



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

ROZE LORRAINE SALDANHA

**“DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE
Botryosphaeria E A PRODUÇÃO DE LACASES,
PECTINASES E β -1,3-GLUCANASES”**

Londrina
2006



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agronômico do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ROZE LORRAINE SALDANHA

**“DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE
Botryosphaeria E A PRODUÇÃO DE LACASES,
PECTINASES E β -1,3-GLUCANASES”**

Londrina
2006

ROZE LORRAINE SALDANHA

**“DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE
Botryosphaeria E A PRODUÇÃO DE LACASES,
PECTINASES E β -1,3-GLUCANASES”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Aneli de Melo Barbosa.

Co-orientador: Prof. Dr. José Eduardo Garcia.

Londrina
2006

ROZE LORRAINE SALDANHA

**“DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Botryosphaeria*
E A PRODUÇÃO DE LACASES, PECTINASES E
 β -1,3-GLUCANASES”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dr^a **Aneli de Melo Barbosa**
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a Dr^a **Leda Maria K. Sodré**
Universidade Estadual de Londrina

Prof^a Dr^a **Rosane Marina Peralta**
Universidade Estadual de Maringá

Londrina, 13 de fevereiro de 2006.

Ao meu querido filho Nathan, recém vindo
ao mundo e razão de todo meu empenho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de toda sabedoria e mestre dos mestres.

Ao Edward, pelo amor, paciência, respeito e compreensão.

À minha mãe Janet, pelo estímulo, amor e por tudo que representa em minha vida.

À Prof^a Dr^a Aneli de Melo Barbosa, pela orientação neste trabalho, por estar ao meu lado com dedicação e paciência me ensinando lições de ciência e ética.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Garcia, pela co-orientação deste trabalho, pelo carinho, paciência e amizade durante estes 2 anos de crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Robert Dekker, Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas-Bôas, Prof^a Dr^a Maria Inês e Prof^a Dr^a Leda pelas valiosas sugestões e informações fornecidas durante este trabalho.

À Prof^a Dr^a Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, por ceder gentilmente tempo e aparelhos indispensáveis à realização deste trabalho.

À Ellen Giese e Luiz Gustavo Covizzi, pela prestatividade e imensa boa vontade em compartilhar informações importantíssimas.

Às amigas e companheiras Ana Paula e Mônica pela disponibilidade e ajuda na execução do trabalho laboratorial.

Ao amigo Nelson, pela agradável companhia e ajuda técnica, pelos momentos de descontração e apoio durante todo este trabalho.

Aos queridos amigos de laboratório: Ellen, Luiz Gustavo, Ana Flora, Eveline, Mônica, Ana Paula, Flávio, Raquel, que me proporcionaram a alegria diária de um ambiente agradável de trabalho.

Aos meus queridos amigos de mestrado: Magda, Vivian, Francine, Rodrigo, Eduardo, Nelci, Tatiana, Renata, Ronaldo, Sandra, Viviane, Daniele, Maria Paula, Andréa, pelo carinho, pela compreensão, força e paciência compartilhada durante estes meses de estudo.

Às queridas secretárias Sueli e Elda, por sempre atender-nos com alegria e disposição.

Às bibliotecárias Ilza e Lau pela paciência...

Às amigas Maria Luiza e Lurdes Frisanco, pela fraternidade embutida em cada minuto de nossa amizade.

Aos que não fizeram parte do mestrado, mas estiveram presentes com muito amor e carinho, incentivando e compartilhando minhas alegrias e tristezas durante estes dois anos.

À Universidade Estadual de Londrina – UEL.

SALDANHA, Roze Lorraine. **Genetic Diversity of *Botryosphaeria* isolates and production of laccases, pectinases and β -1,3-glucanases.** 2005. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

ABSTRACT

Eight Brazilian isolates of *Botryosphaeria* (anamorphs and teleomorphs) and one Australian strain of *Botryosphaeria rhodina* (isolate MAMB-05, used as a reference), were evaluated for their growth and the production of the enzymes: laccases, pectinases and β -1,3-glucanases, when grown on basal medium in the absence and presence of the laccase inducer, veratryl alcohol (VA). The genetic relationship among the 9 isolates collected from different host plants (fruits, leaves, woods and legume) was determined based on Internal Transcribed Spacer (ITS) sequence and Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) data. ITS sequence analysis showed eight closely related isolates classified as *B. rhodina* and its anamorph *Lasiodiplodia theobromae*, and one isolate that was out of the main cluster, identified as *B. ribis*. RAPD analysis resolved the isolates into 2 main clusters, one constituted by four isolates with high polymorphism (Group-I), and a second (3 isolates) without polymorphism (Group-II). Strains belonging to Group-I produced higher levels of constitutive and inducible laccase, as well as β -1,3-glucanase; whereas the Group-II strains produced lower levels of these enzymes. It appeared to have no correlation between pectinase production and genetic diversity among the nine isolates. However, the strain characterized as *B. ribis*, which was positioned out of the main cluster, was found to be the highest producer of pectinases in the presence of VA.

Keywords: *Botryosphaeria*; Laccases; Pectinases; β -1,3-Glucanases; Polymorphism; RAPD.

SALDANHA, Roze Lorraine. **Diversidade genética de isolados de *Botryosphaeria* e a produção de lacases, pectinases e β -1,3-glucanases**. 2005. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2006.

RESUMO

Oito isolados Brasileiros de *Botryosphaeria* (anamorfos e teleomorfos) e uma linhagem Australiana de *Botryosphaeria rhodina* (isolado MAMB-5 usado como referência), foram avaliados quanto ao crescimento e a produção das enzimas: lacases, pectinases e β -1,3-glucanases, após ter sido cultivado em meio basal na ausência e presença do indutor de lacase, álcool veratrílico (AV). A similaridade genética entre os 9 isolados, coletados de diferentes frutas, folhas, madeiras e legume, foi determinada baseando-se nos resultados da seqüência do Espaço Interno Transcrito (ITS) e nos dados **do Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso (RAPD)**. A análise das seqüências do ITS mostrou oito isolados mais próximos, classificados como *B. rodhina* e sua forma anamorfa *Lasiodiplodia theobromae*, e um isolado fora dos agrupamentos, identificado como *B. ribis*. As análises do RAPD permitiram a formação de dois grupos principais, sendo um constituído por quatro isolados, **com alto grau de variação genética (Grupo-I) e um segundo grupo composto por 3 isolados, com perfis eletroforéticos idênticos (Grupo-II)**. As linhagens pertencentes ao Grupo-I produziram maiores níveis de lacases constitutivas e indutivas, como também de β -1,3-glucanases, enquanto que as do Grupo-II produziram menores níveis destas enzimas. Parece não existir correlação entre produção de pectinase e diversidade genética entre os nove isolados. Entretanto, o isolado caracterizado como *B. ribis*, o qual foi posicionado fora dos agrupamentos, foi o melhor produtor de pectinase na presença de AV.

Palavras-chave: *Botryosphaeria*; lacases; pectinases; β -1,3-glucanases; polimorfismo; RAPD.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1	- Esquema geral sobre a hipótese do papel do AV na regulação da síntese de celulase, lacase, xilanase e pectinase por <i>Botryosphaeria rhodina</i>	28
Figura 2	- Esquema da estrutura molecular dos monômeros de lignina.....	32
Figura 3	- Estrutura química da pectina.....	37
Figura 4	- Diferentes tipos de substâncias pécticas e enzimas envolvidas na sua degradação.....	37
Figura 5	- Esquema estrutural do EPS botriosferana, secretado pelo <i>Botryosphaeria rhodina</i>	45
Figura 6	- Representação esquemática da hidrólise da β -1,3-D-Glucana por β -1,3-gluconases.....	46
Figura 7	- Representação esquemática da organização das unidades do DNA ribossomal no genoma fúngico e dos <i>primers</i> universais ITS1 e ITS4.....	53

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Figura 8** - Perfil comparativo da produção de lacases constitutivas (na ausência de AV) pelos isolados de *Botryosphaeria* nos estágios teleomorfo e anamorfo. Substratos utilizados para a determinação da atividade de lacase: ABTS e DMP, nas condições de ensaio descritas no item (4.5.1)..... 76
- Figura 9** - Perfil comparativo da produção de lacases indutiva (na presença de AV) pelos isolados de *Botryosphaeria* nos estágios teleomorfo e anamorfo. Substratos utilizados para a determinação da atividade de lacase: ABTS e DMP, nas condições de ensaio descritas no item (4.5.1)..... 77
- Figura 10** - Perfil comparativo da produção de pectinases pelos isolados de *Botryosphaeria* nos estágios teleomorfo e anamorfo, cultivados na ausência (s/AV) e na presença (c/AV) de álcool veratrílico. Substrato utilizado para a determinação da atividade de pectinase: Pectina 1%, nas condições de ensaio descritas no item (4.5.2)..... 80
- Figura 11** - Perfil comparativo da produção de β -1,3-glucanases pelos isolados de *Botryosphaeria* nos estágios teleomorfo e anamorfo, cultivados na ausência (s/AV) e na presença (c/AV) de álcool veratrílico. Substrato utilizado para a determinação da atividade de β -1,3-glucanases: Laminarina 0,4%, nas condições de ensaio descritas no item (4.5.2)..... 84
- Figura 12** - Alinhamento das seqüências de DNA dos isolados de *Botryosphaeria*, correspondente ao intervalo compreendido na posição 16 a 177, 336 a 470 respectivamente, da região ITS1-5,8S-ITS2..... 90
- Figura 13** - Dendrograma de similaridade genética dos isolados de *Botryosphaeria* baseado nas seqüências de ITS1-5.8Sgene-ITS2 92
- Figura 14** - Amplificação de DNA polimórfico de 9 isolados de *Botryosphaeria* utilizando o *primer* OP-W2 (Operon). As linhas de 1 a 9 correspondem aos isolados: *B. rh.*, *B. ribis*, *L.th.Cur.*, *L.th.Ber.*, *L.th.Grav.*, *L.th.Lar.*, *L.th.M.Fo.*, *L.th.M.Fru* e *L.th.Pi* respectivamente. 1 KB DNA Ladder-plus (Invitrogen Life Technologies) foi usado como marcador de peso molecular (M)... 93
- Figura 15** - Similaridade genética entre os 9 isolados de *Botryosphaeria*. O dendrograma UPGMA foi baseado no índice de similaridade de Jaccard (JS)..... 93

LISTA DE TABELAS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

- Tabela 1** - Códigos dos microrganismos em seu estágio teleomorfo e anamorfo isolados de diferentes partes e espécies vegetais..... 64

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Tabela 2** - Avaliação da produção de biomassa fúngica, proteínas extracelulares e variação de pH nos cultivos dos isolados de *Botryosphaeria* em seus estágios anamorfos e teleomorfos, na ausência (s/AV) e na presença (c/AV) de álcool veratrílico..... 85
- Tabela 3** - Avaliação dos açúcares redutores e totais residuais nos cultivos dos isolados de *Botryosphaeria* em seus estágios anamorfos e teleomorfos, na ausência (s/AV) e na presença (c/AV) de álcool veratrílico..... 88
- Tabela 4** - Matriz de similaridade genética dos isolados fúngicos de *Botryosphaeria*..... 94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	- 2,2 ¹ ácido azino bis (3 - etilbenzotiazoline-6-sulfônico)
AV	- Álcool Veratrílico
BDA	- Batata-dextrose-ágar
C/AV	- Presença de álcool veratrílico
CCD	- Cromatografia de camada delgada
DMP	- 2,6-dimetoxifenol
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
DNTP'S	- Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
Endo-PG	- Poligalacturonases
Endo-PGL	- Pectato liase
EPS	- Exopolissacarídeo
Exo-PG-1	- Galacturonana 1,4- α -galacturonidase
Exo-PG-2	- Exo-poly- α -galacturonosidase
Exo-PGL	- Pectato dissacarídeo liase
H₂O₂	- Peróxido de hidrogênio
IGS	- Espaço intergênico
ITS	- Espaço interno transcrito
Li-P	- Lignina peroxidase
Mn-P	- Manganês peroxidase
NCBI	- Centro Nacional de Informação em Biotecnologia
OGL	- Oligogalacturônico liase
PAE	- Acetil esterase
PCR	- Reação de Polimerase em Cadeia
PG	- Poligalacturonases
PL	- Pectinaliase
PME	- Pectina metil-esterase
PMG	- Polimetilgalacturonidase
RAPD	- Polimorfismo do DNA amplificado ao acaso
RDNA	- DNA ribossômico
S/AV	- Ausência de álcool veratrílico
UV	- Ultravioleta
VA	- Veratryl alcohol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	FUNGOS DO GÊNERO <i>Botryosphaeria</i> : ASPECTOS GERAIS.....	21
2.2	DE <i>Botryosphaeria</i> sp. à <i>Botryosphaeria rhodina</i>	26
2.3	ENZIMAS DE IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA.....	31
2.3.1	Lacases.....	31
2.3.2	Pectinases.....	36
2.3.3	β -1,3-Glucanases.....	44
2.4	MÉTODOS MOLECULARES UTILIZADOS EM FUNGOS FILAMENTOSOS.....	51
2.4.1	Identificação molecular por meio do DNA ribossomal (rDNA)...	52
2.4.2	Polimorfismo Genético de Microrganismos Utilizando o RAPD- PCR e sua Correlação com Características individuais.....	58
3	OBJETIVOS.....	63
3.1	GERAL.....	63
		OBJETIVO
3.2	ESPECÍFICOS.....	63
		OBJETIVOS

