

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

Convênio de Cooperação Institucional com a
Universidade Federal do Amazonas

**“ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS DA PUPUNHA (*Bactris gasipaes* Kunth) E
CARACTERIZAÇÃO POR MARCADORES
MOLECULARES”.**

Pedro de Queiroz Costa Neto

MANAUS - AM
2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

Convênio de Cooperação Institucional com a
Universidade Federal do Amazonas

**“ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS DA PUPUNHA (*Bactris gasipaes* KUNTH) E
CARACTERIZAÇÃO POR MARCADORES
MOLECULARES”.**

Pedro de Queiroz Costa Neto

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Evolução do Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde da
Universidade Federal de São Carlos,
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Genética e Evolução, área de
concentração: Genética e Evolução.

MANAUS - AM
2002

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C837if

Costa Neto, Pedro de Queiroz.

Isolamento e identificação de fungos endofíticos da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) e caracterização por marcadores moleculares / Pedro de Queiroz Costa Neto. -- São Carlos : UFSCar, 2002.

86 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2002.

1. Fungos. 2. Fungos endofíticos. 3. Pupunheira - doenças e pragas. 4. DNA ribossomal. I. Título.

CDD: 589.2 (20^a)

Orientador: Dr. José Odair Pereira

A meus pais, Cleiboni e Hedy, à minha avó
Luiza (mãe guia) e tia Francisca Escócio,
espíritos sempre presentes em meu viver.

Dedico

Aos meus filhos Felipe, Wellinson
d'Ângelo e João Cleiboni, como incentivo
para continuarem a lutar nessa jornada
com meu incondicional apoio, sempre.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de adquirir mais conhecimentos, conhecer novas pessoas, fazer amizades e ter mais confiança em mim mesmo. Pois quando Ele age, ninguém tem o poder de impedir sua benção.

À Universidade Federal do Amazonas que sabiamente propicia aos seus funcionários a oportunidade de enriquecimento científico.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela cessão da área para coleta do material vegetal.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram de forma decisiva para a concretização desse objetivo, e em especial:

Ao Prof. Dr. José Odair Pereira, pelas inúmeras oportunidades de enriquecimento científico a mim concedida, disponibilidade de seu tempo, orientação nessa pesquisa, pela amizade e por acreditar em meu trabalho.

Ao Dr. Charles Roland Clement, pesquisador do INPA, que atuou como co-orientador, pela constante colaboração e incentivo, além da amizade.

A todo o corpo docente do Curso de Pós-Graduação em Genética e Evolução, pelas orientações e ensinamentos dispensados durante as aulas ministradas em Manaus/AM e em Jaguariúna/SP.

À Prof^ª. Dra. Maria Inez de Moura Sarquis, pela prestimosa colaboração na identificação dos microrganismos isolados, e principalmente pela atenção, simpatia e amizade.

A todas as pessoas que trabalharam no Laboratório de Genética/ICB, em especial a Elza Quadros, Fábio Pegado, Marytelma Henrique e Alessandra.

Aos colegas dos Laboratórios de Micologia e Microbiologia/ICB, em especial Prof^ª. Dra. Francisca Simas, Prof^ª. MSc. Ormezinda Celeste, Alessandra Drumond, Prof. MSc. Januário Gama e Felipe Cruz, pela colaboração, sugestões, apoio e amizade.

Aos amigos do curso de pós-graduação, agradeço a atenção dispensada e amizade solidificada ao longo do curso. Débora Mesquita, Jucimary Marques, Jeanne e Marta, agora cada um segue seu destino, entretanto, o tempo vivido junto, que seja eternamente lembrado!

Aos amigos Afrânio Melo, Francisco Valentim, Antônia Lima, Ellen Santos, Alessandra Magalhães, Luciana Barbosa, Doriane Rodrigues, Lucivana Souza, Yamile Alencar, Odinéia Forner, Aline Rondon, Márcia de Lorena, Daniel Raid e Jorge Pietro, entre tantos, muito obrigado pelo apoio, incentivo e amizade.

Aos colegas de trabalho do Departamento de Pessoal da UFAM, em especial Jacqueline, Alendre, Rúbia, Dalva e Marilena, obrigado a todos pelo apoio, colaboração e amizade.

Maria Aldenice Melara e Maria Auxiliadora Braz, muito devo a vocês, não somente por sempre acreditarem em mim, mas também, pela amizade e carinho, e por nunca permitirem que a possibilidade da concretização desse sonho fosse impossível.

Aos Professores MSc. Maria das Neves Viana, MSc. Rozana Galvão, MSc. Altair Fernandes e Dra. Izeni Farias, obrigado por sempre estarem dispostos a esclarecer dúvidas e contribuir com sugestões, além do apoio e amizade.

Aos colegas da Faculdade de Ciências Agrárias, em especial aos Professores Dr. Carlos Edwar Freitas e Dr. Henrique Pereira, Celina de Fátima Monte Botelho, Gilsimar Melo, Jocélio Castro, José Nascimento e Fátima Oliveira, pela

compreensão da necessidade de terminar essa pesquisa, apoio, colaboração e grande amizade.

Aos meus filhos, Felipe, Wellinson d'Ângelo e João Cleiboni, pela compreensão da ausência dada a necessidade de concluir essa pesquisa e também pelo apoio, colaboração, amizade e muito amor.

Aos meus familiares, em especial Cleudon Queiroz e Cleide Queiroz, que sempre me apoiaram nessa jornada.

Ao meu irmão Carlos Alexandre, pela atenção e colaboração dispensadas sempre que precisei.

Themis de Jesus da Silva, obrigado pelo apoio, colaboração, incentivo e amizade.

Izabel Pontes, Otávia Santos e Nazaré Barbosa, muito obrigado pelo apoio, colaboração e amizade.

Aos amigos da Biblioteca do Mini-Campus da UFAM, muito obrigado pela colaboração, incentivo e amizade.

A toda a turma do Laboratório de DNA/ICB, em especial Dina, Márcia e Alessandra, obrigado pela colaboração, amizade e incentivo.

Sizabele, Cyrilo, Sabrina e Pedro Jr., obrigado pela amizade e em especial Marcos Roberto, pela colaboração na elaboração do material didático e amizade.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01	Total de plantas de pupunha (<i>Bactris gasipaes</i>) investigadas para ocorrência de endofíticos, quantidade de frutos usados, meios de cultura e total de placas usadas no isolamento por partes do fruto. ...	24
QUADRO 02	Seqüências nucleotídicas de <i>Ceratocystis</i> spp. e <i>Chalara elegans</i> obtidas no GenBank, e utilizadas para comparação com as seqüências dos isolados de pupunha.	36

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 01	Percentual de microrganismos isolados como endofíticos do fruto de pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i>), em um total de 627.	39
GRÁFICO 02	Bactérias isoladas como endofíticas do fruto de pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i>). Relação entre fragmentos inoculados por planta e frequência de isolamento.	41
GRÁFICO 03	Leveduras isoladas como endofíticas do fruto de pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i>). Relação entre fragmentos inoculados por planta e frequência de isolamento.	42
GRÁFICO 04	<i>Fusarium</i> sp. isolado como endofítico do fruto de pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i>). Relação entre fragmentos inoculados por planta e frequência de isolamento.	43
GRÁFICO 05	<i>Phomopsis</i> sp. isolado como endofítico do fruto de pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i>). Relação entre fragmentos inoculados por planta e frequência de isolamento.	45
GRÁFICO 06	<i>Penicillium</i> sp. isolado como endofítico do fruto de pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i>). Relação entre fragmentos inoculados por planta e frequência de isolamento.	47
GRÁFICO 07	<i>Ceratocystis paradoxa</i> isolado como endofítico do fruto de pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i>). Relação entre fragmentos inoculados por planta e frequência de isolamento.	48
GRÁFICO 08	<i>Thielaviopsis paradoxa</i> isolado como endofítico do fruto de pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i>). Relação entre fragmentos inoculados por planta e frequência de isolamento.	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01	Endófitos de <i>Thielaviopsis</i> isolados do fruto da pupunha, dos quais o DNA genômico foi extraído para amplificação de um fragmento do rDNA com posterior sequenciamento.	30
FIGURA 02	Percentual de microrganismos endofíticos isolados por parte de frutos de pupunheira (<i>Bactris gasipaes</i>).	40
FIGURA 03	Aspecto da colônia de <i>Fusarium</i> sp. em meio BDA (A) e macroconídios de <i>Fusarium</i> sp., endofítico isolado do fruto de <i>Bactris gasipaes</i> (B).	44
FIGURA 04	Aspecto da cultura de <i>Phomopsis</i> sp. isolado como endofítico do fruto de <i>Bactris gasipaes</i>	46
FIGURA 05	Peritécio de <i>Ceratocystis paradoxa</i> , endofítico isolado do fruto de <i>Bactris gasipaes</i>	48
FIGURA 06	Estruturas de reprodução de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> isolado do fruto de <i>Bactris gasipaes</i> . A – cadeia de fialósporos; B – aleuriósporos.	50
FIGURA 07	Crescimento miceliano de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> isolado de frutos de <i>Bactris gasipaes</i> (A). Estruturas de reprodução, cadeias de aleuriósporos (B).	51
FIGURA 08	Haplótipos identificados com o Programa TCS. Foram obtidos nove haplótipos de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> : dois isolados do mesocarpo, dois do endocarpo e cinco da amêndoa. O haplótipo com maior probabilidade de ser o menos derivado está representado no quadrado. O tamanho das figuras indica a freqüência dos haplótipos.	54
FIGURA 09	Árvore de agrupamento de vizinhos produzida a partir de seqüências de 692 pares de bases do rDNA do fungo endofítico <i>Thielaviopsis paradoxa</i> . (verde=mesocarpo, azul=endocarpo, marrom=endosperma e violeta=grupo externo).	56
FIGURA 10	Árvore consenso das 146 árvores obtidas pelo método de máxima parcimônia (L=139, IC=0,897, IR=0,976). Todos os isolados de <i>Thielaviopsis paradoxa</i> ficaram agrupados tendo <i>Ceratocystis paradoxa</i> (AF043607) como grupo irmão. (verde = mesocarpo, marrom = endocarpo, azul = endosperma e violeta = grupo externo).	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Microrganismos endofíticos.....	3
2.1.1 Importância do estudo dos fungos endofíticos.....	4
2.1.2 Isolamento de fungos endofíticos.....	5
2.1.3 Ocorrência de fungos endofíticos.....	6
2.1.4 Relações entre endofíticos /hospedeiro.....	7
2.1.5 Especificidade dos endofíticos pelo hospedeiro.....	10
2.1.6 Taxonomia de fungos endofíticos.....	11
2.2 Técnicas para caracterização molecular de fungos.....	12
2.2.1 A tecnologia da PCR.....	13
2.2.2 Aplicações da técnica de PCR.....	14
2.3 Genes ribossomais.....	15
2.4 O hospedeiro <i>Bactris gasipaes</i> Kunth.....	16
2.4.1 Usos e potencial econômico.....	17
2.4.2 Doenças da pupunheira.....	18
3. OBJETIVOS	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Material biológico e local de coleta.....	23
4.1.1 Amostragem.....	23
4.2 Meios de cultura.....	23
4.3 Soluções e Tampões.....	25
4.3.1 Soluções para extração do DNA.....	25
4.3.1.1 Solução de RNase A.....	25
4.3.1.2 Tampão de extração (CTAB 2%).....	25
4.3.1.3 Clorofil.....	25
4.3.1.4 Tampão Tris-EDTA (TE).....	26
4.3.2 Soluções para Reação de PCR.....	26
4.3.2.1 Solução de MgCl ₂ 7,5 mM.....	26
4.3.2.2 Deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs).....	26

4.3.2.3 Tampão para reação de PCR.....	26
4.3.2.4 Oligonucleotídeos iniciadores (primers).....	27
4.3.2.5 Enzima Taq DNA-polimerase.....	27
4.3.2.6 Tampão Tris-EDTA-Borato (TEB 10X).....	27
4.3.2.7 Tampão da amostra (5X).....	27
4.4 Isolamento de fungos endofíticos.....	28
4.5 Identificação dos fungos isolados.....	29
4.5.1 Técnica de coloração – Lactofenol.....	29
4.6 Etapas para o sequenciamento nucleotídico de parte do rDNA de endófitos de <i>Thielaviopsis</i>	29
4.6.1 Extração do DNA genômico.....	29
4.6.2 Quantificação do DNA.....	31
4.6.3 Amplificação <i>in vitro</i> do DNA pela reação de PCR.....	32
4.6.4 Purificação do produto amplificado.....	33
4.6.5 Seqüenciamento do DNA.....	34
4.6.5.1 Reação de seqüenciamento.....	34
4.6.5.2 Precipitação do produto da reação de seqüenciamento.....	34
4.6.5.3. Eletroforese de seqüenciamento.....	35
4.6.6 Edição e alinhamento das seqüências nucleotídicas.....	35
4.6.7 Caracterização molecular dos endófitos.....	37
4.6.7.1 Distância genética.....	37
4.6.7.2 Análise dos haplótipos.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1 Isolamento dos endofíticos.....	38
5.2 Endófitos do fruto de pupunha.....	39
5.3 Extração e amplificação do DNA ribossomal.....	52
5.4 Seqüenciamento do DNA amplificado.....	53
5.5 Caracterização molecular.....	53
6. CONCLUSÕES.....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
8. ANEXOS.....	74

RESUMO

A palmeira tropical pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) foi domesticada pelos ameríndios e atualmente é cultivada em diversos países. No Brasil possui interesse agroeconômico principalmente para produção de palmito; além disso, o valor nutricional de seu fruto é bastante valorizado. Foi realizado o isolamento de microrganismos endofíticos de fragmentos de frutos de 18 pupunheiras, em meios BDA e PDA (polpa de pupunha-dextrose-ágar) em ausência de luz a 18°C. A partir de fragmentos do mesocarpo, endocarpo e amêndoa foi observada a presença dos microrganismos endofíticos: bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Foram identificados os seguintes táxons: *Thielaviopsis paradoxa* apresentou frequência de isolamento de 36,4%, *Ceratocystis paradoxa* com 17,1%, *Phomopsis* sp. com 10,4%, *Fusarium* sp. com 9,7% e *Penicillium* sp. com 2,0% e o maior índice de infecção foi apresentado pelo mesocarpo com 47,7%. Mais de uma espécie estava colonizando frutos de pupunha em uma mesma planta e em todas as plantas investigadas havia endófitos. *C. paradoxa* apresentou especificidade pelo mesocarpo enquanto *T. paradoxa* pelo endocarpo e amêndoa. Por ser o isolado mais frequente *T. paradoxa* foi escolhido para análise molecular. O DNA de 22 endófitos foi extraído com CTAB e nitrogênio líquido. Um fragmento com 1600 pb foi amplificado a partir do rDNA pela técnica de PCR. A partir da purificação do produto amplificado, foi obtido o sequenciamento de parte da região espaçadora ITS1, ITS2 e gene 5,8S completos, e parte da subunidade maior 28S. As 22 amostras foram submetidas ao GenBank e todas apresentaram maior semelhança com o acesso *C. paradoxa* (AF043607). O alinhamento realizado entre os 22 endófitos demonstrou pouca variabilidade entre eles. As amostras foram então submetidas ao Programa TCS, onde os “gaps” foram considerados como um quinto caracter, resultando na identificação de nove haplótipos. Dentre estes somente dois apresentaram mais de um indivíduo e a maior variabilidade genética foi entre os isolados da amêndoa. Por meio do Programa PAUP 4.0, utilizando o método de distância p – não corrigida, foram obtidas uma matriz de distância e uma árvore parcimoniosa pelo método agrupamento de vizinhos, com tamanho de 139 passos. A

estimativa da taxa de transição/transversão foi de 1,2 e a proporção de bases foi de 27,9% para adenina, 21,5% para citosina, 21,5% para guanina e 29,1% para timina. A proporção de sítios invariáveis foi de 0,476 e o parâmetro gama foi 0,57. O Índice de Consistência foi 0,897 e o de Retenção de 0,976. A matriz demonstrou pouca divergência genética entre os isolados. A topologia dos táxons foi estimada pelo agrupamento de vizinhos, com aplicação de *bootstrap* com 1000 repetições. A árvore foi enraizada a partir de dois grupos externos, ambos da espécie *Chalara elegans* (AF275509 e AF275482). Três grupos maiores foram formados, sendo que *C. paradoxa* (AF043607) originou um grupo com todos os isolados de *T. paradoxa*. Não houve a formação de grupos específicos por fragmento de isolamento, entretanto, alguns haplótipos isolados do endocarpo e amêndoa foram agrupados juntos. A análise molecular ratificou a identificação realizada por meio das estruturas de reprodução de *T. paradoxa*.

ABSTRACT

The tropical palm pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) was domesticated by Amerindians and is cultivated in several countries. In Brazil, the interest is in the agribusiness for heart-of-palm production, although the fruits nutritional value is also interesting. Endophytic microorganisms were isolated from fruit fragments of 18 plants using BDA and PDA (pupunha pulp-dextrose-agar) in the absence of light at 18°C. In fragments of mesocarp, endocarp and endosperm the presence of endophytic bacteria, yeast and filamentous fungi was observed. The fungal isolates were identified as: *Thielaviopsis paradoxa* – 36.4%, *Ceratocystis paradoxa* – 17.1%, *Phomopsis* sp. – 10.4%, *Fusarium* sp. – 9.7% and *Penicillium* sp. – 2,0%. The infection rate was highest in the mesocarp with 47.7%. More than one isolate was colonizing pupunha fruits in the same plant and in all plants investigated there were endophytes. *C. paradoxa* showed specificity for mesocarp while *T. paradoxa* for endocarp and endosperm. *T. paradoxa* was the most frequent isolate, and was chosen for molecular analysis. The DNA from 22 endophytes was extracted with CTAB and liquid nitrogen. A fragment with 1600 bp was amplified from rDNA by PCR and the purified amplification product was sequenced. The 22 samples had been submitted to the GenBank and all had presented greater similarity with access *C. paradoxa* (AF043607). The alignment among the 22 endophytes showed little variability among them. The samples were submitted to the TCS program, where gaps were considered as a fifth character, resulting in the identification of nine haplotypes. Among these only two were found in more than one individual. The greatest genetic variability was among the endosperm isolates. The PAUP 4.0 Program, utilizing the distance *p* method – not corrected, was used to obtain a distance matrix and a parsimonious tree by neighbor-joining, with a length of 139 steps. The estimate of the transition/transversion rate was 1.2, and the base proportions were 27.9% for adenine, 21.5% for cytosine, 21.5% for guanine and 29.1% for thymine. The proportion of invariable sites was 0.476 and the parameter gamma was 0.57; CI=0.897 and RI=0.976. There was little genetic divergence among isolates. The taxons' topology was estimated by neighbor-joining, using a 1000 replication bootstrap. The tree was rooted with two outgroups, both of *Chalara elegans* (AF275509 e AF275482). Three major groups were

formed, with one group containing *C. paradoxa* (AF043607) with all *T. paradoxa* isolates. No specific groups were formed according to the fragment sampled although some haplotypes from the endocarp and endosperm were grouped closely together. The molecular analysis confirmed the identification of *T. paradoxa* made from reproductive structures.

1 INTRODUÇÃO

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) é uma espécie com elevado potencial econômico, pelo valor nutritivo dos seus frutos, que podem ser utilizados tanto na alimentação humana como na animal, e principalmente, pela extração do palmito. A expansão da cultura da pupunha tem ocorrido visando atender ao mercado consumidor de palmito. Segundo Clement (1999a), estima-se que haja 8.000 ha plantados no Brasil, com pelo menos 1.000 ha em produção na Amazônia, principalmente no Acre, atingindo 10% do mercado nacional de palmito.

O ataque por patógenos às sementes de pupunha pode impedir a sua germinação (Vargas, 1993; Hernández *et al.*, 1999). Outro fator que é importante para o sucesso de um cultivo objetivando produção comercial é a escolha de fornecedor de sementes, que deve ser idôneo, com garantia de procedência, pois Bovi (1998) sugeriu que o insucesso na fase de formação de mudas pode ser causado, dentre outros fatores, à obtenção de sementes e/ou mudas de má qualidade e sem tratamento fitossanitário adequado.

Em sementes armazenadas, Ferreira (1988) verificou o ataque por diversos fungos, entre eles várias espécies de *Fusarium*. Coates-Beckford & Chung (1987) citaram *Fusarium solani* como o principal responsável pela queda da germinação de sementes de pupunha levadas a Jamaica, enquanto Vargas (1993) afirmou que, normalmente, os fungos penetram na semente antes da colheita do fruto, enquanto Bovi (1998) afirmou que essa contaminação acontece por ocasião do manuseio e armazenamento inadequados.

Segundo Clement (comunicação pessoal, 2002), na importação de sementes de pupunheira do Peru tem sido observado a presença de fungos do gênero *Monilia*. Tal fato originou grande preocupação entre os importadores baianos, pois as sementes podem ser consideradas potencialmente como vetores de novas doenças para o cacau (*Theobroma cacao*).

Os fungos patogênicos estão entre os principais microrganismos estudados pelo homem em função de sua importância econômica e da necessidade de se

evitar danos em culturas agrícolas. Entretanto, existem fungos que habitam internamente tecidos vegetais sem causar danos aparentes, os quais foram denominados de endofíticos (Petrini, 1986). Trata-se de ocorrência assintomática e faz-se necessário, para estudá-los, isolá-los a partir de tecidos vegetais aparentemente saudáveis e cultivá-los em laboratório (Pereira, 1993).

Até o presente não ocorreu investigação referente a fungos endofíticos em *B. gasipaes*. Por ser da Amazônia e plantada em outras regiões, a incidência de doenças poderá ser um fator preocupante, uma vez que haverá alterações fisiológicas no cultivo em decorrência do adensamento nos plantios, bem como a possível diminuição da variabilidade genética em função do uso de clones.

Por tratar-se de uma palmeira tropical de grande potencial econômico essa espécie foi escolhida para o estudo de sua comunidade de fungos endofíticos, visando contribuir para a compreensão das relações dessa cultura com os fungos a ela associados, bem como para confirmar a presença de fungos no interior das sementes. no presente trabalho foram realizados o isolamento e identificação de fungos endofíticos de frutos de pupunha e os isolados mais frequentes, *Thielaviopsis paradoxa*, foram caracterizados geneticamente pela análise das regiões espaçadoras ITS1 e ITS2 do DNA ribossomal, obtidas pela técnica molecular PCR e seqüenciamento, sendo verificado sua similaridade genética.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Microrganismos endofíticos

São considerados microrganismos endofíticos aqueles microseres, principalmente fungos e bactérias, que habitam no interior das plantas durante todo o seu ciclo de vida ou somente parte dele, sem causar sintomas de doenças. A primeira referência aos fungos endofíticos foi por Bary (1866, citado por Petrini, 1986), quem considerou endofíticos os fungos que vivem no interior dos tecidos das plantas e epifíticos os fungos que vivem sobre a superfície do seu hospedeiro.

Azevedo *et al.* (2002) consideraram que não existe uma exata distinção entre as categorias de microrganismos epifíticos, endofíticos e patogênicos, havendo sim, um gradiente com interfaces entre endófitos, epifíticos e patógenos. Para eles, um microrganismo epifítico pode ser eventualmente encontrado dentro de um vegetal; um endófito, por sua vez, em certas condições, pode tornar-se um patógeno; e um patógeno, em outras condições, não afeta seu hospedeiro e pode ser considerado um endófito.

O fato de nenhuma planta submetida à investigação deixar de apresentar fungos endofíticos fundamentou a conclusão de Sieber *et al.* (1988) de que a presença dos fungos endofíticos é um fenômeno geral e comum. Vários relatos sobre a sua ocorrência vêm se acumulando e confirmando sua existência em diversas espécies, tais como *Hordeum vulgare*, Graminae (Riesen & Close, 1987), *Stylosanthes guianensis*, Leguminosae (Pereira, 1993), *Citrus reticulata*, Rutaceae (Glienke, 1995), *Euterpe oleracea*, Palmae (Lodge *et al.*, 1996), *Scleria pterota*, Cyperaceae (Costa Neto, 1997) e *Copaiifera multijuga*, Detarieae (Araújo, 1999).

Entretanto, a relação entre endofíticos e seus hospedeiros ainda não foi bem definida porque a fisiologia dos endofíticos ainda não é bem conhecida. Acredita-se que poderá ter relações simbióticas, neutras ou antagonísticas (Petrini & Müller, 1986; Carroll, 1988; Cheplick *et al.*, 1989). Mais estudos sobre a associação fungo-planta possibilitará o entendimento do papel que esses microrganismos desempenham em seus hospedeiros.

Alguns microrganismos endofíticos possuem potencial econômico, por exemplo, na produção de antibióticos quando cultivados *in vitro* (Stierle *et al.*, 1993), ou no controle biológico de doenças (Stovall & Clay, 1991) e pragas vegetais (Petrini *et al.*, 1989). Provavelmente oferecem benefícios aos hospedeiros, como o incremento da produtividade vegetal (Read & Camp, 1986). Na biotecnologia podem atuar como vetores alternativos para a introdução de genes em plantas (Murray *et al.*, 1992).

Por ser de ocorrência assintomática, para estudar os endófitos é necessário isolá-los dos tecidos vegetais aparentemente saudáveis e cultivá-los em laboratório. Este isolamento é relativamente fácil. Após a desinfestação de tecidos vegetais, fragmentos do material vegetativo são transferidos para meio de cultura onde os microrganismos endofíticos se desenvolvem. Esta técnica possibilita tanto a estimativa da extensão da infecção quanto da microbiota existente em determinado hospedeiro.

