

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Paula Luize Camargos Fonseca

**DIVERSIDADE DE FUNGOS E VÍRUS DA ENDOSFERA FOLIAR E CAULINAR DE
SERINGUEIRAS (*Hevea brasiliensis*) NATIVAS DA AMAZÔNIA ORIENTAL**

BELO HORIZONTE - MG

DEZEMBRO DE 2016

Paula Luize Camargos Fonseca

**DIVERSIDADE DE FUNGOS E VÍRUS DA ENDOSFERA FOLIAR E CAULINAR DE
SERINGUEIRAS (*Hevea brasiliensis*) NATIVAS DA AMAZÔNIA ORIENTAL**

**Dissertação de mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito para obtenção do título de
Mestre em Microbiologia.**

Orientador: Prof. Dr. Aristóteles Goés Neto (UFMG)

Co-orientadora: Profa Dra. Giliane de Souza Trindade (UFMG)

Colaboradores:

Prof. Dr. Jônatas Santos Abrahão (UFMG)

Prof. Dr. João Marques Trindade (UFMG)

Prof. Dra. Vera Lúcia dos Santos (UFMG)

BELO HORIZONTE

DEZEMBRO DE 2016

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE QUADROS.....	vii
RESUMO.....	12
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Fungos endofíticos.....	15
1.1.1 Diversidade dos fungos endofíticos.....	16
1.1.2 Estudos de ecologia dos Fungos Endofíticos.....	19
1.1.3 Interação ecológica entre fungos endofíticos e plantas.....	20
1.2 Seringueira (Hevea brasiliensis): Aspectos botânicos e econômicos, distribuição e histórico.....	23
1.3. Estudos de metagenoma.....	28
1.3.1 Sequenciamento de pequenos RNAs	29
1.4 Amplificação quantitativa e digital.....	33
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4. FLUXOGRAMA	39
5. MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1 Áreas de coleta.....	40
5.2. Isolamento e preservação dos fungos endofíticos	42
5.3. Identificação dos fungos endofíticos.....	43
5.4 Análises estatísticas de ecologia de comunidades.....	44
5.5. Extração do RNA total das folhas de Hevea brasiliensis	45
5.6. Visualização da integridade do RNA extraído	46
5.7. Dosagem do RNA ribossomal em eletroforese microfluídica	47
5.8. Sequenciamento em larga escala da amostra selecionada.....	48
5.9. Sequenciamento de pequenos RNAs	49
5.10. Análise do sequenciamento de pequenos RNAs.....	50
5.11. RT-PCR.....	51
5.12. Desenho de iniciadores para qPCR.....	52
5.13. Amplificação quantitativa (qPCR) para detecção viral.....	52
5.14. Amplificação digital (ddPCR)	54
5.15. Análises filogenéticas.....	55
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
6.1. Áreas de coleta	58
6.2. Isolamento e preservação dos fungos endofíticos	58
6.3. Identificação dos fungos endofíticos.....	60
6.4. Análises estatísticas	63
6.4.1. Ao nível de gêneros.....	63
6.4.2. Ao nível de Unidades Taxonômicas Organizacionais	67
5.5. Extração de RNA total do tecido foliar de Hevea brasiliensis.....	70
6.6. Visualização da integridade do RNA extraído	71
6.7. Análise Qualiquantitativa do RNA total em eletroforese microfluídica.....	72

6.8. Envio das amostras para o sequenciamento e sequenciamento de pequenos RNAs	73
6.9. Análise do sequenciamento de pequenos RNAs	74
6.10 RT-PCR	77
6.11. Iniciadores para qPCR	80
6.12. Amplificação quantitativa (qPCR) e digital (ddPCR) para confirmação do vírus da família Tymoviridae	85
7. CONCLUSÕES	98
8. PERSPECTIVAS	100
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	101
10. ANEXOS	119
11. Apoio	164

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da unidade de repetição do rDNA dos eucariontes.....	19
Figura 2. Características da seringueira (<i>Hevea</i> sp.). A: Extração de látex; B: Sementes; C: Fruto; D: Folha composta.....	24
Figura 3. Evolução da produção de borracha por microrregião (1990 - 2014). (Somain & Droulers, 2016).....	27
Figura 4. Produção e consumo mundial de borracha no ano de 2012. (Instituto Agrônômico, 2015).....	28
Figura 5. As principais vias de pequenos RNAs gerados pelo sistema imune do hospedeiro.(i) via do siRNA; (ii) via do miRNA; (iii) via do piRNA. (Ghildiyal & Zamore, 2009).	32
Figura 6. Mapa do Parque Nacional de Anavilhanas. (ICMBio (http://www.icmbio.gov.br/portal)).	40
Figura 7. Mapa do Floresta Nacional de Caxiuanã. (ICMBio (http://www.icmbio.gov.br/portal)).	41
Figura 8. Identificação dos locais de retirada dos fragmentos das folhas dos vegetais coletados. Os fragmentos possuem 5 mm ² de área.....	42
Figura 9. Curva de acumulação dos fungos endofíticos isolados de <i>Hevea brasiliensis</i> na Floresta Nacional de Caxiuanã e no Parque Nacional de Anavilhanas.....	63
Figura 10. Relação entre os gêneros identificados nas áreas de estudo. A: Gêneros específicos e comuns a ambas áreas de coleta.	64
Figura 11. Frequência dos gêneros em relação a abundância. Gêneros com um isolado foram incluídos.	66
Figura 12. Abundância dos seis OTUs mais prevalentes no tecido foliar em cada indivíduo de <i>Hevea brasiliensis</i> coletado. A1 –A4 Indivíduos da PARNA Anavilhanas 1 – 4; C1-C5 Indivíduos da FLONA Caxiuanã 1-5.	68
Figura 13. Ordenação por Escalonamento Dimensional Não-Métrico (NMDS) baseado na composição da comunidade de fungos endofíticos nas folhas de indivíduos de <i>Hevea brasiliensis</i> pela distância de Jaccard. + - OTUs identificadas no estudo.....	69
Figura 14. Ordenação por Escalonamento Dimensional Não-Métrico (NMDS) baseado na composição da comunidade de fungos endofíticos nas folhas de indivíduos de <i>Hevea</i> sp. pela distância de Hellinger. + - OTUs identificadas no estudo.....	70

Figura 15. Imagem do eletroferograma obtido a partir da análise da integridade da amostra do Indivíduo 2 de RNA total analisado em eletroforese microfluídica.....	73
Figura 16. Mapa da região da Polimerase de RNA dependente de RNA (RpRd) em que foram formados 14 contigs com alta identidade viral.....	75
Figura 17. Pequenos RNAs. A. Perfil de pequenos RNAs do contig 6_5; B. cobertura dos pequenos RNAs montados do contig 6_5.	76
Figura 18. Amplificação para o gene da Actina. A: Gel de poliacrilamida 8% com o produto de qPCR evidenciando a amplificação para o gene da actina.	80
Figura 19. Curva de amplificação e curva de melt da reação para detecção do vírus da família Tymoviridae usando o par de iniciadores do contig 6_5.	85
Figura 20. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% evidenciando a não amplificação dos iniciadores do contig 6_5.	86
Figura 21. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% evidenciando a amplificação dos iniciadores do contig 6_5 na concentração 10 pmol e diluição 1:100 a 60°C.	87
Figura 22. Curva de amplificação da reação para detecção do vírus da família Tymoviridae usando os pares de iniciadores e sondas dos contigs 15_14, 12_11_60_59 e 13_12_29_28... ..	88
Figura 23. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% evidenciando a amplificação da amostra C2 para os contigs 12_11_60_59, 15_14 e 13_12_29_28. L: marcador de peso molecular (Ladder); C-: controle negativo de cada reação.	89
Figura 24. Perfil de amplificação da ddPCR para o par de iniciadores e sonda do contig 37_35_16_15. A: Na temperatura de 58°C e B: Na temperatura de 60°C.....	90
Figura 25. Perfil de amplificação da ddPCR para os iniciadores e sondas sintetizados na temperatura de 58°C.....	91
Figura 26. Características da partícula viral da família Tymoviridae. Na esquerda, virion do vírus Turnip yellow mosaic vírus (TYMV).	94
Figura 27. Árvore filogenética da região da polimerase. Árvore construída pelo método de distância (Neighbor Joining) com espécies representativas da ordem Tymovirales, a partir das sequências de proteína.	96
Figura 28. Árvore filogenética da região da polimerase. Análise filogenética realizada pelo método de inferência Bayesiana pelo modelo LG + I + G com espécies representativas da ordem Tymovirales, a partir das sequências de proteína.	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características usadas para classificação entre as classes. (Adaptado de Rodriguez <i>et al.</i> , 2008).....	18
Tabela 2. Impacto do mal-das-folhas sulamericana nos países da América Central e América do Sul até o ano de 2006 (Adaptado de Lieberei, 2007).	26
Tabela 3 - Concentração e volume dos reagentes do mix M-MLV.	52
Tabela 4. Reagentes usados para uma reação de qPCR.	53
Tabela 5. Reagentes usados em uma reação de ddPCR.	55
Tabela 6. Sequências virais usadas nas análises filogenéticas.	56
Tabela 7. Número de isolados por indivíduo de <i>Hevea brasiliensis</i> coletado.	59
Tabela 8. Taxons identificados pela análise da região da região ITS.	61
Tabela 9. Grupos formados pelo alinhamento no MAFFT e agrupamento no MOTHUR.	62
Tabela 10. Abundância dos isolados por Filo e por Classe.....	64
Tabela 11. Índices de diversidade dos fungos endofíticos por local de coleta e por origem. .	67
Tabela 12. Quantificação e qualidade das amostras após a extração de RNA utilizando-se extração orgânica com TRIzol®.	71
Tabela 13. Informações sobre os dados obtidos no sequenciamento de sRNAs.....	75
Tabela 14. Sequenciamento da amostra de <i>Hevea brasiliensis</i> amplificada para a região da actina.	79
Tabela 15. Características dos iniciadores desenhados para amplificação.	82
Tabela 16. Número de cópias viral nas amostras de RNA total, DNA complementar (cDNA) e produto amplificado.....	92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Protocolo de extração de DNA.	47
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus celcius
%	Porcentagem
+ssRNA	RNA fita simples polaridade positiva
ug	Micrograma
uL	Microlitro
Ago	Argonauta
BeMV	<i>Belladonna mottle virus</i>
CCMB	Coleção de cultura de micro-organismos da Bahia
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Ct	Ciclo <i>threshold</i>
Dcr	Dicer
ddPCR	Reação em cadeia da polimerase digital
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	<i>Double strand</i> DNA/ DNA fita dupla
dsRNA	<i>Double strand</i> RNA / RNA fita dupla
FgMTV1	<i>Fusarium graminearum mycotymovirus 1</i>
Flona	Floresta Nacional
g	Gramma
<i>g</i>	Gravidade
GC	Guanina – Citosina

ha	Hectares
HA	Adaptado ao hábitat
Hel	Helicase
ICMBIO	Instituto Chico Mendes de Biodiversidade
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
ITS	Região transcrita interna
Kb	Quilobase
Km	Quilômetro
L	Litro
M	Molar
MA	Micorrízicos Arbusculares
MEA	Ágar extrato de malte
mg	Miligramas
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Mtr	Metiltransferase
ng	Nanograma
nM	Nano molar
nt	Nucleotídeo

NHA	Não adaptado ao hábitat
ORF	<i>Open Reading frame</i> / Janela de Leitura aberta
PARNA	Parque Nacional
pb	Par de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
piRNA	<i>Piwi interacting RNA</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RISC induzido	RNA – <i>induced silencing complex</i> / complexo de RNA de silenciamento
RNAi	RNA de interferência
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
rRNA	RNA ribossomal
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa
sgRNA	RNA subgenômico
sRNA	Small RNA/ pequeno RNA
siRNA	Pequenos RNAs de interferencia
t	Toneladas
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>

TYMV	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>
uL	Microlitro
U	Unidade
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
V	Voltz

RESUMO

No interior de tecidos vegetais existem micro-organismos simbióticos que podem interagir e auxiliar na protecção das plantas contra patógenos, como por exemplo, os fungos endofíticos. Fungos endofíticos residem no tecido vegetal vivo sem provocar sintomas de doença no hospedeiro. A diversidade de fungos sugere que eles podem conferir características importantes para o hospedeiro, como por exemplo, promovendo o aumento da imunidade da planta contra patógenos. *Hevea brasiliensis* é a melhor planta para a produção de látex natural. O centro de origem do gênero *Hevea* é a região amazônica. Sabe-se que esta espécie é suscetível à várias doenças provocadas por fungos e vírus, dentre elas, o mal-das-folhas sulamericano (SALB) e a doença foliar viral. Essas doenças são responsáveis pela redução da produção de látex pela *H. brasiliensis* e podem levar à morte da planta. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a comunidade de fungos endofíticos e detectar fitopatógenos associados à folhas e alburno de indivíduos de *H. brasiliensis* da Floresta Nacional de Caxiuanã (PA) e do Parque Nacional de Anavilhanas (AM). Cinco folhas foram coletadas a partir de cada um dos nove indivíduos de plantas das duas Unidades de Conservação. Um total de 335 isolados de fungos foram purificados, preservados, depositados em coleção e identificados, pertencendo a 23 gêneros distribuídos em 87 grupos de similaridade (OTUs - Unidades Taxonômicas Operacionais). As espécies identificadas foram agrupadas e por análises de ordenação foi possível assinalar espécies comuns e específicas para cada região de coleta, indicando que a comunidade de fungos endofíticos em cada local seja diferente. Um indivíduo completamente assintomático para qualquer doença fúngica ou viral (C2) foi selecionado para o sequenciamento em larga-escala de pequenos RNAs (metatranscritômica de sRNA). Ao final do processo, foi possível mapear e montar *contigs* pertencentes ao fungo *Pseudocercospora ulei*, patógeno do SALB e um vírus da família Tymoviridae, provavelmente uma nova espécie, nunca descrito infectando seringueiras. Para confirmar a presença do vírus nas folhas dos indivíduos, foram desenhados iniciadores com sondas altamente específicas para a detecção por amplificação quantitativa (qPCR) e digital (ddPCR). Nos dois métodos utilizados, foi possível detectar o vírus usando diferentes regiões do seu genoma, porém a ddPCR apresentou maior sensibilidade de detecção e foi possível quantificar de forma absoluta o provável novo vírus. Para a confirmação da presença do fungo *P.ulei*, serão desenhados iniciadores específicos para a detecção em ddPCR. Outros indivíduos de seringueiras de outras regiões da Amazônia brasileira serão testadas para a

detecção do vírus da família Tymoviridae. Este trabalho permitiu a detecção de dois fitopatógenos e pode ser útil para o estudo de doenças que acometem *H. brasiliensis* e para a melhor compreensão desses patógenos quando estão vivendo endofiticamente no hospedeiro ainda assintomático.

ABSTRACT

Within vegetal tissues there are symbiotic microorganisms that can interact and help in the protection of plants against pathogens, such as endophytic fungi. Endophytic fungi reside in living plant tissues without causing symptoms of disease in the host. The fungi diversity suggests that they may confer important characteristics to the host, for example, by increasing plant's immunity against pathogens. *Hevea brasiliensis* is the best plant for natural latex production. The center of origin of the genus *Hevea* is the Brazilian Amazon region. It is known that this genus is susceptible to various diseases caused by fungi and viruses, as South American Leaf Blight (SALB) and viral leaf disease. These illnesses are responsible for the reduction of latex production by *H. brasiliensis* and can lead to plant death. The objective of this work was to characterize the endophytic fungi community and detect phytopathogens associated with leaves and sapwood of *H. brasiliensis* in National Forest of Caxiuanã (PA) and National Park of Anavilhanas (AM). Five leaves were collected from nine plant individuals from the two conservation areas. A total of 335 fungal isolates were purified, preserved, deposited in collection and identified belonging to 23 genera distributed in 87 similarity groups (Operational Taxonomic Units – OTUs). The species were grouped and by ordination analysis it was possible to identify common and specific species for each collection site, indicating that the endophytic fungi community in each location is different. One individual completely asymptomatic for any fungal or viral disease (C2) was selected for small RNA sequencing (metatranscriptome of sRNA). At the end of the process, it was possible to set up contigs corresponding to the fungus *Pseudocercospora ulei*, SALB pathogen and a virus related to Tymoviridae family, probably a new species, never described infecting rubber trees. To confirm the presence of virus in the individual leaves, primers were designed with highly specific probes for detection by quantitative (qPCR) and digital (ddPCR) amplification. In both amplifications, it was possible to detect different parts of its genome, however ddPCR presented greater detection sensitivity and it was possible to quantify absolutely the viral material. To confirm the presence of the fungus *P. ulei*, specific primers for detection in ddPCR will be designed. Further rubber tree individuals from other Brazilian Amazon region will be tested for the Tymoviridae family virus detection. This work allowed two phytopathogens detection and may be useful for the study of diseases that affect *H. brasiliensis* and for better understanding of these pathogens when they are living endophytically in asymptomatic host.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fungos endofíticos

O reino Fungi representa um dos grupos de organismos com maior diversidade da Terra, e estimativas sugerem a existência de aproximadamente 5.1 milhões de espécies de fungos, dos quais somente cerca de 5% já foram descritos (Blackwell, 2011). Os fungos exercem diversos papéis ecológicos nos ecossistemas. Os sapróbios são importantes na ciclagem de nutrientes, atuando especialmente na degradação da matéria orgânica; os parasitas (agentes que vivem permanentemente às custas dos seus hospedeiros) e patogênicos (parasitos que provocam enfermidades) são capazes de acometer diversos organismos, incluindo protozoários, algas, plantas, outros fungos e animais, incluindo humanos; e os mutualistas associam-se com diversos organismos permitindo a exploração de novos habitats e recursos pelos organismos associados (Lutzoni *et al.*, 2004).

As plantas mantêm uma relação de simbiose com fungos endofíticos e micorrízicos (Rodríguez, 2008, Vaz *et al.*, 2014), os quais são capazes de exercer várias funções na evolução, ecologia e diversidade dos vegetais. Enquanto os fungos micorrízicos colonizam as raízes e a rizosfera, os fungos endofíticos são capazes de residir em diversos tecidos vegetais, como por exemplo, folha, caule, raiz, frutos e flores (Rodríguez, 2008; Smith & Read, 2008).

O termo endofítico foi proposto pela primeira vez por De Bary (1866), referindo-se aos micro-organismos que colonizam o interior de tecidos vegetais. Em 1991, Carroll utilizou o termo especificamente para organismos que provocam infecção assintomática na planta hospedeira (Carroll, 1991). Por sua vez, Petrini (1991) propôs que o termo fosse utilizado para todos os organismos capazes de colonizar o interior de tecidos vegetais. A junção dos conceitos resultou na definição atual, que são aqueles fungos que colonizam o interior de tecidos vegetais, por pelo menos um período do seu ciclo de vida sem provocar nenhuma sintomatologia à planta hospedeira (Bacon & White, 2000). Pode-se considerar que a relação entre os fungos e as plantas hospedeiras é considerada ubíqua, uma vez que já foram descritas tanto em plantas terrestres quanto aquáticas e foi sugerido que a maioria das plantas formam associações simbióticas com fungos endofíticos (Petrini *et al.*, 1986; Stone *et al.*, 2000).

A grande maioria dos fungos endofíticos pertence ao filo Ascomycota e poucos ao filo Basidiomycota. Os fungos endofíticos infectam as plantas por estruturas de infecção, como o apressório, ou diretamente pela penetração no tecido da planta através das hifas. Esses fungos

são divididos em grupos funcionais ou em quatro classes baseado no tipo de hospedeiro, colonização, transmissão e função ecológica (Rodriguez *et al.*, 2008).

Vários estudos (Arnold *et al.*, 2000; Redman *et al.*, 2001) demonstraram que fungos endofíticos influenciam na adaptabilidade da planta hospedeira (tolerância a diferentes concentrações de sal, doenças, temperatura, herbivoria e biomassa), auxiliando a planta na adaptação ao ambiente, na resistência contra patógenos, temperatura e demais estresses ambientais.

1.1.1 Diversidade dos fungos endofíticos

Estudos indicam que a associação entre plantas e fungos endofíticos já existe por mais de 400 milhões de anos, demonstrando a importância dos fungos na evolução das plantas hospedeiras (Rodriguez *et al.*, 2008, Rodriguez & Redman, 2008). Rodriguez *et al.* (2008) propõe uma divisão em quatro classes dos fungos endofíticos. O primeiro deles é chamado de Classe I ou Clavicipitáceos (endofíticos-C), os quais são encontrados em infecções sistêmicas em gramíneas e associados a insetos e são transmitidos verticalmente através das sementes. Os endofíticos-C são formados por poucas espécies e a maioria pertencente aos gêneros *Epichloe* e *Balansia* e seus respectivos anamorfos *Neotyphodium* e *Ephelis* da família Clavicipitaceae (Hypocreales, Ascomycota). Os fungos dessa classe podem aumentar a resistência da planta hospedeira à herbivoria, a patógenos e à dessecação, além de aumentar a tolerância a metais pesados. A resistência à herbivoria é devido a produção de metabólitos secundários produzidos pelos fungos, como a ergovalina e a peramina (atividade citotóxica e inseticida, respectivamente) (Alexopoulos *et al.*, 1996; Schulz & Boyle, 2005). Em contrapartida, os fungos aproveitam da proteção contra fatores abióticos e da competição com fungos epifíticos (fungos que residem na superfície de tecidos vegetais) e se nutrem no espaço apoplástico ou o espaço intracelular do tecido vegetal (Saikkonen *et al.*, 1998).

A segunda, terceira e quarta classes compreendem fungos não-clavicipetáceos (endofíticos-NC), os quais apresentam alta diversidade e podem colonizar folhas, caules e raízes. Assim como os fungos endofíticos-C, esses fungos são beneficiados pela proteção e nutrição do hospedeiro. Em compensação, os fungos auxiliam na adaptação da planta hospedeira ao ambiente (modificações e estresses) e resistência a patógenos e herbivoria (Strobel & Dayse 2003; Linnakoski *et al.*, 2011).

A classe II apresenta grande número de espécies e normalmente uma frequência alta em raízes, caules e folhas de plantas em ambientes com alto estresse e, por isso, são capazes de formar infecções sistêmicas na planta hospedeira. A maior parte dos fungos dessa classe pertencem ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomicotina e algumas espécies do filo Basidiomycota, subfilos Agaricomycotina e Pucciniomycotina. Alguns exemplos são os gêneros *Fusarium*, *Colletotrichum* e *Curvularia*. A transmissão ocorre tanto horizontal quanto verticalmente. Nessa classe há exemplos de fungos que protegem o hospedeiro contra diferentes fitopatógenos fúngicos, através da produção de metabólitos secundários, parasitismo e/ou indução de infecção sistêmica. Schulz *et al.* (1999) verificou que os fungos endofíticos *Fusarium oxysporum* e *Cryptosporiopsis* sp. produziam compostos fenólicos (catequina, vanilina, epicatequina, 4-hidroxibenzoato, tetrahidroxiestilbeno entre outros compostos) em altas concentrações para inibir o crescimento de patógenos nos hospedeiros *Larix decidua* e *Hordeum vulgare*. Durante o período de senescência da planta, diferentes fungos dessa classe emergem e esporulam, sendo, por isso, considerados também sapróbios (Weber *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2008).

A Classe III geralmente ocorre em tecidos aéreos e, por isso, a infecção é considerada restrita. Habitualmente está presente em diferentes hospedeiros, principalmente em folhas de árvores tropicais, ocorrendo também, de uma maneira geral, em briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas tanto em clima tropical, temperado, boreal e no continente da Antártica (Arnold *et al.*, 2001; Gamboa & Bayman, 2001; Murali *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2008). Esses fungos pertencem principalmente ao filo Ascomycota nas classes Sordariomycetes, Dothideomycetes, Pezizomycetes e Leotiomycetes e, em menor número, ao filo Basidiomycota. Alguns exemplos de fungos são os gêneros *Pestalotiopsis*, *Xylaria* e *Phomopsis* (Schulz & Boyle, 2005; Rodriguez *et al.*, 2008)

Por último, os fungos da Classe IV são fungos miceliais septados e melanizados (“*Dark Septate Endophyte*”, DSE) que colonizam raízes e possuem transmissão horizontal, com baixa especificidade de hospedeiro e de ambiente e, por isso, são ubíquos. Normalmente são ascomicetos e formam estruturas melanizadas (hifas e microesclerócios) nas raízes das plantas hospedeiras. Alguns exemplos de gêneros pertencentes a essa classe são *Chloridium*, *Leptodontidium* e *Phialocephala*. (Alexopoulos *et al.*, 1996; Schulz & Boyle, 2005; Rodriguez *et al.*, 2008). As principais características para classificação dos quatro grupos de fungos endofíticos estão na Tabela 1.

Na classificação feita por Rodriguez e colaboradores (2008), não estão incluídos os fungos micorrízicos arbusculares (MA). A associação micorrízica constitui o sistema radicular absorptivo de aproximadamente 90% das plantas terrestres (Smith and Read, 2008) e pode ser classificada em sete tipos (Harley and Smith 1983, Peterson *et al.*, 2004), sendo os fungos MA o tipo mais abundantemente encontrado na natureza. Essa simbiose propicia o melhor desenvolvimento do vegetal, devido ao aumento na absorção de água e nutrientes, principalmente fósforo (P), pelas hifas do fungo MA (Smith and Read, 2008, Gomes, *et al.*, 2010). Em condições ambientais de estresse, como, por exemplo, baixa disponibilidade de água e matéria orgânica, os MA podem aumentar a concentração de P nas raízes (Bustamante *et al.*, 2012; Morton *et al.*, 2004).

Tabela 1. Características usadas para classificação entre as classes de fungos endofíticos. (Adaptado de Rodriguez *et al.*, 2008).

Critérios	<u>Clavicipitaceae</u>		<u>Não -Clavicipitaceae</u>	
	Classe I	Classe II	Classe III	Classe IV
Hospedeiro	Estrito	Amplio	Amplio	Amplio
Tecidos colonizados	Rizoma e tecidos aéreos	Tecidos aéreos, raíz e rizoma	Tecidos aéreos	Raiz
Colonização na planta	Extensa	Extensa	Limitada	Extensa
Biodiversidade na planta	Baixa	Baixa	Alta	Desconhecida
Transmissão	Vertical/ Horizontal	Vertical/ Horizontal	Horizontal	Horizontal
Benefícios da planta*	NHA	NHA/HA	NHA	NHA

* Não adaptado ao habitat (NHA): Benefícios relacionados ao crescimento da planta independente do seu ambiente. Adaptado ao habitat (HA): Benefícios resultantes da pressão ambiental do local, como pH, temperatura e salinidade.

Muitos fungos apresentam características morfológicas similares e complexas, dificultando a sua identificação pela taxonomia clássica. Uma alternativa para a identificação correta pode ser através da amplificação e sequenciamento da região dos espaçadores internos transcritos ITS1 e ITS2 e do gene 5.8S do RNA ribossomal nuclear (rRNA) (Figura 1),

considerada como o código de barras primário de fungos (Schoch *et al.*, 2012). Esta região compreende cerca de 600 pares de bases e foi escolhida por ser de fácil obtenção (simplicidade), ser altamente conservada (universalidade) e por apresentar variabilidade intergenômica (Freire, 2008). Além disso, os bancos de dados apresentam uma elevada quantidade de dados referentes à essas sequências (Schoch *et al.*, 2012).

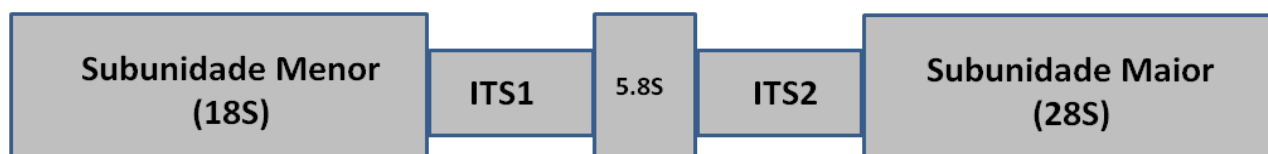


Figura 1. Representação esquemática da unidade de repetição do rDNA dos eucariontes.

1.1.2 Estudos de ecologia dos Fungos Endofíticos

O reino Fungi apresenta mais de 100.000 mil espécies, sendo estimada a presença de aproximadamente 5,1 milhões de espécies (Arnold *et al.*, 2000; Blackwell, 2011). Apesar da sua importância na indústria, na agricultura e na medicina, pouco ainda se sabe a respeito da diversidade fúngica e, principalmente, sobre a sua dinâmica de comunidade. Fungos endofíticos foram descritos em todas as plantas já estudadas em todo o mundo e, por isso, são considerados ubíquos (Arnold *et al.*, 2000). Os estudos iniciais sobre fungos endofíticos eram concentrados apenas na sua taxonomia. Com o passar do tempo, os estudos começaram a focar em aspectos ecológicos dos fungos endofíticos e sua presença no hospedeiro (Petrini, 1992; Fisher *et al.*, 1993; Saikkonen *et al.*, 1998; Sieber, 2007).

Durante a evolução das plantas, as associações feitas com fungos promoveram adaptações no hospedeiro relacionadas à capacidade de defesa contra patógenos e herbivoria, aumento do crescimento vegetal e resistência a fatores ambientais (Clay & Schardl, 2002). A comunidade de fungos endofíticos geralmente apresenta especificidade de hospedeiro à nível de espécie. Este fato pode ser devido ao ambiente que o hospedeiro está exposto, logo, o hospedeiro será infectado apenas com os fungos presentes naquela região e que terão acesso ao hospedeiro (Petrini, 1992; Deng & Cao, 2016). Os fungos podem apresentar especificidade de infecção por determinado tecido, sugerindo sua adaptação as condições fisiológicas do hospedeiro. Geralmente apenas um ou dois táxons são considerados dominantes em um determinado

hospedeiro e são considerados aqueles mais adaptados à vida endofítica. Também há vários táxons de fungos endofíticos que são capazes de infectar diferentes espécies de hospedeiros por exemplo os gêneros, *Phomopsis*, *Phoma* e *Colletotrichum*, e por isso são considerados gêneros generalistas. (Petrini, 1992; Aly *et al.*, 2011; Deng & Cao, 2016).

Hospedeiros da mesma espécie que estão localizados próximos uns dos outros possuem perfil similar de espécies fúngicas, mas podem apresentar diferenças na abundância e na distribuição quando comparados com espécies de plantas jovens e adultas. Petrini & Carroll (1981) sugeriram que há uma correlação entre riqueza de espécies e frequência de colonização de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta (jovem ou adulta). Geralmente, plântulas apresentam um número de fungos endofíticos menor do que plantas adultas.

A estrutura e estabelecimento da comunidade no interior do hospedeiro pode ser influenciada por fatores bióticos e abióticos, como temperatura, umidade, radiação solar e pluviosidade também podem interferir na comunidade fúngica, assim como há indícios que ações antropogênicas também são capazes de influenciar na diversidade e na riqueza de fungos endofíticos, por exemplo, poluentes do ar, plantações e inseticidas. Isso ocorre devido a colonização estar diretamente relacionada com as condições ecológicas. Se estas últimas estiverem desfavoráveis (escassez de nutrientes, temperaturas extremas, presença de patógenos, seca, etc.), a diversidade de fungos endofíticos na planta hospedeira será menor (Petrini *et al.*, 1992; Sieber, 2007; Deng & Cao, 2016).

Muitos autores sugerem que fungos endofíticos são muito diversos em florestas tropicais (Arnold, 2007). Arnold & Lutzoni (2007) demonstraram a incidência de fungos endofíticos do ártico até os trópicos e observaram que quanto menor a latitude, maior era a diversidade de fungos endofíticos em folhas. Além disso, foi possível constatar que 71,2% das espécies eram únicas para cada região analisada. Gazis & Chaverri (2010), demonstraram que os fungos endofíticos são mais comuns nas folhas, e isso se deve à transmissão horizontal na planta analisada (*H. brasiliensis*). Folhas são consideradas uma das comunidades fúngicas mais complexas de ecossistemas terrestres, pois nelas estão presentes espécies sapróbias, patogênicas e endofíticas, e essas espécies podem interagir com outros organismos que também estão presentes no interior ou na superfície (Unterseher *et al.*, 2013).

1.1.3 Interação ecológica entre fungos endofíticos e plantas

As interações entre plantas e fungos são diversas. Embora a associação seja assintomática e,

por isso, muitas vezes classificada como comensal ou mutualística, vários fungos também podem ser sapróbios e/ou patógenos oportunistas (Strobel & Daisy, 2003). Os fungos podem ser simbioses mutualistas, uma vez que o fungo não ativa as defesas do hospedeiro e mantém a infecção localizada e controlada pela planta, assim não há sintomatologia de infecção. Se os mecanismos de defesa da planta estiver em equilíbrio com a demanda de nutrientes do fungo e os seus fatores de patogenicidade, a associação continua equilibrada. Porém, fatores ambientais podem desestabilizar esse balanço. Primeiro, quando os mecanismos de defesa da planta conseguem neutralizar os fatores de patogenicidade do fungo e, conseqüentemente, o fungo irá sucumbir. A segunda, quando a planta for afetada pelos fatores de patogenicidade dos fungos e, então, o fungo se tornará patógeno daquela planta. Além disso, muitos fungos endofíticos podem ser patógenos latentes de plantas e, provavelmente, são influenciados por fatores ambientais para iniciarem a expressar os seus fatores de patogenicidade (Rodriguez *et al.*, 2008; Kusari *et al.*, 2012). Da mesma forma, fungos endofíticos podem ser sapróbios latentes e quando a planta entrar em senescência, o fungo será um dos primeiros colonizadores (Schulz & Boyle, 2005). Outros fatores também podem influenciar o equilíbrio entre o fungo e o hospedeiro, como mudanças fisiológicas e genéticas do hospedeiro e a adaptabilidade de ambos os organismos (Saikkonen *et al.*, 1998). Muitos fungos endofíticos podem ser considerados como fitopatógenos, como também, certos endófitos que não causam doenças em um hospedeiro podem ser patogênicos para outros hospedeiros (Araujo *et al.*, 2008). Ainda que os fungos sejam classificados como endofíticos, epifíticos e fitopatógenos (provocam doenças em plantas), não há um limite claro entre os grupos, e por isso devem ser levados em consideração fatores bióticos e abióticos e a interação dos fungos com outros micro-organismos (Saikkonen *et al.*, 1998; Azevedo, 1999).

Os benefícios e o papéis ecológicos dos fungos endofíticos ainda não são muito bem compreendidos, mas estudos sugerem que eles podem ser patógenos latentes, sapróbios latentes ou mutualistas que protegem a planta contra doenças e herbívoros (Carroll, 1988; Hyde *et al.*, 2009). Fungos sapróbios que colonizarem a planta ainda viva, poderão colonizar o tecido assim que a planta entrar no período de senescência, ganhando vantagem de acesso a nutrientes e açúcares sobre outros sapróbios que também irão colonizar o tecido durante esse período (Porras-Alfaro & Bayman, 2011).

Muitos fungos endofíticos auxiliam a planta hospedeira contra a herbivoria. Esses fungos produzem substâncias que agem como repelentes natural de insetos. Exemplos de

fungos endofíticos são *Acremonium lolii*, *Phomopsis oblonga*, *Muscodor vitigenus* e *Cladosporium shaerosperum*. Paralelamente, o fungo *Beauveria bassiana* é bastante usado no controle biológico de pragas no setor agroindustrial e também pode ser detectado como endofítico (Azevedo *et al.*, 2000; Araujo *et al.*, 2008).

Por outro lado, uma planta pode ser colonizada por mais de uma espécie fúngica ou por outros micro-organismos, como bactérias e vírus. Esses organismos residem no tecido vegetal e interagem continuamente com a planta hospedeira e, por isso, é possível que a planta interfira nos processos metabólicos dos micro-organismos e vice-versa. A interação entre os organismos endofíticos pode promover a produção de metabólitos secundários e esse contato pode ocorrer através de moléculas sinalizadoras, logo, um fungo pode sinalizar quimicamente para outro fungo ou bactéria produzir um metabólito específico (Kusari *et al.*, 2012). Schroeckh e colaboradores (2009), mostraram que a interação entre o fungo *Aspergillus nidulans* e uma Actinobacteria promove a ativação de genes do metabolismo secundário do fungo que, em condições normais (temperatura ambiente em local úmido), não são expressos. Marquez e colaboradores (2007) observaram a existência de relação simbiótica entre o vírus *Curvularia thermal tolerance virus*, o fungo endofítico ascomiceto *Curvularia protuberata* e a planta *Dichantheium lanuginosum*. A associação entre esses três distintos organismos permite que a planta sobreviva em regiões de elevadas temperaturas.

Diversos trabalhos tem demonstrado o potencial biotecnológico dos fungos endofíticos como promotores do crescimento vegetal e como produtores de moléculas de interesse (Gazis & Chaverri, 2010). Por exemplo, a planta *Taxus brevifolia* era usada em tratamentos de neoplasia por conter a substância taxol, um agente anti-tumor. Foi verificado que todas as espécies de *Taxus* possuíam a substância, mas em baixa quantidade. Para realização do tratamento, varios pedaços de madeira da planta eram retirados para a extração do taxol. Até que foram testados fungos endofíticos isolados da planta *T. brevifolia* para produção da substância e foi verificado que o fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, encontrado na planta *Taxus brevifolia*, é responsável pela produção de taxol na planta hospedeira (Stierle *et al.*, 1993).

Os fungos endofíticos podem ser antagonistas naturais de fitopatógenos, auxiliando na proteção da planta contra uma possível infecção. Em 2011, Rocha e colaboradores isolaram 435 fungos endofíticos de folhas de *Hevea brasiliensis* e testaram 88 desses isolados contra o fungo fitopatógeno *Pseudocercospora ulei*. Um total de 15 desses isolados pertencentes aos

gêneros *Fusarium*, *Phomopsis*, *Glomerella*, *Myrothecium*, *Microsphaeropsis* e *Pestalotiopsis* apresentaram atividade antagônica ao fitopatógeno, inibindo a germinação de conídios (esporos assexuais) de 80 a 100% de *P. ulei*.

Chaverri & Gazis (2011) mostraram que fungos endofíticos podem ser utilizados como uma alternativa para conter as infecções causadas por fungos fitopatogênicos. Medidas de proteção química como o benomil (0,5 g/L) e o carbendazim (0,9 g/L) ainda não foram suficientes para a produção de um clone resistente ou para o controle de doenças provocadas por fungos (Lieberei, 2007). Portanto, estudos sobre a diversidade de fungos endofíticos associados à *Hevea* podem levar a descoberta de novas espécies fúngicas úteis para o desenvolvimento de estratégias de controle do *P. ulei* e de outros fitopatógenos. Apesar dos estudos já descritos sobre as funções ecológicas dos fungos endofíticos e sua importância para a planta hospedeira, poucos são os estudos sobre a influência dos mesmos na biologia da planta e como a dinâmica da comunidade fúngica e de outros organismos endofíticos interferem no metabolismo da planta (Rodriguez *et al.*, 2008).

1.2 Seringueira (*Hevea brasiliensis*): Aspectos botânicos e econômicos, distribuição e histórico

O gênero *Hevea* é popularmente conhecido como seringueira, planta pertencente à família Euphorbiaceae, uma dicotiledônea monóica (possui flores femininas e masculinas no mesmo indivíduo) com folhas compostas e repartidas em três folíolos e fruto com geralmente três sementes (Figura 2). Essas plantas são lenhosas, arbóreas, de porte grande, podendo atingir até 50 metros de altura sob condições favoráveis (Gasparotto *et al.*, 1997). A produção de sementes inicia-se aos quatro anos e aos sete se inicia a produção de látex (Gasparotto *et al.*, 1997).

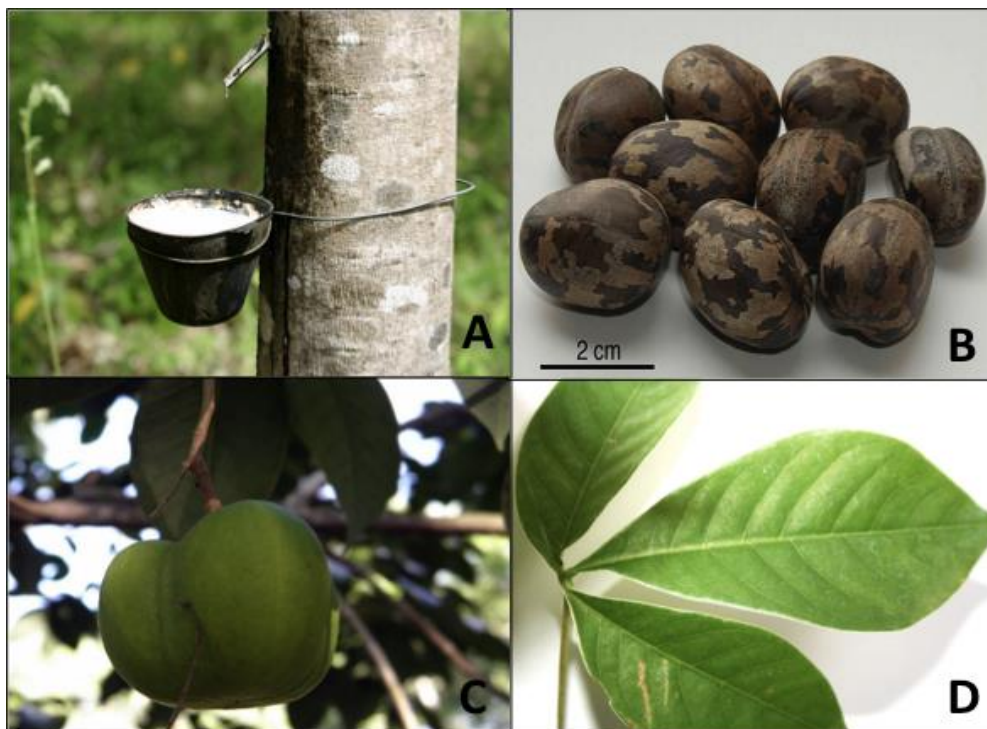


Figura 2. Características da seringueira (*Hevea* sp.). A: Extração de látex; B: Sementes; C: Fruto; D: Folha composta.

O centro de origem do gênero *Hevea* é a região amazônica brasileira no qual estão presentes 10 das 11 espécies conhecidas. A área de ocorrência do gênero estende-se para Bolívia, Colômbia, Peru, Venezuela, Equador, Suriname e Guiana (Francisco *et al.*, 2004).

A melhor espécie para a produção de látex é a *Hevea brasiliensis* (Chaverri & Gazis, 2010), uma vez que apresenta maior capacidade produtiva, maior variabilidade genética e o látex produzido apresenta elasticidade, resistência ao impacto, dispersão de calor e maleabilidade em temperaturas altas (Aoki *et al.*, 2014; Raulf, 2014), sendo, por isso, a espécie mais utilizada no mundo. O principal produto derivado do látex é a borracha natural, obtida a partir de partículas contidas no látex (Raulf, 2014; Instituto Agrônomo, 2015). As propriedades apresentadas pelo látex natural extraído de *H. brasiliensis*, em vários casos, não pode ser substituída pelo látex produzido pelo petróleo (látex sintético), já que os compostos sintéticos utilizados atualmente não apresentam as características necessárias para aplicações de alto desempenho como, por exemplo, para a produção de luvas cirúrgicas e pneus (Cornish, 2001).

No ano de 1841, começaram a ser exploradas no Brasil as plantações de seringueiras, também chamadas de seringais, uma vez que a borracha era um dos produtos da economia

nacional. No ano de 1876, o britânico Henry Alexander Wickham, contratado pela coroa inglesa, contrabandeou 70 mil sementes de *H. Brasiliensis*, sendo considerado um dos casos mais famosos de biopirataria do mundo. No ano de 1895 as sementes contrabandeadas foram plantadas na Malásia (Haag, 2009). Até o ano de 1910, a borracha era o segundo produto mais exportado do país, porém, em 1913, surge a doença denominada mal-das-folhas sulamericana (SALB), provocada pelo fungo *Pseudocercospora ulei* (Chaverri & Gazis, 2011; Montello *et al.*, 2014). A SALB provoca desfolhamento excessivo a partir da deposição de esporos na face inferior dos folíolos. Surgem então pequenas manchas necróticas que, com o passar do tempo, recobrem quase todo o folíolo, causando necrose e queda das folhas (Kimati *et al.*, 1997).

O primeiro país a ser atingido pela doença das seringueiras foi a Guiana onde ocorreu o abandono das plantações. A doença se expandiu para outros países, como o Suriname, em que ocorreu a troca das culturas de seringueira por café e cacau, e no Panamá, onde ficava situada a companhia de pneus *Goodyear*. No Brasil, o fungo responsável pela SALB destruiu cerca de 25% das plantações da companhia Ford, na cidade de Fordlândia, no estado do Pará. Na tentativa de minimizar os problemas com a plantação e redução de custos, entre 1934 e 1942, foram plantados clones asiáticos parcialmente resistentes ao *P. ulei* de *H. brasiliensis* em mais de 6.000 ha no Pará. Em 1943, uma nova epidemia da doença iniciou e muitos dos novos clones foram perdidos. Por isso, a empresa Ford desistiu das plantações e transferiu a responsabilidade para o Governo brasileiro, que, nos anos posteriores, promoveu programas de incentivo de plantações de seringais na região amazônica (Gasparotto *et al.*, 1997). Entretanto, a falta de pessoal especializado e de clones parcialmente resistentes resultou no abandono da maior parte dos seringais. Um resumo do impacto da SALB na América está representado na Tabela 2. Esta é a doença mais prejudicial à seringueira e ocorre apenas no continente americano. Pela severidade da doença e ameaça econômica que proporciona, os Estados Unidos incluíram a SALB na lista de armas biológicas (Gasparotto *et al.*, 1997; Lieberei, 2007).