4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	64
4.1	MICROORGANISMOS.....	64
4.2	PREPARO DO INÓCULO.....	65
4.3	CULTIVO EM MEIO SUBMERSO.....	65
4.4	INTERRUPÇÃO DOS CULTIVOS.....	66
4.5	ENZIMÁTICAS.....	DETERMINAÇÕES 66
4.5.1	Determinação da Atividade de Lacase.....	66
4.5.2	Determinação da Atividade de Pectinases e β-1,3-Glucanases...	67
4.6	ANALÍTICAS.....	DETERMINAÇÕES 67
4.7	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	68
4.8	QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO.....	69
4.9	AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS1-5.8SGENE-ITS2 DO rDNA.....	70
4.10	SEQÜENCIAMENTO DAS REGIÕES ITS1 – 5.8S - ITS2 DO rDNA.....	71
4.11	ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DAS REGIÕES ITS1 – 5.8S - ITS2.....	72
4.12	ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE DNA AMPLIFICADO AO ACASO (RAPD)....	73
4.13	ANÁLISE DOS DADOS.....	74

5	RESULTADOS	E	75
DISCUSSÃO.....			
5.1	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASES CONSTITUTIVAS E INDUTIVAS PELOS DIFERENTES ISOLADOS DE <i>Botryosphaeria</i>.....		75
5.2	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PECTINASES PELOS DIFERENTES ISOLADOS DE <i>Botryosphaeria</i> NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE ÁLCOOL VERATRÍLICO.....		79
5.3	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE B-1,3-GLUCANASES PELOS DIFERENTES ISOLADOS DE <i>Botryosphaeria</i> NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE ÁLCOOL VERATRÍLICO.....		81
5.4	COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS, BIOMASSA FÚNGICA E DA VARIAÇÃO DE pH, NOS CULTIVOS DOS ISOLADOS DE <i>Botryosphaeria</i>, NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE ÁLCOOL VERATRÍLICO.....		84
5.5	COMPARAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES E TOTAIS RESIDUAIS NOS CULTIVOS DOS DIFERENTES ISOLADOS DE <i>Botryosphaeria</i>, NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE ÁLCOOL VERATRÍLICO.....		87
5.6	ANÁLISE DO SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1-5,8SGENE-ITS2 EM ISOLADOS DE <i>Botryosphaeria</i>.....		88
5.7	ANÁLISE DE RAPD DOS 9 ISOLADOS FÚNGICOS E COMPARAÇÃO COM PRODUÇÃO DE ENZIMAS.....		92
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....		98
	REFERÊNCIAS.....		99
	ARTIGO.....		114

1 INTRODUÇÃO

Muitos microrganismos são encontrados na natureza como degradadores de matéria orgânica e possuem um importante papel na reciclagem de nutrientes para o meio ambiente. Estes microrganismos possuem enzimas específicas que os capacitam a degradar os componentes básicos da parede celular vegetal.

Os fungos filamentosos, especialmente os isolados de *Botryosphaeria*, representam um grupo com ampla distribuição mundial, podendo causar danos em diversas madeiras comerciais, árvores frutíferas e ornamentais. Sua fitopatogenicidade é caracterizada por lesões necróticas no tronco e nos galhos, com intensa produção de gomose, levando à morte progressiva do ápice das árvores, denominado *dieback*.

Por se tratar de um microrganismo com duplo estágio de propagação em seu ciclo de vida, fungos da família Botryosphaeriaceae podem ser encontrados tanto no estágio anamorfo (assexuado), denominado *Lasiodiplodia theobromae* ou *Botryodiplodia theobromae*, quanto no estágio teleomorfo (sexuado), denominado *Botryosphaeria*.

Um *Botryosphaeria* sp (MAMB-5) isolado de cancro de eucalipto e recentemente identificado como *B. rhodina*, foi caracterizado quanto à produção enzimática, como: ligninolítico, pectinolítico, glucanolítico, celulolítico, hemicelulolítico, amilolítico e inulinolítico, na presença e na ausência de álcool veratrílico (AV). Outros dois isolados de *Botryosphaeria* (*Botryosphaeria ribis* e *Lasiodiplodia theobromae*) também foram produtores de lacases constitutiva

(ausência de AV) e indutiva (presença de AV). A análise eletroforética de marcadores protéicos intracelulares (esterases e fosfatases) e lacases, indicaram que as três espécies fúngicas foram geneticamente distintas para os marcadores esterases e fosfatases e similares para os marcadores de lacases, apresentados nos zimogramas.

A produção de enzimas como lacases, celulases, hemicelulases, pectinases e as β -1,3-glucanases, apresenta forte indício do envolvimento delas no processo de fitopatogenicidade por este gênero. Por outro lado, embora estes microrganismos constituem graves problemas para a agricultura e horticultura, o emprego de suas enzimas em processos industriais com finalidades biotecnológicas (indústrias têxteis, papelarias, alimentícias, farmacêuticas, biorremediação, preparo de protoplastos, extração de proteínas, enzimas e pigmentos), tem sido estudado e poderá proporcionar melhoria na qualidade de vida da população assim como a obtenção de novos produtos comercializáveis.

O uso de marcadores moleculares para a rápida e segura identificação de espécies fúngicas produtoras de enzimas de interesse biotecnológico é amplamente utilizado na pesquisa microbiológica.

Dentre as estratégias moleculares, destaca-se a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), que se aplica por ser simples, rápida, sensível e não exigir grandes quantidades e nem alto grau de pureza do ácido desoxirribonucléico (DNA). Baseia-se na multiplicação *in vitro* de uma determinada seqüência de DNA em muitas cópias deste segmento, utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), cofatores, *Taq* polimerase e desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP'S), assim como variações de temperatura para a desnaturação do DNA, anelamento dos *primers* e extensão da nova cadeia.

A amplificação de regiões através da PCR seguida do seqüenciamento dos produtos referentes aos espaços internos transcritos (ITS) 1 e 2 e o gene 5.8S do DNA ribossômico (rDNA) e análise de similaridade com seqüências já depositadas em bancos de dados, têm sido utilizadas freqüentemente para a identificação de espécies fúngicas relacionadas.

Já a técnica de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) é uma alternativa baseada em PCR que utiliza oligonucleotídeos curtos e de seqüência arbitrária como iniciadores. Esta técnica apresenta alta sensibilidade para geração de uma classe polimórfica de marcadores moleculares, capazes de identificar o grau de similaridade entre os genótipos, nos níveis inter e intra-específico, sem necessidade de conhecimento de seqüências de DNA do organismo investigado.

O uso destas técnicas moleculares aliado aos dados bioquímicos quanto à produção de enzimas oxidativas e também hidrolíticas é interessante quando se deseja identificar tanto o grau de similaridade entre os genótipos de espécies relacionadas, quanto selecionar os isolados com potencial biotecnológico, baseando-se na observação de seus fenótipos. Portanto, é neste sentido que se insere o objetivo principal deste trabalho, ou seja, comparar oito isolados fúngicos brasileiros do gênero *Botryosphaeria* a nível enzimático, quanto a produção de lacases, pectinases e β -1,3-glucanases, após serem cultivados na ausência e na presença de AV e também a nível genético, quanto as variações nas seqüências de nucleotídeos da região ITS1-5.8Sgene-ITS2 do rDNA e diversidade genética, através do RAPD, correlacionando-os entre si, utilizando o *Botryosphaeria rhodina* (MAMB-5), como referência, visto que este tem sido o fungo deste gênero mais estudado e citado na literatura em termos de produção de lacases e hidrolases.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O reino Fungi é constituído por organismos eucariontes e multicelulares, que podem atuar como simbiontes, saprófitas ou patógenos de plantas e animais. São conhecidos como os principais decompositores de matéria orgânica, com um papel ecológico importante na reciclagem de nutrientes, principalmente na deterioração da madeira (BLACK, 2002).

Estes fungos são divididos em dois grupos: os que utilizam as substâncias de reserva presentes no lumen celular, conhecidos como fungos que causam bolor, ou que causam manchas; e os que possuem capacidade de degradar a parede celular utilizando enzimas específicas conhecidos como fungos da podridão macia, parda ou branca, os quais são classificados de acordo com as características macroscópicas na madeira residual (OLIVEIRA et al., 1986).

A celulose, as hemiceluloses e a lignina são os componentes primários da parede celular vegetal e sua degradação afeta suas propriedades físicas e mecânicas, diminuindo a resistência a agressões por agentes externos e aumentando a permeabilidade celular (OLIVEIRA et al., 1986).

A decomposição da lignina é mais complexa por se tratar de um heteropolímero amorfo de elevado peso molecular, formado pela polimerização de unidades fenólicas e álcoois, que atua como material incrustante, conferindo rigidez às paredes celulares vegetais e resistência à degradação. Porém, o estudo de sua degradação é de grande interesse visto que se trata de um mecanismo bioquímico incomum, devido à complexidade do substrato, da natureza das enzimas, dos microrganismos envolvidos e do meio ambiente onde as reações ocorrem (SILVA; GOMES, 2004).

As principais enzimas envolvidas na degradação da lignina são: lignina-peroxidase (Li-P), manganês-peroxidase (Mn-P) e a lacase. Enquanto a Li-P quebra ligações não aromáticas, a Mn-P e as lacases podem oxidar os componentes fenólicos da lignina (SILVA; GOMES, 2004).

As lacases fúngicas são secretadas ao meio por micélios de basidiomicetos, ascomicetos e deuteromicetos (GIANFREDA; XU; BOLLAG, 1999). Os fungos basidiomicetos têm sido intensamente descritos na literatura como produtores de lacases, sendo os mais conhecidos: *Trametes versicolor* (JONSSON et al., 1995), *Agaricus bisporus* (PERRY et al., 1993), *Phlebia radiata* (SALOHEIMO; NIKUPAAVOLA; KNOWLES, 1991), *Pleurotus ostreatus* (GIARDINA et al., 1999), porém, existem poucos relatos destas polifenol-oxidases em fungos ascomicetos.

2.1 FUNGOS DO GÊNERO *Botryosphaeria*: ASPECTOS GERAIS

Os fungos do gênero *Botryosphaeria* são ascomicetos fitopatogênicos, com ampla distribuição mundial, causadores de doenças em diversas plantas de importância econômica como: eucalipto - *Eucalyptus citriodora* (SILVEIRA et al., 1996), melaleuca - *Melaleuca quinquenervia* (RAYACHHETRY; ELLIOTT, 1997), acácia (ROUX; WINGFIELD, 1997), pinheiros e ciprestes (ENCINAS; DANIEL, 1999), árvores frutíferas (BROOKS; FERRIN, 1994; LI; CAO; MU, 1995; KIM et al., 2001; CARDOSO; MAIA; PESSOA, 2002) e ornamentais (RAMOS et al., 1997; YUAN; MOHAMMED, 1999; SWART et al., 2000; SANCHEZ et al., 2003).

