYLE, 2005). Porém a maioria dos relatos foi baseada no conhecimento de que essa classe é defensora das plantas por viver mutualmente (GRAYER et al., 2001). Os endofíticos se diferem dos patogênicos por não causar nenhuma doença à planta hospedeira. Segundo Saikkonen (1998) os fungos endofíticos surgiram a partir dos patogênicos e desenvolveram uma íntima relação, o que permitiu uma extensão dos períodos de latência e redução da virulência. Há uma vasta variedade desses micro-organismos, por várias partes do mundo, responsáveis pela produção de metabólitos secundários e que possuem uma íntima relação com compostos bioativos antitumorais (Tabela 1).

Tabela 1: Variedade de endofíticos produtores de taxol (antitumoral).

Origem	Endofítico	Planta Medicinal Hospedeira	Composto	Atividade Biológica
EUA (2)	<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i>		
China	<i>Periconia sp.</i>	<i>Torreya grandifolia</i>		
Austrália	<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	<i>Wollemia nobilis</i>		
Austrália	<i>Xylaria sp.</i>	<i>Wollemia nobilis</i>		
Austrália	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Wollemia nobilis</i>		
Alemanha	<i>Pestalotiopsis sp.</i>	<i>Taxus baccata</i>	Taxol	Anticancerígeno
Hungria	<i>Pestalotiopsis sp.</i>	<i>Torreya grandifolia</i>		
Nepal	<i>Pestalotiopsis microspora</i> <i>Pestalotiopsis heterocornis</i>	<i>Taxus wallachiana</i>		
Venezuela (13)	<i>Stegolerium kukenani</i>	<i>Stegolepsis guianensis</i>		

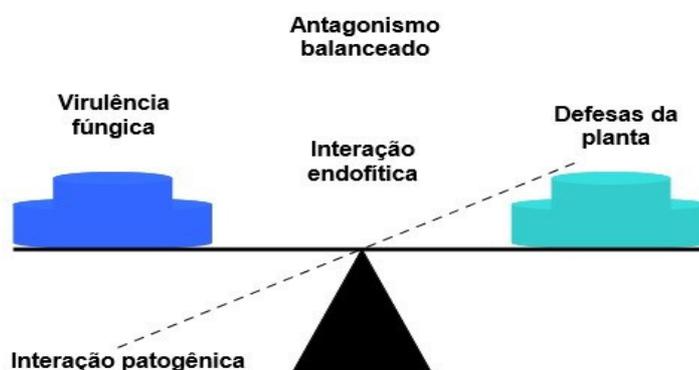
Fonte: SCHULZ et al., 2002.

É conhecida a grande diversidade de metabólitos secundários que são biossintetizados pelos fungos endofíticos e que apresentam rota metabólica variada. Existe uma diferença notável em estruturas inéditas e extratos bioativos que são produzidos por endofíticos e os que são produzidos por fungos do solo. Isso se deve pelo favorecimento da interação simbiônica (SCHULZ et al., 2002); e modo de transmissão de fungos endofíticos.

3.3 Interação Fungo-Planta

A estreita relação entre fungo endofítico-planta hospedeira é caracterizada pelo equilíbrio entre a virulência do fungo e a defesa da planta (Figura 2). Esse equilíbrio pode sofrer alterações quando o hospedeiro sofre algum tipo de stress ou mudanças fisiológicas em alguns organismos envolvidos. Perturbação nesse balanço resulta no desenvolvimento de doenças.

Figura 2: Antagonismo balanceado entre fungo endofítico e planta hospedeira.



Fonte: STROBEL, 2003

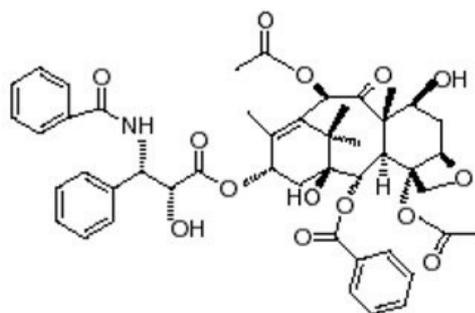
A figura 2 mostra a possibilidade de um mutualismo-antagonismo. Isso pode ser verificado através da liberação de metabólitos tóxicos produzidos pelos fungos contra a planta. O objetivo é que o equilíbrio entre a interação endofítico-hospedeiro se mantenha e dessa forma não desenvolva de doenças. Se esse equilíbrio for quebrado a favor do fungo, o endofítico passa a ser patogênico. Segundo Saikkonen (1998), a relação de simbiose estabelecida entre o fungo e a planta hospedeira pode variar de comensalismo a mutualismo, e mesmo, parasitismo. Esses limites irão variar de acordo

com o equilíbrio entre a defesa da planta e os nutrientes que os endofíticos necessitam. O endofítico proporciona à planta resistência contra herbívoros, a patógenos e a estresses abióticos, ou ainda, pode potencializar a sua capacidade competitiva pela produção de determinados metabólitos, além da produção de hormônios de crescimento; enquanto os endofíticos recebem proteção e alimentos (STROBEL, 2003).

3.4 Fungos endofíticos como fonte de produtos bioativos

Os produtos naturais são em sua maioria compostos de baixo peso molecular, esses são produzidos em resposta a condições ambientais. Segundo Vieira (2008) esses metabólitos não são essenciais para crescimento e são compostos com uma bioquímica particular, pois apresentam peculiaridades quanto a sua estrutura. Percebe-se que essas alterações só aparecem quando os micro-organismos passam por um stress hídrico, de nutrientes, salinidade e etc (STROBEL et al., 2005). Segundo Stone (2000) não é possível promover essas mesmas modificações em laboratório, pois fatores como temperatura, composição do meio, podem interferir na qualidade e na quantidade de produto. Segundo Carlile et al., 1997, a produção de metabólitos secundários são produzidos durante a fase estacionária, quando os nutrientes são esgotados e o crescimento sofre um declínio. Em algumas espécies de fungos são observadas algumas modificação, como a hibridização de endofítico e sua planta hospedeira, o que confere uma diversidade genética e com isso a formação de novos compostos bioativos (Saikkonen et al., 1998). Esse mecanismo é observado no gênero *Pestalotiopsis* (STROBEL, 2002) e está relacionado com a produção de taxol (Figura 3).

Figura 3: Estrutura química do Taxol.



Fonte: STROBEL, 2003

O taxol é um composto antitumoral encontrado em árvores de lento crescimento e por isso deve-se levar em conta a importância da produção desse composto como metabólito secundário.

3.5 O Paclitaxel (Taxol)

O paclitaxel é obtido a partir de espécies vegetais de *Taxus brevifolia* (Figura 4). É um diterpeno com intensa atividade antitumoral por causa de seu modo único de ação sobre o sistema de células de microtúbulos. Devido a enorme dificuldade associada à obtenção de plantas que crescem na natureza, culturas de células vegetais são consideradas a abordagem mais favorável e ambientalmente sustentável para a sua produção a nível industrial. Outros autores comprovaram que outros gêneros de fungos endofíticos de outras espécies de plantas também são capazes de produzirem taxol e outros compostos de importância biológica e por isso verifica-se que do ponto de vista ecológico e biotecnológico que essa descoberta é de extrema importância, uma vez que o taxol era extraído apenas de casca da planta, onde eram necessários cascas de mais de 1000 árvores, cada uma com idade de maturação considerável, para se obter um 1 kg de Taxol, fato que quase levou a extinção desta importante planta medicinal (STINSON, 2003).

Figura 4: Espécie vegetal de *Taxus bravifolia*.



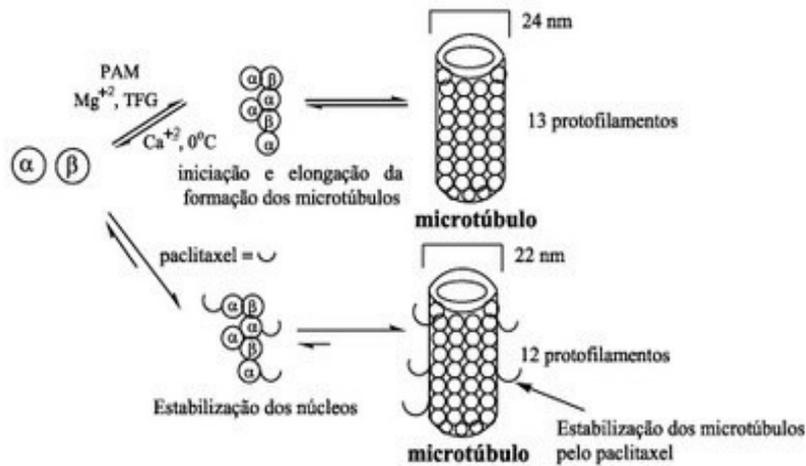
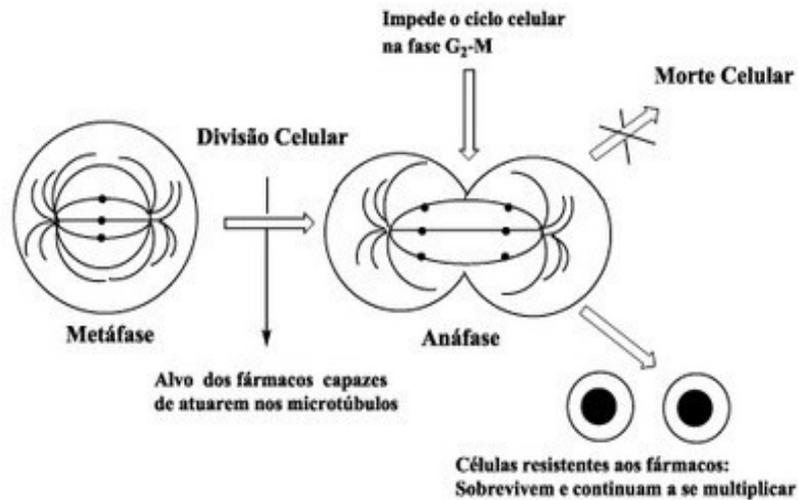
Fonte: Google.com/imagens

O interesse pelo taxol foi intenso a partir dos anos 80, quando vários grupos de pesquisa passaram a tentar viabilizar metodologias sintéticas para sua obtenção em maior escala. O taxol e seu análogo taxotere possuem duas subunidades estruturais distintas: uma subunidade central, com vários centros estereogênicos caracteriza o esqueleto fundamental taxânico e outra representada pela cadeia lateral composta de um amino-ácido α -hidroxilado esterificando uma hidroxila secundária do esqueleto central, com apenas dois centros estereogênicos. A síntese total do taxol é um desafio para os químicos, devido a complexidade da molécula. A síntese química total só é viável quando o composto de interesse possui estrutura simples, com nenhum ou poucos centros quirais. As reservas naturais, as vezes, são a única opção para compostos como o taxol. Sendo que essa reserva não é inesgotável e por isso seu extrativismo tem consequências nefastas.