2.1.1 Importância do estudo dos fungos endofíticos

O conhecimento atual sobre as potencialidades de uso dos fungos endofíticos motiva novas pesquisas. Algumas das descobertas com potencial biológico e econômico são:

- 1) interações que propiciam melhor desempenho das plantas (Read & Camp, 1986), como aumento da área foliar e maior número de ramificações (Latch *et al.*, 1984), maior tolerância ao ataque de insetos (Siegel *et al.*, 1987; Clay, 1988), maior resistência a doenças (White Jr. & Cole, 1985; Stovall & Clay, 1991), e tolerância à seca (West *et al.*, 1990);
- 2) uso como agentes no controle biológico de pragas e doenças de algumas espécies cultivadas (Azevedo *et al.*, 2000);
- 3) uso como vetores alternativos para a introdução de genes em plantas (Fahey, 1988; Murray *et al.*, 1992);
- 4) quando cultivados *in vitro*, podem produzir antibióticos; por isso tornaram-se alvos na busca desses produtos e de outros metabólitos secundários de interesse farmacológico (Fisher *et al.*, 1984a e b; Calhoun *et al.*, 1992; Stierle *et al.*, 1993);

5) uso como bioindicadores de vitalidade (Helander & Rantio-Lehtimäki, 1990).

Há pesquisas em andamento, tais como: 1) a fisiologia dos endofíticos para o entendimento da interação endófito/hospedeiro; 2) as condições em que um endófito torna-se patogênico (Sieber *et al.*, 1988); e 3) a influência dos endófitos na sobrevivência, reprodução ou crescimento de plantas infectadas (Rice *et al.*, 1990). Essas linhas de pesquisas ainda não foram iniciadas com endófitos isolados de hospedeiros tropicais.

A compreensão do papel que esses microrganismos desempenham em seus hospedeiros é de fundamental importância. Tal conhecimento será adquirido a partir de pesquisas direcionadas à associação fungo-planta. Ainda há muito a aprender sobre os aspectos ecológicos, genéticos e fisiológicos dessa associação, o que justifica também o estudo de novos hospedeiros, especialmente no trópico úmido.

2.1.2 Isolamento de fungos endofíticos

Para o isolamento dos fungos endofíticos, por serem assintomáticos, é necessária a eliminação dos microrganismos existentes na superfície do hospedeiro, os chamados epifíticos. Assim, realiza-se uma desinfestação. O processo de desinfestação varia de hospedeiro para hospedeiro, dependendo basicamente da espessura da cutícula e epiderme dos tecidos (Pereira, 1993).

Técnicas eficazes para a desinfestação foram relatadas por Petrini (1986), apresentando diferentes condições para a desinfestação de líquens, briófitas, pteridófitas, gimnospermas, monocotiledôneas e dicotiledôneas, com variações do tempo de exposição e concentração de hipoclorito de sódio (NaOCl). Schulz *et al.* (1993) também verificaram a eficácia de vários métodos de desinfestação visando o isolamento de endofíticos de plantas herbáceas e arbustos.

Os fungos endofíticos são observados pelo crescimento de colônias em meio de cultura a partir de fragmentos das plantas, cujas superfícies foram previamente desinfestadas (Carroll & Carroll, 1978; Petrini *et al.*, 1982; Fisher & Petrini, 1990; Pereira *et al.*, 1993). O tempo de incubação para o crescimento dos fungos depende do material vegetativo utilizado. Usualmente, o tempo de incubação para isolamento a partir de fragmentos de folhas é de três a sete dias, podendo chegar a 14 dias. Outra

variante importante é a temperatura de incubação. Guimarães (1998) concluiu que a temperatura de 18°C foi melhor quando comparada a 28°C, porque alguns endofíticos apresentam crescimento miceliano mais lento e podem crescer sobrepostos aos de crescimento mais rápido, ou mesmo, nem germinar.

O processo mais utilizado para isolamento de microrganismos endofíticos é a desinfestação de tecidos e órgãos vegetais. Outras técnicas também já foram utilizadas, tais como: técnicas de coloração e microscopia ótica (White Jr. & Cole, 1985; Wilson *et al.*, 1991; White Jr. *et al.*, 1993); testes biológicos com afídios (Clement *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1991); métodos sorológicos e técnicas de bioensaio (Sinclair, 1991); e o emprego de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão (Viret & Petrini, 1994).

2.1.3 Ocorrência de fungos endofíticos

Mais de 300 espécies de plantas já foram relatadas como hospedeiras assintomáticas de fungos, destacando-se as gramíneas e as coníferas das zonas temperadas. Os endofíticos isolados foram, com poucas exceções, Ascomycetos, incluindo Loculoascomycetos, Discomycetos e Pirenomicetos (Carroll, 1988).

Por meio de análises de DNA de isolados de *Apiognomonina errabunda*, Hämmerli *et al.* (1992) verificaram que numa folha do hospedeiro havia mais de uma espécie de endófito colonizando-a. Merece destaque o fato de ocorrer predominância de uma ou de poucas espécies de fungos em determinados hospedeiros, evidenciando a reduzida variabilidade na biota micótica endofítica. Porém, a composição das espécies pode variar de acordo com o hospedeiro, distribuição geográfica, idade das plantas, condições ecológicas e sazonais, incluindo altitude e precipitação (Carroll & Carroll, 1978; Carroll, 1988; Wilson *et al.*, 1991; Agostini *et al.*, 1992).

Fungos endofíticos foram isolados em espécies tropicais (Petrini & Dreyfuss, 1981; Rodrigues & Samuels, 1990; Fisher *et al.*, 1992; Rodrigues, 1992; Lodge *et al.*, 1996; Maricaua, 1997; Silva, 1998), em forrageiras (Siegel *et al.*, 1987; Clay, 1988; Bacon, 1995), em plantas medicinais (Melo & Pereira, 1997; Araújo, 1999) e em planta invasora, *S. pterota* (Costa Neto, 1997). Em cultivos agrícolas de interesse econômico também ocorrem endofíticos: *Triticum* sp. (White Jr & Cole, 1985), *H.*

vulgare (Riesen & Close, 1987), *Oryza sativa* (Fisher & Petrini, 1992), *C. reticulata* (Glienke, 1995), *Musa* sp. (Pereira, 1993), *S. guianensis* (Pereira, 1993), *Zea mays* (Pamphile, 1997), *Paullinia cupana* (Guimarães, 1998), *Theobroma grandiflorum* (Silva, 1998) e *Euterpe oleracea* (Rodrigues, 1992).

A primeira ocorrência de endófitos em palmeiras foi citada por Rodrigues & Samuels (1990). Observaram tal fato a partir de folhas não expandidas e abertas de *Licuala ramsayi*, uma palmeira tropical australiana. Foram isolados *Fusarium* cf. *aquaeductuum*, *F. solani*, *Geniculosporium serpens*, *Xylaria cubensis*, *Phomopsis* sp., *Stagonospora* sp., *Nodulisporium* sp., *Pestalotiopsis* sp. e uma nova espécie foi encontrada, *Idriella licualae*. Foi sugerido que a ocorrência de endófitos nas folhas não expandidas pode ser devida à transmissão através de sementes.

A presença de endófitos na região Amazônica brasileira foi diagnosticada primeiro por Rodrigues (1991), quando estudou folhas do hospedeiro açazeiro (*Euterpe oleracea*), situado na ilha Combu, próximo a Belém, Estado do Pará. Houve destaque para membros da família Xylariaceae, os quais apresentaram a maior frequência de colonização dentro das folhas, e o gênero *Letendraea*, correspondeu à segunda maior frequência. Com menor incidência foram identificados os gêneros *Phomopsis*, *Colletotrichum*, *Idriella*, *Thozetella*, *Phoma*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Acremonium*, *Dendrodochium*, *Leiosphaerella*, *Curvularia* e *Ramichloridium*.

Rodrigues (1991) descreveu *Letendraea*, como um novo gênero endofítico. Posteriormente reclassificado por Rodrigues & Samuels (1994) como *Letendraeopsis palmarum*. Rodrigues & Samuels (1992) também identificaram três novas espécies do gênero *Idriella* isoladas do hospedeiro *E. oleracea*, na ilha Combu, próximo a Belém, *I. euterpes*, *I. asaicola* e *I. amazonica*.

2.1.4 Relações entre endófitos/hospedeiro

Fungos endofíticos não induzem sintomas de doenças, entretanto, mantêm os mecanismos bioquímicos e genéticos requeridos para a infecção e a colonização de plantas hospedeiras (Rodrigues & Redman, 1997). Esses mesmos autores citaram quatro classes de fungos endofíticos baseados em seus comportamentos dentro do tecido vegetal: 1) Crescem ativamente dentro do tecido hospedeiro, resultando

em extensa colonização; 2) Crescem ativamente dentro do hospedeiro, colonizando apenas áreas limitadas do tecido vegetal; 3) Crescem pouco dentro do hospedeiro, em função de reação deste, ficando quiescente até a senescência do hospedeiro e 4) Crescem pouco dentro do hospedeiro, mas permanecem metabolicamente ativos.

Clay (1987) observou em *Festuca arundinaceae* que a porcentagem de sementes granadas infectadas por endofíticos foi o dobro quando comparada àquelas não infectadas e que houve também aumento na produção de biomassa. O autor associou tal fato à concentração de hifas em regiões meristemáticas de seus hospedeiros, que poderiam estar facilitando a regulação hormonal da divisão celular e diferenciação dos tecidos.

Segundo Johnson *et al.* (1985), *Festuca* sp. infectada e não infectada por endofíticos eram discriminadas por muitos insetos. Duas espécies de afídeos não conseguiram sobreviver em *Festuca* sp. quando infectada por endofíticos. Tal comportamento foi observado também por Carroll & Carroll (1978), que sugeriram serem os fungos endofíticos os responsáveis por conferir resistência a herbivoria. Breen (1992) destacou que a forrageira *Lolium perenne*, quando infectada pelo endófito *Acremonium*, apresentou resistência à *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). Segundo Rodrigues & Dias-Filho (1996), tal resistência a herbivoria está relacionada a diminuição da palatabilidade dos hospedeiros, pois ocorre a produção de toxinas pelo fungo, de forma que os predadores passassem a evitá-los.

Clark *et al.* (1989) isolaram de coníferas os endofíticos *Phyllosticta* sp. e *Hormonema dematioides*, e observaram a produção de metabólitos com efeito citotóxico para células HeLa e células da larva parasita desses pinheiros. Azevedo *et al.* (2000) citaram que o fungo *Trichoderma* tem sido utilizado com sucesso para o controle biológico do fungo *Crinipellis perniciososa*, agente causal da vassoura de bruxa na cultura do cacau (*T. cacao*).

O processo de penetração do endófito *Discula umbrinela* isolado de *Fagus sylvatica* foi descrito por Viret & Petrini (1994). O fungo forma apressório e degrada a cutícula e células da epiderme do hospedeiro. Após um período de latência de alguns dias, o endófito coloniza o espaço intercelular, depois o intracelular, podendo

ocorrer a formação de haustórios, o que conduz à morte prematura das células infectadas.

A relação existente entre hospedeiros e endófitos pode ser simbiótica, mutualística ou neutra. Os resultados observados por Leuchtman *et al.* (1992) compararam o polimorfismo enzimático de seis espécies de fungos do gênero *Phyllosticta* com os padrões enzimáticos de seus hospedeiros e observaram que os padrões enzimáticos de ambos relacionavam-se.

Hallmann & Sikora (1996) isolaram *Fusarium oxysporum*, um endófito não patogênico, de raízes de *Lycopersicum esculentum*, que produzia metabólitos inibidores do crescimento do nematóide parasita *Meloidogyne incognita*. Também destacaram que *F. oxysporum* era o isolado mais frequente de plantas de tomate.

Marshall *et al.* (1999) observaram a transmissão dos fungos endofíticos *Neotyphodium* sp. e *Acremonium* sp. em 10 espécies de *Triticum* durante duas gerações. Foram analisadas sementes com e sem a presença de endófitos. *Neotyphodium* foi transmitido com frequência de 100% às plantas descendentes, enquanto *Acremonium* não foi transmitido para todas as progênes das plantas que originalmente hospedavam esse endófito.

Strobel & Long (1998) isolaram *Phoma* sp. como endófito do hospedeiro *Taxus wallachiana* e verificaram que esse isolado produzia um composto antibacteriano chamado altersolanol. Tal fato sugere que este endófito protege a planta hospedeira contra bactérias patogênicas.

O taxol é um diterpenóide extraído de *Taxus brevifolia*, com efeito anti-tumoral no seio e ovário humano; essa planta possui crescimento lento e baixa produção de taxol. Stierle *et al.* (1993) isolaram do floema desse hospedeiro o fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, que, quando cultivado em meio semi-sintético, produz taxol e outros metabólitos. Portanto, tal endófito constitui-se em fonte alternativa para a produção desse fármaco e também contribui para evitar desequilíbrio ecológico em função da derrubada de *T. brevifolia*. Para Azevedo (1998), este fato sugere a possibilidade de uma transposição de genes entre fungos e plantas, indicando uma engenharia genética *in vivo*.

2.1.5 Especificidade dos endofíticos pelo hospedeiro

O estabelecimento da especificidade de um endófito, por determinado hospedeiro ou mesmo por tecido do hospedeiro, pode ser verificada considerando-se alguns aspectos. Segundo Pamphile (1997) devem ser realizadas investigações ecológicas das comunidades de endofíticos pelo isolamento e trabalho de censo, medidas diretas dos esporos e outros estudos morfológicos, eletroforese de isoenzimas e, mais recentemente, análises de DNA, como também experimentos de germinação.

Um padrão de dominância de espécies foi verificado por Petrini *et al.* (1982), pois um fungo isolado com maior frequência em um hospedeiro, em outro, pode ser menos frequente. Estes menos frequentes parecem ser também menos específicos, pois são isolados num amplo espectro de hospedeiros. Sieber *et al.* (1991) também levantaram a hipótese de que cada espécie vegetal desenvolve uma comunidade endofítica altamente específica.

Um aparente padrão de dominância por somente um ou poucos táxons de fungos pode ser observado nas espécies de plantas investigadas. Como exemplo, *Lophodermium piceae* (Fuckel) Hohn. foi o endofítico mais frequente de *Picea abies* Karst. (Sieber, 1988), enquanto em *Abies balsamea* (L.) Mill foi *Phyllosticta multicorniculata* (Petrini *et al.*, 1989). White Jr. & Cole (1985) consideraram um fator importante na distribuição dos endofíticos a sua especificidade pelo hospedeiro, já que uma alta proporção de hospedeiros de gêneros diferentes pode levar a uma baixa taxa de infecção, principalmente quando associada a altitudes elevadas.

Existem espécies de fungos que apresentam especificidade por um gênero ou família de determinado hospedeiro. O fungo *Chloroscypha chloromela* foi observado somente em *Sequoia sempervirens* (Stone, 1986) e *Phyllosticta pyrolae* e *P. vaccinii* são espécies restritas a hospedeiros das Ericales (Petrini, 1986). Petrini & Fisher (1988) observaram que *Pinus sylvestris* e *Fagus sylvatica*, crescendo no mesmo local, apresentaram comunidades distintas de fungos endofíticos.

A situação mais frequente é encontrar o mesmo endofítico num grande espectro de hospedeiros. Pereira (1993) citou os fungos *Colletotrichum* sp. e *Xylaria* sp. como endófitos comuns em hospedeiros tropicais sem um padrão de dominância. Como endófitos de ocorrência em hospedeiros pertencentes a diferentes famílias de plantas, ou

seja, endófitos ubíquos, Petrini (1986) registrou os gêneros *Geniculosporium*, *Phyllosticta*, *Phomopsis* e *Cryptocline*, enquanto Carroll (1988) citou *Cryptosporiopsis* e *Leptostroma*.

Fisher & Petrini (1990) estudaram a especificidade entre os tecidos do hospedeiro e seus endofíticos. Isolaram *Melanconum apiocarpum* e *Cryptosporiopsis* sp. somente da casca de *Alnus glutinosa*, e nenhum endofítico do xilema.

Carroll (1988) relatou um dos poucos casos de estreita especificidade entre endofítico e hospedeiro. O fungo *Rhabdocline parkeri* foi encontrado somente no pinheiro de Douglas (*Pseudotsugae menziesii*, Pinaceae) e em nenhuma outra conífera simpátrica no Noroeste dos EUA.

Rodrigues (1991) observou especificidade entre endófitos de *E. oleracea*. Isolou *Anthostomella* sp. e *Xylaria telfairii* apenas da região situada entre os vasos condutores, enquanto *X. adscendens* e *X. allantoidea* ocorreram somente na nervura central das folhas investigadas.

2.1.6 Taxonomia de fungos endofíticos

A identificação dos fungos endofíticos a partir da morfologia apresentada pelo crescimento miceliano sobre meio de cultura não é suficiente; é necessária uma análise minuciosa dos aspectos morfológicos das estruturas reprodutivas, principalmente sexuais. Segundo Petrini (1986), a identificação dos fungos endofíticos torna-se muito difícil dada a escassez de informações sobre o cultivo de espécies já descritas e também do microhabitat característico de cada tecido vegetal.

Já foram descritos Basidiomicetos, Deuteromicetos e Oomicetos. Entretanto, a maioria dos fungos endofíticos é representada por Ascomicetos, os quais estão distribuídos entre Loculoascomicetos, Discomicetos e Pirenomicetos (Petrini, 1986). O mesmo autor sugere que o uso de meios de cultura inespecíficos, em parte, pode ser o motivo da menor frequência de Basidiomicetos.

Thielaviopsis é um gênero de fungo saprófita responsável pela podridão preta de raízes em diversos hospedeiros: vegetais, herbáceas ornamentais e culturas agrícolas (_____, 2002). *T. paradoxa* foi identificado como patógeno nas culturas *Plumeria* sp. e *Saccharum officinarum* (Gonsalves & Ferreira, 2002b) e está

classificado na divisão eumicota, subdivisão deuteromicotina, classe hifomicetes e ordem hifales (moniliales). Segundo Paulin-Mahady *et al.* (2002) o gênero *Thielaviopsis* é baseado em *T. ethacetia* Went (nag Raj and Kendrick 1975, Went 1893), o qual depois foi reconhecido como sinônimo de *T. paradoxa* (de Seynes) Höhn, anamorfo de *Ceratocystis paradoxa* (Dade) Moreau.

Ceratocystis é um gênero que apresenta várias espécies citadas como patogênicas em diversos hospedeiros. Segundo Kile (1993) citado por Witthuhn *et al.* (1998) existem espécies patogênicas para árvores frutíferas e florestais, *Hypomea batata* e *Hevea* spp. *C. paradoxa* é patógeno nos hospedeiros *Cocos nucifera*, *Musa acuminata*, *A. comosus*, *S. officinarum*, *Hemerocallis fulva*, *Hemerocallis* sp. e *Plumeria* sp. Esse gênero está classificado na divisão eumicota, subdivisão ascomicotina, classe pirenomicetes e ordem esfaeriales (Gonsalves & Ferreira, 2002a).

A identificação de espécies de *Ceratocystis* torna-se difícil porque alguns grupos separados por substratos mostram pouca ou nenhuma variação em sua morfologia (Harrington & McNew, 1998), entretanto, Witthuhn *et al.* (1998) analisando seqüências espaçadoras ITS de DNA, identificaram sete espécies de *Ceratocystis* isoladas de coníferas. Segundo Paulin-Mahady *et al.* (2002) *Ceratocystis sensu stricto* é um gênero monofilético e disperso por insetos.

2.2 Técnicas para caracterização molecular de fungos

As técnicas clássicas utilizadas para a caracterização de fenótipos, tais como as características morfológicas ou bioquímicas, principalmente por auxotrofia, apresentam restrições nos estudos populacionais e muitas vezes de sistemática quando se objetiva a análise da variabilidade genética em microrganismos. A análise de proteínas, por meio da eletroforese de isoenzimas que detecta diferentes alelos dos genes, dada a diferença de mobilidade eletroforética, tem sido utilizada com sucesso no estudo da variabilidade genética de populações (Leuchtmann *et al.*, 1992; Leuchtmann, 1994; Zervakis *et al.*, 1994).

Marcadores moleculares de DNA (ácido desoxirribonucléico) têm sido utilizados com sucesso para identificar espécies de fungos ou linhagens intraespecíficas e formação de raças (Metzenberg, 1991). As técnicas baseadas nestes marcadores

representam diretamente a variação genética, não estando sujeitas às influências do ambiente, nem sofrendo variações em função do estágio de desenvolvimento do organismo ou do tipo de tecido utilizado (Puterka *et al.*, 1993).

2.2.1 A tecnologia da PCR

A tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction) foi desenvolvida por Kary Mullis em meados da década 80 (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Essa técnica consiste na amplificação *in vitro* de determinada seqüência de DNA. São necessários a enzima DNA polimerase, cofatores, desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), tampões apropriados, um par de oligonucleotídeos (primers) de seqüência alvo conhecida e o DNA molde. Esse sistema é colocado sob condições controladas para diversos ciclos de amplificação em termociclador programado (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Um ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A fita dupla do DNA alvo é desnaturada por elevação da temperatura para 92 a 95°C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60°C, dependendo essencialmente do tamanho e seqüência do primer utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada “primer” com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3’ dos primers. Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência-alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência é feita no processo. Uma vez que a quantidade de DNA da seqüência-alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, é produzido mais de um milhão de vezes a quantidade inicial da seqüência-alvo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A completa automatização e expansão da técnica de PCR ocorreram a partir do isolamento, por Saiki *et al.* (1988), da enzima Taq DNA-polimerase produzida pela bactéria *Thermus aquaticus*, que vive em fontes térmicas e apresenta atividade polimerásica a 72°C, conservando a atividade por algumas horas a 95°C. Outra enzima termoestável disponível para PCR é a Vent DNA-polimerase que é isolada de

Costa Neto, P.Q.

Thermococcus litoralis. Com a utilização dessas enzimas tornou-se desnecessário acrescentar uma nova quantidade de enzima a cada ciclo (White *et al.*, 1989).

A possibilidade de gerar grandes quantidades de DNA, de segmentos específicos do genoma, proporcionada por essa técnica, foi um dos aspectos fundamentais da revolução por ela causada. As seqüências amplificadas podem ser visualizadas diretamente na forma de uma banda num gel de agarose, sob luz ultravioleta, obtida por eletroforese, e corada com brometo de etídio. A grande limitação dessa técnica é a necessidade do conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência de DNA de interesse e para tal, faz-se necessária a clonagem e o sequenciamento da região (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

2.2.2 Aplicações da técnica de PCR

A técnica de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism) associada à de PCR foi utilizada para demonstrar a relação filogenética entre 11 espécies do gênero *Ceratocystis*. O resultado obtido após a amplificação de um fragmento de 1600 pares de bases do DNA ribossomal foi uma árvore de parcimônia com 288 passos produzida a partir de parte da seqüência do DNA da subunidade maior do rRNA. *Ceratocystis fimbriata* e *C. albofundus* apresentaram valor de *bootstrap* de 100% e outro clado de 95% agrupou as outras nove espécies de *Ceratocystis* em subgrupos (Witthuhn *et al.*, 1999).

Analisando as seqüências espaçadoras ITS1 e ITS2 e parte da subunidade maior do rDNA, quatro espécies anamorfas de *Chalara* foram agrupadas como monofiléticas junto ao gênero teleomorfo *Ceratocystis* (Paulin-Mahady *et al.*, 2002). Esses autores realizaram uma reclassificação taxonômica para essas espécies, transferindo-as para o gênero anamorfo *Thielaviopsis*, pois formam aleurioconídio típico desse gênero. A classificação anterior tinha sido questionada desde a descoberta por Paulin & Harrington (2000) de *Chalara* como sendo polifilético. Tal afirmação foi encontrada pela análise molecular usando seqüências de parte da subunidade menor e da subunidade maior do rDNA.

Wingfield *et al.* (1994) analisaram a seqüência nucleotídica de uma região da subunidade 18S e duas regiões da subunidade 28S do rRNA de nove espécies

do gênero *Ceratocystis*. Foram observadas substituições múltiplas nos sítios nucleotídicos e houve baixa taxa de transição/transversão. Tais resultados sugerem que as espécies estão bem estabelecidas, sendo portanto, espécies antigas. A análise da morfologia dos ascósporos, para a maioria das espécies, não foi congruente com a filogenia molecular. Tal fato sugere que a taxonomia baseada em características morfológicas dos ascósporos pode conferir resultados enganosos. Witthuhn *et al.* (1998) confirmaram a possibilidade da utilização de seqüências do rRNA para distinguir táxons de *Ceratocystis*.

Guo *et al.* (2001) sequenciaram fragmentos amplificados, com iniciadores universal e específico para fungo, do gene 5,8S e das regiões espaçadoras ITS1 e ITS2 do rDNA a partir de DNA total extraído de tecidos congelados da palmeira *Livistona chinensis*. Análises filogenéticas com máxima parcimônia, teste de *bootstrap* e consulta ao GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, EUA) e EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Alemanha) a partir dessas seqüências, indicaram que seis seqüências clonadas pertenciam a origens diferentes, sendo cinco de fungos e uma de planta.

2.3 Genes ribossomais

Para as análises de seqüenciamento, dos genes mais utilizados na análise filogenética dos fungos, são os genes ribossomais. Os genes rRNA (ácido ribonucléico ribossomal) são uma família de genes repetitivos que são organizados em duas unidades transcritas distintas, ambas codificando espécies de RNA (rRNA) que formam o ribossomo. Primeiramente, os genes 18S (subunidade menor), 5,8S e 28S (subunidade maior) formam um cistron que é repetido diversas vezes em vários eucariotos (Long & Dawid, 1980). Os cistrons são organizados em uma cauda com cabeça de forma repetitiva com regiões espaçadoras internas (ITS) separando os genes em unidades e um espaço intergênico (IGS) separando as unidades adjacentes. Essas unidades repetitivas, incluindo os espaços intergênicos, são chamadas de DNA ribossomal, e podem existir diversos arranjos por genoma (Ganley & Scott, 2002).

Outra unidade de rRNA transcrita é composta de genes 5S, os quais possuem aproximadamente 120 pares de bases. Esses genes são repetidos também, mas

suas organizações repetitivas são mais diversificadas do que aquelas do rDNA. Em fungos, os genes 5S são às vezes incluídos dentro de unidades repetidas de rDNA ou encontradas dispersas, como cópias individuais (Ganley & Scott, 2002).

