

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS  
ENDOFÍTICOS E PATOGÊNICOS *Colletotrichum* spp.  
ISOLADOS DE GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana* H.B.K.  
var. *sorbilis* (Mart.) Ducke)**

PEDRO DE QUEIROZ COSTA NETO

Manaus-AM  
Junho-2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS  
ENDOFÍTICOS E PATOGÊNICOS *Colletotrichum* spp.  
ISOLADOS DE GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana* var.  
*sorbilis* H.B.K. (Mart.) Ducke)**

PEDRO DE QUEIROZ COSTA NETO

ORIENTADOR: Prof. JOSÉ ODAIR PEREIRA, Dr.

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, Área de Concentração: Conservação e Uso de Recursos Genéticos Microbianos da Amazônia.

Manaus-AM  
Junho-2009

## Ficha Catalográfica

Costa Neto, Pedro de Queiroz  
C837c Caracterização molecular de fungos endofíticos e patogênicos *Colletotrichum* spp. isolados de guaranazeiro (*Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke) / Pedro de Queiroz Costa Neto.  
2009

100 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: José Odair Pereira  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas.

1. Antracnose. 2. Guaraná. 3. Variabilidade genética 4. Amazônia. I. Pereira, José Odair II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-**  
**GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

TESE DE DOUTORADO

TÍTULO:  
**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS**  
**ENDOFÍTICOS E PATOGÊNICOS *Colletotrichum* spp.**  
**ISOLADOS DE GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana* var.**  
***sorbilis* H.B.K. (Mart.) Ducke)**

ORIENTADO:  
PEDRO DE QUEIROZ COSTA NETO

ORIENTADOR:  
Prof. JOSÉ ODAIR PEREIRA, Dr.

Felipe Costa, Wellinson d'Ângelo  
Sobrinho e João Cleiboni Costa, nessa  
jornada além da relação pai e filho,  
somos amigos, a vocês:

Dedico

À todos aqueles que me possibilitaram a  
oportunidade de ampliar conhecimentos,  
quer seja na condição de aluno ou  
professor, a vocês:

Ofereço

## AGRADECIMENTOS

Àquele que sempre, em todos os momentos, nunca me desamparou, guia-me por veredas da justiça e da mansidão, nosso Deus.

À Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade da qualificação científica ofertada a todos os seus servidores.

À Embrapa, pela coleta de material vegetal para isolamento de fungos.

À Universidade de Ribeirão Preto/UNAERP, na pessoa da Profa. Dra. Suzelei, pela oportunidade de estágio no Laboratório de Biotecnologia, onde aprendi a técnica molecular AFLP.

Aos professores do Departamento de Ciências Fundamentais e Desenvolvimento Agrícola da Faculdade de Ciências Agrárias da UFAM, pela liberação para realizar esse Curso.

Aos professores do Colegiado do Curso de Ciências Agrárias e do Ambiente do Instituto Natureza e Cultura do Pólo Alto Solimões da UFAM, pela oportunidade de continuar e concluir esse Curso.

Ao Prof. Dr. José Odair Pereira, pela orientação, estímulo, oportunidades e amizade.

À Profa. Dra. Bianca Bertoni pela disponibilidade do seu tempo para orientação no aprendizado da técnica AFLP, pela amizade construída e incentivo contínuo.

Ao corpo docente do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFAM, pela oportunidade de ampliar conhecimentos e amizades estabelecidas.

Aos companheiros da jornada científica Profa. Dra. Rozana Medeiros-Galvão, Profa. Dra. Izeni Pires, Profa. Dra. Doriane Rodrigues, Profa. Dra. Maria das Neves, Profa. MSc. Aline Rondon, Profa. MSc. Ieda Batista, Profa. MSc. Luciana Barbosa, Profa. MSc. Luciana Souza, MSc. Helena Kazuko, MSc. Taciana Amorim, MSc. Wallace Batista, Chelzea Mara, Sâmara, Cláudia Guedelha, pela colaboração na realização desse trabalho e amizade fortalecida nas árduas diárias de laboratório e salas de aula.

Aos companheiros do Laboratório de Princípios Bioativos de Origem Microbiana/LPBOM: Profa. Dra. Antonia Queiroz, Dra. Ágata, MSc. Gabriela, Socorro, Auricélia (Chaveirinho), Ismael e Alessandra, pela colaboração e amizade nas longas horas compartilhadas.

Às Mestras Liene Rocha (morena) e Raquel (loira), meus braços direito e esquerdo no final da jornada, sou grato pela disponibilidade na colaboração e paciência, pela amizade construída e amor ao AFLP.

A todos os companheiros que trabalham no Centro de Apoio Multi-disciplinar, em especial Prof. Dr. Spartaco Filho, Prof. Dr. Edimar, Elza Quadros, Enedina, Jhoson, Tiago, Diego, Rogério, Gabriela, Izabel Porto, Roberto, Josué e Patrícia, muito obrigado pela colaboração em discussões científicas, material de trabalho e amizade.

A uma turma da ajuda da última hora: MSc. Rafaela Santos, MSc. Conceição Freitas, Edvaldo Pereira, Mário Nunes, Jaqueline Macêdo, Aldenice Melara, Rúbia, Celina Botelho, Gilsimar, José Nascimento, Jocélio, Rodrigo Reis, Benedito Maciel, Lunalva, Roberto Mafra, Cristian e Paulezina Viana, direta ou indiretamente vocês contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigado.

Themis Silva, obrigado pela amizade, por lembrar-me que Deus se faz sempre presente em nós, pela colaboração nesse trabalho, mesmo distante você está presente!

Aos amigos de Sena Madureira, pelo apoio e torcida na concretização desse sonho, que compartilho com cada um de vocês, em especial: Gercineide Fernandes,

Antônia Queiroz, Januária Queiroz, Dandara Costa, Giseuda Monteiro, Sílvia Queiroz, Alodia Queiroz e Cleide Queiroz.

Thaysa Nogueira, muito obrigado pela contribuição na elaboração final desse trabalho, paciência e incentivo.

Ao meu irmão Carlos Alexandre e esposa, pelo apoio e compreensão quando necessitei para concretizar esse meu sonho. Muito obrigado!

Meus filhos, Felipe, Wellinson d'Ângelo e João Cleiboni, muito obrigado pelo apoio, compreensão e colaboração na realização desse sonho compartilhado intensamente com cada um de vocês.

Meus pais, Cleiboni e Hedy, minha avó Luiza, e minha tia Francisca, *in memoriam*, por todos os momentos presentes, nas alegrias e nas tristezas, e pelo eterno amor.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Quantidade de isolados, hospedeiros, fragmento de isolamento, patogenicidade e procedência de <i>Colletotrichum</i> spp. Analisados .....	28
Tabela 2	Fungos endofíticos de guaranazeiro, do gênero <i>Colletotrichum</i> , demonstrando os isolados obtidos a partir de um único folíolo .....	53
Tabela 3	Relação dos isolados de <i>Colletotrichum</i> , identificados em nível de espécie, por comparação de seqüências das regiões ITS1-ITS2 e subunidades 5,8S do gene rDNA com o banco de informações NCBI .	60
Tabela 4	Relação dos isolados correspondentes a cada um dos nove haplótipos com mais de um representante, encontrados em três subpopulações de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> / <i>Glomerella cingulata</i> isolados de guaranazeiro, açaizeiro e <i>Rollinia</i> sp. ....	70
Tabela 5	Sítios polimórficos evidenciando a discriminação de 28 haplótipos entre os 68 indivíduos – dez <i>Glomerella cingulata</i> e 58 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> isolados de <i>Paullinia cupana</i> de Manaus e Maués, e de <i>Euterpe oleraceae</i> , <i>Rollinia</i> sp. e <i>Strychnos</i> sp. de Manaus. Foram observadas uma transversão (T → A), oito transições e 11 inserções/deleções em fragmento de 479 pares de bases. As regiões monomórficas são indicadas por ponto. N corresponde ao número de indivíduos observados dentro de cada haplótipo. P representa a proporção do haplótipo .....	72
Tabela 6	Distribuição dos 28 haplótipos de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> / <i>Glomerella cingulata</i> em função do hospedeiro e localidade .....	73
Tabela 7	Análise da variabilidade genética por meio de variância molecular (AMOVA) dentro e entre subpopulações e Índice de Fixação ( $F_{ST}$ ) de <i>Colletotrichum</i> / <i>Glomerella</i> , isolados de <i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i>	80
Tabela 8	Combinação de pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos fragmentos gerados pelos cortes das enzimas de restrição .....	81

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Grupo de genes do DNA ribossomal, compreendendo os três principais (18S, 5,8S e 28S), a região espaçadora intergênica (IGS), e as regiões espaçadoras internas (ITS). A região IGS compreende o gene 5S. As regiões ITS são mais variáveis enquanto as principais são conservadas. ITS1 e ITS4 localização de anelamento dos oligonucleotídeos para amplificação de parte do gene rDNA. (Adaptado de Mitchell e Zuccaro, 2006) .....	22
Figura 2	Colônias de <i>Colletotrichum</i> armazenadas em dois métodos: Castellani e Óleo mineral .....	55
Figura 3	Fenótipos de colônias monospóricas de <i>Colletotrichum</i> spp., isoladas de folíolos de <i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i> . EGM e EGF são isolados endofíticos e PGM, patogênicos .....	56
Figura 4	Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e revelado sob luz ultravioleta. Revelação do DNA genômico extraído de <i>Colletotrichum</i> spp. M – Marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder; isolados EGM1, EGM4, EGM8, EGM21, EGM23, EGM25, EGM26, EGM27, EGM28 e EGM31 .....	58
Figura 5	Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e revelado sob luz ultravioleta mostrando amplificação por PCR das regiões ITS1-ITS2 e 5,8S do gene rDNA de isolados de <i>Colletotrichum</i> obtidos em folíolos de <i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i> . M – Marcador 1 Kb Ladder; isolados EGM1, EGM4, EGM8, EGM21, EGM23, EGF1, EGF2, EGF3, EGF4, EGF5, ESC1, PAM1, PBM1, EEC1, EEC2, EEC4 e EEC5 .....	59
Figura 6	Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e revelado sob luz ultravioleta, mostrando a amplificação de região do gene rDNA de isolados de <i>Colletotrichum</i> com iniciadores espécie específico CgInt/ITS4 para <i>C. gloeosporioides</i> isolados de <i>Paullinia cupava</i> var. <i>sorbilis</i> . M – Marcador 1 Kb Ladder; isolados EGF1, EGF2, EGF3, EGF4, EGF5, EGF6, EGF7, EGF8, EGF9, EGF10, EGF11, EGF12, EGF13, EGF20, EGF21, EGF22, e EGF23 .....	68
Figura 7	Rede de haplótipos da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>Glomerella cingulata</i> , isolados de <i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i> , <i>Rollinia</i> sp., <i>Euterpe oleraceae</i> e <i>Strychnos</i> sp.. Nas figuras geométricas estão agrupados os haplótipos e a área de cada uma representa a frequência relativa de cada haplótipo. Os haplótipos são separados por passos mutacionais. Círculos minúsculos sem denominação representam haplótipos	

	mutantes hipotéticos não amostrados. A rede de haplótipos apresenta conexão entre os isolados dos vários hospedeiros .....	75
Figura 8	Perfil eletroforético dos quatro pares de iniciadores testados para a análise da variabilidade genética de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e <i>Glomerella cingulata</i> por meio da técnica molecular AFLP. Foram utilizados os iniciadores <i>EcoRI</i> + AT, + AG, + TA, + TC combinados com <i>MseI</i> + C .....	82
Figura 9	Variabilidade genética observada em 34 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> e seis <i>Glomerella cingulata</i> , isolados de <i>Paullinia cupana</i> , <i>Euterpe oleraceae</i> , <i>Rollinia</i> sp. e <i>Strychnos</i> sp. com marcadores moleculares AFLP gerados por cortes de restrição com as enzimas <i>EcoRI/MseI</i> . Dendrograma gerado no programa NTSYS, utilizando coeficiente Jaccard e algoritmo UPGMA. Isolados de <i>G. cingulata</i> : EGF8, EGF16, EGM20, PGM4, EEC4 e EEC5 .....	83

# **Caracterização molecular de fungos endofíticos e patogênicos *Colletotrichum* spp. isolados de guaranazeiro (*Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke)**

## **RESUMO**

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) tem potencial de uso em sistemas agroflorestais e vários produtos com valor agregado tornando-se atrativa economicamente, entretanto, sua expansão no Amazonas tem sido limitada pela antracnose, doença causada por *Colletotrichum guaranicola*. A variabilidade genética desse fungo, isolado de folíolos de guaranazeiro como patógeno e endófito, foi analisada com ferramenta molecular. Com o sequenciamento da região ITS do gene rDNA foram identificados *C. gloeosporioides* e *G. cingulata* como endófitos e patógenos; e exclusivamente como endófitos *C. boninense*, *C. fragariae* e *G. acutata*. O par de oligonucleotídeos CgInt/ITS4 foi eficiente na amplificação espécie específica para *C. gloeosporioides* e *G. cingulata*. Foram encontrados 28 haplótipos e o mais freqüente ficou distribuído entre as três subpopulações (Fazenda Experimental, Maués e UFAM). A estrutura genética observada com AMOVA demonstrou maior variabilidade genética dentro das populações do que entre elas, e o  $F_{ST}$  foi de 0,0923 destacando que houve pouca influência da origem geográfica sobre o genótipo dos isolados. Por AFLP, com quatro oligonucleotídeos, não houve separação entre endófitos e patógenos, bem como correlação com a origem geográfica e hospedeiros. O índice de similaridade com o coeficiente Jaccard foi de 34%. Pela identificação taxonômica molecular realizada

sugerimos que o agente etiológico da antracnose em guaranazeiro seja reconhecido como *C. gloeosporioides* e sua fase teleomorfa *G. cingulata*.

**Palavras-chave:** Antracnose. Guaraná. Variabilidade genética.

**Molecular characterization of endophytic and pathogenic fungus *Colletotrichum* spp. isolated from guaranazeiro (*Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke)**

**ABSTRACT**

The guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) has potential of use in agroforestry systems and diverse products with aggregated value becoming attractive economically; however, its expansion in Amazonas State has been limited by anthracnose, a disease caused by *Colletotrichum guaranicola*. The genetic variability of this fungus, isolated from guaranazeiro' leaves as endophytic and pathogenic, was analyzed using molecular tools. After sequencing the ITS region of the rDNA gene, *C. gloeosporioides* and *G. cingulata* were identified as endophytic and pathogenic; and exclusively as endophytic, *C. boninense*, *C. fragariae* and *G. acutata*. The oligonucleotide pair CgInt/ITS4 was efficient in the species specific amplification for *C. gloeosporioides* and *G. cingulata*. A total of 28 haplotypes were found and the most frequent one was distributed between the three subpopulations (Fazenda Experimental, Maués and UFAM). The genetic structure observed with AMOVA showed greater intra than interpopulation genetic variability, and  $F_{ST}$  was 0.0923, indicating little geographic origin influence on the isolated genotypes. In accord with AFLP, with four oligonucleotides, there was not separation between endophytic and pathogenic isolates, as well as correlation with geographic origin and hosts. The index of similarity with the Jaccard coefficient was 34%. Based on the molecular taxonomy identification carried out we suggest the recognition of *C. gloeosporioides* and its teleomorph phase as the etiologic agent of anthracnose in guaranazeiro.

**Keywords:** Anthracnose. Guarana. Genetic variability.

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS .....	3
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3.1 Microrganismos endofíticos .....	4
3.1.1 Considerações gerais .....	4
3.1.2 Ocorrência de endófitos .....	5
3.1.3 Relações com os hospedeiros .....	6
3.1.4 Fungos endofíticos e patógenos latentes .....	9
3.2 Características do gênero <i>Colletotrichum</i> .....	10
3.2.1 Estudos morfo-fisiológicos em <i>Colletotrichum</i> <i>guaranicola</i> .....	11
3.3 O hospedeiro <i>Paullinia cupana</i> H.B.K. var. <i>sorbilis</i> .....	13
3.3.1 Antracnose do guaranazeiro .....	15
3.4 Ferramentas para estudos moleculares .....	15
3.4.1 A técnica de PCR na identificação molecular .....	16
3.4.2 Marcadores moleculares AFLP .....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	21
4.1 Material biológico e local de coleta .....	21
4.1.1 Amostragem .....	22
4.2 Meio de cultura .....	22
4.3 Soluções e Tampões .....	22
4.3.1 Soluções para extração do DNA genômico .....	22
4.3.1.1 Solução de RNase A .....	22
4.3.1.2 Tampão de extração para DNA .....	22
4.3.1.3 Solução Clorofil .....	23
4.3.1.4 Solução Clorofane .....	23
4.3.1.5 Solução estoque Tris-HCl 1M pH 8,0 .....	23
4.3.1.6 Solução EDTA 0,5M pH 8,0 .....	23
4.3.1.7 Solução NaCl 5M .....	23
4.3.1.8 Solução SDS 10% .....	24



4.3.1.9 Solução de brometo de etídeo .....	24
4.3.1.10 Tampão de corrida TAE 50X .....	24
4.3.1.11 Tampão Tris-EDTA (TE) .....	24
4.3.2 Soluções para Reação de PCR .....	25
4.3.2.1 Solução de MgCl <sub>2</sub> 7,5 mM .....	25
4.3.2.2 Deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs) .....	25
4.3.2.3 Tampão para Reação de PCR .....	25
4.3.2.4 Oligonucleotídeos iniciadores .....	25
4.3.2.5 Enzima Taq DNA-polimerase .....	26
4.3.2.6 Tampão Tris-EDTA-Borato (TEB 10X) .....	26
4.3.2.7 Tampão de amostra (5X) .....	26
4.4 Isolamento de fungos endofíticos .....	26
4.5 Isolamento de fungos patogênicos .....	27
4.6 Identificação morfológica dos fungos isolados .....	27
4.6.1 Técnica de coloração – Lactofenol .....	28
4.7 Genotipagem com marcadores moleculares .....	28
4.7.1 Extração de DNA genômico .....	28
4.7.2 Quantificação do DNA .....	29
4.7.3 Amplificação de região do gene rDNA .....	29
4.7.3.1 Purificação do produto amplificado .....	30
4.7.3.2 Reação de sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 .....	31
4.7.3.3 Precipitação do produto da reação de sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 .....	31
4.7.3.4 Eletroforese de sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 .....	31
4.7.3.5 Edição e alinhamento das seqüências ITS1-5,8S-ITS2 .....	32
4.7.3.6 Análise dos haplótipos .....	32
4.7.3.7 Análise da estrutura populacional .....	33
4.7.4 Marcador molecular AFLP .....	33
4.7.4.1 Gel de poliácridamida 6% em eletroforese vertical .....	35
4.7.4.2 Revelação com coloração em nitrato de prata .....	36
4.7.4.3 Análise de similaridade genética por meio de AFLP .....	37
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>

5.1 Isolamento e identificação morfológica de <i>Colletotrichum</i> .....	39
5.2 Amplificação da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA .....	42
5.2.1 Sequenciamento das regiões do gene rDNA amplificadas .....	43
5.2.2 Identificação taxonômica molecular .....	44
5.2.3 Amplificação do rDNA com oligonucleotídeo espécie específico ....	50
5.3 Análise de haplótipos .....	51
5.4 Variabilidade genética .....	60
6 CONCLUSÃO .....	67
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69
ANEXOS .....	86

## 1 INTRODUÇÃO

Falar da Amazônia é quase sempre associá-la à biodiversidade, floresta e bacia hidrográfica, com seus povos que mesclam, harmonicamente, o viver na Amazônia e o viver dela. Nesse contexto, ciência e tecnologia, se constituem em alternativas capazes de melhorar a qualidade de vida desses povos.

Visando destacar a importância de culturas regionais como fonte de riquezas para a região, entre as várias espécies de plantas que possuem valor econômico nessa floresta tropical foi selecionada *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, tendo como nome vulgar guaranazeiro. Essa espécie ocorre naturalmente na região Sudeste do Estado do Amazonas, principalmente no município de Maués, e, posteriormente foi introduzida em Manaus. O único produtor de guaraná em escala comercial, no mundo, é o Brasil, excetuando-se pequenas áreas plantadas na Amazônia venezuelana e peruana.

Muitas doenças de etiologia fúngica afetam à cultura. Um dos principais fatores responsáveis pela redução da produção e da expansão da guaranicultura no Estado é a incidência da antracnose, doença causada pelo fungo *Colletotrichum guaranicola* Albuq. (ALBUQUERQUE, 1961), que é considerada a doença mais importante da cultura.

Fungos do gênero *Colletotrichum* podem ser isolados de folhas aparentemente saudáveis como de folhas apresentando lesões típicas da antracnose, em qualquer fase de desenvolvimento da planta, possibilitando duas suposições especulativas: 1) Que existe uma só variedade de *C. guaranicola*, capaz de colonizar os tecidos internos de *P. cupana* var. *sorbilis* e permanecer na condição aparentemente não-agressiva ou, de forma alternativa, atuar como agente etiológico da antracnose; 2) Que existem duas variedades de *C. guaranicola*, uma capaz de colonizar os tecidos internos de *P. cupana* var. *sorbilis* e permanecer na condição aparentemente não-agressiva e outra que atua como agente causador da antracnose, fazendo a colonização dos tecidos internos da planta já como parte do processo agressivo.

No presente trabalho pretendeu-se identificar os isolados obtidos por meio da técnica molecular PCR (Polymerase Chain Reaction ou reação em cadeia da polimerase) pela amplificação de parte do gene ribossomal nuclear e investigar a

possibilidade de se obter marcadores moleculares do tipo AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) que permitam esclarecer a existência ou não das linhagens agressiva e não-agressiva de *C. guaranicola* em relação ao hospedeiro *P. cupana* var. *sorbilis*. Assim, serão fornecidos subsídios para estratégias de melhoramento voltadas à obtenção de genótipos superiores e resistentes à antracnose. Para tanto, foi necessário isolar, caracterizar a nível molecular e comparar genótipos de endófitos com genótipos de patógenos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar molecularmente fungos endófitos e patógenos de *Colletotrichum* associados à cultura do guaranazeiro.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar em nível de espécie os isolados de *Colletotrichum* por meio da técnica de PCR pela amplificação das regiões ITS1-5,8S-ITS2 do gene DNA ribossomal;

Observar se há correlação genética e/ou geográfica entre os isolados utilizando-se a região amplificada do rDNA;

Relacionar haplótipos gerados por polimorfismos na região ITS1-5,8S-ITS2 com distribuição geográfica e patogenicidade dos isolados;

Avaliar a variabilidade genética entre os isolados de *Colletotrichum* com a técnica AFLP;

Investigar a existência de correlações entre comportamentos patogênicos, origem geográfica, graus de divergência genética e perfis eletroforéticos dos isolados de *Colletotrichum*.

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS**

##### **3.1.1 Considerações gerais**

A primeira referência aos fungos endofíticos foi realizada por De Bary (1866) citado por Petrini (1986), que considerou microrganismos endofíticos aqueles que vivem no interior dos tecidos das plantas e epifíticos, aqueles que vivem sobre a superfície do seu hospedeiro.

O termo endofítico tem sido usado de modo indiscriminado e tem causado muita confusão. 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 (PETRINI, 1991; PEREIRA, 1993; BACON e WHITE Jr, 2000; TAN e ZOU, 2001). Azevedo e Araújo (2006) consideraram aqueles cultiváveis ou não e excluíram desse grupo, bactérias noduladoras e fungos micorrízicos.

Segundo Sinclair (1991), muitos fitopatógenos latentes são isolados do interior de tecidos vegetais evidenciando a dificuldade em se distinguir estes de endófitos verdadeiros. Não existe uma exata distinção entre as categorias de microrganismos epifíticos, endofíticos e patogênicos é o que consideraram Azevedo et al. (2002); havendo sim, um gradiente com interfaces entre eles. De acordo com os autores, 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 afetar seu hospedeiro e pode ser considerado um endófito. Strobel et al., (2004) consideraram que a diferenciação entre os termos epifítico, endofítico e fitopatógeno depende do nicho ocupado em determinado estágio da interação microrganismo/hospedeiro.

O conhecimento da comunidade de endófitos de cada hospedeiro, bem como o de suas interações, implica em seus isolamentos e caracterizações. É comum o isolamento de dezenas a centenas de microrganismos de um único vegetal e a partir deste, pelo menos uma espécie pode mostrar-se específica, ressaltando e confirmando que os endófitos são um componente importante da diversidade microbiana (TAN e ZOU, 2001; STROBEL e DAISY, 2003).

Há ocorrência desses microrganismos nos mais diversos vegetais (CERKAUSKAS, 1988; PEREIRA, 1993; COSTA NETO, 2002; TALHINHAS et al., 2005; HIGGINS et al., 2007). Os microrganismos endofíticos podem ser estudados a partir do seu isolamento em meios de cultura e sob condições controladas, pela observação direta a partir de técnicas de microscopia ótica ou eletrônica, ou ainda pela detecção direta por técnica molecular de amplificação de DNA (SCHULZ e BOYLE, 2005).

### 3.1.2 Ocorrência de endófitos

Várias espécies de plantas já foram relatadas como hospedeiras assintomáticas de fungos, com destaque para gramíneas e coníferas de zonas temperadas. Poucos trabalhos foram realizados com hospedeiros tropicais.

Em cultivos agrícolas de interesse econômico foram encontrados endófitos em *Oryza sativa* (FISHER e PETRINI, 1992), *Musa* sp. (PEREIRA, 1993), citrus (GLIENKE, 1995), *Paullinia cupana* (GUIMARÃES, 1998), *Theobroma grandiflorum* (MEDEIROS-GALVÃO, 1998), *Bactris gasipaes* (COSTA NETO, 2002), *Zea mays* (SEGHERS et al., 2004) e cana-de-açúcar (MENDES et al., 2007). Os endófitos também foram encontrados em plantas herbáceas (TAECHOWISAN et al., 2003), espécies de florestas tropicais (STROBEL, 2002), plantas medicinais (HUANG et al., 2001) e aquáticas (CHEN et al., 2003).

A transmissão dos endófitos pode ocorrer de forma vertical quando penetram pelas sementes ou pela zona radicular, horizontalmente por penetração em estômatos ou diretamente pela parede celular utilizando-se de apressórios e haustórios (SAIKKONEN et al., 2004). Arnold e Herre (2003) observaram que a transmissão de endófitos em cacauero (*T. cacao*) é do tipo horizontal. E tal fato pode estar relacionado com a disponibilidade de propágulos no ar ao longo do ciclo de vida da planta.

A ocorrência de endófitos no vegetal varia espacialmente, há diferença e especificidade na comunidade entre os tecidos do hospedeiro: raiz, caule, folha, flor e fruto (TEJESVI et al., 2005; GOND et al., 2007). Além disso, a comunidade de endófitos depende também da interação com microrganismos epifíticos e patogênicos (SANTAMARIA e BAYMAN, 2005; OSONO, 2007); da influência do ambiente (PIMENTEL et al., 2006; UNTERSEHER et al., 2007); e idade do hospedeiro (PHOTITA et al., 2001; VUJANOVIC e BRISSON, 2002). As espécies que

frequentemente têm sido isoladas pertencem ao filo Ascomycota, incluindo os anamorfos (Hifomicetos e Coelomicetos) e em menor frequência, Basidiomicota e Zigomicota (SCHULZ e BOYLE, 2005).