3.6 Mecanismo de ação (Uso terapêutico)

A principal aplicação do paclitaxel é o uso terapêutico e o funcionamento se dá pela inibição da replicação celular, uma vez que se liga especificamente a subunidade beta-tubulina dos micotubulos e fixa-os. Esse composto induz a apoptose das células com a proteína inibidora da apoptose BCL-2 das células mitóticas (Figura 5). Quando existem células cancerígenas, essa divisão ocorre de forma desordenada e descontrolada. É nesse momento que o Taxol é importante, pois ele age na célula defeituosa impedindo a mitose. O semi-sintético do taxol, o paclitaxel, está ganhando cada vez mais espaço em tratamento de tumores, como: mama, pulmão, ovários, cólon, cabeça e pescoço. Mesmo já tendo uma imensa aceitação em tratamentos de tumores, o taxol ainda não é largamente utilizado devido ao alto valor comercial (STROBEL et al., 1996). Esse composto é muito eficaz, porém apresenta alguns efeitos colaterais como: alergias na pele, cardiotoxicidade e alterações nas funções do fígado. No final de 1989, o grupo americano de Robert Holton desenvolveu uma rota para o taxol semi-sintético, com rendimento duas vezes maior que o processo anterior. Em 1992, Holton patenteou um processo melhorado com um rendimento de 80% e começou a fabricar paclitaxel, na Irlanda, a partir do 10-deacetilbacatina, isolada do Teixo europeu.

Figura 5: Mecanismo de ação do taxol sobre as células cancerígenas.



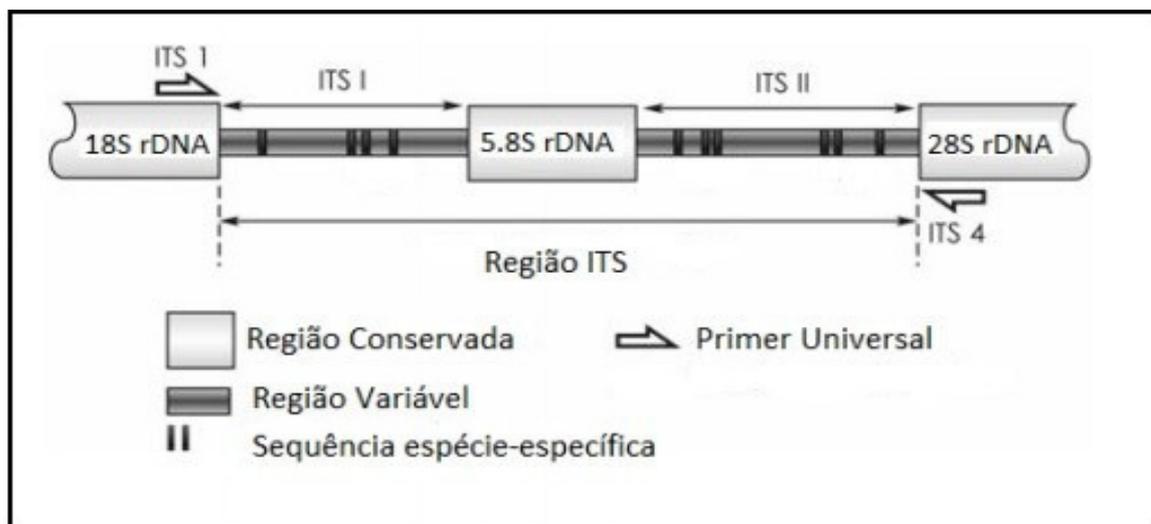
Fonte: qnint.s bq.org.br

A produção de paclitaxel usa células de *Taxus* que crescem em meio aquoso, em grandes tanques de fermentação. O taxol é extraído diretamente, purificado por cromatografia e isolado por cristalização. Comparada com a semi-síntese, o processo reduz a quantidade de reagentes e requer bem menos energia.

3.7 A importância da identificação Molecular

Uma alternativa para a identificação e diferenciação de espécies de Micro-organismos em geral é com o uso de PCR. A utilização de primer's específicos para determinadas regiões garantem uma identificação altamente confiável. As regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) do RNA ribossomal são regiões conservadas do DNA capazes de auxiliar no estabelecimento de relações filogenéticas e distinção de espécies (CHEN et al., 2004). A identificação de micro-organismos, em especial os fungos, tem sido realizada por meio de regiões ITS que fornecem a possibilidade da identificação de gêneros dos mesmos, pela amplificação e sequenciamento desses isolados confrontados com banco de dados (AZEVEDO et al., 2002), possibilitando sua utilização futura em processos biotecnológicos. Devido a sua especificidade e sensibilidade a PCR é um método importante e bastante utilizado para identificação de fungos. A identificação a nível molecular, muitas vezes, se dá pelo uso da região ITS do DNA ribossômico. O DNA que codifica para o RNA ribossomal apresenta-se como um Cluster gênico, onde se encontra os genes 18S, 5.8S e o 28S (Figura 6).

Figura 6: Diagrama esquemático da região ITS, que inclui o ITS 1, ITS2 e 5.8S rDNA e os primer's universais ITS1 e ITS4.



Fonte: HORISA et al, 2009.

3.8 Identificação do composto alvo

Mesmo com todos os avanços tecnológicos de equipamentos que possuem métodos robóticos e automatizados, a identificação do composto alvo ainda é um grande desafio. Isso por que, deve haver uma forte interação entre a química e a biologia e vice-versa, ou seja, uma relação multidisciplinar. Nos últimos anos a sensibilidade dos aparelhos aumentou e com isso a possibilidade da elucidação de novos compostos vem aumentando consideravelmente. No início do século 21 as técnicas cromatográficas de isolamento passaram por um grande progresso, equipamentos como LC-MS e HPLC-UV-VIS foram e continuam sendo elementos viáveis para a caracterização de novos metabólitos (BÉDYŠ, 2005).

Dessa forma, o interesse de produtos produzidos por micro-organismos vem crescendo exponencialmente por seu uma fonte ecologicamente correta (PUPO; GALLO, 2007).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

Foram utilizados seis gêneros, previamente obtidas de diferentes fontes, locais e ano de isolamento, depositados na Micoteca do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, UFPEURM (Tabela 2) (SOUZA et al.,2007). Todas as amostras foram mantidas liofilizadas e/ou em óleo mineral. Para a execução deste presente estudo, as amostras foram reativadas em meio padrão BDA (Batata Dextrose Ágar); Repicados contínuos a cada 15 dias.

Tabela 2: Amostras oriundas da Coleção Micoteca - URM

MICOTECA	-URM	AMOSTRAS	FONTE DE ISOLAMENTO
URM	5576	<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	Água
URM	5628	<i>Nigrospora shaerica</i>	<i>Indigofera suffruticosa</i> vulgarmente conhecida como anil.
URM	6852	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Folha da planta medicinal <i>Plantago</i> <i>major l.</i>
URM	55552	<i>Alternaria alternata</i>	Endofítico do caule de <i>Lippia sidoides</i>
URM	5796	<i>Fusarium solani</i>	Solo
URM	5764	<i>Glomerella cingulata</i>	Folhas do feijão

4.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA total foi utilizado o método padrão CTAB ou CTAB com modificações e variações do método original, descrito por Dellaporta et al., (1983). As amostras foram cultivadas em erlenmeyer de 250 mL, contendo 75 mL meio padrão BD (Batata Dextrose) e incubadas a temperatura ambiente, de forma imóvel. Após 72 horas, as amostras foram submetidas a um sistema de filtração a vácuo para separação do meio de cultura e da biomassa. O meio de cultura foi descartado e a biomassa separada em papel filtro qualitativo.

Cerca de 3g de biomassa foi colocada em microtubos contendo microesferas de vidro com 700 µL de tampão de extração CTAB 2x (Pré-aquecido a 65°C) e submetido ao Fastprep -24, responsável pela maceração das amostras. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho- maria a 65°C por 40 minutos e agitadas em intervalos de 10 minutos. Após a incubação, retirou-se a amostra e aguardou-se chegar em temperatura

ambiente. Em seguida foram adicionados 600 µL de CIA (Clorofórmio – Álcool Isoamílico) e homogeneizado por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 600 µL de CIA e novamente foi centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado Isopropanol gelado na proporção de 1:1 e resfriou a -20°C por período de 30 minutos. Logo após, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 800 xg. O álcool foi descartado e adicionou 800 µL de etanol 70% e homogeneizado por 2 minutos. Novamente as amostras foram centrifugadas, por 2 minutos a 6.000 xg. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Depois de centrifugadas, as amostras foram secadas em temperatura ambiente. Em seguida foram ressuspensas em 40 µL de TE+RNAse, incubadas em banho-maria a 37°C por 30 minutos e estocadas a -20°C.

