

## Identificação Molecular baseada no Sequenciamento de rDNA de Fungos Endofíticos Foliare de *Passiflora* spp.

**Mariana Sanches Santos<sup>1</sup>, Maria Carolina dos Santos e Silva<sup>2</sup>, Thiago Tognolli de Almeida<sup>1</sup>, Aretusa Cristina Felber<sup>1</sup>, Sandro Augusto Rhoden<sup>1</sup>, João Lúcio de Azevedo<sup>2</sup>, e João Alencar Pamphile<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular CEP 87020-900 Maringá – Paraná - E-mail: [mari\\_sanches\\_s@hotmail.com](mailto:mari_sanches_s@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade de São Paulo – Centro de Energia Nuclear na Agricultura CEP 13400-970 Piracicaba – São Paulo.

### RESUMO

*Endófitos, geralmente fungos e bactérias, vivem sistematicamente no interior das plantas, sem causar aparentemente dano a seus hospedeiros. Eles colonizam principalmente as partes aéreas dos vegetais. A planta hospedeira, bem como sua idade, distribuição geográfica, clima, entre outros fatores, influenciam a variedade de endófitos que pode ser encontrada. Este trabalho teve como objetivo a identificação molecular de fungos endofíticos isolados de *Passiflora* spp. Foi amplificado o rDNA de 18 isolados endofíticos empregando os **primers** ITS1 e ITS4. Estes amplificados foram utilizados no sequenciamento com o **primer** ITS1 e analisados no MEGABACE. As sequências foram editadas no BioEdit e empregadas no Blast do NCBI. Dos dezoito isolados de *Passiflora* spp., o rDNA de um endófito foi sequenciado com sucesso: o endófito Isol.12. Este apresentou maior identidade com *Cercospora* sp. o que foi confirmado na análise filogenética.*

**Palavras-chave:** *Passiflora*, endofítico, molecular.

### INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos vivem no interior de plantas habitando, de modo geral, suas partes aéreas, sem causar, aparentemente, qualquer dano aos seus hospedeiros. Eles distinguem-se dos patogênicos, que causam doenças nas plantas, e dos epifíticos que vivem na superfície dos vegetais<sup>I</sup>.

O maracujá-azedo ou maracujá-amarelo é uma planta de clima tropical, encontrando em todo território Brasileiro, onde apresenta excelentes condições ecológicas para o seu cultivo. O maracujá-doce (*Passiflora alata*) é a terceira espécie mais cultivada, nativa da América do Sul, vem a cada ano, ganhando mais espaço no mercado das frutas doces para o uso **in natura**, e de interesse comercial em programas de melhoramento genético, por suas características agronômicas<sup>II</sup>.

As regiões ITS (**Internal Transcribed Spacer**) do RNA ribossomal são regiões conservadas do DNA que auxiliam no estabelecimento de relações filogenéticas e distinção de espécies<sup>III</sup>. A identificação de fungos endofíticos tem sido realizada por meio de regiões ITS que possibilitam a identificação de gêneros de fungos isolados de plantas, por meio da amplificação

e sequenciamento desses isolados, que são conferidos com um banco de dados <sup>IV</sup>; <sup>I</sup>, possibilitando futuramente sua utilização em processos biotecnológicos.

O objetivo geral do trabalho foi identificar molecularmente por sequenciamento do ITS1-5,8S-ITS2 rDNA fungos endofíticos isolados de *Passiflora* spp.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

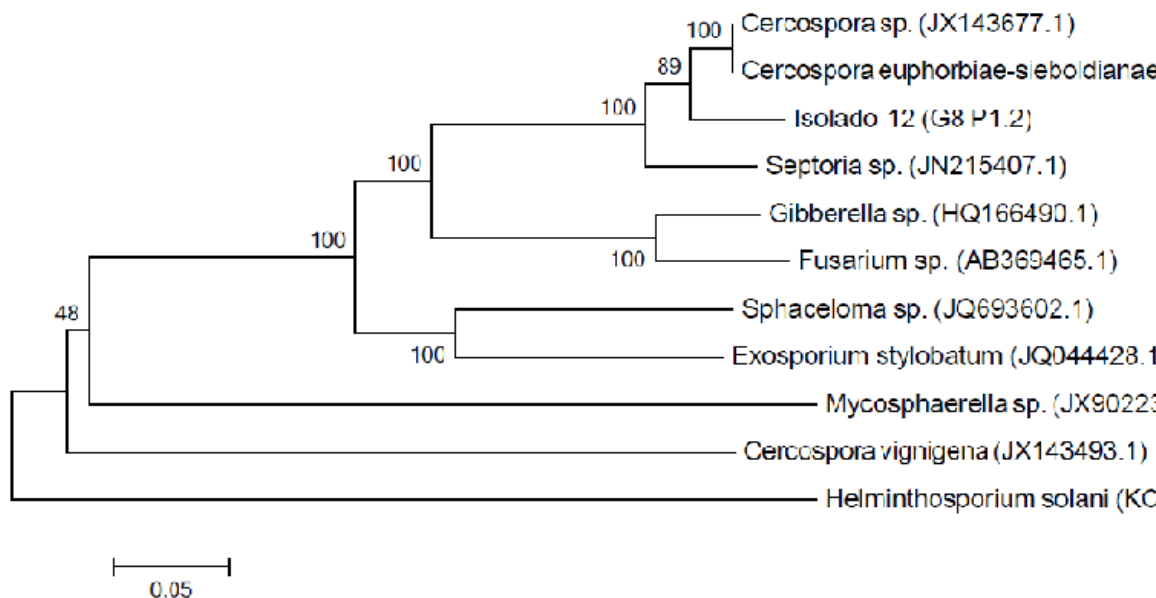
Foram identificados molecularmente fungos endofíticos já isolados da planta *Passiflora* spp. que fazem parte do banco de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia Microbiana - UEM. Foi realizada a extração do DNA genômico utilizando a metodologia descrita por Pamphile e Azevedo<sup>V</sup>, modificada. Para se estimar a concentração do DNA foi utilizado o DNA genômico de cada amostra, mais tampão de amostra, sendo submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0 %. Foram utilizados fragmentos das regiões ITS1- 5,8S - ITS2 do DNA ribossomal. A região foi amplificada utilizando os **primers** ITS1 e ITS4. Os fragmentos amplificados foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%. Os produtos de amplificação das regiões ITS 1- 5,8S – ITS2 rDNA dos fungos endofíticos isolados foram purificados. Após a purificação, o DNA dos isolados endofíticos foi quantificado em gel de agarose a 1%. Depois disso, os produtos de amplificação das regiões ITS 1- 5,8S – ITS2 rDNA dos fungos endofíticos isolados foram purificados. As amostras foram então colocadas em placa para o sequenciamento.