Segundo Masilamini e Muthumary (1996), estes microrganismos são patógenos facultativos que infectam diferentes partes da planta como caule, folhas e frutos, em diferentes estágios do desenvolvimento. Tanto o cancro, como o apodrecimento dos galhos ou das raízes têm sido as observações mais comuns relatadas e constituem graves problemas para a agricultura e horticultura, comprometendo também a estocagem de frutas, cascas e tubérculos.

O cancro caracteriza-se por lesões necróticas nos tecidos, manifestando-se pelo escurecimento da casca e do lenho, sendo visualizado pela gomose na área lesionada. Devido à sua presença, ocorre a morte progressiva do ápice das árvores, comumente denominado *dieback*, detectado através das folhas esbranquiçadas e galhos secos. A quebra dos galhos pode ocorrer por ação do vento, na altura da região lesionada. Nos frutos, inicialmente surgem lesões circulares de coloração marrom e halo avermelhado, evoluindo para lesões profundas e conseqüente apodrecimento (SILVEIRA et al., 2001).

Durante o ciclo de vida do *Botryosphaeria* pôde ser observada a penetração de hifas no tecido vegetal dos tubérculos, após 4 horas da inoculação. Após a infecção, o fungo permanece viável até 10 meses, sobrevivendo em condições desfavoráveis, com formação de hifas especializadas e clamidósporos. Os clamidósporos quando liberados no solo promovem a desintegração do tubérculo doente. Em condições favoráveis ao crescimento, há o desenvolvimento de micélios e conseqüentemente ocorrem novas infecções. Os picnídios são formados quando expostos à luz em cultura, podendo ser disseminados no meio ambiente (OGUNDANA, 1983).

Algumas espécies de *Botryosphaeria* têm sido citadas como endofíticas em eucalipto (SMITH; WINGFIELD; PETRINI, 1996). Segundo Freeman

e Rodriguez (1993) a distinção entre um microrganismo endofítico e um patógeno não está completamente esclarecida, visto que organismos patogênicos, economicamente importantes, podem ser endofíticos ou latentes, em alguns tipos de plantas.

Por outro lado, certas espécies de *Botryosphaeria* podem causar doenças apenas quando o hospedeiro está debilitado ou sofre algum tipo de estresse por agentes bióticos ou abióticos; como exemplo pode ser citado o *Botryosphaeria dothidea*, que normalmente pode infectar plantas de forma oportunista (SWART et al., 2000).

A nomenclatura e taxonomia de alguns fungos patogênicos não estão completamente definidas até o momento, apresentando contradição. Isto acontece principalmente quando existe dupla propagação, tanto no estágio sexual (teleomorfo), como no estágio assexual (anamorfo) (TAXONOMY..., 2005).

Os fungos são classificados de acordo com a natureza do estágio sexual no seu ciclo de vida. Entretanto, esta classificação torna-se complexa devido a dois fatores principais: (1) em alguns fungos, não são observados ciclos sexuais; (2) é frequentemente difícil correlacionar os estágios sexuados e os assexuados de alguns fungos. Por exemplo, um pesquisador pode estudar a fase assexuada de um fungo e designar-lhe um nome; um outro pesquisador pode estudar a fase sexuada deste mesmo fungo e dar-lhe um nome diferente. Como a relação entre as fases sexuada e assexuada nem sempre é perceptível, uma determinada espécie de fungo pode apresentar dois nomes, até que um outro pesquisador descubra que as duas fases ocorrem no mesmo organismo (BLACK, 2002). Portanto, a classificação sistemática clássica atual baseia-se na anatomia morfológica dos fungos teleomorfos (TAXONOMY..., 2005).

Técnicas citológicas e moleculares têm favorecido a classificação fúngica, sendo o gênero *Botryosphaeria* pertencente ao Domínio: Eucariota; Reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Classe: Pyrenomycetes ou Loculoascomycetes; Ordem: Dothideales; Família: Botryosphaeriaceae (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

Os anamorfos de *Botryosphaeria* podem ser classificados em: *Botryodiplodia*, *Diplodia*, *Dothiorella*, *Fusicoccum*, *Lasiodiplodia*, *Macrophoma*, *Macrophomopsis* e *Sphaeropsis* (CROUS; PALM, 1999).

Denman et al. (2000) propuseram a classificação dos anamorfos de *Botryosphaeria* em apenas *Fusicoccum*, *Diplodia* e *Sphaeropsis*, baseando-se nos aspectos morfológicos dos conídios e hifas, como também pela análise da região espaçadora interna transcrita (ITS) do DNA ribossomal. Segundo os autores tem sido sugerido que o fungo *Lasiodiplodia theobromae* (anamorfo de *Botryosphaeria rhodina*) seja incluído como um sinônimo de *Diplodia*.

Encinas e Daniel (1995) estudaram o ataque do anamorfo *Lasiodiplodia theobromae* ou *Brotryodiplodia theobromae* às células vegetais, correlacionando o desenvolvimento fúngico com o peso seco obtido da madeira infectada, num determinado período de tempo. Observaram microscopicamente que após 30 dias de infecção, ocorreu penetração das hifas, degradação das células do parênquima e da parede celular por enzimas pectinolíticas, celulolíticas e amilolíticas, concomitantemente com a perda de 2% de peso seco. Houve colonização da madeira em áreas mais sólidas, com penetração intensa de hifas no parênquima e formação de cavidades após 60 dias de infecção, com perda de 9% do peso seco.

Estudos sobre a produção de enzimas envolvidas na fitopatogenicidade por espécies de *Botryosphaeria* não são muito abundantes,

portanto, pesquisas neste sentido poderão colaborar no entendimento da infecção e ação patogênica dos microrganismos deste gênero, uma vez que algumas enzimas por eles produzidas atuam como fitotoxinas, o que favorecerá no combate e controle deste patógeno. O fato do microrganismo ser um fungo fitopatogênico, não impede o emprego de suas enzimas em processos biotecnológicos, considerando-se a realização de testes citotóxicos, mutagênicos, alergênicos, bem como a realização de análises genéticas.

O álcool veratrílico (AV) é um metabólito secundário sintetizado *de novo* e detectado nos fluidos de cultivo de vários fungos, principalmente basidiomicetos ligninolíticos, como *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata* (KANTELINEN; HATAKKA; VIIKARI, 1989; GOLD; ALIC, 1993; De JONG; FIELD; De BONT, 1994; SUGUIMOTO et al., 2001), incluindo-se o *Botryosphaeria* sp. (DEKKER; BARBOSA, 2001). Sua principal função é atuar como um mediador redox entre a lignina-peroxidase (Li-P) e a degradação de lignina (GOODWIN; AUST; GROVER, 1995), além de proteger a Li-P de ser inativada pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂), produzido metabolicamente no ciclo redox em basidiomicetos (CHUNG et al., 2000).

Este álcool aromático pode também induzir a transcrição de genes de lacases e manganês peroxidases em basidiomicetos (EGGERT; TEMP; ERIKSSON, 1996; SCHEEL et al., 2000) induzindo também a produção de lacases em ascomicetos, como no *Botryosphaeria* sp (BARBOSA et al., 1996; VASCONCELOS et al., 2000; DEKKER; BARBOSA, 2001, CUNHA et al., 2003). O álcool veratrílico provavelmente facilite a secreção de lacases intracelulares para o meio extracelular por alterar a estrutura ou as propriedades da membrana no ascomiceto *Botryosphaeria* sp (DEKKER et al., 2001).

2.2 DE *Botryosphaeria* sp. à *Botryosphaeria rhodina*

Dentre os fungos do gênero *Botryosphaeria*, o *Botryosphaeria* sp. (MAMB-5), isolado de cancro de eucalipto por Barbosa et al. (1995), tem sido intensamente estudado quanto à produção de enzimas. Este fungo foi selecionado como ligninolítico devido a sua capacidade de descolorir o corante poliaromático Poly R-478, em meio de cultivo submerso. Posteriormente, foi constatado que este isolado produzia lacase constitutivamente, ou seja, uma polifenol oxidase classificada como *p*-difenol:oxigênio oxireductase (EC. 1.10.3.2), verificando-se também a indução pelo AV, na produção desta enzima em *Botryosphaeria* sp. (MAMB-5) (BARBOSA et al., 1996).

Vasconcelos et al. (2000), otimizaram a produção de lacases pelo *Botryosphaeria* sp. (MAMB-5), através do estudo das variáveis: tempo de cultivo, concentração de extrato de levedura e concentração do indutor AV. A concentração do AV e o tempo de cultivo foram os fatores que aumentaram a produção de lacase, enquanto que o extrato de levedura não influenciou a produção desta polifenol oxidase. A máxima produção de lacase ocorreu na presença de 30,4mM de AV em 4,5 dias, a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e 180rpm.

Dekker e Barbosa (2001), demonstraram que o aumento da aeração afetava positivamente a produção de lacase pelo *Botryosphaeria* sp (MAMB-5) na presença de AV. Também descreveram, pela primeira vez, que este fungo secretava no meio de cultivo um exopolissacarídeo (EPS), caracterizado como uma β -glucana, através da ação de hidrolases comerciais.

Neste mesmo ano (2001), Dekker et al., relataram uma hipótese sobre o papel regulador do AV na produção de enzimas hidrolíticas secretadas pelo *Botryosphaeria* sp. (MAMB-5), tais como: celulases, xilanases, amilases e pectinases, após este microrganismo ter sido cultivado nas respectivas fontes de carbono: celulose, xilana, amido e pectina. Os resultados sugeriram que o AV exerça um papel regulador na síntese destas enzimas, uma vez que observou-se a diminuição da produção destas hidrolases na presença do referido álcool. Por outro lado, os mesmos pesquisadores constataram que houve repressão catabólica da síntese de celulases e xilanases quando o *Botryosphaeria* sp. (MAMB-5) foi cultivado em glucose e xilose, respectivamente, como única fonte de carbono. Também foi demonstrado que independentemente da fonte de carbono, houve indução da síntese de lacases na presença do AV (Figura 1). Acredita-se que estas enzimas colaborem na ação patogênica do fungo, através de ações sinérgicas e que o AV facilite o transporte de lacases do meio intra para o extracelular (DEKKER et al., 2001).

Além do isolado *Botryosphaeria* sp. (MAMB-5), outros dois fitopatógenos de *Botryosphaeria*: *Botryosphaeria ribis* e *Lasiodiplodia theobromae* foram comparados quanto à produção de lacases, na presença e ausência do AV bem como quanto à produção de picnídios. Vasconcelos et al. (2001), constataram que estes fungos produzem lacases tanto intra quanto extracelularmente, quando cultivados no meio basal, independentemente se na ausência ou na presença do AV. Entretanto, o melhor produtor de lacases ainda foi o isolado de *Botryosphaeria* sp. (MAMB-5).