Para avaliar a qualidade do DNA extraído, foi retirado 1µL de cada amostra, o qual foi misturado a 3µL de tampão (glicose a 15%, azul de bromofenol a 0,25%) e 1µL do corante SYBR Green. Essa mistura foi aplicada em gel de agarose 1%, em tampão de corrida TBE 0,5x. Após a corrida, o gel foi observado em transiluminador de luz ultravioleta e foto-documentado.

4.3 Amplificação e purificação do gene ITS 1 e 4 por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os genes ITS 1 e 4 (ITS1-5.8S-ITS2 rDNA) foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores: ITS1: (5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3') e ITS4: (5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3') (Xiong et al., 2013).

A amplificação das amostras foi efetuada em volume final de 25 uL contendo tampão 10X, dNTPs (10mM.), MgCl₂ (50mM.) e Taq polimerase (2,5 U/µ L), iniciadores (20pmol/cada) e 5 µL da amostra de DNA (Tabela 3). As reações foram realizadas em termociclador (C1000 Thermal Cycler – BioRad), programado com um ciclo inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos, cada ciclo consistindo de uma etapa de desnaturação (95°C por 30 segundos), uma etapa de anelamento (62°C por 60 segundos) e uma etapa de extensão (72°C por 2 minutos) e, por fim, uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos (Tabela 4).

Após o processo de amplificação, cada reação foi avaliada por eletroforese. Para isso, foram adicionados às reações: 3 µL de tampão de amostra e 1 µL de SYBR Green e 5 µl da amostra amplificada. Essa mistura foi aplicada em gel de agarose a 1,2%, em tampão de corrida TBE 0,5x, utilizando como marcador DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). Em seguida, o gel foi observado em transiluminador de luz ultravioleta e foto-documentado.

Tabela 3: Componentes das reações de amplificação dos genes *ITS* 1 e 4 por PCR.

Reagentes	Volume para uma Reação (µL)	Concentração Final
Água Mili Q	13,3	-
Tampão de reação	2,5	1x
MgCl ₂	1,5	2mM
dNTP	0,5	0,2mM
Primer forward	1,0	0,4µM
Primer reverse	1,0	0,4µM
DNA molde	5,0	25ng
Taq polimerase	0,2	0,04u
Total	25	-

Os produtos do gene *ITS* 1 e 4 rDNA amplificados foram purificados, seguindo o protocolo do kit de purificação PureLink (Invitrogen) e em seguida sequenciados em seqüenciador automático de DNA ABI 3100 no LabCen.

Tabela 4: Primers e condições de amplificação do gene *ITS* 1 e 4 das amostras da Micoteca –URM.

Gene	Primers	Sequências	Condições
ITS rDNA	ITS 1	5' – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3'	5 min A 95°C, 30X (30S A 95°C; 60S A 62°C; 2 min A 72°C)
	ITS 4	5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3'	e 5 min A 72°C

4.4 Screening primário da produção de taxol, por fungo, baseado na amplificação Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O screening foi realizado com três sequências conservadas de genes chaves envolvidos na biossíntese do taxol. Os primers utilizados foram *ts* (envolvido na formação do esqueleto de taxano), *dbat* (envolvido na formação de bacatina III), e *Bapt* (envolvido na formação da cadeia lateral em C13 fenilpropanoil) (Tabela 4). As sequências foram sintetizadas pela Integrated DNA Technologies (Coralville, IOWA). A amplificação das amostras foi efetuada em volume final de 25 uL contendo tampão 10X, dNTPs (10mM.), MgCl₂ (50mM.) e Taq polimerase (2,5 U/μ L), iniciadores (20pmol/cada) e 5 μL da amostra de DNA (Tabela 5).

Tabela 5: Primers e condições de amplificação dos genes *ts*, *dbat* e *bapt* por PCR.

Gene	Primers	Sequências (5' – 3')	Condições
MARCADORES	<i>ts</i> – F	CAAACCCATGTCGAATTGAGAAG	5 min A 94°C, 30X (30S A 94°C; 45S A 57°C; 1 min A 72°C) E
	<i>ts</i> – R	CAAGTTTGCATACACTCTGGAATCT	
	<i>dbat</i> – F	GGGAGGGTGCTCTGTTTG	5 min A 72°C
	<i>dbat</i> – R	GTTACCTGAACCACCAGAGG	
	<i>bapt</i> – F	CCTCTCTCCGCCATTGACAA	
	<i>bapt</i> – R	TCGCCATCTCTGCCATACTT	

As reações foram realizadas em termociclador (C1000 Thermal Cycler – BioRad), programado com um ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos, cada ciclo consistindo de uma etapa de desnaturação (94°C por 30 segundos), uma etapa de anelamento (57°C por 45 segundos) e uma etapa de extensão (72°C por 1 minutos) e, por fim, uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos (Tabela 6). As amostras foram selecionadas através da amplificação do gene *ts*, depois pelo gene *bapt* e por fim, o gene *dbat*. A amplificação da PCR foi realizada de acordo com Xiong et al., (2013). Após o processo de amplificação, cada reação foi avaliada por eletroforese. Para isso,

foram adicionados às reações: 3 µL de tampão de amostra e 1 µL de SYBR Green e 5 µL da amostra amplificada. Essa mistura foi aplicada em gel de agarose a 1,2%, em tampão de corrida TBE 0,5x, utilizando como marcador DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). Em seguida, o gel foi observado em transiluminador de luz ultravioleta e foto-documentado.

Tabela 6: Componentes das reações de amplificação dos genes *ts*, *bpat* e *bapt* por PCR.

Reagentes	Volume para uma Reação (µL)	Concentração Final
Água Mili Q	13,5	-
Tampão de reação	2,2	1x
MgCl ₂	2,2	2mM
dNTP	0,9	0,2mM
Primer forward	0,5	0,4µM
Primer reverse	0,5	0,4µM
DNA molde	5,0	100ng
Taq polimerase	0,2	0,04u
Total	25	-

4.5 Análises dos dados

As sequências do gene *ITS* 1 e 4 rDNA das amostras obtidas foram comparadas com outras sequências depositadas no banco de dados Genbank do NCBI usando a ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). A qualidade do sequenciamento foi analisada com o auxílio dos programas Pregap4 4.0 e Gap4 4.0 que fazem parte do Staden.

4.6 Obtenção dos extratos da fase orgânica

Para a obtenção do pré-inóculo, os fungos foram cultivados em placas de petri em meio sólido BDA por sete dias a temperatura ambiente. Em seguida foram feitos blocos de circunferência 6mm e seis desses blocos foram transferidos para erlenmeyers com capacidade de 2L contendo 500 mL de meio líquido BD suplementado (Anexo A). Em seguida foram cultivados a 28°C sob agitação de 160 rpm por 21 dias. As amostras foram feitas em triplicata e a cada 7 dias um erlenmeyer de cada espécie foi retirado (SOUZA et al., 2004; CAFÊU, 2007).

4.7 Extração do metabólito secundário

Figura 7: Metodologia de cultivo e obtenção dos extratos brutos para isolamento dos metabólitos produzidos pelos fungos.



Ao final de cada tempo, ou seja, nos tempos de 7, 14 e 21 dias as amostras foram filtradas para separação do líquido fermentado e biomassa (Figura 7).

4.7.1 Extração do metabólito bioativo da massa celular

A massa celular foi tratada com acetato de etila para extração do princípio bioativo. A cada 1 g de peso úmido da massa celular foram adicionados 10 mL de acetato de etila e colocados sob agitação por 20 minutos a 180rpm para desidratação da biomassa e extração dos metabólitos bioativos intracelulares. Em seguida, foi centrifugado, a fim de separar a fase líquida, extrato do solvente, da fase sólida.

4.7.2 Extração de substâncias bioativas do líquido metabólico

Para a extração do líquido metabólito foi adicionado acetato de etila na proporção de 2:1 (v/v), para a extração do princípio bioativo, os quais foram submetidos à agitação de 180 rpm por 30 minutos. Após este processo, a fase aquosa formada pelo líquido metabólico esgotado e a fase orgânica contendo o solvente com o produto bioativo, foram separados através de um funil de separação por densidade. Os extratos brutos obtidos foram pesados em balança analítica e armazenados em freezer a -20°C.

4.8 Análise de cromatografia em camada delgada (CCD)

De acordo com o screening molecular, quatro, das seis amostras apresentaram pelo menos dois genes para relacionado com a produção do taxol. Para verificação da produção de taxanos pelos fungos 5552, 5628, 5764 e 6852 foi realizada uma triagem dos extratos do líquido metabólico por cromatografia em camada delgada em câmara saturada utilizando placas de alumínio com 0,25 mm de gel de sílica 60 UV254nm (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). O padrão do paclitaxel (Cayman Chemical) foi dissolvido em metanol, e os reagentes de Liebermann-Burchard, anisaldeído- H₂SO₄ e vanilina sulfúrica como reveladores químicos. O sistema de eluição usado foi clorofórmio-acetonitrila (7:3 v/v).