As amostras foram sequenciadas utilizando os DNAs correspondentes à região ITS1-5,8S – ITS2 rDNA. A reação de sequência foi realizada pela técnica de PCR. O sequenciamento foi realizado em sequenciador **MegaBACE**™ 1000 **sequencer (Amersham Biosciences)**. Após, as amostras foram analisadas e editadas. Para a identificação dos isolados, as sequências nucleotídicas encontradas foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados NCBI (**National Center for Biotechnology Information website**), utilizando o programa BLAST para pesquisa das espécies. A identificação das espécies foi determinada baseada no melhor valor de resultado obtido quanto à similaridade. Feito isso, as sequências determinadas foram alinhadas usando o programa MEGA versão 5.1 com o agrupamento pelo método **neighbor-joining**, usando-se **p-distance** para nucleotídeos com a opção **the pairwise gap deletion** e usando **bootstrap** com 10.000 repetições e usando **bootstrap** com 1000 repetições para determinar a distância genética dos fungos isolados.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Dos dezoito fungos isolados de *Passiflora* spp. para identificação, apenas o Isol. 12 (G8 P1.2) apresentou um resultado do sequenciamento com qualidade suficiente para a análise filogenética. Para a identificação do isolado, a sequência nucleotídica encontrada foi comparada com aquelas depositadas no banco de dados NCBI (**National Center for Biotechnology Information website**), utilizando o programa BLAST para pesquisa das espécies. Com uma homologia de semelhança de 99%, o fungo G8 P1.2 foi identificado como *Cercospora* sp. Na análise filogenética, as sequências de tais endófitos e outras do NCBI foram usadas, confirmando que Isol.12 é semelhante a *Cercospora* sp. (Figura 1).

**Figura 1** - Árvore filogenética construída pelo método de agrupamento "Neighbor-joining" usando-se "p-distance" para nucleotídeos com a opção "the pairwise gap deletion".



O isolado G8P1.2 foi associado ao clado constituído pelas espécies *Cercospora* sp. com 100 % **bootstrapping** (BP). O gênero *Cercospora* caracteriza-se pelo lento crescimento e pela reduzida esporulação em meios de cultura<sup>VI</sup>. Algumas espécies são conhecidas como causa de severas epidemias de cercosporiose, tal doença é causada pelo patógeno *Cercospora zeae-maydis*, havendo indicação da ocorrência também da espécie *C. sorghi* var. *maydis*, no Brasil<sup>VII</sup>.

### CONCLUSÕES

Existe pelo menos um fungo endofítico de *Passiflora* spp. com grande identidade a *Cercospora* sp.

### REFERÊNCIAS

1. AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR., W.; ARAUJO, W. L.; PEREIRA, J. O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUSC, 2002. cap. 8, p. 235-268.
2. ANSELMO, R.M.; JUNQUEIRA, N.T.V. Doenças do maracujá-doce (*passiflora alata* dryand) na região do cerrado. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁZEIRO, 5, 1998, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Funep, 1998, p.360-362.
3. CHEN, C.A., *et al.* Secondary structure and phylogenetic utility of the Ribossomal Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) in Scleractinian corals. **Zoological Studies**. 43, 759-771, 2004.
4. RUBINI, M.R.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; POMELLA, A.W.V.; MAKI, C.S.; ARAÚJO, W.L.; SANTOS, D.R.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological



**Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia**  
**Trabalho Completo apresentado na seção: PÔSTER**

control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **Int. J. Biol. Sci.** v. 1, p. 24-33, 2005

5. PAMPHILE, J. A.; AZEVEDO, J. L. Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (= *Fusarium moniliforme*) from maize (*Zea mays* L.). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. Holanda, v. 18, n. 5, p. 391-396, 2002.

6. BRUNELLI, K. R.; FAZZA, A.C.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; CAMARGO, L.E.A. Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora zeaemaydis*. **Summa Phytopatologica**, v. 32, p. 92-94, 2006.

7. CASELA, C. R; FERREIRA, A. da S. A Cercosporiose na Cultura do Milho. **Circular Técnica**, v. 24,p. 65, 2003.