Seqüências do ácido nucléico de subunidades de rRNA têm provado serem úteis para inferir árvores filogenéticas em diversos táxons de fungos (Bruns & Szaro, 1992), por serem ortólogos entre todos os organismos, e também por que rRNAs não passam por transferência entre espécies, como fazem algumas seqüências nucleotídicas (Sogin, 1991 citado por Wingfield *et al.*, 1994). Por isso, rRNA é freqüentemente usado para inferir filogenias de táxons distantes e/ou próximos.

2.4 O hospedeiro *Bactris gasipaes* Kunth

A pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth) pertence à família Palmae (Arecaceae) e é uma palmeira que foi domesticada pelos ameríndios e disseminada pela Bacia Amazônica, região noroeste andina e América Central (Mora-Urpí, 1993; Clement (1995a) citado por Mora-Urpí *et al.*, 1997). O seu cultivo é comum em quintais e pequenos pomares na Amazônia. No Brasil, também é encontrada nos seguintes Estados: Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo.

É uma palmeira cespitosa (multicaule), podendo atingir 20 m ou mais de altura. O diâmetro do caule pode variar de 15 a 30 cm. O ápice do estipe sustenta uma coroa de 15 a 25 folhas pinadas, com os folíolos inseridos em diferentes ângulos. O palmito é formado pelas folhas tenras não-expandidas, localizadas no centro da coroa. A inflorescência monóica aparece nas axilas das folhas senescentes. Após a polinização, os cachos podem conter entre 50 a 1000 frutos e pesar de 1 a 25 kg (Clement, 1999a).

O fruto é uma drupa que pode medir de 3 a 7 cm de diâmetro (Clement, 1999b) e individualmente pesam de 10 a 250 g (Clement, 1999a). Possui forma ovalar ou globular, apresentando os elementos do cálice aderidos à sua base aplainada e com o ápice marcado pelo pericarpo delgado (Camacho & Soria, 1970). Apresenta epicarpo com coloração verde quando imaturo e com cores variadas quando maduro, podendo ser amarela, vermelha e intermediária; seu mesocarpo pode apresentar-se desde bastante oleoso até amiláceo, com característica farinácea, textura firme e coloração

amarelo-alaranjado (Bohorquez & Ycaza, 1988; Cavalcante, 1991), com um endocarpo envolvendo um endosperma fibroso e oleoso (Clement, 1999a).

O período de florescimento da pupunha, na Amazônia central, ocorre entre agosto e outubro, e o principal período de coleta entre dezembro e março. Entretanto, poderá ocorrer um período de menor florescimento durante maio-junho, com frutificação em agosto-setembro, em anos e solos favoráveis (Clement, 1999a).

2.4.1 Usos e potencial econômico

A pupunha apresenta-se como alternativa viável e versátil para nossa população. Encontrada em muitos quintais, pode ser utilizada como um componente paisagístico. Clement (1987) relata que a pupunha é um alimento quase completo, por apresentar razoável quantidade de proteína, óleo, caroteno (pro-vitamina A) e amido. Bohorquez & Ycaza (1988) destacaram o valor energético do fruto da pupunha por apresentar uma proporção de 8,5% de açúcar e uma elevada taxa de gordura, assim sendo, possui um notável valor calórico, além de conter cálcio, ferro e vitaminas. Tracy (1985) e Fernández-Piedra *et al.* (1995) citaram a presença de sete aminoácidos essenciais em frutos de pupunha, em quantidades pequenas.

A pupunha apresenta mesocarpo com textura variável, o qual é determinado pela quantidade de água, amido, fibra e óleo (Clement, 1999a). Tradicionalmente os frutos da pupunha são consumidos após cozimento em água com sal durante 30 a 60 minutos para melhorar o sabor e eliminar cristais de oxalato de cálcio, que irritam a boca (Arkcoll & Aguiar (1984) citado por Clement, 1999a), e um inibidor de tripsina (Murillo *et al.* (1983) citado por Clement, 1999a). Depois de descascados, partidos pelo comprimento e a semente extraída são prontos para o consumo. Podem ser saboreados puros e/ou acompanhado de café ou usados na fabricação de pudim e sorvete. Os frutos amidosos podem ser servidos com maionese ou outros molhos, fritos ou assados etc. Kerr *et al.* (1997) apresentaram mais de 60 receitas de pratos feitos com pupunha. Oliveira (2000) confirmou a viabilidade de frutos da pupunha na obtenção de bebidas alcoólicas por fermentação dirigida. A bebida apresentou teor alcoólico ideal, cor característica do fruto, sabor e aroma agradáveis, e bom nível de aceitação.

Atualmente, o maior interesse nessa cultura é a produção de palmito (Mora-Urpí *et al.*, 1997), o qual tem despertado interesse como agronegócio rentável (Bovi, 1997). Clement (1999a) afirmou que o palmito extraído da pupunha é melhor que o de açai (*E. oleracea* e *E. precatória*), além disso, permite um melhor controle de qualidade no produto final, contribuindo assim, para abrir um amplo mercado para a pupunha no Brasil.

2.4.2 Doenças da pupunheira

A pupunha é uma espécie verdadeiramente domesticada (Clement (1992) citado por Clement, 1999a). O potencial para produção de palmito tem incrementado o seu cultivo e Clement (1999a) alertou que estará livre de doenças em seu novo ambiente por uma ou duas décadas. Após isto estará suscetível a ataques, pois, o fruto é substrato ideal e até as folhas oferecem bom substrato para fungos e bactérias.

Pesquisas já realizadas identificaram diversos fungos causando doenças em pupunheira. Afetando diversos órgãos, tais como, raiz, folhas, frutos e sementes, com ocorrências em vários estádios, variando de ataques em sementes até a fase de produção de frutos. O ataque em sementes é preocupante, pois vários produtores as vêm importando para o cultivo no Brasil.

Hernández *et al.* (1999) relataram que *Fusarium* e *Thielaviopsis* atacam raízes de pupunheira, causando problemas no crescimento, bem como diminuindo o rendimento e a qualidade do palmito. O fungo *Phytophthora palmivora* e a bactéria *Erwinia chrysanthemi* são responsáveis por doenças no caule, comprometendo o palmito. *Thielaviopsis paradoxa* foi observado por Pizzinatto *et al.* (1996) causando podridão basal em pupunheira.

Stein *et al.* (1996) isolaram o fungo *Curvularia* sp. causando severa doença foliar em pupunheiras, em viveiros da região de Bragantina (Pará, Brasil). Em campos de produção de palmito em Manaus, Vêras *et al.* (2000) constataram a presença de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia eragrostides*, *Pestalotiopsis* spp., *Fusarium* spp., *Macrophoma* spp., *Geotrichum* sp., *Phomopsis* sp. e *Lasiodiplodia* sp. causando lesões necróticas nas folhas, de diferentes formas e tamanhos (Vêras & Yuyama, 2000). Hernández *et al.* (1999) citaram *Pestalotiopsis* sp., *Mycosphaerella* sp.,

Colletotrichum sp., *Dreschlera incurvata* e *Fusarium moniliforme*. *Colletotrichum* sp. e *Capnodium* sp. foram citados por Pava *et al.* (1993), na Colômbia. Pizzinatto *et al.* (1996) realizaram a identificação de agentes patogênicos em material procedente de vários municípios do Estado de São Paulo e identificaram *Colletotrichum gloeosporioides*, *Bipolaris* sp., *Alternaria* sp. e *Cercospora* sp. causando manchas foliares.

Pava *et al.* (1993) encontraram *Thielaviopsis* sp. causando severos danos em frutos de pupunha, na Colômbia. Mota *et al.* (1992) avaliaram o efeito do ensacamento de cachos de pupunha na redução da incidência de fungos, em Manaus. Foram detectados os fungos *Thielaviopsis paradoxa*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp.. Os autores citaram que os dois primeiros são patógenos de campo, enquanto os demais são de pós-colheita. A incidência dos fungos foi reduzida nos frutos ensacados; além disso, o aspecto dos frutos foi melhorado devido à redução de ferimentos causados por insetos.

Mota & Gasparotto (1995) quantificaram o efeito dos fungos *Ceratocystis paradoxa* e *Colletotrichum gloeosporioides* na ocorrência da queda precoce dos frutos e na dinâmica dessa síndrome em frutos de pupunha. Constataram que a incidência maior de ataque foi em frutos próximos à sua maturação, mas a queda dos frutos ocorreu com maior intensidade nos dois primeiros meses de desenvolvimento do fruto. Considerando que 80% dos frutos caídos não apresentavam nenhuma lesão, concluíram que o problema estava relacionado a fatores abióticos.

Mota & Gasparotto (1998) realizaram um estudo sobre a síndrome da queda de frutos da pupunheira e a incidência de fungos fitopatogênicos e conseguiram isolar *Ceratocystis paradoxa*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Verticillium* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. Do total de frutos encontrados caídos, 19,8% apresentaram-se infectados.

Vallejo (1995) realizou isolamento de microrganismos patogênicos de frutos e sementes de pupunha em Iquitos. Identificou *Thielaviopsis paradoxa*, *Fusarium* sp., agente da podridão da semente e endosperma, *Erraphium* sp., agente do mofo branco da semente, e *Erwinia* sp., agente da podridão branca do endosperma.

Como microrganismos causadores de doenças da pupunha, Hernández *et al.* (1999) destacaram os fungos *Thielaviopsis paradoxa* e *Chalaropsis thielavioides* porque colonizam rapidamente a polpa, penetrando e apodrecendo a semente. *Schizophyllum* sp., *Xylaria* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. contaminam superficialmente a semente, desenvolvendo-se e permanecendo ativos durante o armazenamento. Segundo esses autores, os fungos penetram nas sementes quando estas são colocadas em condições de germinação, causando apodrecimento.

Durante o armazenamento de sementes de pupunha, Ferreira (1988) identificou o ataque dos seguintes fungos: *Fusarium moniliforme*, *F. flocciferum*, *F. solani*, *F. semitectum*, *Fusarium* sp., *Thielaviopsis paradoxa*, *Phoma* sp., *Penicillium* sp., *Dimargaris* sp., *Geotrichum* sp., *Trichoderma* sp. e *Aspergillus* sp.. Entre vários fungos associados à sementes de pupunha, Coates-Beckford & Chung (1987) afirmaram que o *Fusarium solani* destacou-se como o principal responsável pela queda da germinação.

Em viveiro, *Colletotrichum gloeosporioides* foi responsável pela morte de plântulas jovens (Alves & Batista, 1983). *Fusarium* sp. e *Rhizoctonia* sp. foram identificados causando tombamento (Pizzinatto *et al.*, 1996).

Segundo Vargas (1993), os fungos normalmente não penetram na semente antes da colheita do fruto. Mora-Urpí *et al.* (1997) afirmaram que a infecção por fungos nas sementes armazenadas e durante a germinação é, geralmente, devido ao excesso de umidade e/ou tratamento não apropriado com fungicida. Bovi (1998) deduziu que a causa da contaminação das sementes está no manuseio e armazenamento inadequados das sementes.

Alguns fungos citados como patógenos para a pupunheira, também já foram isolados como endófitos de hospedeiros tropicais, tais como *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Phoma* sp., *Penicillium* sp., *Xylaria* sp. e *Phomopsis* sp. (Rodrigues & Samuels, 1990; Medeiros-Galvão, 1998; Guimarães, 1998; Araújo, 1999; Drumond, 2000). O tecido vegetal utilizado para isolamento de endófitos nesses trabalhos foi de folhas, em nenhum foram utilizados frutos ou sementes dos hospedeiros.

A investigação sobre a ocorrência de endófitos em frutos e sementes de pupunheira é esclarecedora sobre a abordagem da infecção de sementes armazenadas. O conhecimento da seqüência nucleotídica dos isolados com maior freqüência, indicará a diversidade entre eles.

3. OBJETIVOS

Isolar fungos endofíticos de frutos de *Bactris gasipaes* Kunth;

Identificar os isolados mais frequentes, analisando-se suas estruturas de reprodução sexual e assexual quando foram fungos filamentosos;

Determinar, por sequenciamento, a composição do material amplificado por PCR dos isolados endofíticos do gênero *Thielaviopsis*;

Determinar os haplótipos dos indivíduos em estudo;

Verificar a similaridade genética dos isolados do gênero *Thielaviopsis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material biológico e local de coleta

Foram utilizados frutos de pupunheira, aparentemente sadios. Coletados no Banco de Germoplasma do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, localizado na Estação Experimental de Fruticultura Tropical, Km 39 da Rodovia BR-174, Manaus, Amazonas.

4.1.1 Amostragem

Foram realizadas duas coletas de frutos. Em cada coleta foram amostradas dez plantas distintas. O procedimento padrão foi a coleta do cacho de frutos com podão e escolha dos frutos sadios. Ao chegar no Laboratório de Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, foram lavados e suas superfícies desinfestadas (Quadro 01).

Não foi utilizado o mesmo número de fragmentos inoculados para cada parte do fruto em função do estágio de maturação do fruto e da própria manipulação. Quando o fruto não estava completamente maduro foi difícil separar o exocarpo (casca) do mesocarpo e a quebra do endocarpo foi realizada com alicate; às vezes, muita força foi empregada e o material era perdido.

4.2 Meios de cultura

Foram utilizados os meios de cultura BDA (200 g de batata, 20 g de dextrose e 15 g de ágar – pH 6,8) e PDA (constituído de decocto de 200 g de polpa de pupunha, 20 g de dextrose e 15 g de ágar, para 1 L de meio – pH 6,8). O Quadro 01 demonstra o total de frutos por planta, meios de cultura e placas utilizadas nessa pesquisa.

QUADRO 01. Total de plantas de pupunha (*Bactris gasipaes*) investigadas para ocorrência de endofíticos, quantidade de frutos usados, meios de cultura e total de placas usadas no isolamento por partes do fruto.

Plantas	Quantidade de frutos	Meios de cultura	Quantidade de placas/parte do fruto inoculada		
			Mesocarpo	Endocarpo	Amêndoa
P1	6	BDA	-	3	5
P2	12	BDA	-	-	12
P3	17	BDA	-	-	17
P4	4	BDA	-	4	4
P5	4	BDA	4	-	3
P6	5	BDA	-	2	5
P7	8	BDA	8	-	-
P8	4	BDA	4	3	3
P9	5	BDA	-	-	5
P10	3	BDA	3	-	3
P11	3	BDA	-	3	3
P12	3	BDA	-	2	3
		PDA	-	2	3
P13	3	BDA	-	3	3
		PDA	-	3	3
P14	3	BDA	-	3	3
		PDA	-	3	3
P15	3	BDA	1	3	3
		PDA	1	1	2
P16	3	BDA	-	3	3
		PDA	-	3	3
P17	3	BDA	1	2	3
		PDA	1	3	3
P18	2	BDA	2	2	2
		PDA	2	2	2
Total	91	BDA	23	33	80
		PDA	4	17	19

4.3 Soluções e Tampões

As soluções e tampões descritos a seguir foram utilizados nos diversos procedimentos executados durante o desenvolvimento do presente trabalho.

4.3.1 Soluções para extração do DNA

4.3.1.1 Solução de RNase A

Ribonuclease A	100 mg
Água Milli-Q	10 mL

A Ribonuclease A utilizada foi da USB corp. e concentrada a 10 mg/mL. A solução foi preparada por aquecimento em banho-maria a 100°C por 10 min e mantida a -20°C.

4.3.1.2 Tampão de extração (CTAB 2%) (Doyle & Doyle, 1990, modificado por Vicente, 2000)

Tris	2,42 g
EDTA Na ₂	0,74 g
NaCl	8,20 g
CTAB	2,00 g

Os reagentes foram dissolvidos inicialmente em 80 mL de água Milli-Q. Após o ajuste do pH para 8 com HCl 1N, o volume foi completado para 100 mL com água Milli-Q. O tampão foi autoclavado por 15 min a 121 atm e mantido a temperatura ambiente.

4.3.1.3 Clorofil

Clorofórmio	240 mL
Álcool isoamílico	10 mL

A solução foi mantida a temperatura ambiente.

4.3.1.4 Tampão Tris-EDTA (TE)

Tris-HCl 1 M pH 8 (10 mM)	1,0 mL
EDTA 0,5 M pH 8 (1 mM)	0,2 mL
Água Milli-Q	98,8 mL

O Tris-HCl e o EDTA foram alicotados das soluções estoque. O tampão foi autoclavado por 15 min a 121 atm e mantido a temperatura ambiente.

4.3.2 Soluções para Reação de PCR

4.3.2.1 Solução de MgCl₂ 7,5 mM

MgCl ₂ .6H ₂ O	0,15 g
--	--------

Foi dissolvido em 80 mL de água Milli-Q e o volume completado para 100 mL. A solução foi autoclavada por 15 min a 121 atm e mantida a -20°C.

4.3.2.2 Deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs)

Os dNTPs (ATP, CTP, GTP e TTP) obtidos da Pharmacia foram fornecidos em uma concentração onde cada dNTP estava a 20 mM. Para uso, essa mistura foi diluída em água Milli-Q autoclavada, de modo a se obter uma solução estoque com a concentração de 2,5 mM e mantida a -20°C.

4.3.2.3 Tampão para reação de PCR

O tampão da reação (500 mM de KCl e 100 mM de Tris-HCl (pH 8)) estava na concentração 10X. Para uso na reação a concentração final foi de 1X.

4.3.2.4 Oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Os oligonucleotídeos foram adquiridos da Invitrogen Brasil - Life Technologies, na forma de “pellets” liofilizados. Todos foram diluídos baseados em suas concentrações em nmoles para uma concentração de 100 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$. A partir da solução estoque foram preparadas alíquotas para uso nas reações a uma concentração de 2 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ com água Milli-Q.

Os iniciadores (Witthuhn *et al.*, 1999) utilizados no presente trabalho foram:

- **ITS1:** 5' – TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3' e
- **LR6:** 5' – CGC CAG TTC TGC TTA CC - 3'

4.3.2.5 Enzima Taq DNA polimerase

A enzima Taq DNA polimerase (CENBIOT/RS), constituída por um único polipeptídeo de aproximadamente 86-90 kda, foi obtida em tubos de 500 unidades em 100 μl , ou seja, 5u/ μl . a enzima foi mantida a -20°c .

4.3.2.6 Tampão Tris-EDTA-Borato (TEB 10X)

Tris-base	108,0 g
Ácido bórico (H_3BO_3)	55,0 g
EDTA 0,5 M	40 mL

Os reagentes foram dissolvidos em 800 mL de água Milli-Q e o volume completado para 1 L. O pH foi ajustado para 8,4. A solução foi autoclavada por 15 min a 121 atm e mantida a temperatura ambiente. No momento do uso foi diluída 1:10 (1X) em água Milli-Q autoclavada.

4.3.2.7 Tampão da amostra (5X)

Azul de bromofenol	0,05 g
Glicerol	20 mL

Os reagentes foram homogeneizados em 70 mL de água Milli-Q e o volume completado para 100 mL.

4.4 Isolamento de fungos endofíticos

Foram isolados fungos endofíticos de 91 frutos (Quadro 01) aparentemente sadios, de acordo com a metodologia descrita por Petrini (1986) e Pereira *et al.* (1993). Os frutos e as sementes (após plaquear os fragmentos do mesocarpo, a semente foi lavada em água corrente com detergente e posterior desinfestação superficial) foram superficialmente desinfestados por meio de imersão em etanol 70% por um minuto, imersão em NaOCl 3% por quatro minutos, posterior lavagem com etanol 70% por 30 segundos e por mais quatro minutos em água destilada esterilizada.

Após a desinfestação externa, o mesocarpo, o endocarpo e a amêndoa foram cortados assepticamente em fragmentos (5-7 mm) e estes transferidos, em ordem seriada, para placas de Petri contendo os meios BDA e PDA, acrescidos de terramicina (50 µg/mL). Dez fragmentos foram dispostos em 176 placas de Petri, totalizando 1.760 fragmentos. Em 27 placas foram plaqueados fragmentos do mesocarpo, 50 receberam fragmentos do endocarpo e 99 da amêndoa. Todas as placas foram incubadas a 18°C (Guimarães, 1998), em ausência de luz. Foi plaqueado 100 µL da água destilada esterilizada, em meio BDA e incubado a 18°C, para comprovar a desinfestação superficial.

As placas foram observadas diariamente por até 30 dias e, tão logo os fungos iniciaram seu crescimento, pequenos fragmentos de micélio foram repicados para tubos de ensaio, previamente identificados com o número da planta, parte do fruto usada para isolamento e localização do fragmento disposto na placa, para conhecimento da frequência de infecção. Os tubos continham meio BDA inclinado, e foram incubados a temperatura ambiente. Em seguida, os tubos contendo essas colônias foram submetidos a fotoperíodo de 12 horas sob luz fluorescente para estimular a esporulação. O processo de repicagem dos endófitos foi interrompido por ocasião da fusão de colônias fúngicas impedindo o isolamento individual.

4.5 Identificação dos fungos isolados

A identificação dos isolados foi realizada pela análise de suas estruturas de reprodução sexual e assexual (Ellis, 1971; Barnett & Hunter, 1972; Arx, 1974; Petrini, 1986; Rossman *et al.*, 1987). Os fungos que, mesmo nessas condições, permaneceram somente na forma miceliana, não puderam ser identificados e foram considerados estéreis (não necessariamente *Mycelia sterilia*).

4.5.1 Técnica de coloração - Lactofenol

Fragmentos de endofíticos foram fixados e corados em lactofenol (Onions *et al.*, 1981), para análise em microscópio ótico das características morfológicas das estruturas reprodutivas.

4.6 Etapas para o seqüenciamento nucleotídico de parte do rDNA de endófitos de *Thielaviopsis*

4.6.1 Extração do DNA genômico

Foram selecionadas aleatoriamente 22 colônias de endófitos do gênero *Thielaviopsis* (Fig. 01). A partir dessas colônias foram obtidas culturas monospóricas por meio de diluição seriada.

Em câmara de fluxo laminar, as estruturas reprodutivas dos fungos foram raspadas com auxílio de uma alça de platina flambada. Preparou-se uma suspensão de conídios em tubos de ensaio contendo 2,5 mL de solução Tween-80 0,1%. Os tubos foram submetidos a agitação, por um minuto, em agitador Vortex e 1 mL da suspensão em Tween-80 foi transferida para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina 0,9%. A nova suspensão foi agitada, por alguns segundos, em agitador Vortex. Foram realizadas quatro diluições seriadas (1:10; 1:100; 1:1000 e 1:10000).

Foram distribuídos 100 µL, em duplicata, de cada uma das duas últimas diluições em placas de Petri contendo meio BDA. Após a germinação dos esporos, foi transferido, de cada placa, um fragmento do meio BDA contendo uma ponta de hifa produzida a partir da germinação de um único esporo. O fragmento foi transferido para

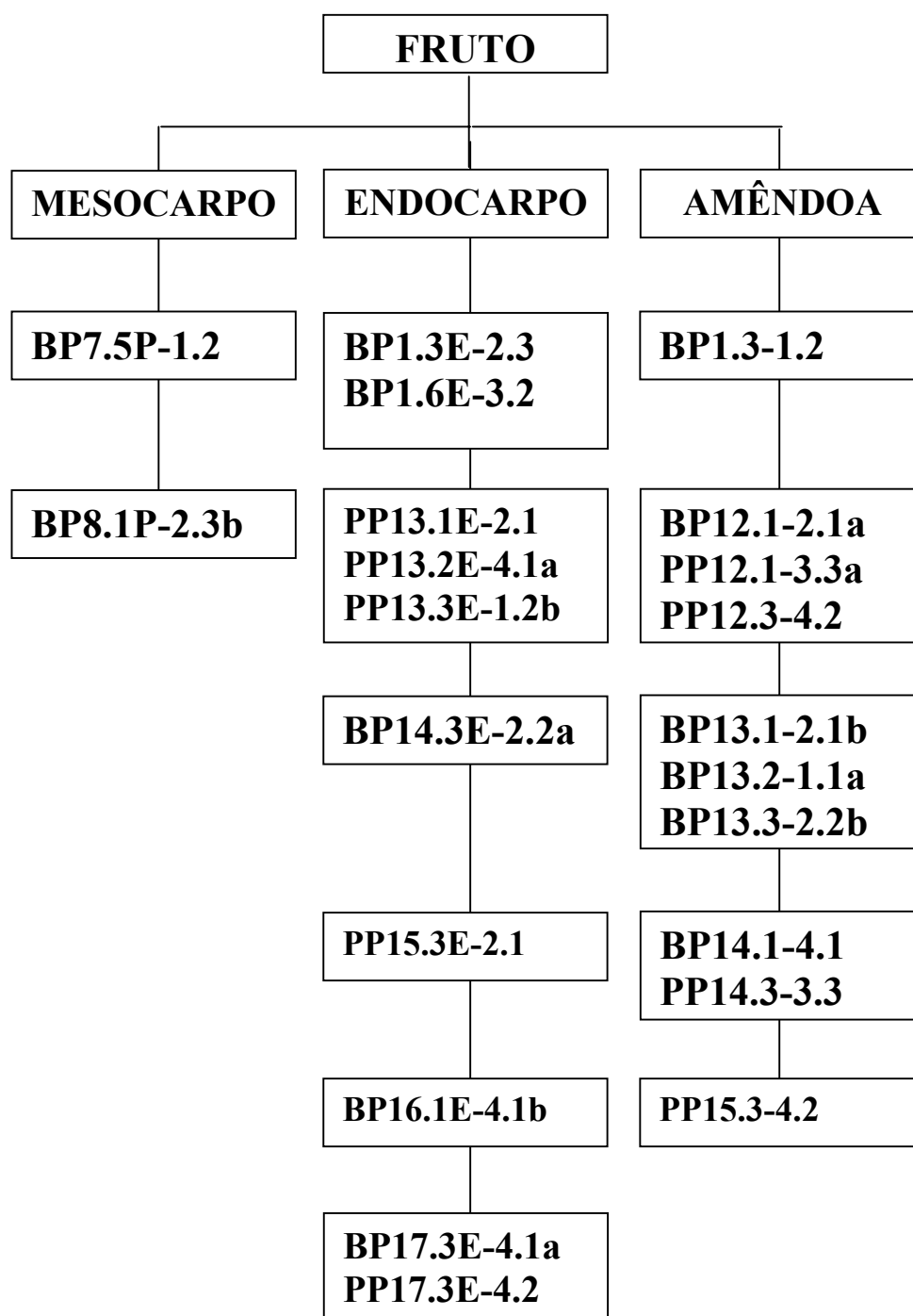


FIGURA 01. Endófitos de *Thielaviopsis* isolados do fruto da pupunheira, dos quais o DNA genômico foi extraído para amplificação de um fragmento do rDNA com posterior seqüenciamento.

uma nova placa de Petri com meio BDA, a qual foi mantida no escuro, à temperatura de 28°C, pelo tempo necessário para o crescimento da colônia.