4.9 Análise de Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

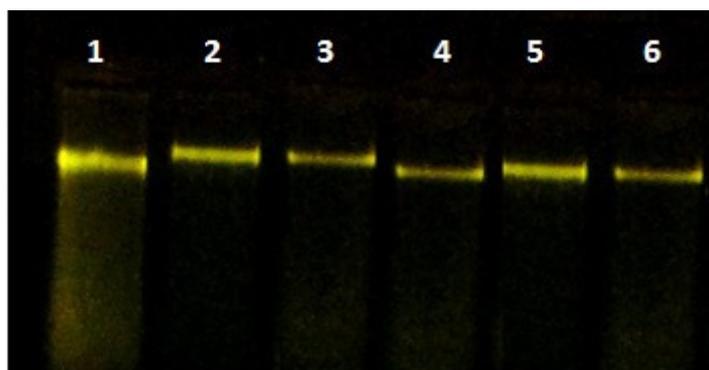
A cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada no Centro de tecnologias estratégicas do Nordeste (CETENE), de acordo com o protocolo de Gangadevi et al. 2007. Os extratos dos fungos foram analisados pela fase reversa de um HPLC analítico Alliance e2695, usando uma coluna RP-C18 de modelo Sunfire, Waters, cujas dimensões 4.6 x 150 mm e fase móvel Metanol/Acetonitrila/Água na proporção 25:35:40, foi utilizada uma vazão de 0.8 mL/min e temperatura de 37°C e volume da injeção 20µL com detecção U.V. Photodiode Array (PDA) Detector, 2998, Waters. As amostras e a fase móvel foram filtradas em filtros microporos com 0,22µm. Para a identificação do taxol, foi utilizado um método IM 4UV TAX ACN MET H2O linha A num comprimento de onda de 232nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração do DNA ribossômico

A metodologia utilizada para a extração de DNA total dos gêneros de fungos estudados mostrou-se eficiente para o isolamento do DNA de todas as amostras, como pode ser observado na figura 8. A concentração de DNA foi mensurada pelo equipamento NanoDrop 2000c. O Nanodrop é preciso e faz a medida na escala ng/ μ L, o equipamento mostra se há contaminação com ácidos nucleicos e proteínas.

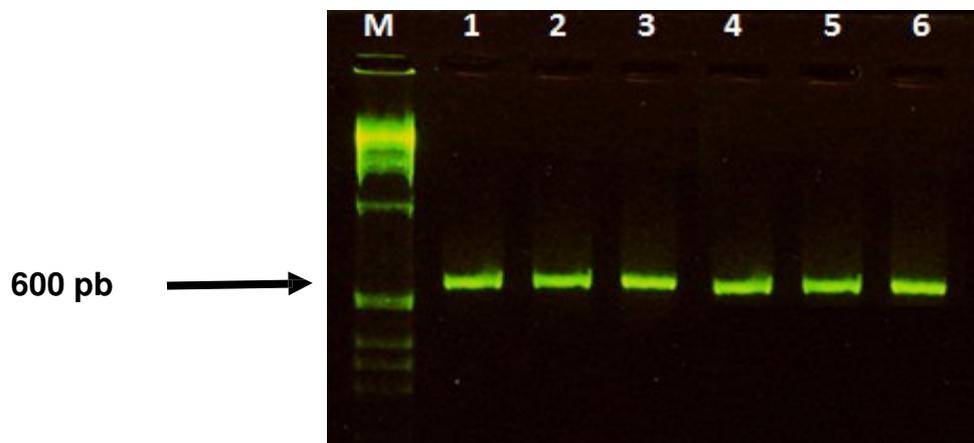
Figura 8: Extração de DNA dos gêneros com importância para produção de taxol, Micoteca-URM. 1: *Pestalotiopsis guepinii*; 2: *Nigrospora sphaerica*; 3: *Colletotrichum gloeosporioides*; 4: *Alternaria alternata*; 5: *Fusarium solani*; 6: *Glomerella cingulata*.



5.2 Amplificação do gene *ITS 1* e *ITS 4* por PCR.

Os produtos da amplificação do gene *ITS 1* e *ITS 4* rDNA dos diferentes gêneros apresentaram um peso molecular de aproximadamente 600 pares de bases, (Figura 9). O tamanho dos fragmentos obtidos está de acordo com os fragmentos da amplificação para esses, descrito na literatura.

Figura 9: Produto da amplificação do gene ITS, correspondente a região ITS1-5.8S-ITS2 dos gêneros da Micoteca –URM. M: Marcador DNA Ladder 100 pb; 1: *Colletotrichum gloeosporioides*; 2: *Glomerella cingulata*; 3: *Alternaria alternata*; 4: *Fusarium solani*; 5: *Pestalotiopsis guepinii*; 6: *Nigrospora sphaerica*.



5.3 Análises das sequências do gene ITS

De acordo com Stackebrant e Goebel (1994), para considerar que isolados pertencem a diferentes espécies é necessário que ela possua uma homologia na sequência do gene ITS rDNA menor que 97%. As sequências do gene ITS rDNA obtidas no presente estudo apresentaram homologia igual ou maior que 99% (Tabela 7) sugerindo confiabilidade do método de sequenciamento em comparação com o método fisiológico e bioquímico realizado pela Micoteca – URM –UFPE. Atualmente a identificação dos micro-organismos da Micoteca vem sendo fisiológica, morfológica e análise de metabólitos secundários, porém não é satisfatória devida às alterações taxonômicas de alguns gêneros de fungos, como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma* (Micoteca–URM).

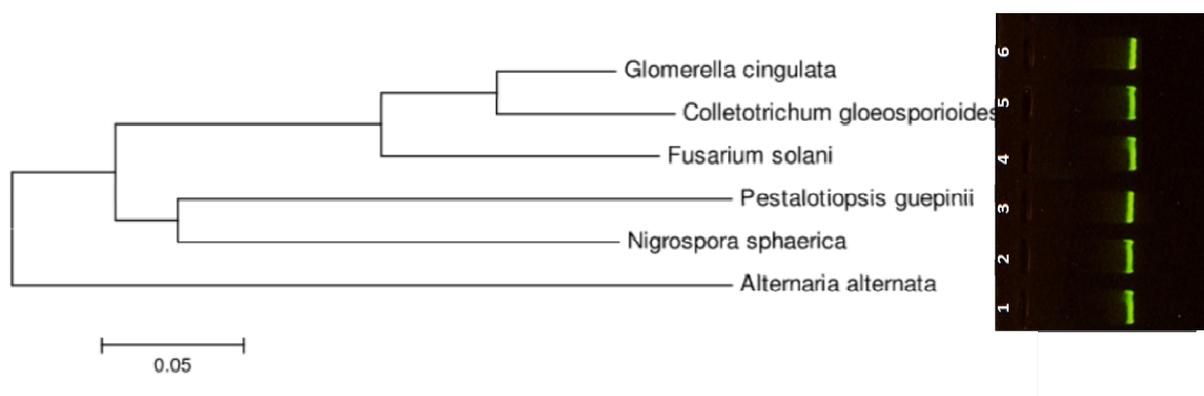
Tabela 7: Similaridade entre as amostras estudadas e gêneros depositadas no banco de dados Genbank.

Fungo	Fonte/Ano	Similaridade (%)	Espécie Similar
		99%	<i>Pestalotiopsis sp.</i>
URM 5576 <i>Pestalotiopsis guepinii</i>	Água/2007		
		99%	<i>Pestalotiopsis microspora strain LK11</i>
URM 5628 <i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Indigofera suffruticosa</i> vulgarmente conhecida como anil/2007	99%	<i>Lasiodiplodia sp.</i>
		99%	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
URM 6852 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Folha da planta medicinal <i>Plantago major</i> l/2012	99%	<i>Glomerella sp.</i>
		99%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
URM 5552 <i>Alternaria alternata</i>	Endofítico do caule de <i>Lippia sidoides</i> /2007	99%	<i>Alternaria alternata</i>
		99%	<i>Alternaria brassicae</i>
URM 5796 <i>Fusarium solani</i>	Solo/2008	100%	<i>Fusarium solani</i>
		99%	<i>Fusarium sp.</i>
URM 5764 <i>Glomerella cingulata</i>	Folhas de Feijão/2008	99%	<i>Glomerella cingulata</i>
		100%	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>

5.4 Análises Filogenéticas

A partir das sequências de ITS1 e ITS4 dos gêneros da Micoteca –URM previamente depositadas no GenBank, foi gerado um dendrograma pelo programa ClustalW. A amplificação do locus ITS1-5.8s–ITS2 do DNA gerou apenas um fragmento de aproximadamente 600-pb para todas as seis espécies estudadas.

Figura 10: Dendrograma construído pelo método ClustalW a partir de fragmentos obtido da região ITS rDNA dos gêneros estudados.



O dendrograma obtido pela análise de agrupamentos com os primers *ITS 1* e *ITS 4* selecionados (Figura 10) evidenciou proximidade genética, refletida em números de agrupamentos, suficientes para discriminar toda as espécies e sua similaridade. Quatro grupos distintos foram delineados apresentando fragmentos comuns entre eles. O primeiro grupo é composto por duas espécies *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* as quais apresentam uma aproximação com o segundo grupo, onde se encontra a espécie *Fusarium solane*; no terceiro grupo se encontram as espécies com similaridade de quase 100%, *Pestalotiopsis guepinii* e *Nigrospora sphaeria* e o quarto grupo podemos encontrar a espécie *Alternaria alternaria* que possui mais aproximação com o terceiro grupo e uma distancia significativa com o primeiro grupo.