A região amazônica apresenta condições favoráveis para o desenvolvimento da heveicultura, mas a epidemia de infecção por *P. ulei* tem promovido o cultivo de seringueiras em áreas adaptadas. Atualmente, os continentes Asiático e Africano são responsáveis pela maior parte da produção de látex no mundo (Silva, 2007). No Brasil, o cultivo de seringueira vem crescendo porém em regiões adaptadas, no centro-oeste (Mato Grosso), nordeste (Bahia),

sudeste (São Paulo e Espírito Santo) e sul (Paraná) (Figura 3) (Santos, 2010). Em 2012, a produção global de borracha natural foi de 11.327 toneladas (t) e o consumo de 11.005 t (Figura 4) (Instituto Agrônômico, 2015).

Tabela 2. Impacto do mal-das-folhas sulamericana nos países da América Central e América do Sul até o ano de 2006 (Adaptado de Lieberei, 2007).

País	Ano	Histórico
	1911	40.000 árvores plantadas
Suriname		
	1918	Plantação destruída pela primeira epidemia de <i>P.ulei</i> .
	1927	Fordlândia: 3.200 ha com 200.000 árvores
	1933	Plantação destruída pelo <i>P.ulei</i> .
Brasil	1936	Belterra: 6.478 ha
	1943	Plantação destruída pelo <i>P.ulei</i> .
	1935	Plantação criada pela companhia da <i>Goodyear</i> .
Panamá	1941	Plantação destruída pelo <i>P.ulei</i> .
Colômbia	1941	Epidemia de <i>P.ulei</i> .
Costa - Rica	1942	Epidemia de <i>P.ulei</i> .
	1967	Início do programa de desenvolvimento da heveicultura.
Brasil	1972 - 1975	1º fase do programa de desenvolvimento.
	1978 - 1982	2º fase do programa de desenvolvimento.
	1984 - 1994	3º fase do programa de desenvolvimento.
	1986	Programa interrompido: 100.000 ha dos 150.000 estavam destruídos.
Brasil	2002	Encontro científico sobre novos esforços para

		combater o <i>P. ulei</i> .
Brasil	2005	Definido que plantações apenas em áreas não afetadas pelo <i>P. ulei</i> .
Colômbia	2006	Programa de seleção de linhagens. resistentes ao <i>P. ulei</i> .

Outras doenças também são de ocorrência comum na heveicultura. A antracnose, provocada pelo fungo *Colletotrichum gloesporioides*, geralmente ocorre em plantas com estresse nutricional. Nesta doença, o crescimento fúngico na casca forma lesões durante o processo de regeneração da sangria para a extração de látex natural pela planta. A doença mancha aureolada, provocada pelo fungo *Rhizoctonia solani*, comumente ocorre na região amazônica e gera problemas econômicos assim como a SALB. O oídio (provocado pelo fungo *Oidium heveae*) ocorre nos estados de São Paulo e Espírito Santo, e ocasiona o desfolhamento excessivo da planta. O vírus do gênero *Carlavirus* clone F 45 12 pertencente à família Flexviridae, já foi descrito nos estados de São Paulo e Amazonas e a patologia ficou conhecida como doença foliar de origem viral (Kimati *et al.*, 1997)

Mesmo apresentando grande importância econômica, poucos são os estudos de detecção de fitopatógenos em seringueiras. Novas metodologias, como o sequenciamento de nova geração pode auxiliar a detecção de patógenos novos e já descritos, assim como na compreensão da microbiota do hospedeiro (Carvalho *et al.*, 2010).

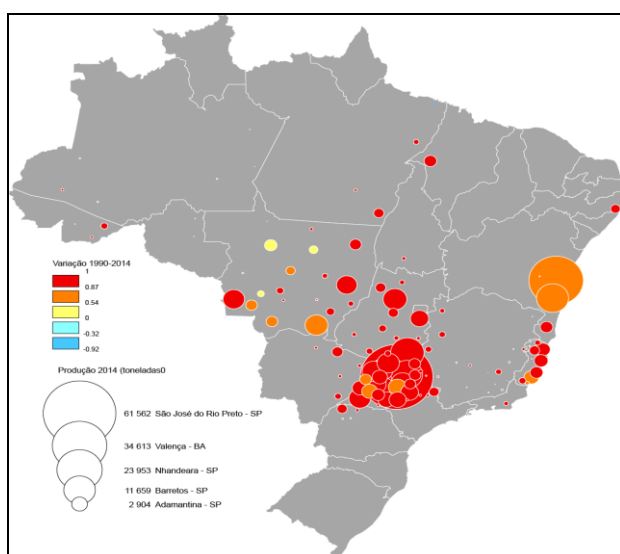


Figura 3. Evolução da produção de borracha por microrregião (1990 - 2014). (Somain & Droulers, 2016).

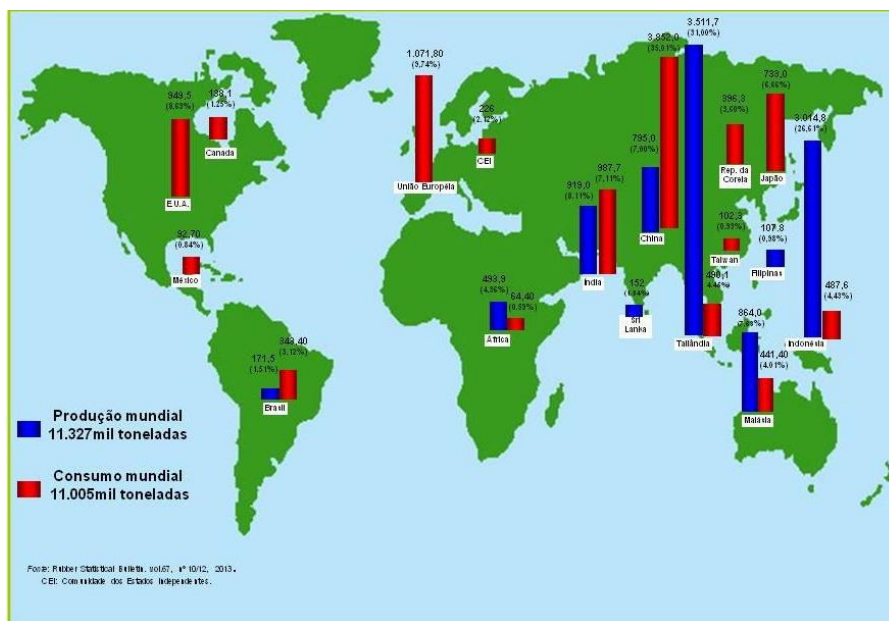


Figura 4. Produção e consumo mundial de borracha no ano de 2012. (Instituto Agrônômico, 2015).

1.3. Estudos de metagenoma

Os micro-organismos foram visualizados pela primeira vez por Anton van Leeuwenhoek e Robert Hooke após a invenção do microscópio entre os anos 1632-1723, o qual permitiu a visualização das formas físicas de diferentes micro-organismos. Porém, apenas no final do século XIX os pesquisadores começaram a correlacionar doença com a presença dos micro-organismos (teoria microbiana das doenças) e, a partir de então, começaram a desenvolver métodos de isolamento e cultivo em laboratório. Ao microscópio era feita a visualização das formas físicas e os diferentes tipos de cultivo com meios de cultura para classificação dos micro-organismos (Keller & Zengler, 2004; Handelsman, 2004).

Todas as técnicas descritas anteriormente ainda são muito utilizadas para a identificação de micro-organismos, no entanto, essas técnicas possuem algumas limitações que dificultam a identificação de novos micro-organismos. Muitos micro-organismos possuem morfologia semelhante, o que dificulta a sua identificação através da microscopia, e outros muitos não são capazes de crescer sem os nutrientes encontrados no seu ambiente natural (Woo *et al.*, 2008). Estimativas sugerem que aproximadamente 1% dos microrganismos são capazes de

crescer nos meios de cultura utilizados (Hugenholtz *et al.*, 1998; Hyde & Soyong, 2008). E, por isso, um pequeno número de organismos já foram estudados.

O advento de técnicas independentes de cultivo, como, por exemplo, a metagenômica, permitiu um melhor entendimento da diversidade taxonômica e funcional das comunidades microbianas cultiváveis e não-cultiváveis (National Research Council, 2007). O metagenoma é o estudo dos genomas de todos os organismos presentes em uma amostra composta (National Research Council, 2007). Embora o método de sequenciamento tradicional (Sanger) seja consideravelmente robusto para a construção de bibliotecas de referência de códigos de barras de DNA, ele não permite o acesso à maior parte da diversidade presente em amostras ambientais. As tecnologias de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing*) permitiram a geração de muito mais informação que a tecnologia tradicional de Sanger, com grande economia de tempo e custo por base de sequenciamento (Carvalho *et al.*, 2010). As tecnologias de NGS realizam o sequenciamento em larga-escala de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em um único sequenciamento.

A maioria dos estudos de metagenômica são feitos usando as regiões 16S do rRNA (no caso de bactérias) ou ITS do rRNA (no caso de fungos). Também há os estudos feitos sem o uso de amplificação de regiões prévias, sendo denominados metagenômica de abordagem *shotgun*, em que ocorre o sequenciamento do genoma de todos os organismos presentes naquela amostra ambiental (National Research Council, 2007). O sequenciamento em larga-escala do tipo *shotgun* pode ser feito a partir tanto do DNA quanto do RNA. Para selecionar o melhor método, deve-se levar em consideração o tipo de amostra e o objetivo do estudo. Recentemente, foi demonstrado o uso de sequências de pequenos RNAs, os quais são produtos da resposta imune inata do hospedeiro, para a detecção de micro-organismos infectando hospedeiros (Aguiar *et al.*, 2015). Alguns estudos de NGS para a detecção de vírus empregaram a metodologia de sequenciamento de RNA de baixo peso molecular a partir do RNA total (Aguiar *et al.*, 2015; Waldron *et al.*, 2015).

1.3.1 Sequenciamento de pequenos RNAs

A via de RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo conservado em eucariotos, no qual pequenos RNAs são responsáveis pela regulação gênica em nível transcricional e pós-transcricional (Lee *et al.*, 2010; Hannon, 2002; Nicolás & Ruiz-Vaázquez, 2013). Foi descrito

pela primeira vez em *Caenorhabditis elegans*, em um mecanismo mediado por RNA fita dupla. Mais tarde, esse mecanismo foi descrito em animais, protozoários, plantas e fungos (Nakayashiki *et al.*, 2006; Nicolás & Ruiz-Vaázquez, 2013). Durante a evolução dos organismos eucariotos a via de RNAi passou por várias adaptações, culminando com o surgimento de novos mecanismos e funções (Hannon, 2002).

Estudos genéticos e bioquímicos identificaram os principais componentes da maquinaria da via de RNAi, destacando-se as proteínas Dicer (DCR) e Argonauta (Ago). A proteína DCR é da família das RNases III, cuja função é processar longos RNAs fita dupla em pequenas sequências de tamanho entre 21 a 26 nucleotídeos. As proteínas Ago são essenciais em complexos efetores multi-subunitários e contêm dois domínios conservados, o motivo PAZ (responsável pela ligação com ácidos nucleicos, e tem preferência por DNA e RNA fita simples) e o domínio Piwi (responsável por se ligar na enzima DCR e hidrolisar dsRNA) (Decker *et al.*, 2015). Nos nematódeos, plantas e fungos, a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) também participa da via de RNAi, e pode estar envolvida com a conversão do RNA aberrante (aRNA – RNA transcrito de um gene não pareado na célula hospedeira) em dsRNA (Elbashir *et al.*, 2001; Nakayashiki *et al.*, 2006; Nolan *et al.*, 2008; Dang *et al.*, 2011).

Os pequenos RNAs (sRNAs) são sequências curtas de RNA de tamanho geralmente entre 20-30 nt associadas com proteínas Ago geradas pela via de RNAi no sistema imune do próprio hospedeiro. Esses pequenos RNAs podem ser classificados em três classes principais (microRNAs – miRNAs; *piwi-interacting* RNAs – piRNAs e pequenos RNAs de interferência – siRNAs) de acordo com a sua biogênese, modo de regulação e as vias biológicas reguladas (Hannon, 2002; Agrawal *et al.*, 2003; Bonnet *et al.*, 2006; Chapman & Carrington, 2007; Ghildiyal & Zamore, 2009; Chen, 2009; Holoch & Moazed, 2015; Aguiar *et al.*, 2016). Cada classe possui uma distribuição de tamanho e preferência de nucleotídeos diferentes. Além disso, essas classes são relacionadas e cooperam para a regulação de genes e proteção do genoma contra modificações externas (Ghildiyal & Zamore, 2009). As classes de siRNA e miRNA já foram descritos em todas as famílias de eucariotos, mas a classe de piRNA foi descrita apenas no reino animal (Dang, *et al.*, 2011).

A via de siRNA (Figura 5) constitui um mecanismo conservado, encontrado na maioria dos eucariotos, sendo importante na resposta antiviral de vírus fita simples ou dupla de RNA ou DNA e na expressão de genes. A via de siRNA é disparada por sequências longas de dsRNA, essas sequências são clivadas pela enzima DCR 2 em fragmentos menores,

chamados de siRNA fita dupla. Após a fragmentação, os siRNA fita dupla ligam-se a Ago 2 para formar o complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*), a argonauta no RISC seleciona uma das fitas para sintetizar a fita complementar. A fita selecionada pela Ago 2 e que direciona o silenciamento é chamada de guia (*guide*), enquanto que a outra fita denominada passageiro (*passenger*) é destruída. Os fragmentos gerados normalmente tem o tamanho de 21 nt (Hutvagner & Zamore, 2002; Bonnet *et al.*, 2006; Ghildiyal & Zamore, 2009; Wilson & Doudna, 2013; Aguiar *et al.*, 2016). Essas características são importantes para o reconhecimento de siRNAs na via de RNAi (Hutvagner & Zamore, 2002).

Os miRNAs (Figura 5) são conservados na maior parte dos organismos e derivam de transcritos denominados pré-miRNAs, que são transcritos pela Polimerase II no núcleo celular. Primeiramente, os pré-miRNAs são processados pela enzima *Drosha* (ribonuclease da classe II que se liga e cliva especificamente RNA) no núcleo em um pré-miRNA longo, cujo tamanho varia entre 60-70 nt. O novo pré-miRNA formado apresenta uma estrutura de grampo (*hairpin*). Com auxílio da proteína Exportina-5, o pré-miRNA na forma de *hairpin* é transportado do núcleo para o citoplasma, onde será reconhecido e clivado pela enzima DCR 1. O produto gerado após a clivagem é acoplado a Ago (1-4) para formar o complexo miRISC, que tem como alvo regiões complementares da extremidade 3' dos RNAs mensageiros (mRNA) celulares. A extremidade 3' dos miRNA formam uma região denominada *seed* (oito nt pareados ao mRNA) que reprime a tradução e a degradação direta dos alvos do mRNA. A via do miRNAs é importante na regulação da tradução e estabilidade dos mRNAs. O tamanho dos miRNAs normalmente é de 22 nt. Plantas possuem miRNAs extremamente complementares ao mRNAs e por isso, a degradação do alvo é feita de uma forma mais eficiente (Hutvagner & Zamore, 2002; He & Hannon, 2004; Bonnet *et al.*, 2006; Chen 2009; Ghildiyal & Zamore, 2009; Wilson & Doudna, 2013; Aguiar *et al.*, 2016).

A classe de sRNAs mais nova descrita é a via de piRNAs (Figura 5), que possui esse nome por se ligar a proteína *Piwi*, pertencente a família das Ago. Geralmente, os piRNAs tem tamanho entre 24-29 nt e são importantes na estabilidade e divisão da linhagem celular germinativa, na repressão de elementos móveis, no silenciamento transcricional, na degradação de RNA e na resposta antiviral. A principal diferença dessa via em comparação com o siRNA e o miRNA é que não precisam da DCR para reconhecimento e clivagem, e por isso, é considerada independente do funcionamento da DCR. Os piRNAs são derivados de sequências de RNA fita simples longos. Essa sequência é processada pela endonuclease

Zucchini, que gera os piRNAs primários. Subsequentemente, os piRNAs primários se ligam as proteínas da família *piwi* Aubergina e Ago 3 formando o complexo piRISC. Os dez primeiros nucleotídeos da fita anti-senso do piRNA são complementares a fita senso encontrada ligada a Ago 3, em razão dessa complementariedade entre as fitas, ocorre o ciclo de amplificação denominado *ping-pong*, que aumenta o número de sequências detectada, e pode ser usada para silenciar a fita ligada a Ago (Hutvagner & Zamore, 2002; Bonnet *et al.*, 2006; Chen 2009; Ghildiyal & Zamore, 2009; Wilson & Doudna, 2013; Aguiar *et al.*, 2016).

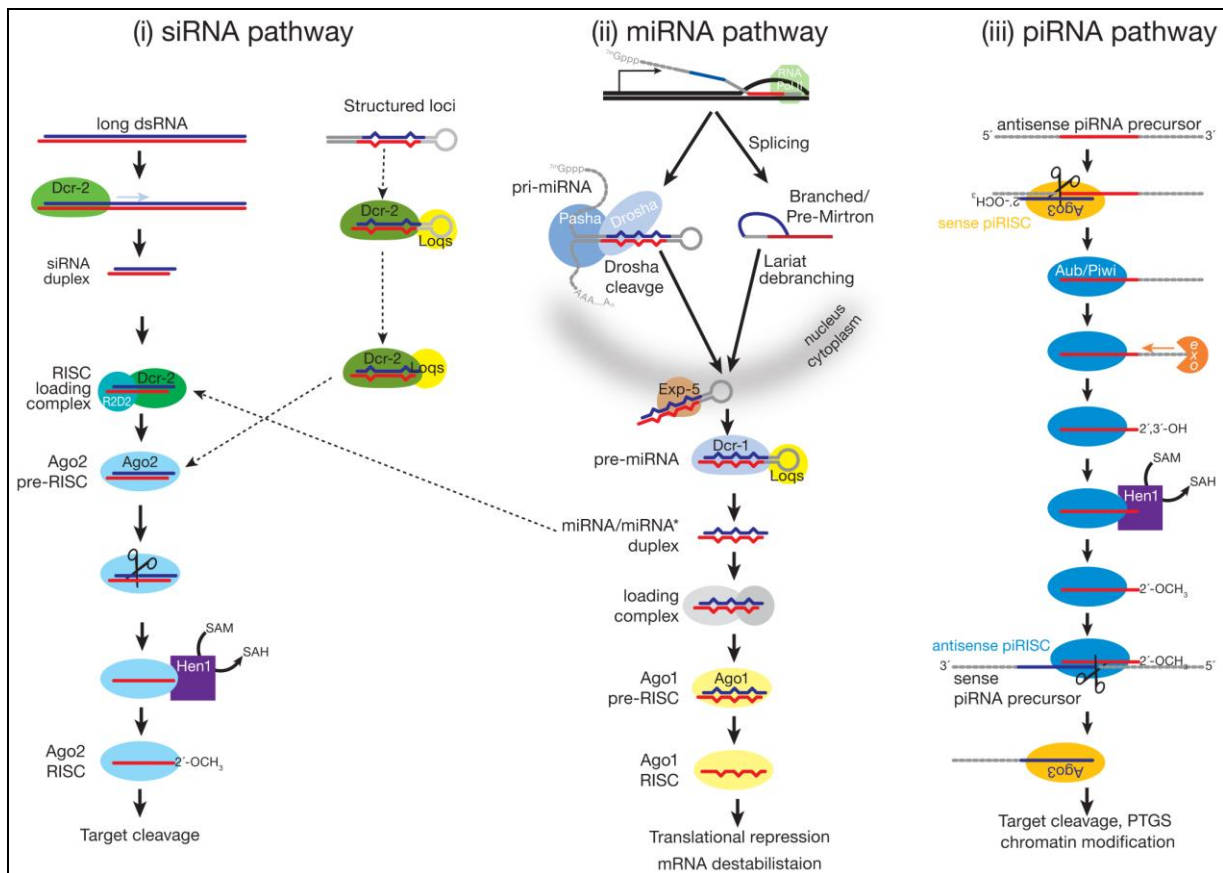


Figura 5. As principais vias de pequenos RNAs gerados pelo sistema imune do hospedeiro. (i) via do siRNA; (ii) via do miRNA; (iii) via do piRNA. (Ghildiyal & Zamore, 2009).

Uma vez que as três classes de pequenos RNAs apresentam diferentes funções na resposta imune do hospedeiro, o sequenciamento em larga-escala de pequenos RNAs pode ser usado na detecção de infecções por diferentes patógenos e na compreensão dos processos fisiológicos do hospedeiro no momento do processamento da amostra. A partir do sequenciamento, pode-se verificar o perfil de distribuição de tamanho, a identidade, a estrutura, origem genômica e a densidade dos sRNAs na amostra analisada, sendo utilizados

como repórteres para a identificação dos vírus e outros organismos na amostra (Ghildiyal & Zamore, 2009; Kreuze, 2014; Aguiar *et al.*, 2015). Este sequenciamento tem sido utilizado principalmente para detecção de sequências virais, uma vez que a metodologia de montagem dos pequenos RNAs gerados no sequenciamento enriquecem o número de sequências virais provenientes da resposta imune do hospedeiro pela via de RNAi, e o perfil de sRNAs (20-30 nt) é usado para confirmar a infecção, já que os sRNAs são gerados pelo sistema imune do hospedeiro (Ozsolak & Milos, 2010).

Em plantas, as vias de RNAi desempenham um papel predominante na resposta a patógenos (principalmente vírus). Essa metodologia já foi usada inúmeras vezes para detecção de fitopatógenos virais (Kreuze, 2014) como demonstrado no trabalho de Bi e colaboradores (2012) em que detectaram na planta *Arctium tomentosum* contigs com similaridade aos vírus *Alstroema vírus X* (RNA fita simples polaridade positiva) e *Emaravirus* (RNA fita simples polaridade negativa). Loconsole e colaboradores (2012) sequenciaram plantas do gênero *Citrus* que apresentavam sintomas associados a doença *Citrus chlorotic dwarf disease* e detectaram um provável novo vírus de DNA fita simples com similaridade com a família *Geminiviridae*. Li e colaboradores (2012) usaram o sequenciamento de pequenos RNAs para a detecção de fitopatógenos virais na espécie *Solanum lycopersicum* e conseguiram detectar o genoma completo do vírus *Potato spindle tuber viroid*, um genoma quase completo (98%) do vírus *Pepino mosaic vírus* e um possível novo vírus do gênero *Potyvirus*. Sela e colaboradores (2012) detectaram em folhas de pimenta o genoma de duas linhagens do vírus *Bell pepper endornavirus*.

Para confirmar os resultados encontrados no sequenciamento após análise bioinformática, deve ser feita a detecção através de reação de amplificação com o desenho de iniciadores específicos para o organismo identificado (Kreuze, 2014). Até o presente momento, não há trabalhos publicados de detecção de fitopatógenos em *H. brasiliensis* através da metodologia de sequenciamento em larga-escala de pequenos RNAs.

1.4 Amplificação quantitativa e digital

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é empregada em todas as áreas da pesquisa biológica e biomédica e parte do princípio de amplificar poucas cópias de um fragmento de DNA gerando milhares de cópias da sequência de interesse. Essa técnica foi descrita pela primeira vez em 1984 por Kary Mullis. Desde então, a PCR qualitativa ou tradicional foi

adaptada, melhorada e outras variações da técnica foram surgindo, como a reação da transcriptase reversa (RT-PCR), em que ocorre a síntese do DNA complementar a partir da fita de RNA. Geralmente, após a reação de PCR é necessário visualizar o produto amplificado por eletroforese em gel (Bartlett & Sirling, Joshi & Deshpande, 2010).

Com o advento da PCR quantitativo em tempo-real (qPCR) (segunda geração do método de PCR) foi possível analisar a amplificação do produto com a reação em andamento usando fluorescência para detecção. Durante a amplificação, um fluoróforo fica livre na solução, e toda vez que a região alvo do DNA começa a ser sintetizada, o fluoróforo intercala-se no DNA fita dupla emitindo fluorescência que é detectado pelo aparelho. O sinal gerado pela fluorescência é proporcional à quantidade da região genômica de interesse na amostra. O ponto em que a fluorescência resultante da incorporação do fluoróforo na fita de DNA sintetizada e que ultrapassa a fluorescência de fundo (*background*) é chamado de *Threshold cycle* (Ct). Quanto maior o Ct, menor a concentração de material na amostra. No caso do uso de fluoróforos livres em solução, pode ocorrer a amplificação de regiões não-específicas, por isso, o sistema que inclui sondas (oligonucleotídeos marcados fluorescentemente). É usado como alternativa para detecção de regiões-alvo, por exemplo, o sistema TaqMan. Nessa metodologia, são usados pares de iniciadores e sonda com fluoróforos e a DNA polimerase com a função nuclease 5', deixando a reação mais específica. Todos os dois sistemas de qPCR descritos são usados para amplificação de fragmentos curtos de até 200 nt (Joshi & Deshpande, 2010; Cao *et al.*, 2016).

A terceira geração do método de PCR desenvolvida foi a *droplet digital* PCR (ddPCR), no qual a amostra é diluída e particionada em milhares de gotas na reação. Dessa forma, cada partição terá uma ou nenhuma cópia de material, mas estatisticamente pode ter mais de uma molécula em uma fração. A amplificação ocorre no interior de cada gota, e a distribuição de Poisson é usada para quantificar o número de cópias da região genômica alvo na amostra amplificada. O produto amplificado é detectado por sondas fluorescentes e a gota positiva emite sinal para o instrumento durante a leitura. A ddPCR reduz o ruído da reação aumentando o sinal da fluorescência e da sensibilidade de detecção. Assim como a qPCR, a ddPCR também amplifica fragmentos pequenos (Hugget *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2016). Algumas publicações foram feitas usando o sistema da ddPCR para detecção de patógenos, como descrito por King e colaboradores (2016) para detecção da bactéria *Borrelia* sp. no carrapato *Ixodes scapularis*, como também para quantificação de miRNAs que já foram

descritos como biomarcadores de câncer de pulmão (Campomenosi *et al.*, 2016) e no diagnóstico de tuberculose (Devonshire *et al.*, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

A seringueira (*Hevea brasiliensis*) é a melhor produtora de látex e borracha natural dentre todas as espécies de plantas conhecidas. Apesar de mais de 90% da produção de borracha ocorrer nos continentes asiático e africano, o centro de origem da *H. brasiliensis* é a Amazônia brasileira. Sabe-se que essa planta é suscetível a diversas doenças provocadas, na sua grande maioria, por fungos e vírus. Vários estudos demonstraram que, no interior do tecido vegetal, pode ocorrer a interação entre micro-organismos e a planta e esses organismos podem auxiliar o hospedeiro na resposta contra patógenos. Um exemplo de interação, que ocorre nos tecidos vegetais, é a infecção por fungos denominados endofíticos.

Fungos endofíticos são aqueles que pelo menos durante parte do seu ciclo de vida, habitam tecidos vegetais sem provocar sintomas de doenças. A associação entre os fungos endofíticos e as plantas são consideradas ubíquas e data de mais 400 milhões de anos e diversos estudos sugerem que a maioria das plantas formam associações simbióticas mutualísticas com esses fungos. Vários estudos vêm constatando que fungos endofíticos atuam modulando a adaptabilidade da planta hospedeira, auxiliando nos procesos metabólicos e imunológicos. Estudos ecológicos sobre esses fungos na planta hospedeira podem inferir o padrão de distribuição na micota endofítica e determinar a influência das variáveis ambientais nesta distribuição.

Mesmo assim, estudos sobre a diversidade de fungos endofíticos em *H. brasiliensis* e, principalmente, sobre o seu potencial contra patógenos ainda são escassos. Até o presente momento, não há trabalhos publicados de diversidade de fungos endofíticos em seringueiras da região amazônica brasileira. Dessa forma, a descrição e análises ecológicas das comunidades de fungos endofíticos de *H. brasiliensis* na Amazônia brasileira seria de grande importância em função do grande interesse econômico na planta e como um estudo de caso para a melhor compreensão da dinâmica de interação entre endófitos e seus hospedeiros.

Uma vez que a seringueira é alvo de diferentes patógenos, a detecção precoce dos mesmos pode auxiliar na prevenção, controle e disseminação da doença para outros indivíduos assintomáticos. Com o advento das técnicas independentes de cultivo, foi possível caracterizar diversos micro-organismos mutualísticos, comensais ou patogênicos presentes em uma mesma amostra, e em alguns casos, além de detectar, identificar novos organismos. Um exemplo de técnica que vêm sendo muito usada para a detecção de patógenos em plantas é o sequenciamento em larga-escala de pequenos RNAs, os quais são sequências curtas (21-30nt)

geradas a partir da resposta imune inata do próprio hospedeiro. Logo, o sequenciamento em larga-escala de pequenos RNAs pode ser usado como ferramenta de diagnóstico em seringueiras, e, dessa maneira, com grande aplicabilidade na detecção de fitopatógenos já descritos e possíveis novos patógenos em indivíduos ainda assintomáticos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

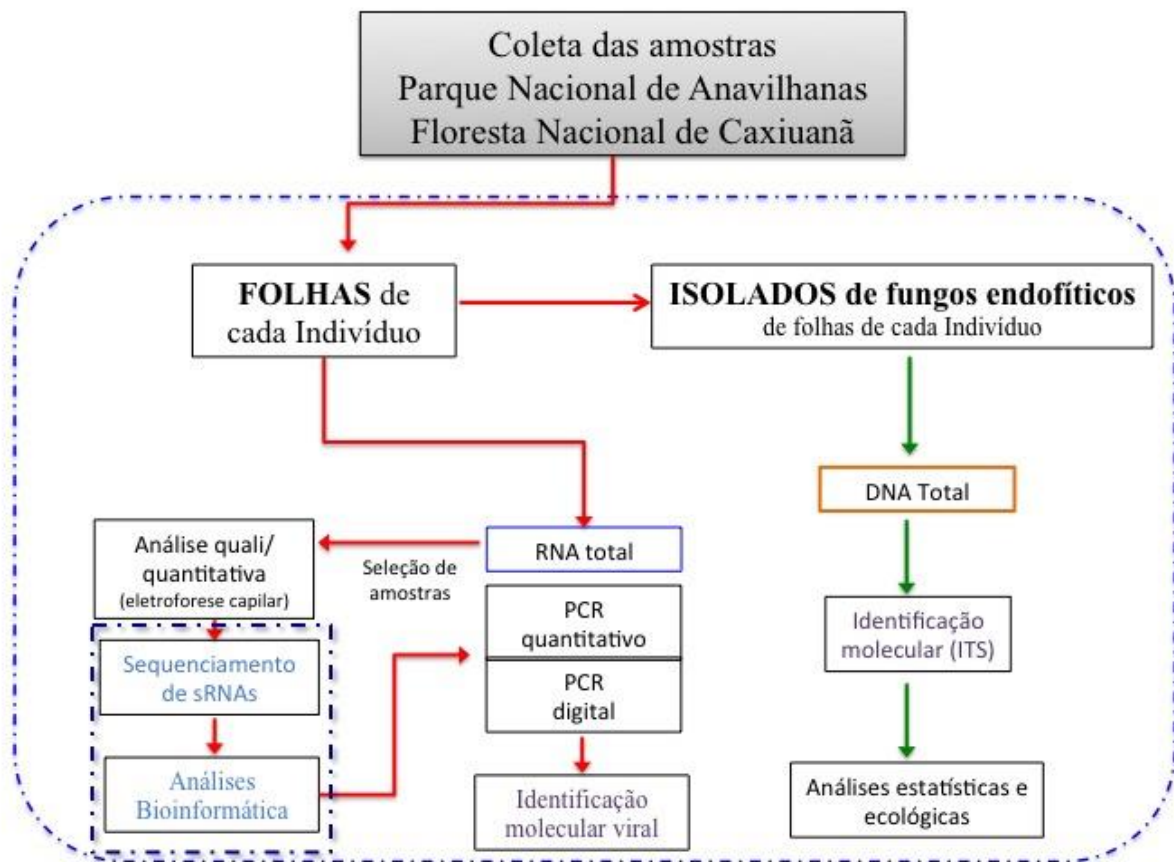
Caracterizar a diversidade da comunidade fúngica em amostras de folha e de alburno da espécie *Hevea brasiliensis* na região amazônica brasileira e detectar fitopatógenos de *Hevea brasiliensis* em indivíduos assintomáticos.

3.2 Objetivos específicos

- Coletar folhas e alburno de indivíduos de *Hevea brasiliensis*;
- Isolar os fungos endofíticos associados às folhas e ao alburno;
- Identificar os fungos por meio do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do rRNA;
- Avaliar a composição taxonômica, riqueza e a abundância relativa de táxons de fungos endofíticos associados às folhas e ao alburno;
- Extrair o RNA total das folhas de cada indivíduo de *H. brasiliensis* coletado;
- Avaliar a qualidade, integridade e concentração das amostras de RNA extraídas;
- Sequenciar pela metodologia de pequenos RNAs de um indivíduo selecionado de *H. brasiliensis*;
- Analisar e avaliar os dados obtidos no sequenciamento em larga-escala de pequenos RNAs;
- Detectar e confirmar por amplificação quantitativa e digital os fitopatógenos identificados no sequenciamento de pequenos RNAs.

4. FLUXOGRAMA

O fluxograma de trabalho inicia-se com a coleta das amostras no Parque Nacional de Anavilhanas e na Floresta Nacional de Caxiuanã. Após a coleta, as amostras são divididas em duas metodologias diferentes. A primeira para detecção de fitopatógenos em indivíduos assintomáticos de seringueira e a segunda para o estudo da diversidade dos fungos endofíticos de cada um dos indivíduos coletados.



5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Áreas de coleta

Parque Nacional de Anavilhanas

O Parque Nacional (PARNA) de Anavilhanas está localizado nos municípios de Novo Airão e Manaus no estado do Amazonas (Figura 6). O parque apresenta uma grande área fluvial e é composto por mais de 400 ilhas no Rio Negro. Ocupa uma área de 350,018 mil ha, nos quais se distribuem florestas densas de terra firme, florestas de inundação e outros ambientes lacustres e fluviais (<http://www.icmbio.gov.br/portal/>). O clima é caracterizado por precipitação média anual de 2.286,2 mm, temperatura média anual de 26°C e umidade relativa média anual de 83% (Pádua, 1999).

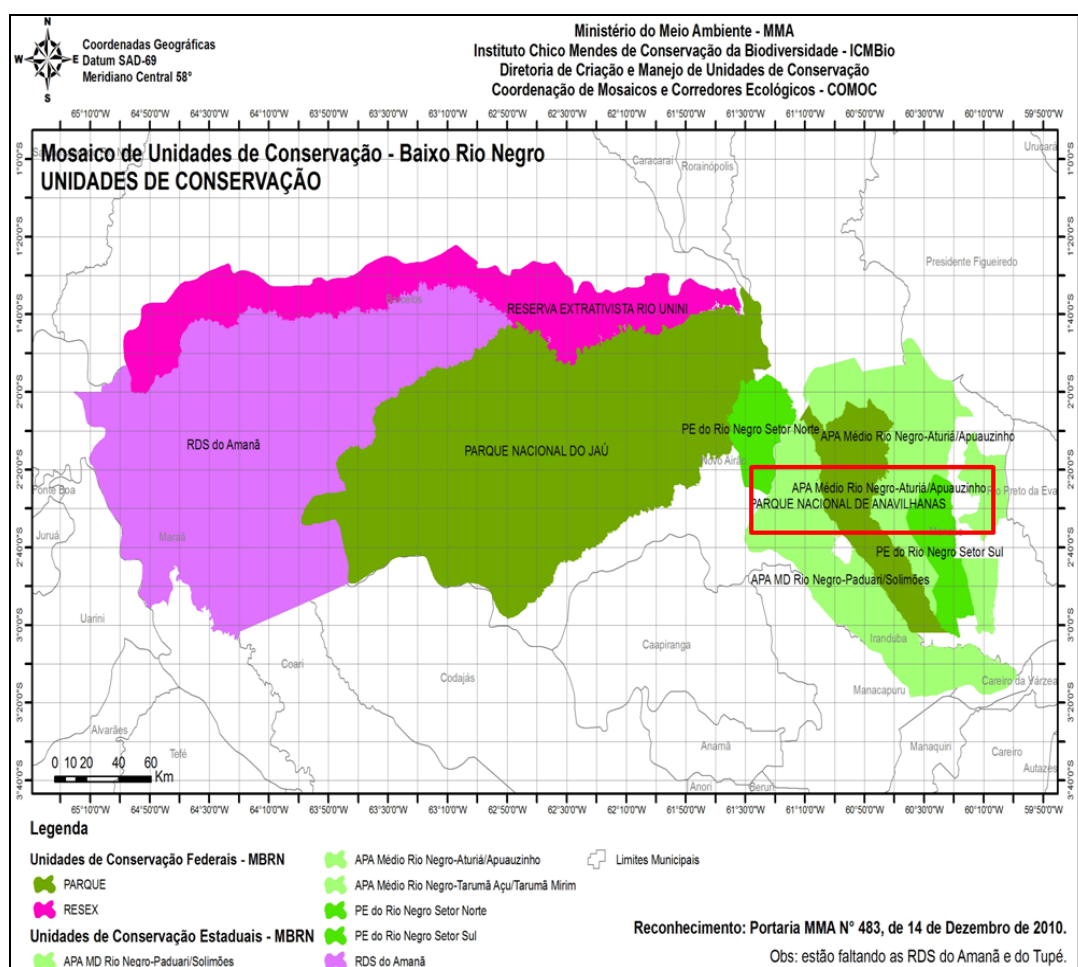


Figura 6. Mapa do Parque Nacional de Anavilhanas. (ICMBio (<http://www.icmbio.gov.br/portal/>)).

Floresta Nacional de Caxiuanã

Criada pelo decreto 194/1961, a Floresta Nacional (FLONA) de Caxiuanã é disposta em uma área de cobertura florestal de espécies predominantemente nativas e tem como objetivo básico o uso múltiplo sustentável dos recursos florestais e a pesquisa científica, com ênfase em métodos para exploração sustentável de florestas nativas. Essa unidade de conservação fica localizada entre os municípios de Melgaço e Portel no estado do Pará (Figura 7). Situada a 300 Km da capital Belém, a FLONA é banhada pelo Rio Anapu e pela baía de Caxiuanã. Ocupa uma área de 330.000 ha, nos quais se distribuem florestas ombrófilas densas, igapó e outros ambientes lacustres (Plano de manejo icmbio: <http://www.icmbio.gov.br/portal/>). O clima é caracterizado por precipitação excessiva durante alguns meses (média anual de 2.106,9 mm) e uma curta estação seca. A temperatura média anual é de 25,9°C, com 82% de umidade média.

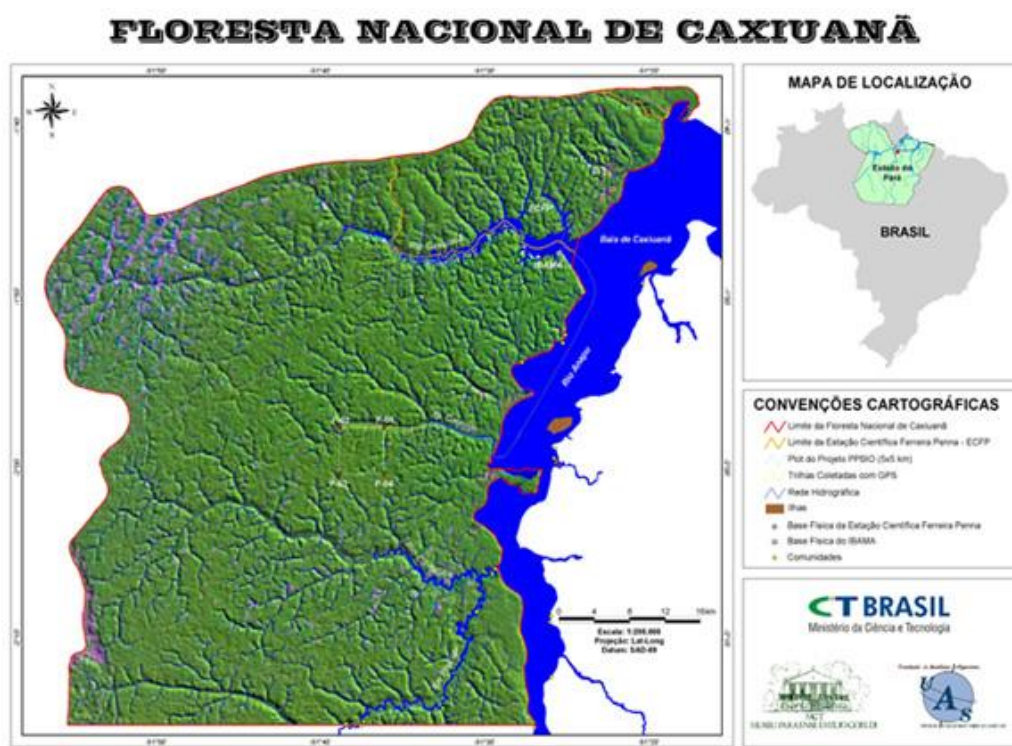


Figura 7. Mapa do Floresta Nacional de Caxiuanã. (ICMBio (<http://www.icmbio.gov.br/portal/>)).

5.2. Isolamento e preservação dos fungos endofíticos

Cinco folhas compostas visualmente saudáveis foram coletadas de cada um dos indivíduos de *Hevea brasiliensis*. Na FLONA de Caxiuanã, foram coletados cinco indivíduos e no PARNA de Anavilhanas foram coletados quatro indivíduos de *H. brasiliensis*. Um folíolo de cada folha composta foi selecionado e lavado com água deionizada purificada esterilizada para retirar a poeira remanescente e logo após realizado o processo de desinfecção superficial com álcool 70% (2 minutos), hipoclorito de sódio com 2% de cloro ativo (2 minutos) e água destilada esterilizada (5 minutos) (Collado *et al.*, 1996). Posteriormente, seis fragmentos de 5 mm² foram retirados da folha com auxílio de bisturi e pinças esterilizadas (Figura 8) e transferidos para placas de Petri contendo meio Extrato de Malte (MEA) (ACUMEDIA, EUA), acrescido de cloranfenicol (100 mg) (HIMEDIA, Índia) e Rosa Bengala (200 mg) (VETEC, Brasil). Além das folhas, foram coletados alburno de cada um dos indivíduos de *H. brasiliensis*, de acordo com a metodologia de Evans *et al.*, 2003 e Kowalski & Kehr, 1996. Três fragmentos de 3-6 cm de periderme foram retirados de cada isolado de *H. brasiliensis* e cinco pedaços de alburno de aproximadamente 5 mm foram cortados da parte exposta da planta e transferidos para placas de petri contendo o meio MEA acrescido de rosa bengala e cloranfenicol. As placas foram incubadas a 25-28°C por um período de até 30 dias. Todos os isolados obtidos foram purificados em meio MEA, preservados em água destilada estéril (Castellani, 1967) e armazenados a temperatura ambiente em frascos esterilizados de vidro. Os fungos purificados foram depositados na Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia (CCMB) sob os acessos CCMB660-CCMB994.

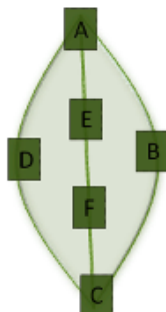


Figura 8. Identificação dos locais de retirada dos fragmentos das folhas dos vegetais coletados. Os fragmentos possuem 5 mm² de área.

5.3. Identificação dos fungos endofíticos

Para a identificação dos fungos isolados, foi feita a extração do DNA seguindo o protocolo de de Hoog *et al.* (2005) com modificações. As etapas realizadas estão descritas no Quadro 1. A qualidade e a quantidade de DNA extraído nas amostras foram verificadas em eletroforese em gel e em espectrofotômetro Nanodrop 1000ND (Thermo Scientific, USA).

A amplificação da região interna transcrita (ITS1-5.8S-ITS2) do RNA ribossomal foi realizada utilizando-se os iniciadores ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (Schoch *et al.*, 2012). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de Tampão 10X, 2,5 µL de MgCl₂ 50mM, 1 µL de DNTP 10 mM, 1 µL de cada um dos iniciadores 10 pmol, 0,2 µL de Taq DNA polimerase 5U/ ML, 2 µL de DNA e água deionizada purificada esterilizada. As amplificações foram conduzidas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Em todas as etapas de amplificação foram incluídos controles positivo (amostra ambiental previamente conhecida) e negativo (produto de PCR com água Milli-Q). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% utilizando-se TBE 1X (Tris-Borato EDTA 0,5 M pH 8,0), eluídos durante aproximadamente 1h a 100 V. Em cada gel foi utilizado o padrão de peso molecular de 100-1000 pb (Invitrogen, BRA). O gel foi corado com gel red (Biotium, US) ou brometo de etídeo 10 mg/mL (Phoneutria, BRA) aplicado no tampão de amostra e no marcador de peso molecular e fotografado em fotodocumentador AlphaImager HP (Protein Simple, EUA). As amostras amplificadas foram purificadas utilizando-se PEG 8000 20% em NaCl 2,5M (Dunn & Blattner, 1987) ou EDTA 125 mM.

Após a purificação, aproximadamente 50-100 ng de cada amostra de DNA genômico foram submetidos ao sequenciamento pelo ABI3730TM (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas no *software GeneiousTM* (versão 9.1) utilizando-se os seguintes critérios: qualidade das sequências de DNA obtidas (pelo menos 70%), tamanho da sequência (400 pb), identidade (98%), discrepâncias e ambiguidades.

Posteriormente, as sequências já identificadas ao nível de gênero foram agrupadas através de alinhamento pelo programa MAFFT (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*). Para isso, as sequências no formato FASTA foram adicionadas em um documento (.txt) e adicionado na interface *online* do programa (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Foram selecionadas as opções *Amino acid* → *UPPERCASE/Nucleotide* → *lowercase (uppercase/lowercase)*, *Same as input (Direction of*

nucleotide sequences), *Aligned (output order)* e *E-INS-i (Strategy)* que é usado para o alinhamento de até 200 sequências com múltiplos domínios conservados e presença de *gaps*. Essa estratégia é capaz de alinhar sequências gênicas de espécies próximas. O alinhamento gerado pelo programa foi copiado para um novo documento *.txt*, editado para eliminação de *gaps* (lacunas sem presença de bases), e aberto no Software *Geneious*, onde foi verificada a qualidade dos agrupamentos gerados e, se necessário, foram feitas edições no arquivo. O arquivo editado, foi novamente salvo em formato FASTA (*.txt*) e aberto no programa MOTHUR (<https://www.mothur.org/wiki/Cluster>), e feita a criação de uma matrix de distância a partir do comando (*dist.seqs*) e agrupado (*Cluster*) e então foram gerados outros arquivos, um com o agrupamento das sequências em diferentes porcentagens de similaridade e outro arquivo com a informação de quantas sequências estavam presentes em cada agrupamento. Neste trabalho, foi considerado a similaridade a 99% para separação dos gêneros em grupos de prováveis espécies. Esse valor utilizado é ainda mais restritivo do que preconizado pelo UNITE (Koljalg *et al.*, 2013), que considera o valor de identidade de 98,5% para a atribuição de espécies.