Após a esporulação, pequenos discos com micélio e esporos foram transferidos para Erlenmeyer contendo 100 mL de meio líquido BD. Foram mantidos sob agitação orbital (100 rpm), a 28°C, por dez dias, para crescimento miceliano.

O micélio obtido com esporos foi coletado em papel de filtro esterilizado para a retirada do excesso de líquido, e pesado. No processo de extração do DNA genômico foram realizadas as etapas detalhadas a seguir.

Após secagem em papel de filtro esterilizado, 300 mg de micélio com esporos foi macerado em almofariz com nitrogênio líquido. O pó fino resultante foi transferido para tubo “Eppendorf” de 1,5 mL contendo 500 µL de tampão CTAB. A partir dessa etapa, o material foi manipulado a 4°C. Homogeneizou-se suavemente e incubou-se em banho-maria, a 65°C, por dez minutos.

Após o banho-maria foram adicionados 500 µL de clorofil, homogeneizando-se suavemente e centrifugou-se a 14.000 rpm por cinco minutos. A fase superior foi transferida para outro tubo “Eppendorf” e adicionou-se duas vezes o volume de etanol 96% gelado. A precipitação do DNA genômico realizou-se por incubação a -20°C por 30 minutos.

Após a precipitação, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por cinco minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado. O “pellet” foi lavado com 500 µL de etanol 70% gelado por centrifugação a 14.000 rpm durante um minuto. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram colocados sobre papel absorvente até a secagem completa do “pellet” a temperatura ambiente. O sedimento foi ressuspensão com uma solução de 97,5 µL de tampão Tris-EDTA e 2,5 µL de RNase.

4.6.2 Quantificação do DNA

Para estimar a concentração do DNA, foram utilizados 2 µl do DNA genômico de cada amostra mais 3 µl de tampão da amostra (5x). esses DNAs foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, juntamente com amostras de DNA em concentrações conhecidas (5, 50 e 100 ng). após a corrida no gel, foi corado em brometo de etídio por 20 minutos. a leitura da quantificação do DNA foi realizada

através da intensidade de fluorescência num fotodocumentador de imagens (biotech image master vds modelo fti-500, da amersham pharmacia biotech) com luz ultravioleta.

4.6.3 Amplificação *in vitro* do DNA pela reação de PCR (Mullis & Faloona, 1987)

Foi amplificado parte do DNA ribossomal de cada indivíduo estudado, utilizando-se o mesmo par de primers do trabalho de Witthuhn *et al.* (1999). Este fragmento compreende o final 3' da subunidade menor do rRNA (SSU – small subunit), a região 5,8S do rRNA, parte da subunidade maior do rRNA (LSU – large subunit) e as regiões espaçadoras internas (ITS - internal transcribed spacer) 1 e 2, contendo 1600 pares de bases. A reação de amplificação foi realizada em tubo “Eppendorf” de 0,2 mL, conforme o seguinte protocolo:

- 11,1 µL de água Milli-Q;
- 3,0 µL de MgCl₂;
- 2,5 µL de dNTPs 1 mM;
- 2,5 µL de tampão da reação (TK);
- 2,0 µL do iniciador ITS1;
- 2,0 µL do iniciador LR6;
- 0,9 µL da Taq DNA polimerase a 5U/µL;
- 1,0 µL do DNA genômico extraído (2,5 a 20 ng/µL).

O volume final da reação foi de 25 µL e os tubos foram colocados em termociclador Perkin-Elmer 9.600. O programa utilizado tinha o seguinte perfil de temperatura: a etapa inicial de desnaturação foi a 94°C por dois minutos; 30 ciclos, sendo 94°C por um minuto – a etapa da desnaturação das fitas complementares do DNA, 50°C por um minuto – a etapa para anelamento dos iniciadores complementares à região alvo e 72°C por dois minutos – etapa destinada a extensão do segmento amplificado; e uma etapa final de extensão a 72°C por cinco minutos. Este programa de amplificação tem duração de aproximadamente três horas.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,0% por cerca de uma hora e posteriormente corados por 20 minutos com brometo de etídio 1%. O DNA evidenciado foi fotografado sob luz UV em transiluminador. Foi utilizado DNA Ladder de 1 Kb como marcador molecular de peso de bandas. O tamanho do fragmento amplificado foi comparado com o marcador para determinar se correspondia ao esperado.

4.6.4 Purificação do produto amplificado

Para eliminação dos produtos não incorporados na reação de amplificação foi utilizado o Kit Concert Rapid PCR (Life Technologies – GIBCO BRL) e a purificação do produto amplificado foi realizada de acordo com as especificações do fabricante, com exceção da quantidade de tampão TE que foi modificado para 30 μ L e tempo de incubação na etapa da eluição do DNA, que foi de 10 minutos.

O produto da amplificação por PCR foi transferido para tubo “Eppendorf” de 1,5 mL e acrescentado 400 μ L da solução de captura – H1 (binding solution), homogeneizando a mistura e depois esse material foi transferido para a coluna.

A coluna ficou dentro de um tubo “Eppendorf” de 2 mL. Foi centrifugado a 12.000 rpm por um minuto e em seguida o líquido foi descartado. Foram adicionados 700 μ L do tampão de lavagem (com etanol) – H2 (wash buffer) e centrifugado a 12.000 rpm por um minuto. O filtrado foi descartado sendo novamente centrifugado a 12.000 rpm por um minuto para remover todo o resíduo do tampão de lavagem; o restante do líquido filtrado foi descartado.

A coluna foi transferida para novo tubo “Eppendorf” de 1,5 mL e foram adicionados 30 μ L do tampão TE (a 65°C). Foi incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse tempo, foi centrifugado a 12.000 rpm por dois minutos. O resultado da purificação foi observado a partir de 3 μ L do DNA amplificado e purificado, mais 2 μ L do tampão da amostra (5X) em gel de agarose 1,0% e também 5 μ L do marcador molecular DNA Ladder 1 Kb para se estimar sua concentração e qualidade.

4.6.5 Seqüenciamento do DNA

4.6.5.1 Reação de seqüenciamento

Todas as amostras foram seqüenciadas, utilizando-se apenas o iniciador ITS1, em um seqüenciador automático MegaBace 1000 – DNA analysis System (Amersham Biosciences - Pharmacia).

Todas as etapas do seqüenciamento do DNA foram realizadas no laboratório de tecnologia do DNA do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas. A reação de seqüência foi realizada pela técnica de PCR (seqüenciamento cíclico) com volume final de 10 µl para cada amostra (Kit da DYEnamic - Amersham Biosciences – Pharmacia), a saber:

- 3,0 µL de água Milli-Q;
- 2,0 µL de DNA purificado;
- 1,0 µL do iniciador ITS1;
- 4,0 µL da solução de seqüenciamento (pré-mix).

A placa de seqüenciamento foi colocada no termociclador mastercycler gradient da eppendorf ag. O programa utilizado tinha o seguinte perfil de temperatura: a etapa inicial de desnaturação foi a 95°C por 25 segundos; 30 ciclos, sendo 95°C por 15 segundos para desnaturação das fitas complementares, 50°C por 20 segundos para haver anelamento do iniciador e 60°C por um minuto para ocorrer a extensão da região a ser seqüenciada. Este programa de amplificação totalizou cerca de 90 minutos.

4.6.5.2 Precipitação do produto da reação de seqüenciamento

Após o término da PCR de seqüenciamento foi realizada a reação de precipitação. Ao produto da PCR de seqüenciamento foi adicionado 1 µL de acetato de amônia, mais 40 µL de etanol absoluto e agitado em Vortex por alguns minutos. A mistura foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente. A placa de seqüenciamento foi envolvida em papel alumínio para evitar a incidência de luz.

Após o tempo de incubação, a placa foi centrifugada a 4.000 rpm por 40 minutos, em centrífuga refrigerada 5804R da Eppendorf. O sobrenadante foi descartado sendo adicionado 150 µL de etanol 70%, em seguida foi centrifugado a 4.000 rpm por

Costa Neto, P.Q.

15 minutos e o sobrenadante descartado. A placa foi centrifugada invertida a 1.000 rpm por apenas um *spin*. O DNA foi ressuspendido em 10 µL de tampão. A placa foi vedada e agitada em Vortex, por dois minutos. Foi realizada mais uma centrifugação a 1.000 rpm por apenas um *spin*.

4.6.5.3 Eletroforese de seqüenciamento

A decodificação nucleotídica do fragmento amplificado foi realizada em seqüenciador automático MegaBace 1000 – DNA analysis System (Amersham Biosciences - Pharmacia). A eletroforese capilar em gel de poliacrilamida foi realizada com base na metodologia padrão do fabricante. Para condições de injeção: 3 KV por 80 segundos; condições de corrida: 6 KV por 200 minutos; sob uma temperatura de 44°C. A incorporação de cada dideoxynucleotídeo marcado com um cromóforo na reação de seqüenciamento cíclico foi lido pelo seqüenciador automático pela captação da fosforilação.

4.6.6 Edição e alinhamento das seqüências nucleotídicas

Após o término do seqüenciamento nucleotídico das 22 amostras, procedeu-se a conferência e edição visual entre as seqüências por comparação com o padrão apresentado no cromatograma de cada reação. As espécies de *Ceratocystis* obtidas no GenBank foram incluídas na análise para confirmação do possível polimorfismo entre os endófitos isolados (Quadro 02).

A partir da inclusão dessas novas amostras, o total de seqüências em análise foi de 36 amostras. Essas amostras foram alinhadas no programa Clustal W (BioEdit). Primeiro foi realizado um alinhamento somente das 22 amostras, foi observado a necessidade da inclusão de eventos de inserção/deleção. O segundo alinhamento foi realizado entre as 36 amostras. Foi necessária a eliminação de parte das extremidades para um padrão de alinhamento mais homogêneo.

Após o alinhamento foi obtida uma matriz de dados contendo as seqüências dos 36 táxons. Como grupo externo foram consideradas duas amostras de

Chalara elegans (nº de acesso no GenBank: AF275482 e AF275509), baseado no pressuposto de que sejam espécies muito próximas taxonomicamente de *T. paradoxa*.

QUADRO 02. Sequências nucleotídicas de *Ceratocystis* spp. e *Chalara elegans* obtidas no GenBank, e utilizadas para comparação com as sequências dos isolados de pupunha.

Espécie	Origem	Hospedeiro	GenBank
<i>Ceratocystis moniliformis</i> (Hedgc.) C. Moreau	África do Sul	<i>Erythrina</i> sp.	AF043597
<i>Ceratocystis fagacearum</i> (Bretz) J. Hunt	E. U. A.	<i>Quercus</i> sp.	AF043598
<i>Ceratocystis radicola</i> (Bliss) C. Moreau	Califórnia, E.U.A.	Desconhecido	AF043599
<i>Ceratocystis laricicola</i> Redfern & Minter*	Escócia	<i>Larix</i> sp.	AF043600
<i>Ceratocystis polonica</i> Siemaszko*	Polónia	<i>Picea</i> sp.	AF043601
<i>Ceratocystis pinicola</i> T. C. Harr. & M. J. Wingf.*	Inglaterra	<i>Pinus</i> sp.	AF043602
<i>Ceratocystis virescens</i> (R. W. Davidson) C. Moreau*	Nova York, E.U.A.	<i>Quercus</i> sp.	AF043603
<i>Ceratocystis fimbriata</i> Ellis & Halst.	França	<i>Platanus</i> sp.	AF043604
<i>Ceratocystis albofungus</i> M. J. Wingf. De Beer & Michael Morris	África do Sul	<i>Acacia</i> sp.	AF043605
<i>Ceratocystis adiposa</i> (E. J. Butler) C. Moreau	Japão	Desconhecido	AF043606
<i>Ceratocystis paradoxa</i> (Dade) C. Moreau	Desconhecida	<i>Musa</i> sp.	AF043607
<i>Ceratocystis paradoxa</i> (Dade) C. Moreau	Desconhecida	Desconhecido	AF275477
<i>Chalara elegans</i> Nag Raj & Kend.	Desconhecida	<i>Betula</i> sp.	AF275482
<i>Chalara elegans</i> Nag Raj & Kend.	Desconhecida	<i>Pelarogonium</i> sp.	AF275509

* Pertencem ao complexo *Ceratocystis coerulescens* (Münch) B. K. Bakshi

Com o objetivo de estabelecer homologia dos sítios entre os indivíduos, foi necessária a inclusão de “gaps” na matriz de dados, os quais correspondem às inserções/deleções. Assim sendo, o alinhamento final ficou com 692 pares de bases, com exceção do endófito *Thielaviopsis paradoxa* (PP12.3-4.2, com 663 pb) e *Ceratocystis paradoxa* (acesso no GenBank nº AF275477, com 420 pb).

4.6.7 Caracterização molecular dos endófitos

4.6.7.1 Distância genética

A busca da árvore mais parcimoniosa foi realizada com algoritmo heurístico no programa PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) 4.0 para Macintosh (Swofford, 2001), por meio do princípio metodológico de distância genética e os “gaps” foram tratados como ausência de dados.

Para realizar o cálculo da distância genética, foi utilizado o tipo Distância p – não corrigida, onde é considerada a proporção de posições em que as duas seqüências diferem, ou seja, o número de nucleotídeos diferentes entre duas seqüências é dividido pelo número total de nucleotídeos comparados. Foi criada uma matriz de distância p – não corrigida, de onde, indiretamente, se extraiu as proporções de transições e transverções entre os pares de seqüências nucleotídicas.

A topologia para os táxons estudados foi estimada pelo método de agrupamento de vizinhos (neighbor-joining, NJ) implementado em PAUP (Swofford, 2001), foi aplicado o teste de confiança em topologia *bootstrap* (Russo *et al.*, 2001).

4.6.7.2 Análise dos haplótipos

Os haplótipos entre os 22 isolados endofíticos foram obtidos com auxílio do Programa TCS (Templeton Crandall Sing) (Clement *et al.*, 2000), tendo as seqüências nucleotídicas alinhadas no formato Nexus e os “gaps” foram considerados como um quinto caracter.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento dos endofíticos

Os meios de cultura utilizados, BDA e PDA, apresentaram os mesmos táxons, sem preferência por um ou por outro meio. Após 48 horas de incubação foi possível a observação de crescimento miceliano.

Do total de 1.760 fragmentos incubados, 422 apresentaram microrganismos endofíticos, representando uma frequência de isolamento de 23,9%. Rodrigues (1994) obteve 21 a 30%, quando isolou endófitos da palmeira tropical *E. oleracea*, e Cannon & Simmons (2002) obtiveram 12 a 22%, quando investigaram endófitos em hospedeiros tropicais na Guiana.

Foram isolados 627 microrganismos, sendo 233 do mesocarpo, 208 do endocarpo e 186 da amêndoa. Cannon & Simmons (2002) observaram variação entre 9 a 23% de fragmentos não apresentando crescimento de endófitos de um total de 2.520. Foi sugerido pelos autores que o tamanho do fragmento de isolamento é importante, pois pode interferir na comunidade endofítica investigada, ou seja, se o fragmento for grande, o microrganismo mais próximo da borda impedirá o desenvolvimento daquele mais distante. Portanto, fragmentos menores propiciam a obtenção de um maior número de isolados.

A frequência de isolamento do mesocarpo foi de 47,7%, com 129 fragmentos apresentando crescimento de microrganismos. O endocarpo, com 146 fragmentos, apresentou 29,2% e a amêndoa, com 147 fragmentos, apresentou 14,8%. Pode-se supor uma relação com os componentes nutricionais do mesocarpo, o qual é rico em amido (Bohorquez & Ycaza, 1988; Oliveira, 2000). Rodrigues & Samuels (1990) observaram uma maior concentração de endófitos na nervura central do que na região situada entre os vasos condutores em folhas da palmeira *Licuala ramsayi*.

A técnica freqüentemente utilizada para o isolamento de microrganismos endofíticos tem sido a desinfestação superficial do material vegetal utilizado, com destaque para as folhas, variando a concentração e o tempo de exposição. O meio de cultura é muito importante pois pode interferir diretamente na comunidade endofítica do

hospedeiro, tal fato se deve pela mudança de disponibilidade de nutrientes a que são submetidos. Uma técnica alternativa, que a priori, supera tais etapas, foi apresentada por Guo *et al.* (2001) que, através da técnica molecular PCR, utilizando iniciadores universal e específicos para fungos, conseguiram identificar fungos endofíticos diretamente da extração de DNA a partir de tecido da planta hospedeira. Foi amplificado parte do DNA ribossomal sem fazer o isolamento do microrganismo em meio de cultura.

5.2 Endófitos do fruto de pupunha

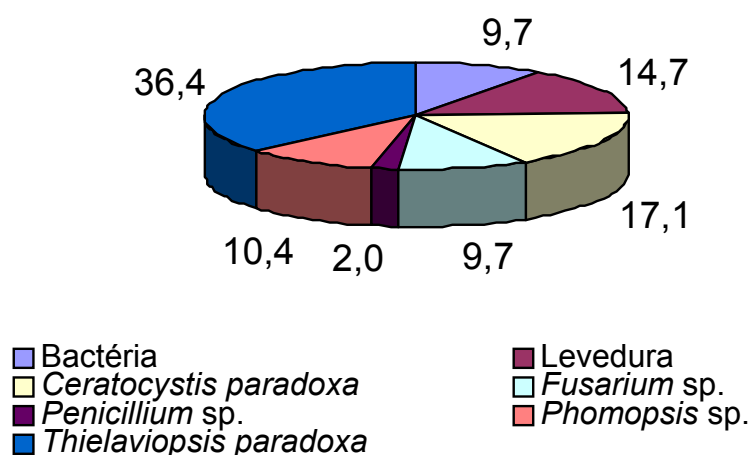


GRÁFICO 01. Percentual de microrganismos isolados como endofíticos do fruto de pupunheira (*Bactris gasipaes*), em um total de 627.

Foram isolados e identificados cinco gêneros de fungos filamentosos nos frutos de *B. gasipaes*, sendo o mais frequente *Thielaviopsis paradoxa* (36,4% dos 627 microrganismos isolados), seguido por *Ceratocystis paradoxa* (17,1%), *Phomopsis sp.* (10,4%). Os isolados menos frequentes foram *Fusarium sp.* (9,7%) e *Penicillium sp.*

(2,0%). Também foram isolados como endofíticos 92 fungos leveduriformes e 61 bactérias, representando 14,7% e 9,7%, respectivamente (Gráfico 01), apesar do uso do antibiótico terramicina em meio de cultura para isolamento de fungos.

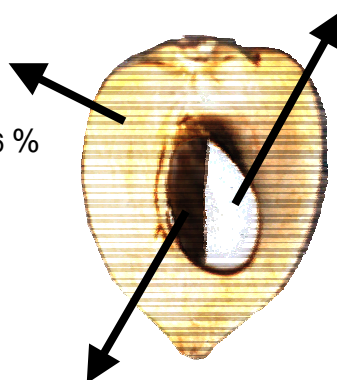
Os endófitos mais frequentemente isolados de palmeiras têm sido membros da família Xylariaceae (Rodrigues & Samuels, 1990; Rodrigues, 1994; Guo *et al.*, 2000); entretanto, neste trabalho nenhum foi identificado. Talvez este fato possa estar associado com o tecido do hospedeiro utilizado para isolamento dos endófitos, pois nas investigações anteriores utilizaram-se folhas, enquanto neste trabalho foi utilizado o fruto. O gênero *Phomopsis* tem sido relatado como endófito tanto em diferentes hospedeiros tropicais (Pereira, 1993; Medeiros-Galvão, 1998; Guimarães, 1998) como em palmeiras (Rodrigues & Samuels, 1990; Rodrigues, 1994; Guo *et al.*, 2000). Os gêneros *Fusarium* e *Penicillium* ainda não foram citados como endófitos em palmeiras, entretanto, foram identificados em outros hospedeiros tropicais (Medeiros-Galvão, 1998; Guimarães, 1998).

MESOCARPO

Ceratocystis paradoxa 38,5%
Leveduras 18,8 %
Bactérias 14,0 %
Fusarium sp. 8,1 %
Penicillium sp. 4,0 %
Thielaviopsis paradoxa 2,6 %

AMÊNDOA

Thielaviopsis paradoxa 8,9 %
Leveduras 2,8 %
Phomopsis sp. 2,6 %
Bactérias 2,2 %
Fusarium sp. 2,0 %
Ceratocystis paradoxa 0,1 %
Penicillium sp. 0,1 %



ENDOCARPO

Thielaviopsis paradoxa 26,6 %
Phomopsis sp. 7,8 %
Fusarium sp. 3,8 %
Leveduras 2,6 %
Ceratocystis paradoxa 0,4 %
Bactérias 0,2 %
Penicillium sp. 0,2 %

FIGURA 02. Percentual de microrganismos endofíticos isolados por parte de frutos de pupunheira (*Bactris gasipaes*).

Observou-se uma frequência maior de isolamento de *C. paradoxa* a partir do mesocarpo, enquanto seu anamorfo *T. paradoxa* foi isolado do endocarpo e da amêndoa (Fig. 02). O gênero *Phomopsis* não foi encontrado colonizando o mesocarpo dos frutos; sua maior ocorrência foi no endocarpo (7,8%). O gênero *Fusarium* foi isolado das três partes dos frutos. Os isolados de bactérias e leveduras apresentaram maior frequência no mesocarpo e amêndoa, que são os tecidos mais ricos em nutrientes facilmente disponíveis. A preferência de espécies endofíticas pela colonização de um tecido em particular já foi registrada (Carroll, 1988; Rodrigues & Samuels, 1990) e isso pode refletir sua capacidade de utilizar certo substrato específico (Rodrigues, 1994).

Isolados das espécies *T. paradoxa* e *C. paradoxa* foram isoladas pela primeira vez colonizando endofiticamente um hospedeiro. Entretanto, Vallejo (1995) e Mora-Urpí *et al.* (1997) citaram estes gêneros como patógenos de frutos e sementes de pupunha. Mota & Gasparotto (1998) isolaram *C. paradoxa* quando estudando a síndrome da queda de frutos da pupunheira e a incidência de fungos fitopatogênicos, em Manaus.

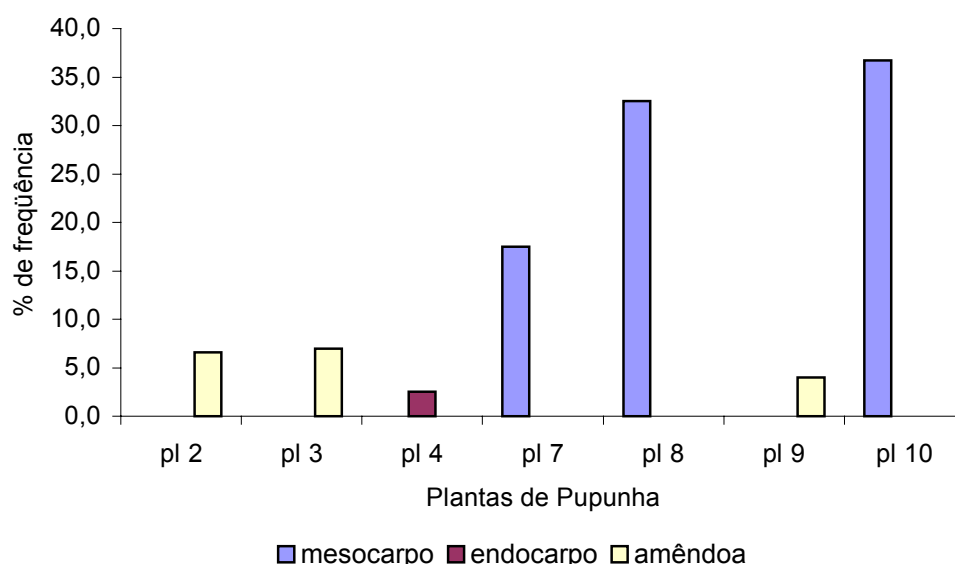


GRÁFICO 02. Bactérias isoladas como endofíticas do fruto de pupunheira (*Bactris gasipaes*). Relação entre fragmentos inoculados por planta e frequência de isolamento.

Entre 18 plantas investigadas, sete apresentaram bactérias endofíticas, com um total de 61 isolados. Nestas plantas, a ocorrência de bactérias endofíticas foi específica com relação ao fragmento vegetal. As três maiores freqüências de infecção foram do mesocarpo, seguidas da amêndoa e endocarpo (Gráfico 02).

Provavelmente todas as plantas possuem microrganismos endofíticos, pois segundo Petrini (1991), endófitos podem colonizar os tecidos internos dos hospedeiros em algum tempo de seu ciclo de vida. A ocorrência de bactérias como endofíticas tem sido freqüente em diversos hospedeiros, tais como *Medicago sativa*, *Gossypium hirsutum*, *Oryza sativa*, *Solanum tuberosum*, *Saccharum officinarum* e *Quercus* spp. (Azevedo, 1998).