*Colletotrichum* é um gênero que frequentemente tem sido isolado como endófito em vários hospedeiros. Araújo et al. (2001) isolaram *Colletotrichum gloeosporioides* de folhas e porta-enxertos de *Citrus*; Bussaban et al. (2001) identificaram *C. gloeosporioides* e *Glomerella* spp. como endófitos de folhas, pseudocaulis e rizomas de gengibre (*Amomum siamense* Criab.), coletados em dois locais na Tailândia; Camatti-Sartori et al. (2005) investigando endófitos de folhas, flores e frutos de macieiras (*Malus domestica*) no Sul do Brasil, em três sistemas de cultivo diferentes: convencional, integrado e orgânico, observaram que *Colletotrichum* estava entre os gêneros mais frequentes.

### 3.1.3 Relações com os hospedeiros

A relação existente entre microrganismos endofíticos e seus hospedeiros ainda não foi completamente elucidada. Podemos inferir duas hipóteses principais, a primeira diz respeito ao equilíbrio antagônico e a segunda à simbiose mutualística (FAETH, 2002; RUDGERS et al., 2004; SAIKKONEN et al., 2004; SCHULZ e BOYLE, 2005; KOGEL et al., 2006).

Pode ocorrer flutuação sazonal na comunidade endofítica. Gao et al. (2005) observaram esse fato quando investigaram endófitos em *Heterosmilax japonica* Kunth, pois ocorreu maior abundância de populações endofíticas em amostras isoladas na primavera do que no verão. Outro fato é a localização dos endófitos no hospedeiro. O endófito *Stagonospora* sp. colonizou na primavera somente a raiz de *Phragmites australis*, enquanto no outono foi isolado de várias partes do hospedeiro (ERNEST et al., 2003).

Bactérias endofíticas promovem o crescimento vegetal, propiciam ao hospedeiro resistência ao estresse e alterações fisiológicas, e também conferem proteção contra herbivoria e patógenos (NETO et al., 2004).

Dois endófitos do gênero *Phomopsis* isolados de gravioleira (*Annona muricata* L.) e pinha (*A. squamosa* L.) promoveram eficientemente o crescimento vegetal, demonstrando ter potencial de uso na agricultura, pois foram capazes de aumentar a produção dessas culturas (SILVA et al., 2006). Essa capacidade tem sido atribuída a



mecanismos diretos tais como a fixação de nitrogênio, produção de fitohormônios e como indiretos, o antagonismo a fitopatógenos, que induz o aumento na taxa de germinação, crescimento das raízes e parte aérea, número de folhas e flores, área foliar e rendimento de culturas (SILVEIRA, 2001).

A ocorrência de endófitos e a frequência de infecção variam grandemente de acordo com a espécie hospedeira e a origem geográfica da mesma. White Jr et al. (1993) observaram que 30% das espécies da subfamília Pooideae abrigavam endófitos em níveis variados de infecção, sendo *Acremonium* sp. o isolado em maior frequência. Este fungo é um potente fitopatógeno em outras subfamílias de gramíneas. Este fato, segundo os autores, sugere uma relação coevolutiva entre a subfamília Pooideae, e o fungo *Acremonium* sp. Enquanto Penna (2000) isolou endófitos do interior de sementes de erva-mate, porém a maioria das plantas investigadas não possuía sementes infectadas por microrganismos endofíticos.

A frequência e composição de espécies das comunidades microbianas são dependentes das interações entre os fatores bióticos e abióticos inerentes aos seus habitats, uma vez que o habitat associado à planta é um ambiente dinâmico. Há variação espacial nas comunidades endofíticas em diferença e especificidade da microbiota entre os tecidos vegetais: raízes, caules, folhas, flores e frutos (NALINI et al., 2005; TEJESVI et al., 2005; GOND et al., 2007); dependem da interação com outros microrganismos como patógenos e epifíticos (SANTAMARÍA e BAYMAN, 2005; OSONO, 2007), além de estarem sujeitos às influências ambientais (PIMENTEL et al., 2006; UNTERSEHER et al., 2007) e idade do tecido vegetal colonizado (PHOTITA et al., 2001; VUJANOVIC e BRISSON, 2002). A colonização dos endófitos pode ser inter ou intracelular, localizada ou sistêmica (SCHULZ e BOYLE, 2005).

Produtos de interesse biotecnológico produzidos por endófitos, como antibióticos ou enzimas, destacam a importância desses microrganismos. Amilases, celulasas, proteases, lipases, quitinases e outras enzimas têm sido encontradas em fungos endofíticos (STROBEL e DAISY, 2003). Fármacos de interesse medicinal como o taxol, produzidos pelo endófito *Taxomyces andreanae* isolados de *Taxus brevifolia*, atualmente tem sido estudado com objetivo de produzir esse composto em escala industrial (YUAN et al., 2006).

Realizando busca por microrganismos produtores de taxol, vários outros endófitos também produzem essa droga: *Pestalotiopsis microspora* isolado de *T. wallachiana* (STROBEL et al., 1996), *P. guepinii* endófito de *Wollemia nobilis*

(STROBEL et al., 1997), *Seimatoantlerium tepuiense* endófito de *Maguireothammus speciosus* (STROBEL et al., 1999), *Periconia* sp. endófito de *Torreya grandifolia* (LI et al., 1998) e *Bartalimia robillardoides* endófito de *Aegle marmelos* (GANGADEVI e MUTHUMARY, 2007).

Arnold et al. (2003) demonstraram o antagonismo de fungos endofíticos do cacauzeiro contra *Phytophthora* sp.. Este trabalho foi relevante por ter postulado o papel que endófitos de plantas lenhosas desempenham na sua proteção contra fitopatógenos, diminuindo consideravelmente a incidência da doença em mudas previamente inoculadas com fungos endofíticos (CLAY, 2004).

A colonização assintomática por endófitos é consequência da interação antagonica balanceada entre o hospedeiro e o fungo. Uma vez que o endófito pode produzir exoenzimas necessárias à infecção ao hospedeiro, e este, pode produzir mecanismos de defesas para impedir a infecção. Neste caso, existe equilíbrio entre a virulência fúngica e a defesa da planta (SCHULZ e BOYLE, 2005). Entretanto, havendo desequilíbrio nessa harmonia, quer seja para diminuição na defesa da planta como no aumento da virulência do fungo, ocorre o desenvolvimento de doença (SCHULZ et al., 2002).

Os microrganismos endofíticos podem influenciar na produção ou inibição de metabólitos com função de defesa podendo conferir ao hospedeiro resistência ao ataque de insetos (AZEVEDO et al., 2000); função antimicrobiana, contra fitopatógenos (ARNOLD et al., 2003; MUCCIARELLI et al., 2002; BANDARA et al., 2006); aumento de tolerância a estresse e produção de fitohormônios (TUDZYNSKI e SHARON, 2002).

Os metabólitos produzidos por microrganismos endofíticos têm demonstrado capacidade de inibição de ampla variedade de agentes patogênicos incluindo fitopatógenos (STROBEL, 2003; STROBEL et al., 2004; GUNATILAKA, 2006) assim como fungos e bactérias (HARRISON et al., 1991; HORN et al., 1995; STROBEL et al., 1999; BRADY e CLARDY, 2000; LI et al., 2000; LU et al., 2000) e vírus (GUO et al., 2000). Por meio de indução de mutação em *Colletotrichum* sp. e *C. magna*, vários mutantes obtidos diferiram do tipo selvagem em apenas um gene, este fato sugere que a diferença entre patógeno e endófito pode ser pequena (FREEMAN e RODRIGUEZ, 1993).

O endófito *Colletotrichum* sp. isolado da planta medicinal *Artemisia annua*, que é utilizada na China como droga antimalárica, apresentou atividade antimicrobiana

frente a patógenos humanos e de plantas (LU et al., 2000). Zou et al. (2000) observaram essa mesma atividade para o endófito *C. gloeosporioides*, que produz ácido coletótrico, isolado de *A. mongolica*.

A diferença entre endófitos e patógenos varia conforme o hospedeiro. Arnold et al. (2003) isolaram *Colletotrichum* spp. em 88,9% das folhas de cacaueteiro e 33,3% de folhas de *Ouratea lucens*, entretanto não observaram esse gênero em *Heisteria concina*. E dos gêneros isolados, 65,5% estavam albergados em somente um hospedeiro.

Comunidades de fungos epifíticos e endofíticos associadas com folhas de café (*Coffea arabica*) foram investigadas em Porto Rico por SANTAMARÍA e BAYMAN (2005). *Pestalotia* e *Botryosphaeria* foram os gêneros mais freqüentes entre os epifíticos, enquanto para os endófitos foram *Colletotrichum*, *Xylaria* e *Guignardia*. Os mesmos autores observaram que fragmentos de folhas com *Colletotrichum* são menos prováveis de conter *Xylaria* e *Guignardia* do que aqueles sem *Colletotrichum*, isto sugere possível competição ou antagonismo entre os endófitos.

### **3.1.4 Fungos endofíticos e patógenos latentes**

A coexistência parasita/hospedeiro, com um mínimo de dano a este, caracteriza a infecção latente, considerada como certa tolerância ou resistência do hospedeiro aos patógenos. Estes encontram um ambiente interno impróprio para o seu crescimento e multiplicação, como resultado de um processo de coevolução planta/patógenos. Esta coevolução eliminaria a alta susceptibilidade individual das plantas, bem como a elevada virulência dos patógenos (SINCLAIR, 1991).

Espécies consideradas patogênicas têm sido isoladas freqüentemente como endófitas, tais como: *Didymella exitialis* (Morini) Muller e *Phacosphaeria nodorum* (Muller) Hedj., patógenos do trigo (PETRINI, 1986; SIEBER et al., 1988); *Thielaviopsis paradoxa*, patógeno de pupunheira (COSTA NETO, 2002); e *G. cingulata* e *C. fragariae*, patógenos de açaizeiro (MARQUES et al. (2007).

Segundo Rodriguez e Redman (1997), fungos endofíticos não induzem sintomas significativos de doenças, mas mantêm os mecanismos bioquímicos e genéticos necessários para a infecção e a colonização de plantas hospedeiras.

Um fungo que ocupa de forma assintomática o tecido da planta pode ser um patógeno fraco ou uma raça virulenta detectada durante a latência, ou possivelmente simplesmente um habitante de um nicho que espera uma oportunidade de propagar-se.

As predisposições dos parceiros (planta/fungo) e das circunstâncias ambientais influenciam o balanço entre o hospedeiro e endófito (SCHULZ e BOYLE, 2005).

Saikkonen et al. (1998) sugeriram que a origem de muitos endófitos pode recair em patógenos assintomáticos ou latentes, e o contrário também, endófitos que interagem mutualisticamente com seu hospedeiro podem tornar-se patógenos em algum momento de estresse do hospedeiro (SCHULZ e BOYLE, 2005; KOGEL et al., 2006).

Assim sendo, ao realizar isolamento de endófitos, patógenos latentes também podem estar sendo isolados. *Colletotrichum magna* é capaz de expressar diversos estilos de vida: é patogênico em variedades de cucurbitáceas, é saprofítico em material vegetal e endofítico em tomate (FREEMAN e RODRIGUEZ, 1993).

### **3.2 Características do gênero *Colletotrichum***

O gênero *Colletotrichum* pertence ao filo Ascomycota, ordem Phyllachorales (ALEXOPOULOS et al., 1996). *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spaud & Schrenk é a forma teleomórfica ou perfeita desse Ascomiceto; *C. gloeosporioides*, forma anamórfica ou imperfeita, foi escolhido para representar o estágio conidial (ARX, 1957). O gênero *Colletotrichum* engloba fungos mitosporicos pertencentes à ordem Melanconiales da classe Coelomycetes (SUTTON, 1980, 1992). Existem muitas outras espécies desse fungo, as quais, via de regra, recebem o nome do hospedeiro: *C. guaranicola*, *C. musae*, *C. graminicola*.

Segundo Gunnell e Gubler (1992) o gênero *Colletotrichum* é caracterizado por conídios cilíndricos com as extremidades arredondadas. Todas as espécies produzem células hialinas, cilíndricas, ou conídios encurvados dentro do acérvulo. Algumas vezes, o acérvulo possui setas, porém esta condição parece ser determinada, pelo menos em parte, pelo ambiente (HOLLIDAY, 1980; ALEXOPOULOS et al., 1996).

Smith et al. (1985), isolaram *Colletotrichum* que produzia massa conidial de coloração rosa a laranja. Conforme Alexopoulos et al. (1996), *C. graminicola* produz mucilagem destinada à proteção dos conídios ao dessecamento, bem como aos efeitos tóxicos de compostos polifenólicos liberados pelos hospedeiros.

Segundo Menezes (2002) algumas espécies de *Colletotrichum* são mais específicas em determinados hospedeiros, como exemplo, *C. lindemuthianum* em feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e *C. musae* em frutos de banana (*Musa paradisiaca* L.),

enquanto outras são polífagas, como exemplo, *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* que ocorrem em vários hospedeiros.

As principais características para *C. gloeosporioides*, segundo Sutton (1992) são: conídios retos e cilíndricos, formados geralmente em massas de coloração salmão, medindo de 12-17 x 3,5-6 µm e apressórios clavados, ovados, obovados ou lobados apresentando coloração castanha, medindo de 6-20 x 4-12 µm.

A identificação de espécies do gênero *Colletotrichum* é baseada, principalmente em características morfológicas e culturais (SUTTON, 1992; BEZERRA e MENEZES, 2007; TOZZE JÚNIOR e MASSOLA JÚNIOR, 2007). Entretanto, tais características fenotípicas sofrem a interferência do ambiente. Atualmente existem outros métodos mais precisos, como os marcadores moleculares (TALHINHAS et al., 2002; SHARMA et al., 2005; ANDRADE et al., 2007).

O cultivo dos isolados em meios artificiais visando à identificação em nível de espécie neste complexo grupo do *Colletotrichum* leva a resultados que limitam essas metodologias. Bueno et al. (2005) quando investigaram a variabilidade morfológica de conídios de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* isolados de pimentão, pimenta e jiló, observaram diferenças significativas nas dimensões e formato de conídios produzidos por um mesmo isolado em função das condições de cultivo, tais como, substrato, temperatura e fonte de luz. Concluindo que essas duas espécies não podem ser distinguidas unicamente com base no tamanho e formato dos conídios.

De modo semelhante, Tozze Júnior et al. (2006) avaliando isolados de *Colletotrichum* obtidos de solanáceas, observaram a presença de até três tipos de apressórios (circular, ovalado e lobado) a partir de um único conídio. Segundo Katan (2000) critérios morfológicos e culturais são, e provavelmente continuarão sendo a primeira etapa para a separação de espécies ou grupos de espécies.

O estudo sobre a patogenicidade específica a determinado hospedeiro ou grupo de hospedeiros, é constantemente utilizado em chaves de classificação na identificação de espécies de *Colletotrichum* (SUTTON, 1980; BAXTER et al., 1983). Entretanto, frequentemente a distinção entre espécies de *Colletotrichum* são baseadas em características morfológicas dos esporos e apressórios (SUTTON, 1992). Este mesmo autor afirmou que a taxonomia de *Colletotrichum* é confusa e quando mais informações detalhadas à cerca de determinado isolado fitopatogênico são necessárias, critérios morfológicos são de pouco interesse.

Cannon et al. (2000) consideraram que existem três grandes grupos de *Colletotrichum*, baseados nas espécies de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. orbiculare*, aos quais são agregadas as demais espécies. Espécies de *Colletotrichum* inicialmente eram identificadas com base no tipo de hospedeiro de onde eram isolados (SREENIVASAPRASAD et al., 1996a) e assim, diferentes nomes foram dados aos isolados morfológicamente iguais, obtidos de hospedeiros distintos, entretanto, este critério não revelou claramente as relações intra-específicas (JEFFRIES et al., 1999).

### **3.2.1 Estudos morfo-fisiológicos em *Colletotrichum guaranicola***

Albuquerque (1960) realizou testes de patogenicidade para identificar *C. guaranicola* como agente causal da antracnose em plantas de guaraná. Foi utilizado o meio de cultura BDA, no qual os acérvulos não apresentaram setas e não foram observadas estruturas da fase perfeita do fungo. Os conídios começaram a germinar uma hora após serem inoculados em ágar comum ou em água destilada, prolongando-se por 48 horas, quando atingiram 100% de germinação.

A germinação dos conídios também foi estudada por Duarte et al. (1995), que ocorreu após duas horas da semeadura em ágar-água e BDA. No ensaio com oito isolados, esses autores observaram variações no tamanho e na velocidade de germinação dos conídios, na velocidade de crescimento radial das colônias e em outros aspectos fenotípicos das mesmas.

Segundo Verás et al. (1997), os conídios de *C. guaranicola*, geralmente, são retos, hialinos, unicelulares, adquirindo um septo quando fisiologicamente maduros, já próximo à germinação, e ocorrem tanto na extremidade de hifas ou conidióforos, como acérvulos. Estes apresentam setas escuras, pontiagudas, com e sem septos. Em alguns casos, foram observadas anastomoses de hifas e também de conídios, explicando em parte a variabilidade fenotípica e genotípica do patógeno.

Lesões foliares causadas por *C. guaranicola* apresentam tonalidade escura nas folhas novas. Os formatos e as dimensões das manchas são variáveis. Os conídios apresentam-se como oblongos, hialinos e unicelulares medindo 12–20 x 4–6 µm (ALBUQUERQUE, 1961).

Duarte (1999) descreveu *C. guaranicola* como produtor de esporos em acérvulos subepidérmicos desprovidos de setas, medindo de 75 a 83 µm de diâmetro com plexo subcuticular, de onde surgiram conidióforos curtos, simples, hialinos, não

septados medindo 14–20 x 4–6 µm com extremidade afilada e com escara visível. Os conídios apresentaram forma irregular tendendo para cilíndrica, medindo 4–8 x 4–6 µm e germinaram duas horas após a semeadura em placas de ágar-água atingindo 100% de germinação após quatro a quatro horas e meia.

Isolados dessa espécie fúngica apresentam variação quanto a coloração e aspecto geral da colônia, variando conforme o substrato de cultivo utilizado e o genótipo do próprio isolado. Ocorre também variação na morfologia dos conídios, tanto em comprimento como largura, de um mesmo isolado, em função do substrato empregado (VERÁS et al., 1997).

Estudos sobre o patossistema *C. guaranicola* e guaranazeiro foram realizados por Bentes e Matsuoka (2002) e revelaram que o clone 626 expressou sua resistência em função do atraso na entrada do patógeno e colonização dos tecidos. Isto ocorreu pela baixa quantidade de formação de apressórios. A germinação dos conídios foi observada pela emissão de tubo germinativo que originou apressório globoso, de coloração marrom-escuro, e a partir deste houve a formação de uma estrutura chamada de cone apressorial com forma de funil, de onde foi emitida uma hifa de infecção. O clone suscetível apresentou sintomas da antracnose após cinco dias da inoculação do patógeno e o resistente somente após sete dias.

Uma reavaliação taxonômica de *C. guaranicola*, agente causal da antracnose em guaranazeiro foi realizada por Bentes e Barreto (2004). Os autores observaram colônia de coloração branca, com abundante produção de micélio e massa conidial de cor alaranjada, quando cultivado em meio BDA. Os conídios, no centro das colônias, apresentaram-se hialinos, cilíndrico, medindo 10,5–15,5 x 3–4,5 µm. O apressório era de cor escura (melanizado) e globoso, podendo ter algumas variações, com medidas de 4,5–8 x 5–8 µm. Foram observados acérvulos com setas quando em meio de cultura, mas não em acérvulos presentes no hospedeiro.

Segundo Bentes e Barreto (2004), isolados de *C. guaranicola* diferem de outras espécies de *Colletotrichum* apresentando conídios cilíndricos, atualmente aceitas, pelo tamanho do conídio e pelo tamanho e forma do apressório e sugeriram que fosse reconhecido como um táxon distinto dentro do gênero *Colletotrichum*, de acordo com Albuquerque (1961). Apesar de terem realizado teste de gama de hospedeiros com *C. guaranicola* e não observarem infecção, os autores propuseram investigação com maior número de hospedeiros, de preferência aquelas relacionadas com o guaranazeiro.

### 3.3 O hospedeiro *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis*

O gênero *Paullinia* é nativo das Américas, distribuindo-se desde o Sul dos Estados Unidos e México até a Argentina. A área de distribuição do guaranazeiro abrange a Venezuela, Colômbia, Peru, Norte da Bolívia, parte das Guianas, Amazonas, Acre, Pará, Bahia, São Paulo, Minas Gerais, Maranhão, Rondônia e norte do Mato Grosso. (PIRES, 1949; PANTOJA, 1960; LLERAS, 1984; NASCIMENTO FILHO e ATROCH, 2002). No Estado do Amazonas há destaque para os municípios de Iranduba, Parintins, Itacoatiara, Barreirinha, Boa Vista dos Ramos, Manacapuru, Maués, Urucará e Manaus (NASCIMENTO FILHO e ATROCH, 2002).

Existem duas subespécies de *P. cupana*, as quais foram definidas quando foram observadas divergências em determinados caracteres botânicos (DUCKE, 1937).

*Paullinia cupana* H.B.K. var. *cupana*, apresenta plantas novas com folíolos fortemente lobados e recortados. Plantas de qualquer idade desprovidas de gavinhas. Flores e frutos bem maiores que na outra variedade; os frutos podem apresentar o dobro ou o triplo do tamanho da outra subespécie, e são acentuadamente obovado-piriformes, de cor vermelha-escura, com pouco brilho. São encontradas nas bacias fluviais do Alto Orenoco e Alto Rio Negro (DUCKE, 1937).

*Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis*, apresenta plantas novas com folíolos fracamente lobados. Quando adultas são abundantemente providas de gavinhas, localizadas junto às inflorescências ou nas mesmas. Flores ligeiramente menores. Frutos com somente metade ou um terço do volume dos frutos da outra variedade, aproximadamente esféricos, de cor vermelha-viva, brilhante. Encontrada na região Sudeste do Estado do Amazonas, sobretudo em Maués e Parintins. É conhecida pelo nome vulgar de “guaraná” (DUCKE, 1937).

A variedade *cupana* propagou-se de suas origens e foi incorporada aos hábitos alimentares dos colonizadores e viajantes da região do alto Rio Negro venezuelano e colombiano, mas o seu consumo ficou restrito a esse “habitat” natural. Já a variedade *sorbilis*, foi amplamente aceita desde a chegada dos primeiros colonizadores e seu uso foi amplamente difundido a outras regiões, passando a ser utilizado como matéria prima para a produção de refrigerantes (DUCKE, 1946).

O guaranazeiro é uma planta perene arbustiva, lenhosa e trepadeira, da família Sapindaceae. Em cultivo, dá formação a moitas e em capoeira ou mata, cresce podendo atingir até 10 metros de altura tendo como suporte outras árvores. Possui inflorescência



em forma de cacho e mede cerca de 25 cm de comprimento. O fruto é uma cápsula deiscente variando de vermelhada a alaranjada, e quando maduro abre-se parcialmente, de forma que a semente castanho-escuro fica à mostra envolta parcialmente por uma película branca, o arilo (SOUZA et al., 1996).

A comercialização do guaraná pode ser em ramas (sementes torradas), bastão ou em pó. Possui utilização em agroindústria, que pode fabricar o xarope (concentrado) para consumo direto como bebida energética misturado com água ou para a produção industrial de bebidas refrigerantes gaseificadas. Frequentemente o pó é comercializado em frascos, cápsulas gelatinosas ou saches. Pesquisas confirmaram o guaraná como a maior fonte de cafeína natural e exerce ação estimulante sobre o sistema nervoso central. As sementes secas também são utilizadas em peças de artesanato com motivos indígenas, muito apreciadas por turistas nacionais e estrangeiros que visitam o Amazonas (SUFRAMA, 2003).

### **3.3.1 Antracnose do guaranazeiro**

A antracnose é uma doença foliar, cujo agente etiológico é o fungo *C. guaranicola*, de ocorrência nas folhas mais jovens, surgindo deformações e enrolamento da lâmina foliar. Em folhas adultas, há o crestamento das margens e, em casos mais severos, o secamento total é observado. Aparecem lesões necróticas nas folhas, de coloração marrom-avermelhada. Esse fato compromete o desenvolvimento e a produtividade das plantas, constituindo-se em fator altamente limitante à expansão da cultura do guaranazeiro.

Pode ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento das plantas, inclusive em mudas ainda no viveiro. A sua incidência aumenta no período de maior umidade, pois a mesma favorece a disseminação e germinação dos conídios. No Amazonas, esse período compreende os meses de fevereiro, março e abril, de chuvas abundantes. A incidência também ocorre em áreas de cultivo mecanizada, provavelmente pela eliminação de barreiras naturais à propagação dos conídios (ALBUQUERQUE, 1960; DUARTE et al., 1995).

Há evidências da transmissão por meio de sementes, embora com baixa frequência. Tal fato pode explicar a introdução do patógeno em áreas distantes como o Sul da Bahia. As medidas de controle indicadas envolvem práticas culturais, uso de fungicidas e matrizes resistentes (DUARTE, 1999).

### **3.4 Ferramentas para estudos moleculares**

As técnicas que utilizam marcadores de DNA são mais eficientes para a caracterização de isolados e suas populações, pois representam diretamente a variação genética, não estando sujeitas a influências do ambiente, nem sofrendo variações em função do estágio de desenvolvimento do organismo ou do tipo de tecido utilizado (PUTERKA et al., 1993).

Marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo oriundo de um gene expresso ou de um fragmento específico de DNA (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Atualmente diversos marcadores moleculares têm sido identificados por técnicas que permitem uma ampla caracterização do polimorfismo genético existente em diferentes organismos.

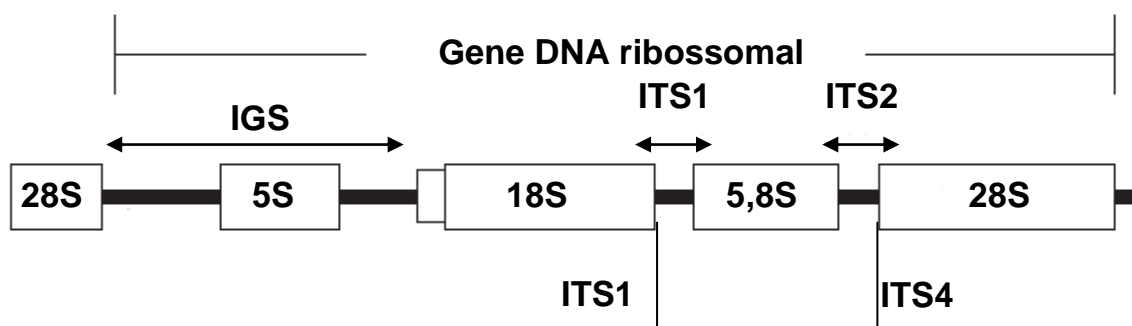
O advento de técnicas baseadas em PCR apresentou uma nova opção de uso dos marcadores moleculares. A técnica de PCR foi desenvolvida em meados da década de 80 (MULLIS e FALOONA, 1987) e alcançou uso disseminado e extenso em vários campos da biologia (WHITE et al., 1989).