5.4 Análises estatísticas de ecologia de comunidades

As análises ecológicas foram feitas ao nível de gênero e ao nível de prováveis espécies. Os isolados identificados foram organizados em uma base de dados com as informações de coleta, identificação e as respectivas sequências. Gêneros identificados contendo apenas um isolado (ocorrência única ou singleto) foram considerados em todas as análises, pois estes podem ser considerados organismos-chave para a comunidade de fungos endofíticos e plantas (Gazis & Chaverri, 2015).

As análises ao nível de gênero compreenderam a curva de acumulação de gêneros e a frequência de cada gênero por local de coleta, utilizando o programa R (R *Development Core Team*, 2005), e agrupamento e distribuição dos filos, classes e gêneros presentes em cada sítio de coleta por tecido coletado através da interface gráfica por diagrama de Venn no pacote *office*. Para verificar a riqueza e abundância relativa dos táxons e os índices de diversidade (Shannon), equitatividade e índice CHAO (riqueza extrapolada), foram usados os programas Past 3.0 (Hammer *et al.*, 2001) e R (R *Development Core Team*, 2005). Os índices de diversidade, riqueza e abundância foram feitos apenas para o tecido foliar, por local de coleta, e então comparados entre si (Hammer *et al.*, 2001; R *Development Core Team*, 2005).

As análises ao nível de prováveis espécies foram feitas usando alinhamento das sequências dos isolados pelos programas MAFFT e, posteriormente o agrupamento em OTUs a 99% de similaridade (prováveis espécies) usando o programa MOTHUR. Para constatar as OTUs mais prevalentes em cada um dos 9 indivíduos coletados foi gerado um gráfico de coluna empilhada, onde o eixo da abcissa refere-se aos indivíduos e o eixo das ordenadas refere-se a abundância das OTUs. Além disso, foram realizadas análises de ordenação (*Non-metric Multidimensional Scaling* - NMDS) das comunidades de fungos endofíticos nos áreas de estudo (R *Development Core Team*, 2005) para revelar padrões ou tendências na estrutura dessas comunidades, utilizando-se as distâncias de Jaccard (dados qualitativos biestado ou binários ou de presença-ausência) e Hellinger (dados quantitativos merísticos ou de abundância). Todas as análises ao nível de prováveis espécies consideraram apenas os isolados obtidos no tecido foliar.

5.5. Extração do RNA total das folhas de *Hevea brasiliensis*

Fragmentos de folhas de cada um dos indivíduos de *Hevea brasiliensis* da FLONA de Caxiuana foram colocados em microtubo de 1,5 mL, congelados e macerados com auxílio de nitrogênio líquido. Nesta etapa, a extração de RNA foi feita usando o reagente TRIzol® (Invitrogen, 2014) com as recomendações do fabricante. A extração de RNA foi dividida em cinco etapas – homogeneização, separação de fases, precipitação, lavagem e dissolução do RNA. Na primeira etapa foi adicionado ao material macerado 750 uL de TRIzol e a mistura formada pelo pó fino e o TRIzol foram homogeneizados por pipetagens sucessivas. Em seguida, foi feita a separação de fases, em que a amostra foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente para a dissociação dos complexos nucleoproteicos, e depois adicionados 200 uL de clorofórmio. As amostras foram agitadas em aparelho do tipo vórtex e incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos. Logo após, foi feita centrifugação a 12.000 xg durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante formado após a centrifugação foi transferido para um novo tubo e adicionado 500 uL de isopropanol para a precipitação do RNA. Em seguida, a amostra foi incubada na temperatura de 30°C durante 10 minutos e centrifugadas a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e foi adicionado 1 mL de etanol 75%. Posteriormente, as amostras foram agitadas em aparelho do tipo vórtex e centrifugada a 7.500 xg por 5 minutos a 4°C (etapa correspondente a lavagem do RNA). Logo após, foi feita a dissolução do RNA, que consistiu na retirada do excesso de etanol para o

precipitado de RNA formado não secar completamente, e então adicionados 50 μ L de água tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC) e incubado a 60°C por 5 minutos. Após a extração, o RNA total foi quantificado por espectrofotometria no Nanodrop 2.0 (Thermo Scientific). Todas as amostras foram estocadas em freezer a -70°C.

5.6. Visualização da integridade do RNA extraído

Para verificar a integridade do RNA extraído da amostra com TRIzol[®], a amostra extraída foi eluída em gel de agarose com hipoclorito de sódio (Aranda *et al.*, 2012). Para isso foi feito gel de agarose 1% com Tris – Ácido Bórico - EDTA (TBE) 1X e com hipoclorito de sódio na concentração final de 6%. Essa mistura foi aquecida em forno de micro-ondas, para a dissolução da agarose e então foi resfriada e adicionado 3 μ L de Brometo de Etídio (10 mg/mL). A amostra aplicada no gel deveria conter 1 μ g de RNA em até 8 μ L (volume máximo testado e aplicado no gel). Cada amostra foi misturada ao tampão de amostra 6X e aplicada no gel já polimerizado. Foi usado o marcador de peso molecular 1 kb (Kappa, 2014) e a corrida tinha duração de aproximadamente 45 minutos na voltagem constante de 100 V. Após a corrida, os géis foram fotografados no fotodocumentador AlphaImager HP (Protein Simple, EUA) e visualizadas a presença de três bandas correspondentes ao RNA ribossomal (28S, 18S e 5.8S).

Quadro 1. Protocolo de extração de DNA.

Soluções	Protocolo de Extração de DNA genômico (De Hoog <i>et al.</i>, 2005)
1. Tampão de lise Tris-HCl pH 9 0,05 M; EDTA 0,005 M; NaCl 0,1 M; SDS 1%;	Acrescentar 600 µL do tampão e macerar a amostra com nitrogênio e então adicionar 5 µL de proteinase K Incubar por 60 min/60 °C
2. CTAB Tris 0,2M; NaCl 8,2% (1,4M); EDTA 0,5M; CTAB 10%.	Adição de 162 µL da solução de CTAB Incubar por 10 min/ 65° C
3. Clorofórmio: Álcool isoamílico (24:1)	Acrescentar 400 µL Incubar em gelo por 30 minutos; Centrifugar a 13.200 rpm por 10 min
4. Acetato de Sódio 3M	Acrescentar 10% do volume da solução Incubar a 0° C por 12 h
5. Isopropanol absoluto	Adicionar 50% do volume com isopropanol Centrifugar a 13.200 rpm por 5 min
6. Etanol absoluto	Adicionar 200 µL de etanol absoluto (2 a 8°C) Homogeneizar Centrifugar 13.200 rpm por 5 min
7. Etanol 70%	Adicionar 200 µL de etanol 70% (2ª 8°C) Homogeneizar Centrifugar 13.200 rpm por 5 min
8. TE EDTA (0,25M) e Tris-HCl (1M)	Ressuspender em 100 µl de TE.

Tris-HCl: Trishidroximetilaminometano; **EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético; **NaCl:** Cloreto de sódio; **SDS:** Dodecil sulfato de sódio; **CTAB:** Brometo de Cetiltrimetilamônio.

5.7. Dosagem do RNA ribossomal em eletroforese microfluídica

Para a seleção de amostras a ser sequenciadas pela metodologia de pequenos RNAs foi verificado a qualidade do RNA total da amostra pelo equipamento Bioanalyzer (Agilent Technologies) através da metodologia de eletroforese microfluidica (*On-Chip electrophoresis*). Para a análise do RNA total de cada amostra selecionada, foi usado o Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, 2013) seguindo as orientações fornecidas

pelos fabricantes. Este *chip* foi escolhido pois permite a quantificação de pequenos RNAs. A concentração de cada amostra estava entre 200–300 ng/uL. A preparação da análise no Bioanalyzer foi separada em seis etapas diferentes. A primeira etapa teve como objetivo preparar o marcador molecular de RNA usado durante a análise. Assim, o marcador foi aquecido a 70°C por 2 minutos e colocado em gelo até o momento da sua aplicação. A segunda etapa consistiu na preparação do gel, em que 550 uL do gel matrix de RNA foi colocado em microtubo com coluna com filtro. Logo em seguida, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a temperatura ambiente a 1500 xg e uma alíquota de 65 uL do gel filtrado foi adicionado em tubo de 0,5 mL. A terceira etapa foi baseada na preparação do mix de gel com corante. Dessa forma, o corante de RNA foi agitado em aparelho do tipo vórtex por 10 segundos e foi adicionado 1 uL do corante no microtubo de 0,5 mL que continha o gel filtrado. Este tubo foi agitado e centrifugado por 10 minutos a 13000 xg em temperatura ambiente. A quarta etapa refere-se a transferência do mix de gel com corante para o *chip*. Para isso, o *chip* foi colocado no *priming station* com os ajustes corretos para leitura de RNA e então, foi pipetado 9 uL do mix de gel com corante no poço especificado pelo manual com auxílio de seringa acoplada no *priming station*, para distribuição do gel por todo o *chip*, e em seguida, foi adicionado 9 uL desse mix em outros dois poços indicados com a letra G. A quinta etapa compreende a transferência de 5 uL do marcador de RNA em todos os 12 poços em que será aplicada as amostras e no poço especificado pelo fabricante. O último passo de preparação para a corrida refere-se a transferência 1 uL do marcador molecular em poço previamente especificado, 1uL de amostra em cada um dos 12 poços, seguida de agitação horizontal em aparelho do tipo vórtex IKA MS3 (Manca, Hong Kong) com duração de 1 minuto e velocidade 2400 rpm.

Após a preparação das amostras, o *chip* foi inserido no Agilent 2100 Bioanalyzer, selecionada a análise de RNA total de eucariotos e feita a corrida e leitura no software Agilent 2100 expert. Após 30 minutos de corrida eletroforética, obteve-se o resultado.

5.8. Sequenciamento em larga escala da amostra selecionada

A amostra selecionada a partir da análise qualiquantitativa em eletroforese microfluídica, foi preparada para o envio para a empresa Omega Biotek (Georgia, Estados Unidos), responsável pelo sequenciamento da amostra de *H. brasiliensis*. A preparação para envio do material foi feito usado o kit RNA Transport (Omega Biotek, 2013), seguindo as

recomendações fornecidas pelo fabricante, que consistia na adição de três volumes do reagente de proteção em um tubo de 1,5 mL e, em seguida, adicionado o volume de RNA da amostra referente à concentração de 2 µg. A mistura do RNA com o reagente foi homogeneizada e armazenada a temperatura ambiente. O transporte das amostras até a empresa foi feito pela empresa Síntese Biotecnologia (Belo Horizonte, Brasil).

5.9. Sequenciamento de pequenos RNAs

A preparação das amostras para sequenciamento foi feita usando o kit NEXTflex Small RNA – Seq V3 (Bioo Scientific Corp, 2015), que fornece adaptadores aleatórios para reduzir o viés de amplificação, usando protocolos com poucos insumos e com maior especificidade. O protocolo usado consiste na ligação dos adaptadores na extremidade 3' (5' rApp /NNNNTGGAATTCTCGGGTGCCAAGG/3ddC/3') e na extremidade 5' (5'GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUCNNNN 3'), seguida da síntese do cDNA pela enzima MuLV Reverse Transcriptase (Bioo Scientific, 2015) e o iniciador NEXTflex RT 5' GCCTTGGCACCCGAGAATTCCA 3', seguida da amplificação com iniciadores universais marcados (5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTTCAGAGTTCTACAGTCCCGA 3' e 5' CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATXXXXXX¹GTGACTGGAGTTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA 5') que tem o objetivo de aumentar o número de cópias de cada sequência e por último, a eluição da amostra e corrida em gel TBE – PAGE corado com SYBR Gold (Invitrogen, 2006) para seleção por tamanho dos pequenos RNAs. O fabricante recomenda que a amostra que apresentar uma banda de aproximadamente 150 pb indica sucesso da preparação da biblioteca, e a ausência da banda de aproximadamente 130 pb indica que a metodologia de purificação sem o uso de gel pode ser empregada. A amostra enviada para o sequenciamento apresentou essas características e por isso, a purificação foi realizada com o kit NEXTflex Cleanup (Bioo Scientific, 2015). Após a purificação, foi verificada a distribuição da biblioteca novamente em eletroforese microfluídica pela análise de sensibilidade de DNA e a concentração no fluorômetro (Qubit) pela metodologia de dsDNA HS (Life Technologies, 2015) e sequenciado no aparelho HiSeq (Illumina).

5.10. Análise do sequenciamento de pequenos RNAs

As sequências provenientes do sequenciamento tiveram quatro nucleotídeos retirados de cada extremidade e a sequência do adaptador 3' também foi removida (5' TGG AATTCTCGGGTGCCAAGG 3'). Após a remoção dos adaptadores, as sequências foram submetidas a um filtro de qualidade por meio do comando *fastx_quality_filter* e *fastx_toolkit*, parte do pacote *fastx-toolkit* (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html). As sequências que apresentaram qualidade *phred* menor que 20, mais curta que 15 nucleotídeos e que continha bases ambíguas foram descartadas (Aguiar *et al.*, 2015). As sequências restantes foram comparadas com o genoma de referência, permitindo uma base desemparelhadas (*mismatches*), usando o programa *Bowtie* (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>) e aquelas que apresentaram similaridade superior a 98% também foram descartadas, uma vez que o objetivo era a detecção de fitopatógenos no hospedeiro. O genoma da *H. brasiliensis* foi recuperado no *Genome Online Database* (<https://gold.jgi.doe.gov/>).

As sequências restantes (não mapeadas com o genoma de referência) foram filtradas pelo tamanho de 21 nt e usadas para sobreposição e junção das sequências de maior tamanho (*contigs*) usando o programa *Velvet assembly* com a linha de comando *velvet_asm.afg file*. O valor de K-mer usado (K-mer 15) foi gerado pelo programa *VelvetOptimiser* (<http://bioinformatics.net.au/software/velvetoptimiser.shtml>). Após a montagem dos *contigs*, aqueles redundantes foram retirados usando o programa *BLASTClust* (*BLAST package*). Os *contigs* restantes foram comparados com sequências de nucleotídeos e proteínas usando o *blastn* e o *blastx*, respectivamente. Os *contigs* virais e fúngicos foram identificados usando o *GenBank database* (similaridade da sequência de nucleotídeos ou proteína e domínios conservados). Foram considerados apenas os *contigs* que apresentavam *E-value* de $1e^{-5}$ (nucleotídeo) ou $1e^{-3}$ (proteína) no banco de dados referência do NCBI, com cobertura superior a 90% à nível de nucleotídeos e a 70% à nível de proteína.

Para avaliar o perfil de pequenos RNAs, as sequências foram mapeadas contra sequências de referência, usando o programa *Bowtie* (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>), permitindo apenas um *mismatch*. O perfil de pequenos RNAs considera a frequência, o tamanho que pode variar entre 15 – 35 nt mapeados no genoma de referência e o sentido de cada sequência. Também foi avaliada a relação entre os perfis de pequenos RNAs de diferentes sequências e foi calculado o número de vezes que

cada sequência de pequenos RNAs apresentava cobertura semelhante quando comparado com a sequência de referência para determinar a densidade. A densidade é usada como parâmetro para identificação de sequências virais que possuem similaridade com sequências já depositadas em bancos de dados. O gráfico de densidade gerado possui no eixo x a sequência referência (retirada de bancos de dados) e no eixo y os picos de densidade de sRNAs ao longo da sequência referência e nas fitas senso positivo e negativo. Quando os sRNAs estão distribuídos ao longo de toda a sequência de referência, pode ser inferida a similaridade das sequências com vírus já identificados e descritos. Quando um número alto de *contigs* não possui similaridade com nenhuma sequência depositada em bancos de dados, são usados os perfis de sRNAs para verificar a assinatura molecular específica de vírus (21-23 nt). O perfil de sRNAs é demonstrado em um gráfico onde o eixo x é o tamanho da sequência de sRNAs gerados em nt e no eixo y o número de sequências de sRNA geradas pelas fitas positiva e negativa de DNA. A presença de sRNAs de tamanho simétrico entre 20-23 nt com uma abundância similar entre as fitas senso positivo e negativo de um *contig* sugere que eles foram originados a partir de um RNA fita dupla (dsRNA) que foi processado pela via siRNA. A densidade e o perfil de sRNAs foram demonstradas pelo programa R com o pacote *ggplot2* (<https://www.r-project.org/>) (Aguiar *et al.*, 2015).

5.11. RT-PCR

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi dividida em duas etapas. Na primeira etapa, foi adicionado 1 µL de iniciadores randômicos (0,5 µg /µL), RNA [200 ng] e água para o volume final de 11 µL em um microtubo de 0,5 mL. Esse tubo foi aquecido na temperatura de 90°C por 5 minutos e imediatamente foi colocada em gelo. Este passo é necessário para abrir a dupla fita e permitir que a enzima reconheça a fita de RNA (Rwahnih *et al.*, 2011). Na segunda etapa foi adicionado 14 µL de mix da enzima M-MLV Reverse Transcriptase® (Promega, 2014). A concentração e o volume de cada reagente presente no mix está na Tabela 3. Após a adição do *mix*, o tubo foi aquecido na temperatura de 37°C por 60 minutos. Em seguida, o cDNA sintetizado foi quantificado no Nanodrop 2.0 (Thermo Scientific).

Para verificar a qualidade do cDNA e a integridade do RNA usado para a síntese de cDNA foi desenhado um par de iniciadores do gene constitutivo que codifica a actina de *H. brasiliensis*. Esse par de iniciadores foi selecionado por apresentar alta eficiência de amplificação em amostras de folhas. O fragmento amplificado é de 194 pb e as sequências de

cada iniciador, senso e antisenso são respectivamente 5`AGTGTGATGTGGATATCAGG 3` e 5` GGGATGCAAGGATAGTC 3`. As concentrações dos reagentes usados e a ciclagem foram as mesmas apresentadas no artigo de Duan e colaboradores (2010).

Tabela 3 - Concentração e volume dos reagentes do mix M-MLV.

Reagentes	Volume para cada reação
Tampão 5X	5,0 µL
dNTP, (10 mM)	2,0 µL
M-MLV RT (200 U/ µL)	1,0 µL
Água	6,0 uL
Volume final	14,0 µL

5.12. Desenho de iniciadores para qPCR

Os iniciadores usados neste trabalho foram desenhados utilizando o programa *Primer3* v. 0.4.0 na interface do *software Geneious* 6.1. Os iniciadores gerados foram avaliados nos seguintes critérios: tamanho do iniciador (entre 18 a 22 pb), conteúdo das bases citosina e guanina (entre 40%-60%), temperatura de *melting* (entre 55-65°C) e presença de estruturas secundárias a partir da energia de *hairpin* (ΔG -2 a 2kcal/mol), energia de *self-dimer* (ΔG -5kcal/mol) e energia de *hetero-dimer* (ΔG -6kcal/mol). No caso de sondas, a sequência foi selecionada entre o par de iniciadores e foram avaliados os seguintes critérios, tamanho da sonda (entre 20 a 25 nt), a temperatura de *melting* (60-70°C) e o conteúdo GC (entre 35 – 65%). A sonda não pode ser maior que 30 nucleotídeos pela distância afetar a fluorescência e diminuir a intensidade do sinal, como também não deve ter na extremidade 5` a base guanina, pois ela dissipa a fluorescência (Amissah *et al.*, 2012).

5.13. Amplificação quantitativa (qPCR) para detecção viral

O sistema usado para a verificação da qualidade das amostras de cDNA e para a detecção viral na amostra de folha foi a amplificação quantitativa (qPCR). Para a amplificação de reações de iniciadores sem sonda, foi usado o *kit* SYBR Green® (Applied Biosystems), com

os seguintes reagentes e volume final de 10 uL: 5 uL de Master Mix SYBR Green (tampão, DNA polimerase e desoxiribonucleotídeos - dNTPs já estão adicionados), 1 uL de cada iniciador nas concentrações de 400 e 800 nmol e 2 uL de cDNA diluído na concentração final de 250 ng. Para amplificações usando sonda, foi usado o kit TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems). Para ambas as reações, a amostra e controle negativo foram testados em duplicata. Uma vez que o vírus detectado apresentava pouca similaridade com todos os outros vírus descritos (família Tymoviridae) e os trabalhos de detecção viral em seringueiras são escassos, as reações de qPCR não possuíam controle positivo para os *contigs* virais usados na detecção, por isso, é considerada suicida. Os reagentes usados em uma reação estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. Reagentes usados para uma reação de qPCR.

Reagentes	Volume para 1 reação
TaqMan® Universal Master Mix II, with/no	
UNG 2X (Applied Biosystems)	5,0 µL
Iniciadores e sonda (10 pmol)	1,0 µL
Água MILI-Q	2,0 µL
cDNA [<100 ng]	2,0 µL
Volume final	10,0 µL

Após o selamento das placas de qPCR e centrifugação por 3 minutos a 3.200 rpm à temperatura ambiente, as placas foram colocadas e processadas no equipamento 7500 Real Time PCR System™ (Applied Biosystems) com o seguinte programa: um passo de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de um passo de desnaturação a 95°C por 15 segundos, um passo de anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Ao término da reação, os dados gerados foram analisados e avaliados nos quesitos contaminação e amplificação da própria amostra em relação aos iniciadores desenhados.

5.14. Amplificação digital (ddPCR)

Para a quantificação do número de cópias virais do RNA extraído e sequenciado foi feita a amplificação digital (ddPCR) usando os equipamentos QX100 Droplet Generator e o termociclador C1000 com suporte para placas de 96 poços (Bio-Rad, EUA). Os mesmos pares de iniciadores com sondas foram usados para a realização dos experimentos. Para isso, foi feito um *mix* para cada um dos quatro pares de iniciadores com sondas. Foi usado o ddPCR *Supermix for probes* (No dUTP) 2X contendo tampão, cloreto de magnésio, dNTP, enzima polimerase com função *hot-start*. Todos os componentes ficaram à temperatura ambiente por 10 minutos, misturadas em aparelho tipo vórtex, para completa homogeneização dos reagentes. O *mix* foi preparado de acordo com a Tabela 5. Para cada reação foi calculado um erro de 2,0 uL a mais que o volume da reação. Após o preparo da reação, foi adicionado o *mix* e o cDNA puro (concentrado) e diluído 1:10 em uma placa de 96 poços e deixados à temperatura ambiente por 5 minutos. Foi adicionado 20 uL de cada poço da placa de 96 poços em um poço da placa do cartucho DG8, seguido da adição de 70 uL do óleo para sondas nos poços especificados e então inserido no aparelho Droplet Generator QX100 para geração das gotas, onde ocorre a amplificação da região alvo. Depois da mistura do *mix* com amostra e o óleo com gotas, a placa do cartucho foi transferida para uma nova placa de 96 poços específica para a amplificação e selada com folha de alumínio no aparelho PX1 PCR Plate Sealer. A placa foi colocada no termociclador C1000, onde foram testados duas temperaturas diferentes para cada um dos pares de iniciadores e sondas testadas de acordo com as recomendações do fabricante. A ciclagem foi composta por um passo inicial de ativação da enzima polimerase a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos e anelamento e extensão a 58 ou 60°C por 1 minuto, seguido de um ciclo de desativação da enzima a 98°C por 10 minutos e um *hold overnight* a 4°C. Posteriormente, a placa foi retirada do termociclador e inserida no equipamento QX100 Droplet Reader, onde foi selecionado o teste de quantificação absoluta com o alvo para FAM e início da leitura de cada poço da placa amplificada. A análise foi feita no *software* QuantaSoft e verificado o valor de *threshold* (limiar) e o número de cópias do alvo na reação de 20 uL.

Tabela 5. Reagentes usados em uma reação de ddPCR.

Reagentes	Volume para 1 reação (uL)
Iniciadores 10pmol e	2,16
Sonda 5 pmol	
<i>Mix</i>	10
cDNA	2,0
Volume final	24,0
Volume por tubo	22,0
Água q.s.p.	9,84

5.15. Análises filogenéticas

As sequências usadas para o desenho de iniciadores foram as mesmas utilizadas para as análises filogenéticas. Essas sequências foram alinhadas utilizando-se o programa MAFFT v.7, pela estratégia E-INS-i (instalado como *plugin* do programa Geneious® e, posteriormente, corrigidas manualmente base a base). A partir das sequências alinhadas foi criada a sequência consenso que foi alinhada com diferentes sequências de proteína de espécies virais da ordem Tymovirales obtidas em Li e colaboradores (2016) (Tabela 6).

Após o alinhamento, foram testados vários métodos de análises filogenéticas. A primeira análise realizada foi pelo método de distância, utilizando o algoritmo de Neighbor Joining com o valor de *bootstrapping* de 1000 iterações. A Análise bayesiana foi realizada no programa MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Para escolha do modelo evolutivo, foi utilizado o programa jModeltest v.0.1.1 (Posada, 2008), e foi verificado que o melhor modelo evolutivo que mais ajustava aos dados empíricos foi o LG + I + G. Os valores de Probabilidade Posterior (PP) > 0.95 % foram considerados como muito significativos. A análise de Verossimilhança Máxima foi realizada no programa PhyML3.0 (Guindon & Gascuel, 2003), utilizando também o programa jModeltest2 para a seleção prévia do modelo evolutivo mais provável, que no caso, foi o mesmo modelo LG + I + G.

Tabela 6. Sequências virais usadas nas análises filogenéticas.

Gênero	Espécie viral	Número de acesso		Referência
		nt	rp	
Tymoviridae				
Maculavirus	<i>Grapvine fleck virus</i> (GFkV)	NC_003347	NP_542612	Sabanadzovic <i>et al.</i> , 2001
	<i>Citrus sudden death-associated virus</i> (CSDaV)	NC_006950	YP_224218	Maccheroni <i>et al.</i> , 2005
Marafivirus	<i>Maize rayado fino virus</i> (MRFV)	AF265566	AAK52838	Hammond & Ramirez, 2001
	<i>Oat blue dwarf marafivirus</i> (OBDV)	U87832	AAC57874	Edwards <i>et al.</i> , 1997
	<i>Anagyris vein yellowing virus</i> (AVYV)	NC_011559	YP_002308578.1	Koenig <i>et al.</i> , 2005
	<i>Diascia yellow mottle virus</i> (DiaYMV)	NC_011086	YP_002048673	Segwagwe <i>et al.</i> , 2008
Tymovirus	<i>Eggplant mosaic virus</i> (EMV)	NC_001480	NP_040968	Osorio-Keese <i>et al.</i> , 1989
	<i>Nemesia ring necrosis virus</i> (NeRNV)	NC_011538	YP_002308442	Koenig <i>et al.</i> , 2005
	<i>Ononis yellow mosaic tymovirus</i> (OYMV)	NC_001513	NP_041257	Ding <i>et al.</i> , 1989

Tymovirus	<i>Plantago mottle virus</i> (PlMoV)	NC_011539	YP_002308445	Koenig <i>et al.</i> , 2005
	<i>Turnip yellow mosaic virus</i> (TYMV)	AF035403	AAB92649	Skotnicki <i>et al.</i> , 1992
Alphaflexviridae				
Allexivirus	<i>Shallot virus X</i> (ShVX)	NC_003795	NP_620648	Kanyuka <i>et al.</i> , 1992
Botrexvirus	<i>Botrytis virus X</i> (BotVX)	NC_005132	AAL177722	Howitt <i>et al.</i> , 2006
Lolavirus	<i>Lolium latente virus</i> (LoLV)	NC_010434	YP_001718499	Vaira <i>et al.</i> , 2008
Mandarivirus	<i>Indian citrus ringspot virus</i> (ICRSV)	NC_003093.1	NP_203553	Rustici <i>et al.</i> , 2002
Potexvirus	<i>Potato virus X</i> (PVX)	NC_011620	YP_002332929	Huisman <i>et al.</i> , 1988
Sclerodarnavirus	<i>Sclerotinia sclerotiorum debilitation-associated RNA virus</i> (SSDaRV)	NC_007415	YP_325662	Xie <i>et al.</i> , 2006
Gammaflexviridae				
Mycoflexvirus	<i>Botrytis virus F</i> (BotV-F)	NC_002604	NP_068549	Howitt <i>et al.</i> , 2001

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Áreas de coleta

Na PARNA de Anavilhanas, foram coletados quatro indivíduos aparentemente saudáveis. As coordenadas geográficas dos indivíduos coletados são: Indivíduo 1 (Lat: 03° 00' 201" S Long: 060° 25' 846" W), Indivíduo 2 (Lat: 03° 00' 200" S Long: 060° 25' 842" W), Indivíduo 3 (Lat: 02° 59' 871" S Long: 060° 26' 239" W) e Indivíduo 4 (Lat: 02° 59' 867" S Long: 060° 26' 248" W). Na Flona de Caxiuanã, foram coletados cinco indivíduos aparentemente assintomáticos para lesões geradas por fitopatógenos, cujas coordenadas são: Indivíduo 1 (Lat: 01° 45' 59.9" S Long: 51° 24' 17.2" W), Indivíduo 2 (Lat: 01° 45' 59.8" S Long: 51° 24' 17.0" W), Indivíduo 3 (Lat: 01° 45' 59.5" S Long: 51° 24' 17.5" W), Indivíduo 4 (Lat: 01° 46' 00" S Long: 51° 24' 16.8" W) e Indivíduo 5 (Lat: 01° 45' 25.8" S Long: 51° 26' 09" W). Para cada indivíduo de ambos os parques foram coletados pelo menos um fragmento de alburno e cinco folhas compostas, sendo que foram selecionados aleatoriamente um folíolo de cada folha e feito o processo de desinfecção superficial.

A *H. brasiliensis* é nativa da região amazônica brasileira, onde se encontram as melhores características para o desenvolvimento propício da planta (Silva *et al.*, 2014). A FLONA de Caxiuanã e o PARNA de Anavilhanas foram selecionados por apresentar áreas de cobertura vegetal nativa, de preservação e de proteção ecológica dos ecossistemas. Nessas áreas não é permitido a exploração das espécies da flora e fauna presentes e é disponibilizado para a população o espaço para visitação de forma que os visitantes aprendam sobre a importância da diversidade e das pesquisas desenvolvidas no ambiente (Pádua, 1999; Gonçalves *et al.*, 2012).

6.2. Isolamento e preservao dos fungos endofíticos

O número total de fungos endofíticos isolados de folhas e alburno de seringueiras foram de 335 acessos (culturas puras), sendo 90,45% (297) de fungos isolados de folhas e 9,55% (38) isolados de alburno. O menor percentual de isolados a partir de alburno deve-se provavelmente ao menor número de fragmentos coletados e cultivados por indíviduo. Além disso, não houve isolamento de fungos a partir de alguns fragmentos de alburno (ex. Indivíduo 1 da PARNA de Anavilhanas e Indivíduo 4 da FLONA de Caxiuanã). Gazis &

Chaverri (2015) verificaram em seu estudo que o número de isolados a partir do alburno é menor do que os encontrados em folhas. Esse resultado foi o mesmo encontrado neste estudo, em que a abundância de endofíticos foi maior em folhas.

No PARNA de Anavilhanas, foram isolados um total de 161 fungos, sendo desses 3,73% (6) de alburno e 96,27% (155) de folhas, enquanto que na FLONA de Caxiuanã, foram isolados um total de 174 fungos, sendo 18,40% (32) de alburno e 81,60% (142) fungos de folhas. Foi isolado um maior número de fungos endofíticos em folhas do PARNA Anavilhanas do que na Flona de Caxiuanã. Na Tabela 7, pode-se verificar o número de isolados por indivíduo de seringueira coletado. O indivíduo 4 do PARNA Anavilhanas foi o que apresentou maior número de isolados fúngicos (45), enquanto que o indivíduo 4 da Flona de Caxiuanã apresentou o menor número de isolados (29). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa no número de isolados fúngicos nos distintos indivíduos dos dois parques ($p = 0,999$, teste T de Student), o número de isolados purificados de cada indivíduo segue a distribuição normal ($p = 0,9675$ teste de Shapiro-Wilk) e todas as variâncias são iguais ($p = 0,6433$ teste de Mantel-Cochran-Haenszel).

Tabela 7. Número de isolados por indivíduo de *Hevea brasiliensis* coletado.

Localização	Indivíduo	Número de isolados
PARNA Anavilhanas	1	34
PARNA Anavilhanas	2	41
PARNA Anavilhanas	3	41
PARNA Anavilhanas	4	45
Flona Caxiuanã	1	39
Flona Caxiuanã	2	37
Flona Caxiuanã	3	38
Flona Caxiuanã	4	29
Flona Caxiuanã	5	31
Total	9	335

Neste estudo, foram isolados 335 fungos a partir de 45 folhas de nove indivíduos de *H. brasiliensis* de duas áreas de estudo. Rocha e colaboradores (2011) purificaram 435 isolados de fungos endofíticos de 15 indivíduos de *H. brasiliensis* em plantação comercial no estado

da Bahia. Pelo menos um fungo endofítico foi isolado de cada folha, o que é corroborado por Arnold e colaboradores (2001) e por Saucedo-García e colaboradores (2014) para plantas em diferentes regiões climáticas. Arnold e colaboradores (2001) propuseram uma forma de comparação a partir do número de isolados obtidos por fragmento de folha. Neste estudo, foi observado que cada folha possuía pelo menos um gênero de fungos endofíticos infectando.

Uma vez em cultura pura, os isolados foram agrupados de acordo com as características morfológicas incluindo: forma do micélio aéreo, cor da colônia, textura da superfície e características da margem. Muitos fungos não produzem estruturas sexuadas ou assexuadas no meios de cultura convencionais, como Agar batata dextrosado, ágar fubá, extrato de malte e sabouraud dextrose. Por essa razão os isolados de fungos filamentosos foram identificados por meio do sequenciamento da região de código de barras primário de fungos: o ITS do rDNA (Schoch et al., 2012).

6.3. Identificação dos fungos endofíticos

O sequenciamento foi realizado com os iniciadores ITS4 (Reverso) e ITS5 (Direto). Quase oitenta e seis por cento (85,60%) das sequências apresentaram boa qualidade Phred com base nos quesitos: tamanho da sequência maior que 400 pb e qualidade da sequência maior que 40 . A identificação molecular revelou vinte e três diferentes gêneros (Tabela 8); as informações da identificação de cada um dos 335 isolados está disponível no anexo 9.1.

Tabela 8. Taxons identificados pela análise da região da região ITS.

Taxon	Número de isolados	Exemplos
<i>Arthrinium</i> sp.	01	HB272
<i>Aspergillus</i> sp.	03	HB11, HB14, HB36
<i>Bionectria</i> sp.	39	HB002, HB12, HB29, HB270, HB373, HB390
<i>Botryosphaeria</i> sp.	02	HB21, HB199
<i>Colletotrichum</i> sp.	148	HB22, HB62, HB92, HB100, HB207, HB284, HB367
<i>Daldinia</i> sp.	04	HB79, HB87, HB90, 181
<i>Diaporthe</i> sp.	19	HB32, HB57, HB101, HB149, HB294, HB312
<i>Hypoxyton</i> sp.	06	HB70, HB119, HB245
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	10	HB240, HB350, HB353
<i>Muscodor</i> sp.	02	HB218, HB349
<i>Nectria</i> sp.	01	HB261
<i>Nemania</i> sp.	02	HB50, HB276
<i>Neofusicoccum</i> sp.	01	HB165
<i>Penicillium</i> sp.	01	HB257
<i>Peniophora</i> sp.	08	HB229, HB253, HB356
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	06	HB260, HB300, HB383
<i>Phanerochaete</i> sp.	01	HB339
<i>Pleurostoma</i> sp.	01	HB280
<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	15	HB06, HB19, HB116
<i>Pseudopestalotiopsis</i> sp.	01	HB295
<i>Trametes</i> sp.	01	HB186
<i>Trichoderma</i> sp.	52	HB71, HBA05, HB290, HB307, HB333, HB387
<i>Xylaria</i> sp.	21	HB01, HB130, HB244

Os isolados identificados foram considerados inicialmente apenas ao nível de gênero, uma vez que a região preconizada como código de barras primário de fungos não apresenta de

modo geral resolução taxonômica suficiente para discriminar espécies. Mesmo assim, a região ITS é muito usada por ser de fácil amplificação, alta fidelidade e pela maioria dos bancos de dados apresentarem inúmeras sequências para o estudo dessa região (Stielow *et al.*, 2015). Na tentativa de agrupar os isolados ao nível de espécie, foi feito o alinhamento das sequências usando o programa MAFFT e gerada uma matriz de distância com o programa MOTHUR. Os dados foram alinhados com sequências de referência, considerando 99% de similaridade entre as sequências, e foram gerados 87 grupos distintos e cada grupo corresponde a uma distinta hipótese de espécie (Koljang, et al., 2013) (Tabela 9). As informações de quantos e de quais isolados foram agrupados em cada grupo está disponível no anexo 9.2.

Tabela 9. Grupos formados pelo alinhamento no MAFFT e agrupamento no MOTHUR.

Gênero	Número de agrupamentos	Abreviatura
<i>Arthrinium</i> sp.	1	AR1
<i>Aspergillus</i> sp.	2	AS1, AS2
<i>Bionectria</i> sp.	5	BI1 -BI5
<i>Botryosphaeria</i> sp.	1	BT1
<i>Colletotrichum</i> sp.	16	CO1-CO16
<i>Daldinia</i> sp.	2	DA1, DA2
<i>Diaporthe</i> sp.	13	DI1-DI13
<i>Hypoxylon</i> sp.	4	HY1-HY4
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	2	LA1, LA2
<i>Muscodor</i> sp.	1	MU1
<i>Nectria</i> sp.	1	NE1
<i>Nemania</i> sp.	1	NM1
<i>Neofusicoccum</i> sp.	1	NF1
<i>Penicillium</i> sp.	1	PE1
<i>Peniophora</i> sp.	6	PN1-PN6
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	3	PT1-PT3
<i>Phanerochaete</i> sp.	1	PH1
<i>Pleurostoma</i> sp.	1	PL1
<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	4	PS1-PS4
<i>Pseudopestalotiopsis</i> sp.	1	PD1
<i>Trametes</i> sp.	1	TM1
<i>Trichoderma</i> sp.	8	TR1-TR8
<i>Xylaria</i> sp.	11	XY1-XY11

A estratégia de separação das prováveis espécies de acordo com a similaridade das sequências já foi descrita por Gazis & Chaverri (2015) para as análises ecológicas dos fungos

endofíticos de indivíduos de *H. brasiliensis* na Amazônia ocidental extra-brasileira e África. As análises de ecologia de comunidades foram realizadas inicialmente considerando ao nível de gêneros (n = 23) e posteriormente considerando as prováveis espécies (n = 87).

6.4. Análises estatísticas

6.4.1. Ao nível de gêneros

Um total de 23 gêneros foram identificados e a distribuição dos isolados seguiu o padrão de log-normal, com poucos gêneros identificados em ambas as áreas de coleta (PARNA de Anavilhanas e FLONA de Caxiuanã) e muitos gêneros com apenas um único isolado identificado nos indivíduos de *H. brasiliensis* coletados nessas áreas.

A curva de acumulação de gêneros (Figura 9) não alcançou a assíntota, indicando que o esforço amostral não foi suficiente para identificar toda a riqueza da comunidade de fungos endofíticos cultiváveis nas áreas amostradas (Figura 9). E por isso, mais coletas seriam necessárias para estimar a real diversidade dos fungos endofíticos no tecido foliar.

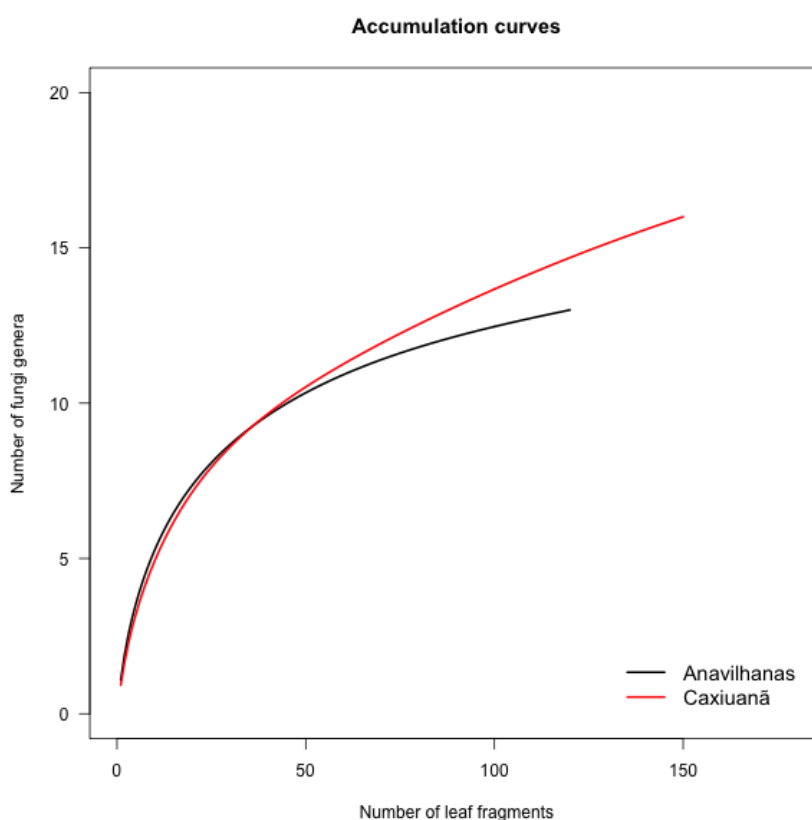


Figura 9. Curva de acumulação dos fungos endofíticos isolados de *Hevea brasiliensis* na Floresta Nacional de Caxiuanã e no Parque Nacional de Anavilhanas.

Os isolados pertencem a 23 gêneros distintos (Tabela 10), dos quais 86,96% são do Filo Ascomycota e 13,04% do Filo Basidiomycota e se distribuem em 4 classes diferentes: Sordariomycetes (60,87%), Dothideomycetes (17,39%), Eurotiomycetes (8,70%) e Agaricomycetes (13,04%) (Tabela 9). Um total de 7 gêneros foi comum a ambas as áreas de estudo enquanto que seis gêneros foram isolados apenas de indivíduos de Anavilhanas e 10 gêneros de indivíduos de Caxiuana (Figura 10 e Figura 11). Também foi verificado que um gênero identificado foi específico apenas para alburno, enquanto outros gêneros foram comuns para ambos os tecidos (Figura 12b).

Os gêneros mais abundantes nos dois locais de coleta e nos diferentes tecidos foram *Coletotrichum* (43%), *Trichoderma* (16%) *Bionectria* (12%), *Diaporthe* (5,7%) e *Xylaria* (5%) (Figura 13). Entretanto, houve uma clara distinção entre as comunidades nos dois tipos de tecido. Em folhas, *Coletotrichum* (46,62%) e *Bionectria* (13,18%) são os mais abundantes enquanto que em alburno *Trichoderma* é o mais abundante (66,7%).

Tabela 10. Abundância dos isolados por Filo e por Classe.

	Filo		Classe	
	ANA	CAX		
Ascomycota	160	165	Sordariomycetes	140 154
Basidiomycota	1	9	Dothideomycetes	18 10
			Eurotiomycetes	3 1
			Agaricomycetes	0 9

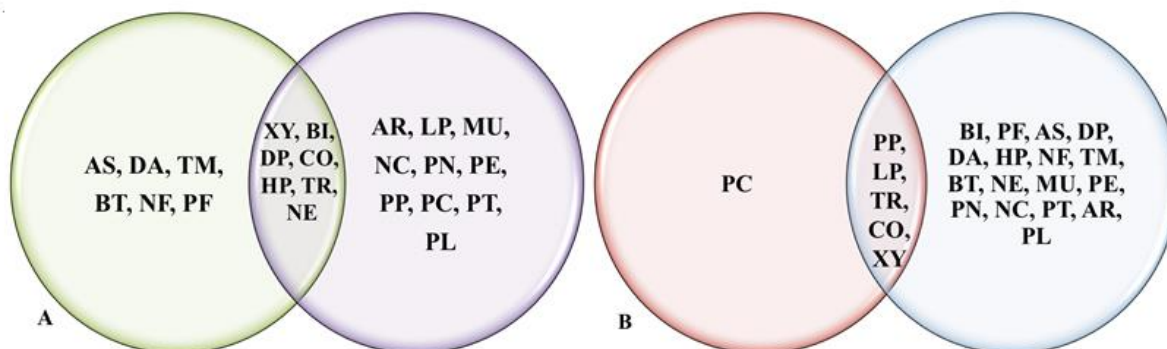


Figura 10. Relação entre os gêneros identificados nas áreas de estudo. A: Gêneros específicos e comuns a ambas áreas de coleta.

Em verde representado a PARNA Anavilhanas e em roxo, a FLONA Caxiuanã. **B:** Gêneros específicos para cada um dos tecidos coletados em ambas áreas de estudo. Em vermelho, alburno e em azul, o tecido foliar. AS – *Aspergillus* sp.; DA – *Daldinia* sp.; TM – *Trametes* sp.; BT – *Botryosphaeria* sp.; NF – *Neofusicoccum* sp.; PF – *Pseudofusicoccum* sp.; XY – *Xylaria* sp.; BI – *Bionectria* sp.; DP – *Diaporthe* sp.; CO – *Colletotrichum* sp.; HP – *Hypoxyton* sp.; TR – *Trichoderma* sp.; NE – *Nemania* sp.; AR- *Arthrinium* sp.; LP – *Lasiodiplodia* sp.; MU – *Muscodora* sp.; NC – *Nectria* sp.; PN – *Penicillium* sp.; PE – *Peniophora* sp.; PP – *Pestalotiopsis* sp.; PC – *Phanerochaete* sp.; PT – *Pleurostoma* sp.; PL – *Pseudopestalotiopsis* sp.