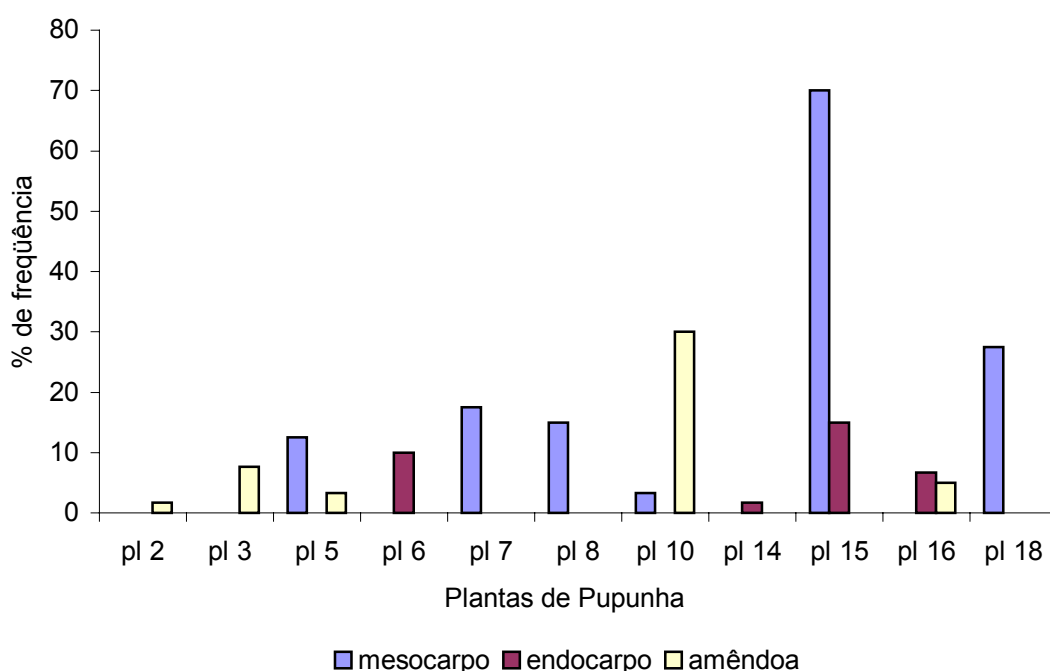


GRÁFICO 03. Leveduras isoladas como endofíticas do fruto de pupunheira (*Bactris gasipaes*). Relação entre fragmentos inoculados por planta e freqüência de isolamento.

Foram isoladas 92 leveduras em 11 das 18 plantas investigadas. Da planta 15 foram isolados tanto do mesocarpo como do endocarpo, enquanto da planta 10, do mesocarpo e da amêndoa. Estes fungos ocorreram em todas as partes investigadas, com destaque para o mesocarpo (Gráfico 03).

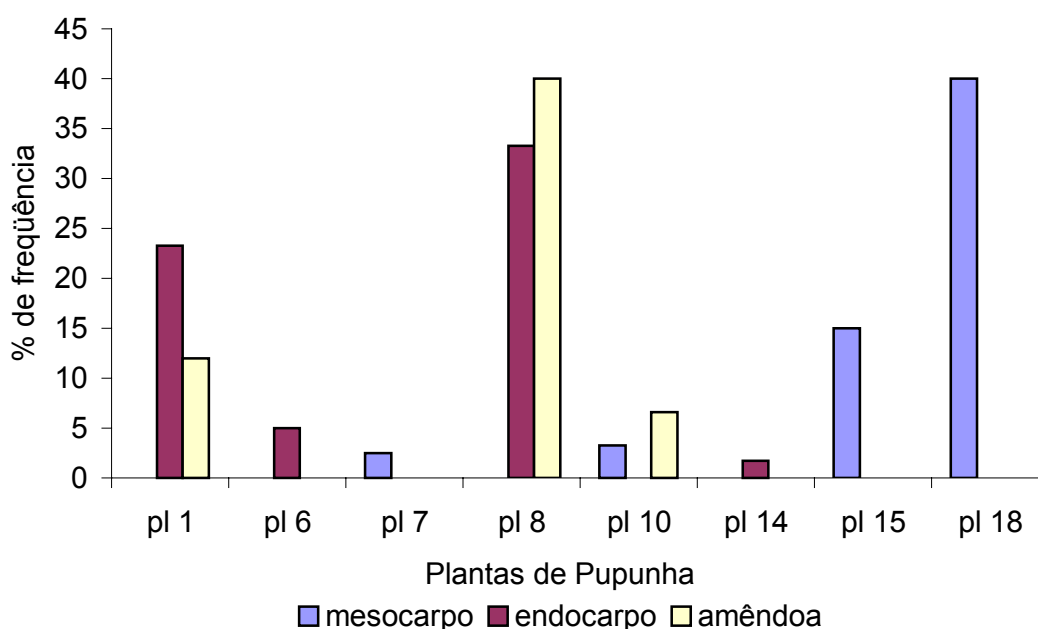


GRÁFICO 04. *Fusarium* sp. isolado como endofítico do fruto de pupunheira (*Bactris gasipaes*). Relação entre fragmentos inoculados por planta e frequência de isolamento.

Oito plantas apresentaram-se como hospedeiras para *Fusarium* sp., com um total de 61 isolados. Na planta 8 ocorreu infecção no endocarpo e amêndoa, com 33,3 e 40% respectivamente. Este gênero não demonstrou especificidade por uma das partes analisadas do fruto, entretanto, as mais altas frequências ocorreram no endocarpo e amêndoa (Gráfico 04). *Fusarium* spp. foram relatados como patógenos para a cultura

por Vêras *et al.* (2000), pois foram isolados de folhas de pupunheira num cultivo para palmito em Manaus, Amazonas, onde provocaram queima das folhas. Hernández *et al.* (1999) relataram que o fungo ataca as raízes, gerando problemas no crescimento.

A ocorrência desse gênero como endofítico tem sido observada em outros hospedeiros tropicais, como em *Paullinia cupana* (Maricaua, 1997) e *Musa cavendish* (Pereira, 1993), em culturas agrícolas, *Zea mays* (Pamphile, 1997) e *Lycopersicum esculentum* (Hallmann & Sikora, 1996), e também na palmeira tropical *Licuala ramsayi* (Rodrigues & Samuels, 1990). Bovi (1998) citou a ocorrência desse gênero infectando sementes de pupunheira armazenadas, atribuindo essa infecção ao despulpamento e armazenamento inadequados. Merece um estudo mais elaborado para comprovar a patogenicidade de endófitos desse gênero, pois Hallman & Sikora (1996) observaram *F. oxysporum* não patogênico como endófito de plantas de tomate.



FIGURA 03. Aspecto da colônia de *Fusarium* sp. em meio BDA (A) e macroconídios de *Fusarium* sp., endofítico isolado do fruto de *Bactris gasipaes* (B).

Espécies do gênero *Fusarium* apresentaram-se com micélio extensivo e cotonoso, freqüentemente de coloração amarela (Fig. 03). Foram observados macro e microconídios, freqüentemente juntos em pequenas cabeças úmidas, multiseptados, com

estrutura de meia lua ou na forma de canoa. Segundo Barnett & Hunter (1972), os conidióforos desse gênero são variáveis, delgado e simples, ou robusto, pequeno, com ramos irregulares ou conjunto de fiálides, sozinho ou em grupo dentro de esporodóquio.

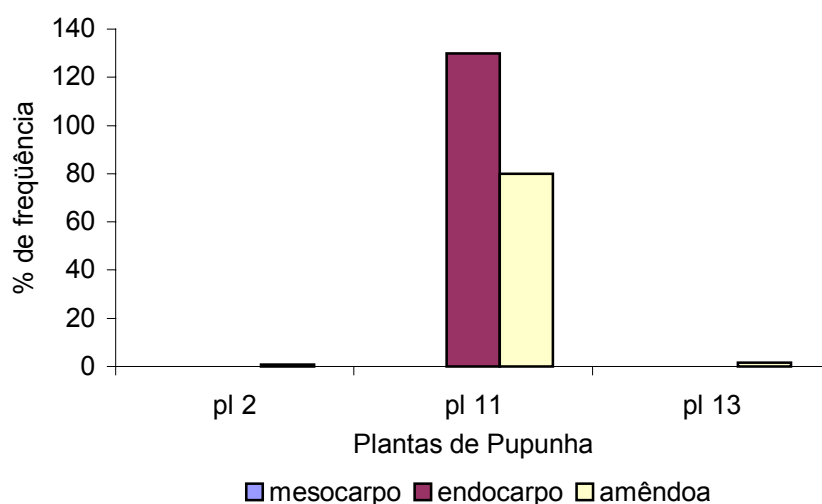


GRÁFICO 05. *Phomopsis* sp. isolado como endofítico do fruto de pupunheira (*Bactris gasipaes*). Relação entre fragmentos inoculados por planta e frequência de isolamento.

Phomopsis sp. não apresentou grande distribuição entre as plantas investigadas. Os isolados foram obtidos de apenas três plantas, com infecção localizada no endocarpo e amêndoa (Gráfico 05).

Muitos fungos do gênero *Phomopsis* são importantes patógenos de plantas (Alexopoulos *et al.*, 1996). Carroll (1986) informou que diversas espécies têm sido classificadas como endofíticos mutualísticos e Sinclair & Cerkauskas (1996) informaram que várias espécies também estão associadas com infecção latente em diversas plantas. *Phomopsis* foi observado atacando folhas de pupunheira, causando lesões necróticas de diferentes formas e tamanhos (Véras & Yuyama, 2000), e Bovi (1998) citou sua ocorrência na Bahia, atacando mudas de pupunheira, com plantas

apresentando bordas pretas e esfiapadas.



FIGURA 04. Aspecto da cultura de *Phomopsis* sp. isolado como endofítico do fruto de *Bactris gasipaes*.

As espécies do gênero *Phomopsis* apresentaram picnídio escuro (Fig. 04), conídios hialino, sendo ovóide a fusóide (alfa) e filiforme, curvado ou dobrado (beta); tais características foram citadas por (Barnett & Hunter, 1972; Galli *et al.*, 1978).

Phomopsis tem sido relatado com freqüência como endofítico em diversos hospedeiros, entre eles as espécies tropicais *Theobroma grandiflorum* (Medeiros-Galvão, 1998), *Himatanthus sucuuba* (Magalhães, 2000), *Carapa guianensis*, *Cecropia sciadophylla*, *Jacaranda* sp. e outros (Cannon & Simmons, 2002). Rodrigues & Samuels (1990) isolaram esse gênero somente da região da nervura central de folhas de *Licuala ramsayi* e nenhum da região entre os vasos condutores; Rodrigues (1994) observou em folhas do hospedeiro *E. oleracea*, enquanto Guo *et al.* (2000) de *L. chinensis*.

Também foram isoladas espécies do gênero *Penicillium*, foi o menos

freqüente (Gráfico 06). Com apenas 13 isolados, apresentou infecção em todas as partes do fruto, destacando-se no mesocarpo. As espécies desse gênero apresentaram conidióforo comprido acima do micélio, ramificado próximo do ápice, terminando em fiálides, formando uma estrutura parecida com uma vassoura. Os conídios eram globosos, em cadeias. Tais características foram citadas por Barnett & Hunter (1972) e sementes (Mora-Urpí *et al.*, 1997) e também foram relatados como patógenos de pós-colheita (Mota *et al.*, 1992).

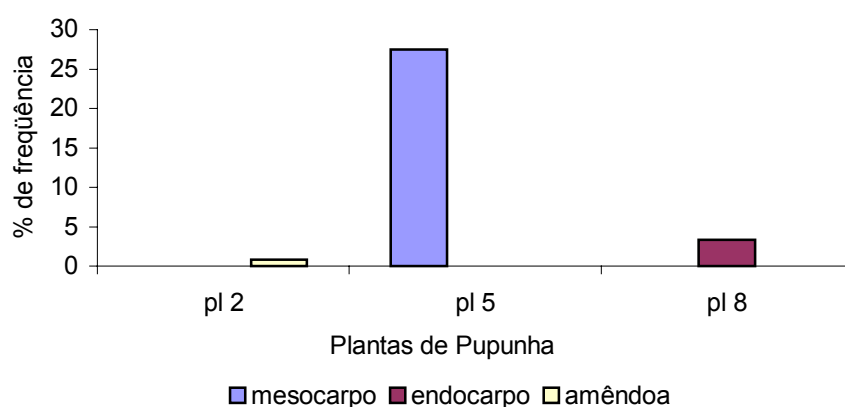


GRÁFICO 06. *Penicillium* sp. isolado como endofítico do fruto de pupunheira (*Bactris gasipaes*). Relação entre fragmentos inoculados por planta e freqüência de isolamento.

Ceratocystis paradoxa é o teleomorfo de *T. paradoxa* (Paulin-Mahady *et al.*, 2002). Nas cinco plantas que apresentaram esta espécie foram obtidos 107 isolados. Somente da planta 18 foram isolados das três partes do fruto investigadas. O mesocarpo destacou-se como o local preferido deste endófito (Gráfico 07).

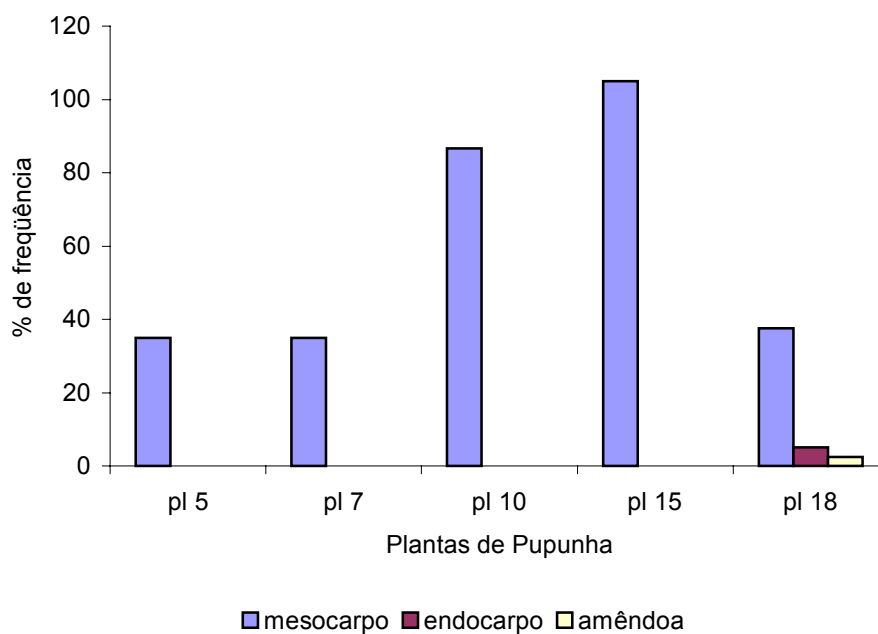


GRÁFICO 07. *Ceratocystis paradoxa* isolado como endofítico do fruto de pupunheira (*Bactris gasipaes*). Relação entre fragmentos inoculados por planta e frequência de isolamento.



FIGURA 05. Peritécio de *Ceratocystis paradoxa*, endofítico isolado do fruto de *Bactris gasipaes*.

Os endófitos de *C. paradoxa* apresentaram peritécio com pescoço longo (Fig. 05) e ascósporos na forma de chapéu. Segundo Stiers (1976) e van Wyk *et al.* (1991, 1993), citados por Alexopoulos *et al.* (1996), os ascos são produzidos a partir de células ascógenas que enfileiram a parede interna do peritécio, do qual eles são soltos; eventualmente ficam espalhados por toda a cavidade.

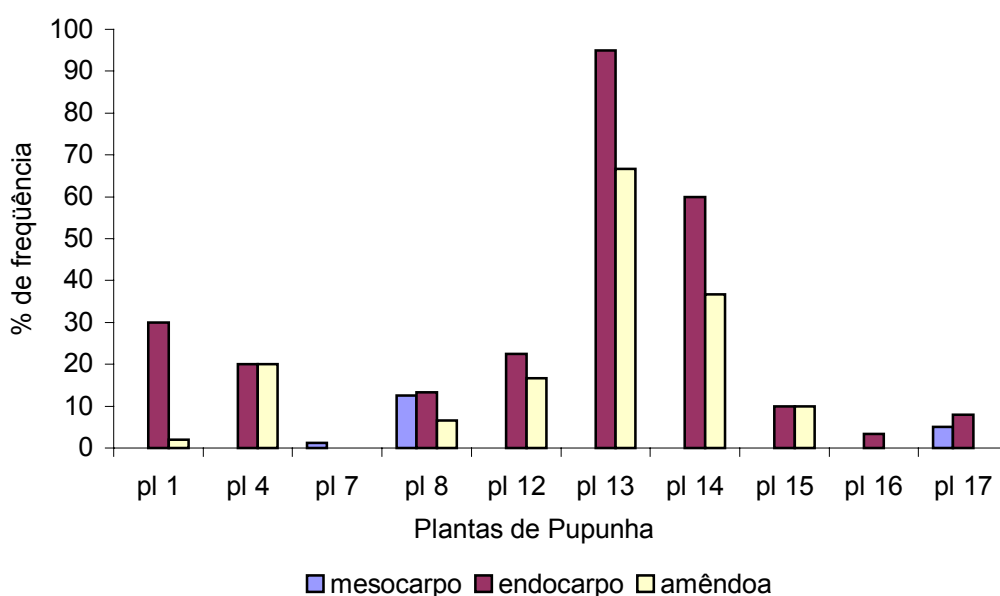


GRÁFICO 08. *Thielaviopsis paradoxa* isolado como endofítico do fruto de pupunheira (*Bactris gasipaes*). Relação entre fragmentos inoculados por planta e frequência de isolamento.

Thielaviopsis paradoxa foi o endófito mais freqüente, com 228 isolados e a planta 8 apresentou infecção em todas as partes investigadas, embora o endocarpo e a amêndoa foram as mais preferidas (Gráfico 08).

Ceratocystis paradoxa foi mais freqüente no mesocarpo, enquanto seu anamorfo *Thielaviopsis paradoxa* no endocarpo e amêndoa (Fig. 02). Possivelmente ambas espécies foram isoladas dos locais onde estão disponíveis os nutrientes que lhes são necessários. Rodrigues & Samuels (1990), ao isolarem endófitos de folhas não

expandidas de *L. ramsayi*, sugeriram que sua ocorrência foi devida à transmissão por meio de sementes do hospedeiro.

Essa aparente especificidade apresentada entre os isolados de *T. paradoxa* e *C. paradoxa* talvez possa ser explicada pela transmissão de *T. paradoxa* via sementes do hospedeiro. Posteriormente, pela disponibilidade de nutrientes em função da diferenciação celular do hospedeiro, este endófito possa mudar da fase mitospórica para sua fase perfeita.

Mora-Urpí *et al.* (1997) descreveram essa espécie como patógeno de frutos e sementes de pupunha. Hernández *et al.* (1999) relataram *T. paradoxa* atacando raízes de pupunheira causando problemas no crescimento, bem como diminuindo o rendimento e qualidade do palmito. Também há ocorrência de podridão basal em pupunheira causada por *T. paradoxa* (Pizinnatto *et al.*, 1996).

Esse gênero é saprófita e ataca diversos hospedeiros. Gonsalves & Ferreira (2002b) citaram como patógeno de *S. officinarum*, e Mota *et al.* (1992) ao avaliarem o efeito do ensacamento de cachos de pupunha na redução da incidência de fungos, detectaram entre alguns, isolados de *T. paradoxa*. Os autores os citaram como patógeno de campo. Num reconhecimento fitossanitário realizado na Colômbia, baseado em um critério ecológico, foram detectados severos danos em frutos de pupunha havendo citação para *Thielaviopsis* sp. (Pava *et al.*, 1993).

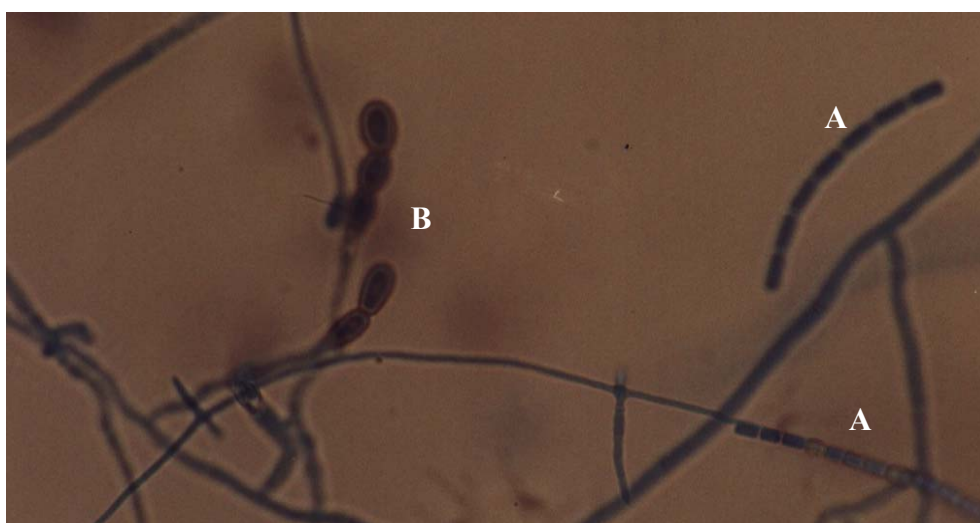


FIGURA 06. Estruturas de reprodução de *Thielaviopsis paradoxa* isolado do fruto de *Bactris gasipaes*. A – cadeia de fialósporos; B – aleuriósporos.

Os endófitos de *T. paradoxa* apresentaram cadeias de fialósporos e aleuriósporos escuros e ovóides (Fig. 06), sendo o conidióforo pigmentado. Muitas espécies de *Ceratocystis* produzem compostos voláteis distintos que desempenham um importante papel na atração de insetos vetores (Hanssen, 1993; Kile, 1993; Malloch & Blackwell, 1993 citados por Alexopoulos *et al.*, 1996), estes incluem álcoois de cadeia-curta e seus ésteres, e mono e sesquiterpenos, alguns dos quais são de interesse para uso como compostos aromáticos (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Thielaviopsis paradoxa apresentou grande variedade tanto na coloração das colônias como no crescimento miceliano (Fig. 07). A cor variou do cinza claro ao preto, ocorrendo verde oliva, e também, após diversas subculturas alguns isolados apresentaram micélio branco. Esse fungo apresenta crescimento extremamente rápido e esporula abundantemente, exceto as colônias albinas. Foi observada a formação de setores, indicando que os fungos estavam pleomorfizando; e algumas colônias formaram micélio aéreo, enquanto outras apresentaram pouca massa miceliana e rasteira. Tais características também foram observadas para *Chalara elegans* (sinônimo de *Thielaviopsis basicola*) (Punja & Sun, 1999).

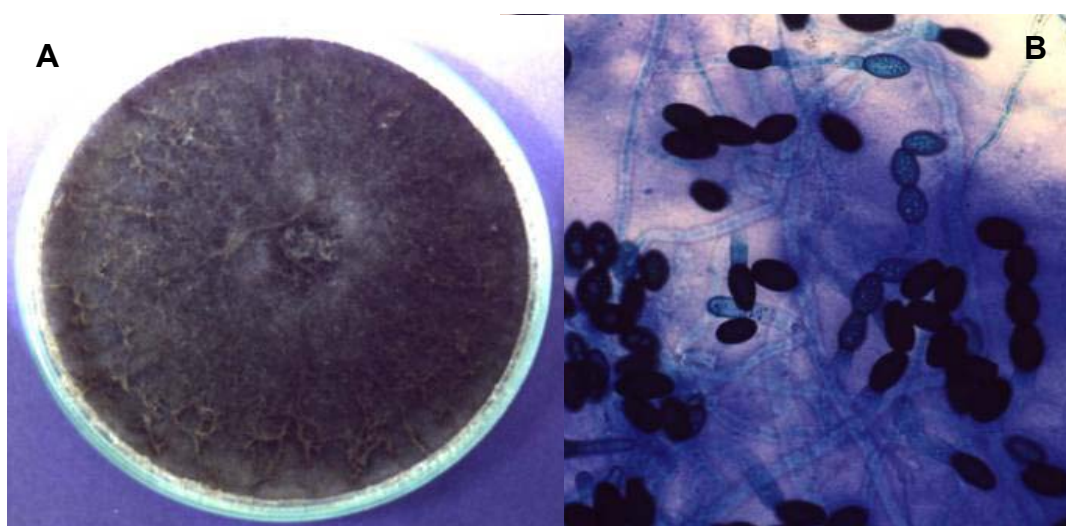


FIGURA 07. Crescimento miceliano de *Thielaviopsis paradoxa* isolado de frutos de *Bactris gasipaes* (A). Estruturas de reprodução, cadeias de aleuriósporos (B).

A questão da transmissão de microrganismos via semente é um pouco confusa. Vargas (1993) afirmou que os fungos normalmente não penetram nas sementes antes da colheita do fruto; enquanto Mora-Urpí *et al.* (1997) citaram que infecções causadas por fungos em sementes armazenadas, e durante a germinação são, geralmente, devido ao excesso de umidade e/ou tratamento não apropriado com fungicida. Mas, para Hernández *et al.* (1999), os fungos penetram nas sementes quando estas são colocadas em condições de germinação, causando apodrecimento.

O fato da ocorrência de endófitos em frutos de pupunha, quais sejam, mesocarpo, endocarpo e amêndoa, questiona a confirmação dos autores citados e corrobora a posição de Bacon & Siegel (1988) de que endofíticos são transmitidos, via sementes, de uma geração para a próxima do hospedeiro. Essa informação merece ser considerada quando medidas de controle fitossanitário forem adotadas no armazenamento de sementes de pupunheira.

Houve isolamento de endófitos de todas as partes do fruto analisadas. Portanto, os fungos isolados e citados como patógenos para essa cultura merecem um estudo posterior para verificar se realmente são patógenos. Manulis *et al.* (1994) conseguiram distinguir isolados patogênicos de não-patogênicos de *Fusarium oxysporium* por meio de marcadores moleculares RAPD. Glienke (1999) encontrou tanto isolados de *Guignardia* endofíticos como patogênicos de citrus, os quais puderam ser distinguidos e bem caracterizados, também, por meio de marcadores RAPD.