Técnicas que utilizam ferramentas moleculares têm sido muito utilizadas e propiciaram grandes avanços na taxonomia e na caracterização de fungos. Os marcadores moleculares são úteis na avaliação de níveis de diversidade genética e relações filogenéticas intra e interespecíficas e também para caracterizar linhagens (MARTIN e FIGUERES, 1999).

Diferentes técnicas de genotipagem têm sido utilizadas para resolver problemas taxonômicos nos últimos anos tais como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism ou polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos por corte da fita dupla de DNA), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA ou DNA polimórfico amplificado ao acaso), e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism ou polimorfismo por comprimento de fragmento amplificado) (LOUWS et al., 1999; SOLL, 2000). Estas técnicas levam em consideração as informações distribuídas em todo o genoma de um organismo e geralmente permitem discriminá-los em nível de espécies e raças.

#### **3.4.1 A técnica de PCR na identificação molecular**

Os genes do dna que codificam o rna ribossômico apresentam-se em grupo. Estes são constituídos pelos genes 18S, 5,8S e 28S, e estes, internamente são separados por duas regiões denominadas ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao rna ribossômico maduro. Esse grupo gênico aparece repetido centenas de vezes no genoma fúngico, separados por espaços intergênicos não transcritos (IGS). Esses grupos apresentam algumas regiões altamente conservadas e outras variáveis, tal fato tem permitido a análise de variação de diferentes níveis taxonômicos (HIBBET, 1992; GANLEY e SCOTT, 2002; ZAHA et al., 2003) (Figura 01).



**Figura 01.** Grupo de genes do dna ribossomal, compreendendo os três principais (18s, 5,8s e 28s), a região espaçadora intergênica (igs), e as regiões espaçadoras internas (its). A região igs compreende o gene 5s. As regiões its são mais variáveis enquanto as principais são conservadas. Its1 e its4 localização de anelamento dos oligonucleotídeos para amplificação de parte do gene rdna. (adaptado de mitchell e zuccaro, 2006)

A região 18S apresenta-se como a mais conservada e é indicada para comparação de organismos distantemente relacionados e a região 28S é a mais variável e por isso, é apropriada quando se deseja comparar diferentes gêneros ou, em alguns casos, diferentes espécies (WHITE et al., 1990).

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 de *Livistona chinensis*. Análises filogenéticas com máxima parcimônia, teste de *bootstrap* e consulta ao GenBank e EMBL a partir dessas seqüências, indicaram que seis seqüências clonadas pertenciam a origens diferentes. Cinco seqüências (P1-9, P2-6, P4-4, P4-5 e P4-7) eram de fungos e a outra, P3-2, pertencia a plantas.

Sequências de DNA que frequentemente apresentam polimorfismo entre espécies fúngicas, tais como as da região ITS do rDNA, são candidatas para a detecção de uma espécie e exclusão das demais. Por exemplo, vários oligonucleotídeos foram desenvolvidos como espécie-específico, baseados em sequências de nucleotídeos da região ITS1 do rDNA, e têm sido utilizados pela técnica de PCR objetivando a identificação de espécies de *Colletotrichum*.

Variação no DNA ribossomal de *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *C. fuscum* e *C. fragariae*, isolados de diferentes regiões e hospedeiros, foi observada por Munaut et al. (2002). Foram analisadas as regiões ITS1 e ITS2 e observado que bandas polimórficas entre as linhagens as separaram em cinco grupos, mostrando a distância entre as espécies.

Os pares de oligonucleotídeos CaInt2/ITS4 e CgInt/ITS4 foram desenvolvidos para *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, respectivamente (MILLS et al., 1992; SREENIVASAPRASAD et al., 1996b). Este conjunto de oligonucleotídeos já foi utilizado em pesquisas envolvendo a identificação de isolados de *Colletotrichum* de vários hospedeiros: citros, mamão, pêssego, maracujá, amêndoa, abacate, manga, goiaba, morango e solanáceas (BROWN et al., 1996; PERES et al., 2002; ADASKAVEG e HARTIN, 1997; AFANADOR-KAFURI et al., 2003; TOZZE JÚNIOR et al., 2004; BUENO, 2005; ANDRADE et al., 2007). Existem outros pares de oligonucleotídeos específicos tais como Cc1NF1/Cc2NR1 para *C. coccodes* (CULLEN et al., 2002) e CcInt/ITS4 para *C. capsici* (AVRDC, 2003).

### **3.4.2 Marcadores moleculares AFLP**

A análise de AFLP representa a tecnologia mais recente para a obtenção de um grande número de marcadores moleculares distribuídos em genomas de procariotos e eucariotos. Segundo Vos et al. (1995) esta técnica é famosa pela robustez, reprodutibilidade, e elevado poder discriminatório.

O ensaio AFLP combina a especificidade, a resolução e o poder de amostragem da digestão por enzimas de restrição com a velocidade e a praticidade de detecção de polimorfismo via PCR. Desde o seu desenvolvimento e divulgação (ZABEAU, 1993), esta técnica tem sido utilizada de forma crescente para finalidades de “fingerprinting”, mapeamento genético localizado (bulk segregant analysis) e construção de mapas genéticos, principalmente em espécies de plantas cultivadas que

apresentaram uma baixa taxa de polimorfismo de DNA (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), a análise AFLP consiste essencialmente de quatro etapas. Na primeira etapa, o DNA genômico total do indivíduo é clivado com duas enzimas de restrição, combinando uma enzima de corte raro com outra de corte freqüente. Na segunda etapa, adaptadores específicos são ligados aos terminais dos fragmentos genômicos gerados pela clivagem. Na terceira etapa, uma fração dos fragmentos gerados é amplificada seletivamente, via PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos desenhados para reconhecer seqüências nos adaptadores. Na quarta e última etapa, a subpopulação de fragmentos amplificados é separada em gel de alta resolução.

Polimorfismos entre fragmentos AFLP resultam de mutações de ponto, inversões, deleções e inserções, que levam a perda ou ganho de um sítio de restrição reconhecido pelas enzimas utilizadas, ou a alteração da seqüência reconhecida pelos nucleotídeos arbitrários nos terminais 3' dos oligonucleotídeos que dirigem a PCR a partir dos adaptadores. O conceito de “dominância” dos marcadores RAPD aplica-se igualmente aos marcadores AFLP. Estes não permitem a detecção de heterozigotos, ou seja, não é possível distinguir se uma banda no gel é o resultado da amplificação de um ou dois alelos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

A principal vantagem da técnica AFLP, segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), é o grande número de fragmentos gerados e resolvidos em um único gel. O índice de “multiplex” do ensaio AFLP, ou seja, o número de marcadores simultaneamente analisados em um único gel é o mais alto entre as tecnologias de marcadores hoje disponíveis. O'Neill et al. (1997) destacaram a rapidez da técnica, custo razoável, poder de reprodutibilidade, alta freqüência de polimorfismos, e uso de pequena quantidade de DNA.

Outra vantagem da tecnologia AFLP é o grande poder de detecção de variabilidade genética. Ela explora simultaneamente o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição, tal como no ensaio RFLP, e a ocorrência ou não de amplificação a partir de seqüências arbitrárias, tal como no ensaio RAPD. Consegue-se, assim, uma flexibilidade significativa na obtenção de marcadores polimórficos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Há maior robustez no ensaio com AFLP quando comparado com o ensaio com RAPD. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998) isso se deve basicamente ao fato de que

oligonucleotídeos bem mais longos são utilizados na etapa de PCR, o que aumenta significativamente a especificidade da amplificação, evitando a competição que ocorre durante a PCR no ensaio RAPD. A técnica AFLP reúne, portanto, a vantagem da PCR específica com a vantagem de técnica RAPD em se explorar seqüências arbitrárias.

A principal limitação dos marcadores AFLP é o baixo conteúdo de informação genética por “locus”, pois apenas um alelo é detectado (amplificação do fragmento). As demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como um alelo nulo. Marcadores AFLP são, portanto, “dominantes”, e têm natureza binária. Genótipos heterozigotos não podem ser diretamente discriminados dos homozigotos. Outro fator específico dessa técnica é a necessidade de DNA genômico altamente puro (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; CAIXETA et al., 2006). A eletroforese é realizada em géis de poliacrilamida nas dimensões utilizadas para sequenciamento e sua revelação é com nitrato de prata (CAIXETA et al., 2006).

MAJER et al. (1996) foram os primeiros a utilizarem marcadores AFLP em taxonomia de fungos, estudando variações genéticas em espécies de *Cladosporium fulvum* e *Pyrenopeziza brassicae*, patógenos de plantas. Logo depois, outros fungos fitopatogênicos, especialmente os do gênero *Fusarium*, foram analisados por AFLP (LEISSNER et al., 1997).

Uma análise taxonômica foi realizada com AFLP por Schmidt et al. (2004) para solucionar problemas com três espécies de *Fusarium*. Os isolados analisados formaram grupos distintos, indicando claramente serem espécies distintas, *F. langsethiae*, *F. poae* e *F. sporotrichioides*.

Segundo O'Neill et al. (1997), “fingerprinting” com AFLP facilita a identificação de genes específicos ou de polimorfismos associados com a especificidade com o hospedeiro, especificidade da raça, virulência, e avirulência. Os mesmos autores utilizaram com sucesso a técnica para confirmar a classificação taxonômica de dois isolados patogênicos de *Colletotrichum*. Esta técnica é atrativa para investigação da diversidade genética entre isolados e espécies de complexos gêneros de fungos como o *Colletotrichum*.

O uso de uma única base seletiva com *EcoRI* combinada com *MseI* + 3 foi suficiente para gerar bastante bandas, em análise de AFLP com *C. acutatum*. Nesse estudo realizado por James et al. (2003) nove combinações de oligonucleotídeos geraram polimorfismo suficiente para distinguir cada um dos 26 isolados investigados.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO E LOCAL DE COLETA

Para o isolamento dos microrganismos endofíticos foram utilizadas folhas de guaranazeiro, aparentemente sadias. As folhas foram coletadas em guaranazais na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas/UFAM, Rodovia BR-174, Km 39, Manaus/AM e na EMBRAPA/Amazônia Ocidental, em sua unidade no município de Maués/AM.

Isolados fitopatogênicos foram obtidos somente da EMBRAPA/Amazônia Ocidental, no município de Maués/AM. Isolados endófitos e fitopatógenos de outras culturas foram obtidos de *Rollinia* sp., *Strychnos* sp., cebolinha-verde (*Allium fistulosum* L.) e couve (*Brassica oleracea* L.), todos próximos à área do Campus Universitário da UFAM, gentilmente cedidos por pesquisadores do Laboratório de Produtos Bioativos de Origem Microbiana/LPBOM e Laboratório de Microbiologia, ambos da Faculdade de Ciências Agrárias/FCA da UFAM; e dois isolados URM4903 e URM4905 de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) variedades precoce e Embrapa C.P. 09, respectivamente, obtidos junto à Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco (Tabela 01).

**Tabela 01.** Quantidade de isolados, hospedeiros, fragmento de isolamento, patogenicidade e procedência de *Colletotrichum* spp. analisados

Nº de isolados	Hospedeiro	Fragmento	Patogenicidade	Procedência
24	Guaranazeiro	Folha	Endofítico	Fazenda Experimental Manaus/AM
31	Guaranazeiro	Folha	Endofítico	EMBRAPA Maués/AM
7	Guaranazeiro	Folha	Patogênico	EMBRAPA Maués/AM
7	Açaizeiro	Fruto	Endofítico	Campus Universitário Manaus/AM
8	<i>Rollinia</i> sp.	Folha	Endofítico	Campus Universitário Manaus/AM
2	<i>Strychnos</i> sp.	Folha	Endofítico	Campus Universitário Manaus/AM

1	Cebolinha-verde	Folha	Patogênico	Manaus/AM
1	Couve	Folha	Patogênico	Manaus/AM
2	Cajueiro	Folha	Patogênico	Recife/PE

#### 4.1.1 Amostragem

Foram realizadas coletas nas duas localidades. Para o isolamento foi utilizado um folíolo de cada planta. E desta, cinco fragmentos foram inoculados em meio de cultura. Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Genética de Microrganismos/LAGEM do Instituto de Ciências Biológicas/ICB da UFAM.

#### 4.2 MEIO DE CULTURA

Foi utilizado o meio de cultura BDA (200 g de batata, 15 g de dextrose e 15 g de ágar – pH 6,8).

#### 4.3 SOLUÇÕES E TAMPÕES

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

##### 4.3.1 Soluções para extração do DNA genômico

###### 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 para DNA (RAEDER e BRODA, 1985)

Tris-HCl 1M pH 8,0 .....	2 mL
EDTA 0,5M pH 8,0 .....	0,5 mL
SDS 10% .....	1 mL
NaCl 5M .....	0,5 mL
H <sub>2</sub> O destilada .....	6 mL

O tampão de extração foi preparado no momento do uso.

#### 4.3.1.3 Solução Clorofil

Clorofórmio .....	240 mL
Álcool isoamílico .....	10 mL

A solução foi mantida a temperatura ambiente.

#### 4.3.1.4 Solução Clorofane

Clorofil .....	50 mL
Fenol .....	50 mL

A solução foi mantida a temperatura ambiente.

#### 4.3.1.5 Solução estoque Tris-HCl 1M pH 8,0

Trizma-Base .....	121 g
H <sub>2</sub> O destilada .....	1000 mL

O pH foi ajustado para 8 com HCl. A solução foi autoclavada e mantida a 4 °C.

#### 4.3.1.6 Solução EDTA 0,5M pH 8,0

EDTA .....	37,22 g
------------	---------

H<sub>2</sub>O destilada ..... 100 mL

O pH foi ajustado para 8 com NaOH. A solução foi autoclavada e mantida a 4 °C.

#### 4.3.1.7 Solução NaCl 5M

NaCl ..... 29,16 g

H<sub>2</sub>O destilada ..... 100 mL

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

#### 4.3.1.8 Solução SDS 10%

SDS ..... 10 g

H<sub>2</sub>O destilada ..... 100 mL

A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

#### 4.3.1.9 Solução de brometo de etídeo (SAMBROOK et al., 1989)

Brometo de etídeo ..... 0,01 g

H<sub>2</sub>O destilada ..... 10 mL

A solução foi agitada por cinco horas e estocada a temperatura ambiente. No momento do uso, 5 µL desta solução foram diluídos em 100 mL de TAE 1X.

#### 4.3.1.10 Tampão de corrida TAE 50X

Trizma-Base ..... 242 g

Ácido Acético Glacial ..... 57,1 mL

EDTA 0,5M pH 8,0 ..... 100 mL

H<sub>2</sub>O destilada ..... 1000 mL

A solução foi autoclavada e mantida a temperatura ambiente. No momento do uso foram realizadas as diluições necessárias.

#### 4.3.1.11 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 MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM

MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>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 8,0)) estava na concentração 10X. Para uso na reação a concentração final foi de 1X.

#### 4.3.2.4 Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos liofilizados foram adquiridos da Invitrogen Brasil - Life Technologies. 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 2,5  $\mu\text{M}/\mu\text{L}$  com água Milli-Q.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação das regiões ITS1 e ITS2 e gene 5,8S do rDNA foram (WHITE et al., 1990):

**ITS1** 5' – TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3' (iniciador anverso)

e

**ITS4** 5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3' (iniciador reverso).

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação específica de região do rDNA de *C. gloeosporioides* foram (MILLS et al., 1992):

**CgInt** 5' – GGC CTC CCG CCT CCG GGC GG - 3' (iniciador anverso) e

**ITS4** 5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3' (iniciador reverso)

#### 4.3.2.5 Enzima Taq DNA-polimerase

A enzima Taq DNA polimerase utilizada foi da Invitrogen Life Technologies, USA contendo 5 U/ $\mu\text{L}$ . A enzima foi mantida a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

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

Tris-base .....	108,0 g
Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) .....	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 de amostra (5X)

Azul de bromofenol .....	0,05 g
Glicerol .....	20 mL
H <sub>2</sub> O destilada .....	100 mL

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

#### 4.4 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

Foram isolados fungos endofíticos de folíolos de plantas de guaranazeiro, aparentemente sadias, de acordo com a metodologia descrita por Petrini (1986) e Pereira et al. (1993). As folhas foram lavadas em água corrente com detergente e posterior desinfestação superficial por meio de imersão em etanol 70% por um minuto, imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) 3% por três minutos, posterior lavagem com etanol 70% por 30 segundos e por mais três minutos em água destilada estéril.

Após a desinfestação externa, os folíolos foram cortados assepticamente e cinco fragmentos de 5-7 mm de cada folíolo, em ordem seriada, foram dispostos em placas de Petri contendo o meio de cultivo BDA, acrescido de cloranfenicol (50 µg/mL). Todas as placas foram incubadas a 18 °C (GUIMARÃES, 1998), em ausência de luz. Foram plaqueados 100 µL da água destilada estéril, em meio BDA e incubado nas mesmas condições 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, localidade geográfica e localização do fragmento disposto na placa. Os tubos com meio BDA inclinado, foram incubados a temperatura ambiente. O processo de repicagem dos endófitos foi interrompido por ocasião da fusão de colônias fúngicas impedindo o isolamento individual.

#### 4.5 ISOLAMENTO DE FUNGOS PATOGÊNICOS

Foram utilizados folíolos de guaranazeiro com sintomas de antracnose. Os folíolos foram lavados em água corrente e desinfestados em etanol 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio (NaOCl) 2% por um minuto e lavados por três vezes consecutivas em água Milli-Q autoclavada por um minuto cada vez. Cada placa de Petri utilizada foi inoculada com um folíolo distinto, sendo 20 fragmentos dispostos em meio BDA e incubados a 18 °C por até 15 dias ou crescimento confluyente das colônias.

#### 4.6 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS ISOLADOS

A identificação dos isolados, em nível de gênero, foi realizada pela análise de suas estruturas de reprodução assexual (BARNETT e HUNTER, 1972; SUTTON, 1992). Esta etapa foi realizada no LAGEM/ICB e LPBOM/FCA, ambos da UFAM.

##### 4.6.1 Técnica de coloração – Lactofenol

Fragmentos dos fungos foram fixados e corados em lactofenol (ONIONS et al., 1981), para análise em microscópio óptico das características morfológicas das estruturas reprodutivas.

#### 4.7 GENOTIPAGEM COM MARCADORES MOLECULARES

##### 4.7.1 Extração de DNA genômico

Todas as etapas envolvidas na genotipagem foram executadas nos LAGEM/ICB, LPBOM/FCA, e de Biotecnologia do Centro de Apoio Multidisciplinar da UFAM. Foram selecionadas 55 colônias de endófitos e sete colônias de patógenos do gênero *Colletotrichum*, isolados de guaranazeiro e mais 21 colônias de isolados de outros hospedeiros (17 endófitos e quatro patógenos) (Tabela 01). A partir dessas colônias foram obtidas culturas monospóricas por meio de diluição seriada.

A partir de estruturas reprodutivas dos fungos foi preparada suspensão de conídios em tubos de ensaio contendo 2,5 mL de solução Tween-80 0,1%. Os tubos foram submetidos à 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 em agitador Vortex. Foram realizadas quatro diluições seriadas (1:10; 1:100; 1:1.000 e 1:10.000).

Foram distribuídos 100 µL, em duplicata, de cada uma das duas últimas diluições em placas de Petri contendo meio BDA. Após a germinação dos conídios, foi transferido, de cada placa, um fragmento do meio BDA contendo hifa produzida a partir da germinação de um único conídio. O fragmento foi transferido para 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 coletados e transferidos para Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido BD, os quais foram mantidos de forma estática, a temperatura ambiente ( $26\pm 2$  °C), por sete dias, para crescimento miceliano.

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

Após a secagem em papel de filtro esterilizado, o micélio foi macerado com nitrogênio líquido e 150 mg de micélio foi transferido para tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 700 µL de tampão de extração. Foi homogeneizado suavemente e incubado em banho-maria/60 °C por 60 minutos, sendo homogeneizado a cada 15 minutos. Depois foi adicionado igual volume de fenol hidratado e homogeneizado por cinco minutos manualmente. Centrifugou-se por 15 minutos a 10.000 x g. A parte aquosa foi recuperada em novo tubo e adicionado o mesmo volume de clorofil, homogeneizado por cinco minutos manualmente e centrifugado por 15 minutos a 10.000 x g. A parte superior foi recuperada para novo tubo e adicionado o mesmo volume de clorofane, homogeneizado por cinco minutos manualmente e centrifugado por 15 minutos a 10.000 x g. A parte superior foi recuperada para novo tubo e o DNA foi precipitado com 10% de NaCl 5M e acrescentado dois volumes de etanol 95% (- 20 °C). Deixado para precipitar por uma noite a - 20 °C e depois centrifugado por 15 minutos a 14.000 x g. O precipitado foi lavado por três vezes com etanol 70% e os tubos foram colocados invertidos em fluxo laminar para evaporação total do etanol. O precipitado foi ressuspendido com 30 µL do tampão TE.

#### **4.7.2 Quantificação do DNA**

Para estimar a concentração do DNA, foram utilizados 2  $\mu\text{L}$  do DNA genômico de cada amostra mais 3  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra (5X). Esses DNAs foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e comparados com High DNA Ladder (Invitrogen) de concentração conhecida. O gel foi corado com 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de brometo de etídio. A leitura da quantificação do DNA foi realizada pela intensidade de fluorescência num fotodocumentador de imagem (Biotech Image Master VDS modelo FTI-500, da Amersham Pharmacia Biotech) com luz ultravioleta.

#### **4.7.3 Amplificação de região do gene rDNA**

A reação de amplificação para os isolados foi realizada para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ : 1  $\mu\text{L}$  de DNA genômico (10  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), 2,5  $\mu\text{L}$  Tampão de amplificação (10X), 3  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 2,5  $\mu\text{L}$  de dNTPs (2,5 mM), 1  $\mu\text{L}$  do iniciador ITS1 (20 mM), 1  $\mu\text{L}$  do iniciador ITS4 (20 mM), 0,3  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (5  $\text{U}/\mu\text{L}$ ) e 13,7  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q. A amplificação espécie-específica para *C. gloeosporioides* foi realizada com igual volume, reagentes e concentrações mudando apenas o par de oligonucleotídeos CgInt e ITS4.

O perfil de amplificação para os conjuntos de iniciadores consistiu de uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por dois minutos e 35 ciclos, sendo 94 °C por um minuto – desnaturação, 50 °C por um minuto – anelamento, 72 °C por dois minutos – extensão, e uma extensão final a 72 °C por cinco minutos. A reação foi realizada em termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9.600.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,0%, por 60 minutos e corados com brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). O DNA amplificado foi observado em fotodocumentador de imagem (Biotech Image Master VDS modelo FTI-500, da Amersham Pharmacia Biotech) com luz ultravioleta. Foi utilizado DNA Ladder de 1 Kb (Invitrogen Life Technologies) como marcador molecular de pares de bases.

##### **4.7.3.1 Purificação do produto amplificado**



A purificação do produto amplificado via PCR da região do rDNA composta por ITS1-5,8S-ITS2 foi realizada com o Kit GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences) de acordo com o seguinte protocolo:

Ao produto da amplificação por PCR foi adicionado 200 µL da solução de captura, homogeneizado e transferido para a coluna. Foi centrifugado a 13.000 x g por 90 segundos e o líquido no tubo coletor foi descartado.

O DNA aderido à coluna foi lavado com 200 µL do tampão de lavagem e centrifugado a 13.000 x g por 90 segundos. O líquido no tubo coletor foi descartado.

A coluna foi transferida para novo microtubo coletor de 1,5 mL e adicionado 30 µL de água Milli-Q. Foi incubado a temperatura ambiente por cinco minutos. Após esse tempo, foi centrifugado a 13.000 x g por 90 segundos. O resultado da purificação foi observado a partir de 3 µL do DNA amplificado e purificado mais 2 µL do tampão de amostra (5X) em gel de agarose 1,0% e marcador molecular DNA Ladder de 1 Kb (Invitrogen Life Technologies) para se estimar sua concentração e qualidade.

#### 4.7.3.2 Reação de sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2

As amostras foram sequenciadas utilizando-se apenas o oligonucleotídeo ITS1, no sequenciador MegaBace 1000 – DNA analysis System (Amersham Biosciences - Pharmacia).

O sequenciamento do DNA foi realizado no Laboratório de Biotecnologia/CAM/UFAM. A reação de sequência foi realizada pela técnica de PCR (sequenciamento cíclico) com volume final de 10 µL para cada amostra (Kit da Dyenamic - Amersham Biosciences – Pharmacia), com: 3 µL de água Milli-Q autoclavada, 2 µL do DNA purificado, 1 µL do oligonucleotídeo ITS1 (iniciador anverso) e 4 µL da solução de sequenciamento (pré-mix).

O programa utilizado apresentava o seguinte perfil de temperatura: etapa inicial de desnaturação com 95 °C por 25 segundos, e 30 ciclos, sendo 95 °C por 15 segundos (desnaturação), 50 °C por 20 segundos (anelamento) e 60 °C por um minuto (extensão). A placa de sequenciamento foi colocada no termociclador Mastercycler Gradient da Eppendorf ag.

#### 4.7.3.3 Precipitação do produto da reação de sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2

Ao produto da PCR de sequenciamento foi adicionado 1 µL de acetato de amônia, mais 40 µL de etanol absoluto e agitado em Vortex por dois minutos. A mistura foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente e a placa de sequenciamento foi coberta com papel alumínio para evitar a incidência de luz.

Após a incubação, em centrífuga refrigerada 5804R da Eppendorf, a placa foi centrifugada a 4.000 rpm por 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado 150 µL de etanol 70%, centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado. A placa foi centrifugada invertida a 1.000 rpm por um *spin*. O DNA foi ressuspensionado 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 um *spin*.

#### 4.7.3.4 Eletroforese de sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2

A decodificação nucleotídica do fragmento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA amplificado foi realizada em sequenciador 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 sequenciamento cíclico foi lida no sequenciador automático pela captação da fosforilação.

As corridas foram analisadas em programas disponíveis no pacote de software do MegaBace 1000. Os eletroferogramas de cada isolado foram gerados pelo “Sequence Analyser” e o programa “ScoreCard” gerou informações estatísticas de cada seqüência destacando o número de nucleotídeos obtidos e a eficiência.

#### 4.7.3.5 Edição e alinhamento das seqüências ITS1-5,8S-ITS2

Após o sequenciamento nucleotídico das amostras, foi realizada a conferência e edição visual entre as seqüências por comparação com o padrão apresentado no cromatograma de cada reação. O alinhamento das seqüências foi realizado com auxílio do programa ClustalW (BioEdit).