Alguns dos gêneros mais abundantes encontrados no presente estudo, como, por exemplo, *Colletotrichum* / *Glomerella*, *Diaporthe* / *Phomopsis* e *Xylaria* correspondem a fungos endofíticos multi-hospedeiros em árvores de regiões tropicais, ou seja, ecologicamente, são generalistas (Rubini *et al.*, 2005; Arnold *et al.* 2007; Suryanarayanan, 2011; Vaz *et al.*, 2014; Tonial *et al.*, 2016). Gazis & Chaverri (2010), trabalhando com fungos endofíticos em *Hevea brasiliensis* na Amazônia Ocidental extra-brasileira (Peru), reportou que os gêneros *Pestalotiopsis* e *Trichoderma* / *Hypocrea* foram respectivamente o primeiro e o segundo mais abundantes. O gênero *Trichoderma* também foi um dos gêneros mais abundantes em *Hevea brasiliensis* na Amazônia Oriental brasileira, entretanto, o gênero *Pestalotiopsis* representou apenas 1,49% do total de isolados neste estudo. Similarmente, o gênero *Colletotrichum* / *Glomerella*, o qual foi o mais abundante na Amazônia Oriental (Brasil) foi considerado raro (abundância relativa entre 1-3%) na Amazônia Ocidental (Peru) no mesmo hospedeiro. Tanto *Colletotrichum* como *Pestalotiopsis* são considerados fungos endofíticos generalistas em árvores tropicais e essa divergência pode ser atribuída pela metodologia utilizada no isolamento, uma vez que os meios de cultura foram distintos nos dois trabalhos, o que pode ter favorecido o isolamento preferencial de cada desses gêneros (Kirk *et al.*, 2004).

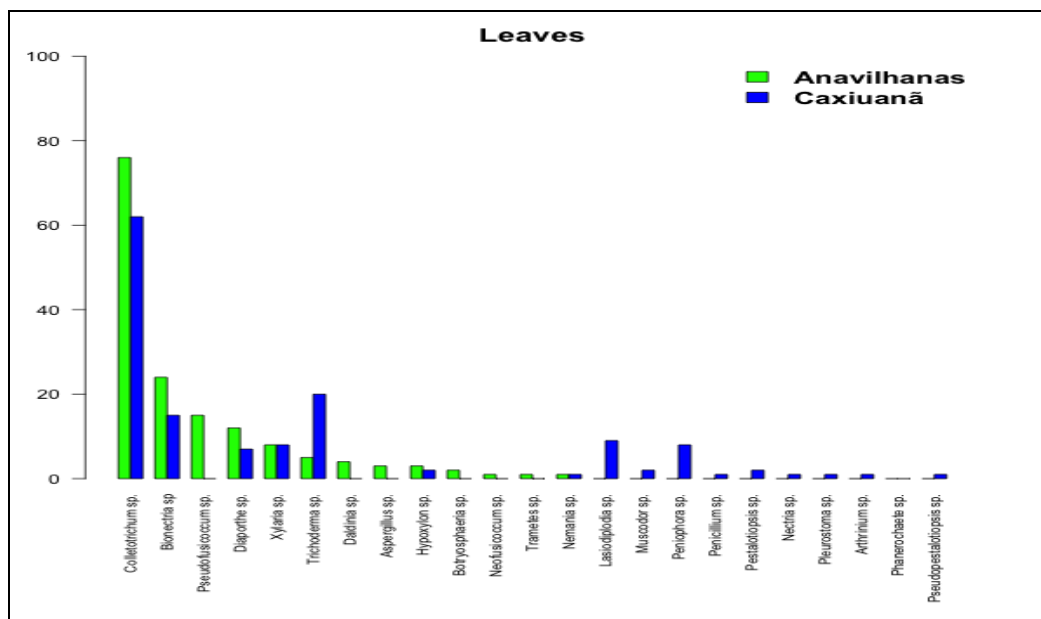


Figura 11. Frequência dos gêneros em relação a abundância. Gêneros com um isolado foram incluídos.

O estudo da estrutura de comunidades de fungos endofíticos no tecido foliar dos indivíduos amostrados incluiu a determinação dos aspectos qualitativos (composição taxonômica) e quantitativos (riqueza, abundância, equitatividade) da diversidade. Os índices de diversidade (Shannon e Shannon normalizado) correspondem a um índice composto que leva em consideração conjuntamente os índices de riqueza e abundância relativa enquanto que a equitatividade ou uniformidade (de Shannon) corresponde à distribuição relativa dessas espécies dentro da comunidade (Hammer *et al.*, 2001). A diversidade (Shannon normalizado) de fungos endofíticos é maior no tecido foliar de indivíduos de *H. brasiliensis* na FLONA de Caxiuanã embora a equitatividade tenha sido praticamente a mesma entre as duas áreas de coleta. Esses índices refletem o fato de que a riqueza foi mais elevada na FLONA de Caxiuanã, mas a abundância diferiu pouco entre as duas áreas (Tabela 6), como também a distribuição relativa deles como reflete o índice de equitatividade. Assim como já demonstrado na curva de acumulação dos gêneros (Fig. 11), a estimativa de riqueza dos gêneros por extrapolação, dada pelo índice de CHAO, é superior aos valores de riqueza obtidos de forma empírica (Tabela 11).

Tabela 11. Índices de diversidade dos fungos endofíticos por local de coleta e por origem.

	Diversidade (Shannon)	CHAO	Riqueza	Abundância	Shannon Norm	Equitabilidade (Shannon)
Ana - Folhas	1,73	17,50	13,00	155	5,62	0,67
Cax - folha	1,92	22,00	16,00	142	6,81	0,69

6.4.2. Ao nível de Unidades Taxonômicas Organizacionais

As comunidades de fungos endofíticos no tecido foliar de cada indivíduo de *H. brasiliensis* nas duas áreas de estudo é variável, no entanto, alguns padrões são claramente evidenciados (Figura 12): (i) as prováveis espécies *Colletotrichum* sp1 e *Bionectria* sp1 são geralmente as mais abundantes e encontram-se associadas na maior parte dos indivíduos, independentemente da área de coleta; (ii) todos os indivíduos de *H. brasiliensis* da FLONA de Caxiuanã também apresentam a provável espécie *Trichoderma* sp.1 com elevada abundância relativa, enquanto que nos indivíduos da PARNA de Anavilhanas esse padrão não é detectado. Gazis & Chaverri (2015) demonstraram que plantas nativas de *H. brasiliensis* apresentam uma maior diversidade de espécies do gênero *Trichoderma* sp. em folhas e alburno e que podem auxiliar a planta na proteção contra outros patógenos. Essa diferença pode estar diretamente relacionada à área de estudo, sugerindo a necessidade de uma investigação específica que leve em consideração a fisiologia e o estado fitossanitário das árvores nas diferentes áreas de estudo.

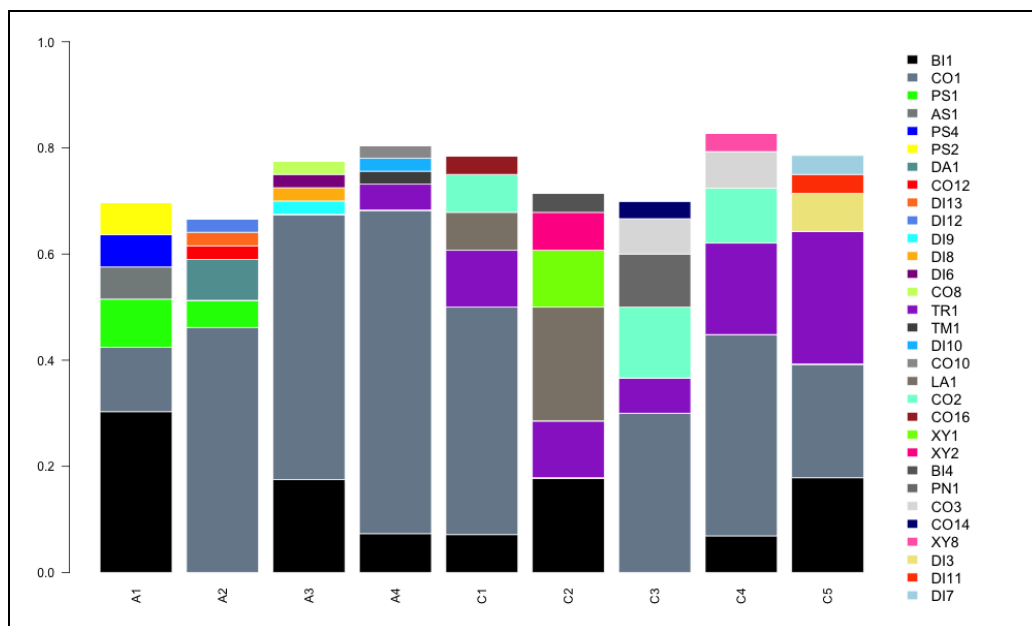


Figura 12. Abundância dos seis OTUs mais prevalentes no tecido foliar em cada indivíduo de *Hevea brasiliensis* coletado. A1 –A4 Indivíduos da PARNA Anavilhanas 1 – 4; C1-C5 Indivíduos da FLONA Caxiuanã 1-5.

Utilizou-se o método de Ordenação, Escalonamento Dimensional Não-Métrico (NMDS), para revelar tendências e ordenar a comunidade de fungos endofíticos das duas áreas de estudo em cada folha de cada indivíduo coletado baseado tanto em dados qualitativos (presença e ausência de OTUs) pelo índice de semelhança de Jaccard e dos dados quantitativos (abundância de isolados por OTU) (Hormann *et al.*, 2015). Independentemente de se utilizar os dados de presença e ausência como de abundância há uma clara separação entre as comunidades de fungos endofíticos nas folhas dos indivíduos das distintas áreas de estudo (Figuras 13 e 14).

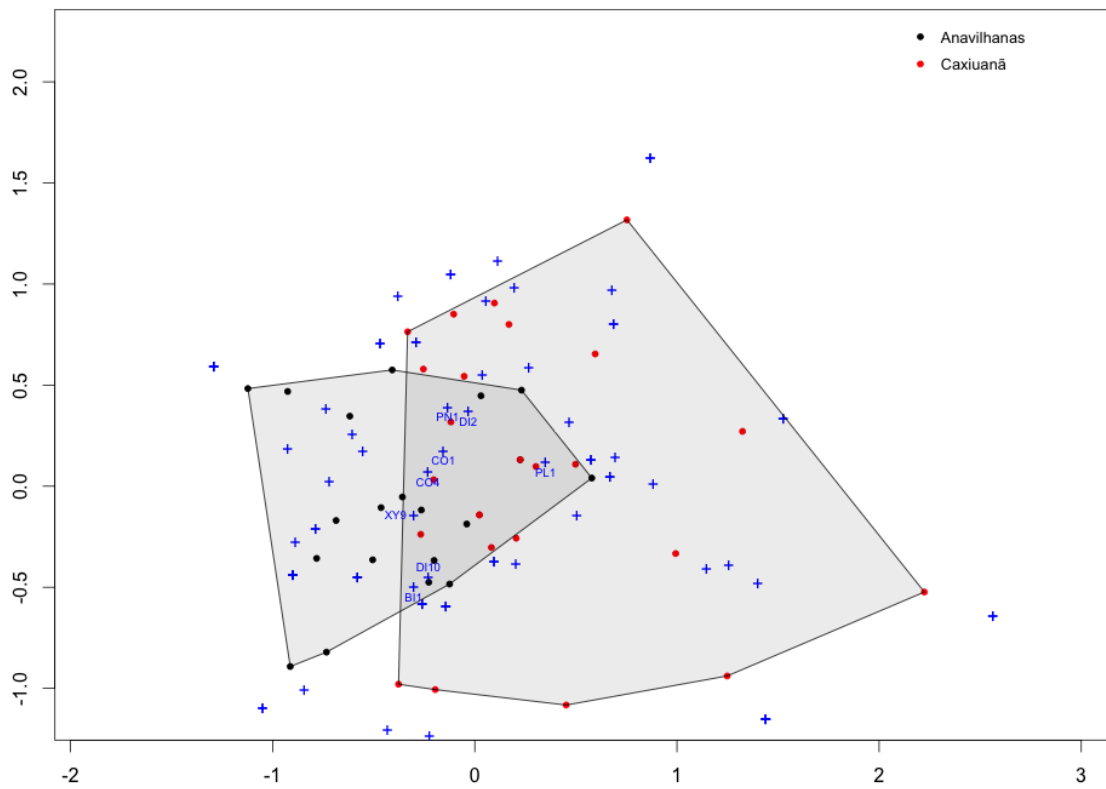


Figura 13. Ordenação por Escalonamento Dimensional Não-Métrico (N-MDS) baseado na composição da comunidade de fungos endofíticos nas folhas de indivíduos de *Hevea brasiliensis* pela distância de Jaccard. + - OTUs identificadas no estudo.

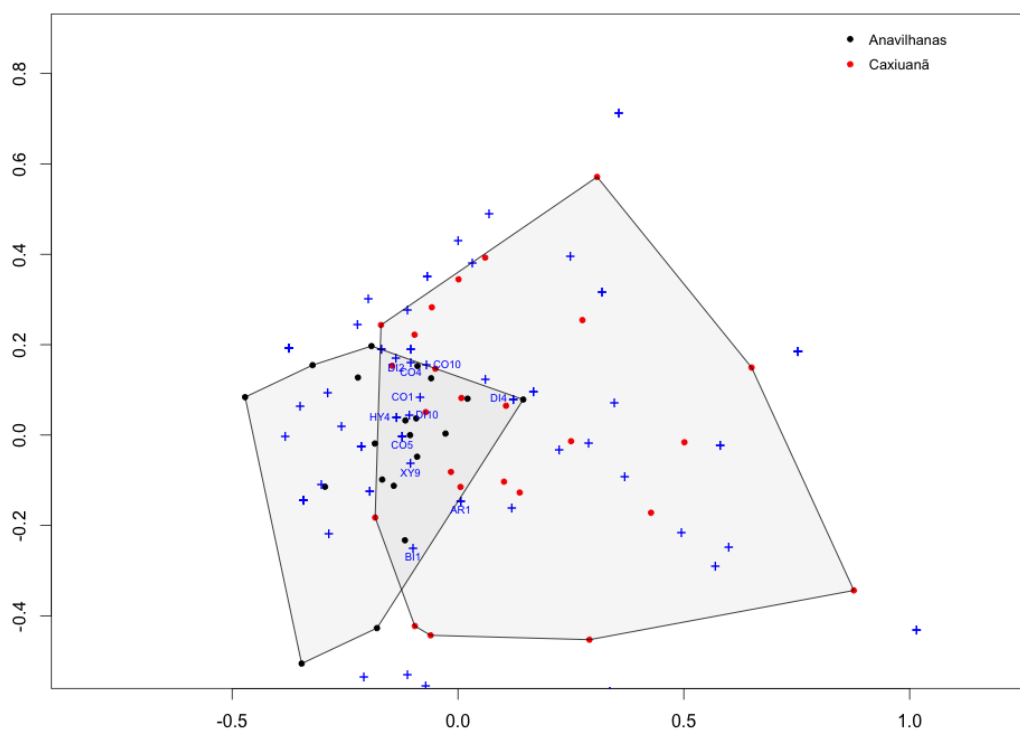


Figura 14. Ordenação por Escalonamento Dimensional Não-Métrico (N-MDS) baseado na composição da comunidade de fungos endofíticos nas folhas de indivíduos de *Hevea* sp. pela distância de Hellinger. + - OTUs identificadas no estudo.

5.5. Extração de RNA total do tecido foliar de *Hevea brasiliensis*

Para a extração de RNA total, foi usado o reagente TRIzol®. Após a extração, o RNA total da amostra foi quantificado por espectrofotometria. Realizou-se a avaliação da amostra quanto à contaminação por proteína (razão 260/280) e contaminação por fenol e outros reagentes (razão 260/230). Os quesitos avaliados no Nanodrop podem ser verificados no Tabela 12.

Tabela 12. Quantificação e qualidade das amostras após a extração de RNA utilizando-se extração orgânica com TRIzol®.

Amostras	Extração de RNA orgânica		
	Relação 260/230	Relação 260/280	Concentração (ng/μl)
Indivíduo C.1	0,40	1,45	149,4
Indivíduo C.2	0,96	1,46	67,44
Indivíduo C.3	0,35	1,18	50,9
Indivíduo C.4	0,37	1,27	39,64
Indivíduo C.5	0,51	1,41	20,98

O método de extração de RNA usando o reagente TRIzol (mistura de fenol, e tiocianato de guanidina em pH 4,0) foi descrito pela primeira vez em 1987, pelos pesquisadores Chomczynski e Sacchi. O método permite o isolamento de RNA, DNA e proteínas totais a partir de pouco material de diferentes tecidos de diferentes organismos, apresentando bons resultados e simplicidade (Chomczynski & Sacchi, 1987; Chomczynski, 1993). Por isso, o método com TRIzol foi selecionado para a realização da extração de RNA total deste trabalho. As relações 260/230 de todos os indivíduos extraídos se apresentaram baixas, mas isso já era esperado, uma vez que espécies da família Euphorbiaceae contém vários polissacarídeos, polifenóis e metabólitos secundários que co-precipitam com o RNA na presença de etanol, ficando como contaminante na amostra (Xu et al., 2009).

6.6. Visualização da integridade do RNA extraído

Para verificar a integridade do RNA total extraído, as amostras foram eluídas em gel de agarose com hipoclorito de sódio. A amostra deveria conter o equivalente a 1 ug de RNA, porém, como todas as amostras de folhas apresentaram uma dosagem baixa (em média 56 ng/uL) e apresentava o volume final de 30 uL, foi eluído apenas 10 uL de RNA (equivalente a aproximadamente 600 ng de RNA total). Nesse gel, também foi eluído uma amostra de RNA total de cultura pura de fungo endofítico [2,5 ug de RNA], como controle positivo e o padrão de peso molecular de 1 Kb (Kappa, 2014). Porém, apenas a amostra de fungo endofítico apresentou bandas íntegras de RNA ribossomal (28S, 18S e 5.8S).

Sabe-se que o RNA é sensível à manipulação inadequada, temperatura e nucleases (Fleige & Pfaffl, 2006). A avaliação da integridade do RNA pode ser feita por vários

métodos, como o gel de agarose desnaturante, porém essa técnica usa reagentes tóxicos e de longa duração. Para análise rápida do RNA total, foi proposto por Aranda e colaboradores (2012) um gel de agarose 1% com hipoclorito de sódio 6%, o hipoclorito é responsável por desnaturar estruturas secundárias do RNA destruindo as ligações de hidrogênio e as RNases presentes no gel, permitindo a visualização das bandas do RNA ribossomal que são usadas como padrão de integridade.

6.7. Análise Qualiquantitativa do RNA total em eletroforese microfluídica

Apesar de o RNA total das amostras de folhas aparentemente não aparecerem íntegros no gel de agarose com hipoclorito de sódio, as amostras foram analisadas qualiquantitativamente em eletroforese microfluídica. Para a seleção da melhor amostra foi considerado a concentração de RNA em solução, e os valores das relações das absorbâncias 260/280 e 260/230 nm. A amostra que apresentou os valores melhores foi a do Indivíduo 2, e por isso, ela foi selecionada para o sequenciamento de pequenos RNAs.

Na figura 15, podemos visualizar a quantidade e qualidade do RNA total da amostra. O primeiro pico (25 nt) visualizado na imagem abaixo indica a presença de pequenos RNAs na amostra, o segundo pico (2000 – 4000 nt) indica a presença da região do rRNA 28S. Podemos verificar a ausência dos picos entre 1000 – 2000 nt (pico da região do rRNA 18S) e o pico em 4000 nt (pico da região do rRNA 5.8S). A concentração de RNA total foi de 59 ng/uL. Ao lado direito da imagem podemos verificar uma canaleta do gel em tempo real, demonstrando apenas a banda da região do rRNA 28S.

A análise em eletroforese microfluídica é muito utilizada para verificar a integridade e dosagem do RNA total das amostras e, diferentemente de métodos espectrofotométricos, apresenta alta sensibilidade, estabilidade, rapidez e necessita de pouca quantidade de material inicial. Outro parâmetro para analisar o RNA, é o Número de Integridade do RNA (*RNA Integrity Number* - RIN) gerado pelo equipamento, que atribui valores de 1 a 10, onde 10 significa o RNA totalmente intacto e 1 o RNA totalmente degradado (Jahn *et al.*, 2008). Entretanto, RNA de plantas geralmente geram baixos valores ou mesmo nenhum valor de RIN (Kim & Haj-Ahmad, 2014).

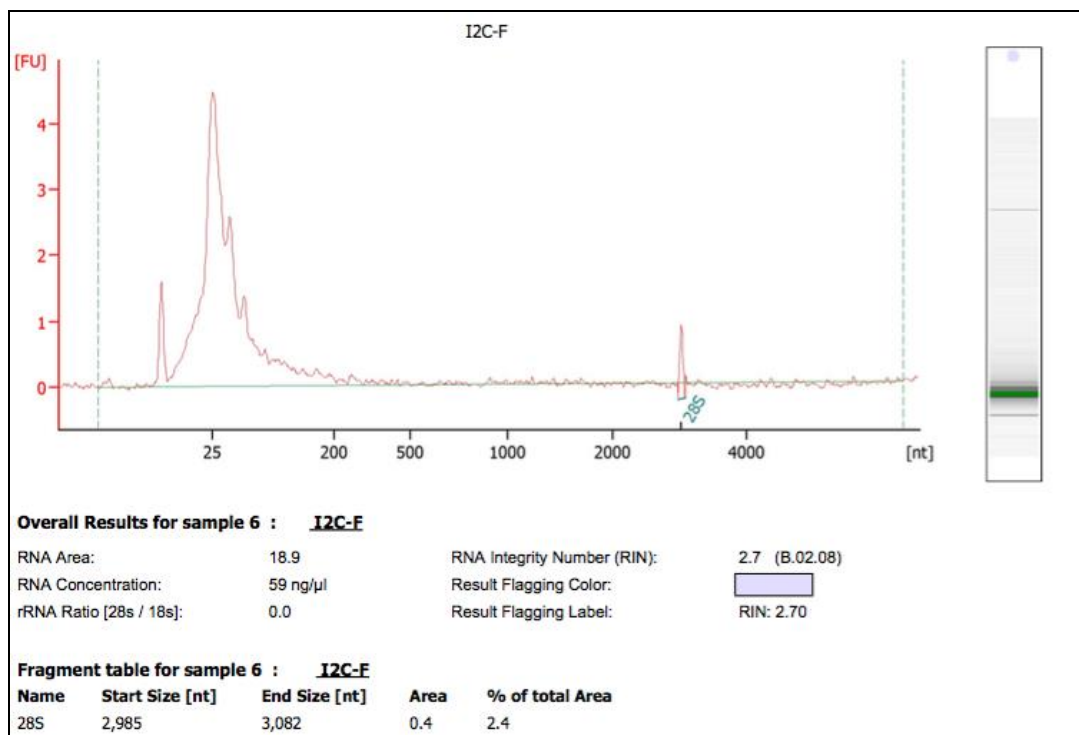


Figura 15. Imagem do eletroferograma obtido a partir da análise da integridade da amostra do Indivíduo 2 de RNA total analisado em eletroforese microfluídica.

6.8. Envio das amostras para o sequenciamento e sequenciamento de pequenos RNAs

A amostra do indivíduo 2 de *Hevea brasiliensis* (FLONA de Caxiuanã) foi preparada para envio usando o kit RNA Transport, e estocado a temperatura ambiente. No dia seguinte, a amostra foi enviada para a empresa Omega Bio-tek para a realização do sequenciamento através da empresa Síntese Biotecnologia. O kit RNA Protection Reagent foi usado para o armazenamento à temperatura ambiente de RNA total purificado, não permitindo a degradação da amostra e eliminando a necessidade de estocar e enviar o material em gelo seco.

A amostra foi entregue após 15 dias do envio e então preparada para o sequenciamento em aparelho HiSeq® (illumina). O kit NEXTflex Small RNA-Seq foi selecionado por reduzir a formação de dímeros de adaptadores produzidos durante a preparação da biblioteca, permitindo a detecção acurada de diferentes sRNAs. Após o preparo da amostra, foi feita novamente a análise qualiquantitativa em eletroforese microfluídica e realizado o sequenciamento.

Diferente da metodologia usada no sequenciamento pelos equipamentos da Roche (454) e da Lifetechnologies (Ion Torrent e Proton), a Illumina utiliza a tecnologia de sequenciamento por síntese (*Sequencing By Synthesis – SBS*). A biblioteca com os adaptadores são desnaturados em fita simples e os adaptadores são ligados na superfície da célula de fluxo (local onde ocorre o sequenciamento), seguido da amplificação por ponte (amplificação da fita simples de DNA que está aderida na superfície da célula de fluxo, a extremidade livre se liga a um adaptador que também está aderido na superfície, e então é adicionado dNTPs, DNA polimerase para alongar a fita). Após a amplificação, o sistema desenvolvido pela Illumina usa dNTPs marcados para detectar cada nucleotídeo adicionado. Esse método permite que várias regiões de alta densidade de sequências seja formada e melhore o sinal produzido e, portanto, a detecção de cada nucleotídeo (Liu *et al.*, 2012).

6.9. Análise do sequenciamento de pequenos RNAs

A biblioteca de sRNA sequenciado pelo aparelho HiSeq (illumina) gerou um total de 10.690.564 sequências (Tabela 13). Após a remoção dos adaptadores e das sequências de baixa qualidade restaram 9.266.320 sequências. Em seguida, foram removidas as sequências do próprio hospedeiro (*H. brasiliensis*) (6.085.037 sequências), sobrando 3.181.283 sequências. Essas sequências foram filtradas por diferentes tamanhos e foram utilizadas para a montagem de *contigs* com o kmer de 15 nt, e, posteriormente, foram comparados com sequências nucleotídicas e protéicas pelo *Blast* utilizando as bases de dados do GenBank e GenPept. Nesta etapa foram montados 110 *contigs*, sendo que 52 não apresentavam similaridade com nenhuma espécie descrita no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), além de 14 *contigs* que tiveram similaridade com proteínas de doze espécies diferentes de vírus (Anexo 9.3 e 9.4) relacionado à família Tymoviridae. Aqui será representada a espécie que apresentou similaridade intermediária e alta com todos os *contigs* montados. Os *contigs* virais montados, juntamente com o tamanho e identidade de cada um deles, podem ser observados na figura 16. Muitos dos *contigs* não virais são derivados de fungos endofíticos e bactérias presentes na folha sequenciada.

Foi observado que das 3.181.283 sequências não-mapeadas no genoma de seringueira (*H. brasiliensis*), 9203 eram derivadas de vírus da família Tymoviridae. Para confirmar a presença dos *contigs* na amostra de seringueira, foi verificado para cada região montada o perfil de

sRNAs e a densidade de ambas as fitas (positiva e negativa) ao longo do genoma de referência (Figura 17). Além de sequências virais, também foram encontradas cerca de 600 sequências de *P. ulei* (principal patógeno de seringueira), mas o perfil de sRNAs dessas sequências não foi único, o que pode ser consequência da ausência do genoma completo publicado do *P. ulei*, dificultando a análise dessas sequências.

Tabela 13. Informações sobre os dados obtidos no sequenciamento de sRNAs.

	Sequências totais	<i>H.brasiliensis</i> (%)	Vírus (%)	<i>P.ulei</i> (%)
Número de sequências totais	10690564	6085037 (56,92%)	9203 (0,09%)	600 (0,005%)
Número de sequências após trimagem	9266320	6085037 (65,67%)	9203 (0,1%)	600 (0,006%)

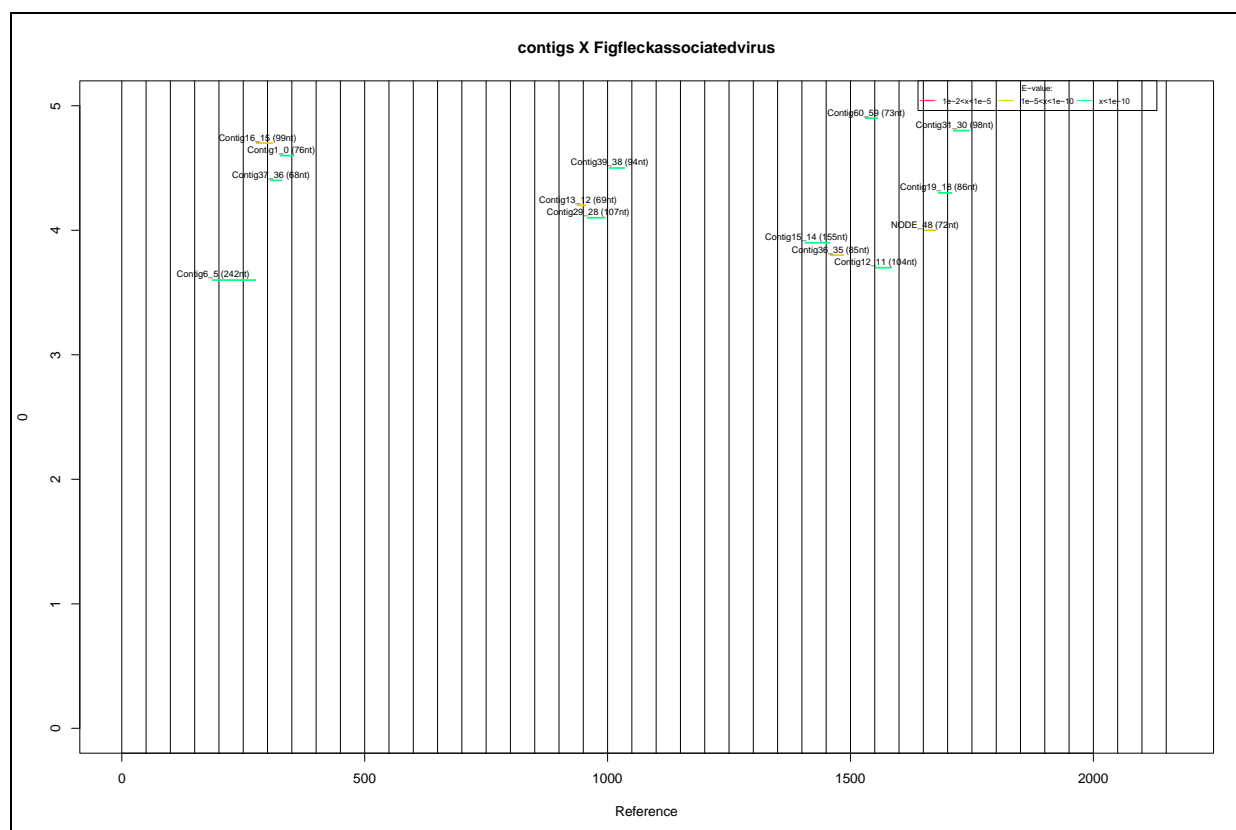


Figura 16. Mapa da região da Polimerase de RNA dependente de RNA (RpRd) em que foram formados 14 contigs com alta identidade viral.

Vírus são capazes de infectar todas as espécies de plantas descritas, porém podem ser específicos para cada hospedeiro (patógenos especialistas), que é o caso do *Citrus tristeza vírus* que infecta poucas espécies do gênero *Citrus* sp., ou pode infectar diferentes hospedeiros (patógenos generalistas), como, por exemplo, *Cucumber mosaic vírus*, que infecta mais de 85 famílias diferentes de plantas.

Plantas apresentam diferentes sistemas para prevenção e defesa contra vírus e esses sistemas são classificados em passivo e ativo. O passivo ocorre quando a planta interrompe a produção de fatores (proteínas produzidas e usadas no hospedeiro mas que podem ser usados por vírus durante a infecção e replicação) que seriam usados pelo vírus durante a replicação ou disseminação. Já a ativa é a detecção e destruição das células infectadas quando apresentam genes de resistência de um específico vírus no hospedeiro. Além disso, plantas apresentam a habilidade de se defender a partir de um sistema de detecção de alvos virais com especificidade de cada sequência, que é a via de RNA de interferência (RNAi) (Nelson & Citovsky, 2005; Gergerich & Doija, 2006).

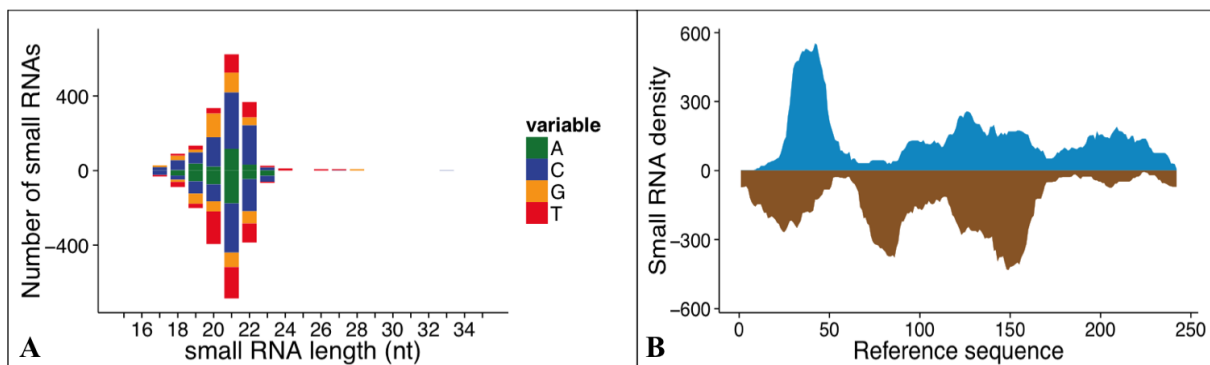


Figura 17. Pequenos RNAs. A. Perfil de pequenos RNAs do contig 6_5; B. cobertura dos pequenos RNAs montados do contig 6_5.

Foi possível detectar pelo sequenciamento de sRNAs, um vírus relacionado a família Tymoviridae. O perfil de tamanho dos sRNAs produzidos pela via do hospedeiro é única. Aguiar e colaboradores (2015) comprovaram que a infecção por diferentes espécies virais gera perfis de tamanhos de sRNAs diferentes, o que permite a identificação e agrupamento das sequências virais pertencentes a cada espécie. Similarmente, o perfil de tamanho de sRNAs de fungos e bactérias também são muito característicos. No perfil de sRNAs gerados, podemos observar um pico em 21 nt, que é específico para via de siRNA, usada pelo sistema imune inato do hospedeiro (no caso, a planta *Hevea brasiliensis*) para controlar a

multiplicação viral. Esse perfil gerado pelo sistema imune do hospedeiro depende das características virais (estrutura do genoma, tropismo e replicação) e, por isso, o perfil de sRNAs pode fornecer informações sobre a biologia viral. Vírus de RNA apresentam uma distribuição homogênea na cobertura do perfil de sRNAs, enquanto que vírus de DNA apresentam picos claros de sRNAs. Na biblioteca sequenciada neste trabalho, o vírus detectado apresenta distribuição homogênea do perfil de sRNAs e os contigs formados, quando comparados com o banco de dados referência *Viral Genomes* do NCBI, confirma que o genoma é de RNA fita simples polaridade positiva. O vírus detectado no sequenciamento potencialmente é uma nova espécie, pois apresenta similaridade apenas ao nível de proteína com outras espécies da família Tymoviridae.

A metodologia de sequenciamento de sRNAs (metatranscritômica de pequenos RNAs) também apresenta várias vantagens comparada com outras metodologias de sequenciamento em larga-escala, como preparação da biblioteca com pouca manipulação da amostra, evitando a contaminação da mesma; otimização da detecção viral, já que o sistema imune do próprio hospedeiro aumenta o número de sequências virais, enriquecendo a amostra, e pode ser utilizada para a detecção de novas espécies virais (Ozsolak & Milos, 2010; Aguiar *et al.*, 2015).

6.10 RT-PCR

Para fazer a síntese de cDNA, foi feita uma modificação em relação a concentração de RNA que deveria ser adicionado na reação. De acordo com as orientações do fabricante (Invitrogen) deveria ser adicionado 2 ug de RNA total para uma reação no volume final de 25 uL. Mas, foi adicionado o equivalente a 250 ng de RNA total na reação. Krug & Berger (1987) afirmaram que 0,25 ug é suficiente para gerar uma boa concentração de cDNA com qualidade. Uma vez que a planta pode estar infectada com vírus de RNA fita dupla, a temperatura de desnaturação usada na síntese de cDNA foi de 90°C, como descrito por Rwahnih *et al.*, 2010.

Inicialmente, a síntese foi feita apenas para a amostra do Indivíduo 2, já que foi o indivíduo selecionado para sequenciamento. Após a síntese, o cDNA foi dosado por espectrofotometria e apresentou concentração de 1200 ng/uL de cDNA, com as relações 260/280 de 1,87 e 260/230 de 2,10.

Para verificar se a síntese de cDNA funcionou, foi feita a amplificação quantitativa com par de iniciadores para a região do gene (constitutivo) que codifica a actina de *H. brasiliensis*. Duan e colaboradores (2010) avaliou o número de transcritos do gene da actina em plantas submetidas a 19 condições de tratamento com tempos diferentes. Foi observado que a abundância de transcritos desse gene não varia em nenhuma condição testada e apresenta alta especificidade de amplificação. Por esse motivo, o gene da actina é considerado um bom controle interno de reação. Rodríguez e colaboradores (2008) reiteraram que a estabilidade do nível de expressão do gene em diferentes momentos, tratamentos e tempos deve ser avaliado, pois o controle interno é usado como uma medida acurada e confiável que indica a qualidade do cDNA sintetizado.

A amostra foi amplificada, verificada em gel de poliacrilamida 8% e enviada para o sequenciamento. Após a edição das sequências (direta e reversa), foi gerada a sequência consenso que foi comparada com o banco de dados do NCBI utilizando o programa *Blastx*. O resultado pode ser observado na tabela 14.

Tabela 14. Sequenciamento da amostra de *Hevea brasiliensis* amplificada para a região da actina.

ID da amostra	Organismo	Estratégia	Tamanho da sequência (pb)	Melhor hit	<i>e-value</i>	Identidade (%)	Cobertura (%)	Query (pb)
Ind2 -CF	<i>Hevea brasiliensis</i>	blastx	272	<i>Hevea brasiliensis</i> clone RYT-33-97 actin7a mRNA [HQ260674]	3e-99	92	95	1471

Uma vez que o cDNA apresentou boa qualidade, foi feita a síntese das outras amostras de folhas dos outros quatro indivíduos da FLONA de Caxiuanã, e então feita a qPCR para o gene da actina de *H. brasiliensis*. Todas as 4 amostras foram amplificadas, porém, quando eluídas em poliacrilamida 8%, foi verificado que nenhuma das quatro amostras apresentava bandas de tamanho de aproximadamente 200 pb. Na figura 18, podemos verificar a amplificação para o gene da actina para todas as 5 amostras de folhas, assim como o gel de poliacrilamida 8% com apenas a amostra do indivíduo 2 apresentando uma banda nítida.

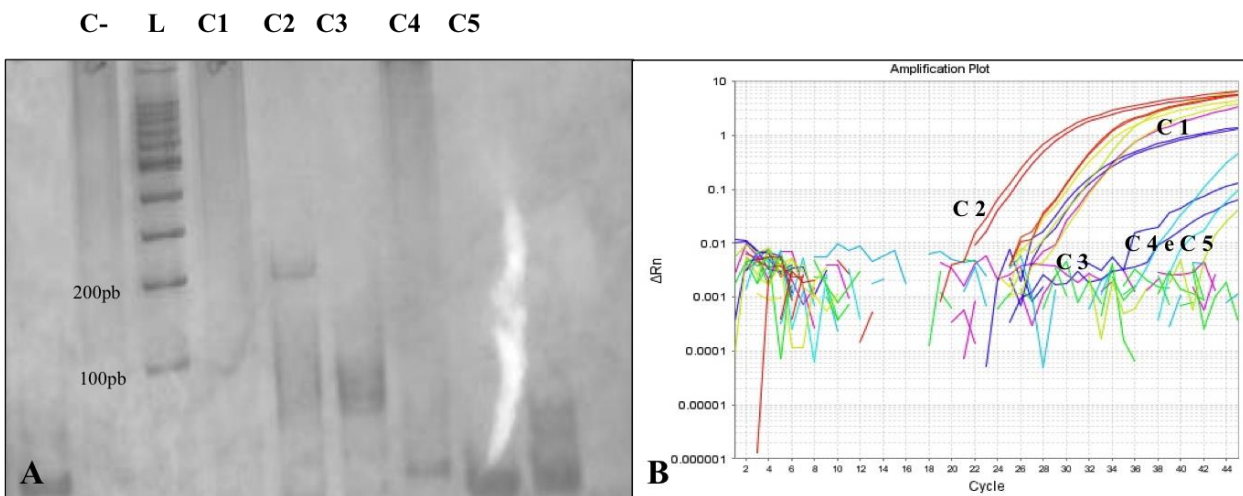


Figura 18. Amplificação para o gene da Actina. A: Gel de poliacrilamida 8% com o produto de qPCR evidenciando a amplificação para o gene da actina.

C-: controle negativo da reação; L: marcador de peso molecular (Ladder); C (1-5): produto da amplificação das amostras de folhas de Caxiuanã; C2: Amostra amplificada; B: Curva de amplificação da reação de qPCR para o gene da actina.

6.11. Iniciadores para qPCR

Foram desenhados pares de iniciadores para a confirmação da detecção de um provável novo vírus em *H. brasiliensis*. Para isso, foi usado o programa *Primer 3* em interface com o software *Geneious* e foram avaliadas as principais características de cada iniciador. A tabela 15 mostra todas as características dos iniciadores desenhados que foram selecionados para a detecção. Também foram desenhados pares de iniciadores com sondas específicas a partir dos *contigs* montados na análise das sequências de pequenos RNAs. Esses iniciadores foram sintetizados pela IDT de acordo com a tecnologia *PrimeTime® qPCR Assay*, em que

apresenta *Double-Quenchers*, que inclui o Iowa Black FQ (IBFQ) na extremidade 3' da sonda e o *quencher* ZEN localizado internamente da sequência da sonda e a nove pb do fluoróforo 6-FAM (5'FAM/ZEN/3'IBFQ). Essa estratégia foi selecionada por reduzir o sinal de amostras negativas e aumentar a sensibilidade e precisão do sinal de amplificação das amostras positivas. O uso de sondas fornece amplificação viral específica e permite a identificação de diferentes vírus. A sonda é uma pequena molécula de DNA que contém em uma extremidade um fluoróforo, um quencher interno, e outro quencher na outra extremidade. Uma vez que a sequência da sonda é complementar ao cDNA original (amostra), a sonda anela especificamente na região alvo durante o anelamento dos iniciadores. Durante a extensão, a sonda é deslocada e hidrolisada, liberando fluorescência que é detectada pelo aparelho, e é proporcional a amplificação (Cella, *et al.*, 2013).

Tabela 15. Características dos iniciadores desenhados para amplificação.

Nome do <i>contig</i>	Nome e direção do primer	Sequência do primer 5' → 3'	Amplicon (pb)	Iniciador (nt)	Temperatura de <i>melting</i>	GC (%)	<i>Hairpin</i>	Homodímero	Heterodímero
	Iniciador <i>contig6_5</i>	TCA CAA CCT CTC	130	130	58	55	-	-	-
	Direto	TCC GCT CA							
	Iniciador <i>contig6_5</i>	TTC AAG GTG TGT	130	130	58	58	-	-	-
	Reverso	GCG GGT G							
Contigs 12_11_60_59	Iniciador 36 Direto	GGC TAG GTG AAG GGA ATC GG	85	20	58	60	-	-	-
	Iniciador 141 Reverso	TGA AAA AGT ATC AAC GTG TGC TC	85	23	54	40	-	-	-
	Sonda Contigs12_11_60_59	TGG CAG AAT TCA GAG AGC TCA AAT GGG	85	27	61	48	N/A	N/A	N/A

Contigs		AGG GAT CTG TGA							
37_35_16_15	Iniciador 32 Direto	CAC GAA GC	80	20	57	55	-	-	-
	Iniciador 133 Reverso	CTC CCC AAC CCA TCC ACT	80	18	57	61	-	-	-
	Sonda Contigs37_35_16_15	TTC GCA GAC AGC CTT TGG GAC TAA	80	24	61	50	N/A	N/A	N/A
Contigs									
13_12_29_28	Iniciador 14 Direto	GGA TGT GGC AAG TCC TAC CC	68	20	58	60	-	-	-
	Iniciador Reverso 102	GGA CAG TTT CCA CTC GGT TC	68	20	56	55	-	-	-
	Sonda Contigs13_12_29_28	AGC AGC TTC TCC GTA CCA AGC ATT	68	24	61	50	N/A	N/A	N/A
Contig									
15_14	Iniciador 51 Direto	AGG CAG TCT GGA GTG AGG AG	62	20	58	60	-	-	-

Iniciador Reverso	133	TATCCAAAAGGCTCCGCTTC	62	20	55	50	-	-	-
Sonda Contig15_14		AAA GAC TGG TTC GTG GGC CAA CTC	62	24	62	54	N/A	N/A	N/A

6.12. Amplificação quantitativa (qPCR) e digital (ddPCR) para confirmação do vírus da família Tymoviridae

Inicialmente, foi desenhado um par de iniciadores com base na sequência obtida através do sequenciamento de sRNA (*contig 6_5* de 242 nt) para a confirmação da presença do vírus na amostra do Indivíduo 2. Uma vez que o tamanho do produto seria de 130 pb, o par de iniciadores foi testado tanto em amplificação convencional, quanto quantitativa.

Na amplificação quantitativa, foi testado a diluição das amostras 1:10, 1:50 e 1:100 além da concentração dos iniciadores a 400 nM e 800 nM. Cada diluição e controle negativo foram feitos em duplicatas. Ao final da reação, foi observado picos tanto nas amostras quanto no controle negativo, por isso, os produtos foram eluídos em poliacrilamida 8% e nenhum produto apresentou banda no tamanho de 130 pb (Figura 19 e Figura 20).