5.3 Extração e amplificação do DNA ribossomal

Foi realizada a extração do DNA genômico de 22 endofíticos de *T. paradoxa* isolados do fruto da pupunheira. A quantificação por eletroforese em gel de agarose 0,8% variou de 2,5 a 150 ng/ μ L.

A partir da quantificação do material extraído, foi realizada a amplificação do fragmento do DNA ribossomal desejado por meio da reação de PCR. O produto amplificado foi observado em gel de agarose 1,0% e seu tamanho estimado por comparação com o marcador molecular de bandas DNA Ladder de 1 Kb, o qual foi de aproximadamente 1600 pb.

5.4 Seqüenciamento do DNA amplificado

Após seqüenciamento dos produtos de PCR, todos foram submetidos a uma busca no BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997). Todas as seqüências tiveram um único resultado, ou seja, a busca no BLAST resultou sempre no fungo *Ceratocystis paradoxa* (AF043607).

O alinhamento das 36 amostras totalizou 692 pares de bases, com exceção dos isolados *T. paradoxa* (PP12.3-4.2, com 663 pb) e *C. paradoxa* (acesso no GenBank nº AF275477, com 420 pb). Comparando-se o fragmento amplificado com o acesso nº AF043607 do GenBank (*C. paradoxa*) foi confirmada a amplificação de parte do ITS1, gene rDNA 5,8S e ITS2 completos, e parte da subunidade maior 28S.

5.5 Caracterização molecular

A estimativa da taxa de transição/transversão foi de 1,2 e a proporção de bases nucleotídicas que compõem o DNA seqüenciado foi de 27,9% para adenina, 21,5% para citosina, 21,5% para guanina e 29,1% para timina. A proporção de sítios invariáveis foi 0,476 e a estimativa do parâmetro gama foi de 0,57. O Índice de Consistência (CI) foi de 0,897 e o Índice de Retenção (RI) de 0,976.

Após o seqüenciamento nucleotídico e seu alinhamento, foi observado pouca diferença entre os 22 endófitos isolados. Witthuhn *et al.* (1999), trabalhando com a mesma região ora amplificada, observaram alta variabilidade entre espécies de *Ceratocystis*. Os autores relataram que numerosas inserções/deleções dificultaram muito o alinhamento das seqüências. Entretanto, a subunidade maior do gene rRNA apresentou-se relativamente conservada.

Dada a pouca variabilidade aparente entre os isolados, fez-se uma busca de haplótipos com o Programa TCS (Clement *et al.*, 2000). Do total de 22 isolados, foram encontrados nove haplótipos. Os 22 isolados de frutos da pupunha foram obtidos a partir das seguintes partes do fruto: dois do mesocarpo, dez do endocarpo e dez da amêndoa. Os haplótipos obtidos foram dois do mesocarpo, dois do endocarpo e cinco da amêndoa (Fig. 08). Dessa forma, existe uma maior diversidade haplotípica entre isolados da amêndoa e mesocarpo; o contrário ocorre entre os isolados do endocarpo, que apresentaram uma similaridade nucleotídica maior.

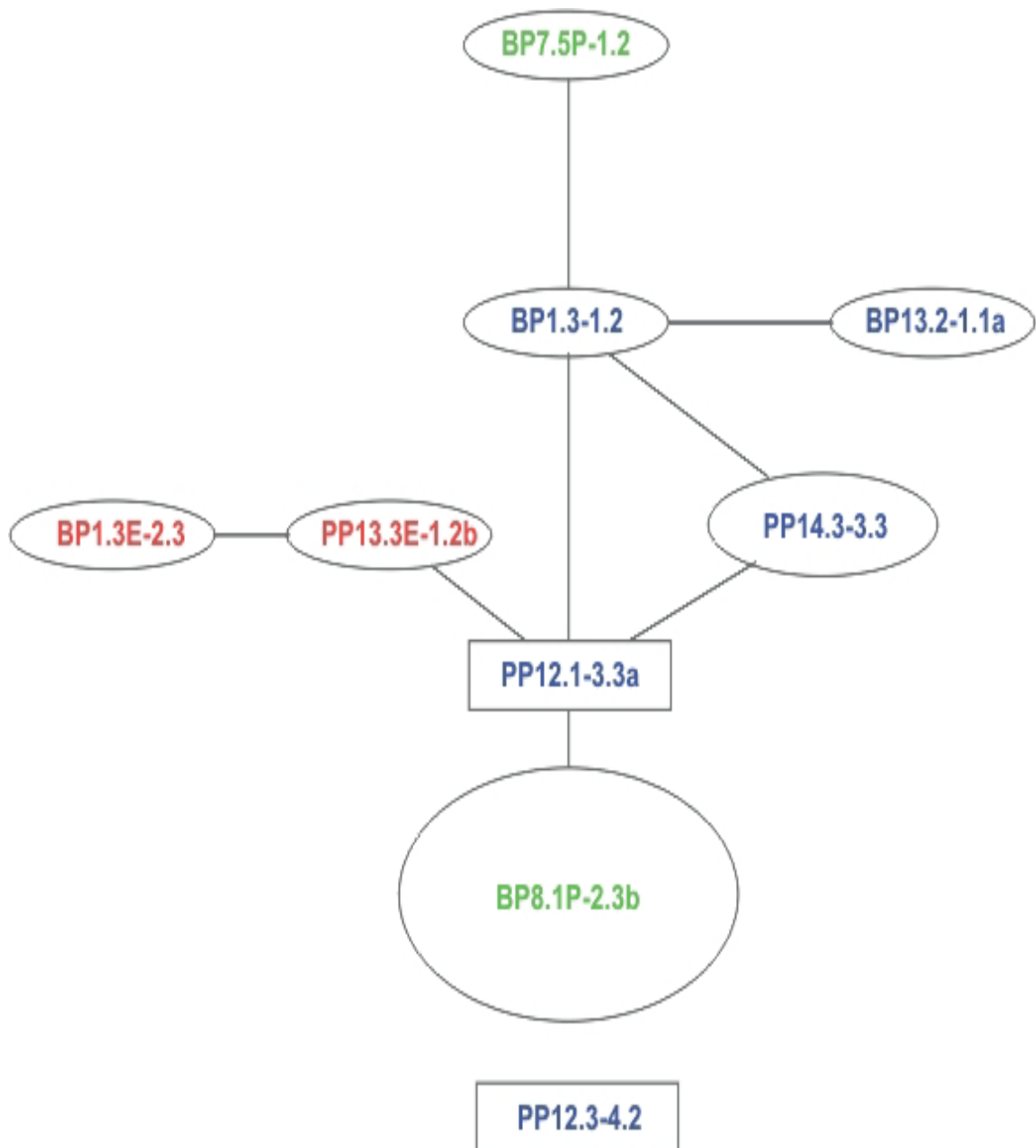


FIGURA 08. Haplótipos identificados com o Programa TCS. Foram obtidos nove haplótipos de *Thielaviopsis paradoxa*: dois isolados do mesocarpo, dois do endocarpo e cinco da amêndoa. O haplótipo com maior probabilidade de ser o menos derivado está representado no quadrado. O tamanho das figuras indica a frequência dos haplótipos.

Do conjunto de haplótipos identificados, sete se apresentaram com seqüências nucleotídicas distintas e somente dois (BP8.1P-2.3b e PP14.3-3.3)

apresentaram mais de um isolado de *T. paradoxa* (Fig. 08). Os isolados BP16.1E-4.1b e BP17.3E-4.1a são idênticos ao haplótipo PP14.3-3.3, enquanto os demais isolados são idênticos ao haplótipo BP8.1P-2.3b, sendo seis do endocarpo e cinco da amêndoa.

O isolado PP12.3-4.2 apareceu completamente isolado dos demais. Tal fato pode ter acontecido porque foi amplificado somente 663 pares de bases e o complemento até 692, com ausência de bases, pode ter influenciado nesse resultado, pois quando analisamos seu alinhamento nucleotídico, até onde foi seqüenciado, havia somente duas bases com alterações idênticas às apresentadas pelo haplótipo BP8.1P-2.3b.

Quando os haplótipos foram comparados com as plantas hospedeiras, verificou-se a ocorrência de mais de um isolado com seqüência nucleotídica diferente colonizando o mesmo hospedeiro. Os isolados BP16.1E-4.1b e BP17.3E-4.1a, idênticos ao haplótipo PP14.3-3.3, foram isolados de plantas distintas, do endocarpo e amêndoa e possuem a mesma seqüência nucleotídica. Os isolados representados pelo haplótipo BP8.1P-2.3b também foram isolados de plantas distintas, bem como do mesocarpo, endocarpo e amêndoa. Na planta 17 foram identificados dois haplótipos diferentes colonizando o endocarpo, BP17.3E-4.1a e BP17.3E-4.2, na planta 13, outros três haplótipos colonizavam o endocarpo e amêndoa e na planta 1, dois haplótipos BP1.3-1.2 e BP1.3E-2.3 colonizavam o mesmo fruto.

Os isolados da planta 12 corresponderam a haplótipos diferentes e foram isolados somente da amêndoa. Da planta 14, os isolados BP14.1-4.1 da amêndoa e BP14.3E-2.2a do endocarpo, foram idênticos ao haplótipo mais freqüente BP8.1P-2.3b, que foi isolado do mesocarpo do fruto da planta 8, e o terceiro isolado PP14.3-3.3 foi igual ao segundo mais freqüente.

Por meio do método de distância p - não corrigida, foram obtidas uma matriz de distância (anexo A) e uma árvore parcimoniosa pelo método de agrupamento de vizinhos com tamanho de 139 passos para 692 caracteres avaliados. Destes, 583 pares de bases foram constantes e 109 variáveis, sendo que 80 foram informativos para parcimônia (Fig. 09).

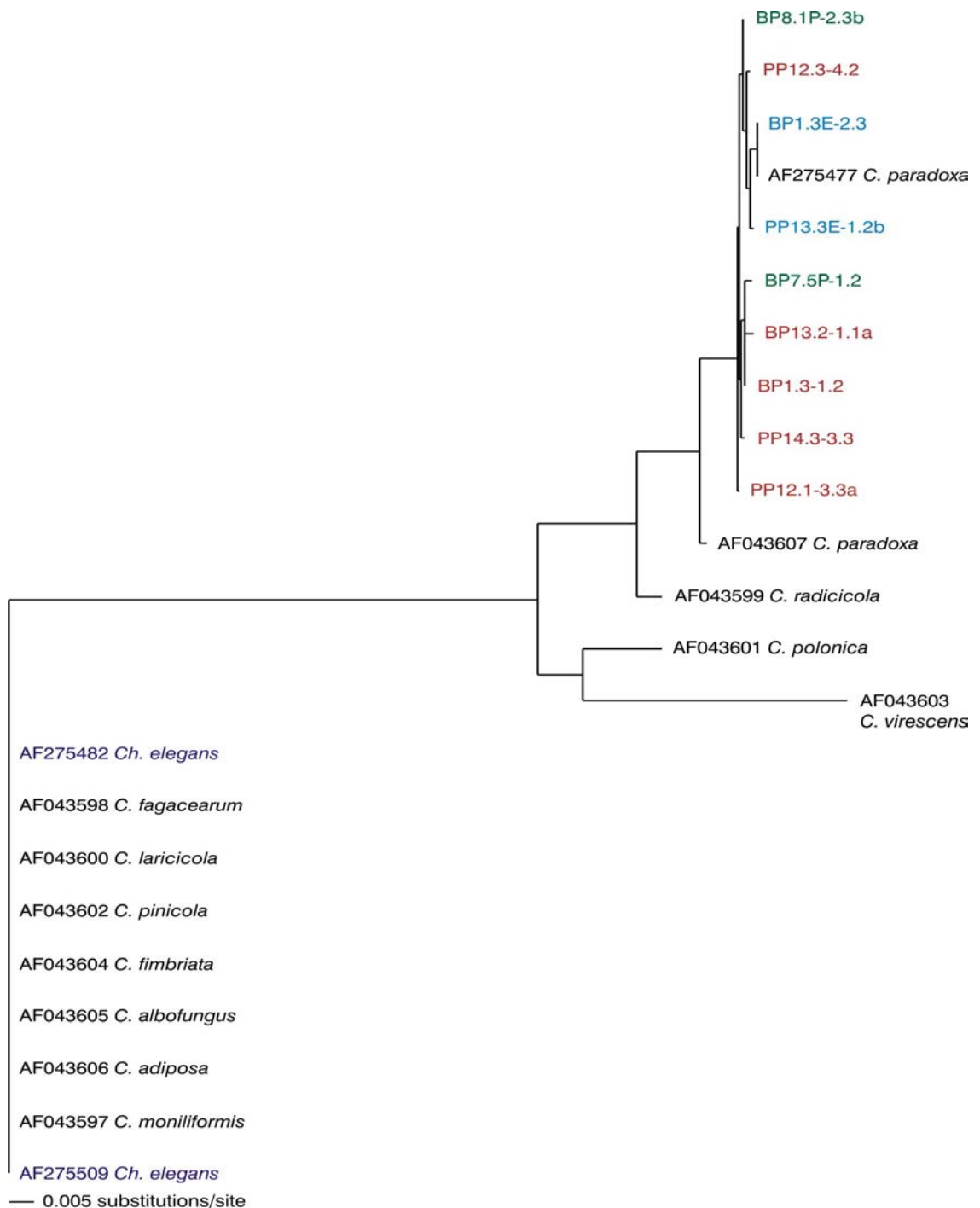


FIGURA 09. Árvore de agrupamento de vizinhos produzida a partir de seqüências de 692 pares de bases do rDNA do fungo endofítico *Thielaviopsis parodoxa*. (verde=mesocarpo, azul=endocarpo, marrom=endosperma e violeta=grupo externo).

A matriz de distâncias genética gerada pelo método de distância p – não corrigida mostrou pouca divergência genética entre os endófitos (anexo A). Os endófitos que apresentaram maiores índices de distância genética entre si foram BP1.3E-2.3 comparado aos BP7.5P-1.2 e BP13.2-1.1a (0,6% para ambos); cada um foi isolado de partes diferentes do fruto, bem como de plantas diferentes. Em suas seqüências nucleotídicas foram observadas transversões: no isolado BP1.3E-2.3 ocorreu na base 523 a troca de citosina por adenina; no BP7.5P-1.2, na base 299 ocorreu troca de citosina por guanina; e no BP13.2-1.1a ocorreram trocas nas bases 151, de adenina por citosina e 299, de citosina por guanina (anexo B).

Ceratocystis paradoxa (AF043607) apresentou maior distância genética dos endófitos BP13.2-1.1a e BP1.3E-2.3 (1,3% para ambos). Nesses dois endófitos, quando comparados com as outras amostras, inclusive *C. paradoxa*, na base 608 pode ter ocorrido uma deleção.

As análises de distância e parcimônia foram muito semelhantes e identificaram as amostras do presente trabalho como sendo de *C. paradoxa*, com valores de consistência acima de 90% (Fig. 10). Na árvore de máxima parcimônia três cladogramas maiores foram formados com espécies de *Ceratocystis*: *C. polonica* e *C. virescens* formando um subgrupo menor, e *C. radicularis* e *C. paradoxa*, com valores de consistência variando de 91 a 100%. *C. paradoxa* (AF043607) originou um grupo com todos os isolados de *Thielaviopsis* e um dos acessos do GenBank, *C. paradoxa* (AF275477). Esse grupo conteve três subgrupos menores com baixos valores de consistência, variando de 53 a 62% (Fig. 10). Esse grupo teve *C. paradoxa* (AF043607) como ancestral comum e sugere que o conjunto de isolados de *T. paradoxa* seja um grupo monofilético (Paulin-Mahady *et al.*, 2002), o que faz sentido geográfico.

Não houve a formação de grupos específicos por fragmento de isolamento, entretanto, alguns haplótipos isolados do endocarpo e amêndoa foram agrupados juntos. Os dois haplótipos do mesocarpo ficaram agrupados separados, enquanto BP7.5P-1.2 formou um subgrupo com haplótipos da amêndoa, BP8.1P-2.3b formou outro subgrupo com um haplótipo da amêndoa e dois do endocarpo (Fig. 10).

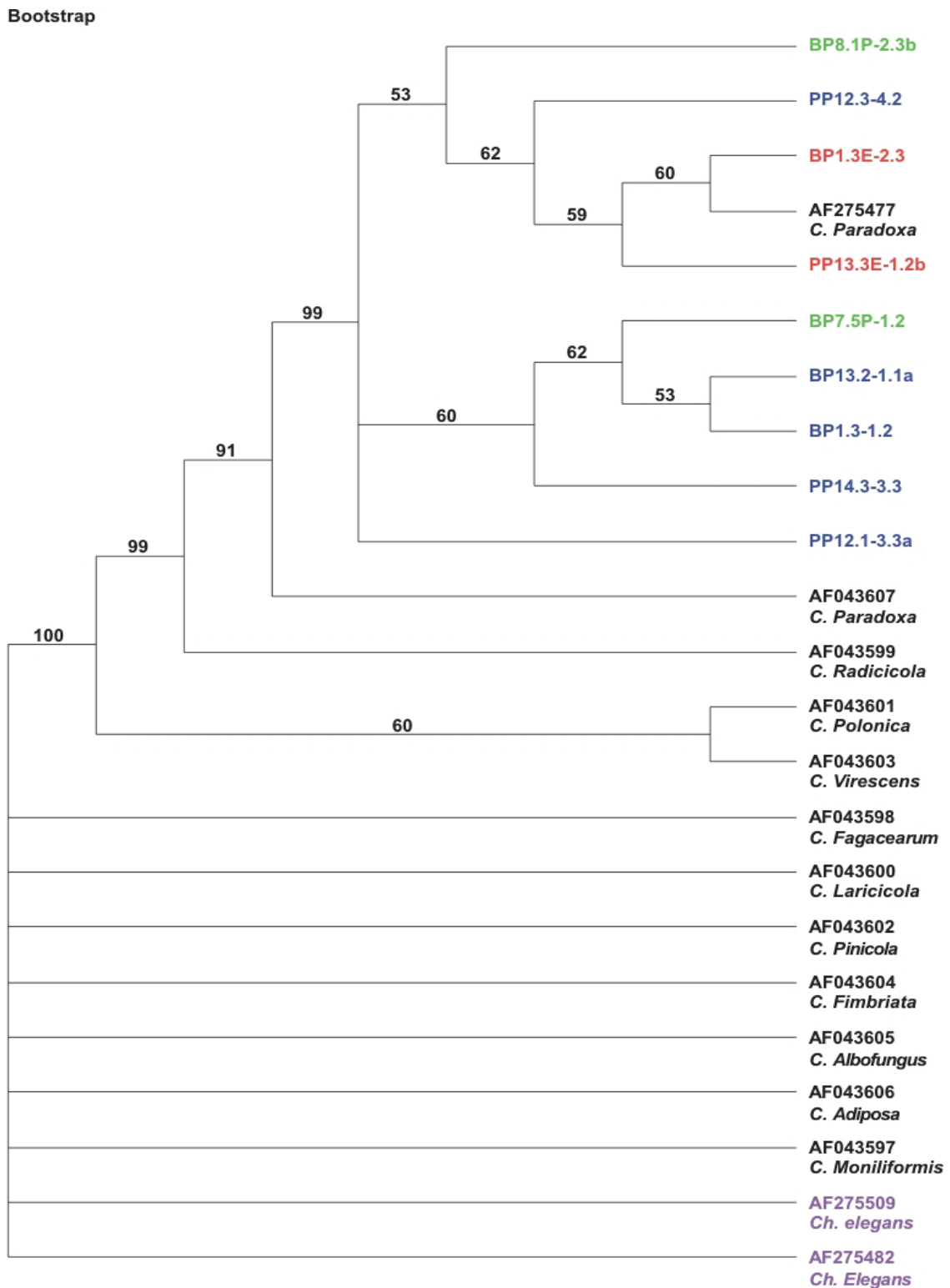


FIGURA 10. Árvore consenso das 146 árvores obtidas pelo método de máxima parcimônia (L=139, IC=0,897, IR=0,976). Todos os isolados de *Thielaviopsis paradoxa* ficaram agrupados tendo *Ceratocystis paradoxa* (AF043607) como grupo irmão. (verde = mesocarpo, marrom = endocarpo, azul = endosperma e violeta = grupo externo).

O haplótipo PP12.1-3.3.a é o menos derivado dos isolados, o que corresponde com sua posição da Figura 8, e o mais derivado é o BP8.1P-2.3b, cuja seqüência nucleotídica corresponde a mais 11 isolados, localizado no topo da árvore mais parcimoniosa (Fig. 10). Quatro haplótipos, sendo dois isolados da planta 13 (PP13.3E-1.2b e BP13.2-1.1a) e dois da planta 1 (BP1.3E-2.3 e BP1.3-1.2), formaram dois subgrupos. Em um deles ficaram dois isolados do endocarpo de cada planta, e no outro, dois isolados da amêndoa (Fig. 10).

Apesar do pouco polimorfismo observado entre as seqüências nucleotídicas do fragmento do DNA ribossomal amplificado foi possível identificar diferenças entre os isolados. Dada as diferenças nucleotídicas evidenciadas entre os haplótipos, é correto afirmar que mais de um endófito estava colonizando frutos do hospedeiro *Bactris gasipaes*.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

A pupunheira possui endófitos em seus frutos, tanto no mesocarpo, como no endocarpo e amêndoa, e estes foram dos grandes grupos já definidos (fungos, leveduras e bactérias).

A maior frequência de isolamento foi apresentada pelo par *T. paradoxa* e *C. paradoxa*, que mostraram certa especificidade por parte do fruto. *C. paradoxa* foi isolado com maior frequência do mesocarpo, enquanto *T. paradoxa* do endocarpo e amêndoa.

A ocorrência de endófitos em sementes de *B. gasipaes*, sugere que há transmissão de microrganismos de uma geração para a outra entre plantas.

Entre os 22 isolados de *T. paradoxa* analisados, foram encontrados nove haplótipos. Somente dois haplótipos com mais de um representante.

A maior variabilidade genética foi apresentada entre os endófitos da amêndoa e a menor entre os endófitos do endocarpo.

A identificação do fungo *T. paradoxa* através das suas estruturas de reprodução foi confirmada com o sequenciamento de um fragmento do seu rDNA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

_____ 2002.

<http://www.ces.uga.edu/Agriculture/plantpath/plantdis/fungi/Thielaviopsis.html>

AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. & MITCHELL, D.J. 1992. Morphological and pathological characteristics of strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from Citrus. **Phytopathology**, Lancaster, v.82, p.1377-82.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. & BLACKWELL, M. 1996. **Introductory Mycology**. 4^a ed. John Wiley & Sons, INC, New York, U.S.A., 869p.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**., nº 25, p.3389-3402.

ALVES, M.L.B. & BATISTA, M.F. 1983. Ocorrência de antracnose em pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) em Manaus. **Acta Amazônica**, v.13, nº 3-4, p.705.

ARAÚJO, L.C. 1999. **Microrganismos endofíticos de copaíba: Um hospedeiro tropical rico em metabólitos secundários**. Monografia, Universidade do Amazonas, Manaus, 69p.

ARX, J.A. VON. 1974. **The genera of fungi sporulating in pure culture**. 2^a ed., J. Cramer, Vaduz, 351p.

AZEVEDO, J.L. 1998. Microrganismos endofíticos. *In: Ecologia Microbiana*. Melo, I.S. & Azevedo, J.S. (eds.), Embrapa-CNPMA, Jaguariúna, p.117-37.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.JR.; PEREIRA, J.O. & ARAÚJO, W.L. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB: Electronic Journal of Biotechnology**. www.ejb.org/copyri.html, v.3, n.1.

AZEVEDO, J.L.; JR MACCHERONI, W.; ARAÚJO, W.L. & PEREIRA, J.O. 2002. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. *In: Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. Serafini, L.A.; Barros, N.M. & Azevedo, J.L. (eds.). EDUCS, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, p.233-68.

BACON, C.W. 1995. Isolation, culture and maintenance of endophytic fungi of grasses. *In: Isolation of biotechnological organisms from nature*. Labeda, D.P. (ed.), New York, McGraw-Hill, p.259-82.

- BACON, C.W. & SIEGEL, M.R. 1988. Endophyte parasitism of tall fescue. **Journal of Production Agriculture**, nº 1, p.45-55.
- BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. 1972. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3ª ed., Burgess Publishing Co., Mineapolis, Minnesota, USA, 241p.
- BOHORQUEZ, R.N. & YCAZA, H.C. 1988. Estudio experimental del aprovechamiento del fruto del pejibaye (*Guilielma gasipaes*). **Revista de la Universidad de Guayaquil**, v.72, nº 2, p.103-13.
- BOVI, M.L.A. 1997. Expansão do cultivo da pupunheira para palmito no Brasil. **Horticultura Brasileira**, 15 (suplemento), p.183-5.
- BOVI, M.L.A. 1998. **Palmito pupunha: informações básicas para cultivo**. Instituto Agrônômico, Boletim Técnico nº 173, Campinas, São Paulo, 50p.
- BREEN, J.P. 1992. Temperature and seasonal effects on expression of *Acremonium* endophyte-enhanced resistance to *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). **Environmental Entomology**, v.21, p.68-74.
- BRUNS, T.D. & SZARO, T.M. 1992. Rate and mode differences between nuclear and mitochondrial small-subunit rRNA genes in mushrooms. **Molecular Biology and Evolution**, nº 9, p.836-55.
- CALHOUN, L.A.; FINDLAY, J.A.; MILLER, J.D. & WHITNEY, N.J. 1992. Metabolites toxic to spruce budworm from balsam fir needle endophytes. **Mycological Research**, Cambridge, v.96, nº 4, p.281-6.
- CAMACHO, V.E. & SORIA, J.V. 1970. Palmito Pejibaye. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.14, p.122-32.
- CANNON, P.F. & SIMMONS, C.M. 2002. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, v.94, nº 2, p.210-20.
- CARROLL, G.C. 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: **Microbiology of the Phyllosphere**, Fokkema, N.J. & Heuvel, J. van den (eds.), Cambridge University Press, Cambridge, p.205-22.
- CARROLL, G.C. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, Brooklyn, v.69, p.2-9.
- CARROLL, G.C. & CARROLL, F.E. 1978. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.5, p.3034-43.