As seqüências alinhadas e editadas foram confrontadas para consulta no banco de informações de domínio público o NCBI [National Center for Biotechnology

Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))] utilizando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), com a ferramenta BLASTn (nucleotídeo-nucleotídeo) para realizar pesquisas em seqüências de nucleotídeos com bancos de dados de seqüências também de nucleotídeos (GIBAS e JAMBECK, 2001).

#### 4.7.3.6 Análise dos haplótipos

Os haplótipos foram obtidos com auxílio do programa TCS versão 1.21 (CLEMENT et al., 2000), tendo as seqüências nucleotídicas alinhadas no formato Nexus e os “gaps” foram considerados como um quinto caractere.

O programa TCS utiliza a estatística da parcimônia pelo algoritmo desenvolvido por Templeton et al. (1992). As seqüências originais são reunidas em haplótipos e uma matriz de distância é calculada (número de diferenças mutacionais) para todas as comparações par a par.

Os *loops* apresentados na rede de haplótipos foram resolvidos utilizando-se critérios baseados na teoria da coalescência (CRANDALL e TEMPLETON, 1993) que foram resumidos por Pfenninger e Posada (2002) como: a) Critério da frequência: a conexão dos haplótipos na rede é mais provável com os de maior frequência do que com os raros; b) Critério topológico: a conexão dos haplótipos na rede é mais provável com os haplótipos do interior do que com os da extremidade; c) Critério geográfico: a conexão dos haplótipos é mais provável com os haplótipos da mesma população ou região do que com aqueles de ocorrência em populações distantes.

#### 4.7.3.7 Análise da estrutura populacional

A estrutura populacional dos isolados de *Colletotrichum/Glomerella* das três subpopulações foi definida como Fazenda, Maués e UFAM para agrupar os isolados de cada localidade amostrada. Os níveis de diferença molecular entre as populações foram observados utilizando a análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992) e teste de Mantel (MANTEL, 1967) por meio das ferramentas disponíveis no software Arlequin versão 3.1 (SCHNEIDER et al., 2006). Nesta análise, a diversidade genética total analisada em dois níveis hierárquicos, diferença entre populações e entre isolados dentro da população. O índice de fixação ( $F_{ST}$ ) considera apenas as diferenças na frequência dos haplótipos, entretanto, segundo Wright (1978) para valores de  $F_{ST}$

significativamente diferentes de zero, quando superiores a 0,05 são considerados indicadores de alta estruturação populacional e abaixo, indicam baixa estruturação.

#### 4.7.4 Marcador molecular AFLP

A amplificação do marcador AFLP usado foi realizada usando o protocolo de Vos et al. (1995), com modificações. A combinação das enzimas *EcoRI/MseI* foi utilizada na digestão do DNA genômico. As reações de digestão foram realizadas utilizando 200 ng de DNA genômico (10 ng/ $\mu$ L), 5,0  $\mu$ L do tampão “One Phor All” 10X (Amersham), 0,5  $\mu$ L de albumina de soro bovino (BSA 100X) (10  $\mu$ g/ $\mu$ L), 1,0  $\mu$ L da enzima *MseI* (TTAA) (10 U/ $\mu$ L, New England Biolabs) e 0,5  $\mu$ L da enzima *EcoRI* (GAATTC) (10 U/ $\mu$ L, Gibco) em volume final completado para 50  $\mu$ L com água Milli-Q autoclavada. As reações de digestão foram realizadas a 37 °C por três horas e inativadas a 70 °C por 15 minutos (Termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9.600).

Os adaptadores foram preparados em quantidade suficiente para ligações de 120 amostras. Para o preparo do adaptador *EcoRI* foi utilizado 4,2  $\mu$ L (5 pmol/ $\mu$ L) do adaptador “*EcoRI* oligo1” (5’ – CTC GTA GAC TGC GTA CC – 3’), 3,6  $\mu$ L (5 pmol/ $\mu$ L) do adaptador “*EcoRI* oligo2” (5’ – AAT TGG TAC GCA GTC TAC – 3’), 6  $\mu$ L do tampão OPA 10X (Amersham) e 106,2  $\mu$ L de água Milli-Q autoclavada. No preparo do adaptador *MseI* foram utilizados 64,2  $\mu$ L (50 pmol/ $\mu$ L) do adaptador “*MseI* oligo1” (5’ – GAC GAT GAG TCC TGA G – 3’), 30,6  $\mu$ L (50 pmol/ $\mu$ L) do adaptador “*MseI* oligo2” (5’ – TAC TCA GGA CTC AT – 3’), 7  $\mu$ L do tampão OPA 10X (Amersham) e 18,2  $\mu$ L de água Milli-Q autoclavada. O perfil da reação para preparo dos adaptadores foi de 65 °C por 10 minutos, 37 °C por 10 minutos e mais 25 °C por 10 minutos, realizada em termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9.600, depois a reação foi mantida a – 20 °C.

Os adaptadores foram ligados aos fragmentos de DNA em uma reação contendo 1  $\mu$ L do tampão da T4 DNA Ligase, 1  $\mu$ L dos adaptadores da enzima *EcoRI*, 1  $\mu$ L dos adaptadores da enzima *MseI*, 1  $\mu$ L de T4 DNA Ligase (1 U/ $\mu$ L, Invitrogen Life Technologies), 6  $\mu$ L de água Milli-Q autoclavada e 50  $\mu$ L da reação de digestão descrita acima. As reações de ligação foram realizadas a 23 °C durante três horas em

termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9.600. As amostras foram armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Os fragmentos de DNA foram amplificados em duas reações. Na primeira, denominada de pré-amplificação, foram utilizados os oligonucleotídeos *EcoRI* + A (5' – GAC TGC GTA CCA ATT CA – 3') e *EcoRI* + T (5' – GAC TGC GTA CCA ATT CT – 3') combinados com *MseI* + C (5' – GAT GAG TCC TGA GTA AC – 3'), enquanto na segunda, denominada de amplificação seletiva, foram utilizados oligonucleotídeos para *EcoRI* com dois nucleotídeos adicionais em seu terminal 3' (*EcoRI* + AG, + AT, + TA e + TC) em combinação com o oligonucleotídeo *MseI* + C. Ambas as reações foram efetuadas em termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9.600.

As reações de pré-amplificação foram compostas por 2,5  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA digerido e ligado aos adaptadores conforme descrito acima, 0,5  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo da enzima de corte raro (*EcoRI* + A ou *EcoRI* + T) (25 ng/ $\mu\text{L}$ ), 0,5  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo da enzima de corte freqüente (*MseI* + C) (25 ng/ $\mu\text{L}$ ), 0,4  $\mu\text{L}$  de dNTPs (2,5 mM), 1  $\mu\text{L}$  do tampão de PCR 10X, 1,2  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 0,3  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ) e 3,6  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q autoclavada. O programa de pré-amplificação foi realizado com o seguinte perfil: 26 ciclos de amplificação após desnaturação inicial a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  por dois minutos. Cada ciclo foi constituído de um minuto a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  (desnaturação), um minuto a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  (anelamento) e um minuto a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  (extensão). O ciclo final foi seguido de cinco minutos a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A reação foi realizada em termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9.600. Os produtos da pré-amplificação foram diluídos acrescentando-se 40  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q autoclavada e mantidas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação seletiva foram (*EcoRI* + AN e *MseI* + C). Nas reações de amplificação foram utilizados 1,5  $\mu\text{L}$  do produto da pré-amplificação diluído, 1  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo (*EcoRI* + AN) (25 ng/ $\mu\text{L}$ ), 1,2  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo *MseI* + C (25 ng/ $\mu\text{L}$ ), 0,4  $\mu\text{L}$  de dNTP (2,5 mM), 2  $\mu\text{L}$  do tampão 10X da enzima, 1,2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ) e 12,5  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q autoclavada. O programa de amplificação seletiva foi de desnaturação inicial a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante dois minutos, 12 ciclos compostos de 30 segundos a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 segundos a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  e um minuto a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  seguidos de 23 ciclos compostos de 30 segundos a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 segundos a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  e um minuto a  $72$

°C. O ciclo final de extensão foi de dois minutos a 72 °C. A reação foi realizada em termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9.600 e depois mantidas a – 20 °C.

Após a amplificação seletiva, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida [acrilamida/bisacrilamida (19:1) 6%, uréia 7,5 M, tampão 1X TEB] de 0,5 mm de espessura. Foi utilizado o sistema eletroforético "Sequi-Gen GT" (Biorad) de 38 x 50 cm e pente para 65 amostras.

Às amostras foi adicionado 8 µL de tampão formamida (formamida 98%, EDTA 10 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,002% (p/v) e xileno cianol 0,002% p/v) e desnaturadas a 95 °C por cinco minutos em termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9.600. O gel foi submetido a uma eletroforese inicial ("pré-corrida") sob potência constante de 80 W por uma hora, a 50 °C e 3.000 V. Na parte superior da cuba foi utilizado TEB 1X e, na parte inferior, TEB 1X/acetato de sódio 3 M. Uma vez aplicadas, as amostras foram submetidas à eletroforese sob as mesmas condições da pré-corrida durante 2h30.

Para revelação dos géis foi utilizado o método de coloração com nitrato de prata seguindo o protocolo proposto por Creste et al. (2001).

#### 4.7.4.1 Gel de poliacrilamida 6% em eletroforese vertical

Foi preparada uma matriz de poliacrilamida 6% com volume de 600 mL (uréia 252 g, bis-acrilamida 1,8 g, acrilamida 36 g e TBE 1X 600 mL). Depois foi filtrado em filtro millipore 0,45 µm e mantido em frasco escuro a – 4 °C.

A placa maior (base) foi preparada para impedir a aderência do gel de poliacrilamida (foi limpa duas vezes com etanol 95%, aplicado 1,5 mL de Repel-Silane ES e após cinco minutos limpo novamente com etanol 95%) e a placa menor preparada para aderência do gel (foi limpa duas vezes com etanol 95%, aplicado solução Bind (1 mL de etanol 95%, 5 µL de ácido acético glacial e 5 µL de Bind Silane) e após cinco minutos limpo novamente com etanol 95%).

O gel de poliacrilamida foi preparado com 120 mL da matriz de poliacrilamida, 120 µL de TEMED e 800 µL de APS (persulfato de amônio – 95 mg/mL) e aplicado imediatamente após colocar o APS, com seringa.

#### 4.7.4.2 Revelação com coloração em nitrato de prata

Após a eletroforese vertical o gel foi revelado em metodologia com cinco etapas principais (CRESTE et al., 2001):

1) A placa menor foi colocada em bandeja contendo a solução de fixação (1% de ácido acético glacial, 10% de etanol absoluto e completar com água Milli-Q) e ficou por 10 minutos sob moderada agitação.

2) O gel foi lavado com água destilada por um minuto.

3) A placa menor foi exposta à solução de pré-tratamento (1,5% de ácido nítrico e completar com água Milli-Q) em bandeja por 2,40 minutos sob moderada agitação.

4) O gel foi enxaguado em água destilada por um minuto.

5) O gel foi impregnado em solução com nitrato de prata (0,2% de  $\text{AgNO}_3$  e completar com água Milli-Q) por 20 minutos sob moderada agitação.

6) O gel foi enxaguado em água destilada por 30 segundos, duas vezes.

7) O gel foi exposto à solução reveladora (30 g/L de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ); 0,54 mL/L de formaldeído 37% e completar com água Milli-Q – a solução foi preparada no dia de uso e mantida a  $-4\text{ }^\circ\text{C}$ ), sob moderada agitação até revelar os fragmentos amplificados.

8) A revelação foi interrompida ao se colocar o gel em solução bloqueadora (5% de ácido acético glacial e completar com água Milli-Q) por cinco minutos sob moderada agitação.

9) O gel foi lavado com água destilada por um minuto.

10) A placa menor com o gel foi colocada em temperatura ambiente para secar e posterior leitura.

#### 4.7.4.3 Análise de similaridade genética por meio de AFLP

Existem vários métodos que são utilizados para analisar a variabilidade genética em microrganismos. Os métodos fenéticos utilizam distâncias métricas e são eficientes para resumir informações sobre variação de frequências gênicas entre populações, estabelecendo relações de similaridade entre táxons.

A análise de UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average ou média aritmética entre pares não ponderados) é um método fenético com

modelo de agrupamento hierárquico e a análise da variabilidade genética realiza-se com os agrupamentos das linhagens segundo os princípios adotados em taxonomia numérica.

Nesse método, árvores são elaboradas a partir de matrizes de distância e grupos de táxons são sucessivamente agrupados conforme o nível de similaridade propiciando a elaboração de dendrogramas.

Após a união do par de táxons mais semelhante, este passa a ser considerado um novo táxon e esse processo se repete até a incorporação de todos os táxons ao dendrograma. Para essa análise, foi utilizado o coeficiente de similaridade de Jaccard.

Esse coeficiente desconsidera concordâncias negativas e permite calcular similaridade com base em variáveis binárias (0 (zero) para ausência e 1 (um) para presença de bandas) (SNEATH e SOKAL, 1973).

As similaridades genéticas entre todos os isolados tomados dois a dois foram calculadas pelo coeficiente de Jaccard:

$$J(x,y) = a/(n-d)$$

onde  $\underline{x}$  e  $\underline{y}$  representam isolados,  $\underline{a}$  representa o número de fragmentos em comum entre dois isolados,  $\underline{n}$  o número total de fragmentos avaliados e  $\underline{d}$  o número de fragmentos ausentes nos dois isolados.

Estes valores foram utilizados para a obtenção de uma segunda matriz que, por sua vez, foi submetida à análise de cluster pelo método não ponderado de agrupamento de pares utilizando a média aritmética UPGMA, cujo resultado pode ser visualizado na forma gráfica de um dendrograma.

Todos os cálculos de similaridades e construção do dendrograma foram efetuados com auxílio do programa de computador NTSYS-PC (Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs) (ROHLF, 1998). A consistência das ramificações do dendrograma foi verificada por meio da técnica de amostragem repetitiva de dados (“bootstrapping”) (RUSSO et al., 2001).



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE *Colletotrichum*

Do plantio de guaranazal da EMBRAPA-Amazônia Ocidental localizado no Município de Maués/AM foram isoladas 38 colônias, sendo 31 de endofíticos e sete de patógenos. Na área da Fazenda Experimental plantada com essa cultura, foram obtidas 24 colônias somente de endófitos e não foi observada planta com sintomas de antracnose. Alguns isolados foram obtidos de um mesmo folíolo (Tabela 02).

**Tabela 02.** Fungos endofíticos de guaranazeiro, do gênero *Colletotrichum*, demonstrando os isolados obtidos a partir de um único folíolo

Cód. do isolado *	Origem
EGF13 <sup>a</sup>	Fazenda Experimental/Manaus
EGF14 <sup>a</sup>	Idem
EGF17 <sup>b</sup>	Idem
EGF18 <sup>b</sup>	Idem
EGF19 <sup>c</sup>	Idem
EGF20 <sup>c</sup>	Idem
EGM2 <sup>d</sup>	Maués
EGM3 <sup>d</sup>	Idem
EGM4 <sup>e</sup>	Idem
EGM5 <sup>e</sup>	Idem
EGM6 <sup>f</sup>	Idem
EGM7 <sup>f</sup>	Idem
EGM9 <sup>g</sup>	Idem
EGM10 <sup>g</sup>	Idem
EGM11 <sup>g</sup>	Idem
EGM12 <sup>h</sup>	Idem
EGM13 <sup>h</sup>	Idem
EGM14 <sup>h</sup>	Idem
EGM15 <sup>i</sup>	Idem
EGM16 <sup>i</sup>	Idem
EGM30 <sup>j</sup>	Idem
EGM31 <sup>j</sup>	Idem

\* Para letras iguais significa isolados do mesmo folíolo

Como controle foi introduzido no experimento 21 isolados de *Colletotrichum* obtidos de outros hospedeiros sendo que quatro foram patogênicos – um de cebolinha-verde, um de couve e dois de cajueiro; e 17 endofíticos – oito de *Rollinia* sp., dois de *Strychnos* sp. e sete de açaizeiro.

Todos os isolados foram previamente identificados como *Colletotrichum* spp. pela observação em microscópio óptico, de suas estruturas de reprodução assexual, e também por apresentarem características macroscópicas como a mucilagem de coloração laranja protegendo seus conídios (BARNETT e HUNTER, 1972; SUTTON, 1992).

O gênero *Colletotrichum* é descrito como agente causal da antracnose em diversos hospedeiros (FREEMAN et al., 2000; ANDRADE et al., 2007), bem como em guaranazeiro (BENTES e BARRETO, 2004), entretanto, frequentemente tem sido observado na condição de endófito em hospedeiros tropicais como cacauzeiro (ARNOLD et al., 2003), açaizeiro (MARQUES et al., 2007), e em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), imbaúba (*Cecropia sciadophylla* e *C. ficifolia*) e sucuba (*Himatanthus sucuuba* Spruce) (PEREIRA et al., 2007). Em guaranazeiro Guimarães (1998) identificou *G. cingulata* como endófito e Medeiros-Galvão (1998) em cupuaçuzeiro (*T. grandiflorum*).

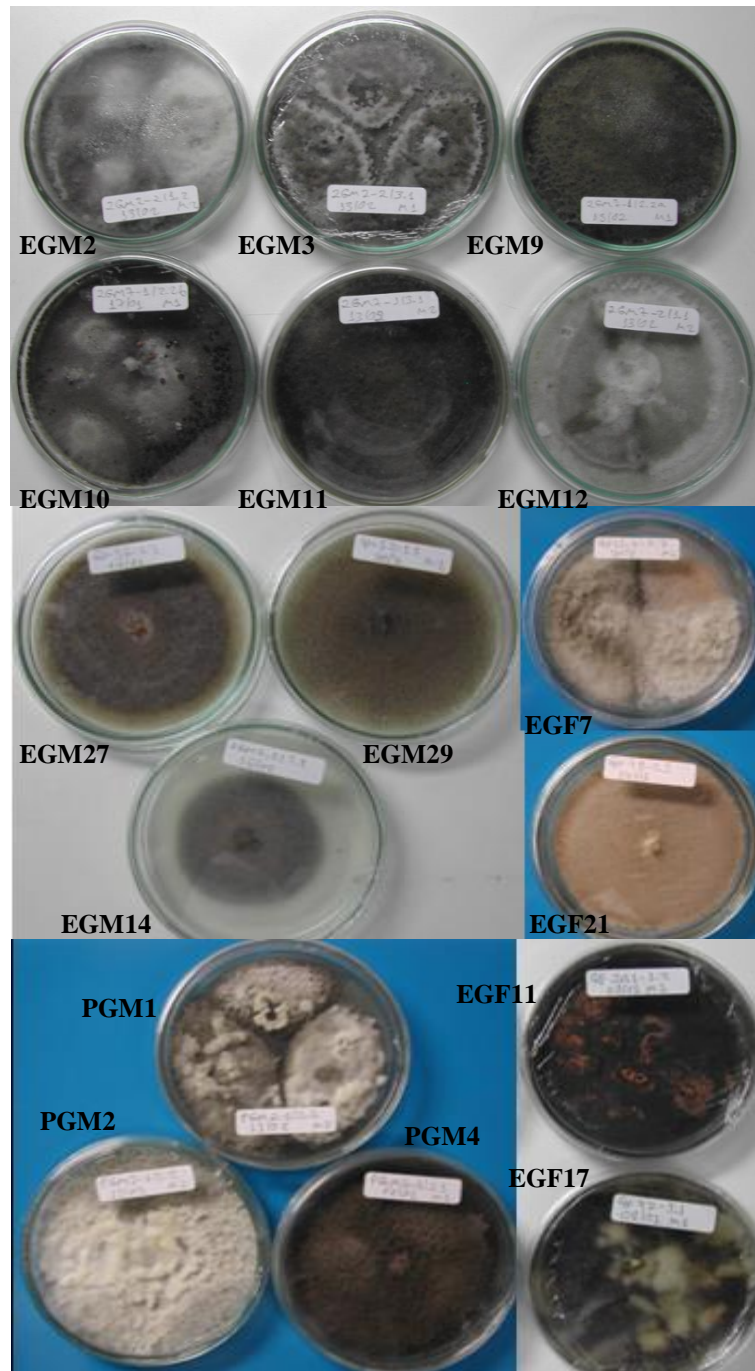
Após a identificação morfológica como colônias de *Colletotrichum*, todos os isolados foram armazenados em óleo mineral, água destilada e Método de Castellani à temperatura ambiente e depositados na Micoteca do LAGEM/ICB da UFAM (Figura 02).



**Figura 02.** Colônias de *Colletotrichum* armazenadas em dois métodos: Castellani e Óleo mineral

A expressão fenotípica dos caracteres morfológicos analisados para a identificação taxonômica de *Colletotrichum* sofre variações em função de diversos fatores, tais como temperatura, nutrientes, pH e luminosidade. Isso ocorre porque o fenótipo apresentado está sob a dependência do genótipo, do ambiente e da interação do genótipo do microrganismo com o ambiente onde ele está se desenvolvendo. Foi observada grande variabilidade morfológica entre os isolados identificados (Figura 03).

Não existe uma definição quanto a características morfológicas que possam identificar com precisão as espécies de *Colletotrichum* e por isso esse grupo é considerado muito complexo, porém a espécie de maior frequência em hospedeiros diversos ao redor do mundo é o *C. gloeosporioides* (MENEZES, 2002).



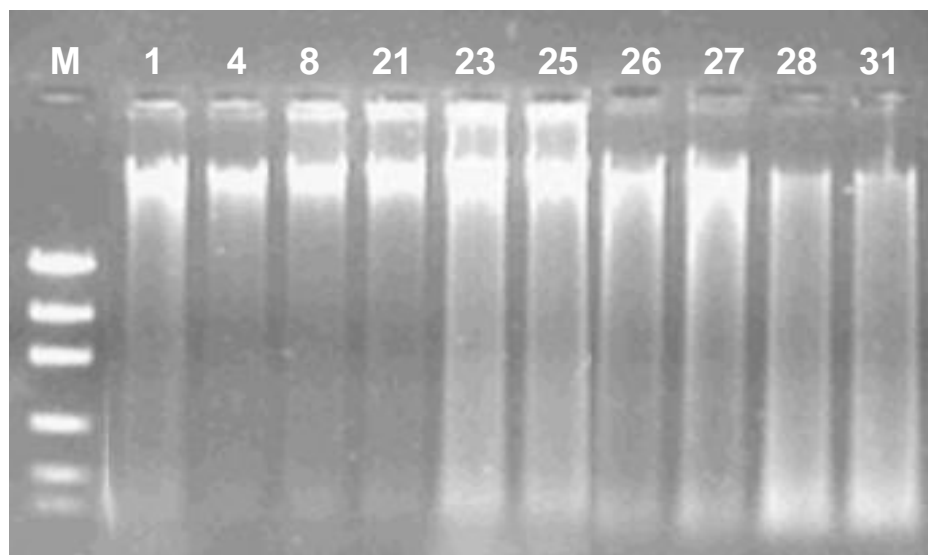
**Figura 03.** Fenótipos de colônias monospóricas de *Colletotrichum* spp., isoladas de folíolos de *Paullinia cupana* var. *sorbilis*. EGM e EGF são isolados endofíticos e PGM, patogênicos

Existem várias metodologias para a identificação de *C. gloeosporioides*. Para Sutton (1992) eles possuem conídios retos e cilíndricos, formados geralmente em massas de coloração salmão, medindo de 12-17 x 3,5-6  $\mu\text{m}$  e os apressórios podem ser clavados, ovados, obovados ou lobados, com coloração castanha medindo de 6-20 x 4-12  $\mu\text{m}$ . Enquanto Cannon (2001) descreveu que as colônias de *C. gloeosporioides* apresentam conídios medindo de 9-24 x 3-4,5  $\mu\text{m}$ , estreitos, cilíndricos, arredondados nas extremidades e geralmente sem o seu teleomorfo *Glomerella*. Pernezny et al. (2003) afirmaram que essa espécie pode ser identificada com conídios hialinos, cilíndricos e medindo 11,1-18,5 x 2,7-5  $\mu\text{m}$ .

Como a identificação morfológica deixa dúvida quanto à correta identificação taxonômica, ferramentas moleculares têm sido utilizadas para esse fim. Em especial a amplificação do gene DNA ribossômico vem sendo usada porque possui regiões conservadas e também variáveis. Além disso, está isenta da interferência ambiental na expressão do fenótipo.

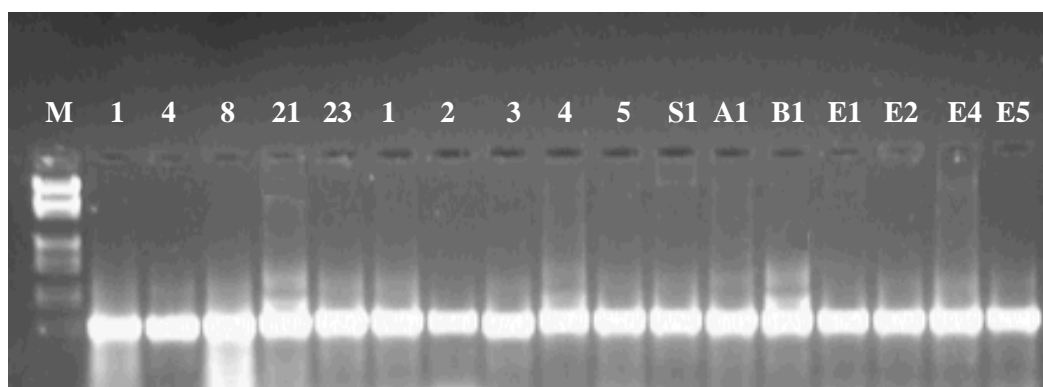
## 5.2 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA

Foram utilizados 83 isolados de *Colletotrichum* para a extração do DNA genômico. A metodologia de extração do ácido desoxirribonucléico genômico foi a descrita por Raeder e Broda (1985) realizando trituração do material biológico com nitrogênio líquido. Esta metodologia foi aplicada após a obtenção de colônias de *Colletotrichum* purificadas por diluição em série, de modo a se obter isolados monospóricos. O resultado pode ser observado na Figura 04. Todas as amostras foram diluídas de modo que se atingisse o volume de 10 ng/ $\mu\text{L}$ .



**Figura 04.** Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e revelado sob luz ultravioleta. Revelação do DNA genômico extraído de *Colletotrichum* spp.. M – Marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder; isolados EGM1, EGM4, EGM8, EGM21, EGM23, EGM25, EGM26, EGM27, EGM28 e EGM31

A amplificação de parte do gene rDNA compreendendo as regiões espaçadoras internas transcritas ITS1 e ITS2 junto com a subunidade 5,8S foi realizada utilizando-se o par de iniciadores ITS1 como anverso e ITS4 como reverso, apresentando um fragmento de aproximadamente 560 pares de bases (Figura 05). Os produtos de PCR correspondentes à amplificação foram visualizados a partir de eletroforese em gel de agarose a 1% corados com brometo de etídeo.