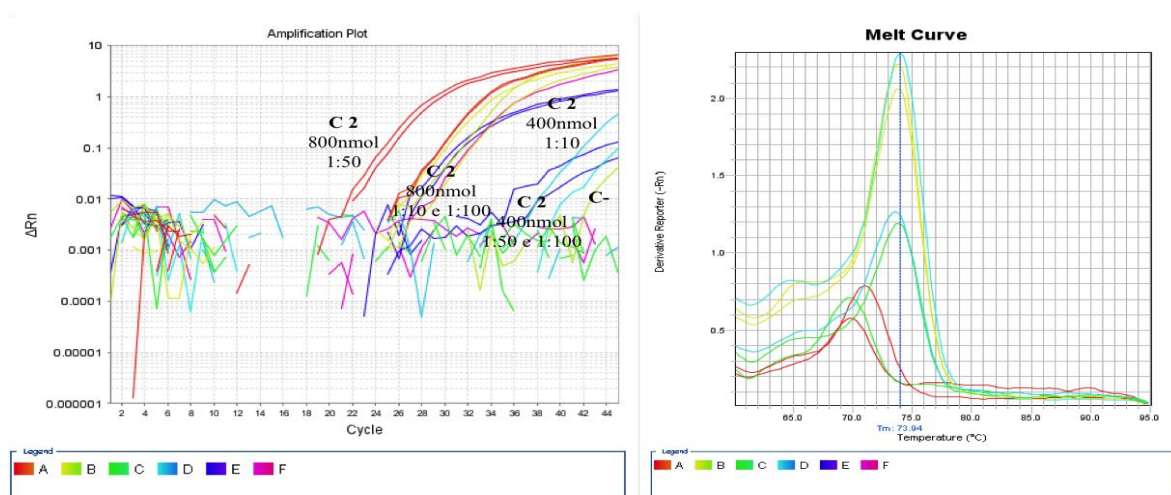


Figura 19. Curva de amplificação e curva de melt da reação para detecção do vírus da família Tymoviridae usando o par de iniciadores do contig 6_5.

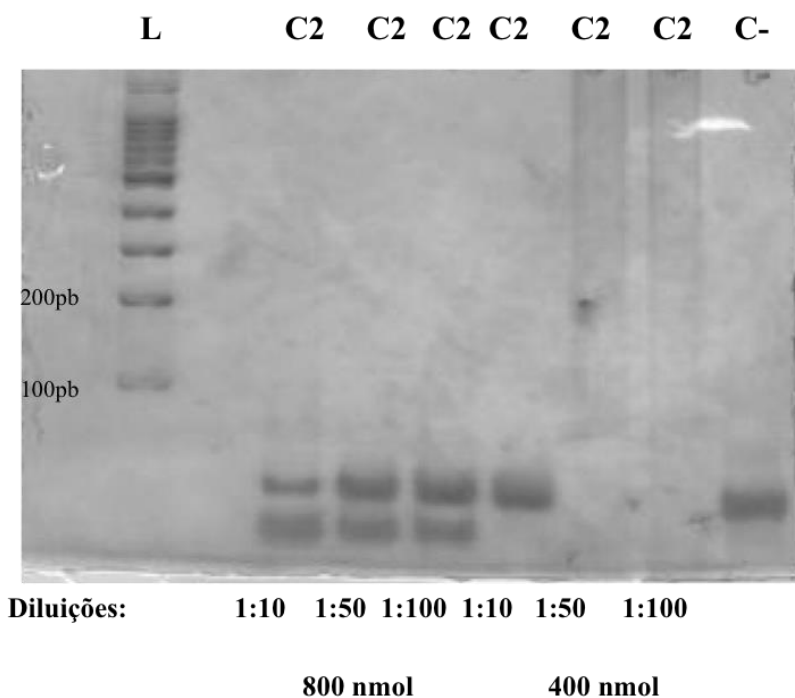


Figura 20. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% evidenciando a não amplificação dos iniciadores do contig 6_5.

L: marcador de peso molecular (*Ladder*); C2: produto da amplificação da amostra de folha 2 de Caxiuanã em diferentes diluições (1:10, 1:50 e 1:100) e em duas concentrações de iniciadores (800 e 400 nmol); C-: controle negativo da reação.

Na amplificação convencional, foi feito gradiente com as seguintes temperaturas de anelamento: 55°, 56°, 57°, 58°, 59° e 60°C. Além da temperatura, foram testados três diluições de amostra, 1:10, 1:50 e 1:100. A ciclagem usada foi composta por um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento nas diferentes temperaturas (55-60°C) por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e um ciclo de extensão final por 5 minutos. Esta amplificação foi feita com iniciadores na concentração de 10 e 15 pmol. Após a amplificação, os produtos de PCR foram eluídos em gel de poliacrilamida 8%. Apenas um produto foi amplificado, referente a amostra diluída 1:100 na temperatura de 60°C com os iniciadores na concentração de 10 pmol (Figura 21).

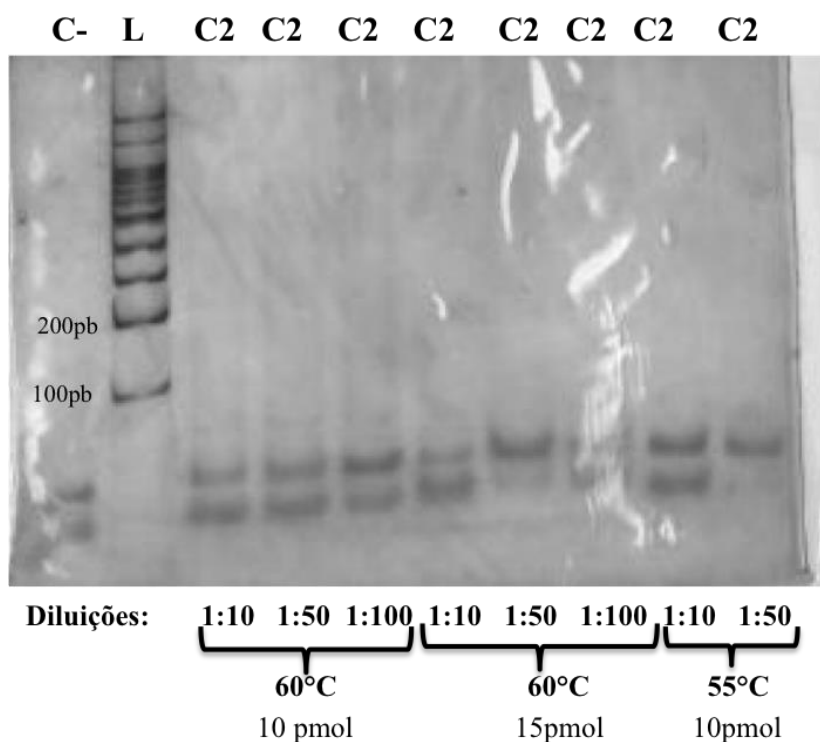


Figura 21. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% evidenciando a amplificação dos iniciadores do contig 6_5 na concentração 10 pmol e diluição 1:100 a 60°C.

C-: controle negativo da reação; L: marcador de peso molecular (*Ladder*); C2: produto da amplificação da amostra de folha 2 de Caxiuana em diferentes diluições (1:10, 1:50 e 1:100) e em duas concentrações de iniciadores (10 e 15 pmol).

O produto de PCR amplificado foi sequenciado, e as sequências apresentavam qualidade de aproximadamente 50% com tamanho de 335 pb e foi possível montar a sequência consenso. Quando comparado contra o banco de dados do *Blastn*, o resultado retornado foi de diferentes espécies do gênero de fungo *Trichoderma* sp..

Uma vez que o par de iniciadores não foi específico o suficiente para a detecção viral, foram desenhados quatro outros pares de iniciadores com sonda de acordo com os *contigs* montados no sequenciamento de sRNA, na tentativa de aumentar a sensibilidade. Primeiramente, foram testadas as amostras C2 (enviada para o sequenciamento de sRNA) e a C1. As duas amostras foram testadas para os quatro pares de iniciadores e sondas, com cDNA puro e diluído 1:10. A amostra C1 foi negativa para todas as quatro regiões testadas. A amostra C2 foi positiva para todas as regiões, com exceção do *contig* 37_35_16_15 . Na figura 22, podemos verificar a curva de amplificação dos iniciadores. Após a qPCR, foi feito

gel de poliacrilamida 8% para verificar a especificidade da reação e o tamanho de cada produto amplificado (Figura 23). Também foram testadas as outras três amostras de folhas de Caxiuanã, porém nenhuma delas foram amplificadas para nenhuma região.

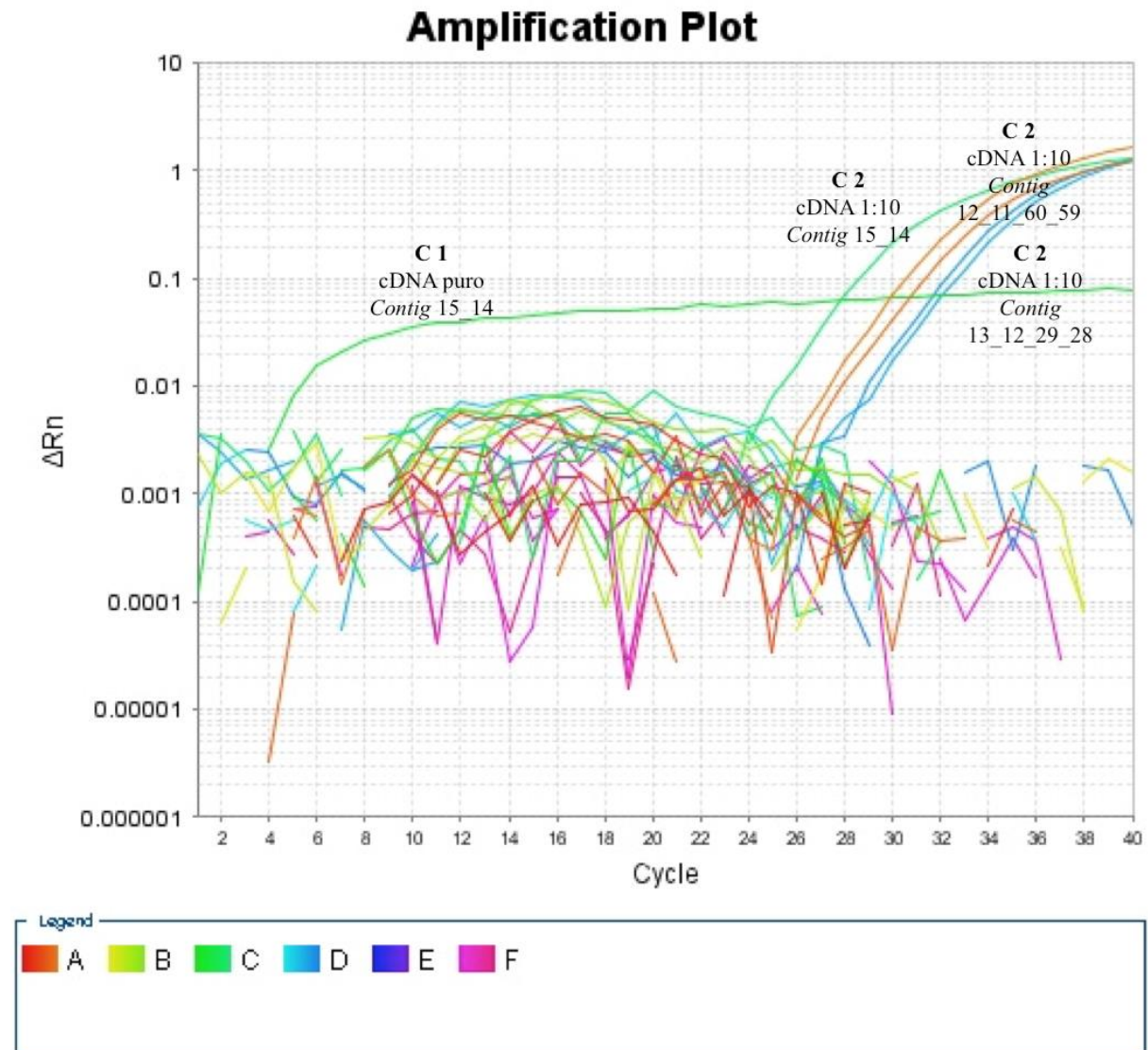


Figura 22. Curva de amplificação da reação para detecção do vírus da família Tymoviridae usando os pares de iniciadores e sondas dos contigs 15_14, 12_11_60_59 e 13_12_29_28.

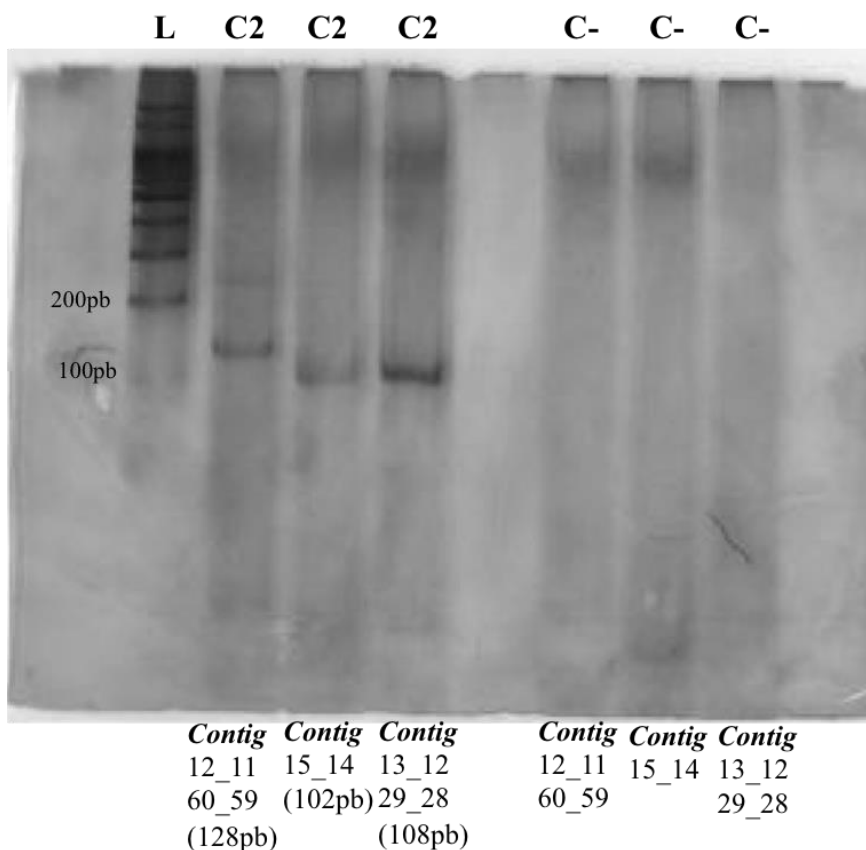


Figura 23. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% evidenciando a amplificação da amostra C2 para os contigs 12_11_60_59, 15_14 e 13_12_29_28. L: marcador de peso molecular (Ladder); C-: controle negativo de cada reação.

Quando cDNA puro é adicionado à reação de PCR, geralmente o excesso de material genético ou inibe ou produz uma fraca amplificação (*shallow amplification*), por isso é recomendado por fabricantes diluir o cDNA antes de adicioná-lo na reação. cDNA diluído resulta em uma curva de amplificação mais acentuada e sem ruído de fluorescência (Deprez *et al.*, 2001). Por isso, neste trabalho foram feitos testes na amostra pura como na diluída. A amostra diluída foi amplificada para os *contigs* 12_11_60_59 e 13_12_29_28. Diferentemente, o *contig* 15_14 foi amplificado na amostra pura.

Para verificação do número de cópias virais (quantificação absoluta) na amostra, foi feita a técnica de ddPCR para quantificação. Diferentemente do resultado obtido na qPCR, todos os pares de iniciadores e sondas testados na amostra C2 concentrada e diluída foram amplificados com sucesso, incluindo o *contig* 37_35_16_15 que não havia sido amplificado no qPCR. Na figura 24 verifica-se o perfil de amplificação da amostra C2 para os pares de iniciadores e sonda do *contig* 37_35_16_15 nas temperaturas de 58° e 60°C. A imagem dos

demais perfis de amplificação podem ser encontrados no Anexo 9.5 desta dissertação. As temperaturas de 58 e 60°C foram testadas para verificar se havia diferença na amplitude das gotas positivas em relação às negativas, Na temperatura de 58°C houve um maior número de gotas no final da reação, variando entre 15.000 a 18.000 gotas. Como a amplificação é baseada em cálculo estatístico e distribuição de Poisson, quanto maior o número de gotas, melhor a amplificação da amostra. Neste trabalho, a melhor temperatura para amplificação da amostra C2 com os quatro pares de iniciadores com sonda foi a 58°C. Para verificar se os outros indivíduos de *H. brasiliensis* coletados em Caxiuana também estavam infectados, foi feita a ddPCR na temperatura padronizada de 58°C. Nenhuma das quatro amostras (indivíduos) foram positivas (Figura 25).

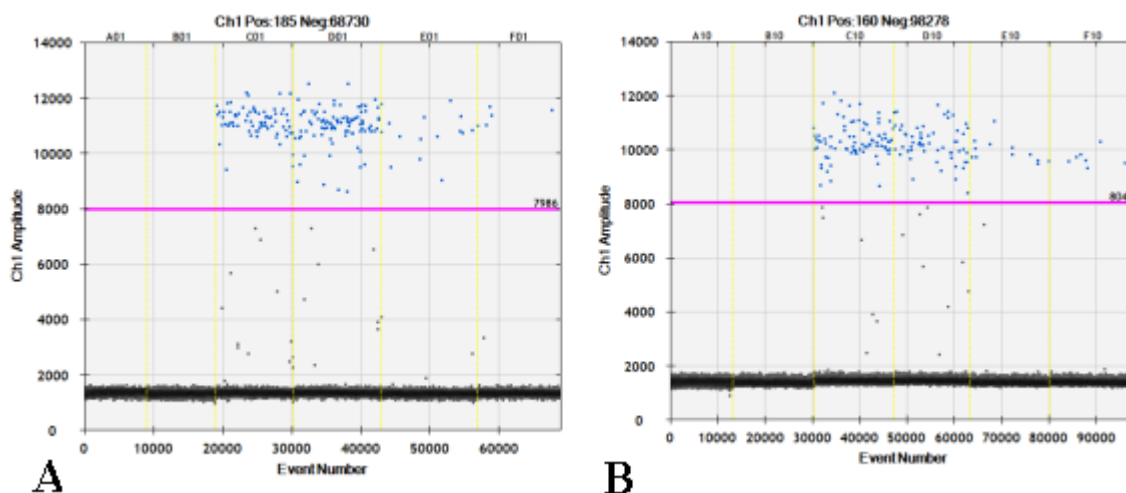


Figura 24. Perfil de amplificação da ddPCR para o par de iniciadores e sonda do contig 37_35_16_15. A: Na temperatura de 58°C e B: Na temperatura de 60°C.

A ddPCR permite o usuário determinar o valor limiar (de *threshold*), diferenciando as gotas negativas (pontos escuros) e as gotas que possuíam a região alvo amplificada (pontos azuis). Na figura 24, podemos verificar o número de gotas na reação, no eixo x do gráfico, denominado *Event Number*, e no eixo y pode ser verificado a amplitude das gotas em relação a presença de material amplificado, já que apresenta maior emissão de fluorescência em relação às gotas negativas. Gotas positivas apresentam maior amplitude do que gotas negativas. Na parte superior do gráfico, também pode ser verificado o número de gotas positivas (185) e o número de gotas negativas (68730). Após a determinação do valor limiar, o *software* QuantaSoft calcula o número de gotas positivas em relação às gotas negativas,

calculando a quantidade de cópias presentes na reação de 20 μ L, de acordo com o modelo de Poisson, considerando um intervalo de confiança de 95%. A partir desse valor pode-se calcular o número de cópias reais de RNA na amostra usada para síntese de cDNA e no cDNA. Os valores obtidos estão presentes na tabela 16. Uma das vantagens da ddPCR em relação a qPCR é a quantificação absoluta sem a necessidade de curva padrão, o que permite a quantificação de alvos que não possuem controle positivo, como por exemplo, a detecção de novas espécies ou de espécies mutantes.

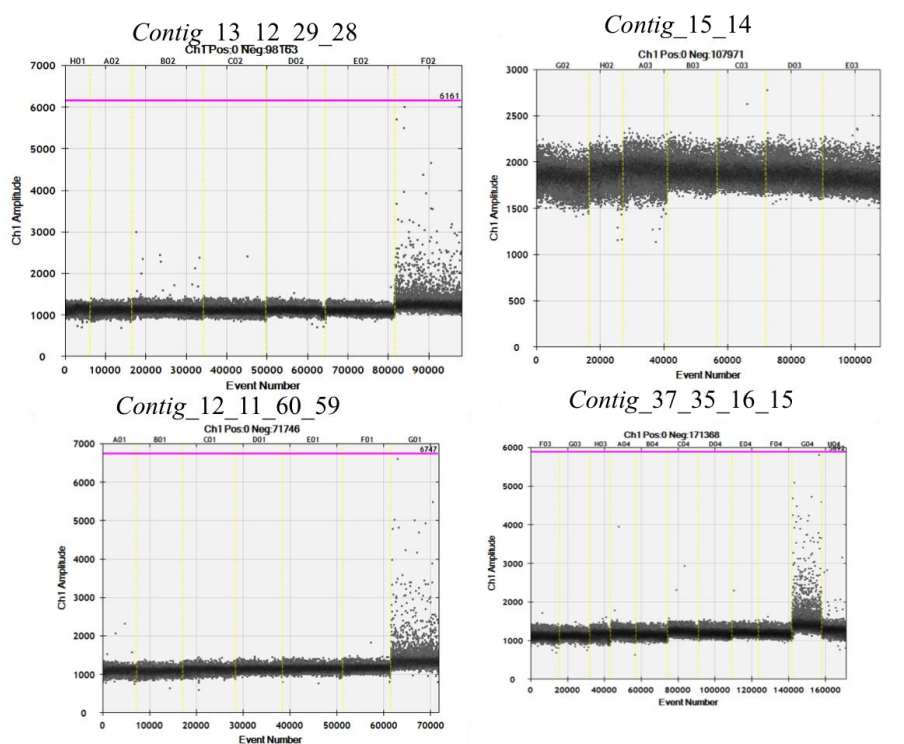


Figura 25. Perfil de amplificação da ddPCR para os iniciadores e sondas sintetizados na temperatura de 58°C.

A ddPCR foi desenvolvida para quantificação absoluta com alta precisão, contando as moléculas de DNA presentes nas gotas formadas durante a montagem da reação. A partição gerada pelas gotas permite o aumento da sensibilidade, detecção específica da região-alvo com consecutiva precisão de quantificação e diminui a interferência de inibidores presentes na amostra, já que a reação de amplificação ocorre no interior de cada gota com pelo menos uma molécula de DNA, aumentando a capacidade de detecção (Baker, 2012; Sedlak & Jerome, 2013). Em comparação com a qPCR, a ddPCR apresentou maior sensibilidade e não sofreu interferência de inibidores na reação. Na qPCR, apenas uma região foi amplificada em

amostra concentrada, mas não em amostra diluída, as outras duas regiões foram amplificadas apenas na amostra diluída. Na ddPCR, tanto amostra diluída quanto concentrada foram amplificadas em duplicata em duas temperaturas testadas para todas as regiões testadas. Apesar de o sistema de detecção em qPCR apresentar aumento de sensibilidade e especificidade, o sistema de amplificação por gotas pela ddPCR foi mais sensível, e isso se deve ao número de partições geradas, que permite maior resolução da amostra (Baker, 2012).

Tabela 16. Número de cópias viral nas amostras de RNA total, DNA complementar (cDNA) e produto amplificado.

Amostra C2	Produto amplificado (20 uL)	cDNA (25 uL)	RNA total (30 uL)
<i>Contig 37_35_16_15</i>	176	2200	33000
<i>Contig 12_11_60_59</i>	134	1675	25125
<i>Contig 13_12_29_28</i>	228	2850	42750
<i>Contig 15_14</i>	556	6950	104250

Pode ser verificado que em temperaturas diferentes o rendimento do número de cópias de uma amostra também pode sofrer alteração, e pode ser que a temperatura de 60°C reduza o rendimento do produto de PCR. Mesmo determinando a temperatura de *melting* dos iniciadores, deve ser testado um gradiente de temperatura para verificar como o sistema mix, iniciadores, sondas e amostra se comportam. No caso da ddPCR testada, a temperatura de anelamento de 58°C apresentou melhores resultados do que a temperatura de 60°C, já que resultou em uma diferença de amplitude maior entre gotas positivas e negativas. Com o resultado da amplificação em qPCR e quantificação em ddPCR, podemos afirmar que na amostra sequenciada há a presença de um vírus da família Tymoviridae e que no momento da coleta estava infectando a planta.

Vírus de plantas foram descobertos no século XIX, quando os pesquisadores Beijerinck & Iwanowski estavam investigando uma doença em tabaco e verificaram que havia um organismo infectando a planta, porém ele era menor do que todos os outros já descritos na literatura. Esse organismo foi identificado como *Tobacco mosaic virus* (TMV), sendo o primeiro vírus a ser descrito. Desde então, outros vírus começaram a ser detectados, identificados e caracterizados infectando o tecido vegetal, mamíferos, bactérias e mais

recentemente os fungos. Estimativas sugerem que já foram descritos aproximadamente 1000 espécies de vírus de plantas (Nelson & Citovsky, 2005; Gergerich & Doijja, 2006).

A família Tymoviridae pertence à ordem Tymovirales que contém vírus que infectam plantas. O nome da ordem deriva do gênero *Tymovirus* (*Turnip yellow mosaic virus*), e foi escolhido por seu nome não ser relacionado com a forma do seu vírion. A família Tymoviridae é a única da ordem que apresenta partículas isométricas e a sua filogenia é baseada no gene da polimerase, que apresenta resolução suficiente para a discriminação dos três gêneros (*Tymovirus*, *Marafivirus* e *Maculavirus*) que compõem a família (Martelli *et al.*, 2002; King *et al.*, 2012).

Espécies da família Tymoviridae apresentam partículas virais isométricas, não envelopadas e possuem diâmetro de aproximadamente 30 nm. O capsídeo é composto por 20 unidades de hexâmeros e 12 unidades de pentâmeros, cujo número de triangulação (T) é 3 (Figura 26). O genoma é composto por RNA fita simples polaridade positiva (ssRNA +), com alto conteúdo de citosina (32 a 50%) e o tamanho do seu genoma varia entre os gêneros de 6.0 a 7.5 kb. O genoma apresenta duas ORFs sobrepostas e uma terceira ORF que é expressa na extremidade 3' do RNA subgenômico (sgRNA). A primeira ORF, codifica uma poliproteína de replicação que contém os domínios da metiltransferase (Mtr), da protease de cisteína (P-Pro), a RNA helicase (Hel) e a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). A ORF2 codifica proteínas do movimento, e a ORF 3 codifica proteínas do capsídeo. Algumas diferenças na disposição das ORFs podem ocorrer nos gêneros que compõem essa família. O gênero *Maculavirus* possui algumas diferenças quanto o arranjo do genoma, a ORF2 codifica proteínas do capsídeo enquanto que as ORF3 e 4 codificam proteínas do movimento. O genoma é ordenado no arranjo icosaédrico no centro da partícula. O genoma do *Tymovirus* possui uma sequência conservada denominada Tymobox que serve como promotor da região do sgRNA e pode ser usada para identificação de vírus do gênero *Tymovirus*. Já os *Marafivirus*, apresentam a região denominada marafibox, que também é usada para identificação de isolados do gênero. Em compensação, o gênero *Maculavirus* não apresenta nenhuma região conservada que possa ser usada na diferenciação entre os gêneros da família Tymoviridae (Martelli *et al.*, 2002; King *et al.*, 2012).

Esses vírus, também podem apresentar dois tipos de partículas, as não infecciosas (contém pouco ou nenhum RNA) denominadas partículas T, e as infectantes, que são partículas intactas e denominadas partículas B. Os vírus são resistentes a altas temperaturas

(60-85°C) e a solventes orgânicos e infectam plantas dicotiledôneas e algumas espécies infectam a família Poaceae (gramíneas). Alguns integrantes podem ser transmitidos por inoculação mecânica nas folhas do hospedeiro por vetores como besouros e cigarras (Banttari & Zeyen, 1969). Podem se replicar em altos títulos e se propagar para diferentes tecidos na planta. Os gêneros *Marafivirus* e *Maculavirus*, no entanto, são limitados ao floema (tecido responsável pelo transporte da seiva elaborada para todas as células da planta) (Martelli *et al.*, 2002; King *et al.*, 2012). Espécies dessa família já foram descritas infectando *Citrus* (Maccheroni *et al.*, 2005), em plantas ornamentais das famílias *Scrophulariaceae* e *Verbenaceae* (Koenig, *et al.*, 2005; Mathews & Dodds, 2006), no gênero *Vitis* (Sabanadzovic *et al.*, 2000; Sabanadzovic *et al.*, 2001; Engel *et al.*, 2010) e em outras plantas, provocando clorose e mosaico amarelo claro nas folhas, clareamento das nervuras e enfezamento (nanismo da planta) (King *et al.*, 2012).

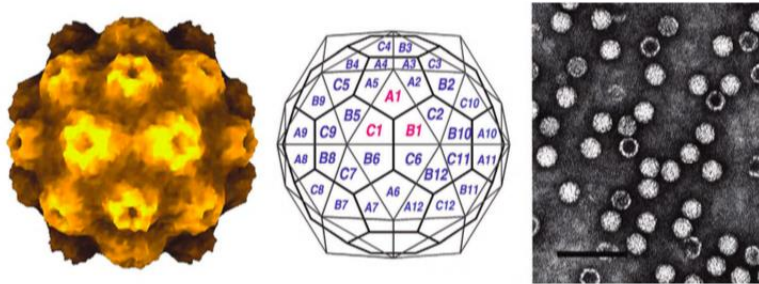


Figura 26. Características da partícula viral da família Tymoviridae. Na esquerda, virion do vírus Turnip yellow mosaic vírus (TYMV).

No centro da imagem a conformação da partícula com os seus hexâmetros e pentâmeros e na direita, as partículas de *Belladonna mottle virus* (BeMV) visualizadas pela microscopia eletrônica de contraste negativo. (King *et al.*, 2012).

Recentemente, Li e colaboradores (2016) detectaram e identificaram uma nova espécie de *Tymovirus* infectando o fungo endofítico *Fusarium graminearum*. Esse vírus foi o primeiro isolado da família Tymoviridae descrito infectando fungos. O micovírus *Fusarium graminearum mycotymivirus 1* (FgMTV1) possui o genoma de 7863 nt de RNA fita simples polaridade positiva e apresenta 4 ORFs, a primeira codificando os domínios da Mtr, Pro, Hel e RdRp e as outras ORFs ainda não possuem funções definidas e com alto conteúdo de citosina, já descrito como característica da família Tymoviridae. Similarmente a outros

micovírus, o FgMTV1 não apresenta uma ORF para codificar proteínas do capsídeo e isso pode ser a razão de, até o momento, não ser possível a purificação de partículas de micovírus. Na família Tymoviridae, também é comum as espécies possuírem genes para MP, os quais interagem com o plasmodesmo da planta hospedeira e permite a passagem do material viral de uma célula para outra. O FgMTV1 não apresenta gene para MP, o que o torna específico para a infecção em fungos, uma vez que fungos não apresentam plasmodesmos. Além disso, o genoma do FgMTV1 apresenta a região Tymobox, usada para identificação de espécies da família. No hospedeiro, esse vírus altera a morfologia do micélio fúngico, diminui a biomassa, esporulação e taxa de crescimento.

Embora não se tenha o genoma do vírus, os *contigs* detectados, caracterizados e identificados tanto por metatranscritômica de pequenos RNAs quanto por qPCR e ddPCR e análise filogenética (Figura 27 e Figura 28) pelo método de distância por (*Neighbor Joining*) e pela análise de inferência Bayesiana com o modelo LG + I + G permitem afirmar de que se trata de um provável novo vírus de Tymoviridae proximamente relacionado ao gênero Maculavírus infectando uma planta assintomática nativa de *Hevea brasiliensis* na Amazônia Oriental no território brasileiro. O gênero Maculavírus só possui uma espécie reconhecida pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), *Grapevine fleck virus* (GFkV), esse vírus infecta exclusivamente o gênero *Vitis* sp. (uva) e limitado ao floema, apesar de já ter sido reportado casos de disseminação, não há vetor conhecido para essa função. A infecção por GFkV é caracterizada por modificações na mitocôndria em estruturas denominadas corpos multivesiculares. As suas características de partícula são semelhantes a espécie TYMV, exibida na figura 26 deste trabalho. Outras espécies já foram descritas como prováveis espécies do gênero, o *Bombyx mori macula-like latent virus* (BmMLV) e o *Grapevine red globe virus* (GRGV) (Marteli *et al.*, 2002; King *et al.*, 2012).

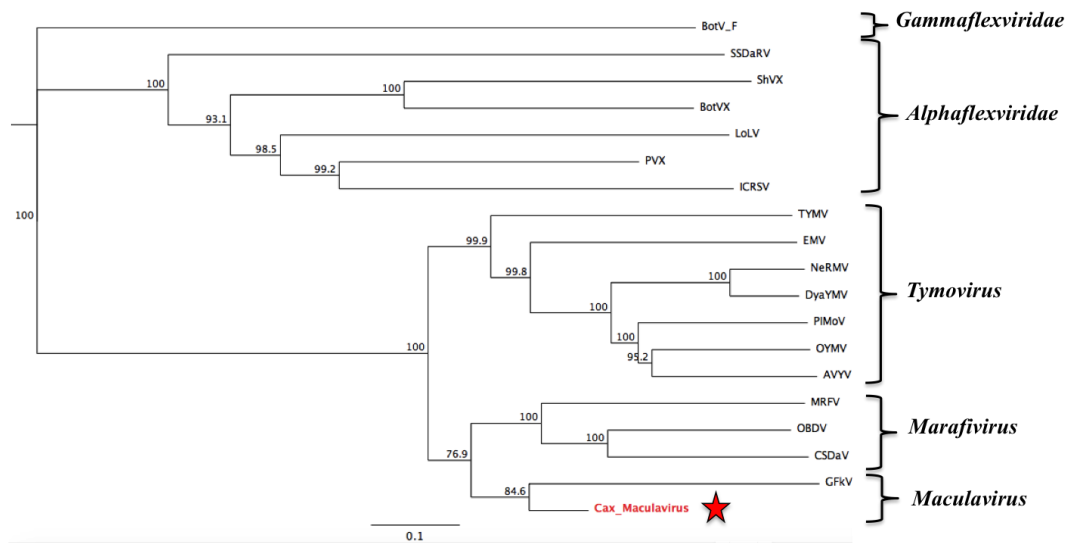


Figura 27. Árvore filogenética da região da polimerase. Árvore construída pelo método de distância (Neighbor Joining) com espécies representativas da ordem Tymovirales, a partir das sequências de proteína.

Caxiuanã_Tymovirus foi detectado neste trabalho, o grupo externo usado foi o *Botrytis virus* F (BotV-F) (Gammaflexviridae). Os demais vírus usados na construção da árvore foram: Gênero *Maculavirus* - *Grapevine fleck virus* (GFKV); *Marafivirus Citrus sudden death-associated virus* (CSDaV), *Maize rayado fino virus* (MRFV), *Oat blue dwarf marafivirus* (OBDV); *Tymovirus* - *Anagryis vein yellowing virus* (AVYV), *Diascia yellow mottle virus* (DiaYMV), *Eggplant mosaic virus* (EMV) *Nemesia ring necrosis virus* (NeRMV), *Ononis yellow mosaic tymovirus* (OYMV), *Plantago mottle virus* (PIMoV), *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV); Família Alphaflexviridae – *Shallot virus X* (ShVX), *Botrytis virus X* (BotVX), *Lolium latente virus* (LoLV), *Indian citrus ringspot virus* (ICRSV), *Potato virus X* (PVX), *Sclerotinia sclerotium debilitation-associated RNA virus* (SSDaRV).

7. CONCLUSÕES

- Independentemente da área de coleta (PARNA Anavilhanas e FLONA Caxiuanã), a riqueza e diversidade foi maior na FLONA Caxiuanã. Em contrapartida, a abundância e equitatividade foi semelhante entre as regiões estudadas.
- O filo de maior frequência e dominância foi o Ascomycota, os gêneros mais abundantes foram *Colletotrichum* sp., *Bionectria* sp. e *Trichoderma* sp, os quais estavam presentes na maioria dos indivíduos de *Hevea brasiliensis* estudados.
- A partir das análises de ordenamento pelas distâncias de Jaccard e e Hellinger, foi possível delimitar as prováveis espécies específicas para cada área de coleta e as espécies que foram comuns a ambas regiões e demonstrar que as comunidades de fungos endofíticos nas diferentes folhas dos indivíduos analisados apresentam estruturas diferentes em cada uma das áreas de estudo.
- O sequenciamento de pequenos RNAs em folhas de *Hevea brasiliensis* permitiu a detecção de dois patógenos, o fungo *Pseudocercospora ulei* e uma nova espécie viral relacionada a família Tymoviridae em indivíduo nativo e assintomático de *Hevea brasiliensis*.
- O vírus detectado no estudo, foi caracterizado como pertencente a família Tymoviridae e provável gênero *Maculavirus* a partir das análises filogenéticas tanto pelo método de distância (*Neighbor Joining*) como pela inferência Bayesiana, com alto apoio estatístico.
- Foi possível confirmar a detecção do vírus através de sondas específicas pelas metodologias de amplificação quantitativa e digital. A amplificação digital permitiu a quantificação absoluta do RNA viral presente na amostra e se mostrou mais sensível e resistente a inibidores da amostra em relação a amplificação quantitativa, possibilitando a detecção de uma região que não havia sido amplificada na qPCR.

- O sequenciamento de pequenos RNAs, a amplificação quantitativa e a amplificação digital usados neste trabalho são ferramentas metodológicas que podem ser usadas para a detecção de patógenos novos e já descritos em *Hevea brasiliensis*, permitindo a tomada de medidas de controle e prevenção contra patógenos em indivíduos ainda assintomáticos.

8. PERSPECTIVAS

Para a confirmação da presença do fungo fitopatogênico *Pseudocercospora ulei* na amostra de folha enviada para o sequenciamento, serão desenhados pares de iniciadores com sondas específicas a partir dos *contigs* montados na análise das sequências de pequenos RNAs para detecção em PCR digital.

Uma vez que os iniciadores e sondas foram sintetizados em um mesmo tubo pela metodologia do PrimeTime, não foi possível realizar o sequenciamento das amostras amplificadas. Por isso, foi sintetizado novamente os iniciadores em tubos separados e a amostra será purificada e enviada para o sequenciamento. Após a confirmação, o genoma do novo vírus da família Tymoviridae será sequenciado e montado pela metodologia de *primer and genome walking*, de acordo com Loconsole *et al.*, 2012.

Outros indivíduos de *H. brasiliensis* coletados na FLONA de Tapajós (Pará) e em plantações comerciais na Bahia (PMB Michelin) também serão testados na ddPCR, para confirmação dos resultados da qPCR.

Além disso, será realizada a metagenômica para acessar (em teoria) a totalidade da comunidade de fungos das amostras de folhas já coletadas e que possuem o DNA total extraído.

9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Agrawal, N.; Dasarandhi, P.V.N.; Mohmmmed, A.; Malhotra, P.; Bhatnagar, R.K.; Mukherjee, S.K. (2003) RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology AND Molecular Biology Reviews* 67(4): 657-685.

Aguiar, E.R.G.R.; Olmo, R.P.; Paro, s.; Ferreira, F.V.; Faria, I.J.S.; Todjro, Y.M.H.; Lobo, F.P.; Kroon, E.G.; Meignin, C.; Gatherer, D.; Imler, J.C.; Marques, J.T. (2015) Sequence-independent characterization of viruses base don the pattern of viral small RNAs produces by the host. *Nucleic Acids Research*, 43(13): 6191-6206.

Aguiar, E.R.G.R.; Olmo, R.P.; Marques, J.T. (2016) Virus-derived small RNAs: molecular footprints of host-pathogen interactions. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 7(6): 824-837

Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. (1996) *Introductory Mycology*. New York: John Wiley.

Aly, H.A.; Debbab, A.; Proksch, P. (2011) Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology Biotechnology* 90:1829-1845.

Amissah, N.B.; Packer, H.; Prediger, E.; Sabel, J. (2012) *qPCR Application Guide Experimental Overview, Protocol, Troubleshooting*. Third Edition. Integrated DNA Technologies. 98p. ^[1]_{SEP}

Aoki, Y.; Takahashi, S.; Takayama, D.; Ogata, Y.; Sakurai, N.; Suzuki, H.; Asawatreratanakul, K.; Wititsuwannakul, D.; Wititsuwannakul, R.; Shibata, D.; Koyama, T.; Nakayama, T. (2014) Identification of laticifer-specific genes and their promotes regions from a natural rubber producing plant *Hevea brasiliensis*. *Plant Science* 225: 1-8. ^[1]_{SEP}

Aranda, P.S.; LaJoie, D.M.; Jorcyk, C.L. (2012) Bleach Gel: A Simple Agarose Gel for

Analyzing RNA Quality. *Electrophoresis* 33(2): 366–369

Araujo, W.L.; Lacava, P.T.; Andreote, F.D.; Azevedo, J.L. (2008) Interaction between endophytes and plant host: Biotechnological aspects. *In: Plant-Microbe Interactions (eds) Barka, E.A.; Clément, C. Research Signpost. Kerala, Índia. 01-21.*

Arnold, A.E.; Maynard, Z.; Gilbert, G.S.; Coley, P.D.; Kursar, T.A. (2000) Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology letters* 3:267-274.

Arnold A.E.; Maynard Z.; Gilbert G. (2001). Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycological Research* 105: 1502-1507.

Arnold, A.E. (2007) Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* 21:51-66.

Arnold, A.E.; Lutzoni, F. (2007) Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88(3): 541-549.

Azevedo J.L. (1999). Botânica: uma ciência básica ou aplicada? *Revista Brasileira de Botânica* 22: 225-229.

Azevedo, J. L.; Maccheroni, W.; Araújo, W. L.; Pereira, J. O. (2000) Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic journal of Biotechnology* 3(2)40-65.

Bacon CW & White JF (2000). *Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker Inc, Nova Iorque 487. ISBN 0-8247-8331-1.

Baker, M. (2012) Digital PCR hits its stride. *Nature methods* 9(6):541-544.

Bi, Y.; Tugume, A.K.; Valkonen, J.P.T. (2012) Small-RNA Deep Sequencing Reveals *Arctium tomentosum* as a Natural Host of *Alstroemeria vírus X* and a New Putative Emaravirus. PlosOne 7(8).

Blackwell M. (2011) The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? American Journal of Botany 98:426-438.

Banttari, E.E.; Zeyen, R.J. (1969) Transmission of Oat Blue Dwarf Virus by the Aster Leafhopper Following Natural Acquisition or Inoculation. Phytopathology 60:399-402.

Bartlett J.M.; Stirling, D. (2003) A short history of the polymerase chain reaction. Methods in Molecular Biology 226:3-6.

Bonnet, E.; Peer, Y.V.; Rouzé, P. (2006) The small RNA world of plants. New Phytologist 171:451-468.

Bustamante, M.M.C.; *et al.*, (2012) Potential impacts of climate change on biogeochemical functioning of Cerrado ecosystems. Brazilian Journal of Biology 72(3): 655-671.

Campomenosi, P.; Gini, E.; Noonan, D.M.; Poli, A.; D'Antona, P.; Rotolo, N.; Dominioni, L.; Imperatori, A. (2016) A comparison between quantitative PCR and droplet PCR Technologies for circulating microRNA quantification in human lung câncer. BMC Biotechnology 16:60.

Cao, L.; Cui, X.; Hu, J.; Li, Z.; Choi, J.R.; Yang, Q.; Hui, L.Y.; Xu, F. (2016) Advances in digital Polymerase Chain Reaction (dPCR) and its Emerging Biomedical Applications. Biosensors and Bioeletronic pii: S0956-5663(16)30972-1. doi: 10.1016/j.bios.2016.09.082.

Carvalho M.C.C.G.; Silva D.C.G. (2010) Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Ciência Rural* 40: 735-744.

Carroll, G.C. (1988) Fungal endophytes in stem and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69:2-9.

Carroll, G.C. Beyond pest deterrence—alternative strategies and hidden costs of endophytic mutualisms in vascular plants. *In: Microbial Ecology of Leaves*, J.A. Andrews; S.S. Hirano (1991) *eds.* New York: Springer-Verlag, pp. 358–375.

Castellani, A. (1967) Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 42: 181-184.

Cella, L.N.; Blackstock, D.; Yates, M.A.; Mulchandani, A.; Chen, W. (2013) Detection of RNA viruses: Current Technologies and Future Perspectives. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 23(2): 125-137.

Chapman, E.J.; Carrington, J.C. (2007) Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Reviews Genetics* 8: 884-896.

Chaverri, P.; Gazis, R.O. (2010) *Perisporiopsis lateritia*, a new species on decaying leaves of *Hevea* spp. from Amazon basin in Peru. *Mycotaxon* 113:163-169.

Chaverri, P.; Gazis, R.O. (2011) *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. *Mycologia* 103: 139-151.

Chen, X. (2009) Small RNAs and Their Roles in Plant Development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 35:21-44

Chomczynski, P; Sacchi, N. (1987) Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.

Chomczynski, P. (1993) Necessity Breeds Invention: Single-Step RNA Isolation. *Current Contents* 36:8.

Clay, K.; Schardl, C. (2002) Evolutionary Origins and Ecological Consequences of Endophyte Symbiosis with Grasses. *The American Naturalist* 160:99-127.

Collado, J.; Platas, G.; Peláez. (1996) Fungal endophytes in leaves, twigs and bark of *Quercus ilex* from Central Spain. *Nova Hedwigia* 63: 347-360.

Cornish, K. (2001) Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species. *Phytochemistry*. 57: 1123-1134.