- CAVALCANTE, B.P. 1991. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Ed. Cejup., 5ª ed., p.196-9.
- CHEPLICK, G.P.; CLAY, K. & MARKS, S. 1989. Interactions between infection by endophytic fungi and nutrient limitation in grasses: *Lolium perenne* and *Festuca arundinaceae*. **New Phytologist**, Cambridge, v.111, p.89-97.
- CLARK, C.L.; MILLER, J.D. & WHITNEY, N.J. 1989. Toxicity of conifer needle endophytes to spruce budworm. **Mycological Research**, Cambridge, v.93, p.508-12.
- CLAY, K. 1987. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinaceae*. **Oecologia**, Berlin, v.73, p.358-62.
- CLAY, K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. **Ecology**, v.69, p.10-6.
- CLEMENT, C.R. 1987. Pupunha – Uma árvore domesticada. **Ciência Hoje**. v.5, nº 29, p.42-9.
- CLEMENT, C.R 1999a. Pupunha (*Bactris gasipaes*). In: **Biodiversidade Amazônica: exemplos e estratégias de utilização**. Clement, C.R.; Clay, J.W. & Sampaio, P.T.B. (eds.). 1ª ed., INPA/SEBRAE, Manaus, p.82-97.
- CLEMENT, C.R. 1999b. Introdução à pupunha. **A Revista da Pupunha, Pupunha-net**. <http://peixe-<boi.inpa.gov.br/pupunha/artigos/crc1.html>>, p.1-18.
- CLEMENT, M.; POSADA, D. & CRANDALL, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v.9, nº 10, p.1657-60.
- CLEMENT, S.L.; PIKE, K.S.; KAISER, W.J. & WILSON, A.D. 1990. Resistance of endophyte-infected plants of tall fescue and perennial ryegrass to the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, Manhattan, v.63, nº 4, p.646-8.
- COATES-BECKFORD, P.L. & CHUNG, P.C. 1987. A study of the germination, disease symptoms and fungi associated with pejibaye seeds. **Seed Science & Technologie**, v.15, p.205-18.
- COSTA NETO, P.Q. 1997. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos da planta daninha *Scleria pterota* Presl (alpiste de passarinho), em Manaus**. Monografia, Universidade do Amazonas, Manaus, 36p.
- DRUMOND, A.A. 2000. Fungos endofíticos isolados de cumaru (*Dipterix odorata* Wild. (Aubl.)). **Anais IX Jornada de Iniciação Científica da Universidade do Amazonas**, Manaus, p.27.

- ELLIS, B.M. 1971. **Dematiaceous hyphomycetes**. Surrey, Commonwealth Mycological Institute, Kew, 608p.
- FAHEY, J.W. 1988. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. ACS. Symp. Ser. *In: Biologically active natural products: Potential use in agriculture*, Hanover, v.380, p.120-8.
- FERNÁNDEZ-PIEDRA, M.; BLANCO-METZLER, A. & MORA-URPÍ, J. 1995. Contenido de ácidos grasos en cuatro poblaciones de pejíbaye, *Bactris gasipaes* (Palmae). **Revista de Biología Tropical**, v.43, nº 1-3, p.61-6.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed., Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p.
- FERREIRA, S.A.N. 1988. **Armazenamento e desenvolvimento do teste de tetrazólio em sementes de pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
- FISHER, P.J.; ANSON, A.E. & PETRINI, O. 1984a. Antibiotic activity of some endophytic fungi from ericaceous plants. **Botanica Helvetica**, Basel, v.94, p.249-53.
- FISHER, P.J.; ANSON, A.E. & PETRINI, O. 1984b. Novel antibiotic activity of an endophyte *Cryptosporiopsis* sp. isolated from *Vaccinium myrtillus*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.83, p.145-8.
- FISHER, P.J. & PETRINI, O. 1990. A comparative study of fungal endophytes in xylem and bark of *Alnus* species in England and Switzerland. **Mycological Research**, Cambridge, v.94, nº 3, p.313-9.
- FISHER, P.J. & PETRINI, O. 1992. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). **New Phytologist**, Cambridge, v.120, p.137-43.
- FISHER, P.J.; PETRINI, O. & SCOTT, H.M.P. 1992. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, v.122, p.299-305.
- GALLI, F.; TOKESHI, H.; CARVALHO, P.C.T.; BALMER, E.; KIMATI, H.; CARDOSO, C.O.N.; SALGADO, C.L.; KRUGNER, T.L.; CARDOSO, E.J.B.N.; BERGAMIN FILHO, A. 1978. **Manual de Fitopatologia**. 2ª ed., Ed. Ceres, São Paulo, v.1, 373p.

- GANLEY, A.R.D & SCOTT, B. 2002. Concerted evolution in the ribosomal RNA genes of an *Epichloë* endophyte hybrid: comparison between tandemly arranged rDNA and dispersed 5S rrn genes. **Fungal Genetics and Biology**, nº 35, p.39-51.
- GLIENKE, C. 1995. **Variabilidade genética no fungo endofítico *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 115p.
- GLIENKE, C. 1999. ***Guignardia citricarpa* Kiely: Análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro**. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 200p.
- GONSALVES, A.K. & FERREIRA, S.A. 2002a.
http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/cera_prim.htm
- GONSALVES, A.K. & FERREIRA, S.A. 2002b.
http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/Type/thi_prim.htm
- GUIMARÃES, V.C. 1998. **Isolamento de fungos endofíticos do hospedeiro *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke e análise da variabilidade genética, detectada por marcadores RAPD, no endófito *Glomerella cingulata***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos/Universidade do Amazonas, São Carlos, São Paulo, 123p.
- GUO, L.D.; HYDE, K.D. & LIEW, E.C.Y. 2000. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. **New Phytologist**, v.147, p.617-30.
- GUO, L.D.; HYDE, K.D. & LIEW, E.C.Y. 2001. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.20, nº 1, p.1-13.
- HALLMANN, J. & SIKORA, R.A. 1996. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v.102, p.155-62.
- HÄMMERLI, U.A.; BRANDLE, U.E.; PETRINI, O. & McDERMOTT, J.M. 1992. Differentiation of isolates of *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomia errabunda*) from beech, chestnut and oak using RAPD markers. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.5, p.479-83.
- HARRINGTON, T.C. & McNEW, D.L. 1998. Partial interfertility among the *Ceratocystis* species on conifers. **Fungal Genetics and Biology**, v.25, p.44-53.

- HELANDER, M.L. & RANTIO-LEHTIMÄKI. 1990. Effects of watering and simulated acid rain on quantity of phyllosphere fungi of birch leaves. **Microbial Ecology**, New York, v.19, p.119-25.
- HERNÁNDEZ, C.G.; GONZÁLEZ, E.V.; VARGAS, R.G.N.; FIGUEROA, L.S.; BADILA, M.Q. & MEZA, J.M. 1999. Malezas, enfermedades y plagas: su manejo integral. In: **Palmito de pejibaye (*Bactris gasipaes* Kunth): su cultivo e industrialización**. Mora-Urpí, J. & Echeverría, J.G. (eds.). 1ª ed., San José, Costa Rica, Editorial de la Universidad de Costa Rica, 260p.
- JOHNSON, M.C.; DAHLMAN, D.L.; SIEGEL, M.R.; BUSH, L.P.; LATCH, G.C.M.; POTTER, D.A. & VARNEY, D.R. 1985. Insect feeding deterrents in endophyte-infected tall fescue. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, p.568-71.
- KERR, L.; CLEMENT, R.; CLEMENT, C.R. & KERR, W.E. 1997. **Cozinhando com a pupunha**. INPA, 19ª ed., Manaus, 95p.
- KOWALSKI, T. & KEHR, R.D. 1996. Fungal endophytes of living branch bases in several European tree species. In: **Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants – Systematics, Ecology and Evolution**, Redlin, S.C. & Carris, L.M. (eds.), St. Paul, p.67-86.
- LATCH, G.C.M.; CHRISTENSEN, M.J. & SAMUELS, G.J. 1984. Five endophytes of *Lolium* and *Festuca* in New Zealand. **Mycotaxon**, v.20, p.535-50.
- LEUCHTMANN, A. 1994. Isozyme relationships of *Acremonium* endophytes from twelve *Festuca* sp.. **Mycological Research**, Cambridge, v.98, nº 1, p.25-33.
- LEUCHTMANN, A.; PETRINI, O.; PETRINI, L.E. & CARROLL, G.C. 1992. Isozyme polymorphism in six endophytic *Phyllosticta* sp.. **Mycological Research**, v.96, p.287-95.
- LODGE, D.J.; FISHER, P.J. & SUTTON, B.C. 1996. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. **Mycologia**, v.88, nº 5, p.733.
- LONG, E.O. & DAWID, I.B. 1980. Repeated genes in eukaryotes. **Annual Review of Biochemistry**, nº 49, p.727-64.
- MAGALHÃES, A.A.S. 2000. **Isolamento e variabilidade genética detectada por RAPD do fungo endofítico *Guignardia* sp. de *Himatanthus sucuuba* SPRUCE (WOOD) Apocynaceae**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos/Universidade do Amazonas, São Carlos, São Paulo, 130p.

- MANULIS, S.; KOGAN, N.; REUVEN, M. & BEN-YEPHET, Y. 1994. Use of the RAPD technique for identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* from carnation. **Phytopathology**, Lancaster, v.84, p.98-101.
- MARICAUA, M.J.N. 1997. **Fungos endofíticos do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke)**. Monografia, Universidade do Amazonas, Manaus, 35p.
- MARSHALL, D.; TUNALI, B. & NELSON, L.R. 1999. Occurrence of fungal endophytes in species of wild *Triticum*. **Crop Science**, nº 39, p.1507-12.
- MEDEIROS-GALVÃO, R.S. 1998. **Variabilidade genética detectada por RAPD em *Glomerella cingulata*, um dos fungos endofíticos mais frequentes, isolados em *Theobroma grandiflorum*, *Pueraria phaseoloides* e *Scleria pterota***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos/Universidade do Amazonas, São Carlos, São Paulo, 151p.
- MELO, G.B. & PEREIRA, J.O. 1997. Isolamento e estudo da variabilidade genética de fungos endofíticos de cumaru (*Dipterix odorata*). **Anais VI Jornada de Iniciação Científica do Estado do Amazonas**, Manaus, p.11.
- METZENBERG, R.L. 1991. Benefactor's lecture: the impact of molecular biology on mycology. **Mycological Research**, v.95, p.9-13.
- MORA-URPÍ, J. 1993. Diversidad genética en pejibaye. II. Origen y domesticación. *In: IV Congreso Internacional sobre Biología, Agronomía e Industrialización del Pijuayo*. Mora-Urpí, J.; Szott, L.T.; Murillo, M. & Patiño, V.M. (eds.), Editorial de la Universidad de Costa Rica, San José, p.21-9.
- MORA-URPÍ, J., WEBER, J.C. & CLEMENT, C.R. 1997. **Peach palm. *Bactris gasipaes* Kunth. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops**. 20. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research - IPK, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute - IPGRI, Rome, 83p.
- MOTA, A.M. & GASPAROTTO, L. 1995. Dinâmica da queda precoce de frutos de pupunha. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, nº 4, p.377.
- MOTA, A.M. & GASPAROTTO, L. 1998. Fungos associados à "síndrome da queda de frutos" da pupunheira. **Revista da Universidade do Amazonas. Série: Ciências Agrárias**, Manaus, v.7, nº 1-2, p.69-79.
- MOTA, A.M.; SIVIERO, A. & GASPAROTTO, L. 1992. Redução na incidência de fungos em frutos de pupunha. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, nº 4, p.264.
- MULLIS, K. & FALOONA, F. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polimerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v.55, p.335-50.

- MURRAY, F.R.; LATCH, G.C.M. & SCOTT, D.B. 1992. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. **Molecular Genetics**, v.233, p.1-9.
- OLIVEIRA, L.P. 2000. **Produção de bebida alcoólica a partir de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) por fermentação dirigida**. Dissertação de Mestrado, Universidade do Amazonas, Manaus, 131p.
- ONIONS, A.H.S.; ALLSOPP, D. & EGGINS, H.O.W. 1981. **Smith's introduction to industrial mycology**. 7ª ed., Edward Arnold, London, 398p.
- PAMPFILE, J.A. 1997. **Variabilidade, transformação genética e transposons em linhagens endofíticas de *Fusarium moniliforme* isoladas de milho (*Zea mays* L.)**. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 197p.
- PAVA, O.J.; CASTILLO, C.E.; GONZALEZ O.A. & PATINO C.H. 1993. Aspectos de interesse fitossanitário de la palma de chontaduro *Bactris gasipaes* en algunas regiones del Valle y Choco. **Acta Agronômica**, v.33, nº 1, p.25-35.
- PAULIN, A.E. & HARRINGTON, T.C. 2000. Phylogenetic placement of anamorphic species of *Chalara* among *Ceratocystis* and other ascomycetes. **Studies in Mycology**, nº 45, p.169-86.
- PAULIN-MAHADY, A.E.; HARRINGTON, T.C. & McNEW, D. 2002. Phylogenetic and taxonomic evaluation of *Chalara*, *Chalaropsis*, and *Thielaviopsis* anamorphs associated with *Ceratocystis*. **Mycologia**, v.94, nº 1, p.62-72.
- PEREIRA, J.O. 1993. **Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish***. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 105p.
- PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L. & PETRINI, O. 1993. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a preliminary study. **Mycologia**, Lancaster, v.85, p.362-4.
- PETRINI, O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial tissues. In: **Microbiology of the Phyllosphere**. Fokkema, N.J. & Heuvel, J. van den (eds.), Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, p.175-87.
- PETRINI, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: **Microbial Ecology of the Leaves**. Andrews, J.H. & Hirano, S.S. (eds.), Springer Verlag, New York, p.179-97.
- PETRINI, O. & DREYFUSS, M.M. 1981. Endophytische pilze in epiphytischen Aracaceae, Bromeliaceae and Orchidaceae. **Sydowia Horn**, v.34, p.135-48.

- PETRINI, O. & FISHER, P.J. 1988. A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stems of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. **Transactions of the British Mycological Society**, v.91, p.233-8.
- PETRINI, L.E. & MÜLLER, E. 1986. Haupt-und Nebenfruchtformen Europäischer Hypoxylon-Arten (*Xylariaceae*, *Sphaeriales*) und verwandter Pilze. **Mycologia Helvetica**, v.1, p.501-627.
- PETRINI, O.; PETRINI, L.E. & OUELLETTE, G.B. 1989. Recovery of endophytes of *Abies balsamea* from needles and galls of *Paradiplosis tumifex*. **Phytoprotection**, Montreal, v.70, p.97-103.
- PETRINI, O.; STONE, J.K. & CARROLL, F.E. 1982. Endophytic fungi in evergreen shrubs in Western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.60, p.789-96.
- PIZZINATTO, M.A.; BOVI, M.L.A.; CONSOLINI, F. & SPIERING, S.H. 1996. Ocorrência de doenças em pupunheira (*Bactris gasipaes*) no Estado de São Paulo. *In: Congresso Paulista de Fitopatologia*, Campinas, p.60.
- PUNJA, Z.K. & SUN, L.-J. 1999. Morphological and molecular characterization of *Chalara elegans* (*Thielaviopsis basicola*), cause of black root rot on diverse plant species. **Canadian Journal of Botany**, v.77, p.1801-12.
- PUTERKA, G.J.; BLACK, W.C.; STEINER, W.M. & BURTON, R.L. 1993. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Morkvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. **Heredity**, London, v.70, p.604-18.
- READ, J.C. & CAMP, B.J. 1986. The effect of the fungal endophyte *Acremonium coenophialum* in tall fescue on animal performance, toxicity, and stand maintenance. **Agronomy Journal**, Madison, v.78, p.848-50.
- RICE, J.S.; PINKERTON, B.W.; STRINGER, W.C. & UNDERSNDER, D.J. 1990. Seed production in tall fescue as affected by fungal endophyte. **Crop Science**, Madison, v.30, p.1303-5.
- RIESEN, T.K. & CLOSE, R.C. 1987. Endophytic fungi in propiconazole-treated and untreated barley leaves. **Mycologia**, v.79, p.546-52.
- RODRIGUES, K.F. 1991. Fungos endofíticos em *Euterpe oleracea* Mart., com ênfase em Xylariaceae. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, série Botânica, v.2, nº 7, p.429-39.
- RODRIGUES, K.F. 1992. **Endophytic fungi in the tropical palm *Euterpe oleracea* Mart.** Ph D. Thesi, City University of New York, 258p.

- RODRIGUES, K.F. 1994. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. **Mycologia**, v.3, n° 86, p.376-85.
- RODRIGUES, K.F. & DIAS-FILHO, M.B. 1996. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. *Marandu* and *B. Humidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n° 12, p.905-9.
- RODRIGUES, K.F. & SAMUELS, G.J. 1990. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. **Mycological Research**, Cambridge, v.94, p.827-30.
- RODRIGUES, K.F. & SAMUELS, G.J. 1992. *Idriella* species endophytic in palms. **Mycotaxon**, v.XLIII, p.271-6.
- RODRIGUES, K.F. & SAMUELS, G.J. 1994. *Letendraeopsis palmarum*, a new genus and species of loculoascomycetes. **Mycologia**, v.2, n° 86, p.254-58.
- RODRIGUES, R.J. & REDMAN, R.S. 1997. Fungal life-styles and ecosystem dynamics: Biological aspects of plant pathogens, plant endophytes and saprophytes. **Advances in Botanical Research**, v.24, p.169-93.
- ROSSMAN, A.Y.; PALM, M.E. & SPIELMAN, L.J. 1987. **A literature guide for the identification of plant pathogenic fungi**. APS Press, St. Paul, 252p.
- RUSSO, C.A.M.; MIYAKI, C.Y. & PEREIRA, S.L. 2001. Reconstrução filogenética: métodos geométricos. In: **Biologia Molecular e Evolução**. Matioli, S.R. (ed.). Ribeirão Preto, São Paulo, p.108-16.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B. & EHRLICH, H.A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, p.487-91.
- SAIKKONEN, K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M. & SULLIVAN, T.J. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review Ecological Systematic**, v.29, p.319-43.
- SCHULZ, B.; WANKE, U.; DRAEGER, S. & AUST, H.J. 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycological Research**, Great Britain, v.97, n° 12, p.1447-50.

- SIEBER, T.N. 1988. Endophytische pilze in nadeln von gesunden und geschädigten fichten [*Picea abies* (L.) Karsten]. **European Journal of Forest Pathology**, v.18, p.321-42.
- SIEBER, T.N. & DORWORTH, C.E. 1994. An ecological study about assemblages of endophytic fungi in *Acer macrophyllum* in British Columbia: in search of candidate mycoherbicides. **Canadian Journal of Botany**, v.72, p.1397-1402.
- SIEBER, T.N.; RIESEN, T.K.; MÜLLER, E. & FRIED, P.M. 1988. Endophytic fungi in four winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) differing in resistance against *Stagonospora nodorum* (Berck.) Cast. & Germ. = *Septoria nodorum* (Berck.) Berck. **Journal Phytopathology**, Berlin, v.122, p.289-306.
- SIEBER, T.N.; SIEBER-CANAVESI, F. & DORWORTH, C.E. 1991. Endophytic fungi of red alder (*Alnus rubra*) leaves and twigs in British Columbia. **Canadian Journal of Botany**, v.69, p.407-11.
- SIEGEL, M.R.; LATCH, G.C.M. & JOHNSON, M.C. 1987. Fungal endophytes of grasses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.25, p.293-315.
- SILVA, C.S. 1998. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos de plantas de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (ex Spreng) Schumann) consorciadas com leguminosa (*Pueraria phaseoloides* Benth) e de planta daninha (*Scleria pterota* Presl.)**. Monografia, Universidade do Amazonas, Manaus, 37p.
- SINCLAIR, J.B. 1991. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, p.220-4.
- SINCLAIR, J.B. & CERKAUSKAS, R.F. 1996. Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. *In: Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants – Systematics, Ecology and Evolution*, Redlin, S.C. & Carris, L.M. (eds.), St. Paul, p.67-86.
- STEIN, R.L.B.; ALBUQUERQUE, F.C.; DUARTE, M.L.R. & NUNES, A.M.L. 1996. Ocorrência de *Curvularia* sp. em mudas de pupunheira (*Bactris gasipaes* H.B.K.). **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.360.
- STIERLE, A.; STROBEL, G. & STIERLE, D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreane*, an endophytic fungus of Pacific Yew. **Science**, Washington, v.260, p.214-6.
- STONE, J.K. 1986. **Foliar endophytes of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) franco-cytology and physiology of the host-endophyte relationship**. University of Oregon, Eugene, (Ph D. Thesi), 124p.

- STOVALL, M.E. & CLAY, K. 1991. Fungitoxic effects of *Balansia cyperi*. **Mycologia**, v.83, p.288-95.
- STROBEL, G.A. & LONG, D.M. 1998. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. **ASM News**, v.64, n. 5.
- SWOFFORD, D.L. 2001. **PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, version 4.0**. Sinauer Associates, Sunderland.
- TRACY, M. 1985. **The pejibaye fruit: problems and prospects for its development in Costa Rica**. Dissertação de Mestrado, Universidade do Texas, Austin, 110p.
- VALLEJO, J.Y.V. 1995. Principales enfermedades de frutos y semillas de pijibayo (*Bactris gasipaes* H. B. K.). In: **Curso de Capacitación en Agroforesteria**. Vallejo, J.Y.V., (ed.), Yurimaguas, 10p.
- VARGAS, E. 1993. Principales enfermedades del pejibaye en Costa Rica. In: **IV Congreso Internacional sobre Biología, Agronomía e Industrialización del Pijuayo**. Mora-Urpí, J.; Szott, L.T.; Murillo, M. & Patiño, V.M. (eds.), Editorial de la Universidad de Costa Rica, San José, p.355-60.
- VÉRAS, S.M. & YUYAMA, K. 2000. Severidade de doenças foliares da pupunheira em diferentes períodos climáticos, níveis de adubação e espaçamentos. Resumos: 33º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Belém, PA, **Fitopatologia Brasileira**, v.25 (suplemento), 433p.
- VÉRAS, S.M.; YUYAMA, K.; ASSIS, L.A.G. & BRAGA, M.M. 2000. Doenças foliares da pupunheira na região de Manaus. In: **XXIII Congresso Paulista de Fitopatologia**. Instituto Biológico, Campinas, São Paulo, p.232.
- VICENTE, V.A. 2000. **Isolamento e caracterização de fungos da Cromoblastomicose**. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 181p.
- VIRET, O. & PETRINI, O. 1994. Colonization of beach leaves (*Fagus sylvatica*) by the endophyte *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomonina errabunda*). **Mycological Research**, Cambridge, v.98, n° 4, p.423-32.
- WEST, C.P.; OOSTERHUIS, P.M. & WULLSCHLEGER, S.D. 1990. Osmotic adjustment in tissues of tall fescue in response to water deficit. **Environmental and Experimental Botany**, v.30, p.149-56.
- WHITE, T.J.; ARNHEIM, N. & ERLICH, H.A. 1989. The polymerase chain reaction. **Trends in Genetics**, v.5, p.185-9.

- WHITE Jr, J.F. & COLE, G.T. 1985. Endophyte-host associations in forage grasses. I. Distribution of fungal endophytes in some species of *Lolium* and *Festuca*. **Mycologia**, Lancaster, v.77, p.323-7.
- WHITE Jr, J.F.; MORGAN-JONES, G. & MORROW, A.C. 1993. Taxonomy, life cycle, reproduction and detection of *Acremonium* endophytes. **Agricultural Ecosystems Environmental**, v.44, p.13-37.
- WILSON, A.D.; CLEMENTE, S.L. & KAISER, W.J. 1991. Survey and detection of endophytic fungi in *Lolium* germ plasm by direct staining and aphyi assays. **Plant Disease**, St. Paul, v.75, p.169-73.
- WINGFIELD, B.D.; GRANT, W.S.; WOLFAARDT, J.F. & WINGFIELD, M.J. 1994. Ribosomal RNA sequence phylogeny is not congruent with ascospore morphology among species in *Ceratocystis sensu stricto*. **Molecular Biology and Evolution**, v.11, n° 3, p.376-83.
- WITTHUHN, R.C.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. & HARRINGTON, T.C. 1999. PCR-based identification and phylogeny of species of *Ceratocystis sensu stricto*. **Mycologia Research**, v.103, n° 6, p.743-9.
- WITTHUHN, R.C.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. & WOLFAARDT, M. 1998. Monophyly of the conifer species in the *Ceratocystis coerulescens* complex based on DNA sequence data. **Mycologia**, v.90, n° 1, p.96-101.
- ZERVAKIS, G.; SOURDIS, J. & BALIS, C. 1994. Genetic variability and systematics of eleven *Pleurotus* species based on isozyme analysis. **Mycological Research**, Cambridge, v.98, n° 3, p.329-41.

Identificação de fungos endófitos da pupunheira ...