**Figura 05.** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e revelado sob luz ultravioleta mostrando amplificação por PCR das regiões ITS1-ITS2 e 5,8S do gene rDNA de isolados de *Colletotrichum* obtidos em folíolos de *Paullinia cupana* var. *sorbilis*. M – Marcador 1 Kb Ladder; isolados EGM1, EGM4, EGM8, EGM21, EGM23, EGF1, EGF2, EGF3, EGF4, EGF5, ESC1, PAM1, PBM1, EEC1, EEC2, EEC4 e EEC5

### 5.2.1 Sequenciamento das regiões do gene rDNA amplificadas

Após a purificação do produto da PCR, os isolados foram submetidos à reação de sequenciamento e decodificados por eletroforese em sequenciador MegaBace1000. Ao todo foram gerados 83 eletroferogramas, a partir do oligonucleotídeo anverso ITS1, e na média 500 pares de bases foram decodificadas. Todas as amostras foram submetidas à conferência visual e quando necessário, correção manual.

## 5.2.2 Identificação taxonômica molecular

Após a conferência visual das seqüências amplificadas, uma a uma foram submetidas a uma busca de seqüências depositadas no banco de informações de domínio público NCBI, pelo programa BLAST utilizando a ferramenta BLASTn.

Foi observada a produção de alinhamentos significantes representando altos escores e baixos E-values, e estes indicam uma menor probabilidade destas seqüências terem sido obtidas por mero acaso.

Nas coletas realizadas na Fazenda Experimental, localizada no Km 39 da Rodovia BR-174, foram obtidos e identificados somente isolados endofíticos e entre esses, um *C. boninense*, um *C. fragariae*, 15 *C. gloeosporioides*, dois *G. acutata* e cinco *G. cingulata*. Na coleta realizada no município de Maués/AM foram obtidos e identificados entre os endófitos um isolado de *G. acutata*, um *G. cingulata* e 29 *C. gloeosporioides* e entre os patogênicos foram encontrados um isolado de *G. cingulata* e seis *C. gloeosporioides* (Tabela 03).

Entre os isolados de outros hospedeiros foram identificados um *C. capsici* - da couve; *C. fragariae* - dois do cajueiro, um da cebolinha-verde e quatro do açaizeiro; *G. cingulata* - três do açaizeiro e um de *Rollinia* sp.; *C. gloeosporioides* - sete de *Rollinia* sp. e dois de *Strychnos* sp. (Tabela 03).

**Tabela 03.** Relação dos isolados de *Colletotrichum*, identificados em nível de espécie, por comparação de seqüências das regiões ITS1-ITS2 e subunidades 5,8S do gene rDNA com o banco de informações NCBI

Cód. do isolado*	Identificação por análise molecular	Cód. NCBI
EGF20	<b>Colletotrichum boninense</b>	DQ286170
PBM1	<b>Colletotrichum capsici</b>	DQ453988
EGF12	<b>Glomerella acutata</b>	EU734581
EGF9	Idem	Idem
EGM26	Idem	Idem
EGF15	<b>Colletotrichum fragariae</b>	EU605880
PCR1	Idem	Idem
PCR2	Idem	Idem
PAM1	Idem	Idem
EEC1	Idem	FJ172290
EEC2	Idem	Idem
EEC3	Idem	Idem
EEC6	Idem	Idem
EGF2	<b>Glomerella cingulata</b>	FJ459944
EGF8	Idem	Idem
EGF10	Idem	Idem
EGF16	Idem	Idem

EGM20	Idem	Idem
PGM4	Idem	Idem
EGF4	Idem	FJ200360
EEC7	Idem	Idem
EEC4	Idem	Idem
EEC5	Idem	Idem
ERC8	Idem	Idem
EGF3	<b>Colletotrichum gloeosporioides</b>	EF025964
EGF11	Idem	Idem
EGF13	Idem	Idem
EGM17	Idem	AY266388
EGF1	Idem	AF488777
EGF5	Idem	Idem
EGF6	Idem	Idem
EGF7	Idem	Idem
EGF14	Idem	Idem
EGF17	Idem	Idem
EGF18	Idem	Idem
EGF19	Idem	Idem
EGF21	Idem	Idem
EGF22	Idem	Idem
EGF23	Idem	Idem
EGF24	Idem	Idem
EGM1	Idem	Idem
EGM4	Idem	Idem
EGM5	Idem	Idem
EGM8	Idem	Idem
EGM21	Idem	Idem
EGM23	Idem	Idem
EGM24	Idem	Idem
EGM25	Idem	Idem
EGM27	Idem	Idem
EGM28	Idem	Idem
EGM29	Idem	Idem
EGM30	Idem	Idem
EGM31	Idem	Idem
EGM2	Idem	Idem
EGM3	Idem	Idem
EGM6	Idem	Idem
EGM7	Idem	Idem
EGM9	Idem	Idem
EGM10	Idem	Idem
EGM11	Idem	Idem
EGM12	Idem	Idem
EGM13	Idem	Idem
EGM14	Idem	Idem
EGM15	Idem	Idem
EGM16	Idem	Idem
EGM18	Idem	Idem
EGM19	Idem	Idem
EGM22	Idem	Idem
PGM1	Idem	Idem
PGM2	Idem	Idem
PGM3	Idem	Idem
PGM5	Idem	Idem
PGM6	Idem	Idem
PGM7	Idem	Idem
ERC1	Idem	Idem
ERC2	Idem	Idem
ERC3	Idem	Idem

ERC4	Idem	Idem
ERC5	Idem	Idem
ERC6	Idem	Idem
ERC7	Idem	Idem
ESC1	Idem	Idem
ESC2	Idem	Idem

\* EGF – isolados endofíticos de guaranazeiro da Fazenda Experimental/Manaus; EGM – isolados endofíticos de guaranazeiro de Maués; PGM – isolados patogênicos de guaranazeiro de Maués; EEC – isolados endofíticos de açaizeiro do Campus/Manaus; ERC – isolados endofíticos de *Rollinia* sp. do Campus/Manaus; ESC – isolados endofíticos de *Strychnos* sp. do Campus/Manaus; PBM – isolado patogênico de couve de Manaus; PAM – isolado patogênico de cebolinha-verde de Manaus e PCR – isolados patogênicos de cajueiro de Recife/PE

O guaranazal visitado para análise na Fazenda Experimental estava em uma área que não recebia tratos culturais. Várias plantas de outras espécies cercavam aquelas de guaranazeiro. Não foi observado planta com sintoma de antracnose. O observado após a identificação foi a colonização do guaranazal por cinco espécies diferentes, quais sejam: *C. boninense*, *C. fragariae*, *C. gloeosporioides*, *G. acutata* e *G. cingulata*.

Mileo et al. (2006) observaram que as leguminosas utilizadas como cobertura de solo, *Calopogonium mucunoides*, *Crotalaria striata*, *Mucuna aterrima* e *Pueraria phaseoloides* podem ser hospedeiras alternativas de *C. guaranicola*. Podemos inferir que a ocorrência de várias espécies de *Colletotrichum* e *Glomerella* no guaranazal da Fazenda Experimental tenha ocorrido pela presença de outras plantas próximas às de guaranazeiro, as quais podem ser consideradas hospedeiras alternativas.

De outro modo, o guaranazal de Maués/AM, apresentava tratos culturais onde uma planta estava distante da outra e não foi observada nenhuma planta invasora na área, entretanto, algumas plantas estavam com sintomas de antracnose. Dos isolados dessa área entre os fungos endofíticos foram identificados três espécies, *G. acutata*, *G. cingulata* e *C. gloeosporioides*, e entre os patógenos, *G. cingulata* e *C. gloeosporioides*.

Os isolados de ocorrência comum entre as duas áreas foram *G. acutata*, *G. cingulata* e *C. gloeosporioides*. A presença de *C. boninense* e *C. fragariae* no guaranazal da Fazenda Experimental pode ser atribuída à diversidade de hospedeiros na área. Dos isolados de um mesmo folíolo somente EGF19 e EGF20 foram identificados como *C. gloeosporioides* e *C. boninense*, respectivamente, os demais foram *C. gloeosporioides*.

A diversidade de espécies apresentada em guaranazeiro analisando as duas áreas estudadas pode ser atribuída ao ecossistema local. Uma área apresentava somente



plantas de guaranazeiro com tratamentos culturais, o que pode ter restringido a introdução de outras espécies do gênero *Colletotrichum*. Os isolados patogênicos apresentaram as fases anamorfo e teleomorfo, enquanto entre os endofíticos, além de *C. gloeosporioides* e *G. cingulata*, também foi observado *G. acutata*.

Entre os endofitos foi encontrado maior número de gêneros tais como *C. boninense* e *C. fragariae* observados somente na Fazenda Experimental enquanto *C. gloeosporioides*, *G. cingulata* e *G. acutata* nas duas áreas. A ocorrência do gênero *Colletotrichum* é freqüente entre a comunidade de endofitos em hospedeiros tropicais (GUIMARÃES, 1998; AZEVEDO et al., 2002; LU et al., 2004; MARQUES et al., 2007, PEREIRA et al., 2007), geralmente somente a espécie *C. gloeosporioides* tem sido observada. Guimarães (1998) registrou a ocorrência de *G. cingulata* como endofítico em guaranazeiros, entretanto, *G. acutata* foi presente nas populações da Fazenda Experimental/Manaus e em Maués, na condição de endofítico.

Estudo sobre a comunidade de fungos endofíticos de plantas nativas e cultivadas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) foi realizado por Pimentel et al. (2006). Foi observado que em plantio nativo há maior quantidade de endofitos em folhas maduras e jovens comparado com plantio cultivado, o mesmo resultado foi observado para a diversidade de fungos.

Alguns fatores podem ter contribuído para a maior diversidade de *Colletotrichum* encontrada na população de endofitos da Fazenda Experimental. Fatores climáticos pela proximidade de hospedeiros, tais como maior umidade, menor radiação solar sobre as folhas, microclima propício para o estabelecimento de outras espécies de *Colletotrichum* que não a responsável direta pela antracnose do guaranazeiro e hospedeiros alternativos que podem cambiar outras espécies de endofitos pela sua proximidade.

*Colletotrichum acutatum* e *C. fragariae* frequentemente são citados como patógenos de morangueiro. Tanaka e Passos (2002) observaram que *C. acutatum* evidenciou maior especialização patogênica em frutos e inflorescências, enquanto *C. fragariae* em pecíolos e rizomas. Mas, quando em interação com as cultivares de morangueiro, ambos patógenos apresentaram diferentes graus de patogenicidade podendo causar sintomas de intensidade semelhante no mesmo órgão da planta. *Colletotrichum acutatum* (teleomorfo *G. acutata*) também é citado como patógeno para outras culturas agrícolas como citros (*Citrus* spp.) (KUPPER et al., 2003), macieira (*M.*

*pumila* var. *dulcissima*) (LEE et al., 2007) e mamoeiro (*Carica papaya*) (ANDRADE et al., 2007).

No Japão existem as ilhas Bonin, local onde foi observada pela primeira vez a ocorrência de *C. boninense*, causando lesões em folhas de *Crinum asiaticum* var. *sinicum* L.. Esse fungo também ataca outros hospedeiros como *Clivia miniata* Regel e *Cymbidium* sp., além de distribuir-se ao longo da Costa do Pacífico no Japão (MORIWAKI et al., 2003).

Isolados identificados como *Colletotrichum* que se apresentam causando doença em guaranazeiros tem recebido o nome de *C. guaranicola*. Essa denominação foi conferida após teste de patogenicidade realizado por Albuquerque (1960). Pesquisas realizadas nos últimos anos com esses patógenos apresentam informações morfológicas divergentes e que se confundem com aquelas citadas na literatura para *C. gloeosporioides*. Até o momento, nenhum trabalho de identificação molecular foi realizado em *Colletotrichum* isolados de guaranazeiro.

Para a identificação morfológica dos isolados de guaranazeiros, Albuquerque (1960) não observou setas nos acérvulos e nem a fase teleomorfa do fungo. Os conídios são oblongos, hialinos e unicelulares, medindo 12-20 x 4-6 µm (ALBUQUERQUE, 1961). Verás et al. (1997) informaram que os acérvulos possuem setas escuras, pontiagudas, com e sem septos, além dos conídios serem retos, hialinos e unicelulares. Duarte (1999) descreveu que os acérvulos são desprovidos de setas, os conídios apresentam forma irregular tendendo para cilíndrica, medindo 4-8 x 4-6 µm. Bentes e Barreto (2004) observaram conídios hialinos, cilíndricos, medindo 10,5-15,5 x 3-4,5 µm, enquanto os acérvulos em meio de cultivo BDA apresentaram setas eram desprovidos quando presentes no hospedeiro.

Encontramos divergências também para *C. gloeosporioides*. Para Sutton (1992) eles possuem conídios retos e cilíndricos, medindo de 12-17 x 3,5-6 µm. Cannon (2001) descreveu que as colônias de *C. gloeosporioides* apresentam conídios medindo de 9-24 x 3-4,5 µm, estreitos, cilíndricos, arredondados nas extremidades e geralmente sem o seu teleomorfo *Glomerella*. Pernezny et al. (2003) afirmaram que essa espécie pode ser identificada com conídios hialinos, cilíndricos e medindo 11,1-18,5 x 2,7-5 µm.

Os dados da literatura evidenciam a dificuldade para realizar a identificação de *Colletotrichum*, em nível de espécie, utilizando-se dados morfológicos. Uma alternativa que pode ser utilizada para complementar essas informações é o uso de tecnologia molecular.

Ao identificarmos um organismo pela amplificação de parte de seu DNA, estamos abstraindo a possibilidade da interferência ambiental nesse fenótipo. O gene rDNA, por ser ortólogo, é um candidato perfeito para tal análise. Esse gene apresenta regiões conservadas e variadas. A presente amplificação englobou as regiões espaçadoras internas transcritas ITS1-ITS2 que se apresentam como variadas e a subunidade 5,8S que é conservada.

Entre os sete isolados patogênicos analisados, foram identificados seis *C. gloeosporioides* e um como a forma teleomorfa desse anamorfo, ou seja, *G. cingulata*. Albuquerque (1960) não observou o teleomorfo em meio de cultivo, entretanto, no presente trabalho por análise molecular esse feito foi concretizado. Além disso, fica patente que *C. gloeosporioides* é forte candidato a ser o agente etiológico da antracnose do guaranazeiro. Nosso propósito futuro é realizar o teste “Postulado de Koch”, pois é uma metodologia largamente utilizada em trabalhos de fitopatologia para observação dos sintomas apresentados pelo patógeno, de modo rigoroso e científico.

Realizando análise molecular com a região ITS1-5,8S-ITS2 do gene rDNA foi possível para Vinnere et al. (2002) distinguirem as espécies de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. dematium* entre isolados identificados na forma clássica como *C. gloeosporioides*. Os patógenos citados como agentes da antracnose em soja (*Glycine max* (L.) Merr.) são *C. truncatum* e *G. glycines*. Chen et al. (2006) lançando mão da amplificação de parte do gene rDNA também observaram outros agentes causando essa doença, além de *C. truncatum*, *C. gloeosporioides*, e pela primeira vez foi identificada *G. cingulata*. Lee et al. (2007) conseguiram identificar que *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* causam antracnose em macieira (*M. pumila* var. *dulcissima*), e Talhinhos et al. (2005) em Oliveira (*Olea europaea* subsp. *europaea*) utilizando a mesma ferramenta molecular. Existe a possibilidade que outras espécies de *Colletotrichum*/*Glomerella* estejam vinculadas com a antracnose do guaranazeiro, uma vez que *G. acutata* e *G. fragariae* foram identificadas nas populações da Fazenda Experimental/Manaus e Maués (Tabela 03).

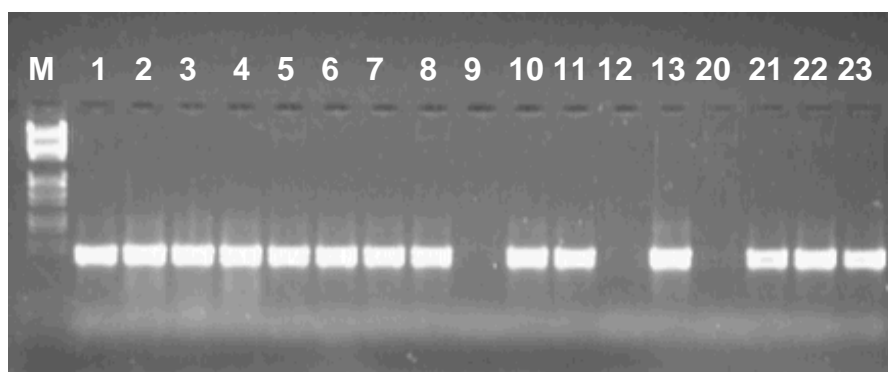
Em função das diferenças morfológicas apresentadas pelas espécies de *Colletotrichum*, concordamos com Verás et al. (1997) que trabalhando com isolados de guaranazeiro observaram grande variabilidade fenotípica em *C. guaranicola* quando variaram o meio de cultivo, sugerindo que as diferenças apresentadas no tamanho e forma do conídio, e acrescentamos presença/ausência de setas, podem ser explicadas pela influência do ambiente na expressão desses fenótipos. Além disso, verificamos que

características descritas na literatura para identificação de *C. guaranicola* também o são para *C. gloeosporioides*, sendo este um fungo frequentemente isolado de vários hospedeiros tropicais citados como agente etiológico da doença antracnose, bem como na condição de endófito.

Se esses isolados representassem uma nova espécie, pela ferramenta molecular ora utilizada, a sua homologia com as sequências depositadas no banco de dados NCBI não teriam sido observadas (os valores para *C. gloeosporioides* e *G. cingulata* foram 99 e 100%). Essa afirmação tem fundamento pela região utilizada, uma vez que ao todo foram identificadas seis espécies.

### 5.2.3 Amplificação do rDNA com oligonucleotídeo espécie específico

Foi utilizada a combinação de iniciadores CgInt – como anverso, e ITS4 – como reverso, destacando que CgInt refere-se a oligonucleotídeo específico para a espécie *C. gloeosporioides* (MILLS et al., 1992), de modo que as amostras em análise seriam amplificadas especificamente.



**Figura 06.** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e revelado sob luz ultravioleta, mostrando a amplificação de região do gene rDNA de isolados de *Colletotrichum* com iniciadores espécie específico CgInt/ITS4 para *C. gloeosporioides* isolados de *Paullinia cupava* var. *sorbilis*. M – Marcador 1 Kb Ladder; isolados EGF1, EGF2, EGF3, EGF4, EGF5, EGF6, EGF7, EGF8, EGF9, EGF10, EGF11, EGF12, EGF13, EGF20, EGF21, EGF22 e EGF23

Essa combinação foi eficiente para a maioria dos isolados de *Colletotrichum*, ou seja, foi amplificada uma banda de aproximadamente 450 pares de bases (Figura 06). Não foi observada amplificação para as espécies *G. acutata* (EGM26, EGF9, EGF12),

*C. boninense* (EGF20) e *C. capsici* (PBM1). Entretanto, somente para um isolado de *C. gloeosporioides* (ESC1) e outro de *G. cingulata* (EGM20) não ocorreram amplificação do fragmento espécie específico. Freeman et al. (2000) também observaram amplificação de fragmento com 450 pares de bases e resposta positiva para a identificação de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* isolados de frutos de abacate, amêndoa e morango, quando utilizaram os pares de iniciadores espécie específico CgInt/ITS4 e CaInt/ITS4.

O par de oligonucleotídeos espécie específico foi eficaz para a amplificação dos isolados de *C. gloeosporioides* e de seu teleomorfo *G. cingulata*, considerando-se a identificação taxonômica molecular pela busca eurística no banco NCBI, entretanto, quando testado com os isolados de *C. fragariae* houve amplificação para todos. Andrade et al. (2007) analisando patógenos ao mamoeiro e caracterizando *C. gloeosporioides*, observaram incongruências nas análises morfológicas e moleculares. Utilizaram as combinações CgInt e CaInt com ITS4, iniciadores específicos para *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, respectivamente. Analisando 33 isolados, por dados morfológicos foram identificados 31 como *C. gloeosporioides* e somente dois como *C. acutatum*, pela amplificação espécie específica foi positivo somente para seis isolados com o par CgInt/ITS4 enquanto quatro isolados para CaInt/ITS4. Os demais isolados não amplificaram com nenhuma das duas combinações. Os autores sugeriram o fato à baixa especificidade dos iniciadores.

Existem trabalhos já realizados que a amplificação com o par CgInt/ITS4 foi eficiente. Freeman et al. (2000) realizaram a identificação molecular de 469 isolados de *Colletotrichum* - obtidos de frutos de abacate e de amêndoa, e de plantas de morango, testando as duas combinações de iniciadores espécies específicos com todos os isolados, sendo uma para *C. gloeosporioides* e outra para *C. acutatum*. Neste trabalho a amplificação espécie específica foi eficiente, pois todos os isolados identificados como *C. gloeosporioides* amplificaram um fragmento de 450 pares de bases para a combinação CgInt/ITS4, enquanto os *C. acutatum* 490 pares de bases para a outra combinação CaInt2/ITS4.

O resultado observado no presente trabalho pode ter sido em função de um evento genético no sítio de anelamento do iniciador, tal como uma recombinação, mutação, inserção ou deleção de base. Ou ainda poderia ser atribuído à grande variabilidade genética existente no complexo grupo do *Colletotrichum*, o que implicaria

na imprecisão dos iniciadores espécies específicos serem utilizados genericamente em isolados de diversos hospedeiros.

### 5.3 ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS

Para a análise com haplótipos foram utilizados dez *G. cingulata* e 58 *C. gloeosporioides*, totalizando 68 isolados. As subpopulações ficaram definidas com 19 isolados para a Fazenda Experimental/Manaus, 37 para Maués e 12 para os isolados de outras plantas hospedeiras (açazeiro, *Rollinia* sp. e *Strychnos* sp.) na área do Campus/Manaus (Tabelas 04 e 05).

**Tabela 04.** Relação dos isolados correspondentes a cada um dos nove haplótipos com mais de um representante, encontrados em três subpopulações de *Colletotrichum gloeosporioides*/*Glomerella cingulata* isolados de guaranazeiro, açazeiro e *Rollinia* sp.

Haplótipos	Identificação do isolado *	
EGF5	EGF5	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
	EGF6	Idem
	EGF22	Idem
	EGM2	Idem
	EGM3	Idem
	EGM4	Idem
	EGM10	Idem
	EGM12	Idem
	EGM15	Idem
	EGM19	Idem
	EGM24	Idem
	EGM27	Idem
	EGM29	Idem
	PGM2	Idem
	PGM3	Idem
	PGM6	Idem
PGM7	Idem	
ERC5	Idem	
EGF24	EGF24	Idem
	EGM16	Idem
	EGM21	Idem
	EGM23	Idem
	EGM30	Idem
	PGM1	Idem
	ERC1	Idem
	ERC3	Idem
ERC4	Idem	
EGM1	EGM1	Idem

	EGM7	Idem
	EGM25	Idem
	EGM28	Idem
	ERC6	Idem
EGF17	EGF17	Idem
	EGF18	Idem
	EGF21	Idem
	EGF14	Idem
	EGM8	Idem
EGF3	EGF3	Idem
	EGF11	Idem
	EGF13	Idem
EGF2	EGF2	<i>Glomerella cingulata</i>
	EGF8	Idem
	EGF16	Idem
EEC7	EEC7	Idem
	ERC8	Idem
EGM20	EGM20	Idem
	PGM4	Idem
EGF4	EGF4	Idem
	EEC5	Idem

---

\* EGF – isolados endofíticos da Fazenda Experimental/Manaus; EGM – isolados endofíticos de Maués; PGM – isolados patogênicos de Maués; EEC – isolados endofíticos de açaizeiro; ERC – isolados endofíticos de *Rollinia* sp.

A seqüência nucleotídica amplificada ITS1-5,8S-ITS2 do gene rDNA apresentou um total de 439 pares de bases decodificadas para cada indivíduo, com inclusão de espaços para um alinhamento correto. Para a união dos haplótipos em uma única rede foi fixado o limite máximo em 5% de diferenças entre as seqüências e o número máximo de conexões parcimoniosas entre os pares de seqüências foi de cinco eventos de mutação.

A composição média das bases nucleotídicas foi de 24,4% para timina, 28,1% para citosina, 22,4% para adenina e 25,0% para guanina. Somente nove eventos de mutação foram observados, sendo uma transversão (T → A) no sítio três, oito transições – com maior freqüência para G → A, e 11 inserções ou deleções entre as posições de 3 a 466 (Tabela 05).

**Tabela 05.** Sítios polimórficos evidenciando a discriminação de 28 haplótipos entre os 68 indivíduos – dez *Glomerella cingulata* e 58 *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de *Paullinia cupana* de Manaus e Maués, e de *Euterpe oleraceae*, *Rollinia* sp. e *Strychnos* sp. de Manaus. Foram observadas uma transversão (T → A), oito transições e 11 inserções/deleções em fragmento de 479 pares de bases. As regiões monomórficas são indicadas por ponto. N corresponde ao número de indivíduos observados dentro de cada haplótipo. P representa a proporção do haplótipo

Haplótipos	Posição das bases nucleotídicas																	N	P (%)	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	3	3	4	4			4
	0	0	0	1	1	2	2	3	4	6	2	5	0	4	9	9	1	6	6	6
	3	7	9	2	8	0	8	1	2	6	7	7	2	0	4	9	3	0	1	6
EGF5	T	C	A	C	-	-	C	T	T	C	A	A	G	A	C	G	G	A	-	C
EGF24	.	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.
EGF17	.	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	G
EGM1	.	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-
EGF2	.	T	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.
EGF3	.	.	-	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.
EGF4	.	.	.	.	T	-	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	.
EGM20	.	T	.	.	T	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.
EEC7	.	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	.
EGF1	.	.	.	-	T	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.
EGF7	.	.	.	.	-	-	.	.	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	-	.
EGF19	.	.	.	.	T	-	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	-	G	
EGF23	.	.	.	.	T	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	-
EGM5	.	.	.	.	T	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	-	.
EGM31	.	.	.	.	-	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.
EGM6	.	.	.	.	T	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	-	.
EGM9	.	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	-	.
EGM11	A	.	.	.	T	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	-	.
EGM13	.	.	.	.	T	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.
EGM14	.	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	-	.
EGM17	.	.	.	.	T	-	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.
EGM18	.	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	-	.
EGM22	.	.	.	.	-	T	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.
PGM5	.	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	-	.
EEC4	.	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	G	-	.
ERC7	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	-	-	.	.	.	.	.	G	-	.
ESC1	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	.
ESC2	.	.	.	.	T	T	.	.	C	.	.	.	.	G	.	.	.	.	-	.

Entre os 68 isolados analisados de três amostras populacionais, foram encontrados 28 haplótipos. Destes, nove com mais de um representante e 19 com seqüências únicas (Tabelas 04 e 06). Dois haplótipos foram os mais frequentes, EGF5, representando 26,47% como o mais frequente, seguido do EGF24 com 13,24%, ambos ficaram distribuídos nas três populações - compreendendo endófitos e patógenos, constituindo-se nos haplótipos de maior distribuição geográfica com diferença em apenas um passo mutacional.