Costa, I.P.M.W.; Assunção, M.M.C.; Lima, T.E.F.; Oliveira, R.J.V.; Cavalcanti, M.A.Q. (2012) Checklist of endophytic fungi from tropical regions. *Mycotaxon* 119:494.

de Hoog, G.S.; Gottlich, E.; Platas, G.; Genilloud, O.; Leotta, G.; Van Brummelen, J. (2005) Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. *Studies in Mycology* 51:33–76.

Deng, Z.; Cao, L. (2016) Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: A review. *Chemosphere*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.097>.

Deprez, R.H.L.; Fijnvandraat, A.C.; Ruijter, J.M.; Moorman, A.F.M. (2001) Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR Green I depends on cDNA synthesis conditions. *Analytical Biochemistry* 307: 63-69.

Devonshire, A.S.; O`Sullivan, D.M.; Honeyborne, I.; Jones, G.; Karczmarczyk, M.; Pavsic, J.; Gutteridge, A.; Milavec, M.; Mendonza, P.; Schimmel, H.; Heuverswyn, F.V.; Gorton, R.; Cirillo, D.M.; Borroni, E.; Harris, K.; Barnard, M.; Heydenrych, A.; Ndusilo, N.; Wallis, C.L.; Pillay, K.; Barry, T.; Reddington, K.; Richter, E.; Mozioglu,

E.; Akyurek, S.; Yalçinkaya, B.; Akgoz, M.; Zel, J.; Foy, C.A.; McHugh, T.D.; Huggett, J.F. (2016) The use of digital PCR to improve the application of quantitative molecular diagnostic methods for tuberculosis. *BMC Infectious Diseases* 16:366.

Duan, C.; Rio, M.; Leclercq, J.; Bonnot, G.O.; Montoro, P. (2012) Gene expression pattern in response to wounding, methyl jasmonate and ethylene in the bark of *Hevea brasiliensis*. *Tree Physiology* 30: 1349-1359.

Dunn, I.S. & Blattner, F.R. (1987) Sharoons 36 to 40: multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Research* 15:2677-2698.

Engel, E.A.; Rivera, P.A.; Valenuela, P.D.T. (2010) First Report of Grapevine Syrah virus-1 in Chilean Grapevines. *Plant Disease* 94(5):633.

Evans, H.C.K.A. Holmes; Thomas S.E.. (2003). Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Progress*. 2:149-160.

Fleige, S.; Pfaffl, M.W. (2006) RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine* 27:126-139.

Fisher, P.J; Petrini, O.; Sutton, B.C.A. (1993) A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England. *Sydowia* 45(2): 338-345.

Francisco, V.L.F.S.; Bueno, C.R.F.; Baptistella, C.S.L. (2004) A cultura da seringueira no Estado de São Paulo. *Informações Econômicas*, São Paulo, 34(9).

Freire MCM, de Oliveria LO, de Almeida, AMR, Schuter I, Moreira MA, Liebenberg MM and Mienie CMS (2008) Evolutionary history of *Phakopsora pachyrhizi* (the Asian

soybean rust) in Brazil based on nucleotide sequences of the internal transcribed spacer region of the nuclear ribosomal DNA. *Genetics and Molecular Biology*, 31:920-931

Gamboa MA & Bayman P (2001). Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia: Meliaceae*). *Biotropica* 33: 352–360.

Gasparotto, L.; Santos, A.F.; Pereira, J.C.R.; Ferreira, F.A. Doenças da seringueira no Brasil. Embrapa Amazônia Ocidental, Brasília, Distrito Federal, 1997. 168p.

Gazis, R.; Chaverri, P. (2010) Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber tree (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal Ecology*. 3: 240-254.

Gazis, R.; Chaverri, P. (2015) Wild trees in Amazon basin harbor a great diversity of beneficial endosymbiotic fungi: is this evidence of protective mutualism? *Fungal Ecology* 17:18-29.

Gergerich, R.C.; Doiça, V.V. (2006) Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. *The Plant Health Instructor* DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0414-01

Ghildiyal, M.; Zamore, P.D. (2009) Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews Genetics*. 10(2):94-108.

Gomes, E. A., *et al.* (2010) Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares associada às raízes de duas linhagens de milho contrastantes para eficiência no uso de fósforo. 2010. XXVIII Congresso Nacional do milho e sorgo.

Gonçalves, A.R.; Barros, E.H.; Lavareda, R.; Silva, R.R.; Mendonça, R.R.; Tenório, C. 2012. Plano de Manejo da Floresta Nacional de Caxiuanã. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Volume I – Diagnóstico. 220p.

Guindon, S. & Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52(5):696-704.

Haag, C. (2009) As sementes da discórdia. *Pesquisa FAPESP* 158:22-25.

Hammer, O.; Harper, D.A.T; Ryan, P.D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1):9pp.

Handelsman, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4):669-685.

Hannon, G.J. (2002) RNA interference. *Nature*. 418: 244-251.

He, L.; Hannon, G.J. (2004) Micro-RNAs: SMALL RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*. 5(7): 522-531.

Holoch, D.; Moazed D. (2015) RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nature Reviews Genetics*. 16:71-84.

Hormann G.; Unkel, I. (2015) *Analysis of Ecological Data with R*. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. 126p.

Huggett, J.F.; Cowen, S.; Foy, C.A. (2015) Considerations for Digital PCR as an Accurate Molecular Diagnostic Tool. *Clinical Chemistry* 61 (1):79-88.

Hugenholtz, P.; Goebel, B.M.; Pace, N.R. (1998) Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *Journal of Bacteriology*. 180 (18): 4765-4774.

Hutvagner, G.; Zamore, P.D. (2002) RNAi: nature, abhors a double-strand. *Current Opinion in Genetics & Development*. 12(2): 225-232.

Hyde, K.D.; Soytong, K. (2008) The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 33:163-173.

Hyde, K.D.; Cai, L.; Cannon, P.F.; Crouch, J.A.; Crous, P.W.; Damm, U.; Goodwin, P.H.; Chen, H.; Johnston, P.R.; Jones, E.B.G.; Liu, Z.Y.; McKenzie, E.H.C.; Moriwaki, J.; Noireung, P.; Pennycook, S.R.; Pfenning, L.H.; Prihastuti, H.; Sato, T.; Shivas, R.G.; Tan, Y.P.; Taylor, P.W.J.; Weir, B.S.; Yang, Y.L.; Zhang, J.Z. (2009) *Colletotrichum* – names in current use. *Fungal Diversity* 39: 147-182.

Instituto Agronômico : Centro de Seringueira e Sistemas Agroflorestais. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/seringueira/importancia.php>> Acesso em: 10 jun.2015.

Jahn, C.E.; Charlowski, A.O.; Willis, D.K. (2008) Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. *Journal of Microbiological Methods* 75: 318-324.

Joshi, M.; Deshoande, J.D. (2010) Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Applications. *International Journal of Biomedical Research* 5:81-97.

Keller, M.; Zengler, K. (2004). Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2):141-150.

Kim, W.S.; Haj-Ahmad, Y. (2014) Evaluation of Plant RNA Integrity Number (RIN) generated using an Agilent BioAnalyzer 2100 – Application Note 80 Plant/Fungi RNA Sample Preparation. Norgen Biotek Corporation.

Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Filho, A.B.; Camargo, L.E.A.. Manual de fitopatologia. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas. Universidade de São Paulo. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997. 706p.

King, J.L.; Smith, A.D.; Mitchell, E.A.; Allen, M.S. (2016) Validation of droplet digital PCR for the detection and absolute quantification of *Borrelia* DNA in *Ixodes scapularis* ticks. *Parasitology* 3:1-9.

King, A.M.Q.; Adams, M.J.; Carstens, E.B.; Lefkowitz, E.J. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. International Union of Microbiological Societies Virology Division. São Diego-Califórnia, 2011. 1338p.

Kirk, J.L.; Beaudette, L.A.; Hart, M.; Moutoglis, P.; Klironomos, J.N.; Lee, H.; Trevors, J.T. (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58:169-188.

Koenig, R.; Barends, S.; Gulyaev, A.P.; Lesemann, D-E.; Vetten, H.J.; Loss, S.; Pleij, C.W.A. (2005) Nemesia ring necrosis virus: a new tymovirus with a genomic RNA having a histidylatable tobamovirus-like 3' end. *Journal of General Virology* 86:1827-1833.

Koljalg, U.; Nilsson, R.H.; Abarenkov, K.; Tedersoo, L.; Taylor, A.F.S.; Bahram, M.; Bates, S.; Bruns, T.D.; Bengtsson-Palme, J.; Callaghan, T.M.; Douglas, B.; Drenkhan, T.; Eberhardt, U.; Duenas, M.; Grebenc, T.; Griffith, G.W.; Hartmann, M.; Kirk, P.M.; Kohout, P.; Larsson, E.; Lindahl, B.D.; Lucking, R.; Martín, M.P.; Matheny, B.; Nguyen, N.H.; Niskanen, T.; Oja, J.; Peay, K.G.; Peintner, U.; Peterson, M.; Poldmaa, K.; Saag, L.; Saar, I.; Schubler, A.R.; Scott, J.A.; Senes, C.; Smith, M.E.; Suija, A.; Taylor, D.L.; Telleria, M.T.; Weiss, M.; Larsson, K-H. (2013) Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology* 22:5271-5277.

Kowalski T.; Kehr R.D. (1996): Fungal endophytes of living branch bases in several European tree species.– *In: Redlin S. C., Carris L. M., eds, Endophytic fungi in grasses and woody plants*, p. 67–86, St. Paul.

Kreuze, J. siRNA Deep Sequencing and Assembly: Piecing Together Viral Infections. *Eds M.L. Gullino and P.J.M. Bonants. Detection and Diagnostics of Plant Pathogens, 21 Plant Pathology in the 21st Century*^[SEP]. Springer. Nova Iorque. 204p. 2014.

Krug, M.S.; Berger, S.L. (1987) First-Strand Synthesis Primed with Oligo(dT). *Methods in enzymology* 152:316-325.

Kusari, S.; Hertweck, C.; Spiteller, M. (2012) Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. Cell Press. Chemistry & Biology Perspective. 19:792-798.

Li, R.; Gao, S.; Hernandez, A.G.; Wechter, W.P.; Fei, Z.; Ling, K-S. (2012) Deep Sequencing of Small RNAs in Tomato for Virus and Viroid Identification and Strain Differentiation. PlosOne. 7(5).

Li, P.; Lin, Y.; Zhang, H.; Wang, S.; Qiu, D.; Guo, L. (2016) Molecular characterization of a novel mycovirus of the family Tymoviridae isolated from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. Virology 489:86-94.

Lieberei, R. (2007) South American Leaf Blight of the Rubber Tree (*Hevea* spp.): New Steps in Plant Domestication using Physiological Features and Molecular Markers. Annals of Botany. 100:1125-1142.

Linnakoski R, Puhakka H, Pappinen A (2011). Endophytic fungi isolated from *Khaya anthotheca* in Ghana. Fungal Ecology 12:444-453.

Liu, L.; Li, Y.; Li, S.; Hu, N.; He, Y.; Pong, R.; Lin, D.; Lu, L.; Law, M (2012) Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. Journal of Biomedicine and Biotechnology 251364.

Loconsole, G.; Saldarelli, P.; Doddapaneni, H.; Savino, V.; Martelli, G.P.; Saponari, M. (2012) Identification of a single-stranded DNA virus associated with citrus chlorotic dwarf disease, a new member in the Family *Geminiviridae*. Virology. 432:162-172.

Lutzoni, F.; Kauff, F.; Cox, J.C.; McLaughlin, D.; Celio, G.; Dentinger, B.; Padamsee, M.; Hibbett, D.; James, T.Y.; Baloch, E.; Grube, M.; Reeb, V.; Hofstetter, V.; Schoch, C.; Arnold, A.E.; Miadlikowska, J.; Spatafora, J.; Johnson, D.; Hambleton, S.; Crockett, M.; Shoemaker, R.; Sung, G.-H.; Lücking, R.; Lumbsch, T.; O'Donnell, K.; Binder, M.;

Diederich, P.; Ertz, D.; Gueidan, C.; Hansen, K.; Harris, R. C.; Hosaka, K.; Lim, Y.-W.; Matheny, B.; Nishida, H.; Pfister, D.; Rogers, J.; Rossman, A.; Schmitt, I.; Sipman, H.; Stone, J.; Sugiyama, J.; Yahr, R.; Vilgalys, R. (2004) Assembling the fungal tree of life: Progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany* 91:1446-1480.

Maccheroni, W.; Alegria, M.C.; Greggio, C.C.; Piazza, J.P.; Kamla, R.F.; Zacharias, P.R.A.; Bar-Joseph, M.; Kitajima, E.W.; Assumpção, L.C.; Camarotte, G.; Cardozo, J.; Casagrande, E.C.; Ferari, F.; Franco, S.F.; Giachetto, P.F.; Girasol, A.; Jordão Jr, H.; Silva, V.H.A.; Souza, L.C.A.; Aguilar-Vildoso, C.I.; Zanca, A.S.; Arruda, P.; Kitajima, J.P.; Reinach, F.C.; Ferro, J.A.; Silva, A.C.R. (2005) Identification and Genomic Characterization of a New Virus (*Tymoviridae* Family) Associates with Citrus Sudden Death Disease. *Journal of Virology* 79(5):3028-3037.

Márquez, L.M.; Redman, R.S.; Rodriguez, R.J.; Roosinck, M.J. (2007) A Virus in a Fungus in a Plant: Three-Way Symbiosis Required for Thermal Tolerance. *Science* 315: 513-515.

Martelli, G.P.; Sabanadzovic, S.; Sabanadzovic, N.A-G; Edwards, M.C.; Dreher, T. (2002) The family *Tymoviridae*. *Archives of Virology* 147(9):1837-1846.

Martelli, G.P.; Sabanadzovic, S.; Abou Ghanem-Sabanadzovic, N.; Saldarelli, P. (2002) *Maculavirus*, a new genus of plant viruses. *Archives of Virology* 147(9):1847-1852.

Mathews, D.M.; Dodds, J.A. (2006) First Report of *Nemesia* ring necrosis virus in North America in Ornamental Plants from California. *Plant Disease* 90(9):

Montello, C.C.; Cardoso-Silva, C.B.; Silva, C.C.; Souza, L.M.; Scaloppi, E.J.; Golçalves, P.S.; Vicentini, R.; Souza, A. P. (2014) De Novo Assembly and Transcriptome Analysis of the Rubber tree (*Hevea brasiliensis*) and SNP Markers Development for Rubber Biosynthesis Pathways. *Plos One* 9:1-14.

Morton, J.B. *et al.* (2004) Measuring and Monitoring Biodiversity of Fungi. *Inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press 317-336.

Murali TS, Suryanarayanan TS, Venkatesan G (2007). Fungal endophyte communities in two tropical forests of southern India: diversity and host affiliation. *Mycological Progress* 6: 191–199.

National Research Council (US) Committee on Metagenomics: Challenges and Functional Applications. *The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet*. Washington (DC): National Academies Press (US); 2007. 1, Why Metagenomics? Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54011/>.

Nelson, R.S.; Citovsky, V. (2005) Plant Viruses. Invaders of Cells and Pirates of Cellular Pathways. *Plant Physiology* 138:1809-1814.

Ozsolak, F.; Milos, P.M. (2011) RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews Genetics* 12(2): 87-98.

Pádua, C.V. Plano de Manejo da Estação Ecológica de Anavilhanas. Brasília, Distrito Federal. 1999. 215p.

Petrini O (1986). Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. *In: Fokkema NJ, van den Huevel J(Eds) Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 175–187.

Petrini, O.; Carroll, G.C. (1981) Endophytic fungi in foliage of some Cupres- saceae in Oregon. *Canadian Journal of Botany* 59:629-636. [SEP]

Petrini, O. (1992) Fungal Endophytes of Tree Leaves. *Microbial Ecology of leaves*. Eds: Andrews, J.H.& Hirano, S.S. Springer-Verlag. Nova Iorque. 503p.

Petrini, O.; Sieber, T.N.; Toti, L.; Viret, O.(1992) Ecology, Metabolite Production, and

Substrate Utilization in Endophytic Fungi. *Natural Toxins* 1:185-196.

Plano de Manejo: Floresta Nacional de Caxiuanã (Pará). Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2012. 180p. [11]

Porras-alfaro, A.; Bayman, P. (2011) Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. *Annual Review of Phytopathology* 49:291-315.

Posada, D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25(7):1253-1356

Raulf, M. (2014) The Latex Story. *History of Allergy. Eds: Bergmann K-C, Ring J. Chemical and Immunology Allergy Home. Basel, Karger* 100:248-255.

Redman, R.S; Dunigan, D.D.; Rodriguez, R.J. (2001) Fungal symbiosis: from mutualism to parasitism, who controls the outcome, host or invader? *New Phytologist* 151, 705-716.

Rocha, A.C.S.; Garcia, D.; Uetanabaro, A.P.T. (2011) Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonismo on *Microcyclus ulei*. *Fungal Diversity* 47: 75-84.

Rodríguez, M.E.; Borges, A.A.; Pérez-Borges, A.; Pérez, J.A. (2008) Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biology* 8:131.

Rodriguez, R.J.; White Jr, J.F.; Arnold, A.E.; Redman, R.S. (2008) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182: 314-330.

Rodriguez, R.; Redman, R. (2008) More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 59,:1109-1114.

Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19(12):1572-1574.

Rubini, M.R.; Silva-Ribeiro, R.T.; Pomella, A.W.V.; Maki, C.S.; Araújo, W.L.; Santos, D.R.; Azevedo, J.L. 2005. 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* 1:24-33.

Sabanadzovic, N.; Abou-Ghanem, N.; Castellano, M.A.; Digiario, M.; Martelli, G.P. (2000) Grapevine fleck virus-like viruses in *Vitis*. *Archives of Virology* 145 (3):553-565.

Sabanadzovic, N.; Ghanem-Sabanadzovic, N.A.; Saldarelli, P.; Martelli, G.P. (2001) Complete nucleotide sequence and genome organization of Grapevine fleck virus. *Journal of General Virology* 82:2009-2015.

Saikkonen, K.; Faeth, S.H.; Helander, M.; Sullivan, T.J. (1998). Fungal endophytes: A Continuum of Interactions with Host Plants. *Annual Review of Ecology and Systematic* 29: 319-343.

Saucedo-García, A.; Anaya, A.L.; Espinosa-García, F.J.; González, M.C. (2014) Diversity and Communities of Foliar Endophytic Fungi from Different Agroecosystems of *Coffea arabica* L. In Two Regions of Veracruz, Mexico. *PlosOne* 9(6).

Schroeckh, V.; Scherlach, K.; Nutzmann, H.W.; Shelest, E.; Schmidt – Heck, W.; Schuemann, J.; Martin, K; Hertweck, C.; Brakhage, A.A.. (2009) Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:14558-14563.

Schoch, C.L.; Seifert, K.A.; Huhndorf, S.; Robert, V.; Levesque, C.A. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America 109: 6241-6246.

Schulz, B.; Rommert, A.K.; Dammann, U.; Aust, H.J.; Strack, D. (1999) The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research* 10: 1275–1283.

Schulz, B.; Boyle, C. (2005) The endophytic continuum. *Mycological Research* 109:661-686.

Sedlak, R.H.; Jerome, K.R. (2013) Viral diagnostics in the era of digital PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 75(1):1-4.

Sela, N.; Luria, N.; Dombrovsky, A. (2012) Genome Assembly of Bell Pepper *Endornavirus* from Small RNA. *Journal of Virology*. 86(14): 7721.

Sieber, T.N. (2007) Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*. 21:75-89.

Silva, L.G.C. Zoneamento do risco de ocorrência do mal das folhas da seringueira com base em sistemas de informações geográficas. 2007. 46f. Dissertação (Fitopatologia/Magister Scientiae) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

Smith & Read. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press. 3º edição. 787p.

Stielow, J.B.; Lévesque, C.A.; Seifert, K.A.; Meyer, W.; Irinyi, L.; Smits, D.; Renfurm, R.; Verkley, G.J.M.; Groenewald, M.; Chaduli, D.; Lomascolo, A., Welti, S.; Houbroken, J.; Lombard, L.; Quaedvlieg, W.; Binder, M.; Vaas, L.A.I.; Vu, D.; Yurkov, A.; Begerow, D.; Roehl, O.; Guerreiro, M.; Fonseca, A.; Samerpitak, K.; Diepeningen, A.D.; Dolatabadi, S.; Moreno, L.F.; Casaregola, S.; Mallet, S.; Jacques, N.; Roscini, L.; Egidi, E.; Bizet, C.; Garcia-Hermoso, D.; Martín, M.P.; Deng, S.; Groenewald, J.Z.; Boekhout, T.; Beer, Z.W.; Barnes, I.; Duong, T.A.; Wingfield, M.J.; Hoog, G.S.; Crous, P.W.; Lewis, C.T.; Hambleton, S.; Moussa, T.A.A.; Al-Zahrani, H.S.; Almaghrabi, O.A.;

Louis-Seize, G.; Assabgui, R.; McCormick, W.; Omer, G.; Dukik, K.; Cardinali, G.; Eberhardt, U.; Vries, M.; Robert, V. (2015) One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia* 35:242-263.

Somain, R.; Droulers, M. (2016) A seringueira agora é paulista. *Confins*, 27, posto online no dia 18 Julho 2016, consultado o 18 Outubro 2016. URL : <http://confins.revues.org/10906> ; DOI : 10.4000/confins.10906.

Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D. (1993) Taxol and taxane production by *Taxomyces andreane* an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260: 214-216.

Stone, J.K., Bacon, C.W., & White, J.F. (2000) An overview of endophytic microbes: endophytism defined, *Microbial endophytes*. Marcel Dekker, Inc: Novsa Iorque. pp. 3 – 29.

Strobel, G.A. & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 491-502.

Tonial, F.; Maia, B.H.L.N.S; Gomes-Figueiredo, J.A.; Sobottka, A.M.; Bertol, C.D.; Nepel, A.; Savi, D.C.; Vicente, V.A.; Gomes, R.R.; Glienke, C. (2016) Influence of Culturing Conditions on Bioprospecting and the Antimicrobial Potential of Endophytic Fungi from *Schinus terebinthifolius*. *Current Microbiology* 72:173-183.

Unterseher, M.; Gazis, R.; Chaverri, P.; Guarniz, C.F.G.; Tenorio, D.H.Z. (2013) Endophytic fungi from Peruvian Highland and lowland hábitats form distinctive and host plant-specific assemblages. *Biodiversity and Conservation*. 22:999-1016.

Vainio, E.J.; Jurvansuu, J.; Streng, J.; Rajamaki, M-L.; Hantula, J.; Valvonen, J.P.T. (2015) Diagnosis and discovery of fungal viruses using deep sequencing of small RNAs. *Journal of General Virology* 96:714-725.

Vaz, A.B.M; Costa, A.G.F.C.; Raad, L.VV.V.; Goes-Neto, A. (2014) Fungal endophytes associated with three South American Myrtae (*Myrtaceae*) exhibit preferences. *Fungal Biology* 118:277-286.

Xu, J.; Aileni, M.; Abbagani, S.; Zhang, P. (2009) A Reliable and Efficient Method for Total RNA Isolation from Various Members of Spurge Family (Euphorbiaceae). *Phytochemical Analysis* 21: 395-398.

Weber, R.W.S.; Stenger, E.; Meffert, A.; Hahn, M. (2004) Brefeldin a production by *Phoma medicaginis* in dead pre-colonized plant tissue: a strategy for habitat conquest? *Mycological Research* 108: 662–671.

Wilson, R.C.; Doudna, J.A. (2013) RNA Interference. *The Annual Review of Biophysics*. 42:217-239.

White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego, California, USA: Academic Press, pp 315- 322. 1990.

Woese, C.R.; Kandler, O.; Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 87(12), 4576-4579.

Woo, P.C.; Lau, S.K.; Teng, J.L.; Tse, H.; Yuen, K.Y. (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(10), 908-934. Review.

10. ANEXOS

10.1. Identificação dos fungos endofíticos pela análise da região ITS1-5.8S-ITS2 do gene RNA ribossomal.

Código de Coleção	Tipo de tecido	Parque	Espécie referência	Identificação do isolado	% de identidade	<i>e-value</i>	Cobertura	Tamanho da seq	Query
HB001	Folha	1	<i>Xylaria</i> sp. [JK341065.1]	<i>Xylaria</i> sp.	100	0	91.9	416	564
HB002	Folha	1	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152.1]	<i>Bionectria</i> sp.	100	0	99	572	567
HB003	Folha	1	<i>Bionectria</i> sp. [KF746136.1]	<i>Bionectria</i> sp.	100	0	99	557	567
HB004	Folha	1	<i>Bionectria</i> sp. [EU552110.1]	<i>Bionectria</i> sp.	99	0	98	577	1548
HB005	Folha	1	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152.1]	<i>Bionectria</i> sp.	99	0	100	569	567
HB006	Folha	1	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> [KF766223]	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	99	0	99	586	592
HB008	Folha	1	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.[KP096369]	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	99	0	100	525	628
HB009	Folha	1	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i> [EU552110]	<i>Bionectria</i> sp.	83	2e-165	85	747	1548
HB011	Folha	1	<i>Aspergillus aculeatus</i> [KU310905]	<i>Aspergillus</i> sp.	100	0	100	547	552
HB012	Folha	1	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152]	<i>Bionectria</i> sp.	100	0	100	541	567

HB014	Folha	1	<i>Aspergillus aculeatus</i> [KU310905]	<i>Aspergillus</i> sp.	100	2e-124	100	246	552
HB017	Folha	1	<i>Pseudofusicoccum</i> <i>stromaticum</i> [JQ905746]	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	99	5E-172	100	335	462
HB018	Folha	1	<i>Diaporthe arecae</i> [KC343032]	<i>Diaporthe</i> sp.	98	0	99	576	571
HB019	Folha	1	<i>Pseudofusicoccum</i> <i>adansoniae</i> [DQ480351]	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	98	0	92	551	548
HB020	Folha	1	<i>Xylaria</i> sp. [HQ022442]	<i>Xylaria</i> sp.	99	0	89	582	522
HB021	Folha	1	<i>Botryosphaeria mamane</i> [KU377487.1]	<i>Botryosphaeria</i> sp.	100	0	99	544	571
HB021b	Folha	1	<i>Pseudofusicoccum</i> <i>stromaticum</i> [KF766223]	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	99	0	96	568	592
HB022	Folha	1	<i>Colletotrichum</i> <i>gloesporioides</i> [KX355173]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	572	573
HB024	Folha	1	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i> [HQ022468]	<i>Bionectria</i> sp.	100	4e-147	100	287	380
HB025	Folha	1	<i>Bionectria ochroleuca</i> [GU256766]	<i>Bionectria</i> sp.	97.6	0	99	570	567
HB027	Folha	1	<i>Bionectria ochroleuca</i> [HQ022466.1]	<i>Bionectria</i> sp.	100	4e-157	100	305	505
HB028	Folha	1	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152]	<i>Bionectria</i> sp.	100	0	100	567	567

HB029	Folha	1	<i>Bionectria aff. ochroleuca</i> [HQ022466]	<i>Bionectria</i> sp.	100	0	100	441	505
HB032	Folha	1	<i>Phomopsis</i> sp. [JQ809664]	<i>Phomopsis</i> sp.	99	0	100	451	578
HB035	Folha	1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> [KX437750]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	487	579
HB036	Folha	1	<i>Aspergillus</i> sp. [JF312217]	<i>Aspergillus</i> sp.	100	0	100	576	613
HB037	Folha	1	<i>Pseudofusicoccum adansoniae</i> [KT968485]	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	98	5e-147	99	305	566
HB038	Folha	1	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i> [JN411807]	<i>Bionectria</i> sp.	96	2e-116	95	276	566
HB039	Folha	1	<i>Pseudofusicoccum adansoniae</i> [KT968482]	<i>Pseudofusicoccum</i> sp	98	0	55	898	565
HB040	Folha	1	<i>Pseudofusicoccum</i> sp. [KP096369]	<i>Pseudofusicoccum</i> sp	99	0	100	481	628
HB041b	Folha	1	<i>Colletotrichum ignotum</i> [KC790967]	<i>Colletotrichum</i> sp.	98.1	0	100	524	573
HB042	Folha	1	<i>Glomerella cingulata</i> [JQ3 41135]	<i>Glomerella</i> sp.	100	0	100	605	605
HB043	Folha	1	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> [KX355173]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	376	573

HB044	Folha	1	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152] <i>Colletotrichum</i>	<i>Bionectria</i> sp.	99.6	0	100	567	567
HB045	Folha	1	<i>gloesporioides</i> [KP703353]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	493	583
HB046	Folha	1	<i>Colletotrichum</i> <i>gloesporioides</i> [KC913203]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	588	598
HB047	Folha	1	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152] <i>Colletotrichum</i>	<i>Bionectria</i> sp.	99	0	100	568	567
HB048	Folha	1	<i>gloesporioides</i> [GU174547]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99.8	0	100	687	
HB049	Folha	1	<i>Glomerella cingulata</i> [EF423544]	<i>Glomerella</i> sp.	99	0	87	537	573
HB050	Folha	1	<i>Nemania bipapillata</i> [JQ341106.1]	<i>Nemania</i> sp.	100	0	100	520	520
HB051	Folha	1	<i>Xylaria cubensis</i> [GU373810]	<i>Xylaria</i> sp.	97.7	2.37e161	100	529	576
HB052	Folha	1	<i>Xylaria</i> sp. [KU645984]	<i>Xylaria</i> sp.	98	0	100	515	589
HB0190	Folha	1	<i>Colletotrichum</i> <i>gloesporioides</i> [KX197385]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	558	599
HB054	Folha	1	<i>Colletotrichum</i> <i>gloesporioides</i> [KX437750]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	426	579
HB055	Folha	1	<i>Colletotrichum</i> <i>gloesporioides</i> [KX437750]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	508	579
HB057	Folha	1	<i>Diaporthe cf. heveae</i> [KC343116]	<i>Diaporthe</i> sp.	98	0	99	521	576

HB058	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX197385]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	477	599
HB059	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX355173]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	531	573
HB060	Folha	1	<i>Diaporthe</i> sp. [KU523580]	<i>Diaporthe</i> sp.	99	0	100	504	617
HB061	Folha	1	<i>Colletotrichum</i> sp. [NR_120133]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	527	582
HB062	Folha	1	<i>Colletotrichum</i> sp. [KT966509]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	99	575	584
HB064	Folha	1	<i>Pseudofusicoccum adansoniae</i> [DQ480351]	<i>Pseudofusicoccum</i> sp	97	0	57	839	538
HB067	Folha	1	<i>Pseudofusicoccum</i> sp. [KP096369]	<i>Pseudofusicoccum</i> sp	99	0	54	933	950
HB068	Folha	1	<i>Colletotrichum siamense</i> [KP703365]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	534	574
HB069	Folha	1	<i>Colletotrichum</i> sp. [KT282763]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	99	577	584
HB070	Folha	1	<i>Hypoxyylon investiens</i> [KC968924]	<i>Hypoxyylon</i> sp.	99	0	100	538	653
HB071	Folha	1	<i>Trichoderma</i> sp. [KF367487]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	100	619	828

HB072	Folha	1	<i>Bionectria cf. ochroleuca</i> [HQ022468]	<i>Bionectria</i> sp.	99	0	100	300	505
HB073	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX197387]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	596	599
HB075	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX355173]	<i>Colletotrichum</i> sp.	94	0	100	545	573
HB078	Folha	1	<i>Colletotrichum fragariae</i> [JN98432]	<i>Colletotrichum</i> sp.	98	0	99	439	573
HB079	Folha	1	<i>Daldinia eschscholtzii</i> [KU204523]	<i>Daldinia</i> sp.	100	0	100	570	564
HB080	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX197387]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	584	599
HB083	Folha	1	<i>Phomopsis</i> sp. [KC342044]	<i>Phomopsis</i> sp.	99	0	99	504	507
HB084	Folha	1	<i>Phomopsis columnaris</i> [KU204665]	<i>Phomopsis</i> sp.	98	0	100	470	566
HB086	Folha	1	<i>Colletotrichum fructicola</i> [KP748201]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	489	614
HB087	Folha	1	<i>Daldinia eschscholtzii</i> [JQ760992]	<i>Daldinia</i> sp.	100	0	100	481	1082
HB088	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX355173]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	502	573
HB089	Folha	1	<i>Pseudofusicoccum</i>	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	99	0	100	562	592

HB090	Folha	1	<i>stromaticum</i> [KF766223] <i>Daldinia eschscholtzii</i> [KU204523]	<i>Daldinia</i> sp.	100	0	100	519	564
HB091	Folha	1	<i>Colletotrichum alatae</i> [KU593526]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	496	599
HB092	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KU529862]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	96	569	559
HB093	Folha	1	<i>Xylaria</i> sp. [KP306896]	<i>Xylaria</i> sp.	100	0	99	543	1082
HB094	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KT289582]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	417	555
HB096	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX197385]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	582	599
HB097	Folha	1	<i>Colletotrichum acutatum</i> [KU881799]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	419	578
HB098	Folha	1	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152]	<i>Bionectria</i> sp.	100	0	97	579	567
HB099	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [JF288539]	<i>Colletotrichum</i> sp.	97	0	100	532	581
HB0100	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KU529862]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	531	559
HB0101	Folha	1	<i>Diaporthe</i> sp. [KU523580]	<i>Diaporthe</i> sp.	99	0	100	534	617
HB0104	Folha	1	<i>Pseudofusicoccum</i> sp. [KP096369]	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	99	0	100	523	628
HB0105	Folha	1	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152]	<i>Bionectria</i> sp.	99	0	99	571	567
HB0107	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX197385]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	589	599
HB0108	Folha	1	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152]	<i>Bionectria</i> sp.	100	0	99	572	567

HB0109	Folha	1	<i>Colletotrichum acutatum</i> [KU881799]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	482	578
HB0110	Folha	1	<i>Phomopsis</i> sp. [KP050587]	<i>Phomopsis</i> sp.	99	0	100	499	561
HB0111	Folha	1	<i>Colletotrichum acutatum</i> [KU881799]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	525	578
HB0112	Folha	1	<i>Colletotrichum</i> <i>gloesporioides</i> [KX437750]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	480	579
HB0113	Folha	1	<i>Pseudofusicoccum</i> <i>adansoniae</i> [KM006445]	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	96	5e-120	42	638	538
HB0114	Folha	1	<i>Colletotrichum</i> sp. [KT282760]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	493	591
HB0115	Folha	1	<i>Trichoderma</i> sp. [KU571482]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	0	100	440	624
HB0116	Folha	1	<i>Pseudofusicoccum</i> <i>stromaticum</i> [KT728919]	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	99	0	100	490	563
HB0117	Folha	1	<i>Colletotrichum</i> <i>gloesporioides</i> [KC913203]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	583	598
HB0118	Folha	1	<i>Colletotrichum</i> <i>gloesporioides</i> [KX437750]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	540	574
HB0119	Folha	1	<i>Hypoxyylon ochraceum</i> [AJ390406]	<i>Hypoxyylon</i> sp.	97	0	91	474	602
HB0120	Folha	1	<i>Colletotrichum</i> sp. [KT953326]	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	100	522	530
HB0121	Folha	1	<i>Colletotrichum</i> sp. [KT282761]	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	100	489	582
HB0122	Folha	1	<i>Colletotrichum alatae</i> [KU593526]	<i>Colletotrichum</i> sp	99	0	100	572	599
HB0123	Folha	1	<i>Colletotrichum</i>	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	100	489	598

			<i>gloesporioides</i> [KX197394]						
HB0124	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [JF441192]	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	99	562	569
HB125b	Folha	1	<i>Diaporthe</i> sp. [KU523580]	<i>Diaporthe</i> sp.	96	0	100	582	617
HB0126	Folha	1	<i>Diaporthe</i> sp. [FJ799941]	<i>Diaporthe</i> sp.	97	0	99	540	1080
HB0127	Folha	1	<i>Trichoderma harzianum</i> [KP009228]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	0	100	612	621
HB0128	Folha	1	<i>Bionectria ocholeuca</i> [HQ022468]	<i>Bionectria</i> sp.	100	1e-127	100	252	505
HB0129	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX197385]	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	99	595	599
HB0130	Folha	1	<i>Xylaria allantoidea</i> [FJ621722]	<i>Xylaria</i> sp.	98	0	100	401	603
HB0132	Folha	1	<i>Colletotrichum</i> sp [KP703353]	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	100	524	583
HB0133	Folha	1	<i>Colletotrichum siamense</i> [KP703365]	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	99	540	574
HB0134	Folha	1	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152]	<i>Bionectria</i> sp.	100	0	100	476	567
HB0135	Folha	1	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152]	<i>Bionectria</i> sp.	100	0	98	578	567
HB0136	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX355173]	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	100	509	573
HB0138	Folha	1	<i>Colletotrichum fructicola</i> [KX268474]	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	100	476	549
HB0139	Folha	1	<i>Xylaria</i> sp. [FJ799949]	<i>Xylaria</i> sp.	99	0	100	600	607
HB0140	Folha	1	<i>Colletotrichum queenslandicum</i> [KT372378]	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	99	598	599

HB0142	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX355173]	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	100	511	573
HB0143	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX355173]	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	100	460	573
HB0144	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX437750]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	526	579
HB0145	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [EF423540]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	96	620	601
HB145b	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX355173]	<i>Colletotrichum</i> sp	99	0	100	406	573
HB0146	Folha	1	<i>Colletotrichum acutatum</i> [KU881799]	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	100	540	578
HB0147	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KU529862]	<i>Colletotrichum</i> sp	99	0	100	510	559
HB0148	Folha	1	<i>Bionectria aff. ochroleuca</i> [HQ022468]	<i>Bionectria</i> sp.	100	0	100	350	505
HB0149	Folha	1	<i>Diaporthe</i> sp. [JQ814333]	<i>Diaporthe</i> sp.	99	0	100	438	491
HB0151	Folha	1	<i>Colletotrichum acutatum</i> [KU881799]	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	100	527	578
HB0153	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX355173]	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	100	522	573
HB0154	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX401434]	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	100	479	582

HB0155	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX355173]	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	100	569	605
HB0156	Folha	1	<i>Hypoxyylon investiens</i> [FJ613018]	<i>Hypoxyylon</i> sp.	99	0	100	521	648
HB0157	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX355173]	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	100	566	573
HB0158	Folha	1	<i>Pseudofusicoccum</i> sp. [KP096369]	<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	99	0	100	474	628
HB0159	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [JF495089]	<i>Colletotrichum</i> sp	98	0	100	441	530
HB0160	Folha	1	<i>Colletotrichum queenslandicum</i> [KT372378]	<i>Colletotrichum</i> sp	99	0	100	585	599
HB0161	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX437750]	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	100	521	579
HB0164b	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KU529862]	<i>Colletotrichum</i> sp	100	0	100	521	559
HB0165	Folha	1	<i>Neofusicoccum batangarum</i> [KT728917]	<i>Neofusicoccum</i> sp.	100	0	100	505	617
HB0166	Folha	1	<i>Diaporthe</i> sp. [KU523580]	<i>Diaporthe</i> sp.	99	0	100	482	617
HB0167	Folha	1	<i>Colletotrichum</i> sp. [KP703353]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	489	583
HB0171	Folha	1	<i>Colletotrichum theobromicola</i> [KX721068]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	443	553
HB0172	Folha	1	<i>Colletotrichum siamense</i> [KP703365]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	539	574

HB0173	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX437750]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	501	579
HB0175	Folha	1	<i>Colletotrichum alatae</i> [KU593526]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	571	599
HB0176	Folha	1	<i>Colletotrichum</i> sp. [KP703353]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	525	583
HB0177	Folha	1	<i>Trichoderma harzianum</i> [KU297283]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	0	100	526	583
HB0178	Folha	1	<i>Trichoderma harzianum</i> [LT604467]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	0	100	477	588
HB0192	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX355173]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	522	573
HB0179	Folha	1	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152]	<i>Bionectria</i> sp.	100	0	100	566	567
HB0180	Folha	1	<i>Colletotrichum alatae</i> [KU593526]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	421	599
HB0181	Folha	1	<i>Daldinia eschscholtzii</i> [KU204523]	<i>Daldinia</i> sp.	97	6e-131	100	288	
HB0183	Folha	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KC913203]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	591	598
HB0185	Folha	1	<i>Colletotrichum</i> sp. [KP703353]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	485	583
HB0186	Folha	1	<i>Trametes</i> sp. [HQ184178]	<i>Trametes</i> sp.	99	0	100	501	589
HB0188	Folha	1	<i>Xylaria</i> sp. [HQ022442]	<i>Xylaria</i> sp.	99	0	89	583	522
HB0189	Folha	1	<i>Bionectria aff. ochroleuca</i> [HQ022468]	<i>Bionectria</i> sp.	100	0	100	421	505
HB0199	Folha	1	<i>Botryosphaeria mamane</i> [KU377487]	<i>Botryosphaeria</i> sp.	100	0	100	451	571
HB0201	Folha	1	<i>Colletotrichum</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	509	579

HBA002	Alburno	1	<i>Colletotrichum acutatum</i> [KU881799]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	534	578
HBA003	Alburno	1	<i>Trichoderma harzianum</i> [KP009228]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	99	620	621
HBA004	Alburno	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [JX258733]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	543	603
HBA005	Alburno	1	<i>Trichoderma harzianum</i> [KP009228]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	0	100	613	621
HBA006	Alburno	1	<i>Trichoderma harzianum</i> [KP009228]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	0	100	608	621
HBA0010	Alburno	1	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX377750]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	509	579
HB202	Folha	2	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX355173]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	3e-154	100	300	573
HB203	Folha	2	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KR704204]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	96	615	601
HB204	Folha	2	<i>Phomopsis</i> sp. [JX944182]	<i>Phomopsis</i> sp.	100	1e-157	100	306	437
HB205	Folha	2	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KT582184]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	498	508
HB206	Folha	2	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX437750]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	474	579
HB207	Folha	2	<i>Colletotrichum alatae</i> [KU593526]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	578	599
HB208	Folha	2	<i>Colletotrichum</i> sp. [KP703353]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	517	583

HB210	Folha	2	<i>Glomerella cingulata</i> [JQ341135]	<i>Glomerella</i> sp.	100	0	99	584	605
HB211	Folha	2	<i>Colletotrichum</i> <i>gloesporioides</i> [KX355173]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	2e-171	100	331	573
HB209	Folha	2	<i>Colletotrichum</i> sp. [KP703353]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	551	578
HB212	Folha	2	<i>Glomerella cingulata</i> [GU066625]	<i>Glomerella</i> sp.	99	0	100	548	574
HB213	Folha	2	<i>Glomerella cingulata</i> [JQ341135]	<i>Glomerella</i> sp.	100	0	99	587	605
HB239	Folha	2	<i>Colletotrichum siamense</i> [KU923686]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	351	525
HB240	Folha	2	<i>Lasiodiplodia</i> <i>pseudotheobromae</i> [JX914479]	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	100	0	100	561	561
HB241	Folha	2	<i>Lasiodiplodia inanensis</i> [KU887065]	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	100	6e-156	100	303	454
HB242	Folha	2	<i>Glomerella cingulata</i> [JQ341135]	<i>Glomerella</i> sp.	100	0	99	584	605
HB243	Folha	2	<i>Colletotrichum</i> sp. [HQ449991]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	303	486
HB244	Folha	2	<i>Xylaria</i> sp. [KP306964]	<i>Xylaria</i> sp.	99	0	100	530	1068
HB245	Folha	2	<i>Hypoxylon monticulosum</i> [KP689191]	<i>Hypoxylon</i> sp.	100	0	100	348	536
HB214	Folha	2	<i>Colletotrichum</i> <i>gloesporioides</i> [KU663491]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	1e-147	100	291	534
HB246	Folha	2	<i>Colletotrichum</i> <i>gloesporioides</i> [KR704204]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	99	593	601

HB216	Folha	2	<i>Glomerella cingulata</i> [JQ341135]	<i>Glomerella</i> sp.	99	0	100	554	605
HB247	Folha	2	<i>Colletotrichum alatae</i> [KU593526]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	590	599
HB370	Folha	2	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152]	<i>Bionectria</i> sp.	100	0	98	577	567
HB248	Folha	2	<i>Colletotrichum</i> <i>gloesporioides</i> [KX355173]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	5e-172	100	332	573
HB371	Folha	2	<i>Trichoderma lixii</i> [KU934235]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	100	578	620
HB386	Folha	2	<i>Trichoderma harzianum</i> [LT604467]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	100	529	573
HB387	Folha	2	<i>Trichoderma harzianum</i> [LT604467]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	0	100	525	573
HB385	Folha	2	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152]	<i>Bionectria</i> sp.	99	0	99	523	522
HB373	Folha	2	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152]	<i>Bionectria</i> sp.	100	0	100	412	522
HB374	Folha	2	<i>Bionectria</i> sp. [KF019253]	<i>Bionectria</i> sp.	99	0	99	485	520
HB388	Folha	2	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152]	<i>Bionectria</i> sp.	100	0	100	428	522
HB395	Folha	2	<i>Bionectria</i> sp. [HQ022468]	<i>Bionectria</i> sp.	99	1e-141	100	280	505
HB345	Folha	2	<i>Trichoderma</i> sp. [KU556489]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	100	561	641
HB346	Folha	2	<i>Lasiodiplodia iranensis</i> [KU887065]	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	100	3e-158	100	307	454
HB348	Folha	2	<i>Trichoderma gamsii</i> [KX009501]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	99	539	577
HB349	Folha	2	<i>Muscodor</i> sp. [KF850711]	<i>Muscodor</i> sp.	99	0	99	507	611
HB350	Folha	2	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> [KX611107]	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	99	0	100	487	789
HB351	Folha	2	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> [KX611107]	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	99	0	100	482	789