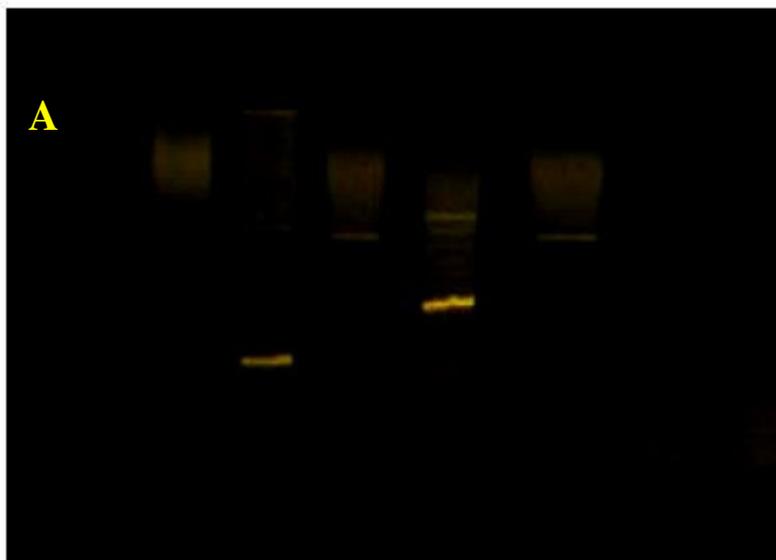
Vários pesquisadores utilizaram o método de ITS para analisar patogenicidade e característica morfológicas. Moriwak et al. (2003), com a finalidade de comparar características morfológicas (baseados em van Arx 1957) com o marcador molecular ITS1, analisaram espécies do gênero *Colletotrichum*, incluindo *C. gloeosporioides*, e propôs uma nova espécie *C. boninense*. Vinnere et al. (2002), por análise da região ITS1-5.8s-ITS2, também conseguiram distinguir as espécies de *C. acuntatum*, *C.*

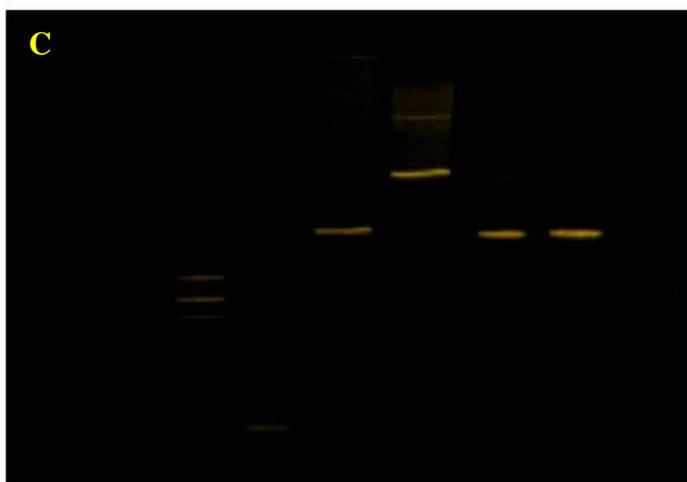
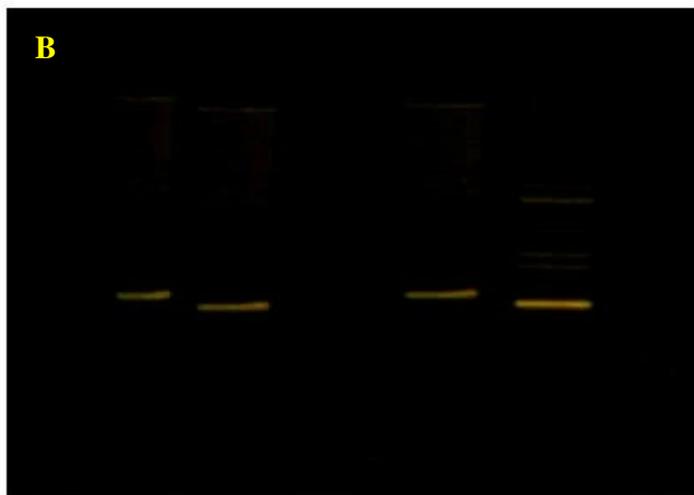
gloeosporioides e *C. dematium*, entre isolados identificados da forma clássica como sendo *C. gloeosporioides*.

5.5 Screening primário da produção de taxol, por fungo, baseado em PCR

Apenas a espécie 6852 depositada na micoteca URM/UFPE apresentou os genes *ts*, *bapt* e *dbat* na amplificação. Já a 5764 apresentou os genes *ts* e *bapt* e o 5628 apresentou os genes *dbat* e *bapt*. Os genes *ts* e *dbat* são essenciais para a biossíntese do taxol (XIONG, Z., 2013). Esses resultados demonstram que esses gêneros são capazes de produzir as enzimas necessárias para a rota metabólica da produção do taxol (Figura 11). Para as demais espécies não foi observado amplificação desses genes. O screening molecular é considerado um método rápido e eficiente, porém deve estar associado a um screening tradicional, que se baseia na produção de um composto para posterior quantificação e indicativo da presença do mesmo, pois a nível de DNA não se pode afirmar que a presença do gene está ligado a sua expressão (XIONG, Z. et al, 2013). Atualmente apenas os marcadores *ts*, *bapt* e *dbat* são usados com marcadores moleculares para o rastreamento primário de taxol por micro-organismos (ZHOU. X. et al, 2007).

Figura 11: Produto da amplificação dos genes *ts*, *dbat* e *bapt*. **A:** Amplificação dos genes *dbat* na ordem: 5576, 5628, 5552, 6852, 5764 e 5796 **B:** Amplificação dos genes *ts* na ordem: 5576, 5552, 5796, 6852, 5628 e 5764. **C:** Amplificação dos genes *bapt* na ordem: 6852, 5552, 5796, 5764, 5628 e 5576.





5.6. Extratos na fase orgânica

5.6.1. Líquido Fermentado (Extracelular)

Na tabela 8 observa-se o rendimento do peso seco do extrato líquido fermentado correspondente a cada gênero. O isolado 5764 foi o que apresentou o rendimento mais elevado frente à amostra 6852 que apresentou o menos rendimento.

Tabela 8: Peso seco referente ao rendimento dos extratos do líquido fermentado.

Fungo em AcOEt	Rendimento (mg) Peso seco
5552	153 mg
	147 mg
	150 mg
5764	182 mg
	161 mg
	164 mg
5628	93 mg
	87 mg
	88 mg
6852	78 mg
	65 mg
	71 mg

5.6.2. Biomassa (Intracelular)

Em relação ao rendimento da biomassa (Tabela 9), foi observado um valor muito baixo, não sendo viável a realização da análise do CCD e do HPLC. Diferentemente do observado no líquido fermentado onde foi possível realizar os testes com a concentração de 1mg/mL em todas as amostras. Mesmo com a sensibilidade do equipamento HPLC, se faz necessário uma quantidade de no mínimo 2 mg, pois o uso total de extrato bruto é de 2mg em 4mL de solvente.

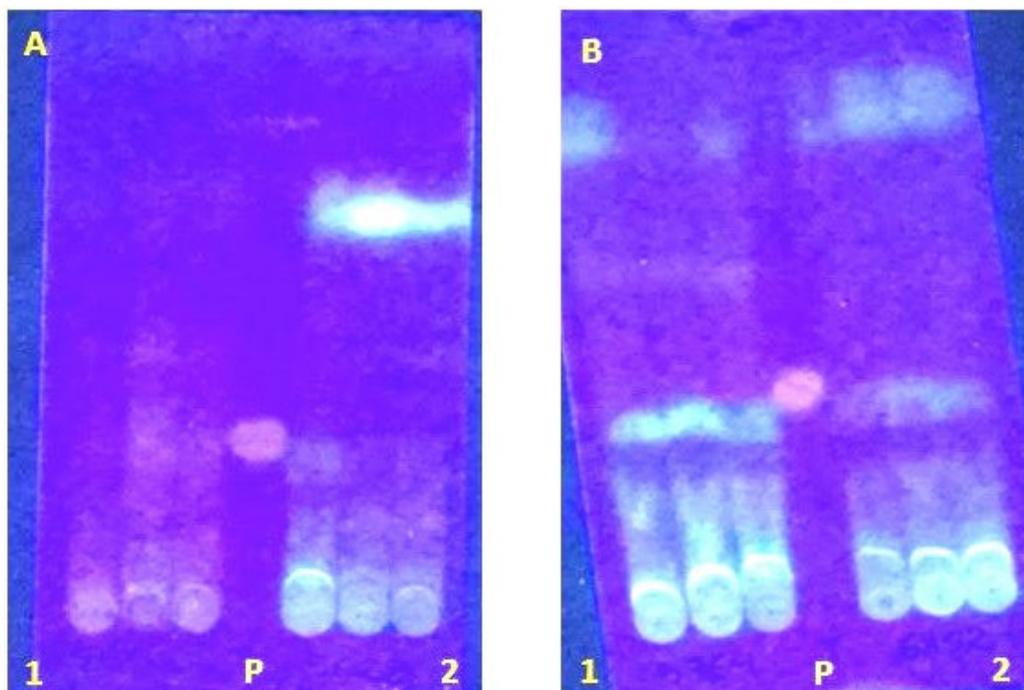
Tabela 9: Rendimento da Biomassa no processo de fermentação dos fungos.