**Tabela 06.** Distribuição dos 28 haplótipos de *Colletotrichum gloeosporioides/Glomerella cingulata* em função do hospedeiro e localidade

Haplótipos	<i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i>			<i>Rollinia</i>	<i>Euterpe</i>	<i>Strychnos</i>	Total
				sp.	<i>oleraceae</i>	sp.	
	Maués		FE *	Campus Universitário			
	patógeno		endófito	Manaus			
	patógeno	endófito	endófito	Endófito			
EGF5	4	10	3	1	-	-	18
EGF24	1	4	1	3	-	-	9
EGF17	-	1	4	-	-	-	5
EGM1	-	4	-	1	-	-	5
EGF2	-	-	3	-	-	-	3♦
EGF3	-	-	3	-	-	-	3
EGF4	-	-	1	-	1	-	2♦
EGM20	1	1	-	-	-	-	2♦
EEC7	-	-	-	1	1	-	2♦
EGF1	-	-	1	-	-	-	1
EGF7	-	-	1	-	-	-	1
EGF19	-	-	1	-	-	-	1
EGF23	-	-	1	-	-	-	1
EGM5	-	1	-	-	-	-	1
EGM31	-	1	-	-	-	-	1
EGM6	-	1	-	-	-	-	1
EGM9	-	1	-	-	-	-	1
EGM11	-	1	-	-	-	-	1
EGM13	-	1	-	-	-	-	1
EGM14	-	1	-	-	-	-	1
EGM17	-	1	-	-	-	-	1
EGM18	-	1	-	-	-	-	1
EGM22	-	1	-	-	-	-	1
PGM5	1	-	-	-	-	-	1
EEC4	-	-	-	-	1	-	1♦
ERC7	-	-	-	1	-	-	1
ESC1	-	-	-	-	-	1	1
ESC2	-	-	-	-	-	1	1
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>30</b>	<b>19</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>68</b>

\* FE – Fazenda Experimental; ♦ Haplótipos de *Glomerella cingulata*.

O haplótipo ancestral (EGF5) apresentou 18 indivíduos, sendo três da Fazenda Experimental (Manaus), 14 de Maués – dez endofíticos e quatro patogênicos, e um de *Rollinia* sp.. O segundo haplótipo mais freqüente (EGF24) apresentou nove indivíduos – cinco de Maués - um patógeno e quatro endofitos; um da Fazenda Experimental e três de *Rollinia* sp.. Conforme Templeton et al. (1992) é esperado que haplótipos ancestrais sejam mais freqüentes e mais amplamente distribuídos.

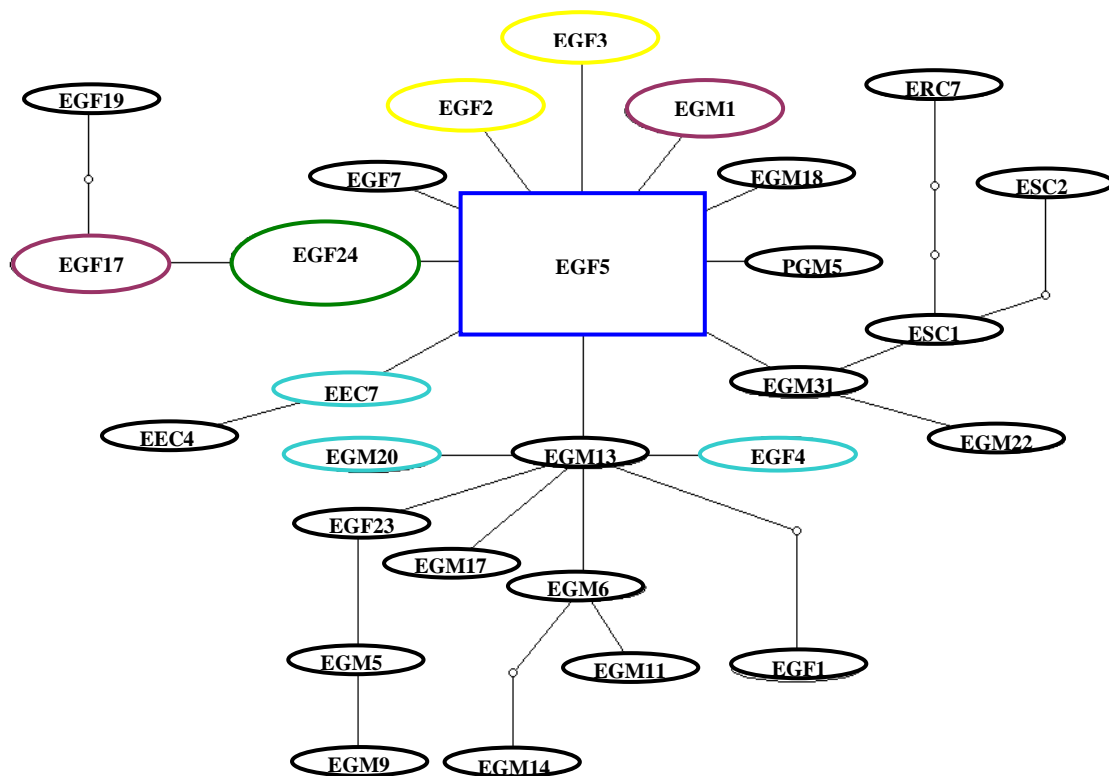
Dois haplótipos distintos apresentaram cinco indivíduos. O representado pelo haplótipo EGM1 compreendeu quatro indivíduos de Maués e um de *Rollinia* sp.; e o EGF17, por quatro da Fazenda Experimental e um de Maués.

Três indivíduos distintos representaram outros dois haplótipos (EGF3 e EGF2). Cada trinca foi composta somente por indivíduos da Fazenda Experimental com destaque para a separação entre os isolados de *G. cingulata* que formaram um haplótipo distinto (EGF2) daquele com *C. gloeosporioides* (EGF3). Estes dois haplótipos endófitos foram os únicos exclusivos da população da Fazenda Experimental/Manaus.

Foram observados três haplótipos com dois representantes cada. O haplótipo EEC7, do açazeiro foi igual ao indivíduo ERC8 isolado de *Rollinia* sp. – ambos *G. cingulata*; enquanto o endófito EGM20 apresentou a mesma seqüência nucleotídica do patógeno PGM4, ambos de Maués e *G. cingulata*; e EGF4 da Fazenda Experimental foi idêntico ao endófito EEC5 isolado de fruto do açazeiro, ambos *G. cingulata*.

Os indivíduos com seqüência nucleotídica única compreenderam 19 haplótipos. Dentre esses, foram exclusivos de cada local, quatro da Fazenda Experimental, 11 de Maués, incluindo o patógeno PGM5, um do açazeiro – *G. cingulata*, um de *Rollinia* sp. e dois de *Strychnos* sp.. A maioria dos haplótipos únicos foi observada na população de Maués, que é uma área cultivada e mantida com tratamentos culturais, provavelmente o uso de agrotóxicos para o controle da antracnose, aliado à introdução de clones resistentes estejam exercendo pressão de seleção na população de *Colletotrichum*, culminando com a troca de alelos para se manterem vivos. No resultado observado não houve separação dos indivíduos em relação às origens geográficas.

A reprodução que ocorre nas populações de *Colletotrichum* é exclusivamente somática e a fase teleomórfica para a maioria das espécies é desconhecida (BEZERRA e MENEZES, 2007), entretanto, no presente trabalho foi observado albergado em folíolos de guaranazeiro *G. cingulata* teleomorfo de *C. gloeosporioides*, tal fato sugere que a grande variabilidade observada seja potencializada em função da troca de material genético, sem esquecer dos eventos de mutação.



**Figura 07.** Rede de haplótipos da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Glomerella cingulata*, isolados de *Paullinia cupana* var. *sorbilis*, *Rollinia* sp., *Euterpe oleraceae* e *Strychnos* sp.. Nas figuras geométricas estão agrupados os haplótipos e a área de cada uma representa a frequência relativa de cada haplótipo. Os haplótipos são separados por passos mutacionais. Círculos minúsculos sem denominação representam haplótipos mutantes hipotéticos não amostrados. A rede de haplótipos apresenta conexão entre os isolados dos vários hospedeiros

A rede de haplótipos demonstrou que há grande variabilidade genética entre os indivíduos das três populações (Figura 07). Da cidade de Maués, foram analisados 37 indivíduos, sendo sete isolados patogênicos e 30 endófitos. Destes, o endófito EGM20 e o patógeno PGM4 foram identificados por ferramenta molecular como *G. cingulata*, ambos representando um haplótipo (Tabela 04). Este fato indica que a fase teleomorfa do patógeno é *G. cingulata*. Os demais foram identificados como *C. gloeosporioides*. Nessa população foram identificados 16 haplótipos. Entre os patógenos, foram observados quatro haplótipos enquanto os endófitos se distribuíram entre 14. Como seqüências únicas foram observados um patógeno PGM5 e dez entre os endófitos, este fato sugere grande variabilidade nessa população. Haplótipos recentes tem distribuição mais restrita, pois segundo Templeton et al. (1992) não tiveram tempo suficiente para maior dispersão.

A população isolada da Fazenda Experimental em Manaus, exclusiva de endófitos, ficou distribuída em dez haplótipos. Entre os 19 indivíduos, quatro foram identificados por ferramenta molecular como *G. cingulata* e se apresentaram como dois haplótipos (EGF2, EGF8 e EGF16, EGF4, respectivamente) e os demais como *C. gloeosporioides*. Somente quatro indivíduos apresentaram-se como haplótipos únicos nessa população. Como essa população existe em um plantio que não recebe tratamentos culturais e existe a possibilidade de intercâmbio de indivíduos entre vários hospedeiros, a grande variabilidade pode ser explicada pela troca de material genético entre os indivíduos na fase sexuada.

Os isolados de outros hospedeiros totalizaram 12 indivíduos distribuídos em nove haplótipos. Dos sete de *Rollinia* sp. foram observados cinco haplótipos, onde o ERC5 foi semelhante ao ancestral e ERC7 foi seqüência única, enquanto ERC1, ERC3 e ERC4 assemelharam-se ao haplótipo EGF24 e o ERC6 ao haplótipo EGM1. O isolado ERC8 identificado como *G. cingulata* foi semelhante ao EEC7 do açazeiro, ambos representando um haplótipo. Os outros dois indivíduos do açazeiro, também identificados como *G. cingulata*, formaram haplótipos distintos, sendo EEC5 com EGF4 e como haplótipo único EEC4. Os dois indivíduos de *Strychnos* sp. (ESC1 e ESC2) se apresentaram como seqüências únicas.

A amplificação molecular da região ITS1-5,8S-ITS2 do gene rDNA foi eficiente para identificar taxonomicamente os isolados de *C. gloeosporioides* e *G. cingulata*. Não foi observada discrepância entre as seqüências em análise daquelas depositadas no GenBank. Junto às seqüências dos isolados de guaranazeiro foram adicionadas seqüências de isolados de outros hospedeiros para a confrontação da possibilidade dos isolados de guaranazeiro ser uma espécie nova de *Colletotrichum*. Na análise com haplótipos foi verificado que as amostras de *Colletotrichum* isoladas de vários hospedeiros foram agrupadas em vários haplótipos. Dentre os representantes do haplótipo ancestral podemos constatar indivíduos isolados de Maués, da Fazenda Experimental e do Campus Universitário. Este fato sugere que as populações de *C. gloeosporioides* constituem-se numa mistura complexa de diversos haplótipos.

Outro fato importante é a conexão na rede de haplótipos entre os indivíduos. Observamos que a partir do haplótipo ancestral somente um passo mutacional o diferencia dos isolados EEC7, EGM18, PGM5 e EGF24. E entre os mais distantes encontram-se com três mutações EGF1, com quatro mutações ESC2, EGM9 e EGF19, e com cinco, o isolado ERC7. Os dois haplótipos mais frequentes foram compartilhados

entre as três populações, enquanto o EGF17 foi entre Fazenda Experimental/Manaus e Maués e o EGM1, Maués e Campus/Manaus. Observamos que há uma ampla variabilidade genética, pois cada população apresentou vários haplótipos.

Os dez isolados de *G. cingulata* foram distribuídos em cinco haplótipos, e somente um foi seqüência única (EEC4). Somente um haplótipo se apresentou comum entre indivíduos de Maués e Fazenda Experimental, o EGF17 (quatro indivíduos de Manaus e um de Maués). Três isolados da Fazenda Experimental formaram o haplótipo EGF2 e dois de Maués o EGM20, enquanto um isolado da Fazenda Experimental e outro do açazeiro representaram um haplótipo distinto. A rede de haplótipos não demonstrou desconexão entre as populações estudadas, quando isso ocorre significa que se trata de um único táxon ou muito próximos (TEMPLETON et al., 1992).

A análise realizada com essa seqüência nucleotídica foi capaz de demonstrar diferenças individuais de *C. gloeosporioides* e *G. cingulata*, evidenciando variação intra e interespecífica. Resultados semelhantes foram observados em trabalhos anteriores. Basseto (2006) analisando 146 isolados brasileiros de *Thanatephorus cucumeris/Rhizoctonia solani* AG 2, identificou oito haplótipos, o ancestral apresentou freqüência de 31,8%. Kauserud et al. (2004) também observaram diferenças trabalhando com *Panellus stypticus*, *Pleorus tuberregium* e *Schizophyllum commune*. Bandas polimórficas apresentadas na seqüência do DNA ribossomal de *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *C. fuscum* e *C. fragariae* em isolados de diferentes regiões e hospedeiros evidenciaram cinco grupos, demonstrando a distância entre as espécies (MUNAUT et al., 2002).

Estudos filogenéticos em micologia utilizam a seqüência do rDNA porque a região ITS evolui mais rapidamente do que outras regiões e pode apresentar variabilidade entre espécies dentro de um gênero ou entre isolados de uma mesma espécie (JAMES et al., 2001; CARBONE e KOHN, 2004; GRASSO et al., 2006). Além disso, possui alta repetibilidade no genoma, o que resulta numa maior sensibilidade frente aos genes de cópia única (PERNEEL et al., 2006).

Essa análise molecular não separou *C. gloeosporioides* endófitos de patógenos. O ancestral comum (EGF5) e o segundo mais freqüente (EGF24) compreenderam endófitos de Maués bem como patógenos, e endófitos de Manaus, isolados de folíolos de guaranazeiro. O haplótipo EGM20 de *G. cingulata* apresentou seqüência nucleotídica idêntica ao PGM4, que foi isolado de folíolo com antracnose, e também identificado como a forma teleomorfa. Nenhuma seqüência de *C. gloeosporioides* foi agrupada com

*G. cingulata*, isso revela que apesar de serem considerados anamorfo e teleomorfo, apresentam diferenças nessa seqüência ortóloga.

A análise da estrutura genética dada pela variância molecular (AMOVA) evidenciou que a maior diversidade genética encontra-se dentro das subpopulações com 90,77% (Tabela 07). Esse valor corrobora a amplitude de haplótipos encontrada nas subpopulações, além da ampla distribuição geográfica e diversidade de hospedeiros.

A diversidade genética observada entre as subpopulações foi de 9,23%. Essa baixa taxa entre as subpopulações está relacionada à freqüência de compartilhamento dos haplótipos mais freqüentes por todas as localidades.

A alta diversidade genética dentro das populações pode ser explicada pela ocorrência de meiose, possibilitando a recombinação entre esses indivíduos, além de capacitá-los a se adaptarem a diversas condições ambientais.

A pouca variação apresentada entre as subpopulações sugere que a forma de dispersão desse fungo pode ser por via aérea, pelo solo ou pela água, o que possibilita a ocorrência de migração a longas distâncias. Outro fato é a ocorrência de *Colletotrichum* em diversos hospedeiros tropicais, ampliando o campo de infecção desse fungo.

O índice de fixação ( $F_{ST}$ ) foi de 0,0923 com  $p = 0,00$ , indicando que houve pouca influência da origem geográfica sobre o genótipo dos isolados estudados. Por outro lado, pode-se supor que a baixa variabilidade apresentada entre as subpopulações pode ser pela presença de um grande número de alelos comuns, ou porque os alelos co-evoluíram independentemente por mutação ou eles eram idênticos por descendência e foram distribuídos por fluxo gênico.

A variabilidade e a estrutura genética de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* isolados em localidades situadas em duas regiões do Chile foram investigadas por meio de RAPD, SSR (Simple Sequences Repeat ou microsátélites) e região ITS do gene rDNA. Foi observado nas três análises que a maior variância molecular encontrava-se dentro das populações. Os valores de  $F_{ST}$  foram baixos evidenciando pouca variabilidade genética baseada na distribuição geográfica, uma vez que os isolados ficaram amplamente distribuídos no dendrograma (VELÁSQUEZ et al., 2007).

**Tabela 07.** Análise da variabilidade genética por meio de variância molecular (AMOVA) dentro e entre subpopulações e Índice de Fixação ( $F_{ST}$ ) de *Colletotrichum/Glomerella*, isolados de *Paullinia cupana* var. *sorbilis*

Fonte de Variação	G.L.*	Soma dos quadrados	Componente de variância	Varição total (%)
Entre as Subpopulações	2	1,409	0,02345	9,23
Dentro das Subpopulações	65	14,988	0,23058	90,77
Total	67	16,397	0,25403	
Índice de Fixação	$F_{ST}$	0,0923		

\*G.L. = Grau de Liberdade

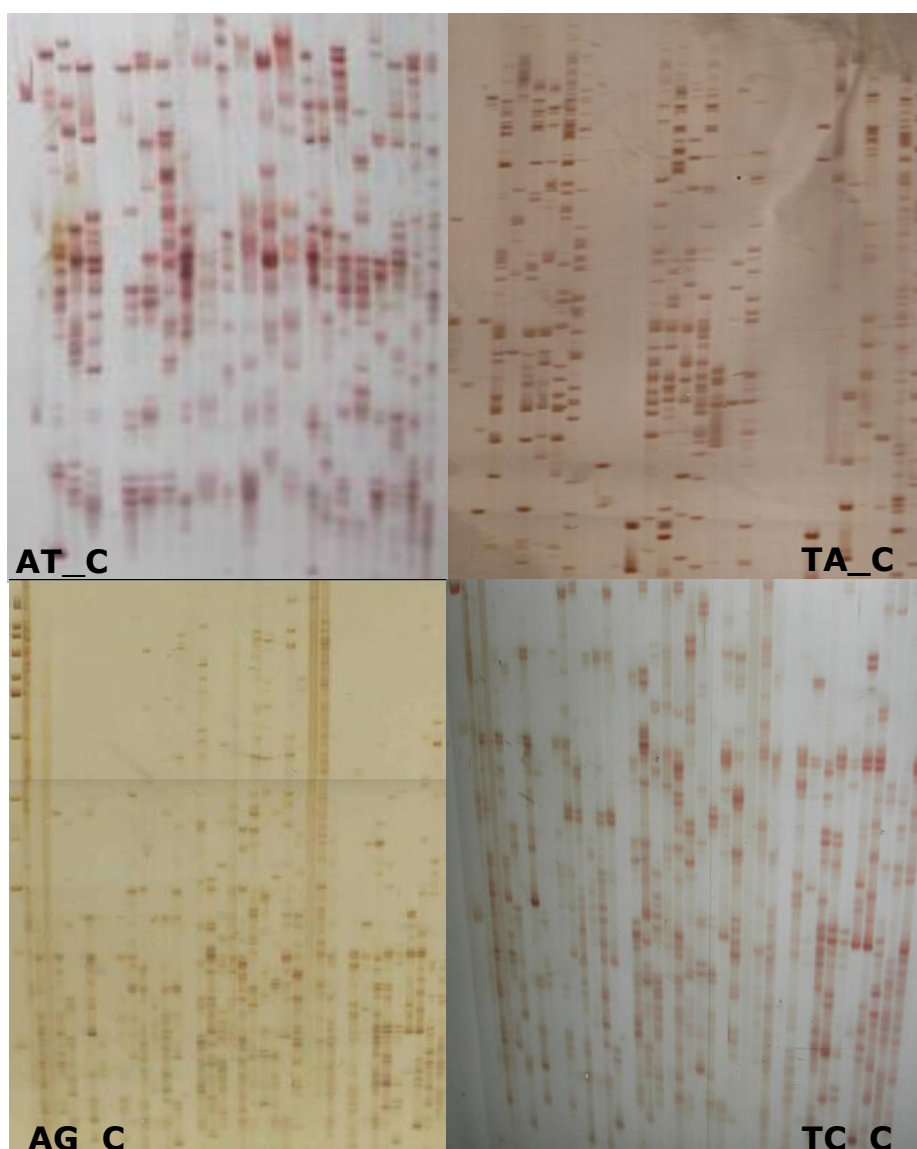
#### 5.4 VARIABILIDADE GENÉTICA

A análise da variabilidade genética entre isolados de *C. gloeosporioides* e *G. cingulata* foi observada por marcadores moleculares AFLP pela combinação de quatro pares de oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação dos fragmentos gerados em função da digestão do DNA nuclear pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI*. O perfil eletroforético de cada combinação pode ser observado na Figura 08. O número médio de fragmentos obtidos por combinação foi de 133 bandas. O total de fragmentos obtidos representou 534 bandas, todas polimórficas, com tamanho variando de 50 a 350 pares de bases (Tabela 08).

O maior grau de similaridade genética, baseado na matriz de distância, foi de 32% entre os patógenos PGM3 e PGM6, isolados de folíolos de guaranazeiros com sintomas de antracnose em plantas diferentes, na cidade de Maués, ambos representantes do haplótipo ancestral, e o menor foi de 1% entre os endófitos EGM28 e EGF1, isolados de guaranazeiros assintomáticos, de Maués e da Fazenda Experimental/Manaus, respectivamente, ambos representando haplótipos diferentes (EGM1 e EGF1 – este, como cópia única). Não foi encontrado 100% de semelhança, entretanto, os isolados EGM31 e EGF21 não apresentaram similaridade; esta observação indica a alta variabilidade genética entre os isolados de *C. gloeosporioides* e *G. cingulata* (Matriz de distância, em anexo).

**Tabela 08.** Combinação de pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos fragmentos gerados pelos cortes das enzimas de restrição

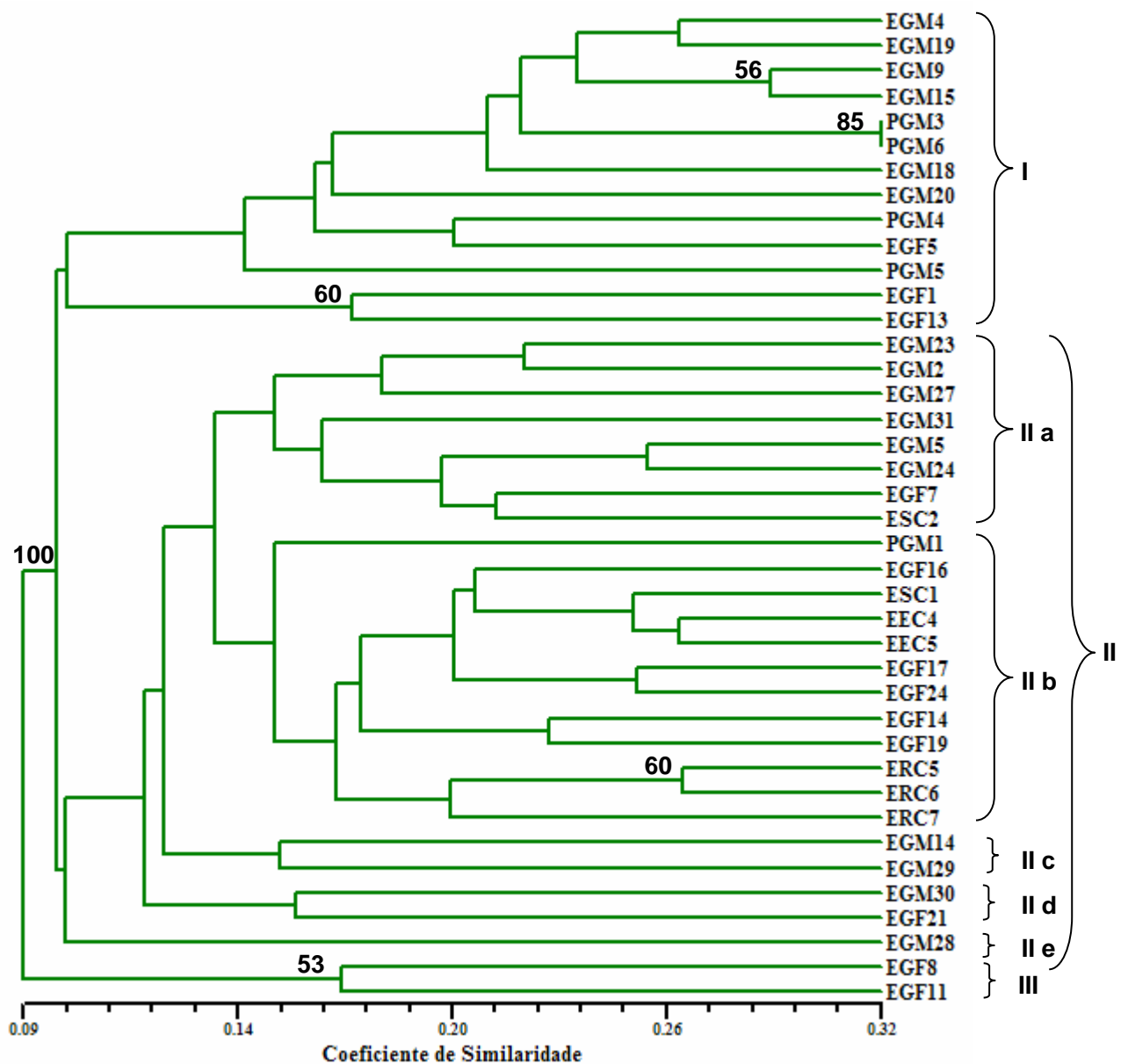
<b>Combinação de oligos</b>	<b>Fragmentos lidos</b>	<b>Bandas polimórficas</b>
<i>EcoRI</i> + TC <i>MseI</i> + C	185	185
<i>EcoRI</i> + TA <i>MseI</i> + C	133	133
<i>EcoRI</i> + AG <i>MseI</i> + C	116	116
<i>EcoRI</i> + AT <i>MseI</i> + C	100	100
<b>Total</b>	<b>534</b>	<b>534</b>





**Figura 08.** Perfil eletroforético dos quatro pares de iniciadores testados para a análise da variabilidade genética de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Glomerella cingulata* por meio da técnica molecular AFLP. Foram utilizados os iniciadores *EcoRI* + AT, + AG, + TA, + TC combinados com *MseI* + C

O dendrograma gerado a partir da matriz de distância genética observada com o coeficiente de Jaccard apresentou três grupos com 9% de similaridade genética entre eles (Figura 09). González et al. (1998) observaram similaridade de 60% entre isolados de *C. lindemuthianum* do México, que formaram dois grupos, com dois subgrupos cada, destacando a separação dos isolados por região geográfica. Enquanto 70% de similaridade genética foi observada entre dois grupos de *Claviceps africana*, um comportou isolados da Austrália, Índia e Japão e no outro grupo ficaram isolados dos Estados Unidos da América, México e África, dentro de cada grupo foi encontrada similaridade variando de 75 a 100% (TOOLEY et al., 2002).