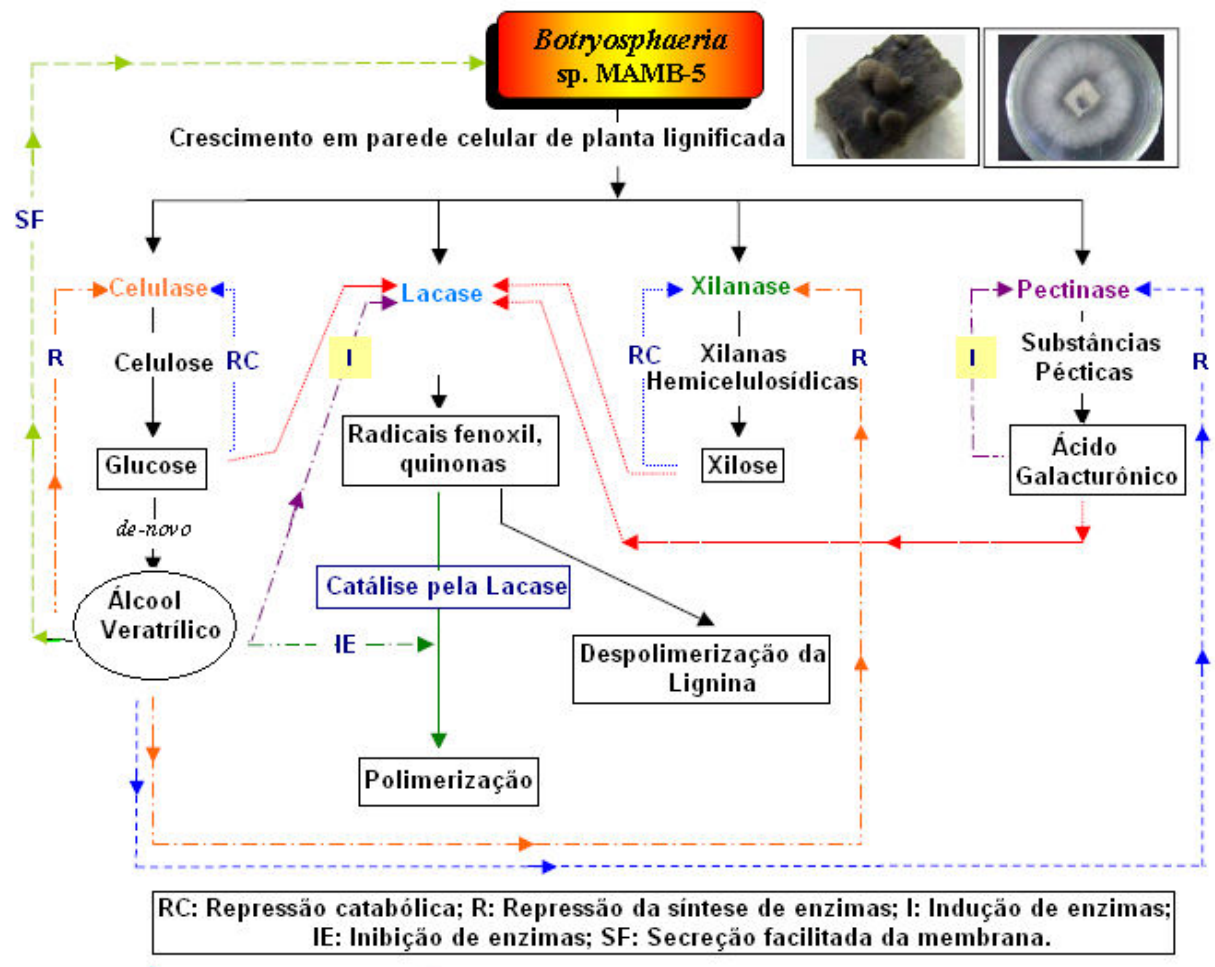


Figura 1 - Esquema geral sobre a hipótese do papel do AV na regulação da síntese de celulase, lacase, xilanase e pectinase por *Botryosphaeria rhodina*, conforme Dekker et al. (2001) com algumas modificações por Dekker, inclusão das pectinases.

A produção de picnídios ocorreu sob iluminação contínua a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, porém em condições diferentes entre os três fungos estudados. A análise eletroforética de marcadores protéicos intracelulares como esterases e fosfatases indicaram que as três espécies fúngicas estudadas são geneticamente distintas embora as lacases por eles produzidas, apresentaram similaridade eletroforética.

Cunha et al. (2003), demonstraram o efeito de diferentes fontes de carbono monoméricas (glucose, frutose, galactose, xilose, ácido galacturônico), diméricas (lactose, sacarose) e poliméricas (inulina e pectina), na produção de

lacases constitutivas e induzidas pelo AV por *Botryosphaeria* sp. (MAMB-5). Este fungo produziu lacases em todas as fontes de carbono estudadas e o AV aumentou a produção de lacases na maioria das fontes de carbono, exceto em inulina e em ácido galacturônico. Também foram confirmadas as evidências anteriormente obtidas por Dekker et al. (2001) de que o *Botryosphaeria* sp (MAMB-5) é um fungo pectinolítico constitutivo.

Ainda em 2003, Barbosa et al. isolaram e caracterizaram a β -glucana secretada no meio de cultivo, após o crescimento do fungo em concentrações elevadas de glucose 5% (p/v). Constataram que este exopolissacarídeo (EPS) é uma (1 \rightarrow 3)- β -D-glucana, com aproximadamente 22% de ramificações no C-6, as quais são constituídas por resíduos de glucose e ou gentiobiose unidos à cadeia principal por ligações glicosídicas tipo β (1 \rightarrow 6). Este EPS foi então denominado de botriosferana.

Steluti et al. (2004), avaliaram diferentes fontes de carbono para a produção de botriosferana pelo *Botryosphaeria* sp. Houve produção do EPS na maioria das fontes estudadas (glucose, frutose, galactose, manose, manitol, sorbitol, lactose, sacarose, sacarose comercial e melação de cana de açúcar), exceto com o manitol, todas as glucanas produzidas foram caracterizadas como sendo do tipo β .

Ainda em 2004, Garcia et al., classificaram o *Botryosphaeria* sp (MAMB-5) isolado do cancro do eucalipto por Barbosa et al. (1995), baseando-se em técnicas moleculares. O microrganismo foi identificado à nível de espécie utilizando como ferramenta a amplificação de regiões conservadas através da PCR, seguida do seqüenciamento do produto referentes aos espaços internos transcritos (ITS) 1 e 2 e o gene 5.8S do DNA ribossômico, sendo em seguida, analisado juntamente com

seqüências já depositadas em bancos de dados. Este método permitiu identificar o isolado tão estudado bioquimicamente como *Botryosphaeria rhodina*.

Silva et al. (2005b), caracterizaram duas botriosferanas produzidas pelo *Botryosphaeria rhodina*, após ter sido cultivado em sacarose e frutose, respectivamente, como únicas fontes de carbono. Demonstraram que o grau de ramificação da botriosferana produzida em sacarose foi menor (21%) do que a obtida em frutose (31%), o que certamente proporcionará diferentes propriedades reológicas aos respectivos polímeros.

No mesmo ano, Giese et al. (2005), utilizaram o botriosferana (EPS) produzido em glucose 5% (p/v) pelo *Botryosphaeria rhodina*, para o crescimento dos fungos *Trichoderma harzianum* e o próprio *Botryosphaeria rhodina*. Como a parede celular fúngica é também composta de glucanas, o objetivo do referido estudo foi avaliar a produção de β -glucanases, nesta fonte de carbono, para sua utilização na produção de pré-bióticos a partir de botriosferana. Os resultados revelaram que ambos microrganismos produziram β -glucanases, sendo o melhor produtor o *T. harzianum*.

Conforme pôde ser observado, o *Botryosphaeria rhodina* têm sido o fungo mais estudado como produtor de lacases. Além destas enzimas, estudos revelaram seu potencial como produtor de pectinases e β -glucanases que também possuem aplicações biotecnológicas importantes, que serão consideradas a seguir.

2.3 ENZIMAS MICROBIANAS DE IMPORTÂNCIA BIOTECNOLÓGICA

2.3.1 Lacases

As lacases (EC: 1.10.3.2 *p*-difenol:oxigênio oxireductase) são polifenol oxidases que catalisam reações de oxido-redução, ou seja, oxida vários compostos aromáticos (fenóis e ácidos aromáticos), compostos não aromáticos, ligninas modificadas e lignina *in natura* (Figura 2) (LEONOWICZ et al., 2001; DEKKER; BARBOSA; SARGENT, 2002; CLAUS, 2004) com concomitante redução do oxigênio molecular até água (YAROLOV et al., 1994; THURSTON, 1994; GIANFREDA; XU; BOLLAG, 1999; LEONOWICZ et al., 2001; DURÁN et al., 2002). Filogeneticamente as lacases pertencem a um grupo ancestral de oxidoreductases dependentes de cobre, juntamente com as oxidases, ácido L-ascórbico oxidases e ceruloplasmina (VALDERRAMA et al., 2003). São também denominadas cuproproteínas porque pertencem a um pequeno grupo de enzimas denominadas oxidases azuis (MESSERSCHMIDT, 1997).

A molécula de lacase é uma glicoproteína monomérica, dimérica ou tetramérica na sua forma ativa de holoenzima. Usualmente contém quatro átomos de cobre por monômero ligado a três sítios redox. As lacases são classificadas em três tipos distintos, dependendo do local de ligação do cobre: tipo I (ou cobre azul) é responsável pela intensa cor azul da enzima; tipo II o cobre exibe baixa absorvância na região do visível e tipo III incorpora dois cobres e é responsável por uma banda

próxima a 330nm no espectro de absorvância da lacase nativa. Todos os íons cobre estão, aparentemente, envolvidos no mecanismo catalítico (CLAUS, 2004).

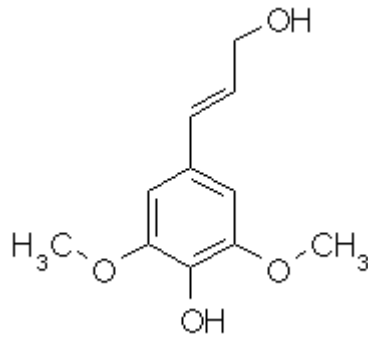


Figura 2 – Esquema da estrutura molecular dos monômeros de lignina.
Fonte: Genomenet... (2005).

As lacases fúngicas são enzimas versáteis sendo secretadas para o meio externo por micélios de basidiomicetos, ascomicetos e deuteromicetos (GIANFREDA; XU; BOLLAG, 1999), incluindo as observadas por Barbosa e colaboradores, em 1995, no ascomiceto *Botryosphaeria rhodina*. Sua ocorrência foi também verificada em plantas, insetos e fungos, sendo abundantes especialmente em fungos degradadores de lignina, em alguns procariontes como *Azospirillum lipoferum*, *Marinomonas mediterrânea* e recentemente em *Bacillus subtilis* (HULLO et al., 2001), porém, segundo Alexandre e Zhulin (2000) as lacases são amplamente encontradas em bactérias.

De acordo com Thurston (1994), vários substratos podem ser utilizados para determinação de atividade de lacases, como: as hidroquinonas, catecóis, guaiacol e *p*-fenilelodiamina, porém o substrato syringaldizine [N,N'-bis(4.3-dimetoxi-4hidroxibenzilino hidrazina)] é considerado mais apropriado para determinação de sua atividade (SMITH et al., 1997). Segundo, Bourbonnais e Paice

(1989) o substrato artificial ABTS [2,2¹ ácido azino bis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico)] tem capacidade de agir como mediador, permitindo a oxidação de modelos não fenólicos de lignina, compostos estes que não são propriamente substratos para a lacases. Outro substrato que tem sido amplamente utilizado para a determinação da lacase é o 2,6-dimetoxifenol (DMP), em diferentes condições de pH e temperatura (DEKKER et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2000).

A importância tecnológica das lacases é resultante da sua capacidade de catalisar a transformação de um grande número de compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos (DURÁN et al., 2002).

O uso de enzimas tem crescido nas últimas décadas através do desenvolvimento de novos processos biotecnológicos promovendo a melhoria da qualidade de vida da população.

As lacases têm sido aplicadas em diferentes processos industriais como na produção de bebidas e alimentos, indústrias têxteis, papelarias e indústria farmacêutica, assim como em processos de biorremediação (LEONOWICZ et al., 2001; MINUSSI; PASTORE; DURÁN, 2002; WESENBERG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003; LEITE et al., 2003a, 2003b; GIANFREDA; RAO, 2004).

Os compostos fenólicos ocorrem naturalmente nas frutas e são oxidados quando em contato com o oxigênio do ar promovendo o escurecimento. Nos sucos de maçã e de uva a oxidação excessiva de compostos fenólicos tem alterado suas características sensoriais. A determinação do conteúdo de compostos fenólicos na bebida natural se faz necessária para que haja uma descrição adequada e também para indicar a estabilidade durante o armazenamento. O tratamento de suco de maçã com lacase e ultrafiltração tem demonstrado a produção de um suco claro e estável por vários pesquisadores, como Stutz (1993);

Ritter e Dietrich (1996); Piacquadio et al. (1998) (apud MINUSSI; PASTORE; DURÁN, 2002).

A estabilização do vinho é uma das principais aplicações de lacases na indústria de bebidas. Os compostos fenólicos conferem aos diferentes tipos de vinho a cor e o sabor e também observa-se um papel importante nas reações oxidativas de aldeídos, aminoácidos e proteínas, aumentando a intensidade da cor, turbidez, alterando assim as propriedades sensoriais (ZAMORANI et al., 1993). Estudos desenvolvidos com vinhos tratados com lacases de diferentes microrganismos têm demonstrado maior estabilidade e qualidade do vinho. Outros estudos mostraram que estas enzimas removeram mais de 90% de ácido ferúlico de uma solução modelo e 34% de compostos fenólicos dos vinhos (MINUSSI; PASTORE; DURÁN, 2002). Portanto, o tratamento dos vinhos com lacases parece ser importante, para a conservação e manutenção de suas propriedades sensoriais.

