



IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR BASEADA NO SEQUENCIAMENTO DE rDNA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS FOLIARES DE *Trichilia elegans*

Mariana Sanches Santos¹; Tiago Tognolli de Almeida²; Aretusa Cristina Felber³; Ravely Casarotti Orlandelli⁴; João Lúcio de Azevedo⁵; João Alencar Pamphile⁶

RESUMO: Endófitos, geralmente fungos e bactérias, vivem sistematicamente no interior das plantas, sem causar aparentemente dano a seus hospedeiros. 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 *Trichilia elegans*. Foi amplificado o rDNA de 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 isolados de *Trichilia elegans*, o rDNA de um endófito foi sequenciado com sucesso: o endófito Isol. 2-58. Este apresentou maior identidade com *Diaporthe sp* o que foi confirmado na análise filogenética.

PALAVRAS-CHAVE: *Trichilia elegans*; endofítico; molecular.

1 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. (AZEVEDO et al., 2002).

Trichilia elegans A. Juss. pertence a família Meliaceae com espécies distribuídas ao longo da região tropical americana. Nos remanescentes florestais e nas regiões, próximas a Maringá, Paraná, Brasil, três espécies de *Trichilia* podem ser encontradas: *T. catigua* A. Juss (catigua), *T. pallida* Sw. (baga-de-morcego) e a *T. elegans* A. Juss. (pau-deervilha-cachua). Estas espécies possuem uma ampla distribuição, no Sul e na América Central, sendo *T. elegans* mais abundante no Sul do Brasil (SOUZA et al., 2001). Algumas plantas do gênero *Trichilia* são utilizadas o Brasil na medicina popular no tratamento de reumatismo, malária, com a finalidade de provocar vômito e também possui caráter purgativo (GARCEZ et al., 1996).

¹Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná. (UEM). mari_sanches_s@hotmail.com

²Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Paraná. Bolsista CAPES. tiagotognolli@hotmail.com

³Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná. (UEM). are264@hotmail.com

⁴Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná. (UEM). ravelycasarotti@gmail.com

⁵Pesquisador Visitante Nível 1 do CNPq no Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular - UEM. jazevedo@esalq.usp.br

⁶Docente do Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular - Universidade Estadual de Maringá (UEM, Maringá, Paraná). prof.pamphile@gmail.com

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 (CHEN *et al.*, 2004). 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 (RUBINI *et al.*, 2005; AZEVEDO *et al.*, 2002), 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 *Trichilia elegans*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram identificados molecularmente fungos endofíticos já isolados da planta *Trichilia elegans* 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 (2002), 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 para determinar a distância genética dos fungos isolados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos fungos isolados de *Trichilia elegans* para identificação, apenas o Isol. 2-5 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 98%, o fungo 2-58 foi identificado como

Diaporthe sp. Na análise filogenética, as sequências de tais endófitos e outras do NCBI foram usadas, confirmando que Isol. 2-58 é semelhante a *Diaporthe* sp. (Figura 1).

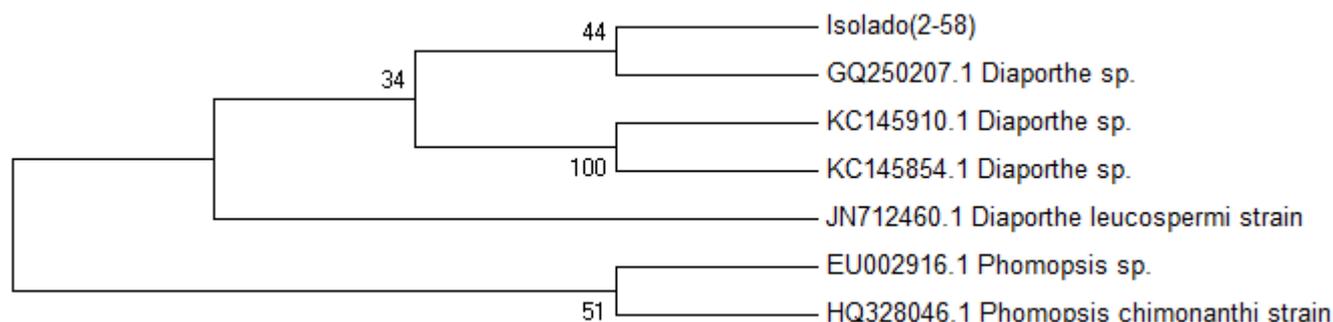


FIGURA 1: Árvore filogenética construída pelo método de agrupamento “Neighbor-joining” usando-se “p-distance” para nucleotídeos com a opção “the pairwise gap deletion”.

4 CONCLUSÃO

Existe pelo menos um fungo endofítico de *Trichilia elegans* com grande identidade a *Diaporthe* sp.

REFERÊNCIAS

- 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.
- CHEN, C.A., *et al.* Secondary structure and phylogenetic utility of the Ribossomal Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) in Scleractinian corals. **Zoological Studies**. v.43, p.759-771, 2004.
- GARCEZ, F. R., GARCEZ, W. S., RODRIGUES, E. D., POTT, V. J., ROQUE, N. F. Secoprotolimonoïds from *Trichilia elegans* spp. *Elegans*. **Phytochemistry**. p. 1399-1403, 1996.
- 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.
- 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 control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**. v. 1, p. 24-33, 2005.

SOUZA, L. A. D.; MOSCHETA, I. S., MOURAO, K. M. S.; SILVERIO, A. Morphology and anatomy of the Flowers of *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. And *T. pallida* Sw. (Meliaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**: v. 44, p. 383-394, 2001.

Anais Eletrônico

VIII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar
UNICESUMAR – Centro Universitário Cesumar
Editora CESUMAR
Maringá – Paraná – Brasil