HB352	Folha	2	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> [KU377523]	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	100	0	100	437	533
HB353	Folha	2	<i>Lasiodiplodia</i> <i>pseudotheobromae</i> [KX244815]	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	99	0	100	465	571
HB354	Folha	2	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> [KX611107]	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	99	0	100	484	533
HB355	Folha	2	<i>Lasiodiplodia</i> <i>pseudotheobromae</i> [KX244815]	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	99	0	100	501	571
HB356	Folha	2	<i>Peniophora</i> sp. [KJ831890]	<i>Peniophora</i> sp.	99	0	99	511	567
HB357	Folha	2	<i>Peniophora</i> sp. [KJ831890]	<i>Peniophora</i> sp.	99	0	100	558	567
HB358	Folha	2	<i>Trichoderma</i> sp. [KU933759]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	100	559	588
HB359	Folha	2	<i>Trichoderma harzianum</i> [KU297283]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	100	524	583
HB360	Folha	2	<i>Trichoderma harzianum</i> [LT604467]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	0	100	549	573
HB361	Folha	2	<i>Xylaria</i> sp. [FJ799949]	<i>Xylaria</i> sp.	100	0	100	580	607
HB362	Folha	2	<i>Xylaria</i> sp. [JQ814327]	<i>Xylaria</i> sp.	100	0	100	401	506
HB363	Folha	2	<i>Xylaria</i> sp. [HQ022442]	<i>Xylaria</i> sp.	99	9	90	577	522
HB364	Folha	2	<i>Xylaria</i> sp. [HQ022442]	<i>Xylaria</i> sp.	99	0	93	460	522
HB365	Folha	2	<i>Xylaria</i> sp. [FJ7999499]	<i>Xylaria</i> sp.	99	0	99	540	607
HB366	Folha	2	<i>Colletotrichum alatae</i> [KU593526]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	555	599
HB390	Folha	2	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152]	<i>Bionectria</i> sp.	100	0	99	569	567
HB376	Folha	2	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152]	<i>Bionectria</i> sp.	99	0	99	550	567
HB249	Folha	2	<i>Colletotrichum</i> sp. [JN390864]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	99	550	578
HB250	Folha	2	<i>Colletotrichum</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	99	564	599

			<i>gloesporioides</i> [KX197385]						
HB251	Folha	2	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KT968455]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	403	553
HB252	Folha	2	<i>Peniophora</i> sp. [KJ831890]	<i>Peniophora</i> sp.	98	0	100	558	567
HB253	Folha	2	<i>Peniophora</i> sp. [KJ831890]	<i>Peniophora</i> sp.	99	0	99	554	567
HB254	Folha	2	<i>Peniophora</i> sp. [KJ831890]	<i>Peniophora</i> sp.	98	0	97	570	567
HB255	Folha	2	<i>Hypoxylon monticulosum</i> [KC968939]	<i>Hypoxylon</i> sp.	99	0	100	515	597
HB257	Folha	2	<i>Penicillium citrinum</i> [KM369869]	<i>Penicillium</i> sp.	99	0	100	476	534
HB258	Folha	2	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX197385]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	544	599
HB259	Folha	2	<i>Xylaria allantoidea</i> [KR534657]	<i>Xylaria</i> sp.	96	0	80	528	544
HB260	Folha	2	<i>Pestalotiopsis</i> sp. [KT150685]	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	99	0	100	515	553
HB261	Folha	2	<i>Nectria pseudotrichia</i> [EU715616]	<i>Nectria</i> sp.	99	0	99	470	1121
HB367	Folha	2	<i>Colletotrichum</i> sp. [KP703353]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	491	583
HB262	Folha	2	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KT968455]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	453	553
HB263	Folha	2	<i>Colletotrichum</i> sp. [KP703353]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	442	583
HB264	Folha	2	<i>Colletotrichum queenslandicum</i> [KU923682]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	485	526
HB266	Folha	2	<i>Colletotrichum camelliae</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	498	540

			[KT351595]						
HB267	Folha	2	<i>Colletotrichum camelliae</i> [KT351595]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	428	540
HB218	Folha	2	<i>Muscodor</i> sp. [KF850711]	<i>Muscodor</i> sp.	100	0	100	597	611
HB219	Folha	2	<i>Glomerella cingulata</i> [JQ341135]	<i>Glomerella</i> sp.	99	0	99	588	605
HB220	Folha	2	<i>Colletotrichum camelliae</i> [KT351595]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	392	540
HB221	Folha	2	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX355173]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	1e-158	100	308	573
HB222	Folha	2	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KU720077]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	1e-117	100	243	525
HB268	Folha	2	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX197385]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	511	599
HB223	Folha	2	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX197385]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	584	599
HB224	Folha	2	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX355173]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	415	573
HB391	Folha	2	<i>Trichoderma</i> sp. [KF367487]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	99	624	828
HB226	Folha	2	<i>Glomerella cingulata</i> [JQ341135]	<i>Glomerella</i> sp.	100	0	99	587	605
HB227	Folha	2	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX197385]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	575	599

HB265	Folha	2	<i>Peniophora</i> sp. [KJ831890]	<i>Peniophora</i> sp.	99	0	96	599	528
HB228	Folha	2	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KT582186]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	475	537
HB229	Folha	2	<i>Peniophora</i> sp. [KJ831890]	<i>Peniophora</i> sp.	99	1e-168	100	333	528
HB230	Folha	2	<i>Colletotrichum siamense</i> [LC052320]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	571	585
HB231	Folha	2	<i>Colletotrichum alatae</i> [KU593526]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	99	588	599
HB232	Folha	2	<i>Xylaria</i> sp. [KR534681]	<i>Xylaria</i> sp.	100	0	100	313	563
HB233	Folha	2	<i>Colletotrichum siamense</i> [KU923686]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	1e-158	100	311	525
HB234	Folha	2	<i>Colletotrichum siamense</i> [KU923686]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	390	525
HB236	Folha	2	<i>Colletotrichum alatae</i> [KU593526]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	98	579	599
HB237	Folha	2	<i>Colletotrichum camelliae</i> [KT351595]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	479	540
HB238	Folha	2	<i>Peniophora</i> sp. [KJ832046]	<i>Peniophora</i> sp.	99	0	100	512	837
HB270	Folha	2	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152]	<i>Bionectria</i> sp.	99	0	97	573	567
HB274	Folha	2	<i>Colletotrichum alatae</i> [KU593526]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	562	599
HB275	Folha	2	<i>Colletotrichum alatae</i> [KU593526]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	573	599
HB277	Folha	2	<i>Colletotrichum siamense</i> [LC052320]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	578	585
HB278	Folha	2	<i>Hypocrea lixii</i> [EU280079]	<i>Hypocrea</i> sp.	100	0	99	621	645
HB279	Folha	2	<i>Colletotrichum alatae</i> [KU593526]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	99	573	599
HB280	Folha	2	<i>Pleurostoma repens</i> [NR_135925]	<i>Pleurostoma</i> sp.	96	0	96	603	587

HB281	Folha	2	<i>Hypocrea lixii</i> [EU280079]	<i>Hypocrea</i> sp.	100	0	100	625	645
HB282	Folha	2	<i>Trichoderma harzianum</i> [KU935690]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	4e-173	100	334	595
HB283	Folha	2	<i>Hypocrea nigricans</i> [HF569185]	<i>Hypocrea</i> sp.	100	0	100	384	942
HB284	Folha	2	<i>Colletotrichum</i> <i>gloesporioides</i> [KU534983]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	591	600
HB285	Folha	2	<i>Colletotrichum alatae</i> [KU593521]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	511	570
HB286	Folha	2	<i>Colletotrichum alatae</i> [KU593526]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	572	599
HB287	Folha	2	<i>Colletotrichum alatae</i> [KU593521]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	519	570
HB288	Folha	2	<i>Colletotrichum</i> <i>gloesporioides</i> [KX355173]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	4e-173	100	334	573
HB289	Folha	2	<i>Glomerella cingulata</i> [JQ341135]	<i>Glomerella</i> sp.	100	0	99	581	605
HB276	Folha	2	<i>Xylaria</i> sp. [JX436805]	<i>Xylaria</i> sp.	98	0	96	625	614
HB272	Folha	2	<i>Arthrinium xenocordella</i> [KF144926]	<i>Arthrinium</i> sp.	100	0	100	473	558
HB273	Folha	2	<i>Trichoderma lixii</i> [KU934235]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	0	100	520	620
HB308	Folha	2	<i>Hypocrea lixii</i> [EU280079]	<i>Hypocrea</i> sp.	100	0	100	622	645
HB309	Folha	2	<i>Glomerella cingulata</i> [JQ341135]	<i>Glomerella</i> sp.	100	0	99	577	605
HB310	Folha	2	<i>Glomerella cingulata</i> [JQ341135]	<i>Glomerella</i> sp.	99	0	99	590	605
HB378	Folha	2	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152]	<i>Bionectria</i> sp.	100	0	100	556	567

HB290	Folha	2	<i>Trichoderma harzianum</i> [LT604467]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	0	100	480	573
HB291	Folha	2	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KX355184]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	4e-116	100	231	571
HB294	Folha	2	<i>Diaporthe pseudomangiferae</i> [KT972131]	<i>Diaporthe</i> sp.	100	0	100	584	601
HB296	Folha	2	<i>Glomerella cingulata</i> [JQ341135]	<i>Glomerella</i> sp.	100	0	99	581	605
HB297	Folha	2	<i>Trichoderma harzianum</i> [KP009228]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	0	100	616	621
HB298	Folha	2	<i>Trichoderma</i> sp. [KF367487]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	99	622	828
HB299	Folha	2	<i>Phomopsis</i> sp. [JX436795]	<i>Phomopsis</i> sp.	100	0	99	580	606
HB300	Folha	2	<i>Pestalotiopsis</i> sp. [KX355192]	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	99	0	100	534	548
HB301	Folha	2	<i>Diaporthe</i> sp. [KU523580]	<i>Diaporthe</i> sp.	99	0	100	591	617
HB302	Folha	2	<i>Phomopsis</i> sp. [HM595506]	<i>Phomopsis</i> sp.	98	0	99	596	652
HB304	Folha	2	<i>Diaporthe</i> sp. [FJ799941]	<i>Diaporthe</i> sp.	98	0	100	588	602
HB307	Folha	2	<i>Hypocrea lixii</i> [EU280079]	<i>Hypocrea</i> sp.	100	0	100	621	645
HB306	Folha	2	<i>Colletotrichum gloesporioides</i> [KU534983]	<i>Colletotrichum</i> sp.	100	0	100	581	600
HB295	Folha	2	<i>Pseudopestalotiopsis theae</i> [HQ832793]	<i>Pseudopestalotiopsis</i> sp.	99	0	100	560	582
HB305	Folha	2	<i>Glomerella cingulata</i> [JQ341135]	<i>Glomerella</i> sp.	99	0	99	585	605
HB303	Folha	2	<i>Glomerella cingulata</i>	<i>Glomerella</i> sp.	100	0	99	590	605

			[JQ341135]						
HB312	Folha	2	<i>Diaporthe novem</i> [KC343159]	<i>Diaporthe</i> sp.	99	0	98	582	571
HB382	Folha	2	<i>Bionectria</i> sp. [HQ022468]	<i>Bionectria</i> sp.	99	0	100	408	505
HB377	Folha	2	<i>Bionectria aff. ochroleuca</i> [KT995766]	<i>Bionectria</i> sp.	100	6e-256	100	303	380
HB379	Folha	2	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152]	<i>Bionectria</i> sp.	100	0	100	554	567
HB381	Folha	2	<i>Bionectria</i> sp. [KF746152]	<i>Bionectria</i> sp.	100	0	100	475	567
HB394	Folha	2	<i>Trichoderma</i> sp. [KU504283]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	99	593	634
HB336	Alburn o	2	<i>Colletotrichum alatae</i> [KU593526]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	578	599
HB337	Alburn o	2	<i>Trichoderma atrobrunneum</i> [KX632514]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	2e-134	100	267	571
HB338	Alburn o	2	<i>Trichoderma</i> sp. [KF367487]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	100	624	828
HB339	Alburn o	2	<i>Phanerochaete</i> sp. [KR812275]	<i>Phanerochaete</i> sp.	99	0	100	540	592
HB313	Alburn o	2	<i>Trichoderma</i> sp. [KF367487]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	100	579	828
HB314	Alburn o	2	<i>Trichoderma</i> sp. [367486]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	100	619	828
HB315	Alburn o	2	<i>Trichoderma lixi</i> [KT588244]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	100	542	586
HB316	Alburn o	2	<i>Trichoderma</i> sp. [KU571482]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	99	537	624
HB317	Alburn o	2	<i>Trichoderma</i> sp. [KF367487]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	100	628	828
HB318	Alburn o	2	<i>Trichoderma</i> sp. [KU504279]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	0	100	488	647

HB340	Alburn o	2	<i>Trichoderma lixii</i> [HQ608080]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	100	522	646
HB341	Alburn o	2	<i>Trichoderma</i> sp. [KU504279]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	0	100	568	647
HB342	Alburn o	2	<i>Trichoderma</i> sp. [KF367487]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	100	611	828
HB343	Alburn o	2	<i>Trichoderma</i> sp. [KU571482]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	99	552	624
HB344	Alburn o	2	<i>Trichoderma spirale</i> [JF439515]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	0	100	615	650
HB319	Alburn o	2	<i>Trichoderma harzianum</i> [LT604467]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	99	461	573
HB320	Alburn o	2	<i>Trichoderma harzianum</i> [LT604467]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	100	373	573
HB321	Alburn o	2	<i>Trichoderma</i> sp. [KU933759]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	100	562	588
HB322	Alburn o	2	<i>Trichoderma atrobrunneum</i> [KX632514]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	2e-171	100	331	571
HB323	Alburn o	2	<i>Trichoderma lixxi</i> [KU934235]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	0	100	589	620
HB325	Alburn o	2	<i>Pestalotiopsis</i> sp. [JQ341110]	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	100	0	100	562	570
HB326	Alburn o	2	<i>Pestalotiopsis</i> sp. [JQ341110]	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	100	0	100	552	570
HB327	Alburn o	2	<i>Hypocrea lixxi</i> [FJ613029]	<i>Hypocrea</i> sp.	100	0	100	625	647
HB328	Alburn o	2	<i>Trichoderma harzianum</i> [LT604467]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	0	100	497	573
HB329	Alburn o	2	<i>Lasiodiplodia gonubiensis</i> [KU593534]	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	100	0	100	544	562

HB368	Alburn o	2	<i>Xylaria</i> sp. [FJ799949]	<i>Xylaria</i> sp.	99	0	100	562	607
HB369	Alburn o	2	<i>Xylaria</i> sp. [FJ799949]	<i>Xylaria</i> sp.	99	0	100	563	607
HB383	Alburn o	2	<i>Pestalotiopsis</i> sp. [KX355192]	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	99	0	100	520	548
HB330	Alburn o	2	<i>Trichoderma</i> sp. [KF367487]	<i>Trichoderma</i> sp.	99	0	100	624	828
HB331	Alburn o	2	<i>Trichoderma</i> sp. [KU504279]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	0	100	580	647
HB332	Alburn o	2	<i>Trichoderma atrobunneum</i> [KX632514]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	2e-156	100	304	571
HB333	Alburn o	2	<i>Trichoderma</i> sp. [KU504279]	<i>Trichoderma</i> sp.	100	0	99	577	647
HB334	Alburn o	2	<i>Colletotrichum</i> <i>gloesporioides</i> [KX447643]	<i>Colletotrichum</i> sp.	99	0	100	416	580

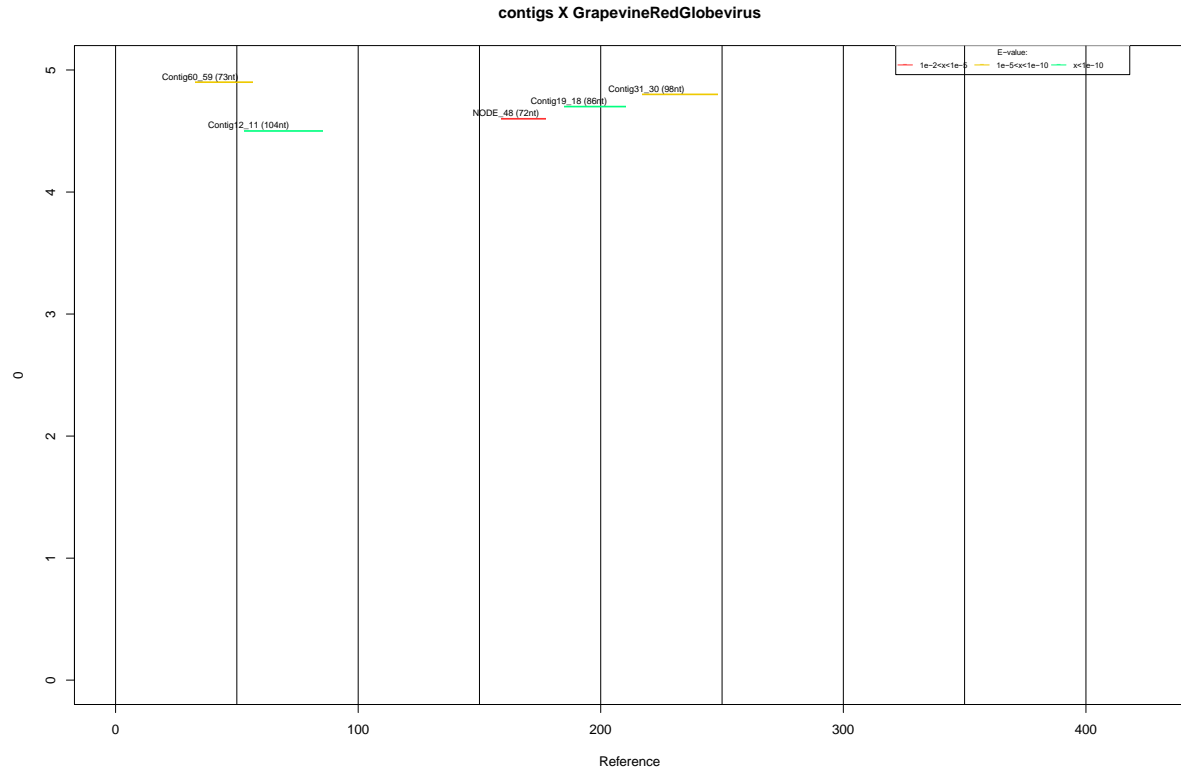
10.2. Isolados pertencentes de cada um dos grupos de similaridade pelo MOTHUR.

Grupo	Isolados
CO 1	HB100, HB107, HB109, HB111, HB112, HB114, HB117, HB118, HB120, HB121, HB122, HB123, HB124, HB129, HB132, HB133, 136, HB138, HB140, HB142, HB143, HB144, HB146, HB147, HB151, HB153, HB154, HB160, HB161, HB164b, HB167, HB171, HB172, HB173, HB175, HB176, HB180, HB183, HB185, HB192, HB201, HB022, HB035, HB043, HB46, HB048, HB049, HB054, HB055, HB058, HB059, HB061, HB068, HB073, HB080, HB086, HB088, HB091, HB096, HB097, HB145, HB157, HB190, HB202, HB203, HB206, HB208, HB210, HB211, HB212, HB213, HB216, HB223, HB224, HB226, HB227, HB230, HB231, HB236, HB242, HBB247, HB248, HB249, HB250, HB251, HB258, HB263, HB274, HB277, HB279, HB284, HB285, HB287, HB289, HB296, HB303, HB305, HB306, HB309, HB310, HB334, HB366, HB367, HB042, HB062, HB069, HBA002, HBA004, HB286
TR1	HB343, HB371, HB313, HB318, HB297, HB307, HB317, HB330, HB328, HB321, HB358, HB115, HB322, HB341, HB394, HB278, HBA006, HB391, HB071, HB177, HB178b, HB283, HB386, HB359, HB331, HB323, 127, HB308, HB342, HB314, HB360, HB273, HB282, HB387, HB332, HB333, HB327, HBA005, HB281, HB338, HB298, HB290, HBA003, HB320
BI1	HB270, HB381, HB004, HB003, HB370, HB376, HB029, HB027, HB028, HB374, HB025, HB098, HB179, HB002, HB388, HB382, HB378, HB128, HB044, HB012, HB390, HB047, HB135, HB385, HB189, HB377, HB373, HB134, HB105, HB379, HB108, HB005, HB275, HB148, HB024
CO2	HB207, HB209, HB266, HB237, HB228, HB288, HB267, HB220, HB336, HB221
LA1	HB351, HB355, HB354, HB353, HB240, HB241, HB329, HB346, HB350
PS1	HB067, HB008, HB158, HB089, HB040, HB104
XY1	HB369, HB362, HB361, HB365, HB368, HB139
CO3	HB264, HB233, HB268, HB239, HB291, HB234
DI1	HB032, HB110, HB204, HB083, HB018
XY2	HB364, HB188, HB363, HB020
DI2	HB166, HB301, HB060
PN1	HB253, HB254, HB252
CO4	HB094, HB145b, HB262,
DA1	HB090, HB079, HB087
PT1	HB326, HB325, HB300
PS2	HB116, HB021b, HB017
PS3	HB113, HB019, HB064
PS4	HB039, HB037
BT1	HB199, HB021
TR2	HB315, HB316
AS1	HB014, HB011
HY1	HB156, HB070
MU1	HB349, HB218
CO5	HB045
NM1	HB050

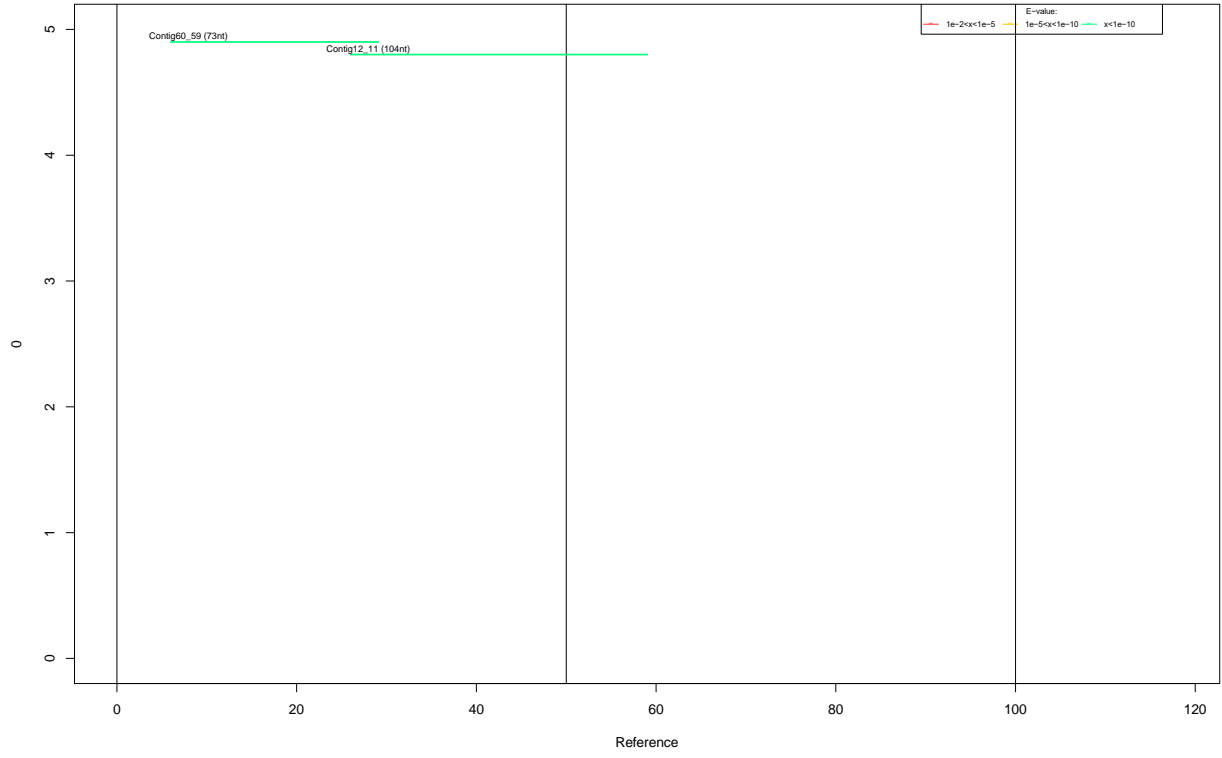
AR1	HB272
PH1	HB339
DA1	HB181
HY2	HB245
HY3	HB255
PN2	HB238
PN3	HB356
PN4	HB357
PN5	HB265
XY3	HB001
PN6	HB229
PL1	HB280
HY4	HB119
AS2	HB036
PD1	HB295
PT2	HB383
XY4	HB052
XY5	HB232
PT3	HB260
XY6	HB259
NE1	HB261
XY7	HB244
NF1	HB165
TR3	HB348
TR4	HB345
TR5	HB344
TR6	HB340
TR7	HB337
XY8	HB276
TR8	HB319
BI2	HB009
XY9	HB130
LA2	HB352
BI3	HB038
XY10	HB093
PE1	HB257
BI4	HB395
BI5	HB072
XY11	HB051
CO6	HB075
CO7	HB078
DI3	HB299
DI4	HB302
DI5	HB294

CO8	HB099
CO9	HB041b
DI6	HB101
CO10	HB159
DI7	HB312
DI8	HB125b
DI9	HB126
DI10	HB149
DI11	HB304
DI12	HB084
DI13	HB057
CO11	HB222
CO12	HB092
CO13	HB243
CO14	HB219
CO15	HB205
CO16	HB214
TM1	HB186

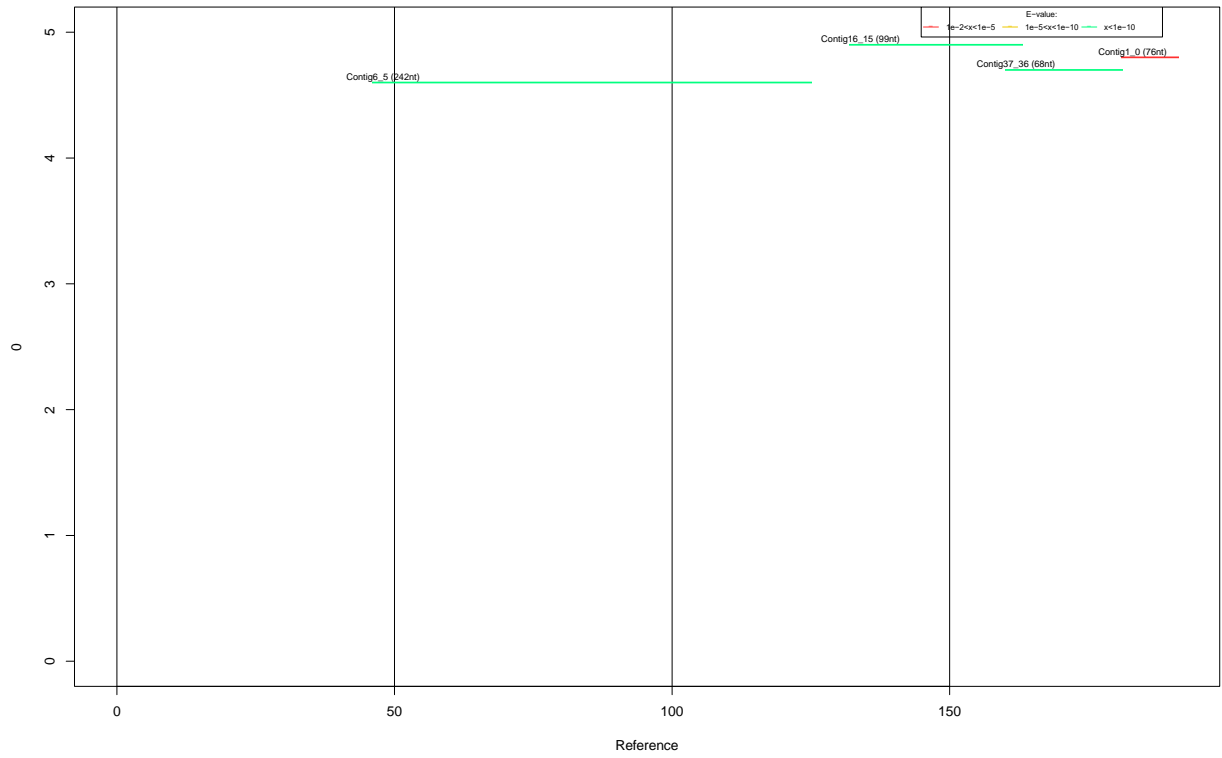
10.3. Representação esquemática da região da Polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp) para as espécies que apresentaram similaridade para os *contigs* formados no sequenciamento de acordo com genoma de referencia.



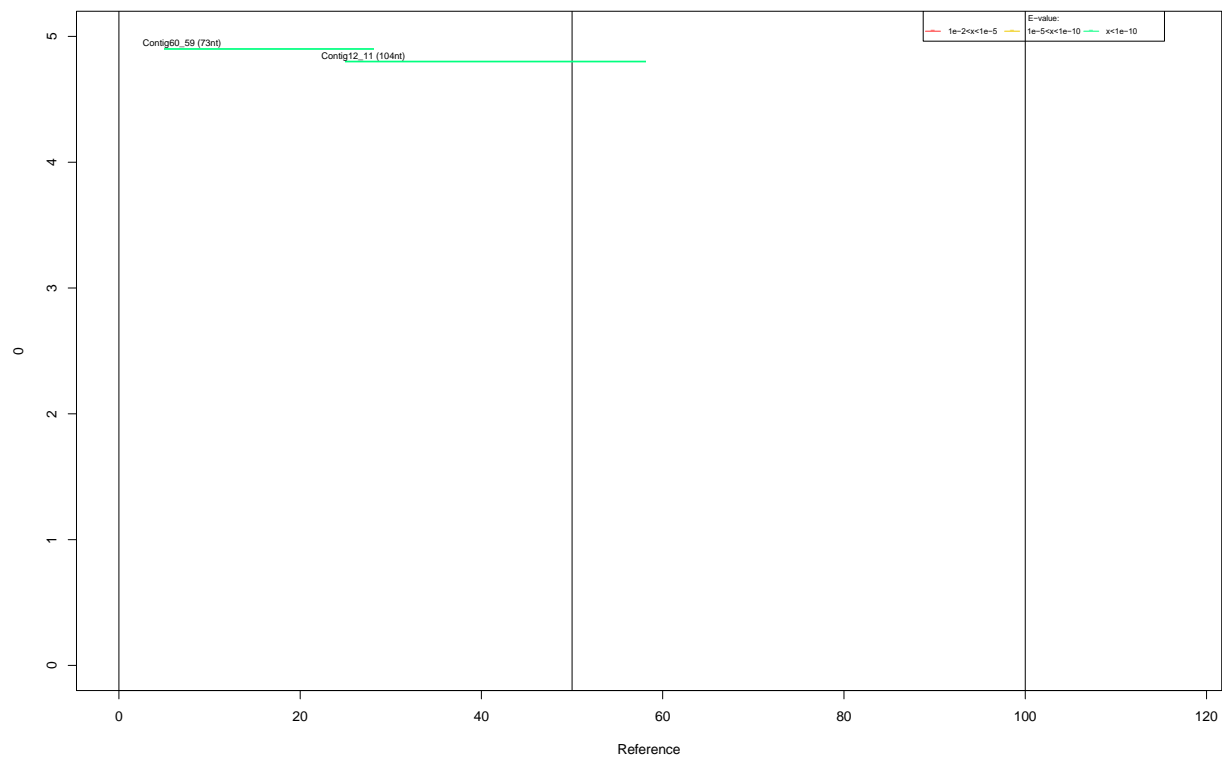
contigs X Grapevinefleckvirus



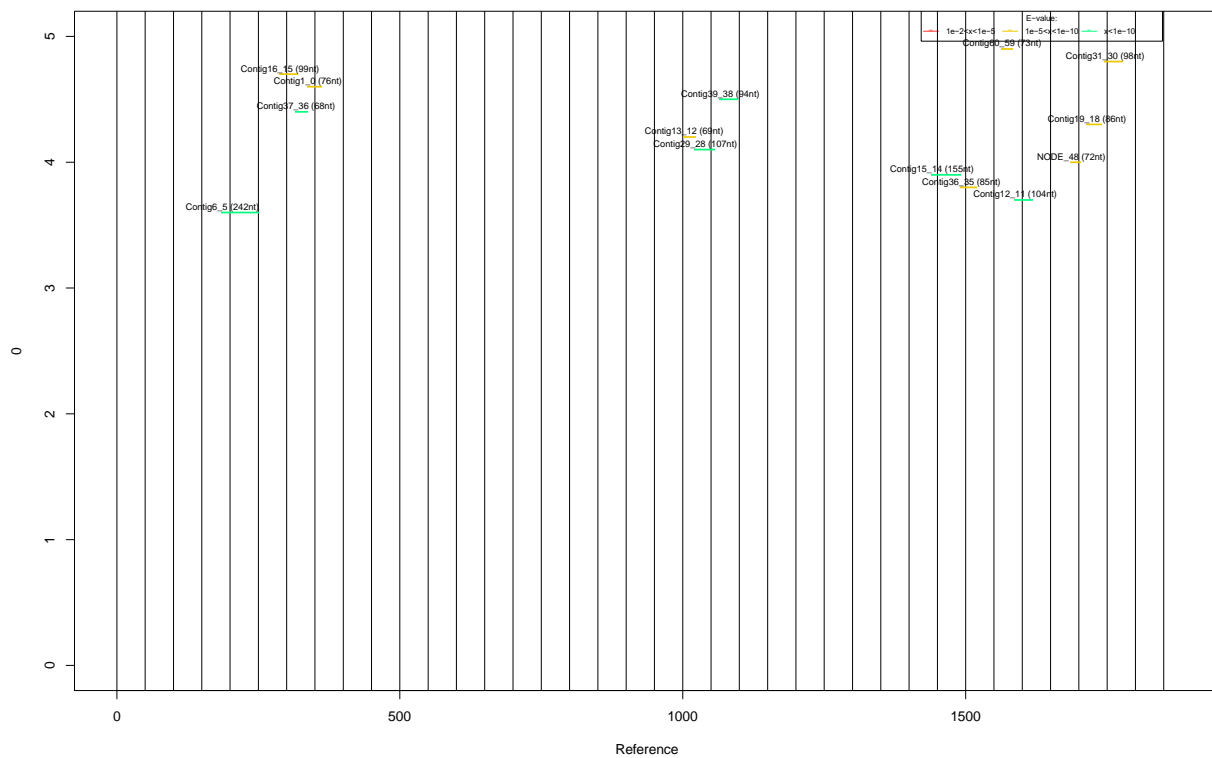
contigs X Grapevineasteroidmosaicassociatedvirus