O poder oxidativo da lacase pode ser utilizado para aumentar a qualidade do sabor dos óleos, extratos e sementes; o cacau, por exemplo, foi estudado por Takemori et al. (1992 apud MINUSSI; PASTORE; DURÁN, 2002), que verificaram uma melhora no sabor e textura, depois de seco e torrado, após ter sido tratado com solução de lacases de *Coriolus versicolor*.

O tratamento da canola com lacase de *Trametes versicolor* promoveu uma redução de até 90% do conteúdo fenólico em 3 horas de processamento (LACKI; DUVNJAK, 1996). Por outro lado, a adição de lacase de *Mycoliophthora thermophilum* na proteína de soja hidrolisada, melhorou o sabor sem, contudo, afetar o nível de hidrólise segundo Anom (1999 apud MINUSSI; PASTORE; DURÁN, 2002).

Segundo Huang et al. (1997), as lacases também podem ser utilizadas na determinação seletiva de ácido ascórbico. Vários biossensores contendo lacases têm sido desenvolvidos para a determinação de glucose, de aminas aromáticas, compostos fenólicos, catecolaminas, entre outros (ROSATTO et al., 2001; MINUSSI; PASTORE; DURÁN, 2002; LEITE et al., 2003a, 2003b). Também tem sido proposto o uso de enzimas oxidativas, tais como peroxidases e lacases em novas tecnologias para a liquefação de carvão, reduzindo os danos ambientais causados por esta fonte de energia (FAKOUSSA e HOFRICHTER, 1999).

O fundamento desta aplicação é pertinente pois, muitos resíduos industriais possuem estruturas fenólicas e seus derivados são amplamente distribuídos no meio ambiente, oriundos principalmente das atividades de produção de plásticos, corantes, tintas, drogas, antioxidantes, polímeros sintéticos, resinas, detergentes, desinfetantes, refinaria de óleo e principalmente indústria de papel e celulose. Alguns são altamente tóxicos sendo produtos resultantes da degradação de pesticidas organofosforados e fenoxiácidos clorados. Seus efeitos tóxicos provocam danos ao meio ambiente e conseqüentemente para o ser humano, pois atuam como agentes carcinogênicos, mutagênicos, hepatotóxicos, além de afetarem as velocidades das reações biocatalíticas nos processos de respiração (ROSATTO et al., 2001; GIANFREDA; RAO, 2004). Portanto, tem sido proposto o desenvolvimento de tecnologias de remediação para acelerar a degradação destes compostos poluentes, utilizando principalmente microrganismos produtores de lacases, que modificam a estrutura e propriedades toxicológicas destes contaminantes proporcionando biodegradação mais rápida e eficiente.

2.3.2 Pectinases

As substâncias pécticas constituem um grupo de polissacarídeos de origem vegetal de alto peso molecular que são encontrados na parede celular primária dos vegetais, associadas à celulose, hemicelulose e lignina, proporcionando adesão entre as células e resistência mecânica à parede celular. Sua quantidade e natureza são determinantes para a textura de frutos e vegetais durante o seu crescimento, amadurecimento, armazenamento e processamento, sendo mais abundante em frutos e em tecidos jovens (BHAT, 2000; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Estruturalmente, a cadeia polissacarídica da pectina é constituída por uma cadeia principal de unidades repetitivas de $\alpha(1\rightarrow 4)$ -D-ácido galacturônico (Figura 3), com ramificações formadas por unidades de $\alpha(1\rightarrow 2)$ -L-ramnose. Embora o ácido D-galacturônico seja o principal açúcar constituinte das substâncias pécticas em geral, proporções variáveis de outros açúcares como: D-galactose, L-arabinose, D-xilose, L-ramnose, podem também ser encontrados (SILVA et al., 2005b). Dependendo do tipo de modificação da cadeia principal, as substâncias pécticas são classificadas como protopectina, ácidos pécticos, oligo-galacturonatos e pectina. (KASHYAP et al., 2001; GUMMADI; KUMAR, 2005), conforme mostra o esquema da Figura 4 .

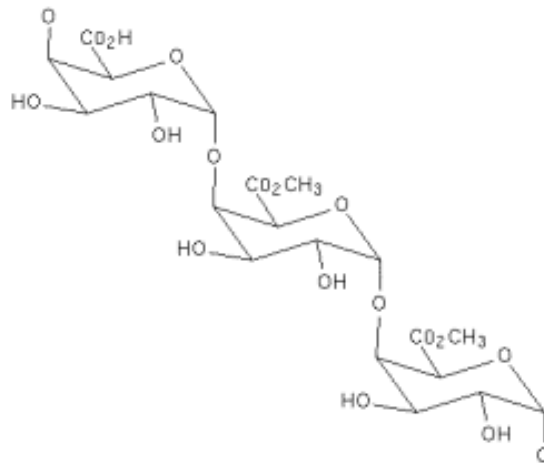


Figura 3 - Estrutura química da pectina.

Fonte: Cybercolloids... (2005)

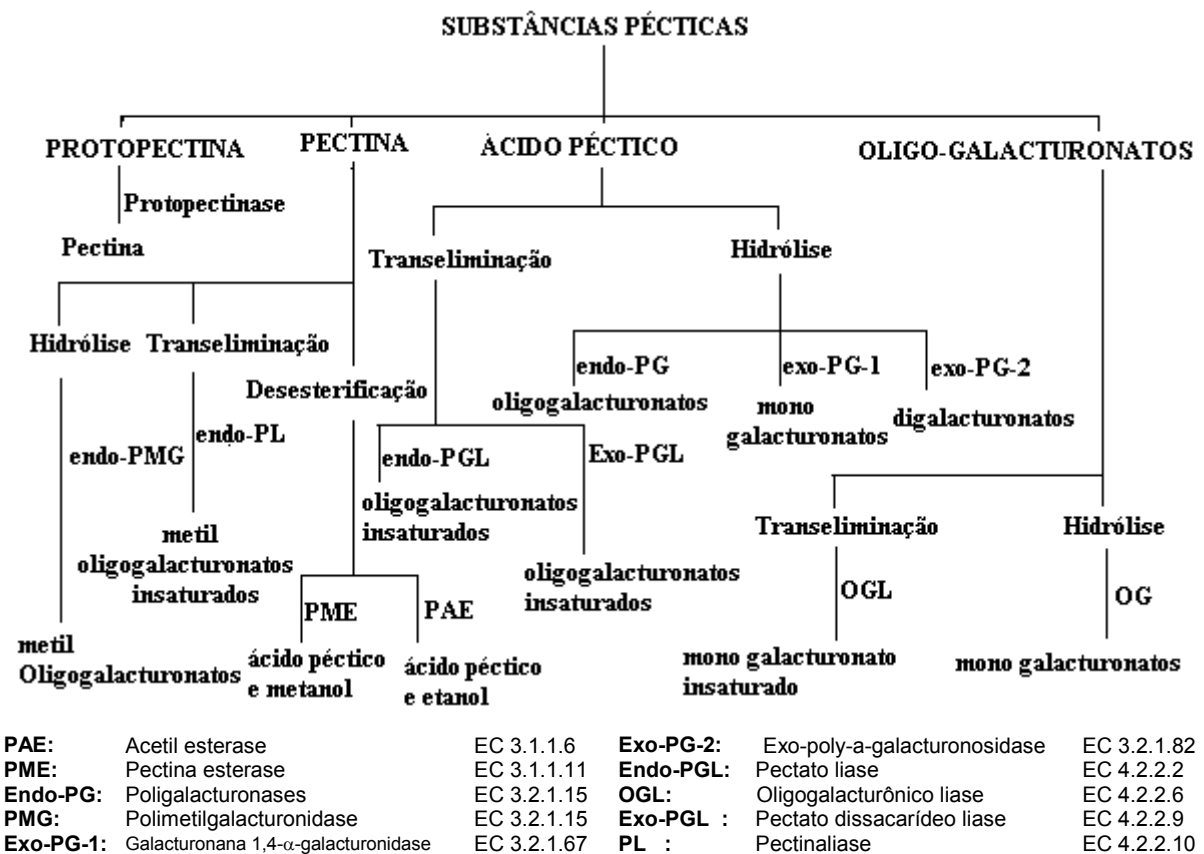


Figura 4 - Diferentes tipos de substâncias pécticas e enzimas envolvidas na sua degradação.

Fonte: Nomenclature...(2005) e Gummadi e Kumar (2005).

Os fungos patogênicos de plantas secretam enzimas que hidrolisam a parede celular, e também são capazes de polimerizar cada um dos seus diferentes componentes. Estas enzimas podem ser utilizadas com diferentes propósitos pelos microrganismos, ou seja, participam de sua ação patogênica favorecendo a penetração e ramificação no tecido do hospedeiro. Muitas destas enzimas são importantes para o seu ciclo de vida saprofítico (RONCERO et al., 2000).

As enzimas pectinolíticas ou pectinases constituem um grupo complexo de enzimas capazes de hidrolizar as substâncias pécticas (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). A classificação destas enzimas baseia-se na sua interação com o substrato, sua ação catalítica e seu tipo de clivagem. Os 3 maiores grupos de pectinases são: (a) protopectinases: degradam protopectinas e pectinas insolúveis; (b) esterases: removem grupos O-metil e (c) despolimerases: clivam cadeias de α -(1→4)-glicosídicas (KASHYAP et al., 2001).

Vários microrganismos são capazes de produzir enzimas que hidrolisam substâncias pécticas, como bactérias (ALESSI et al., 1996; SHEVCHIK et al., 1999; BROWN et al., 2001; KASHYAP et al., 2003), fungos filamentosos (PUCHART et al., 1999; HADJ-TAIEB et al., 2002; RONCERO et al., 2000; HERBERT et al., 2002; OLSSON et al., 2003; SIRIPUTTHAIWAN et al., 2005; PATIL; DAYANAND, 2005; SHOBHA et al., 2005; BOTELLA et al., 2005) e algumas leveduras (SILVA et al., 2005a).

A produção de pectinases tem sido amplamente estudada em fungos filamentosos. Puchart et al. (1999) observaram o crescimento e a produção de pectinases em 17 linhagens de fungos *Thermomyces lanuginosus* utilizando como fontes de carbono polpa de beterraba ou pectina cítrica. Os resultados revelaram que as linhagens crescidas em polpa de beterraba apresentaram maior

atividade pectinolítica do que as que cresceram em pectina cítrica. Portanto, parece que plantas *in natura* proporcionam mais nutrientes para o microrganismo, o que favorece a maior produção de enzimas do que o próprio polissacarídeo isolado.

Spagnuolo et al. (1997), analisaram a atuação de celulases, hemicelulases e pectinases na hidrólise de polpa desidratada de beterraba. As enzimas pectinolíticas foram mais eficientes do que as celulolíticas, enquanto que a ação sinérgica de ambas foi mais efetiva. Quando a polpa de beterraba, extrato alcalino de polpa de beterraba ou celulose foi utilizada por Olsson e colaboradores (2003), como fonte única de carbono para *Trichoderma reesei*, separadamente ou combinados, maior atividade pectinolítica foi obtida com fontes combinadas. Portanto, a combinação de fontes de carbono pode favorecer a produção de enzimas pectinolíticas.

As pectinases utilizadas na indústria alimentícia são produzidas comercialmente pelo *Aspergillus niger*. Este fungo produz várias pectinases, incluindo-se pectina metil-esterase (PME), poligalacturonases (PG) e pectinálise (PL). Muitas pectinases comerciais de *A. niger* apresentam baixa atividade PG e alta atividade PL e PME, sendo que na catálise por PME, há produção de metanol (SILVA et al., 2005a), o qual tem efeito tóxico. Quando semente de girassol foi utilizada como fonte de carbono, por fermentação em estado sólido e fermentação submersa para o *Aspergillus niger*, observou-se maiores níveis enzimáticos em fermentação em fase sólida (PATIL; DAYANAND, et al., 2005). Resultados similares de produção de pectinases foram obtidos quando o *Aspergillus awamori* foi cultivado em resíduo de indústria de vinho, utilizando-se as mesmas condições de fermentação citada anteriormente (BOTELLA et al., 2005). A produção de pectinases foi semelhante à obtida em semente de girassol demonstrando que podem competir

com outros resíduos agroindustriais utilizados como fonte de carbono para o *Aspergillus niger*.