Fungo em AcOEt	Rendimento (Biomassa)	Rendimento (mg) –		Rendimento (%)
		Peso	seco	
5552	4000 mg	0,5	mg	0,125%
5764	3000 mg	0,3	mg	0,010%
5628	3000 mg	0,5	mg	0,016%
6852	4000 mg	1	mg	0,025%

5.7. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Em nenhum dos extratos avaliados foi possível à identificação de paclitaxel nestas condições experimentais. Após revelação com os três reagentes utilizados, sendo eles: Liebermann-Burchard, Anisaldeído- H_2SO_4 e Vanilina sulfúrica (Anexo B, C e D), o mesmo apresentou coloração azul escura, quase negra, com Rf 0,4. Porém na figura 12 se observa uma aproximação do padrão (P) com a amostra 5628 (A)(1). Essa aproximação foi confirmada com o uso da técnica de HPLC que mostrou que a amostra 5628 (A)(1) realmente possui, em baixa quantidade, o paclitaxel de acordo com o padrão adquirido. Dessa forma, verifica-se a importância de otimizar o processo de fermentação dessa amostra. As amostras foram ressuspensas em metanol para a aplicação na placa de alumínio.

Figura 12: Imagem das cromatografias dos extratos da fermentação. A1: 5552 e A2: 5628; B1: 5764 e B2: 6852.



5.8. Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC)

Na análise de HPLC a espécie 5628 (Figura 13) apresentou um tempo de retenção muito próximo ao padrão nos três tempos, 7, 14 e 21 dias, o que sugere que nessa determinada espécie houve a detecção do taxol, porém o equipamento não foi capaz de quantificar devido à baixa concentração do paclitaxel na amostra, ou seja, abaixo da faixa de quantificação do equipamento. A impureza das amostras também pode influenciar na faixa de quantificação do equipamento. Portanto, para a espécie 5628 fica evidente que se faz necessário uma otimização na fermentação para oferecer melhores condições para uma maior produção do metabólito de interesse. Na cepa 6852 (Figura 14) não houve detecção de taxol, porém nas espécies 5764 e 5552 houve detecção, ambas no 7º dia. Assim como a cepa 5628, as cepas 5764 e 5552 (Figura 15 e 16) não foram quantificadas pelo equipamento que estava com uma curva de calibração (Figura 17) de dez pontos, ou seja, 10 diluições. A primeira concentração do padrão foi de 1mg/mL e os demais pontos foram obtidos através de uma diluição seriada.

Figura 13: Verificação do taxol pelo cromatograma de HPLC da espécie **5628**, onde **A:** Corresponde ao produto da fermentação no 7° dia; **B:** 14° dia e **C:** 21° dia.

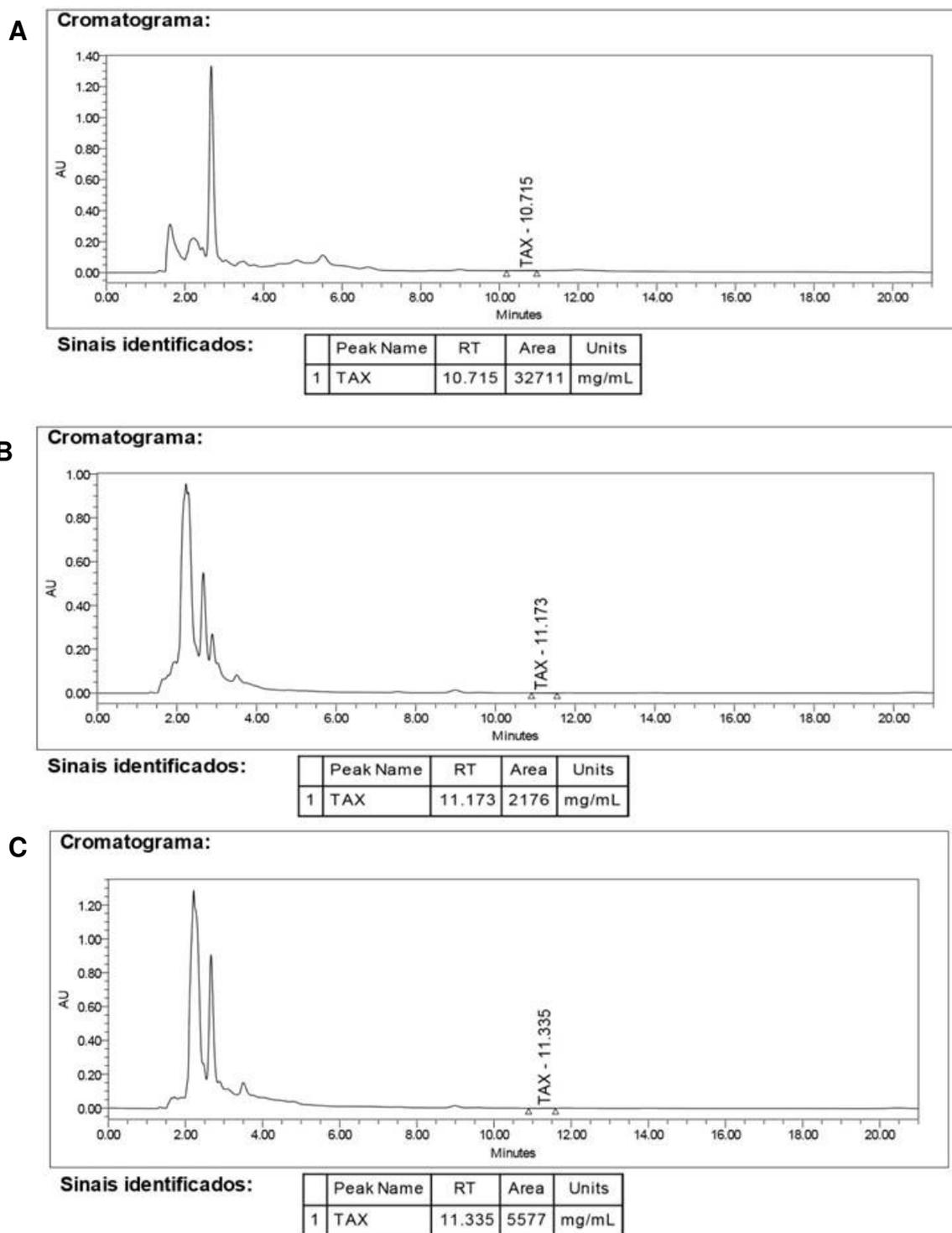


Figura 14: Verificação do taxol pelo cromatograma de HPLC da espécie **6852**, onde **A:** Corresponde ao produto da fermentação no 7° dia; **B:** 14° dia e **C:** 21° dia.

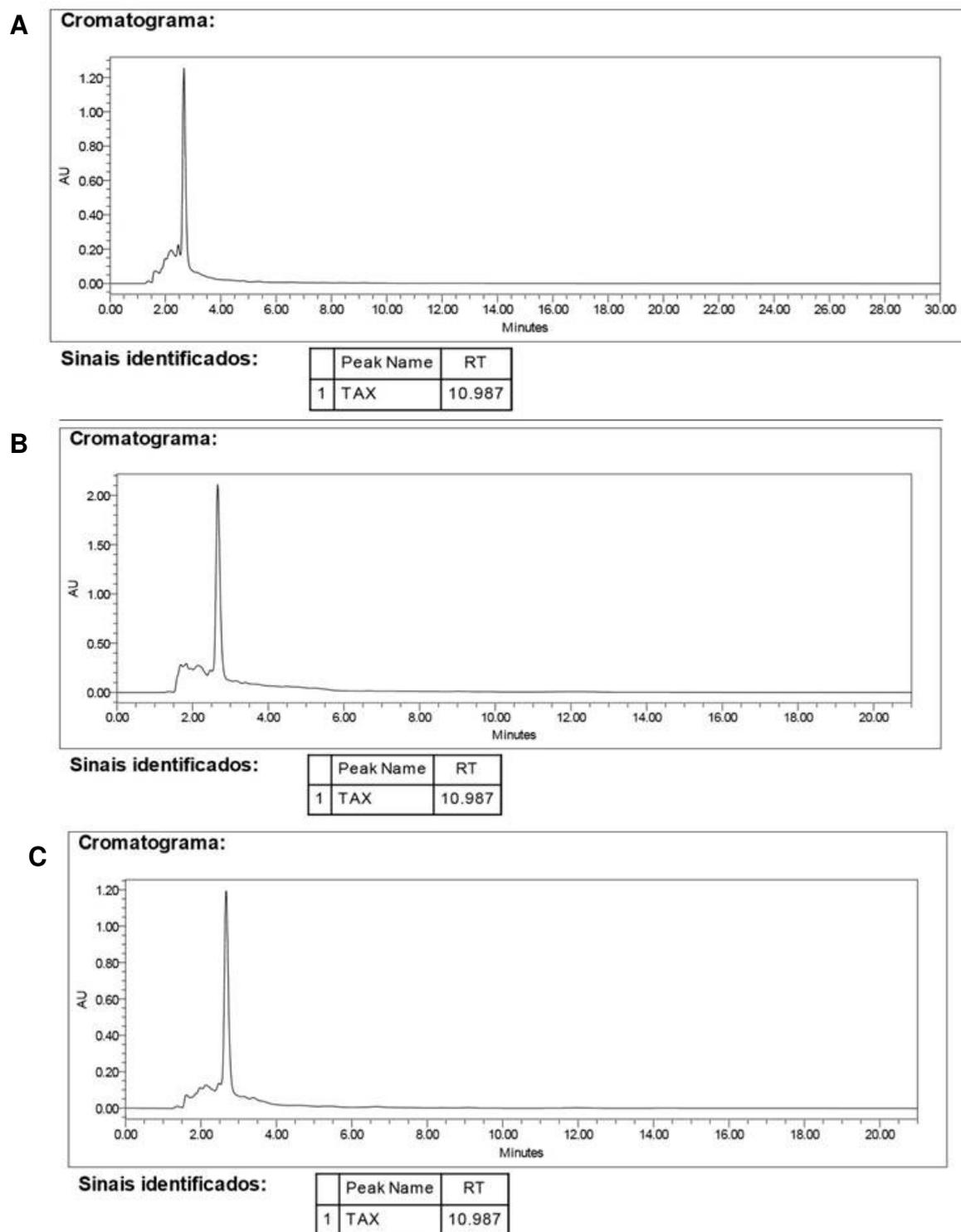


Figura 15: Verificação do taxol pelo cromatograma de HPLC da espécie 5764, onde **A:** Corresponde ao produto da fermentação no 7° dia; **B:** 14° dia e **C:** 21° dia.