**Figura 09.** Variabilidade genética observada em 34 *Colletotrichum gloeosporioides* e seis *Glomerella cingulata*, isolados de *Paullinia cupana*, *Euterpe oleraceae*, *Rollinia* sp. e *Strychnos* sp. com marcadores moleculares AFLP gerados por cortes de restrição com as enzimas *EcoRI/MseI*. Dendrograma gerado no programa NTSYS, utilizando coeficiente Jaccard e algoritmo UPGMA. Isolados de *Glomerella cingulata*: EGF8, EGF16, EGM20, PGM4, EEC4 e EEC5

O grupo I compreendeu dez isolados de Maués, sendo quatro patógenos, e somente três da Fazenda Experimental/Manaus. Todos os representantes desse grupo foram isolados de guaranzeiro com similaridade mínima de 10%. Os isolados PGM4 (*G. cingulata*, patógeno, de Maués) foi similar geneticamente ao EGF5 (*C. gloeosporioides*, endófito, da Fazenda Experimental/Manaus) em 20,1%. O haplótipo de cópia única EGM9 ficou agrupado com EGM15 haplótipo ancestral, a similaridade

genética entre eles foi de 28,6%, confirmada com valor de *bootstrap* de 56%. Nesse grupo, a maior similaridade foi de 32% entre os isolados PGM3 e PGM6 suportado por valor de 85% de *bootstrap*, ambos patogênicos (Figura 09).

Cinco subgrupos foram observados no grupo II, compreendendo isolados das três subpopulações analisadas. No subgrupo IIa foram relacionados somente endófitos *C. gloeosporioides* com similaridade mínima de 15%, sendo seis isolados de guaranazeiros de Maués e um da Fazenda Experimental/Manaus, e o isolado ESC2 de *Strychnos* sp. do Campus Universitário/Manaus. Entre os isolados EGF7 (Fazenda) e ESC2 foi observada similaridade de 21,2%.

O subgrupo IIb apresentou 12 indivíduos e maior agrupamento de isolados de hospedeiros diversos com similaridade mínima de 15%. Foram agrupados seis isolados de guaranazeiro - um patogênico de Maués e cinco endófitos da Fazenda Experimental/Manaus; os demais foram endófitos, o isolado ESC1 de *Strychnos* sp., EEC4 e EEC5 do açazeiro - ambos *G. cingulata*, e os três de *Rollinia* sp. A maior similaridade nesse subgrupo foi entre os pares de isolados EEC4 e EEC5 e ERC5 e ERC6, que foi de 26%. Somente um isolado patogênico se agrupou entre os endófitos nesse subgrupo, com a menor similaridade (15%), e os endófitos de guaranazeiro apresentaram maior similaridade entre si do que com os dos demais hospedeiros. A similaridade genética entre o subgrupo IIb e o subgrupo IIa foi < 14%.

Os subgrupos IIc e IId foram representados por dois isolados cada. O subgrupo IIc apresentou similaridade de 15,2% entre si (EGM14 e EGM29 - isolados de guaranazeiro de Maués), e < 13% dos subgrupos IIa e IIb. Os isolados EGM30 e EGF21 foram 15,8% similares geneticamente no subgrupo IId e 12% aos subgrupos IIa, IIb e IIc. Esse subgrupo foi representado por isolados endófitos de Maués e da Fazenda Experimental/Manaus. O mais distante desses subgrupos foi o IIe representado pelo isolado endófito de Maués EGM28 com similaridade de 10%. O grupo III foi formado pelos isolados endófitos da Fazenda Experimental/Manaus EGF8 (*G. cingulata*) e EGF11 (*C. gloeosporioides*) com similaridade de 17,1% com valor de *bootstrap* de 53%, e suportados em 100% (*bootstrap*) como o grupo mais distante dentre os analisados com 9% de similaridade genética, evidenciando que possuem seqüências genômicas bastante divergentes dos demais isolados.

A técnica AFLP foi eficiente para demonstrar a reprodutibilidade da análise molecular em *Colletotrichum* e *Glomerella*, além da variabilidade inter e intraespecífica

entre os isolados. Entretanto, os pares de oligonucleotídeos amostrados não foram eficientes para correlacionarem os isolados com os hospedeiros e origem geográfica.

Para analisar a variabilidade genética em isolados de *C. pernicioso*, isolados de cacauzeiro, Ploetz et al. (2005) testaram 64 combinações de oligonucleotídeos para a técnica AFLP, e selecionaram nove combinações, obtendo 498 bandas, das quais, 186 foram polimórficas. Foi realizada análise em 15 haplótipos, resultando em coeficiente de similaridade de 74% e separação dos isolados por origem geográfica. A estrutura genética apresentou variação de 55% entre e 45% dentro das populações. Populações do biótipo C estão bem estabelecidas na Bolívia, Brasil, Ecuador e Trinidad.

A quantidade de combinações de oligonucleotídeos utilizadas está diretamente relacionada à carga genética dos isolados. Garzón et al. (2005) discriminaram nove espécies de *Pythium* por marcador AFLP utilizando somente um par de iniciadores *EcoRI*+*AG/MseI*+*C*, evidenciando o poder dessa ferramenta molecular em função da geração de muitas bandas polimórficas. Isolados de *C. gloeosporioides* associados à podridão peduncular do mamão foram investigados por AFLP. Foi observado que o isolado C-17 foi o mais dissimilar com 34%, enquanto os demais se agruparam com similaridade média de 84% (PERES et al., 2003).

Os isolados do grupo I sugerem que *C. gloeosporioides* e *G. cingulata* podem colonizar plantas de guaranazeiro independente da área geográfica. Tal como a relação observada na análise dos haplótipos entre *G. cingulata* ser a fase teleomorfa de *C. gloeosporioides* infectando plantas de guaranazeiro, na técnica AFLP foram agrupados os isolados PGM4 – representando a fase teleomorfa e EGF5 - a fase anamorfa.

A grande variabilidade genética relatada em vários trabalhos sobre esse complexo grupo do *Colletotrichum*, aqui também foi demonstrada. O'Neill et al. (1997) utilizaram a técnica AFLP para identificar a espécie de dois isolados de *Colletotrichum*, a similaridade genética apresentada variou entre 0,5 a 40%, e foram identificados como *C. trifolii* e *C. gloeosporioides*. Silva-Mann et al. (2005) estudaram a variabilidade em isolados de *C. gossypii* que causam antracnose e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* agente etiológico da ramulose em algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), e observaram a separação desses patógenos em dois grupos distintos com grau de similaridade de 42%. Os isolados que causam antracnose apresentaram similaridade de 51,2% enquanto os de ramulose 80,4%.

Os isolados endófitos de *Rollinia* sp. apresentaram similaridade de 26,2% entre ERC5 e ERC6, e de 20% desses com ERC7. Resultado semelhante foi observado entre

aqueles isolados do açazeiro (EEC4 e EEC5) que foi de 26,1% - ambos endófitos *G. cingulata*. Apesar de não ter ocorrido agrupamento evidenciando separação por hospedeiros, o subagrupamento desses isolados sugerem uma relação maior entre os isolados do guaranazeiro. Esse fato sugere uma associação mais íntima entre endófitos/patógenos de *C. gloeosporioides* e *G. cingulata* com o hospedeiro guaranazeiro.

Foi observada similaridade mais próxima entre isolados de guaranazeiro e outro hospedeiro somente entre EGF7 e ESC2 – de *Strychnos* sp. Vale ressaltar que ambos hospedeiros distam geograficamente somente em 60 Km.

O guaranazal da Fazenda Experimental/Manaus pode ter sido originado a partir de plantas adquiridas na cidade de Maués, que fica a 360 Km de Manaus. Alguns desses fungos analisados podem ter sido introduzidos no plantio dessa maneira. Pelo fato da ocorrência em ambas populações das fases anamorfa e teleomorfa, a variabilidade genética ocorre pela recombinação gênica, possibilitando uma rápida adaptação a mudanças nas condições ambientais (CARLIER et al., 2003).

As duas populações de fungos do guaranazeiro apresentaram maior variabilidade genética dentro do que entre as populações. A maioria dos isolados ficaram agrupados com indivíduos da mesma população. Fatores como a natureza de dispersão do patógeno e a seleção imposta por hospedeiros resistentes, também podem influenciar a variabilidade encontrada nas populações de patógenos (NAKYANZI, 2002).

Os microrganismos albergados nas plantas podem desenvolver relações íntimas de tal modo que apresentam especificidade por determinado hospedeiro. Nesse sentido pode ser iniciado um processo de co-evolução. Apesar de o gênero *Colletotrichum* ser relatado como de ampla ação em diversos hospedeiros, um trabalho mais acurado pode ser realizado para identificar se existe uma relação específica entre *C. gloeosporioides* e guaranazeiro, podendo vir a ser classificado como uma variedade, como exemplo *C. gloeosporioides* var. *guaranicola*.

Não houve relação entre similaridade genética e distribuição geográfica, indicando que pode haver colonização tanto de endófitos como patógenos em áreas distintas ressaltando um mosaico de genótipos desse fungo. Com as análises do UPGMA ficou evidente que esses isolados de origens geográficas distintas e de vários hospedeiros apresentaram alta variabilidade genética. Os isolados EGM24 – de Maués,

EGF7 – da Fazenda Experimental e ESC2 – da UFAM ficaram no mesmo grupo com similaridade próxima de 20%.

Uma reavaliação taxonômica de *C. guaranicola* como agente causal da antracnose do guaranazeiro foi proposta por Bentes e Barreto (2004) considerando caracteres morfológicos como mensuração de conídios e apressórios, aspecto da cultura do fungo, formação de acérvulos e setas. Vários autores descrevem que no grupo *Colletotrichum* a delimitação de espécies baseada somente em caracteres morfológicos é questionável (SUTTON, 1992; FREEMAN et al., 2000; PERES et al., 2003).

Muitos caracteres morfológicos podem apresentar-se com vários fenótipos em função de interações com o ambiente. Uma investigação sobre gama de hospedeiros e o método Postulados de Koch podem auxiliar na resposta de quais isolados podem causar antracnose ao guaranazeiro bem como se isolados endófitos também possuem essa capacidade.

O *Colletotrichum* possui a habilidade de causar infecção latente ou quiescente, ou seja, coloniza o hospedeiro sem apresentar sintomas da doença (SUTTON, 1992). A infecção latente pode ser caracterizada pela formação de apressórios ou hifas subcuticulares, e o tipo de estrutura latente depende do hospedeiro infectado. Peruch (1998) citou que em mamão, citros, banana e abacate ocorre na forma de apressórios, e em manga e amora, a estrutura latente é na forma de hifa.

A partir do conhecimento da variabilidade e estrutura genética de fitopatógenos, programas de melhoramento genético de plantas visando a resistência a doenças podem ser mais eficientes. As populações de fungos que apresentam grande variabilidade genética são difíceis de controlar, pois eles têm maior capacidade de resistir às medidas de controle aplicadas, que podem ser química ou pela introdução de hospedeiro resistente (CARLIER et al., 2003).

## 6 CONCLUSÃO

A partir da amplificação da região ITS1-5,8S-ITS4 do gene rDNA, foram identificadas as seguintes espécies: *Colletotrichum boninense*, *C. capsici*, *C. fragariae*, *C. gloeosporioides*, *Glomerella acutata* e *G. cingulata*.

Como patógenos de folíolos de guaranazeiro foram identificados: *C. gloeosporioides* e *G. cingulata*.

Isolados na condição de endófitos, colonizando folíolos de guaranazeiro foram identificados: *C. boninense*, *C. fragariae*, *C. gloeosporioides*, *G. acutata* e *G. cingulata*.

O oligonucleotídeo espécie-específico CgInt foi eficiente na identificação de *C. gloeosporioides* e *G. cingulata*.

Não foi observado separação entre endófitos e patógenos, bem como correlação com hospedeiros ou origem geográfica.

Houve maior variação genética intra do que interpopulacional.

Houve grande variabilidade genética entre os isolados observados pela técnica AFLP, entretanto, os quatro pares de oligonucleotídeos utilizados não foram eficientes para correlacionarem hospedeiros, comportamento endófito/patogênico e origem geográfica.

O agente etiológico da doença antracnose em guaranazeiro é o *C. gloeosporioides* e seu telomorfo *G. cingulata*.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASKAVEG, J.E.; HARTIN, R.J. Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology*, St. Paul, v. 87, p. 979-987. 1997.

AFANADOR-KAFURI, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology*, St. Paul, v. 93, p. 579-587. 2003.

ALBUQUERQUE, F.C. Antracnose do guaraná. Belém: Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte, p. 1-33. 1960.

ALBUQUERQUE, F.C. Antracnose do guaraná. Estudos Técnicos nº 18. Ministério da Agricultura/Serviço de Informação Agrícola, Rio de Janeiro, 22p. 1961.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. *Introductory mycology*. 40<sup>a</sup> ed., John Wiley e Sons Inc. (Ed.), New York, 869p. 1996.

ANDRADE, E.M.; UESUGI, C.H.; UENO, B.; FERREIRA, M.A.S.V. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 32, nº 1, p. 21-31. 2007.

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

ARNOLD, A.E.; HERRE, E.A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia*, v. 95, p. 388-398. 2003.

ARNOLD, A.E.; MEJIA, L.C.; KYLLO, D.; ROJAS, E.I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E.A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, nº 26, p. 15649-15654. 2003.

ARX, J.A. von. Die arten der gattung *Colletotrichum* Cda. *Phytopathologisch Zeitschrift*, Berlin, n. 29, p. 413-468. 1957.

ASIAN VEGETABLE RESEARCH AND DEVELOPMENT CENTER. Evaluation of phenotypic and molecular criteria for the identification of *Colletotrichum* species causing pepper anthracnose in Taiwan. AVRDC Progress Report, p. 92-93. Disponível em: <http://www.avrdc.org/pdf/PR2003.pdf>. Acesso em 01 maio 2007. 2003.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Fungi: Multifaceted Microbes. GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Ed.), New Delhi: Anamaya Publishers, p. 189-207. 2006.

AZEVEDO, J.L.; JR MACCHERONI, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 1-40. 2000.

AZEVEDO, J.L.; JR MACCHERONI, W.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. 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. 233-268. 2002.

BACON, C.W.; WHITE Jr., J.F. *Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker, 487p. 2000.

BANDARA, W.M.M.S.; SENEVIRATNE, G.; KULASOORIYA, S.A. Interactions among endophytic bacteria and fungi effects and potentials. *Journal of Biosciences*, v. 31, p. 645-650. 2006.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3ª ed., Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota, USA, 241p. 1972.

BASSETO, M.A. Mancha areolada da seringueira (*Hevea brasiliensis*) na Amazônia: evolução do patógeno (*Thanatephorus cucumeris/Rhizoctonia solani* grupo de anastomose AG 2-2 Hb) num patossistema tropical. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Ilha Solteira, Ilha Solteira, São Paulo, 56p. 2006.

BAXTER, A.P.; Van der WESTHUIZEN, G.C.A.; EICKER, A. Morphology and taxonomy of South African isolates of *Colletotrichum*. *South African Journal of Botany*, v. 2, p. 259-289. 1983.

BENTES, J.L.S.; BARRETO, R.W. Reavaliação taxonômica de *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque agente causal da antracnose do guaranazeiro. *Acta Amazônica*, v. 34, p. 129-131. 2004.

BENTES, J.L.S.; MATSUOKA, K. Histologia da interação *Colletotrichum guaranicola* e *Paullinia cupana* var. *sorbilis* em clones resistente e suscetível. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, p. 71-77. 2002.

BEZERRA, J.L.; MENEZES, M. Taxonomia tradicional do gênero *Colletotrichum*. In: I Workshop Regional Sobre *Colletotrichum: Colletotrichum*'2007. Recife, Pernambuco, 1 CD-ROM. 2007.

BRADY, S.F.; CLARDY, J. CR377, a new pentaketide antifungal agente isolated from an endophytic fungus. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 1477-1448. 2000.

BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology*, St. Paul, v. 86, p. 523-527. 1996.

BUENO, C.R.N.C. Identificação e caracterização das espécies de *Colletotrichum* causadoras de antracnose em hortaliças solanáceas. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 61p. 2005.

BUENO, C.R.N.C.; TOZZE JÚNIOR, H.J.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Morfologia de conídios de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* produzidos em diferentes temperaturas e espectros de radiação. In: Anais XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, São Paulo, p. 61. 2005.

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

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: Marcadores moleculares. BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.). p. 9-78. 2006.

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

CANNON, P. *Phyllachorales (Colletotrichum)*. (Session 11). International Course on the Identification of Fungi of Agricultural and Environmental Significance. CABI Bioscience. 2001.

CANNON, P.F.; SIMMONS, C.M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia*, v. 94, n° 2, p. 210-220. 2002.

CANNON, P.F.; BRIDGE, P.D.; MONTE, E. Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics. In: *Colletotrichum: host specificity, pathology and host-pathogen interaction*. PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Eds.), v. 1, p. 1-20. 2000.

CARBONE, I.; KOHN, L.M. Inferring process from pattern in fungal population genetics. *Applied Mycology & Biotechnology*, v. 4: Fungal Genomics, p. 30. 2004.  
CARLIER, J. HAYDEN, H.; RIVAS, G. ZAPATER, M.-F.; ABADIE, C.; AITKEN, E. Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf spot pathogens. In: Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, 2002, Costa Rica. *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Montpellier: INIBAP, p. 123-129. 2003.

CERKAUSKAS, R.F. Latent colonization by *Colletotrichum* sp.: epidemiological considerations and implications for mycoherbicides. *Canadian Journal of Plant Pathology*, v. 10, p. 297-310. 1988.

CHEN, G.; LIN, Y.; WEN, L.; VRIJMOED, L.L.P.; JONES, E.B.G. Two new metabolites of a marine endophytic fungus from an estuarine mangrove on the South China Sea coast. *Tetrahedron*, v. 59, p. 4907-4909. 2003.

CHEN, L.S.; CHU, C.; LIU, C.D.; CHEN, R.S.; TSAY, J.G. PCR-based detection and differentiation of anthracnose pathogens, *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum*, from vegetable soybean in Taiwan. *J. Phytopathology*, v. 154, p. 654-662. 2006.

CLAY, K. Fungi and the food of the gods. *Nature*, London, v. 427, n°6973, p. 401-402. 2004.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. TCS: a Computer Program to Estimate Gene Genealogies. *Molecular Ecology*, v. 9, n° 10, p. 1657-60. 2000.

COSTA NETO, P.Q. Isolamento e identificação de fungos endofíticos da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) e caracterização por marcadores moleculares. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos/Universidade Federal do Amazonas, São Carlos, São Paulo, 86p. 2002.

CRANDALL, K.A.; TEMPLETON, A.R. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, v. 134, p. 959-969. 1993.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 19, p. 299-306. 2001.

CULLEN, D.W.; LEES, A.K.; TOTH, I.K.; DUNCAN, J.M. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers conventional and quantitative real-time PCR. *Plant Pathology*, Oxford, v. 51, p. 281-292. 2002.

DUARTE, M.L.R. Doenças de plantas no trópico úmido brasileiro. In: I. Plantas industriais. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 296p. 1999.

DUARTE, M.L.R.; ALBUQUERQUE, F.C.; CORRÊA, M.P.F. Variações morfológicas e fisiológicas de isolamentos de *Colletotrichum guaranicola*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 20, p. 141-144. 1995.

DUCKE, A. Diversidade dos guaranás. *Rodriguesia*, v. 3, nº 9, p. 155-156. 1937.

DUCKE, A. Plantas de cultura pré-colombiana na Amazônia brasileira. Notas sobre as espécies ou formas espontâneas que supostamente lhes teriam dado origem. *Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Norte*, Belém, v. 8, p. 1-24. 1946.

ERNEST, M.; MENDGEN, W.K.; WIRSEL, W. Endophytic fungal mutualists: seed-borne *Stagonospora* spp. enhance reed biomass production in axenic microorganisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 16, nº 7, p. 580-587. 2003.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, v. 131, p. 479-491. 1992.

FAETH, S.H. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *Oikos*, v. 98, p. 25-36. 2002.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. INTRODUÇÃO AO USO DE MARCADORES MOLECULARES EM ANÁLISE GENÉTICA. 3ª ED., BRASÍLIA: EMBRAPA-CENARGEN, 220P. 1998.

FISHER, P.J.; PETRINI, O. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). *New Phytologist*, Cambridge, v. 120, p. 137-143. 1992.

FREEMAN, S.; MINZ, D.; JURKEVITCH, E.; MAYMON, M.; SHABI, E. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology*, v. 90, nº 6, p. 608-614. 2000.

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

GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus *Bartalinia robillardoides* Tassi, isolated from a medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb. World Journal of Microbiology and Biotechnology. DOI 10.1007/s11274-007-9530-4. 2007.

GAO, X.; ZHOU, H.; XU, D.; YU, C.; CHEN, Y.; QU, L. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. FEMS Microbiology Letter, v. 249, p. 255-266. 2005.

GANLEY, A.R.D; SCOTT, B. 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. 2002.

GARZÓN, C.D.; GEISER, D.M.; MOORMAN, G.W. Diagnosis and population analysis of *Pythium* species using AFLP fingerprinting. Plant Disease, v. 89, nº 1, p. 81-89. 2005.

GIBAS, C.; JAMBECK, P. Desenvolvendo Bioinformática: ferramentas de software para aplicações em biologia. Tradução: Cristina de Amorim Machado. Campus, Rio de Janeiro, 440p. 2001.

GLIENKE, C. Variabilidade genética no fungo endofítico *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 115p. 1995.

GOND, S.K.; VERMA, V.C.; KUMAR, A. Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Corrae (Rutaceae) from Varanasi (India). World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 23, p. 1371-1375. 2007.

GONZÁLEZ, M.; RODRÍGUEZ, R.; ZAVALA, M.E.; JACOBO, J.L.; HERNÁNDEZ, F.; ACOSTA, J.; MARTÍNEZ, O.; SIMPSON, J. Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. Phytopathology, v. 88, nº 4, p. 292-299. 1998.

GRASSO, V.; SIEROTZKI, H.; GARIBALDI, A.; GISI, U. Relatedness among agronomically important rusts based on mitochondrial cytochrome b gene and ribosomal ITS sequences. Journal Phytopathology, v. 154, p. 110-118. 2006.

GUIMARÃES, V.C. Isolamento de fungos endofíticos do hospedeiro *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke e análise da variabilidade genética, detectada por marcadores RAPD, no endófito *Glomerella cingulata*. São Carlos: Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Genética e Evolução pela Universidade Federal de São Carlos/SP, 123p. 1998.

GUNATILAKA, A.A.L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of natural Products*, v. 69, n° 3, p. 509-526. 2006.

GUNNELL, P.S.; GUBLER, W.D. Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Lancaster Mycologia*, v. 2, n° 84, p. 157-165. 1992.

GUO, B.; DAI, J.; HUANG, Y.; LEONG, C.; ONG, W.; CARTE, B.K. Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytospora* species. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 602-604. 2000.

GUO, L.D.; HYDE, K.D.; LIEW, E.C.Y. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 20, n° 1, p. 1-13. 2001.

HARRISON, L.; TELOW, D.; RINALDI, M.; STROBEL, G.A. Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae*, possessing broad spectrum antifungal activity. *Journal of General Microbiology*, v. 137, p. 2857-2865. 1991.

HIBBETT, D.S. Ribosomal RNA and fungal systematics. *Trans. Mycol. Soc.*, v. 33, p. 533-556. 1992.

HIGGINS, K.L.; ARNOLD, A.E.; MIADLIKOWSKA, J.; SARVATE, S.D.; LUTZONI, F. Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 42, p. 543-555. 2007.

HOLLIDAY, P. Fungus diseases of tropical crops. Cambridge: Cambridge University Press, 607p. 1980.

HORN, W.S.; SIMMONDS, M.S.J.; SCHWARTZ, R.E.; BLANEY, W.M. Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. *Tetrahedron*, v. 14, p. 3969-3978. 1995.

HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 31, p. 163-167. 2001.

JAMES, C.M.; LESEMANN, S.S.; DOWN, G.J. Modified AFLP analysis method for species with small genomes. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 21, p. 303-307. 2003.

JAMES, T.Y.; MONCALVO, J.M.; LI, S.; VILGALYS, R. Polymorphism at the ribosomal DNA spacers and its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*. *Genetics*, v. 157, p.149-161. 2001.

JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEGER e PLUMBLEY, R.A. The biology and control of *Colletotrichum* sp. on tropical fruit crops. *Plant Pathology*, v. 39, p. 343-366. 1999.

KATAN, T. Vegetative compatibility in *Colletotrichum*. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.E.; DICKMAN, M.B. *Colletotrichum*: Host specificity, pathology and host-pathogen interaction. St. Paul, APS Press, p. 45-56. 2000.

KAUSERUD, H.; HOGBERG, N.; KNUDSEN, H.; ELBORNES, S.A.; SCHUMACHER, T. Molecular phylogenetics suggest a North American link between the antropogenic dry rot fungus *Serpula lacrymans* and its wild relative *S. himantioides*. *Molecular Ecology*, v. 13, p. 3137-3146. 2004.

KOGEL, K.H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – what decides? *Current Opinion in Plant Biology*, v. 9, p. 358-363. 2006.

KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, nº 3, p. 251-257. 2003.

LEE, D.H.; KIM, D.-H.; JEON, Y.-A.; UHM, J.Y.; HONG, S.-B. Molecular and cultural characterization of *Colletotrichum* spp. causing bitter rot of apples in Korea. *The Plant Pathology Journal*, v. 23, nº 2, p. 37-44. 2007.

LEISSNER, C.E.W.; NIESSEN, M.L.; VOGEL, R.F. Use of the AFLP technique for the identification and discrimination of *Fusarium graminearum*. *Cereal Research Communications*, v. 25, p. 555-556. 1997.

LI, J.Y.; SIDHU, R.S.; FORD, E.; HESS, W.M.; STROBEL, G.A. The induction of taxol production in the endophytic fungus *Periconia* sp. from *Torreya grandifolia*. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 20, p. 259-264. 1998.

LI, J.Y.; STROBEL, G.A.; HARPER, J.K.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Organic Letters*, v. 2, p. 767-770. 2000.

LLERAS, E. Considerações sobre distribuição geográfica e taxonomia do guaraná *Paullinia cupana* var. *sorbilis* e taxa afins da Amazônia. EMBRAPA-UEPAE, Manaus, v. 3, 281p. 1984.

LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W.; de BRUIJN, F.J. The three ds of PCR-based genomic analysis of phytobactéria: diversity, detection, and disease diagnosis. *Annual Review Phytopathologi*, v. 37, p. 81-125. 1999.