O *Fusarium oxysporum* é produtor de poligalacturonases (PG - sendo uma endo-PG e duas exo-PG), uma endoxilanase e uma endopectato-liase. Recentemente, foram detectados os genes responsáveis pela expressão de algumas destas enzimas hidrolíticas. Todos os genes estudados foram expressos em distintos estágios do processo de infecção em diversos tecidos vegetais, o que indica sua possível implicação no processo de patogênese (RONCERO et al., 2000).

Dentre as referências sobre produção de pectinases pelo gênero *Botryosphaeria* podem ser citadas apenas a de Dekker et al. (2001) e Cunha et al. (2003), que demonstraram a produção de pectinase constitutiva quando um isolado de *Botryosphaeria rhodina* foi cultivado em glucose ou ácido galacturônico como única fonte de carbono. Estes pesquisadores também observaram que a síntese da enzima foi reprimida na presença de álcool veratrílico (AV) e estimulada na presença de ácido galacturônico e pectina, que atuaram como indutores.

A produção de pectinases por leveduras tem sido alvo de estudos, pois algumas cepas não secretam pectina metil-esterase, podendo ser utilizadas com maior segurança na clarificação de suco de frutas e vinho (BHAT, 2000). Silva et al. (2005a), selecionaram e identificaram leveduras presentes nas superfícies de frutas tropicais, as quais foram capazes de secretar pectinases. Das 300 leveduras selecionadas, 21 isolados produziram poligalacturonases. Dentre estes, 7 isolados produziram pectinase e 9 produziram pectina metil-esterase. Os autores observaram que 1/3 das leveduras identificadas foram encontradas na fruta mangaba e sugeriram que estes resultados estão vinculados à concentração de

pectina presente na fruta, que possui aproximadamente 1,2 %, enquanto as outras variam de 0,2 % a 0,7 % de pectina.

Bactérias também têm sido investigadas quanto à produção de pectinases. Foram encontradas no *Bacillus* sp. DT7 através de fermentação em estado sólido, níveis elevados de pectinase alcalina. Kashyap, Soni e Tewari (2003) observaram que a produção destas enzimas pode ser afetada pelas variáveis: tipo de substrato, presença ou ausência de fonte de carbono, fonte de nitrogênio, minerais e vitaminas. A produção máxima foi obtida após o crescimento em farelo de trigo suplementado com ácido poligalacturônico e “neurobion” com 75% de água destilada, após 36 horas de incubação a 37°C.

A imobilização de enzimas tem sido amplamente estudada, visto ser este um processo que permite a diminuição de custos e um aumento de produção industrial. A pectinaliase, presente em diferentes pectinases comerciais, utilizada na tecnologia de sucos, foi imobilizada em alginato. Preparações de enzimas livres e imobilizadas reduziram a viscosidade de pectina altamente esterificadas após 30min à 40°C. Foi constatado que a pectinaliase imobilizada pode ser utilizada em até 4 ciclos no tratamento eficiente de sucos de frutas (BUSTO et al., 2005).

As aplicações das enzimas pécticas estão amplamente relacionadas à processos de extração e clarificação de sucos de frutas. Estas enzimas contribuem para diminuição da viscosidade e turbidez, aumentando o rendimento do suco e melhorando sua apresentação comercial. Segundo Lee et al. (2006), o tratamento de polpa de banana com pectinases, em condições otimizadas mostrou que a clarificação do suco foi maior durante o processo. A otimização da produção de suco de banana utilizando-se enzimas através da metodologia de superfície de resposta foi desenvolvida estudando-se as variáveis: concentração de pectinases (0,01-0,1

%), temperatura (30-50°C) e tempo (30-120min) de tratamento. Observou-se que o tempo e/ou a concentração de enzimas estão correlacionados com a clarificação, diminuição da turbidez e viscosidade. As pectinases também têm sido utilizadas para clarificar suco de tangerina (CHAMCHONG; NOOMHORM, 1991), maçã (GIRARD; FUKUMOTO, 1999) e abacaxi (CARNEIRO et al., 2002).

Shobha et al. (2005), constataram que a poligalacturonase de *Aspergillus niger* causa uma considerável despolimerização da goma galactomanana, também utilizada na indústria alimentícia.

Na indústria têxtil as pectinases têm sido empregadas em conjunto com outras enzimas como amilases, lipases, celulasas e hemicelulasas para remover goma e viscosidade do algodão, melhorando o seu rendimento (BHAT, 2000; HOONDAL et al., 2000).

Estudos genéticos foram realizados com a finalidade de conhecer o sistema regulador da etapa final de exocitose. Siriputthaiwan et al. (2005), analisaram no fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, o gene regulador Rab/GTPase, utilizando para expressão negativa um alelo mutante dominante negativo (CLPT1) para este gene. A expressão foi obtida mediante o uso do gene promotor de pectinase, o qual dirigiu o alelo CLPT1 mutado permitindo assim sua expressão em meio de pectina e durante a patogênese. Os referidos pesquisadores observaram que nas linhagens mutantes negativas para este gene (Rab/GTPase), crescidas em meio de pectina, houve completa inibição da produção de pectinases extracelulares e também no desenvolvimento da infecção e patogenicidade. As linhagens transgênicas desenvolveram apressório na superfície da planta, sem contudo penetrar em seu tecido, causando infecção. Estes resultados revelaram que o alelo CLPT1 é essencial para o transporte vesicular intracelular de enzimas como as

pectinases e que a patogenicidade foi fortemente reduzida com a expressão do alelo mutante negativo nas linhagens transgênicas.

O mecanismo de regulação de pectinases tem sido mais estudado no sistema bacteriano do que no sistema fúngico. Em *Erwinia chrysanthemi*, foram identificados 3 genes reguladores (KdgR, PecS e PecT) por análise genética (HADJ-TAIEB et al., 2002). Shevchik et al. (1999) também verificaram que a bactéria *Erwinia chrysanthemi* secretou várias enzimas pectinolíticas. Seu gene (KdgC) exibiu um alto grau de similaridade com genes de *Yersinia pseudotuberculosis* (pelY) e de *Erwinia carotovora* (pelB); porém nenhuma atividade pectinolítica foi encontrada pelo produto proteico deste gene (KdgC). Após verificação da seqüência nucleotídica correspondente e a clonagem de um longo fragmento de DNA, foi apresentada uma seqüência de aminoácido maior do que a seqüência da proteína KdgC, sendo esta renomeada como PelW. Os produtos do gene PelW catalizaram a formação de digalacturonatos insaturados a partir de poligalacturonatos ou oligogalacturonatos curtos.

Análogos da proteína de expressão de pectinase (Kdg) foram sintetizados e induziram a expressão dos genes de pectinase na bactéria fitopatogênica *Erwinia chrysanthemi* (ALESSI et al., 1996).

Um mutante de *Penicillium occitanis*, produziu uma pectinase 50 x mais potente para atividades endo e exopectinases do que o selvagem. Este mutante produziu alta atividade de pectinase constitutiva e específica para substratos considerados repressores como a glucose e glicerol (HADJ-TAIEB et al., 2002).

2.3.3 β -1,3-Glucanases

Glucanas são polissacarídeos solúveis em água produzidos por microrganismos, inclusive fungos (PITSON et al., 1991; NORONHA et al., 2000; DEKKER; BARBOSA, 2001). São aplicadas comercialmente nas indústrias alimentícia, de bebidas (HUMBERT-GOFFARD et al., 2004) e farmacêutica, atuando como agentes espessantes, devido a sua alta viscosidade, ou como agente anti-tumoral, anti-inflamatório e antiviral, devido às suas atividades biológicas (ISHIBASHI et al., 2004). São exemplos de glucanas produzidas por microrganismos, as gomas xantanas, dextranas, gelanas, pululanas e botriosferanas.

Dekker e Barbosa (2001), relataram alta viscosidade do meio de cultivo quando *Botryosphaera rhodina* foi cultivado em glucose como fonte única de carbono. Utilizando várias concentrações desta fonte de carbono, verificaram que à medida que se aumentava a concentração de glucose, os açúcares totais aumentavam proporcionalmente, enquanto que a quantidade de açúcares redutores diminuía. Estudos relacionados ao metabolismo fúngico confirmam que a glucose presente no meio de cultivo pode ser armazenada pelo fungo na forma de EPS (exopolissacarídeo). Os autores avaliaram o tipo de ligações glicosídicas constituintes do EPS produzido pelo referido fungo. Para tanto, incubaram separadamente a solução de glucana de *B. rhodina* com diferentes enzimas comerciais, que hidrolisavam ligações glicosídicas tipo α ou β , sendo a glucose liberada quantificada pelo método da glucose-oxidase. Verificaram que somente as enzimas comerciais que hidrolisavam ligações glicosídicas do tipo β é que atuavam

sobre o substrato, liberando glucose; enquanto as enzimas que hidrolisavam ligações glicosídicas tipo α não promoveram hidrólise. Portanto, os referidos pesquisadores concluíram que o EPS produzido pelo *B. rhodina* tratava-se de uma β -glucana.

O EPS produzido pelo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* foi posteriormente caracterizado estruturalmente como uma β -(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)-D-glucana, constituído de ligações glicosídicas, na cadeia principal, do tipo β -(1 \rightarrow 3). As ligações responsáveis pelas ramificações do polímero são do tipo β -(1 \rightarrow 6), que unem resíduos de glucose e ou resíduos do dissacarídeo gentiobiose à cadeia principal. Este polissacarídeo foi denominado de botriosferana (Figura 5), visto ser produzido por *Botryosphaeria rhodina* (BARBOSA et al., 2003).

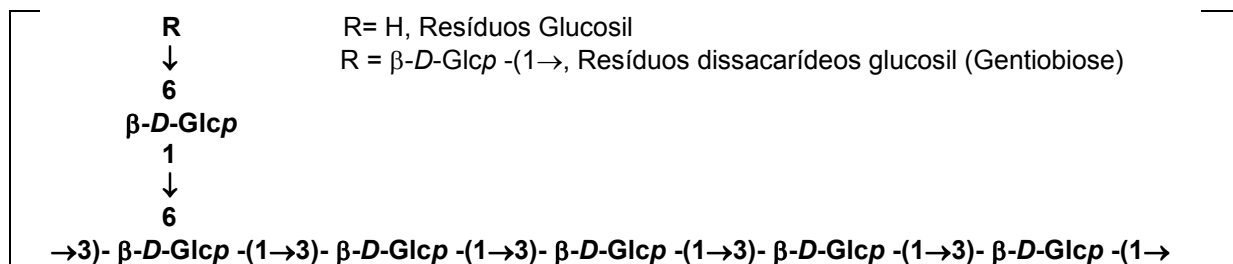


Figura 5 - Esquema estrutural do EPS botriosferana, secretado pelo *Botryosphaeria rhodina*
Fonte: Barbosa et al. (2003).

As enzimas capazes de hidrolizar ligações tipo α ou β destes exopolissacarídeos, são chamadas de glucanases. Uma β -1,3-glucanase catalisa a reação de hidrólise das ligações glicosídicas tipo β -(1 \rightarrow 3) da D-glucana (FLEURI; SATO, 2005) (Figura 6). Esta enzima atua especificamente sobre o substrato laminarina (NORONHA et al., 2000; BARA; LIMA; ULHOA, 2003).