ANEXO 01. Matriz de Distância entre endófitos de *T. paradoxa* isolados de *B. gasipaes*. Os táxons na cor verde foram isolados do mesocarpo, em vermelho do endocarpo e azul do endosperma. Os outros indivíduos pertencem *Ceratocystis* sp. obtidos no GenBank e AF275509 e AF275482, de *Chalara elegans*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 BP8.1P-2.3b	-											
2 BP13.3-2.2b	0.00000	-										
3 BP1.6E-3.2	0.00000	0.00000	-									
4 BP7.5P-1.2	0.00301	0.00301	0.00301	-								
5 PP12.3-4.2	0.00000	0.00000	0.00312	0.00301	-							
6 BP13.2-1.1a	0.00302	0.00302	0.00302	0.00301	0.00316	-						
7 BP12.1-2.1a	0.00000	0.00000	0.00000	0.00301	0.00000	0.00302	-					
8 PP15.3-4.2	0.00000	0.00000	0.00000	0.00301	0.00000	0.00302	0.00000	-				
9 BP13.1-2.1b	0.00000	0.00000	0.00000	0.00301	0.00000	0.00302	0.00000	0.00000	-			
10 PP13.2E-4.1a	0.00000	0.00000	0.00000	0.00301	0.00000	0.00302	0.00000	0.00000	0.00000	-		
11 PP17.3E-4.2	0.00000	0.00000	0.00000	0.00301	0.00000	0.00302	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-	
12 PP14.3-3.3	0.00000	0.00000	0.00000	0.00151	0.00000	0.00150	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-
13 PP15.3E-2.1	0.00000	0.00000	0.00000	0.00301	0.00000	0.00302	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
14 BP14.1-4.1	0.00000	0.00000	0.00000	0.00301	0.00000	0.00302	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
15 BP1.3-1.2	0.00150	0.00150	0.00150	0.00150	0.00156	0.00150	0.00150	0.00150	0.00150	0.00150	0.00150	0.00000
16 BP16.1E-4.1b	0.00000	0.00000	0.00000	0.00151	0.00000	0.00150	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
17 BP14.3E-2.2a	0.00000	0.00000	0.00000	0.00301	0.00000	0.00302	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
18 PP13.1E-2.1	0.00000	0.00000	0.00000	0.00301	0.00000	0.00302	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
19 BP17.3E-4.1a	0.00000	0.00000	0.00000	0.00151	0.00000	0.00150	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
20 BP1.3E-2.3	0.00301	0.00301	0.00301	0.00602	0.00157	0.00602	0.00301	0.00301	0.00301	0.00301	0.00301	0.00301
21 PP13.3E-1.2b	0.00150	0.00150	0.00150	0.00451	0.00000	0.00451	0.00150	0.00150	0.00150	0.00150	0.00150	0.00150
22 PP12.1-3.3a	0.00000	0.00000	0.00000	0.00301	0.00000	0.00301	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
23 AF275477	0.00000	0.00000	0.00000	0.00292	0.00000	0.00537	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
24 AF043598	0.09580	0.09580	0.09580	0.09871	0.09890	0.09867	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580
25 AF043599	0.02281	0.02281	0.02281	0.02579	0.02403	0.02576	0.02281	0.02281	0.02281	0.02281	0.02281	0.02281
26 AF043600	0.09580	0.09580	0.09580	0.09871	0.09890	0.09867	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580
27 AF043601	0.05188	0.05188	0.05188	0.05489	0.05458	0.05484	0.05188	0.05188	0.05188	0.05188	0.05188	0.05188
28 AF043602	0.09580	0.09580	0.09580	0.09871	0.09890	0.09867	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580
29 AF043603	0.07325	0.07325	0.07325	0.07617	0.07700	0.07617	0.07325	0.07325	0.07325	0.07325	0.07325	0.07325
30 AF043604	0.09580	0.09580	0.09580	0.09871	0.09890	0.09867	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580
31 AF043605	0.09580	0.09580	0.09580	0.09871	0.09890	0.09867	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580
32 AF043606	0.09580	0.09580	0.09580	0.09871	0.09890	0.09867	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580
33 AF043607	0.01062	0.01062	0.01062	0.01212	0.01119	0.01365	0.01062	0.01062	0.01062	0.01062	0.01062	0.01062
34 AF043597	0.09580	0.09580	0.09580	0.09871	0.09890	0.09867	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580
35 AF275509	0.09580	0.09580	0.09580	0.09871	0.09890	0.09867	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580

Identificação de fungos endofíticos da pupunheira ...

	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
36 AF275482	0.09580	0.09580	0.09580	0.09871	0.09890	0.09867	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580
(continuação do Anexo 01)												
13 PP15.3E-2.1	-											
14 BP14.1-4.1	0.00000	-										
15 BP1.3-1.2	0.00150	0.00150	-									
16 BP16.1E-4.1b	0.00000	0.00000	0.00000	-								
17 BP14.3E-2.2a	0.00000	0.00000	0.00150	0.00000	-							
18 PP13.1E-2.1	0.00000	0.00000	0.00150	0.00000	0.00000	-						
19 BP17.3E-4.1a	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-					
20 BP1.3E-2.3	0.00301	0.00301	0.00451	0.00301	0.00301	0.00301	0.00301	-				
21 PP13.3E-1.2b	0.00150	0.00150	0.00301	0.00150	0.00150	0.00150	0.00150	0.00150	-			
22 PP12.1-3.3a	0.00000	0.00000	0.00150	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00301	0.00150	-		
23 AF275477	0.00000	0.00000	0.00290	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-	
24 AF043598	0.09580	0.09580	0.09718	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09865	0.09715	0.09565	0.13090	-
25 AF043599	0.02281	0.02281	0.02427	0.02281	0.02281	0.02281	0.02281	0.02573	0.02423	0.02275	0.03513	0.09133
26 AF043600	0.09580	0.09580	0.09718	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09865	0.09715	0.09565	0.13090	0.00000
27 AF043601	0.05188	0.05188	0.05335	0.05188	0.05188	0.05188	0.05188	0.05478	0.05327	0.05180	0.07032	0.09675
28 AF043602	0.09580	0.09580	0.09718	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09865	0.09715	0.09565	0.13090	0.00000
29 AF043603	0.07325	0.07325	0.07466	0.07325	0.07325	0.07325	0.07325	0.07611	0.07463	0.07316	0.10772	0.10534
30 AF043604	0.09580	0.09580	0.09718	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09865	0.09715	0.09565	0.13090	0.00000
31 AF043605	0.09580	0.09580	0.09718	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09865	0.09715	0.09565	0.13090	0.00000
32 AF043606	0.09580	0.09580	0.09718	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09865	0.09715	0.09565	0.13090	0.00000
33 AF043607	0.01062	0.01062	0.01213	0.01062	0.01062	0.01062	0.01062	0.01361	0.01211	0.01060	0.01265	0.09447
34 AF043597	0.09580	0.09580	0.09718	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09865	0.09715	0.09565	0.13090	0.00000
35 AF275509	0.09580	0.09580	0.09718	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09865	0.09715	0.09565	0.13090	0.00000
36 AF275482	0.09580	0.09580	0.09718	0.09580	0.09580	0.09580	0.09580	0.09865	0.09715	0.09565	0.13090	0.00000

(Continuação do Anexo 01)

	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
25 AF043599	-											
26 AF043600	0.09133	-										
27 AF043601	0.04696	0.09675	-									
28 AF043602	0.09133	0.00000	0.09675	-								
29 AF043603	0.06750	0.10534	0.05587	0.10534	-							
30 AF043604	0.09133	0.00000	0.09675	0.00000	0.10534	-						
31 AF043605	0.09133	0.00000	0.09675	0.00000	0.10534	0.00000	-					
32 AF043606	0.09133	0.00000	0.09675	0.00000	0.10534	0.00000	0.00000	-				
33 AF043607	0.02436	0.09447	0.04288	0.09447	0.06577	0.09447	0.09447	0.09447	-			
34 AF043597	0.09133	0.00000	0.09675	0.00000	0.10534	0.00000	0.00000	0.00000	0.09447	-		
35 AF275509	0.09133	0.00000	0.09675	0.00000	0.10534	0.00000	0.00000	0.00000	0.09447	0.00000	-	
36 AF275482	0.09133	0.00000	0.09675	0.00000	0.10534	0.00000	0.00000	0.00000	0.09447	0.00000	0.00000	-

ANEXO 02. Sequências nucleotídicas de parte do gene ribossomal, com 692 pb, de endófitos de *Thielaviopsis paradoxa* isolados de *Bactris gasipaes*. Os indivíduos destacados na cor verde foram isolados do mesocarpo, em vermelho do endocarpo, em azul do endosperma e os sítios polimórficos estão em marrom. Em preto, seqüências de *Ceratocystis* e em violeta, de *Chalara elegans* obtidas no GenBank.

```

[
      1 1111111112 2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 ]
[
      1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#BP8.1P-2.3b  GGATTTGCCG GTAGCAC--A AACAAACTCT TTA-TATTTT TAGAGAATT- --ATTTCATG CTGAGTGGCA
#BP13.3-2.2b  .....
#BP1.6E-3.2   .....
#BP7.5P-1.2   .....
#PP12.3-4.2   .....
#BP13.2-1.1a  .....
#BP12.1-2.1a  .....
#PP15.3-4.2   .....
#BP13.1-2.1b  .....
#PP13.2E-4.1a .....
#PP17.3E-4.2  .....
#PP14.3-3.3   .....
#PP15.3E-2.1  .....
#BP14.1-4.1   .....
#BP1.3-1.2    .....
#BP16.1E-4.1b .....
#BP14.3E-2.2a .....
#PP13.1E-2.1  .....
#BP17.3E-4.1a .....
#BP1.3E-2.3   .....
#PP13.3E-1.2b .....
#PP12.1-3.3a  .....
#AF275477     .....
#AF043598     .TT.C...A ...T.T--T T.....TTA.....-...T...
#AF043599     .A.CC...A .C..T.T-- ..T.....T-...T-...
#AF043600     .TT.C...A ...T.T--T T.....TTA.....-...T...
#AF043601     A.TCC.... .T.TTT. G.A......A.....T AT.....
#AF043602     .TT.C...A ...T.T--T T.....TTA.....-...T...
#AF043603     AAG.C.... .T.TTTT ..A.CT..T. .TT.....-..A.....-...
#AF043604     .TT.C...A ...T.T--T T.....TTA.....-...T...
#AF043605     .TT.C...A ...T.T--T T.....TTA.....-...T...
#AF043606     .TT.C...A ...T.T--T T.....TTA.....-...T...
#AF043607     .....
#AF275509     .TT.C...A ...T.T--T T.....TTA.....-...T...
#AF275482     .TT.C...A ...T.T--T T.....TTA.....-...T...
#AF043597     .TT.C...A ...T.T--T T.....TTA.....-...T...

```

(Continuação do Anexo 02)

```

[
[
1 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 ]
[
7777777778 8888888889 9999999990 0000000001 1111111112 2222222223 3333333334 ]
[
1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#BP8.1P-2.3b TTAAGTAAAT AAGTTAAAC TTCAACAAC GGATCTCTTG GCTCTAGCAT CGATGAAGAA CGCAGCGAAA
#BP13.3-2.2b .....
#BP1.6E-3.2 .....
#BP7.5P-1.2 .....
#PP12.3-4.2 .....
#BP13.2-1.1a .....
#BP12.1-2.1a .....
#PP15.3-4.2 .....
#BP13.1-2.1b .....
#PP13.2E-4.1a .....
#PP17.3E-4.2 .....
#PP14.3-3.3 .....
#PP15.3E-2.1 .....
#BP14.1-4.1 .....
#BP1.3-1.2 .....
#BP16.1E-4.1b .....
#BP14.3E-2.2a .....
#PP13.1E-2.1 .....
#BP17.3E-4.1a .....
#BP1.3E-2.3 .....
#PP13.3E-1.2b .....
#PP12.1-3.3a .....
#AF275477 .....
#AF043598 .T.AC...A T.....
#AF043599 .....
#AF043600 .T.AC...A T.....
#AF043601 .....AT.....
#AF043602 .T.AC...A T.....
#AF043603 .....AT.....
#AF043604 .T.AC...A T.....
#AF043605 .T.AC...A T.....
#AF043606 .T.AC...A T.....
#AF043607 .....
#AF275509 .T.AC...A T.....
#AF275482 .T.AC...A T.....
#AF043597 .T.AC...A T.....

```

(Continuação do Anexo 02)

```

[          1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111112 2222222222 ]
[          4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 0000000001 ]
[          1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#BP8.1P-2.3b  TGGGATACGT AATGTGAATT GCAGAACTCA GTGAATCATC GAATCTTTGA ACGCACATTG CACCTGGCAG
#BP13.3-2.2b  .....
#BP1.6E-3.2   .....
#BP7.5P-1.2   .....
#PP12.3-4.2   .....
#BP13.2-1.1a  ..... C .....
#BP12.1-2.1a  .....
#PP15.3-4.2   .....
#BP13.1-2.1b  .....
#PP13.2E-4.1a .....
#PP17.3E-4.2  .....
#PP14.3-3.3   .....
#PP15.3E-2.1  .....
#BP14.1-4.1   .....
#BP1.3-1.2    .....
#BP16.1E-4.1b .....
#BP14.3E-2.2a .....
#PP13.1E-2.1  .....
#BP17.3E-4.1a .....
#BP1.3E-2.3   .....
#PP13.3E-1.2b .....
#PP12.1-3.3a  .....
#AF275477     .....
#AF043598     .....A.....T.....G...A...
#AF043599     .....
#AF043600     .....A.....T.....G...A...
#AF043601     .....
#AF043602     .....A.....T.....G...A...
#AF043603     .....
#AF043604     .....A.....T.....G...A...
#AF043605     .....A.....T.....G...A...
#AF043606     .....A.....T.....G...A...
#AF043607     .....
#AF275509     .....A.....T.....G...A...
#AF275482     .....A.....T.....G...A...
#AF043597     .....A.....T.....G...A...
    
```


(Continuação do Anexo 02)

[2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222]
[1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778]
[1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890]
#BP8.1P-2.3b	CATTCTGCCA	GGTATGCCTG	TCCGAGCGTC	ATTTCCACCAC	TCAAGCTCTG	CTTGGCGTTG	GAGGACCCGC	
#BP13.3-2.2b	
#BP1.6E-3.2	
#BP7.5P-1.2	
#PP12.3-4.2	
#BP13.2-1.1a	
#BP12.1-2.1a	
#PP15.3-4.2	
#BP13.1-2.1b	
#PP13.2E-4.1a	
#PP17.3E-4.2	
#PP14.3-3.3	
#PP15.3E-2.1	
#BP14.1-4.1	
#BP1.3-1.2	
#BP16.1E-4.1b	
#BP14.3E-2.2a	
#PP13.1E-2.1	
#BP17.3E-4.1a	
#BP1.3E-2.3	
#PP13.3E-1.2b	
#PP12.1-3.3a	
#AF275477	
#AF043598	T.....T.	..C.....CT..T....CA	
#AF043599	T.....T.	..C.....CT..T....CA	
#AF043600	T.....T.	..C.....CT..T....CA	
#AF043601	T.....T.	..C.....CT..T....CA	
#AF043602	T.....T.	..C.....CT..T....CA	
#AF043603	T.....T.	..C.....CT..T....CA	
#AF043604	T.....T.	..C.....CT..T....CA	
#AF043605	T.....T.	..C.....CT..T....CA	
#AF043606	T.....T.	..C.....CT..T....CA	
#AF043607	T.....T.	..C.....CT..T....CA	
#AF275509	T.....T.	..C.....CT..T....CA	
#AF275482	T.....T.	..C.....CT..T....CA	
#AF043597	T.....T.	..C.....CT..T....CA	

(Continuação do Anexo 02)

```
[
222222222 222222223 333333333 333333333 333333333 333333333 333333333 333333333 ]
[
888888888 999999999 000000001 111111112 222222223 333333334 444444445 ]
[
123456789 123456789 123456789 123456789 123456789 123456789 123456789 123456789 ]
#BP8.1P-2.3b GT-----TT GCGGGCCGC- GAAATGAATC GGCTGTTATA CTTGCAGCTT CCCTGCGTAG TAATT----T
#BP13.3-2.2b .----- .-----
#BP1.6E-3.2 .----- .-----
#BP7.5P-1.2 .----- GC .-----
#PP12.3-4.2 .----- .-----
#BP13.2-1.1a .----- GC .-----
#BP12.1-2.1a .----- .-----
#PP15.3-4.2 .----- .-----
#BP13.1-2.1b .----- .-----
#PP13.2E-4.1a .----- .-----
#PP17.3E-4.2 .----- .-----
#PP14.3-3.3 .----- C .-----
#PP15.3E-2.1 .----- .-----
#BP14.1-4.1 .----- .-----
#BP1.3-1.2 .----- GC .-----
#BP16.1E-4.1b .----- C .-----
#BP14.3E-2.2a .----- .-----
#PP13.1E-2.1 .----- .-----
#BP17.3E-4.1a .----- C .-----
#BP1.3E-2.3 .----- C .-----
#PP13.3E-1.2b .----- C .-----
#PP12.1-3.3a .----- C .-----
#AF275477 .----- C .-----
#AF043598 C.TGTC-ACA AGC...A.C .C... AG.. T... AACTT-
#AF043599 .TTTCTT... C .CT---
#AF043600 C.TGTC-ACA AGC...A.C .C... AG.. T... AACTT-
#AF043601 A.C----... C .ATTTA.
#AF043602 C.TGTC-ACA AGC...A.C .C... AG.. T... AACTT-
#AF043603 TGTTT--TCA A.A...A.C .C... T... A----
#AF043604 C.TGTC-ACA AGC...A.C .C... AG.. T... AACTT-
#AF043605 C.TGTC-ACA AGC...A.C .C... AG.. T... AACTT-
#AF043606 C.TGTC-ACA AGC...A.C .C... AG.. T... AACTT-
#AF043607 .----- C .-----
#AF275509 C.TGTC-ACA AGC...A.C .C... AG.. T... AACTT-
#AF275482 C.TGTC-ACA AGC...A.C .C... AG.. T... AACTT-
#AF043597 C.TGTC-ACA AGC...A.C .C... AG.. T... AACTT-
```

(Continuação do Anexo 02)

```

[          3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333334 4444444444 4444444444 ]
[          5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 0000000001 1111111112 ]
[          1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#BP8.1P-2.3b TGTGTTACGC TTTGAAACTC TTGTACTACA T-GCCGTTAA ACCC----- ATCAATTT-- -TTTGAAAGG
#BP13.3-2.2b .....
#BP1.6E-3.2 .....
#BP7.5P-1.2 .....
#PP12.3-4.2 .....
#BP13.2-1.1a .....
#BP12.1-2.1a .....
#PP15.3-4.2 .....
#BP13.1-2.1b .....
#PP13.2E-4.1a .....
#PP17.3E-4.2 .....
#PP14.3-3.3 .....
#PP15.3E-2.1 .....
#BP14.1-4.1 .....
#BP1.3-1.2 .....
#BP16.1E-4.1b .....
#BP14.3E-2.2a .....
#PP13.1E-2.1 .....
#BP17.3E-4.1a .....
#BP1.3E-2.3 .....
#PP13.3E-1.2b .....
#PP12.1-3.3a .....
#AF275477 .....
#AF043598 .....C.....G...T...A...AA----- -A.C.C..TT T.GAA.....
#AF043599 .....G...C----- .AT T.....
#AF043600 .....C.....G...T...A...AA----- -A.C.C..TT T.GAA.....
#AF043601 .T.T.....T...A...C...A...----CC C.....-TT T.GAA.....
#AF043602 .....C.....G...T...A...AA----- -A.C.C..TT T.GAA.....
#AF043603 CTAT...A.....T...A...TCAATT C.TT...GAA A.....
#AF043604 .....C.....G...T...A...AA----- -A.C.C..TT T.GAA.....
#AF043605 .....C.....G...T...A...AA----- -A.C.C..TT T.GAA.....
#AF043606 .....C.....G...T...A...AA----- -A.C.C..TT T.GAA.....
#AF043607 -A.....C.....-TT T.GAA.....
#AF275509 .....C.....G...T...A...AA----- -A.C.C..TT T.GAA.....
#AF275482 .....C.....G...T...A...AA----- -A.C.C..TT T.GAA.....
#AF043597 .....C.....G...T...A...AA----- -A.C.C..TT T.GAA.....

```

(Continuação do Anexo 02)

```

[          4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 4444444444 ]
[          2222222223 3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 ]
[          1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#BP8.1P-2.3b  TTGACCTCGG ATCAGGTAGG AATACCCGCT GAACTTAAGC ATATCAATAA GCGGAGGAAA AGAAACCAAC
#BP13.3-2.2b  .....
#BP1.6E-3.2   .....
#BP7.5P-1.2   .....G.....
#PP12.3-4.2   .....
#BP13.2-1.1a  .....
#BP12.1-2.1a  .....
#PP15.3-4.2   .....
#BP13.1-2.1b  .....
#PP13.2E-4.1a .....
#PP17.3E-4.2  .....
#PP14.3-3.3   .....
#PP15.3E-2.1  .....
#BP14.1-4.1   .....
#BP1.3-1.2    .....
#BP16.1E-4.1b .....
#BP14.3E-2.2a .....
#PP13.1E-2.1  .....
#BP17.3E-4.1a .....
#BP1.3E-2.3   .....
#PP13.3E-1.2b .....
#PP12.1-3.3a  .....
#AF275477     -----
#AF043598     .....
#AF043599     .....
#AF043600     .....
#AF043601     .....
#AF043602     .....
#AF043603     .....
#AF043604     .....
#AF043605     .....
#AF043606     .....
#AF043607     .....
#AF275509     .....
#AF275482     .....
#AF043597     .....

```

(Continuação do Anexo 02)

[4444444445	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555	5555555555]
[9999999990	0000000001	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556]
[1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890]
#BP8.1P-2.3b	AGGGATTGCC	CTAGTAACGG	CGAGTGAAGC	GGCAACAGCT	CAAATTTGAA	ATCTGGCTAC	TTGTAGTCC	
#BP13.3-2.2b	
#BP1.6E-3.2	
#BP7.5P-1.2	
#PP12.3-4.2	
#BP13.2-1.1a	
#BP12.1-2.1a	
#PP15.3-4.2	
#BP13.1-2.1b	
#PP13.2E-4.1a	
#PP17.3E-4.2	
#PP14.3-3.3	
#PP15.3E-2.1	
#BP14.1-4.1	
#BP1.3-1.2	
#BP16.1E-4.1b	
#BP14.3E-2.2a	
#PP13.1E-2.1	
#BP17.3E-4.1a	
#BP1.3E-2.3	A.....	
#PP13.3E-1.2b	
#PP12.1-3.3a	
#AF275477	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
#AF043598-------	
#AF043599T------	
#AF043600-------	
#AF043601TC-----	
#AF043602-------	
#AF043603TC----T	
#AF043604-------	
#AF043605-------	
#AF043606-------	
#AF043607T------	
#AF275509-------	
#AF275482-------	
#AF043597-------	

(Continuação do Anexo 02)

```

[          5555555555 5555555555 5555555555 5555555556 6666666666 6666666666 6666666666 ]
[          6666666667 7777777778 8888888889 9999999990 0000000001 1111111112 2222222223 ]
[          1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 ]
#BP8.1P-2.3b GAGTTGTAAT TTGTAGAGGA TGCTTTTGGT GAGGTGCCTT CCGAGTT-CC CTGGAACGGG ACGCCATAGA
#BP13.3-2.2b .....
#BP1.6E-3.2 .....
#BP7.5P-1.2 .....
#PP12.3-4.2 .....
#BP13.2-1.1a .....
#BP12.1-2.1a .....
#PP15.3-4.2 .....
#BP13.1-2.1b .....
#PP13.2E-4.1a .....
#PP17.3E-4.2 .....
#PP14.3-3.3 .....
#PP15.3E-2.1 .....
#BP14.1-4.1 .....
#BP1.3-1.2 .....
#BP16.1E-4.1b .....
#BP14.3E-2.2a .....
#PP13.1E-2.1 .....
#BP17.3E-4.1a .....
#BP1.3E-2.3 .....
#PP13.3E-1.2b .....
#PP12.1-3.3a .....
#AF275477 -----
#AF043598 ..... .CG..... -...CGT.. .T.....-... .....A...
#AF043599 .....
#AF043600 ..... .CG..... -...CGT.. .T.....-... .....A...
#AF043601 ..... C.....
#AF043602 ..... .CG..... -...CGT.. .T.....-... .....A...
#AF043603 .....
#AF043604 ..... .CG..... -...CGT.. .T.....-... .....A...
#AF043605 ..... .CG..... -...CGT.. .T.....-... .....A...
#AF043606 ..... .CG..... -...CGT.. .T.....-... .....A...
#AF043607 ..... .....T.....
#AF275509 ..... .CG..... -...CGT.. .T.....-... .....A...
#AF275482 ..... .CG..... -...CGT.. .T.....-... .....A...
#AF043597 ..... .CG..... -...CGT.. .T.....-... .....A...

```

(Continuação do Anexo 02)

```

[          6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 6666666666 66]
[          3333333334 4444444445 5555555556 6666666667 7777777778 8888888889 99]
[          1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 1234567890 12]
#BP8.1P-2.3b GGGTGAGAGC CCCGTACGGT TGGATGCCAA ACCTTTGTAT AGCTCCTTCA ACGAGTCGAG TA
#BP13.3-2.2b .....
#BP1.6E-3.2 .....
#BP7.5P-1.2 .....
#PP12.3-4.2 .....
#BP13.2-1.1a .....
#BP12.1-2.1a .....
#PP15.3-4.2 .....
#BP13.1-2.1b .....
#PP13.2E-4.1a .....
#PP17.3E-4.2 .....
#PP14.3-3.3 .....
#PP15.3E-2.1 .....
#BP14.1-4.1 .....
#BP1.3-1.2 .....
#BP16.1E-4.1b .....
#BP14.3E-2.2a .....
#PP13.1E-2.1 .....
#BP17.3E-4.1a .....
#BP1.3E-2.3 .....
#PP13.3E-1.2b .....
#PP12.1-3.3a .....
#AF275477 -----
#AF043598 .....A...A...A...G .....
#AF043599 .....
#AF043600 .....A...A...G .....
#AF043601 .....CA.....
#AF043602 .....A...A...G .....
#AF043603 .....A.....
#AF043604 .....A...A...G .....
#AF043605 .....A...A...G .....
#AF043606 .....A...A...G .....
#AF043607 .....C.....
#AF275509 .....A...A...G .....
#AF275482 .....A...A...G .....
#AF043597 .....A...A...G .....

```