LU, G.; CANNON, P.F.; REID, A.; SIMMONS, C.M. Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycological Research*, v. 108, n° 1, p. 53-63. 2004.

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

MAJER, D.; MITHEN, R.; LEWIS, B.G.; VOS, P.; OLIVER, R.P. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycological Research*, v. 100, p. 1107-1111. 1996.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, v. 27, p. 209-220. 1967.

MARQUES, C.; PEREIRA, J.; COSTA NETO, P.; RONDON, A. Caracterização molecular de espécies de *Colletotrichum* isolados de frutos de açaí. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, Recife: Ed. Universitária da UFPE, p. 194. 2007.

MARTIN, M.P.; FIGUERES, G. *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* cause anthracnose on olives. *European Journal of Plant Pathology*, v. 105, p. 733-741. 1999.

MEDEIROS-GALVÃO, R.S. 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. 1998.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ARAÚJO, W.L.; RAAIJMAKERS, J.M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n° 22, p. 7259-7267. 2007.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, p. 523-524. 2002.

MILEO, L.J.; BENTES, J.L.S.; SILVA, J.F.; CHRISTOFFOLETI, P.J. Plantas de cobertura de solo como hospedeiras alternativas de *Colletotrichum guaranicola*. *Planta Daninha*. Viçosa-MG, v. 24, n° 4, p. 677-683. 2006.

MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 98, p. 137-144. 1992.

MITCHELL, J.I.; ZUCCARO, A. Sequences, the environment and fungi. *Mycologist*, v. 20, p. 62-74. 2006.

MORIWAKI, J.; SATO, T.; TSUKIBOSHI, T. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. *Mycoscience*, v. 44, p. 47-53. 2003.

MUCCIARELLI, M.; SCANNERINI, S.; BERTEA, C.; MAFFEI, M. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. *New Phytologist*, v. 158, p. 579-591. 2002.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.*, v. 155, p. 335-350. 1987.

MUNAUT, F.; HAMAIDE, N.; MARIOTTE, H. Genomic and pathogenic diversity in *Colletotrichum gloeosporioides* from wild native Mexican *Stylosanthes* spp., and taxonomic implications. *Micological Research*, v. 106, p. 479-593. 2002.

NALINI, M.S.; MAHESH, B.; TEJESVI, M.V.; PRAKASH, S.H.; SUBBAIAH, V. KINI, K.R.; SHETTY, H. Fungal endophytes from the three-leaved caper, *Crataeva magna* (Lour.) D.C. (Capparidaceae). *Mycopathologia*, v. 159, p. 245-249. 2005.

NAKYANZI, M. Molecular and pathogenic diversity of isolates of *Mycosphaerella fijiensis* that cause black Sigatoka disease of bananas in East África. Tese de Doutorado. England, University of Greenwich, Natural Resources Institute, 232p. 2002.

NASCIMENTO FILHO, F.J.; ATROCH, A.L. Guaranazeiro. In: BRUCKNER, C.H. (Ed.). *Melhoramento de Fruteiras tropicais*. UFV, Viçosa, Minas Gerais, p.291-307. 2002.

NETO, P.A.S.P.; AZEVEDO, J.L.; CAETANO, L.C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromática*, v. 3, p. 69-72. 2004.

O'NEILL, N.R.; van BERKUM, P.; LIN, J.J.; KUO, J.; UDE, G.N.; KENWORTHY, W.; SAUNDERS, J.A. Application of amplified restriction fragment length polymorphism for genetic characterization of *Colletotrichum* pathogens of alfalfa. *Phytopathology*, v. 87, nº 7, p. 745-750. 1997.

ONIONS, A.H.S.; ALLSOPP, D.; EGGINS, H.O.W. *Smith's introduction to industrial mycology*. 7ª ed., Edward Arnold, London, 398p. 1981.

OSONO, T. Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*) in British Columbia. *Mycoscience*, v. 48, p. 47-52. 2007.

PANTOJA, A. Pequena contribuição no estudo do guaraná. Boletim da Inspetoria Regional de Fomento Agrícola do Estado do Pará. Belém, v. 10, p. 35-50. 1960.

PENNA, E.B. da S. Microrganismos endofíticos em erva-mate (*Ilex paraguariensis*, ST. HIL.) e variabilidade genética em *Phyllosticta* sp. por RAPD. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 130p. 2000.

PEREIRA, J.O. 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. 1993.

PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a preliminary study. *Mycologia*, Lancaster, v. 85, p. 362-364. 1993.

PEREIRA, J.O.; SOUZA, A.Q.L.; HANADA, R.E. Diversidade de microrganismos endofíticos de plantas da Amazônia Brasileira. In: *Micologia: avanços no conhecimento*. COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A.M. (Org.). Sociedade Brasileira de Micologia, Ed. Universitária da UFPE, p. 141-149. 2007.

PERES, A.P.; SILVA-MANN, R.; VIEIRA, M.G.G.C.; MACHADO, J.C. Variabilidade morfocultural e genética de fungos associados à podridão peduncular do mamão. *Ciências Agrotec.*, v. 27, nº 5, Lavras, Minas Gerais, p. 1053-1062. 2003.

PERES, N.A.R.; KURAMAE, E.E.; DIAS, M.S.C.; SOUZA, N.L. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v. 150, p. 128-134. 2002.

PERNEEL, M.; TAMBONG, J.T.; ADIOBO, A.; FLOREN, C.; SABARÍO, F.; LÉVESQUE, A.; HÖFTE, M. Intraspecific variability of *Pythium myriotylum* isolated from cocoyam and other host crops. *Mycological Research*, v. 110, p. 583-593. 2006.

PERNEZNY, K.; ROBERTS, P.D.; MURPHY, J.F.; GOLDBERG, N.P. *Compendium of Pepper Diseases*. The American Phytopathological Society. 2003.

PERUCH, L.A.M. Controle integrado da antracnose no maracujá amarelo. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 92p. 1998.

PETRINI, O. 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. 1986.

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWS, J.; HIRANO, S.S. (ed.). *Microbial ecology of leaves*. New York, Spring Verlag, p. 179-197. 1991.

PFENNINGER, M.; POSADA, D. Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution*, v. 56, p. 2002.

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, K.D. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. *Mycological Research*, v. 105, p. 1508-1513. 2001.

PIMENTEL, I.C.; KUCKKOWSKY, F.R.; CHIME, A.M.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI Jr, A. Fungos endofíticos em folha de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). *Floresta Curitiba*, v. 36, p. 123-128. 2006.

PIRES, J.M. Guaraná e cupana. *Revista da Sociedade Agrônômica e Veterinária*, Belém, v. 1, nº 3, p. 9-20. 1949.

PLOETZ, R.C.; SCHNELL, R.J.; YING, Z.; ZHENG, Q.; OLANO, C.T.; MOTAMAYOR, J.C.; JOHNSON, E.S. Analysis of molecular diversity in *Crinipellis pernicioso* with AFLP markers. *European Journal of Plant Pathology*, v. 111, p. 317-326. 2005.

PUTERKA, G.J.; BLACK, W.C.; STEINER, W.M.; BURTON, R.L. 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. 604-618. 1993.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, v.1, p. 17-20. 1985.

RODRIGUEZ, R.J.; REDMAN, R.S. Fungal life-styles and ecosystems dynamics biological aspects of plant pathogens, plant endophytes and saprophytes. *Advances in Botanical Research*, v. 24, p. 169-193. 1997.

ROHLF, F.J. NTSYS – PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics, Inc. Exerter Publishing, New York, 218p. 1998.

RUDGERS, J.A.; KOSLOW, J.M.; CLAY, K. Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. *Ecology Letters*, v. 7, p. 42-51. 2004.

RUSSO, C.A.M.; MIYAKI, C.Y.; PEREIRA, S.L. Reconstrução filogenética: métodos geométricos. In: *Biologia Molecular e Evolução*. MATIOLI, S.R. (ed.). Ribeirão Preto, São Paulo, p.108-16. 2001.

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

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S.H. Evolution of endophytic-plant symbioses. *Trends in Plant Science*, v. 9, p. 275-280. 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2<sup>a</sup> ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

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

SCHMIDT, H.; ADLER, A.; HOLST-JENSEN, A.; KLEMSDAL, S.S.; LOGRIECO, A.; MACH, R.L.; NIRENBERG, H.I.; THRANE, U.; TORP, M.; VOGEL, R.F.; YLI-MATTILA, T.; NIESSEN, L. An integrated taxonomic study of *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* based on the use of composite datasets. *International Journal of Food Microbiology*, v. 95, p. 341-349. 2004.

SCHNEIDER, S.; EXCOFFIER, L.; LAVAL, G. Arlequin Version 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Computacional and Molecular Population Genetics Lab (CMPG), Institute of Zoology, University of Berne*. Adquirido de: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>. 2006.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. *Mycological Research*, v. 109, p. 661-686. 2005.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; AUST, H.J.; RÖMMERT, A.K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, v. 106, p. 996-1004. 2002.

SEGHERS, D.; WITTEBOLLE, L.; TOP, E.M.; VERSTRAETE, W.; SICILIANO, S.D. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n° 3, p. 1475-1482. 2004.

SHARMA, P.N.; KAUR, M.; SHARMA, O.P.; SHARMA, P.; PATHANIA, A. Morphological, pathological and molecular variability in *Colletotrichum capsici* the cause of fruit rot of chilies in the subtropical region of north-western. *Journal of Phytopathology, Berlin*, v. 153, p. 232-237. 2005.

SIEBER, T.; RIESEN, T.K.; MÜLLER, E.; FREÍD, P.M. Endophytic fungi in four winter wheat cultivars (*Triticum sativum* L.) differing in resistance against *Stagonospora nodorum* (Berk.) Cast & Germ=*Septoria nodorum* (Berk.) Berk. *Journal of Phytopathology*, v. 122, p. 289-306. 1988.

SINCLAIR, J.B. Latent infection of soybean plants and seeds by fungi. *Plant Disease, St. Paul*, v. 75, p. 220-224. 1991.

SILVA, R.L.O.; LUZ, J.S.; SILVEIRA, E.B.; CAVALCANTE, T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). *Acta Botanica Brasílica*, v. 20, nº 3, p. 649-655. 2006.

SILVA-MANN, R.; VIEIRA, M.G.G.C.; MACHADO, J.C.; BERNARDINO-FILHO, J.R.; SALGADO, K.C.C.; STEVENS, M.R. AFLP markers differentiate isolates of *Colletotrichum gossypii* from *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, nº 2, p. 169-172. 2005.

SILVEIRA, E.B. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: *Proteção de plantas na agricultura sustentável*. BARROS, R.; MICHEREFF, S.J. (Eds.), Imprensa Universitária da UFRPE, Recife, p. 71-100. 2001.

SMITH, K.T.; BACON, C.W.; LUTTRELL, E.S. Reciprocal translocation of carbohydrates between host and fungus in bahiagrass infected with *Myriogenospora arramentosa*. *Phytopathology*, nº 75, p. 407-411. 1985.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. *Numerical taxonomic*. San Francisco: W.R. Freeman, 573p. 1973.

SOLL, D.R. The ins and outs of DNA fingerprinting the infections fungi. *Clinical Microbiology Review*, v. 13, p. 332-370. 2000.

SOUZA, A.G.C.; SOUSA, N.R.; SILVA, S.E.L.; NUNES, C.D.M.; COUTO, A.C.; CRUZ, L.A.A. *Fruteiras da Amazônia*. Brasília, EMBRAPA-SPI; Manaus: EMBRAPA-CPAA. 204p. 1996.

SREENIVASAPRASAD, S.; MILLS, P.R.; MEEHAN, B.M.; BROWN, A.E. Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome*, v. 39, p. 499-512. 1996a.

SREENIVASAPRASAD, S.; SHARADA, K.; BROWN, A.E.; MILLS, P.R. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology*, v. 45, p. 650-655. 1996b.

STROBEL, G.A. Rainforest endophytes and bioactive products. *Crit. Rev. Biotechnol.* V. 22, p. 315-333. 2002.

STROBEL, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, v. 5, nº 6, p. 535-544. 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, v. 67, n° 2, p. 257-268. 2004.

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

STROBEL, G.A.; HESS, W.M.; LI, J.Y.; FORD, E.; SEARS, J.; SIDHU, R.S.; SUMMERELL, B. *Pestalotiopsis guepenii*, a taxol producing endophyte of the Wollemi Pine, *Wollemia nobilis*. *Australian Journal of Botanic*, v. 45, p. 1073-1082. 1997.

STROBEL, G.A.; FORD, E.; LI, J.Y.; SEARS, J.; SIDHU, R.S.; HESS, W.M. *Seimatoantlerium tepuiense* gen. nov. a unique endophytic fungus producing taxol from the Venezuelan-Guayana System. *Applied Microbiology*, v. 22, p. 426-433. 1999.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, n° 04, p. 491-502. 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.*, 67: 257-268. 2004.

SUFRAMA. Projeto Potencialidades Regionais Estudo de Viabilidade Econômica – Guaraná. 28p. 2003.

SUTTON, B.C. *The Coelomycetes*. Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute. 696p. 1980.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGGER, M.J. (Eds.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford, U.K.: CAB International, p. 1-26. 1992.

TAECHOWISAN, T.; PEBERDY, J.F.; LUMYONG, S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 19, p. 381-385. 2003.

TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n° 6, p. 2987-2998. 2005.

TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H. Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins. *Phytopathology*, St. Paul, v. 92, p. 986-996. 2002.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, 18(4): 448-459. 2001.

TANAKA, M.A.S.; PASSOS, F.A. Caracterização patogênica de *Colletotrichum acutatum* e *C. fragariae* associados à antracnose do morangueiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, nº 5, p. 484-488. 2002.

TEJESVI, V.M.; MAHESH, B.; NALINI, M.S.; PRAKASH, H.S.; KIMI, K.R.; SUBBIAH, V.; SHETTY, H.S. Endophytic fungal assemblages from inner bark and twig of *Terminalia arjuna* W. & A. (Combretaceae). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 21, p. 1535-1540. 2005.

TEMPLETON, A.R.; CRANDALL, K.A.; SING, C.F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence. III Cladogram estimation. *Genetics*, v. 132, p. 619-633. 1992.

TOOLEY, P.W.; GOLEY, E.D.; CARRAS, M.M.; O'NEILL, N.R. AFLP comparisons among *Claviceps africana* isolates from the United States, Mexico, Africa, Australia, India, and Japan. *Plant Disease*, v. 86, nº 11, p. 1247-1252. 2002.

TOZZE JÚNIOR, H.J.; BUENO, C.R.N.C.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Colletotrichum* sp. de hortaliças solanáceas. *Summa Phytopathologica, Botucatu*, v. 30, p. 73. 2004.

TOZZE JÚNIOR, H.J.; MELLO, M.B.A.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Caracterização morfológica e fisiológica de isolados de *Colletotrichum* sp. causadores de antracnose em solanáceas. *Summa Phytopathologica, Botucatu, São Paulo*, v. 32, p. 71-79. 2006.

TOZZE JÚNIOR, H.J.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Caracterização tradicional de espécies de *Colletotrichum*. In: *Workshop Regional Sobre Colletotrichum: Colletotrichum'2007*. Recife, Pernambuco, 1 CD-ROM. 2007.

TUDZYNSKI, B.; SHARON, A. Biosynthesis, biological role and application of fungal phytohormones. In: *The Mycota. Vol X, Industrial Applications*, Springer Verlag, Berlin, p. 183-212. 2002.

UNTERSEHER, M.; REIHER, A.; FINSTERMEIER, K.; OTTO, P.; MORAWETZ, W. Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. *Mycological Progress*, v. 6, p. 201-212. 2007.

VELÁSQUEZ, V.B.; CÁRCAMO, M.P.; MERIÑO, C.R.; IGLESIAS, A.F.; DURÁN, J.F. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. *Genetics and Molecular Biology*, v. 30, nº 1, p. 89-99. 2007.



VERÁS, S.M.; GASPAROTTO, L.; MENEZES, M. Variabilidade fisio-morfológica de *Colletotrichum guaranicola* em diferentes substratos. Arq. Biol. Tecnol. v. 40, nº 2, p. 297-305. 1997.

VINNERE, O.; FATEHI, J.; WHRIGHT, S.A.I.; GERHARDSON, B. The causal agent of anthracnose of *Rhododendron* in Sweden and Latvia. Mycological Research, v. 106, p. 60-69. 2002.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. Von de; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, v. 23, nº 21, p. 4407-4414. 1995.

VUJANOVIC, V.; BRISSON, J. A comparative study of endophytic mycobiota in leaves of *Acer saccharum* in eastern North America. Mycological Progress, v. 1, p. 147-154. 2002.

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

WHITE, T.J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H.A. The polymerase chain reaction. Trends Genet., v. 5, p. 185-188. 1989.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). PCR Protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, New York, p. 315-322. 1990.

WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations. The University of Chicago Press, London. 1978.

YUAN, J.I.; JIAN-NAN, B.I.; BING, Y.A.N.; XU-DONG, Z.H.U. Taxol-producing fungi: a new approach to industrial production of taxol. Chine Journal of Biotechnology, v. 22, p. 1-6. 2006.

ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application N° 0534858 A1. 1993.

ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; PASSAGLIA, M.P. (Eds.). Biologia Molecular Básica. Mercado Aberto, ed. 3, Porto Alegre. 2003.

ZOU, W.X.; MENG, J.C.; LU, H.; CHEN, G.X.; SHI, G.X.; ZHANG, T.Y.; TAN, R.X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides* an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. Journal of Natural Products, v. 63, nº 11, p. 1529-1530. 2000.

## 8 ANEXOS

Matriz de distância para 40 isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Glomerella cingulata*\* obtida com o programa NTSYS-PC utilizando o método UPGMA.

Nº	Isolado **	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	EGM4																			
2	EGM23	0,11																		
3	EGM27	0,11	0,16																	
4	EGM28	0,07	0,05	0,08																
5	EGM31	0,04	0,06	0,1	0,13															
6	EGM2	0,09	0,22	0,20	0,15	0,15														
7	EGM9	0,23	0,13	0,15	0,08	0,06	0,16													
8	EGM14	0,10	0,13	0,11	0,14	0,10	0,14	0,16												
9	EGM15	0,19	0,12	0,10	0,06	0,08	0,11	0,29	0,12											
10	EGM18	0,18	0,17	0,20	0,07	0,1	0,14	0,24	0,17	0,22										
11	EGM19	0,26	0,10	0,11	0,06	0,07	0,09	0,28	0,13	0,24	0,23									
12	EGM20	0,20	0,07	0,07	0,07	0,06	0,11	0,17	0,12	0,19	0,17	0,1								
13	EGM5	0,08	0,17	0,19	0,12	0,21	0,24	0,16	0,24	0,08	0,14	0,09	0,08							
14	EGM24	0,07	0,13	0,18	0,12	0,18	0,18	0,09	0,12	0,10	0,12	0,06	0,09	0,25						
15	EGM29	0,12	0,10	0,12	0,10	0,05	0,12	0,07	0,16	0,06	0,09	0,08	0,06	0,24	0,12					
16	EGM30	0,10	0,11	0,17	0,07	0,10	0,13	0,08	0,14	0,11	0,08	0,07	0,11	0,17	0,13	0,08				
17	PGM3	0,24	0,08	0,09	0,09	0,08	0,10	0,24	0,10	0,22	0,21	0,27	0,16	0,07	0,05	0,09	0,05			
18	PGM4	0,13	0,06	0,08	0,13	0,10	0,10	0,16	0,12	0,15	0,12	0,16	0,17	0,07	0,08	0,09	0,09	0,19		
19	PGM5	0,08	0,13	0,13	0,06	0,09	0,12	0,14	0,12	0,15	0,13	0,13	0,12	0,12	0,09	0,08	0,09	0,2	0,18	
20	PGM6	0,22	0,08	0,11	0,05	0,05	0,10	0,2	0,11	0,16	0,17	0,21	0,20	0,09	0,09	0,09	0,08	0,32	0,18	0,18
21	PGM1	0,10	0,15	0,16	0,11	0,08	0,14	0,12	0,12	0,16	0,13	0,10	0,13	0,17	0,15	0,14	0,14	0,09	0,08	0,14
22	EGF1	0,08	0,08	0,06	0,01	0,06	0,08	0,10	0,06	0,07	0,07	0,07	0,05	0,05	0,06	0,05	0,02	0,10	0,08	0,16
23	EGF5	0,18	0,07	0,12	0,07	0,08	0,07	0,15	0,11	0,14	0,14	0,19	0,16	0,07	0,09	0,09	0,12	0,18	0,20	0,14
24	EGF7	0,07	0,14	0,15	0,08	0,16	0,15	0,12	0,1	0,16	0,11	0,11	0,08	0,21	0,21	0,13	0,12	0,07	0,10	0,14
25	EGF8	0,06	0,10	0,1	0,07	0,14	0,08	0,06	0,05	0,05	0,09	0,04	0,04	0,08	0,08	0,06	0,07	0,04	0,05	0,08
26	EGF11	0,09	0,13	0,11	0,06	0,14	0,12	0,08	0,11	0,10	0,14	0,10	0,09	0,16	0,09	0,07	0,13	0,08	0,06	0,10
27	EGF13	0,15	0,10	0,09	0,09	0,08	0,07	0,12	0,14	0,12	0,10	0,08	0,11	0,13	0,12	0,07	0,08	0,12	0,08	0,11
28	EGF16	0,09	0,12	0,17	0,08	0,07	0,12	0,12	0,15	0,09	0,12	0,08	0,10	0,15	0,06	0,09	0,13	0,09	0,08	0,09
29	EGF17	0,07	0,15	0,14	0,13	0,11	0,14	0,09	0,09	0,11	0,07	0,06	0,07	0,18	0,18	0,12	0,11	0,08	0,10	0,08
30	EGF21	0,05	0,12	0,07	0,05	0	0,08	0,07	0,05	0,04	0,05	0,04	0,05	0,08	0,08	0,03	0,16	0,05	0,04	0,04
31	EGF14	0,07	0,09	0,07	0,11	0,05	0,11	0,08	0,12	0,08	0,08	0,06	0,07	0,13	0,12	0,16	0,12	0,06	0,11	0,09
32	EGF19	0,07	0,12	0,10	0,06	0,11	0,16	0,05	0,12	0,06	0,12	0,08	0,07	0,16	0,15	0,12	0,20	0,10	0,06	0,10
33	EGF24	0,08	0,13	0,12	0,07	0,06	0,14	0,09	0,11	0,09	0,10	0,05	0,10	0,17	0,15	0,12	0,17	0,09	0,06	0,10

Continuação...

Nº	Isolado **	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
34	ESC1	0,12	0,15	0,15	0,11	0,07	0,13	0,12	0,08	0,09	0,14	0,1	0,13	0,15	0,15	0,15	0,18	0,09	0,07	0,10
35	ESC2	0,08	0,16	0,11	0,07	0,12	0,15	0,11	0,11	0,09	0,09	0,07	0,10	0,19	0,18	0,09	0,10	0,08	0,08	0,11
36	ERC5	0,11	0,18	0,19	0,05	0,06	0,12	0,10	0,14	0,10	0,12	0,10	0,10	0,18	0,12	0,15	0,22	0,08	0,09	0,12
37	ERC6	0,10	0,12	0,12	0,12	0,08	0,07	0,12	0,12	0,09	0,09	0,10	0,11	0,13	0,11	0,11	0,14	0,09	0,09	0,13
38	ERC7	0,13	0,15	0,09	0,13	0,08	0,11	0,13	0,09	0,09	0,09	0,09	0,11	0,16	0,14	0,10	0,11	0,10	0,10	0,10
39	EEC4	0,10	0,16	0,14	0,11	0,12	0,14	0,16	0,12	0,15	0,15	0,08	0,15	0,22	0,19	0,13	0,15	0,12	0,16	0,14
40	EEC5	0,12	0,16	0,16	0,11	0,10	0,11	0,17	0,12	0,12	0,14	0,12	0,13	0,14	0,16	0,14	0,14	0,12	0,12	0,13

Continuação...

Nº	Isolado **	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
20	PGM6																					
21	PGM1	0,10																				
22	EGF1	0,10	0,09																			
23	EGF5	0,23	0,09	0,07																		
24	EGF7	0,08	0,20	0,15	0,09																	
25	EGF8	0,01	0,06	0,05	0,05	0,10																
26	EGF11	0,07	0,12	0,09	0,07	0,16	0,17															
27	EGF13	0,11	0,13	0,17	0,10	0,17	0,08	0,13														
28	EGF16	0,12	0,14	0,06	0,09	0,16	0,03	0,09	0,14													
29	EGF17	0,06	0,14	0,12	0,08	0,22	0,03	0,09	0,14	0,19												
30	EGF21	0,05	0,11	0,04	0,07	0,09	0,03	0,06	0,06	0,08	0,13											
31	EGF14	0,05	0,09	0,03	0,12	0,10	0,08	0,14	0,09	0,10	0,16	0,12										
32	EGF19	0,07	0,15	0,08	0,11	0,13	0,07	0,14	0,09	0,16	0,17	0,17	0,23									
33	EGF24	0,11	0,14	0,09	0,10	0,13	0,07	0,13	0,12	0,19	0,25	0,08	0,18	0,22								
34	ESC1	0,11	0,21	0,07	0,13	0,18	0,08	0,15	0,09	0,21	0,19	0,17	0,24	0,21	0,23							
35	ESC2	0,11	0,14	0,09	0,09	0,21	0,06	0,13	0,11	0,15	0,19	0,12	0,12	0,21	0,18	0,16						
36	ERC5	0,11	0,16	0,07	0,11	0,13	0,07	0,10	0,09	0,15	0,16	0,13	0,17	0,2	0,22	0,23	0,17					
37	ERC6	0,09	0,14	0,03	0,11	0,14	0,05	0,11	0,06	0,13	0,14	0,08	0,15	0,15	0,15	0,23	0,15	0,26				
38	ERC7	0,09	0,14	0,07	0,10	0,14	0,06	0,07	0,08	0,19	0,16	0,18	0,08	0,18	0,14	0,18	0,15	0,21	0,19			
39	EEC4	0,12	0,19	0,10	0,12	0,19	0,08	0,12	0,15	0,22	0,19	0,09	0,15	0,19	0,20	0,26	0,19	0,19	0,19	0,21		
40	EEC5	0,11	0,20	0,12	0,11	0,17	0,09	0,15	0,15	0,19	0,19	0,15	0,16	0,17	0,23	0,24	0,21	0,18	0,15	0,19	0,26	

\* Isolados de *G. cingulata*: EGM20, PGM4, EGF8, EGF16, EEC4 e EEC5. \*\* EGM – isolados endofíticos de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) de Maués; PGM – isolados patogênicos de guaranazeiro de Maués; EGF – isolados endofíticos de guaranazeiro da

Fazenda Experimental/Manaus; ESC – isolados endofíticos de *Strychnos* sp. do Campus Universitário/Manaus; ERC – isolados endofíticos de *Rollinia* sp. do Campus Universitário/Manaus; EEC – isolados endofíticos de açazeiro (*Euterpe oleraceae*) do Campus Universitário/Manaus.