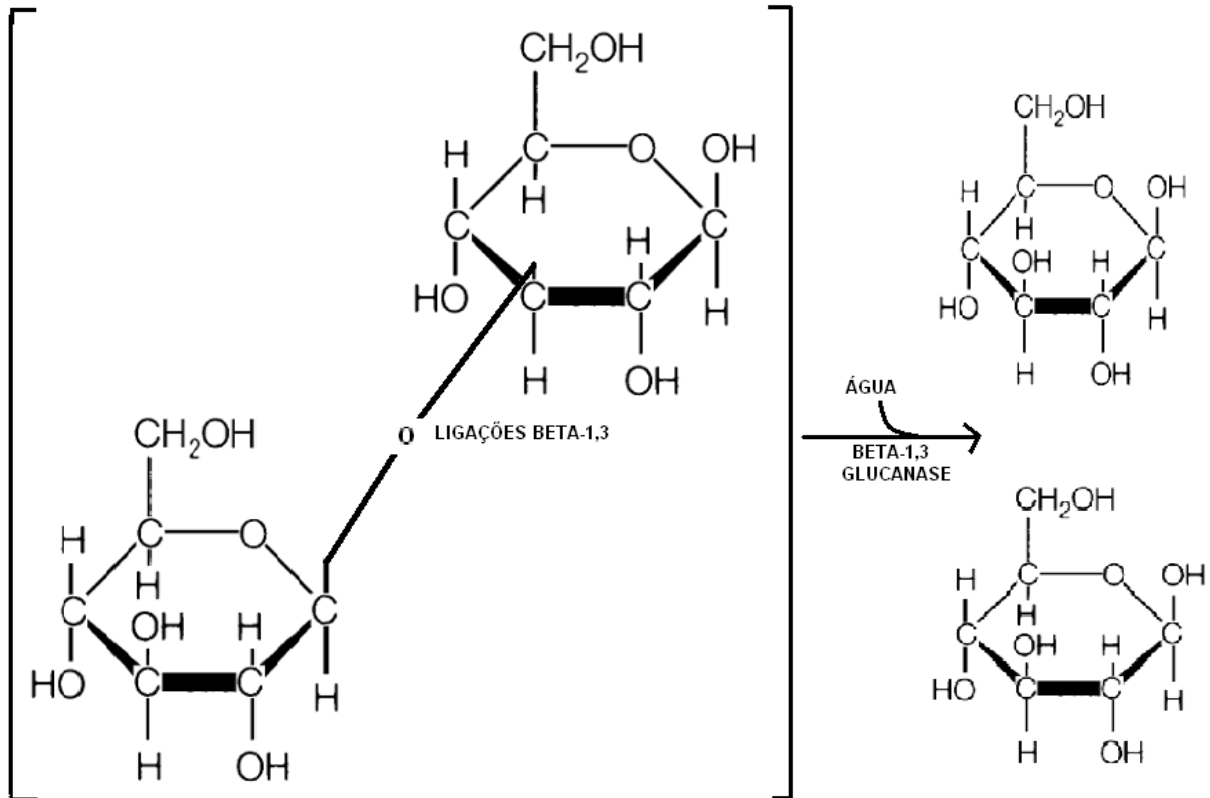


Figura 6 - Representação esquemática da hidrólise da β -1,3-D-Glucana por β -1,3-glucanases

Fonte: Fleuri e Sato (2005), com modificações.

Reese e Mandels (1959), avaliaram por cromatografia de camada delgada (CCD) os produtos resultantes da hidrólise enzimática de laminarina em 140 amostras fúngicas, produtoras constitutivas de β -glucanases, propuseram dois mecanismos de ação: (a) Endo-glucanases que atuam aleatoriamente sobre o substrato β -1,3-D-glucana ou β -(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)-D-glucana, resultando em oligossacarídeos de maior peso molecular e (b) Exo-glucanases que hidrolisam as extremidades não redutoras das β -1,3-D-glucana ou β -(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)-D-glucana, resultando em glicose como único produto de hidrólise. As β -1,6-glucanases, uma vez fazendo parte do complexo glucanólítico irão hidrolisar as ligações glicosídicas tipo β -(1 \rightarrow 6), também liberando glicose.

As β -1,3-glucanases são importantes para a degradação enzimática da parede celular de fungos fitopatogênicos durante o ataque micoparasitário. Alguns microrganismos que secretam β -1,3-glucanases, β -1,6-glucanases, mananases, proteases e quitinases têm alta capacidade de lisar a parede celular de leveduras. Estas enzimas agem sinergicamente, mas somente duas são essenciais para o rompimento da célula: a protease específica que degrada a camada externa e a β -1,3-glucanase lítica que degrada a camada interna (FLEURI; SATO, 2005).

O fungo *Botryosphaeria rhodina* foi capaz de se desenvolver em meio de cultivo contendo botriosferana, suplementado com 1g/l concentrações de glucose, a qual favoreceu seu crescimento e conseqüentemente a produção de β -1,3-glucanases que atuaram na degradação do EPS (GIESE et al., 2005).

Altos títulos de β -1,3-glucanases foram determinados por fungos que não produzem β -glucanas. Bara, Lima e Ulhoa (2003), observaram que níveis significativos de β -1,3-glucanases foram obtidos por *Trichoderma asperellum* na presença de células purificadas de *Rhizoctonia solani*, utilizada como fonte de carbono. Resultados similares foram obtidos por Noronha e colaboradores (2000) e Giese et al. (2005). Estes pesquisadores observaram que o fungo *Trichoderma harzianum* produziu maior nível de atividade de β -1,3-glucanases quando crescido em parede celular purificada e parede celular de *Botryosphaeria rhodina*, respectivamente, como fonte de carbono.

A ocorrência de β -(1 \rightarrow 3)-glucanases também foi observada nos sobrenadantes do meio de cultivo, assim como na parede celular e citoplasma das células fúngicas de *Acremonium persicinum* (PITSON et al., 1991). Recentemente, Jayani et al. (2005) descreveram a síntese de quatro β -(1 \rightarrow 3) glucanases e uma β -(1

→ 6)-glucanase, pelo fungo *Acremonium* sp. crescido em escleroglucanas como fonte de carbono.

Desta forma altos níveis de atividade de β -1,3-glucanase em cultura contendo parede celular como fonte única de carbono, sugerem que a regulação da expressão de β -1,3-glucanase nos microrganismos estudados foi influenciada pelos níveis de β -glucana presentes no meio, atuando como indutor.

Alguns organismos necessitam de indutores para produção de enzimas líticas como as β -1,3-glucanases. Por exemplo: *Acremonium* e *Cephalosporium* cresceram na presença de glucose, laminarina, pustulana ou escleroglucana (JAYUS et al., 2005; FLEURI; SATO, 2005), demonstrando que a produção desta enzima não foi reprimida por glucose nestes microrganismos.

Trichoderma harzianum também produziu β -1,3-glucanases na presença de glucose, parede celular de fungo purificada ou não (NORONHA et al., 2000; GIESE et al., 2005). Já o *Trichoderma asperellum* produziu a enzima quando cultivado na presença de parede celular de *Rhizoctonia solani* (BARA; LIMA; ULHOA, 2003).

Folhas da planta *Phaseolus vulgaris* tiveram um aumento na produção de β -1,3-glucanases após terem sido irradiadas por UV, sendo que esta indução foi correlacionada à quebra de DNA (KUCERA, LEUBNER-METZGER; WELLMANN, 2003).

Relatos sobre a regulação destas enzimas em fungos têm sido importantes para o entendimento de seu metabolismo e melhor aproveitamento de suas propriedades biotecnológicas.

A regulação exercida pela glucose envolve a repressão da expressão de genes que codificam estas enzimas. Uma vez consumida a fonte de

carbono, ocorre a desrepressão, resultando na síntese de β -1,3-glucanases (NORONHA et al., 2000).

Rapp (1989) observou que em baixas concentrações de glucose há uma diminuição na concentração do EPS e na produção de biomassa pelo fungo *Sclerotium glucanicum*, no meio de cultivo, juntamente com o aumento da atividade das glucanases. Porém, quando este fungo foi crescido em excesso de glucose ou xilose, a atividade de β -glucanases não foi detectada, evidenciando que o excesso de glucose ou outra fonte de carbono facilmente fermentável, reprimem a produção destas enzimas em alguns microrganismos. Pôde-se concluir que as β -1,3-glucanases deste microrganismo, foram reguladas por vias indutivas.

Espécies do mesmo gênero podem ter respostas metabólicas diferentes em relação à presença de glucose. Em *Trichoderma harzianum* ocorreu a repressão catabólica (NORONHA et al., 2000), já em *Trichoderma viridae*, não houve repressão catabólica, visto que suas β -1,3-glucanases não foram reprimidas pela glucose. Del Rey, Garcia-Acha e Nombela, (1979), sugeriram que neste fungo, as β -glucanases estariam envolvidas nos processos de formação de parede celular e não com a patogenicidade.

Noronha et al. (2000), observaram a produção de diferentes isoformas de β -1,3-Glucanase produzidas por *Trichoderma harzianum*, tendo sido detectada uma β -1,3-glucanase de 36-kDa, em todas as fontes de carbono utilizadas. Neste mesmo ano (2000), Noronha e Ulhoa, purificaram e caracterizaram como endo- β -1,3-glucanase uma das glucanases produzidas pelo mesmo fungo, crescido em meio contendo quitina. A massa molecular purificada foi de aproximadamente 29-kDa. Análises cinéticas demonstraram que estas duas β -1,3-

glucanases (29-kDa e 36-kDa) são diferentes e possivelmente são controladas por diferentes genes.

Donzelli, Siebert e Harman (2005), otimizaram a produção de β -1,3-glucanase por *Trichoderma atroviridae* por metodologia de superfície de resposta, contendo as variáveis: glucose, íon amônio, quitina, escleroglucana e concentração do inóculo inicial. Observaram que a maior produção foi em glucose, na concentração de 0,01 a 0,1%, entre 18 e 25mM de íon amônio, em quitina ou escleroglucana como fonte de carbono.

A planta *Linum usitatissimum* produz β -1,3-glucanases como defesa contra ataques fúngicos principalmente do gênero *Fusarium*. Wróbel-Kwiatkowska et al. (2004) em estudos de expressão de β -1,3-glucanases, observaram que linhagens transgênicas foram mais resistentes contra os fungos *Fusarium oxysporum* e *Fusarium culmorum* do que linhagens não transgênicas. Experimentos *in vitro* demonstraram que extrato da planta transgênica inibiu o crescimento fúngico.

Enzimas líticas de parede celular como as β -1,3-glucanases, têm aplicações biotecnológicas no preparo de protoplastos para melhoramento genético de leveduras, no aproveitamento de massa celular de levedura para extração de proteínas, enzimas e pigmentos, no tratamento de massa celular de levedura residual de indústrias de fermentação para a produção de ração animal, na obtenção de carboidratos funcionais da parede celular (glucanas e mananas), como também no pré-tratamento para ruptura mecânica de células, aumentando a eficiência e reduzindo o requerimento de energia (FLEURI; SATO, 2005).

Humbert-Goffard et al. (2004) têm desenvolvido um método específico para determinar a atividade de β -1,3-glucanase em vinhos. Os resultados mostraram que a filtração do vinho aumentou após adição de enzimas.

O *Botryosphaeria rhodina* estudado até então, é produtor de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas, amilolíticas, inulinolíticas, pectinolíticas (DEKKER et al., 2001; CUNHA et al., 2003). Giese et al. (2005) também demonstraram que este fungo produz β -1,3-glucanase. Provavelmente, estas enzimas estejam vinculadas à fitopatogenicidade deste ascomiceto, visto que ele atua como endofítico.

2.4 MÉTODOS MOLECULARES UTILIZADOS EM FUNGOS FILAMENTOSOS

O uso de marcadores morfológicos para a classificação de fungos filamentosos utilizado na taxonomia clássica requer além do crescimento adequado, o conhecimento amplo sobre as estruturas assexuais e sexuais nestes microrganismos (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999), por isso o desenvolvimento de técnicas de Biologia Molecular para a diferenciação genética de espécies, ou até mesmo de indivíduos, resultou em notáveis avanços na taxonomia fúngica, devido à sensibilidade e especificidade.