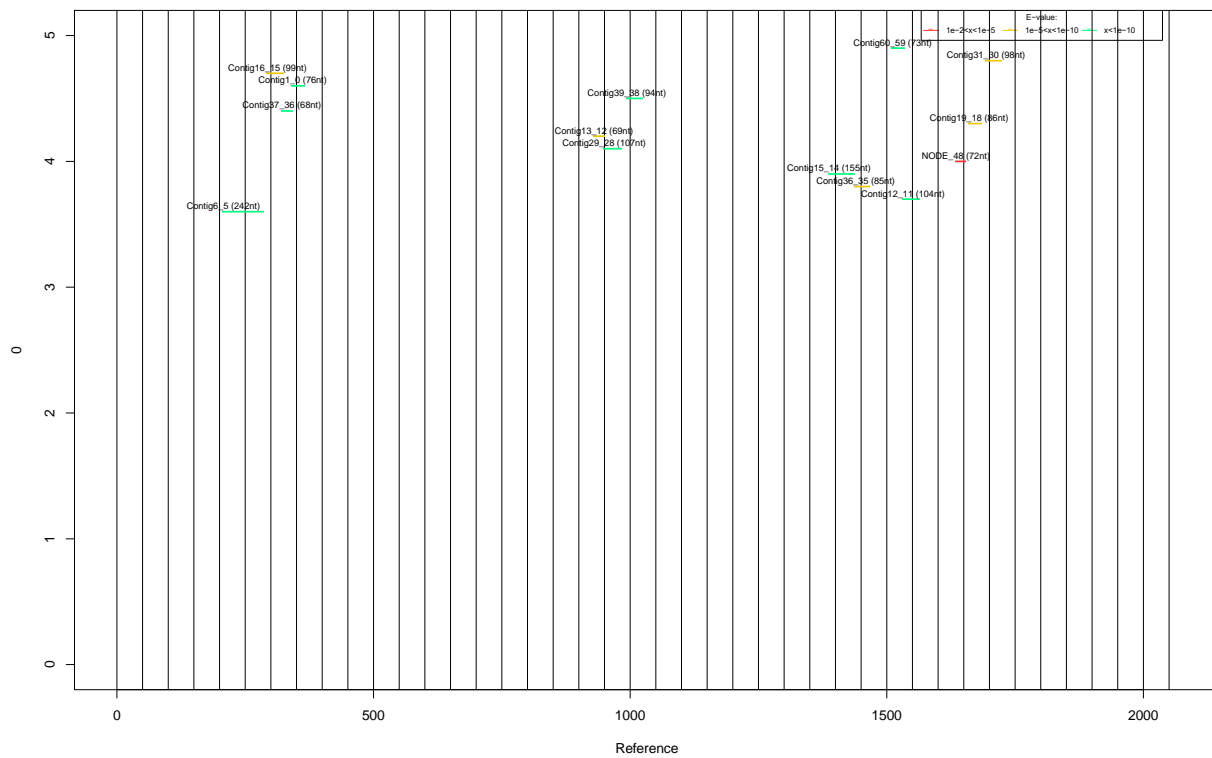
contigs X Grapevinefleckvirus



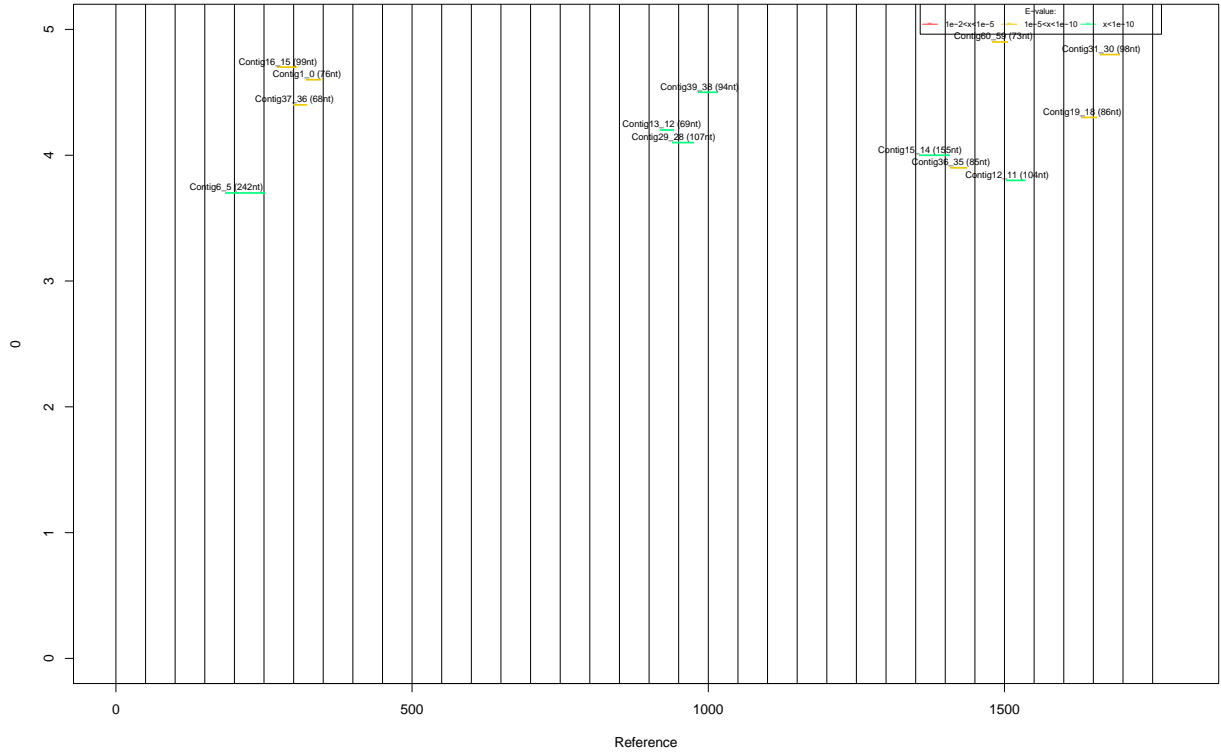
contigs X Kennedyyellowmosaicvirus



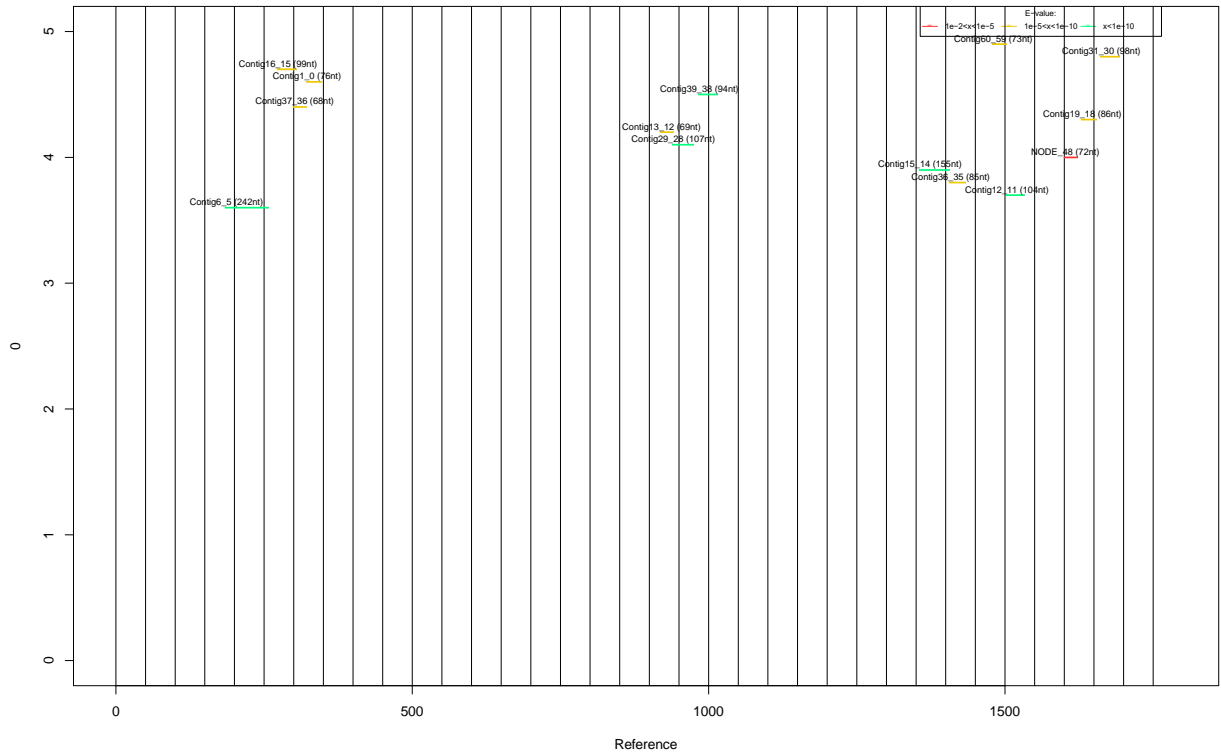
contigs X Oatbluedwarfvirus



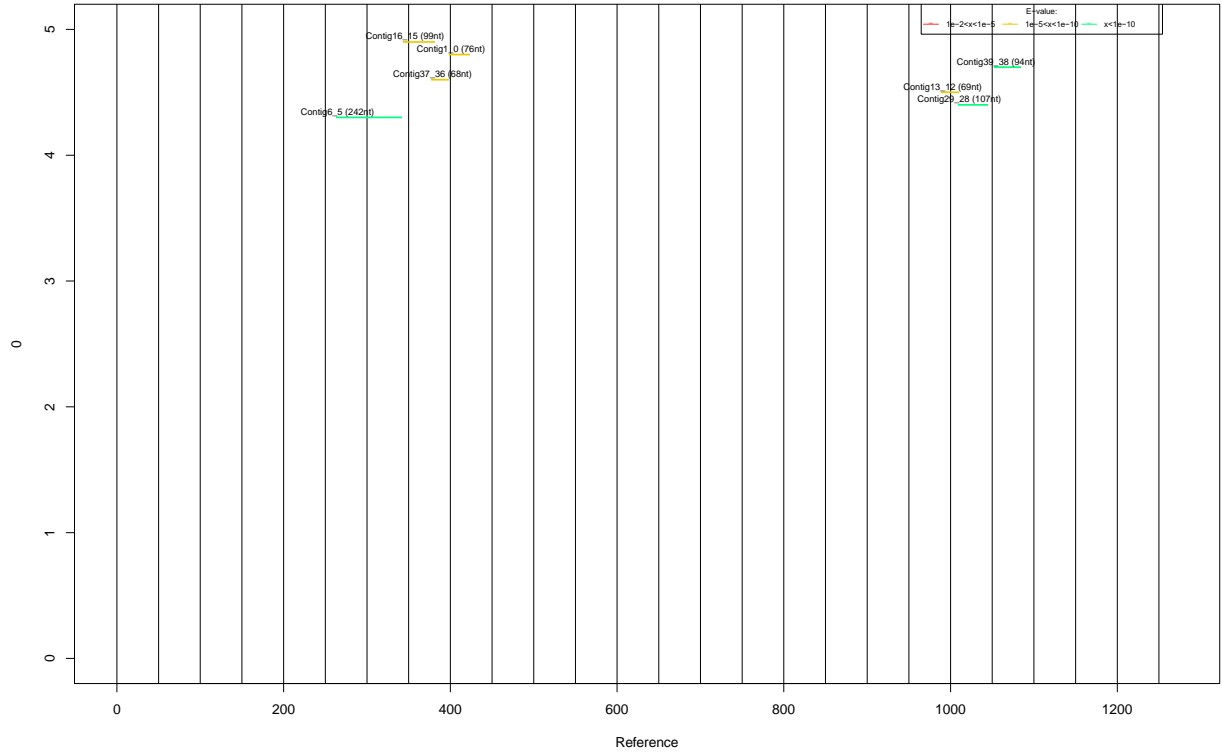
contigs X *Diasciayellowmottlevirus*



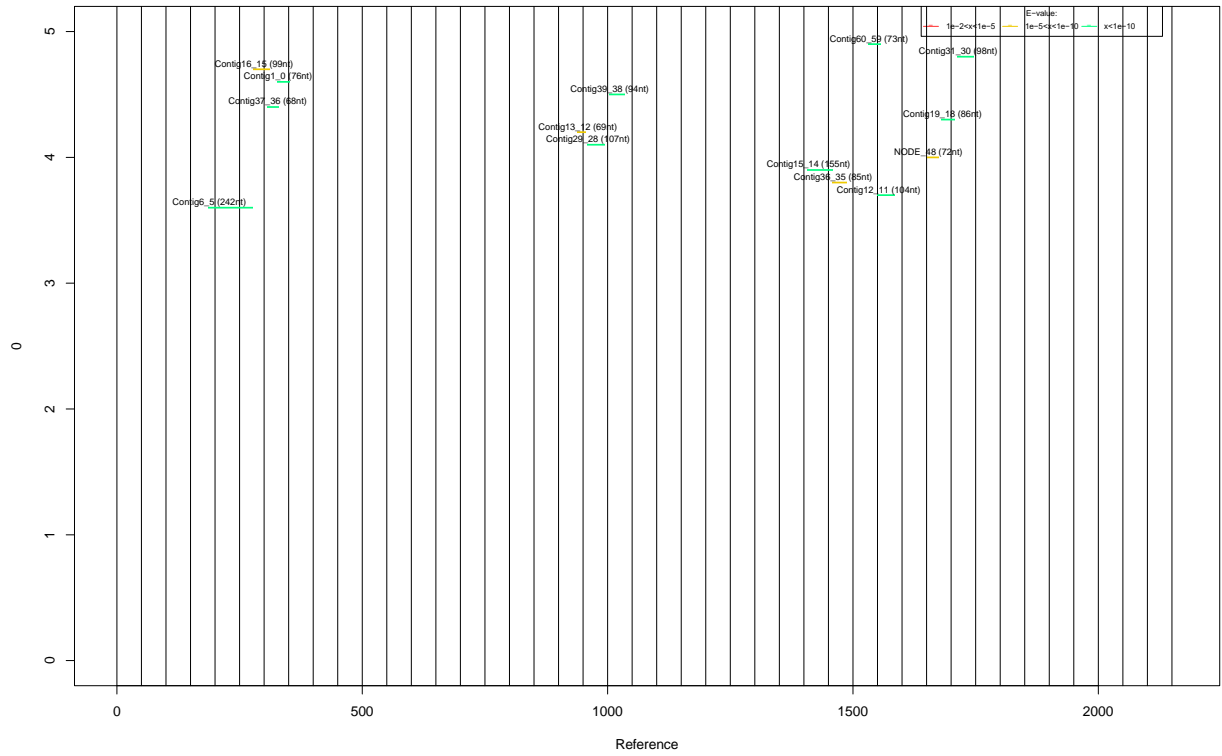
contigs X *Nemesiaringnecrosisvirus*



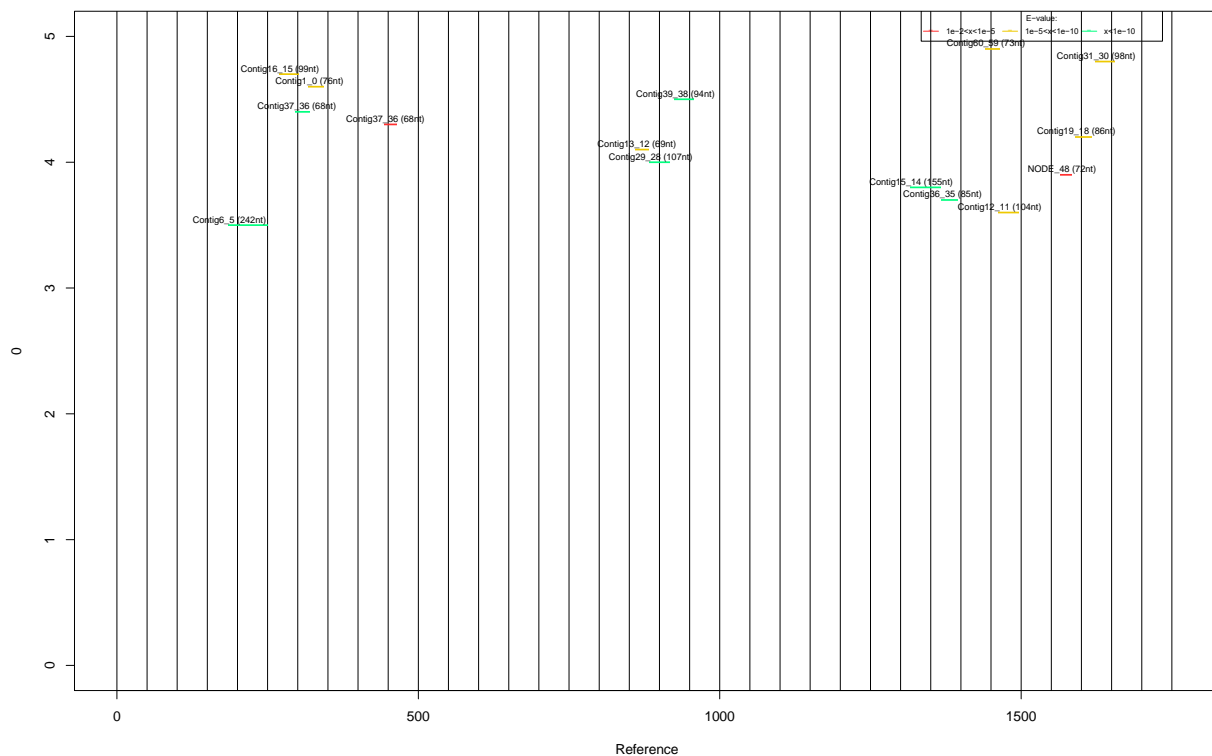
contigs X GrapevineSyrahvirus



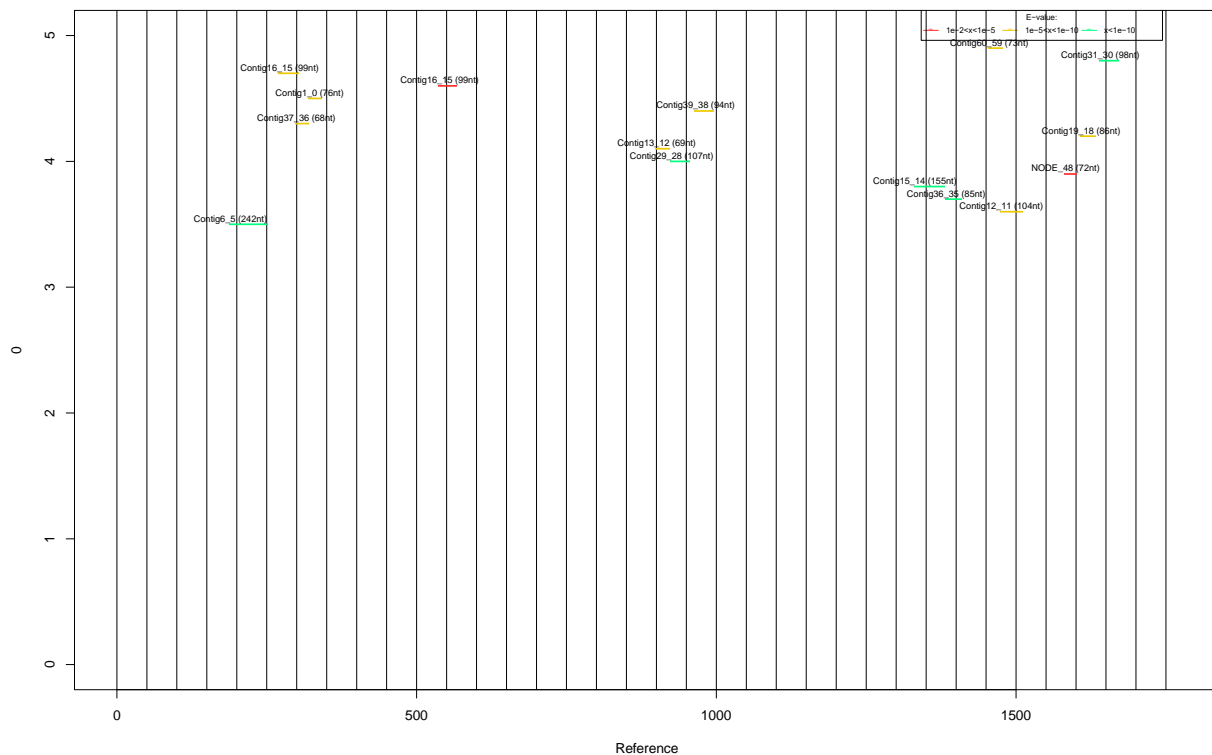
contigs X Figleckassociatedvirus



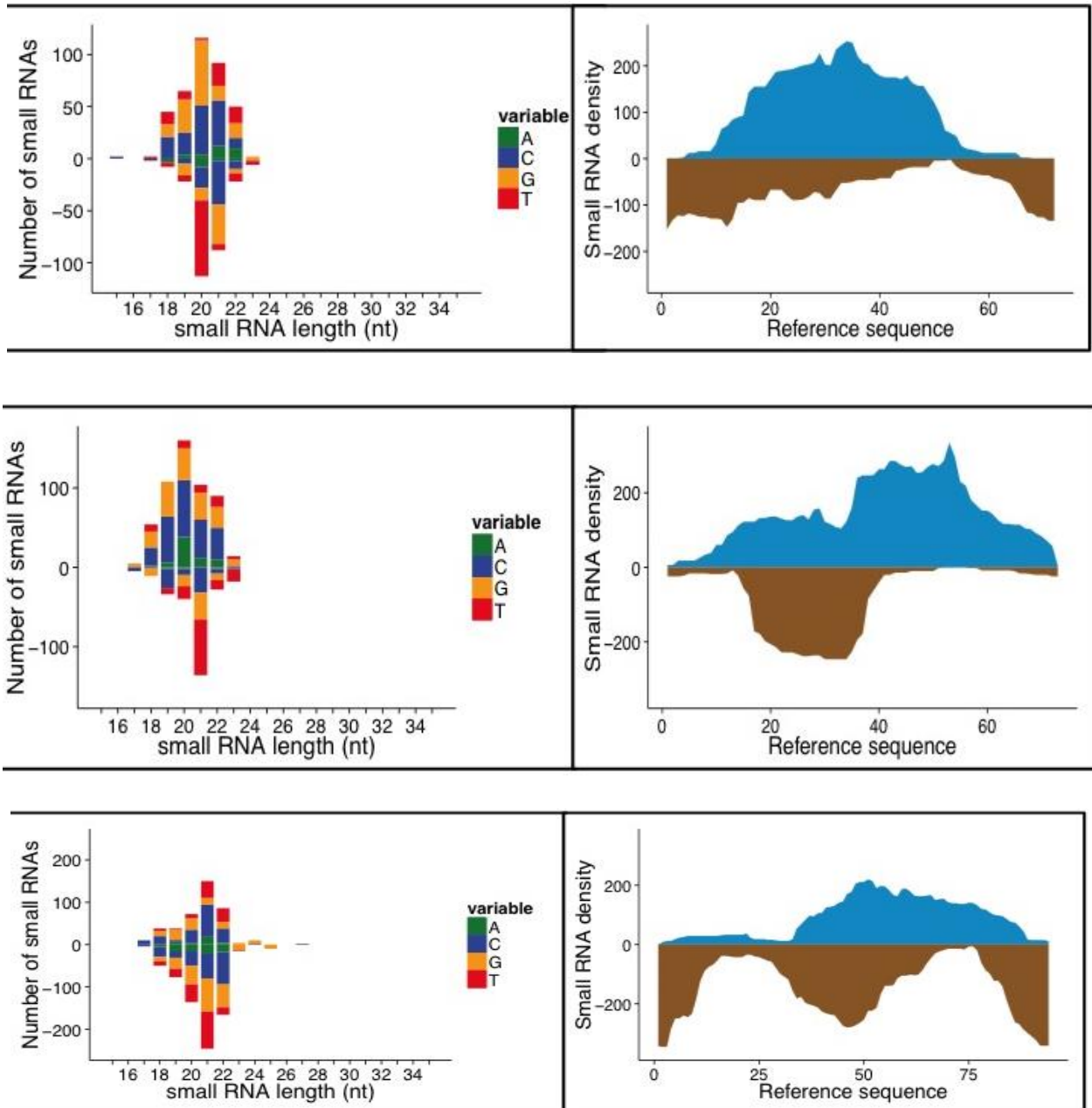
contigs X BombyxmoriMaculalikevirus

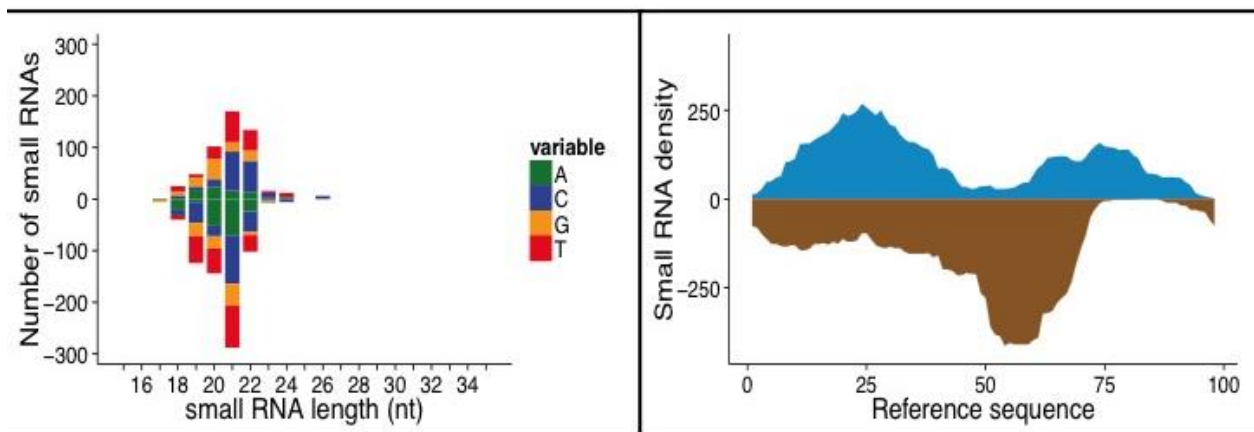
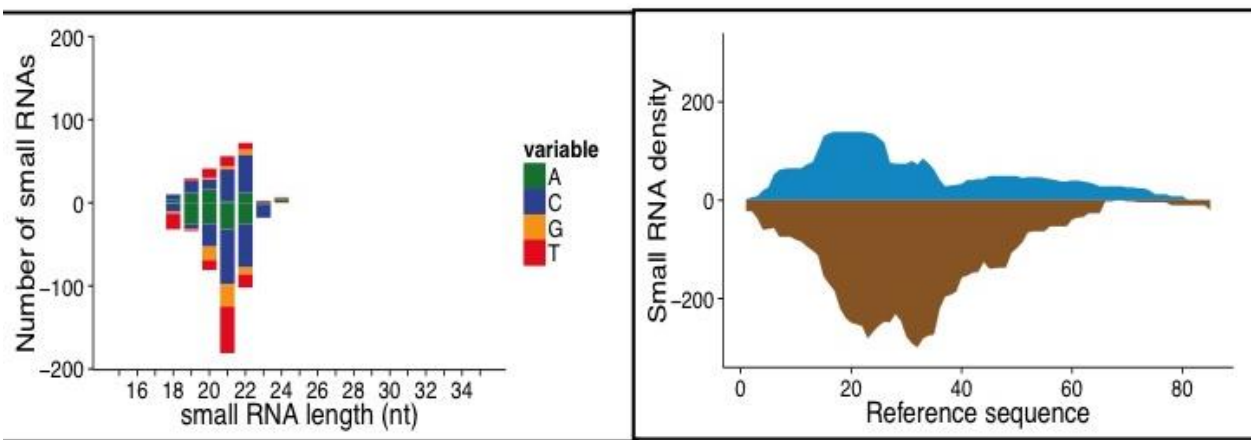
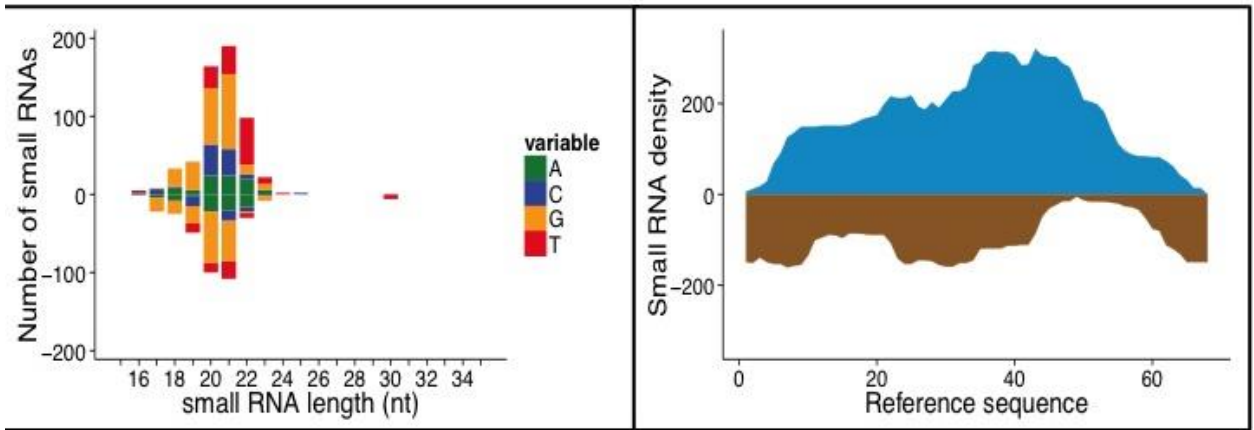


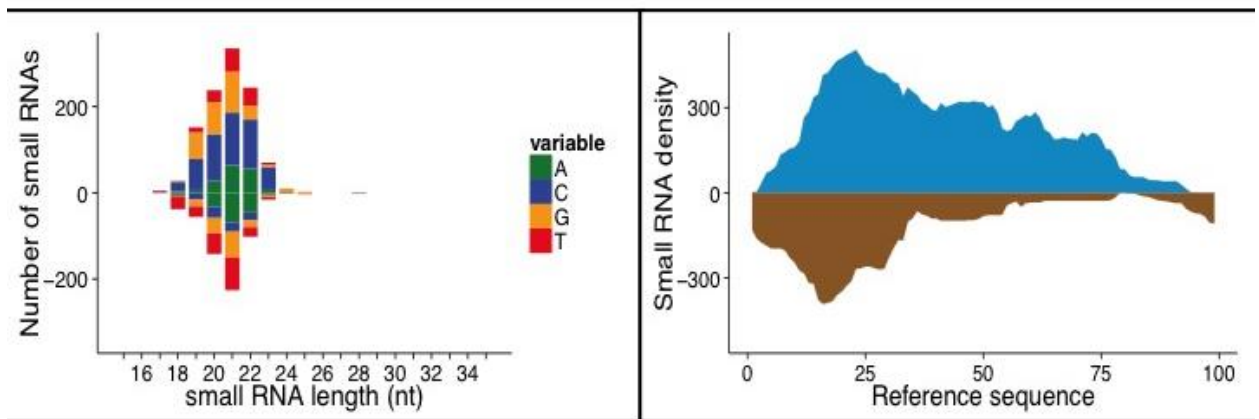
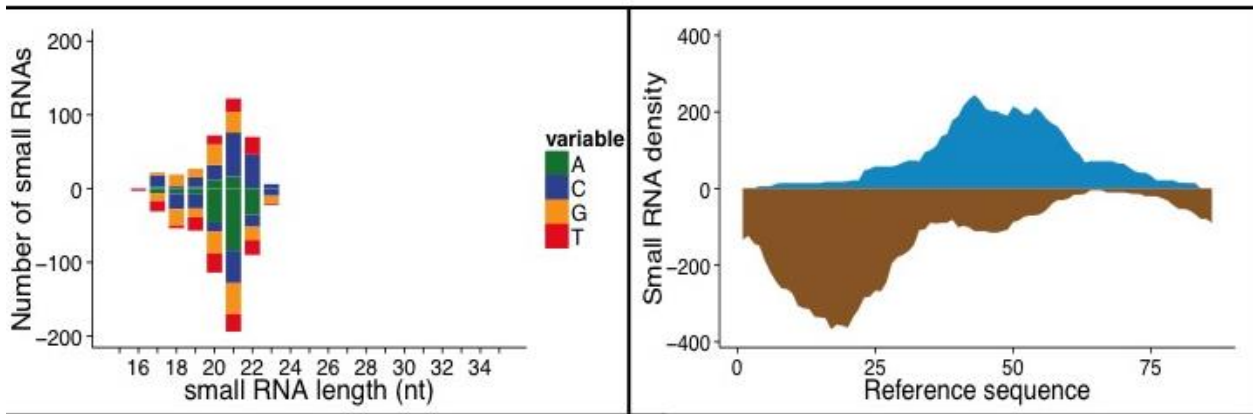
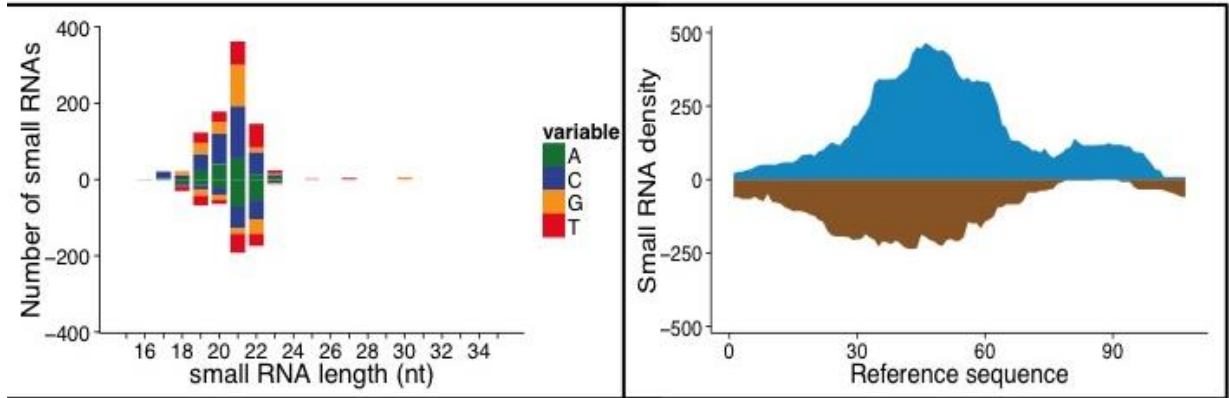
contigs X CulexorinatedTymoviridae-likevirus

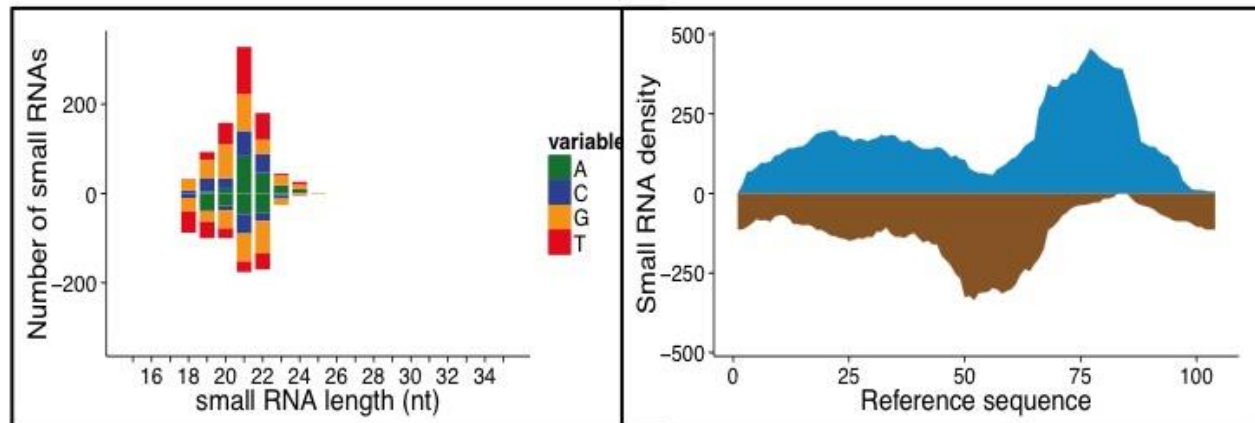
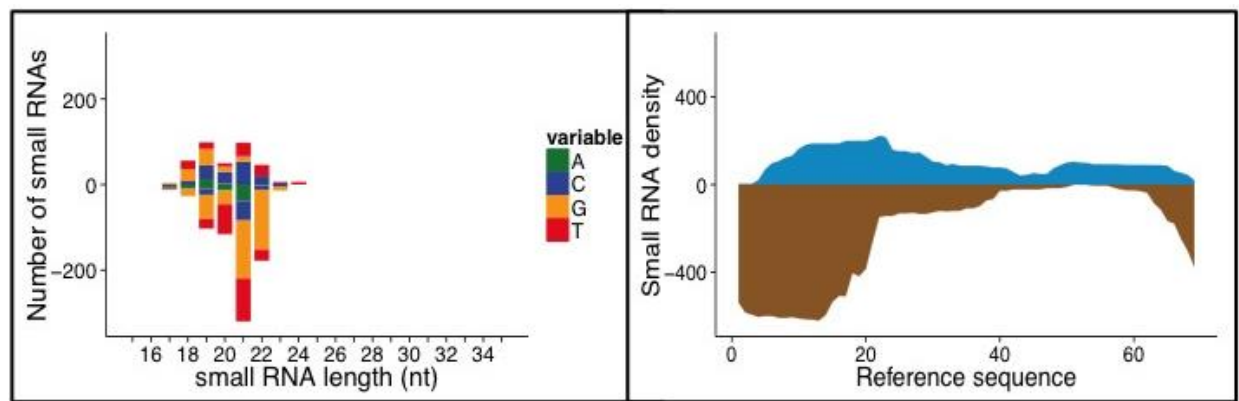
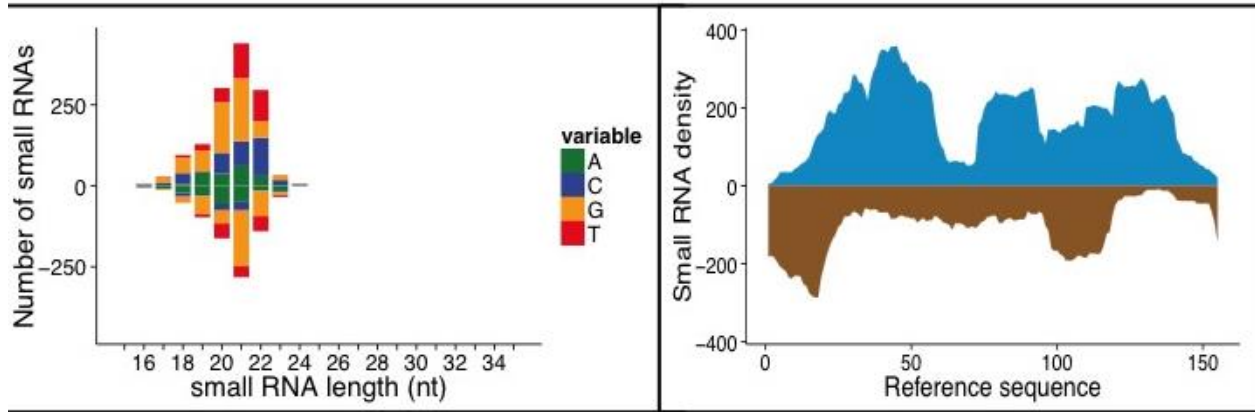


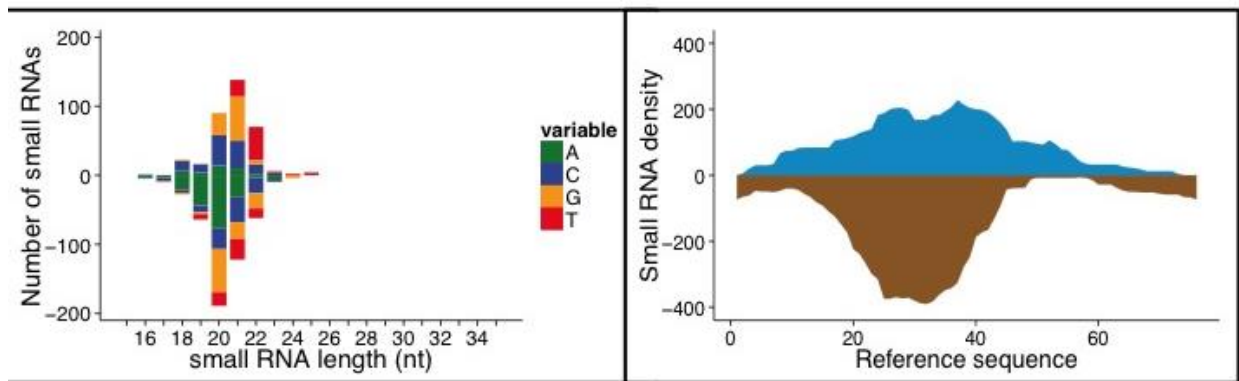
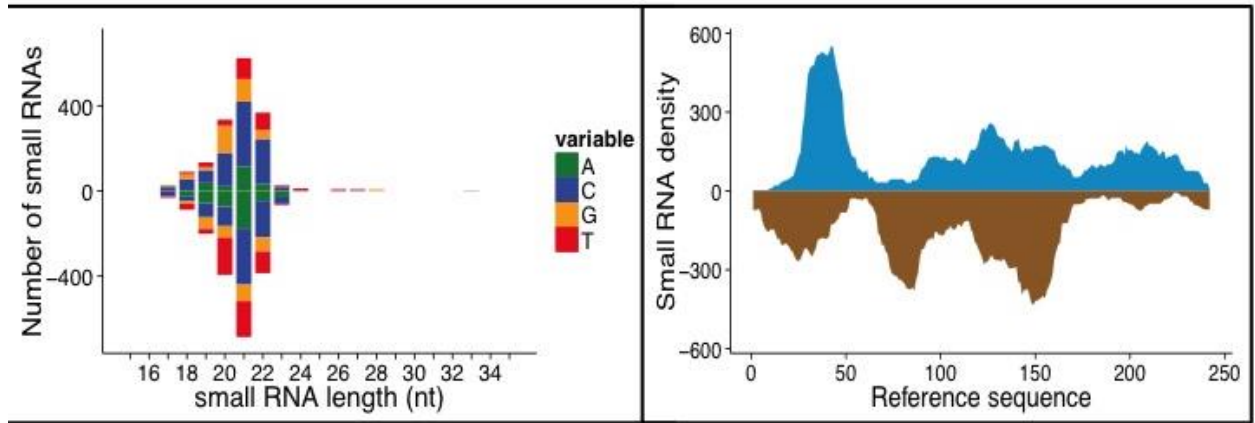
10.4. Densidade e perfil de pequenos RNAs para os *contigs* formados no sequenciamento





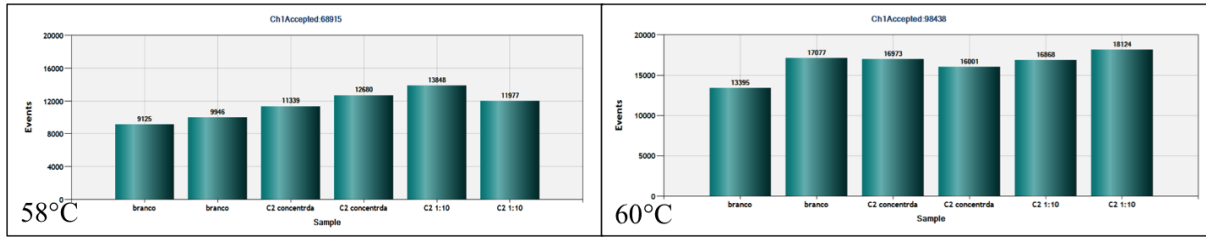
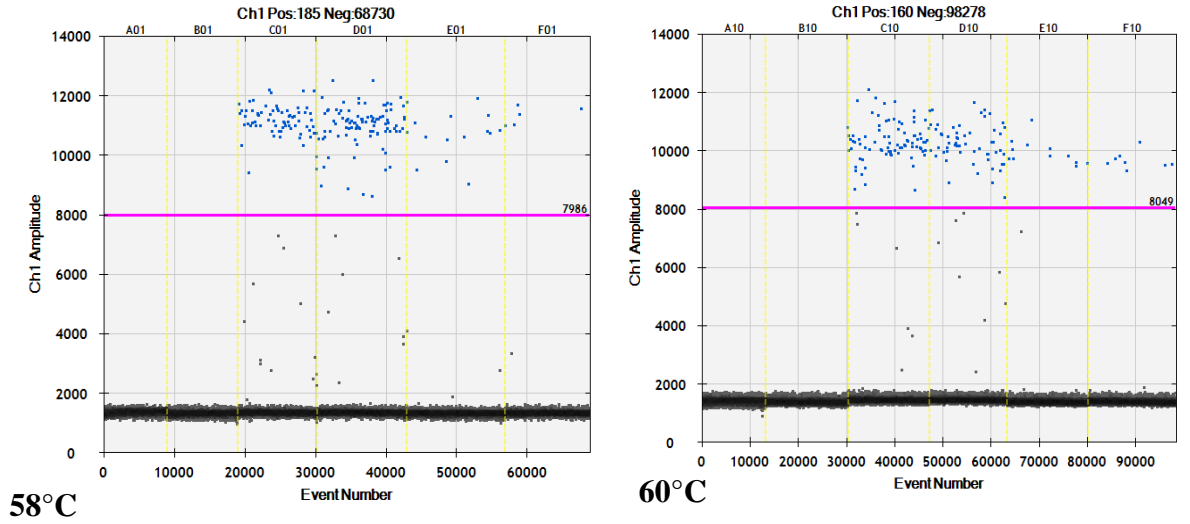




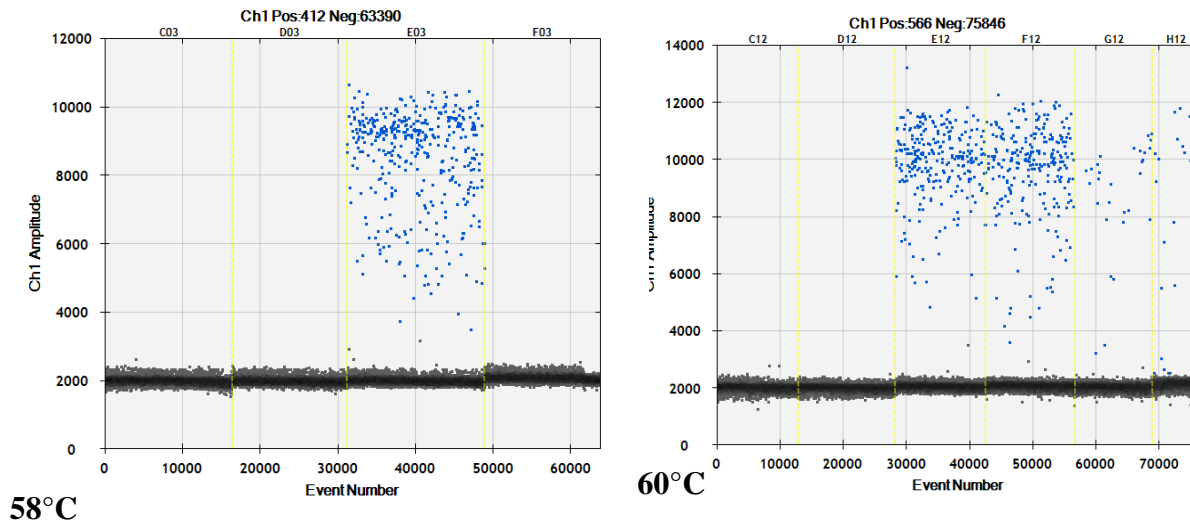


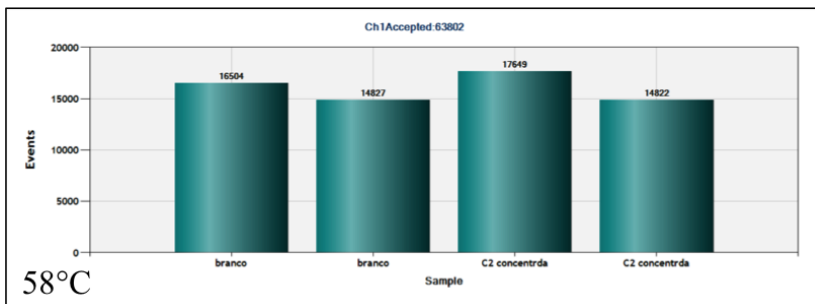
10.5. Perfil de amplificação da amostra C2 na ddPCR

1. Amplificação do *contig* 37_35_16_15

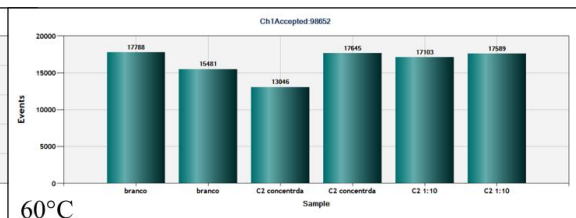
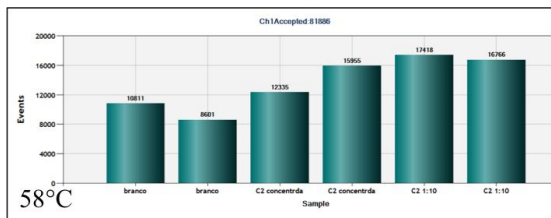
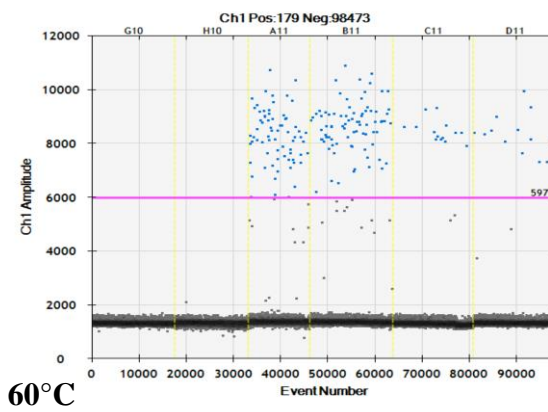
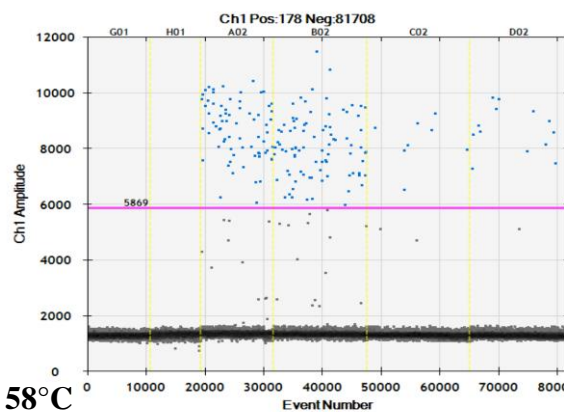


2. Amplificação do *contig* 15_14

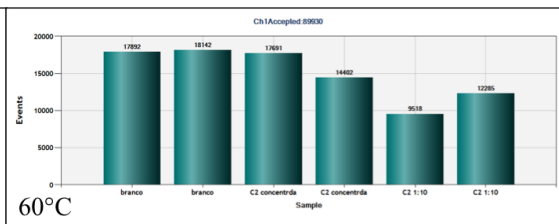
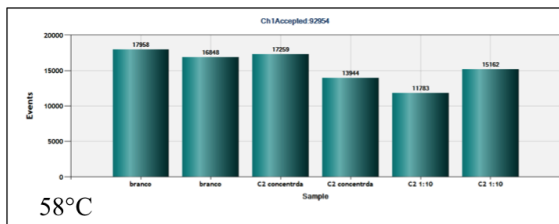
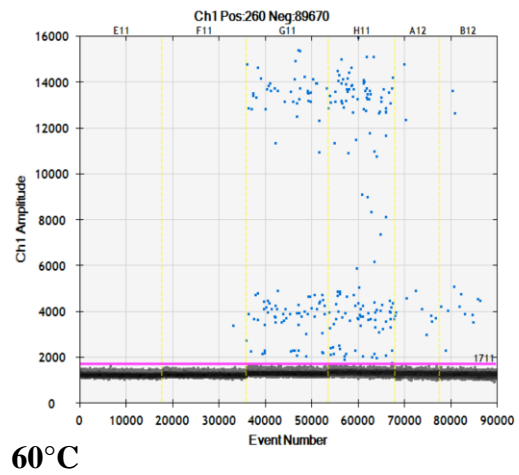
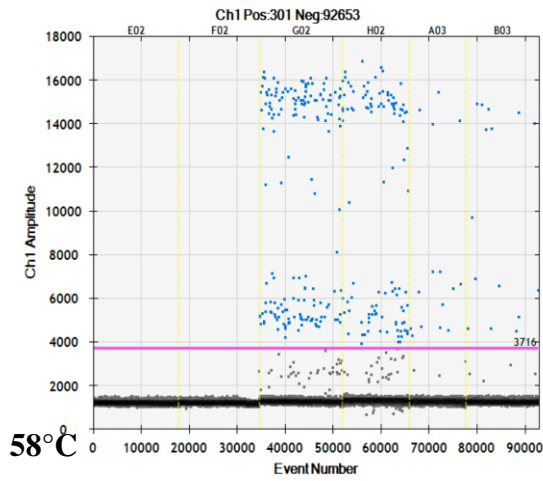




3. Amplificação do *contig* 12_11_60_59



4. Amplificação do *contig* 13_12_29_28



10.6. Produção científica e participação em eventos durante o período do Mestrado

Artigos científicos publicados

Cuadros-Orellana, S., Leite, L. R., Smith, A., Medeiros, J. D., Badotti, F., **Fonseca, P. L.C.**, ... & Góes-Neto, A. (2013). Assessment of fungal diversity in the environment using metagenomics: a decade in review. *Fungal Genomics & Biology*, 3(2), 1.

Artigos científicos aceitos para publicação

ALINE B.M. VAZ^{1,5}, **PAULA L.C. FONSECA**¹, LAURA R. LEITE³, FERNANDA BADOTTI⁴, ANNA C.M. SALIM³, FLAVIO M.G. ARAUJO³, SARA CUADROS - ORELLANA³, ÂNGELO A. DUARTE², CARLOS A. ROSA¹, GUILHERME OLIVEIRA⁶ & ARISTÓTELES GÓES-NETO^{1,7} (2016) USING NGS TO UNCOVER DIVERSITY OF WOOD-DECAYING FUNGI IN NEOTROPICAL ATLANTIC FORESTS. *Phytotaxa*.

Artigo científico submetido para publicação

Badotti, F.; Oliveira, F.S.; Garcia, C.F.; Vaz, A.B.M.; **Fonseca, P.L.C.**; Nahum, L.A.; Oliveira, G.; Góes-Neto, A. Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). *BMC Microbiology*.

Resumos enviado para o II Simpósio de Microbiologia (05 – 06 de outubro de 2015):

1. **FONSECA, P. L. C.**; XAVIER, A. G. ; MARTINS, P. M. ; TOME, M. L. M. R. ; Vaz, A. B. M. ; BADOTTI, F. ; SANTOS, V. L. ; Góes-Neto, Aristóteles . Mycota associated to native Hevea brasiliensis en the brazilian amazon region. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Resumos enviado para o III Simpósio de Microbiologia (05 – 06 de setembro de 2016):

1. **FONSECA, P. L. C.**; AGUIAR, E. R. G. R. ; MARTINS, P. M. ; TOMÉ ; SILVA, J. B. L. ; Vaz, A. B. M. ; BADOTTI, F. ; ABRAHAO, J. S. ; TRINDADE, J. M. ;

TRINDADE, G. D. S. ; Góes-Neto, Aristóteles . DETECÇÃO DE FITOPATÓGENOS EM *Hevea brasiliensis* POR SEQUENCIAMENTO DE PEQUENOS RNAs. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Resumos enviado para VIII Congresso Brasileiro de Micologia (03 – 06 de outubro de 2016):

1. **FONSECA, P. L. C.**; MARTINS, P. M. ; VAZ A. B. M. ; BADOTTI, F. ; ABRAHAO, J. S. ; TRINDADE, G. D. S. ; CHAVERRI, P. ; Góes-Neto, Aristóteles . MYCOVIRUS DETECTION AND IDENTIFICATION IN NATIVE RUBBER TREES (*Hevea brasiliensis*).
2. TOMÉ L. M. ; **FONSECA, P. L. C.** ; BADOTTI, F. ; VAZ, A. B. M. ; CHAVERRI, P. ; Góes-Neto, Aristóteles . DIVERSITY OF ENDOPHYTIC TRICHODERMA IN LEAVES AND STEMS OF WILD RUBBER TREES (*HEVEA BRASILIENSIS*) FROM THE EASTERN AMAZON: DNA BARCODE AND PHYLOGENETIC ANALYSES.
3. BADOTTI, F. ; OLIVEIRA, F. S. ; GARCIA, C. ; VAZ, A. B. M. ; **FONSECA, P. L. C.** ; OLIVEIRA, G. ; NAHUM, L.A. ; GÓES-NETO, A. EFFECTIVENESS OF ITS, ITS1 AND ITS2 AS DNA BARCODE MARKERS FOR THE IDENTIFICATION OF BASIDIOMYCOTA SPECIES.

Cursos nacionais

1. I Curso de inverno de Bioinformática. (Carga horária: 23h). Universidade Federal de Minas Gerais. (2016).
2. Academic English Writing: from e-mails to abstracts. (Carga horária: 64h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil. (2015).

Cursos internacionais

1. Macromicetos: seleção, produção e aplicação de enzimas e metabólitos. (Carga horária: 96h). Universidade de Caxias do Sul, UCS, Brasil. (2015). Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia (CBAB). Curso 16.

Participação em congressos

VIII Congresso Brasileiro de Micologia. (2016)

III Simpósio de Micobiologia da UFMG. (2016)

Simpósio Fostotanolamina em Foco. (2016)

XXVI Brazilian Congress of Virology & X Mercosur Meeting of Virology. (2015)

II Simpósio de Microbiologia da UFMG (2015)

11. Apoio

1. *National Science Foundation* - NSF
2. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -CAPES