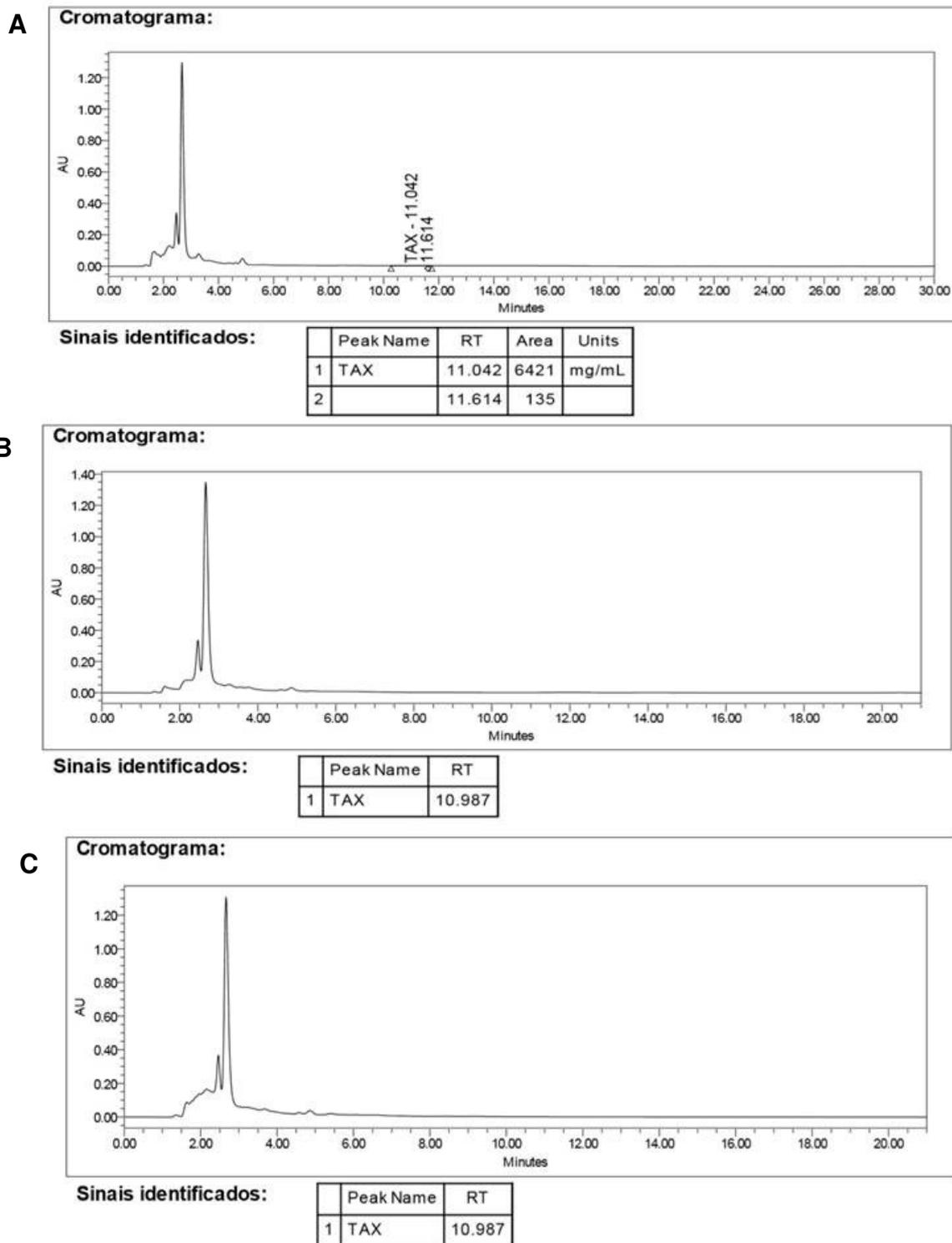
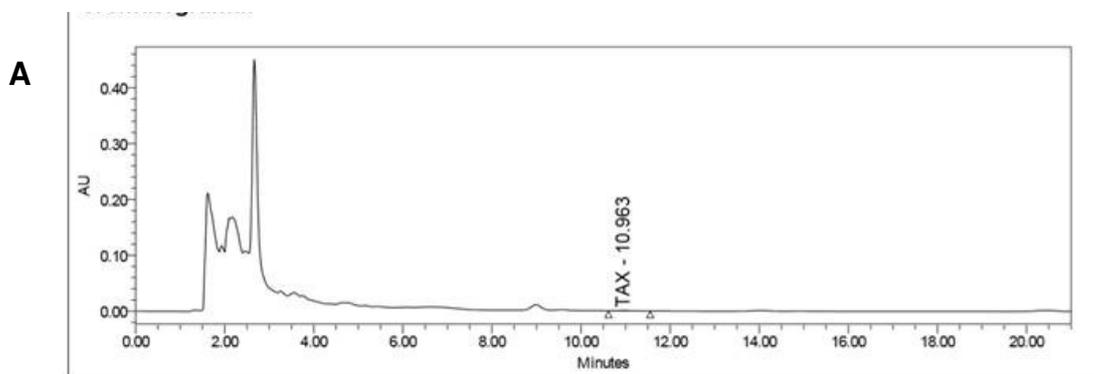
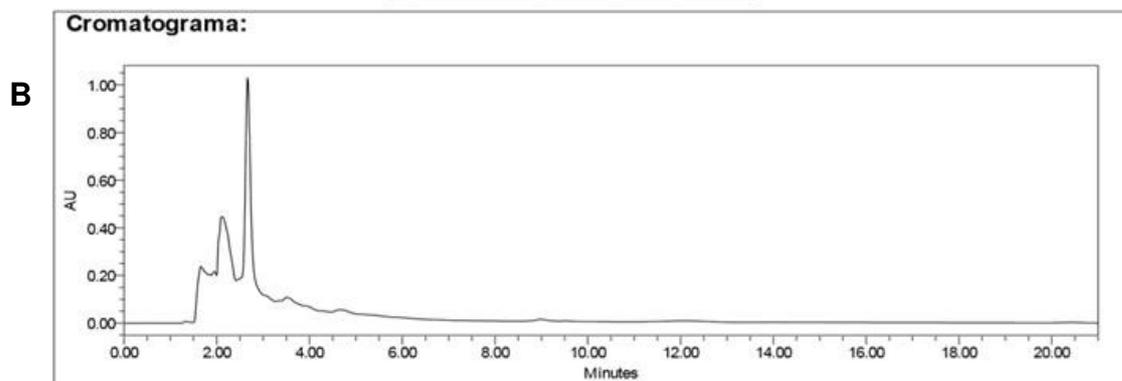


Figura 16: Verificação do taxol pelo cromatograma de HPLC da espécie **5552**, onde **A:** Corresponde ao produto da fermentação no 7^o dia; **B:** 14^o dia e **C:** 21^o dia.



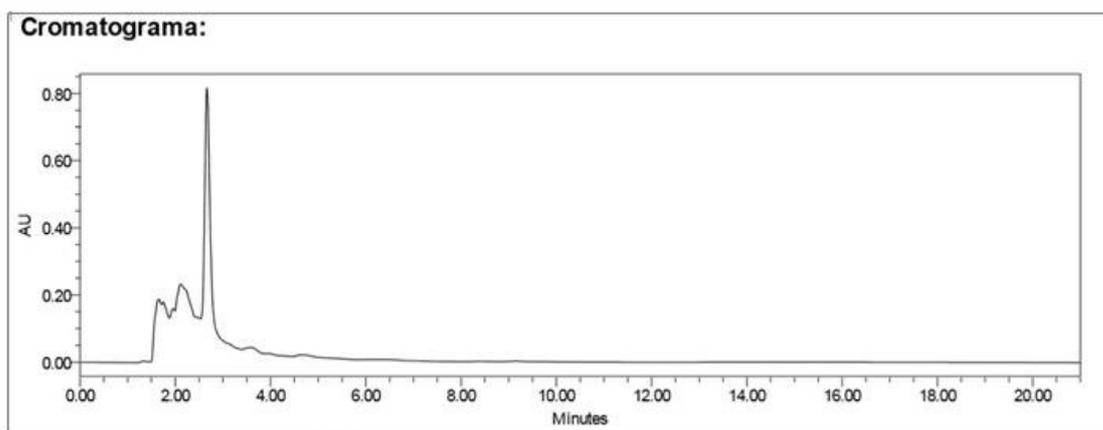
Sinais identificados:

	Peak Name	RT	Area	Units
1	TAX	10.963	6159	mg/mL



Sinais identificados:

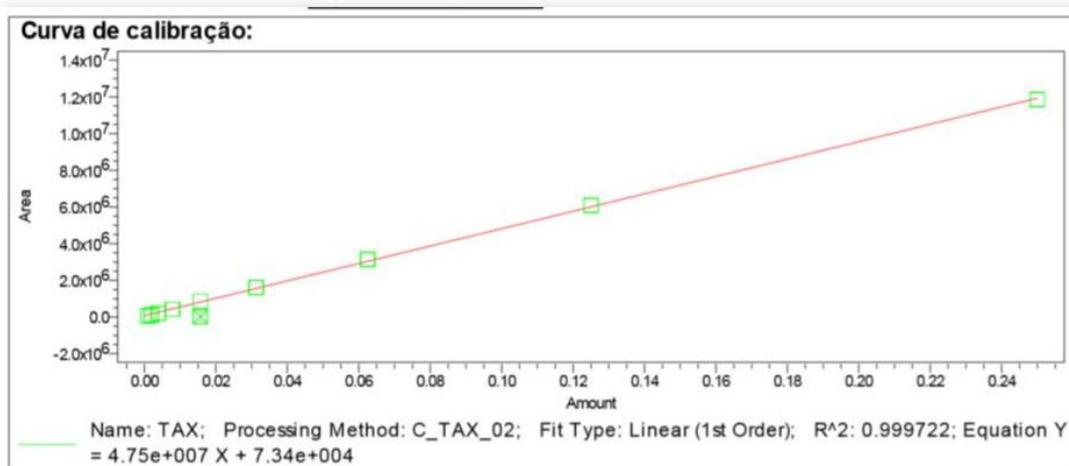
	Peak Name	RT
1	TAX	10.987



Sinais identificados:

	Peak Name	RT
1	TAX	10.987

Figura 17: Curva de calibração do padrão do taxol com diluições seriadas a partir da concentração de 1mg/mL.



6. CONCLUSÃO

A análise das sequências obtidas no presente estudo revelou que as técnicas fisiológicas e bioquímicas utilizadas para identificação de fungos, geralmente, exigem mais tempo, porém tanto o método fisiológico, como o método de sequenciamento é eficiente quando usados em conjunto para confirmação dos gêneros estudados.

Dessa forma, os gêneros estudados foram confirmados através da análise molecular. Além disso, o método utilizado para selecionar os possíveis produtores de taxol foi bastante positivo e das 6 amostras analisadas, quatro apresentaram pelo menos dois marcadores indicativos da produção deste composto.

Verificou-se também que no processo de fermentação, das quatro selecionadas como possíveis produtoras, três apresentaram resultados compatíveis com a produção do taxol, embora em baixa concentração o que indica que precisará de uma continuidade para otimização do processo de fermentação e extração do metabólito de interesse.

7. REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. 1996. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons, Inc. 865p.
- ARAÚJO, WL, 1995. **Isolamento, identificação e caracterização genética de micro-organismos endofíticos de 11 porta-enxertos de citros**. Piracicaba. Resumos, p. 111.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR., 2002. W.; ARAUJO, W. L.; PEREIRA, J. O., 2002. **Micro-organismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais**. In: SERAFINI, L. A.;
- BÉDYS, J., 2005. **Bioactive microbial metabolites, a person view**. *Journal of antibiotal*, London, v. 58, p. 1-26.
- CAFEU, M.C. **Estudo químico e avaliação biológica dos fungos endofíticos *Xylária* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolados de *Casearia sylvestris* (Flaucoustraceae)**. Tese (Doutorado em química) – Universidade Estadual Paulista 2007, p. 255.
- CANNON PF., et al., 2012. **Colletotrichum – current status and future directions**. *Studies in Mycology*, 73:181-213.
- CAO SX, You JL, Zhou SN., 2012. **Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and rots en South China**. *World J Microbiol Biotechnol* 202; 18(2):169-71.
- CHEN, C.A., et al., 2004. **Secondary structure and phylogenetic utility of the Ribosomal Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) in Scleractinian corals**. *Zoological Studies*, 43, 759-771.
- DAMM, U., CANNON, PF., WOUDEBERG, JHC., CROUS PW., 2012. **The *Colletotrichum acutatum* species complex**. *Studies in Mycology*. 73:37-113.
- DELLAPORTA et al., 1983. **Dellaporta plant dna extraction**.
- FILGUEIRAS, H.A. et al., 2000. **Frutas do Brasil: Manga. Pós-colheita**. Fortaleza. Embrapa agroindustrial tropical. P. 20 – 25.

GAZIS R, REHNER S, CHAVERRI P. 2011. **Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences.** Mol. Ecol. 20:3001-3013.

GUO, W., TIWARI, G., TANG, J., WANG, S., 2008. **Frequency, moisture and temperature dependent dielectric properties of chickpea flour.** Biosystems Eng. 101, 217-224.

GRAYER, R.J.; KOKUBUN, 2001. **T. Plant – fungal interactions the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants.** *Phytochemistry*, V. 56, p. 253 – 263.

HERSH MH, VILGALYS R, Clark JS. 2012. **Evaluating the impacts of multiple generalist fungal pathogens on temperate tree seedling survival.** Ecology. 93:511-520.

HOLTON R. A. et al., 1994. **The natural products and the modern medicinal chemistry.** p. 116.

HOOG, G. S., J. GUARRO, J., 2000. **Atlas of Clinical Fungi**, 2nd ed, vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

HORISA,WA, et al., 2009. **Qualitative and quantitative PCR methods using species-specific primer for detection and identification of wood rot fungi,** Journal of medicinal of wood Science, 55: 133 – 138.

INDEX FUNGORUM. disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/namesrecord.asp?RecordID=418895>> Acessado em 11/08/2014.

LESLIE, J.F, SUMMERELL, B.A., the Fusarium laboratory – Blackwell Publishing, Oxford, UK; 2006.

LUGINBUHL, S. **A class Project for PP728 Soil borne Pathogens**, 2010. Disponível em: <http://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Fusarium%20solani/Fusarium_solani.htm>. Acessado em 11/08/2014.

MARTÍN, J.F., et al., 2005. **Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication,** 8: 282 – 293.

MUELLER, G.M.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S., 2004. **Biodiversity of Fungi – Inventory and monitoring methods**. In: STONE, J.K.; POLISHOOK, J.D.; WHITE, J.F.J. *Endofitic Fungi*. Elsevier Academic Press, p. 241-270.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C., 2004. **Microorganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas**. Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, Santiago, v. 3, n. 4, p. 69-72.

PUPO, M.T.; GALLO, M.B.C., 2007. **Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais**. Química nova, São Paulo, v. 30, p 1446-1455.

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

SANTOS, O.C.S., et al., 2010. **Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry**, Journal of applied. Microbiology, 108: 375 – 385.

SANTOS, S.N., 2012. **Bioprospecção de biomoléculas isoladas de fungos endofíticos de Combretum leprosum do bioma caatinga**. Tese (Doutorado em ciências) – Escola superior de agricultura “Luiz de queiroz”, p. 46 – 47.

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

SCHULZ, B.; BOYLE, C., 2005. **The endophytic continuum**. Mycology Research. p. 661-686.

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

STINSON. M., EZRA. D., Hess, W. N., SEARS. J., STROBEL. G., **An endophytic Gliocladium sp. of Eucryphia cordifolia producing selective volatile antimicrobial compounds**, Plant Science, 165: 913-922, 2003.

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

STROBEL, G.; DAISY, B. **Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, New York, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

SUTTON, R.S., 1992. **Adapting bias by gradiente descent**.

TALWAR, P., and S. C. SELGAL., 1978. **Mycotic infections of the eye in Chandigarh and neighbouring areas**. Ind J Med Res. 67:929-933.

TRAPERO, A.; ROMERO, M.A.; VARO, R.; SÁNCHEZ, M.E. 2003. **First report of Pestalotiopsis maculans causing necrotic leaf spots in nursery plants of Arbutus unedo and Ceratonia siliqua in Spain**. Plant Disease 87: 1263.

URBEN, A. F. et al.; **Curso de Taxonomia de Fusarium**, Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2009. ZIPCODEZOO disponível em . Acessado em 22/08/2014.

VON ARX J.A, 1957. **Die Arten der Gattung Colletotrichum Cda**. Phytopathol. Zeitschrift 29:413-468.

VON SCHRENK, 1903. **Glomerella Spaulding of timber preservation**. P. 180 – 196.

XIONG, Z.; YANG, Y.; ZHÃO, N.; WANG, Y., 2013. **Diversity of endophytic fungi and screening of fungal paclitaxel producer from Anglojap yew, Taxus x media**. BMC microbiology.

ZHOU X, Wang Z, Jiang K, Wei Y, Lin J, Sun X, Tang K., 2007. **Screening of taxol-producing endophytic fungi from Taxus chinensis var. mairei**. Appl Biochem Microbiol; 43:490–494.

WEBER RW., 2001. **Alternaria alternata**. Ann Allergy Asthma Immunol. 87(5):A-4.

ANEXOS

A. Meio BD suplementado

- Meio pronto Batata dextrose ----- 24g
- Clorafenicol ----- 0,1g
- Fenilalanina ----- 0,04g
- Sulfato de magnésio heptahidratado ----- 2g
- Sulfato de amônio-----12g
- Água destilada -----1000mL

B. Revelador Liebermann-Burchard

- Anidrido acético ----- 5mL
- Ácido sulfúrico ----- 5mL
- Etanol ----- 50mL

C. Anisaldeído- H_2SO_4

- . Anisaldeído ----- 0,5 mL
- Ácido acético ----- 10 mL
- Metanol ----- 85 mL
- Ácido sulfúrico ----- 5 mL

D. Vanilina sulfúrica

- Vanilina ----- 0,5g
- Etanol ----- 45 mL
- Ácido sulfúrico ----- 5mL