O emprego da reação de polimerase em cadeia (PCR) descrita por Mullis e Fallona (1987) tornou-se uma importante ferramenta, permitindo aliar rapidez à eficiência para obtenção de produto amplificado. Esta técnica baseia-se na multiplicação *in vitro* de uma determinada seqüência de DNA em muitas cópias deste segmento, utilizando a enzima DNA polimerase, cofatores, desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP'S) e oligonucleotídeos. A reação de PCR ocorre com a desnaturação das fitas de DNA através da elevação da

temperatura para 92°C a 95°C, pareamento de um par de oligonucleotídeos, sintetizados artificialmente, utilizados como iniciadores à temperatura de 35°C a 60°C e extensão ou alongamento das novas fitas de DNA pela enzima DNA polimerase à temperatura de 72°C. Na extensão os dNTP's e co-fatores fornecem elementos necessários para formação de novas fitas de DNA. Assim, ao final deste primeiro ciclo 2 novas fitas são formadas, a amplificação segue uma progressão geométrica até 40 ciclos proporcionando um número elevado de cópias de DNA de uma seqüência de interesse (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

A PCR tem como grande vantagem, sobre outros métodos, o tempo de detecção reduzido de dias para apenas algumas horas, permitindo a análise de um pequeno número de células fúngicas ou mesmo simples esporos, materiais secos de herbário ou organismos já extintos (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999). Uma outra vantagem que se aplica aos fungos toxigênicos, é que esta técnica permite diagnosticar microrganismos, mesmo que estes não sejam mais viáveis. Assim, uma amostra que foi contaminada em um dado momento, fornecerá resultado positivo indicando a possibilidade de conter micotoxinas, uma vez que estas são altamente estáveis (SARTORI, 2005).

Esta técnica de amplificação de DNA *in vitro*, tem sido intensamente utilizada na pesquisa microbiológica para estudos filogenéticos, taxonômicos, epidemiológicos e na clínica médica para aplicação de diagnóstico, surgindo assim à partir de seu princípio básico, algumas variações conforme os objetivos em análise, como: PCR em Tempo Real que têm permitido a quantificação da biomassa fúngica (HEID et al., 1996; JORDAN, 2000); PCR multiplex (PCR-m), que consiste na amplificação de várias seqüências alvo simultaneamente, devido ao uso de vários pares de *primers* em uma mesma reação (CHAMBERLAIN et al., 1988);

Amplificação dos espaços internos transcritos do DNA ribossomal (DNAr) de qualquer fungo independente do seu gênero, utilizando *primers* universais, sendo seu produto posteriormente utilizado para seqüenciamento de nucleotídeos (WHITE et al., 1990); PCR-RAPD, (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) que detecta o grau de similaridade entre os genótipos, nos níveis inter e intra-específico, empregando *primers* curtos e de seqüência arbitrária (WELSH; McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990); o uso de enzimas de restrição para hidrolisar fragmentos de DNA amplificados por PCR é denominado de PCR-RFLP e também têm sido usado como ferramenta para análise molecular em fungos filamentosos (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

A PCR aliada ao seqüenciamento de nucleotídeos, RAPD ou à hidrólise por enzimas de restrição de uma dada seqüência do DNA, principalmente de DNA ribossomal (rDNA), têm permitido avanços nos estudos taxonômicos em fungos (DENMAN et al., 2000; HENRY; IWEN; HINRICHS, 2000; SLIPPERS et al., 2004; ALVES et al., 2005).

2.4.1 Identificação molecular por meio do DNA ribossomal (rDNA)

A correta identificação de fungos é uma prática importante em diferentes áreas da ciência. A variedade fúngica e sua diversidade morfológica são insuficientes para permitir a sua clara identificação, entretanto, alguns grupos de maior importância econômica e patológica têm sido intensamente estudado.

A amplificação de DNA ribossomal (rDNA) foi uma das primeiras aplicações da PCR na micologia (WHITE et al., 1990). As seqüências de nucleotídeos que codificam para a formação de RNA ribossômico (rDNA), são encontradas universalmente nas células de eucariontes, estas apresentam-se como um agrupamento gênico (unidade de rDNA), o qual é intensamente repetido no genoma. Cada unidade de repetição inclui três genes: rDNA 18S, rDNA 5.8S e rDNA 28S (Figura 7).

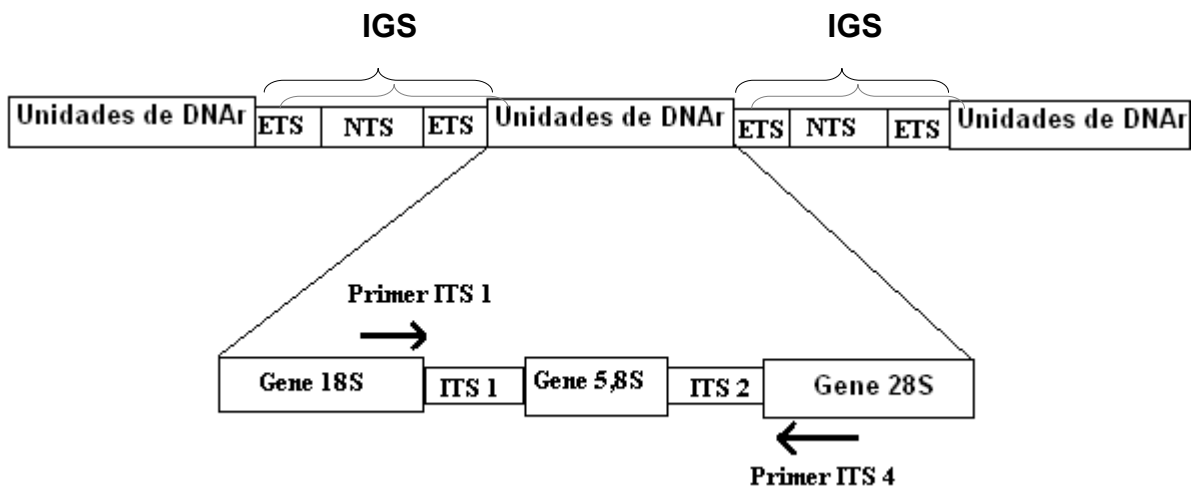


Figura 7 - Representação esquemática da organização das unidades do DNA ribossomal no genoma fúngico e dos *primers* universais ITS1 e ITS4.

Fonte: Elaboração do autor.

Em cada unidade, os genes são separados por duas regiões, os espaços internos transcritos, ou seja, ITS1 e ITS2. Por outro lado, duas unidades de rDNA são separadas pelo espaço intergênico, o IGS (*Intergenic Spacer*) (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999).

A unidade de rDNA apresenta-se constituída de regiões altamente conservadas, correspondentes aos genes, como é o caso da região 18S, sendo portanto, muito útil na comparação de organismos distantemente relacionados; já a

porção 28S é um pouco mais variável em relação à 18S e portanto, apropriada para a comparação de diferentes gêneros. Por outro lado, os espaços internos transcritos, referentes às regiões ITS 1 e 2, evoluem mais rapidamente na unidade de rDNA, sendo as seqüências destas regiões, apropriadas para discriminar espécies relacionadas, ou até mesmo, variedades de uma mesma espécie (FUNGARO, 2000).

Uma vez que os genes 18S e 28S apresentam regiões altamente conservadas, *primers* ditos universais (ITS1 e ITS4) foram desenhados (WHITE et al., 1990), permitindo a amplificação dos espaços internos transcritos de qualquer fungo, independente do gênero a que pertence. A região amplificada, no entanto, compreenderá o ITS1, o 5.8S e o ITS2, a qual poderá ter seqüência de nucleotídeos variáveis entre espécies distintas, porém seqüências conservadas entre linhagens de uma mesma espécie, permitindo assim sua identificação (SKOUBOE et al., 1999; FUNGARO, 2000).

A amplificação de regiões através da PCR seguida do seqüenciamento do produto e análise de similaridade com seqüências já depositadas em bancos de dados, como por exemplo, do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (NCBI), tem sido utilizada freqüentemente para a identificação de espécies fúngicas relacionadas.

Henry, Iwen e Hinrichs et al. (2000), analisaram 6 isolados fúngicos de *Aspergillus* sp. utilizando o seqüenciamento da região ITS (ITS 1 - 5,8S - ITS 2) para a identificação fúngica à nível de espécie, em pacientes imunodeprimidos com aspergilose invasiva. Os produtos amplificados e seqüenciados pelo ITS geraram fragmentos de tamanho que variaram de 564 a 613 pb. Suas seqüências foram então comparadas, às demais seqüências depositadas no *GenBank*, permitindo a

identificação precisa de *Aspergillus* à nível de espécie. Para os autores a aplicação clínica deste estudo permite o rápido diagnóstico, facilitando a seleção de agentes antifúngicos efetivos para o tratamento dos pacientes imunodeprimidos com aspergilose invasiva.

Magnani et al. (2005), relataram o uso de seqüenciamento dos espaços internos transcritos (ITS1-5,8S-ITS2) do DNA ribossomal (rDNA), para a identificação inter-específica de 108 isolados de *Aspergillus* spp, que contaminaram o interior de grãos de café, em 16 propriedades produtoras do norte do estado do Paraná. Estes isolados foram coletados em diferentes estágios de maturação, sendo correlacionado com a produção de ocratoxina A. Os resultados detectaram a presença de espécies potencialmente ocratoxigênicas em 82% das regiões paranaenses analisadas, sendo dentre estas, *Aspergillus niger* a espécie mais freqüentemente detectada, seguida por *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius*. Observaram também, que em linhagens de *A. ochraceus*, existiam algumas diferenças nucleotídicas observados pelos dados de RAPD, ITS1-5,8Sgene-ITS2 do DNA ribossomal (rDNA), mas nenhuma correlação pôde ser notada quanto à produção de ocratoxina A nas linhagens analisadas.

Seqüências das regiões ITS do DNA ribossomal (rDNA) vêm sendo utilizadas na identificação criteriosa de *Botryosphaeria*. A amplificação do fragmento do rDNA de aproximadamente 1200pb, incluindo as regiões ITS1-5.8S-ITS2, gerou um total de 56 fragmentos de restrição, utilizando as enzimas: *AluI*, *AsuI*, *HaeIII*, *MboI*, *NciI* e *TaqI*. Polimorfismo intraespecífico foi detectado apenas em *Botryosphaeria parva* e *Botryosphaeria dothidea*. Anamorfos de *Fusicoccum* foram divididos em *clusters* diferentes, sendo que o primeiro corresponde aos isolados de *B. dothidea* e o outro corresponde às espécies *B. lutea*, *B. ribis* e *B. parva* com

aproximadamente 90% de similaridade. Neste último agrupamento as espécies *B. lutea* e *B. ribis* formaram um sub-agrupamento com aproximadamente 94% de similaridade, diferenciadas pelas endonucleases *HaeIII* e *AsuI*. Já as espécies com anamorfos *Diplodia* formaram um *cluster* contendo os isolados de *Botryosphaeria stevensii* e *Botryosphaeria obtusa* (~ 82% de similaridade), que foram separados do *Botryosphaeria corticola*. As duas espécies de anamorfos *Dothiorella* (*B. sarmentorum* e *Botryosphaeria ibérica*) tiveram 96% de similaridade, sendo separadas pela endonuclease *AsuI*. A única espécie que formou um *cluster* separadamente das demais espécies, foi o *B. rhodina* (anamorfo *Lasiodiplodia theobromae*) (ALVES et al., 2005).

Garcia et al. (2004) identificaram o *Botryosphaeria* sp. (MAMB-5) descrito por Barbosa et al. (1995), à nível de espécie, como *Botryosphaeria rhodina*, por meio de seqüenciamento da região ITS1-5,8Sgene-ITS2 do DNA ribossomal (rDNA). O produto amplificado correspondente a 504pb, foi alinhado e comparado com seqüências conhecidas de outras espécies de *Botryosphaeria*. Esta informação taxonômica é de grande valia para estudos subseqüentes quanto ao seu comportamento bioquímico e genético, quando comparado aos seus próprios anamorfos (*Lasiodiplodia theobromae*) ou até mesmo a outras espécies de *Botryosphaeria* (tanto nos estágios teleomorfos ou anamorfos), além de proporcionar mudanças na denominação este isolado até aqui apresentadas, sendo agora denominado *Botryosphaeria rhodina* e não mais *Botryosphaeria* sp (MAMB-5).

2.4.2 Polimorfismo Genético de Microrganismos Utilizando o RAPD-PCR e sua Correlação com Características individuais

As várias mudanças ocorridas durante o processo evolutivo dos microrganismos, fazem com que estes desenvolvam vias metabólicas diferentes, dependentes das condições de cultivo como a fonte de energia e nitrogênio, temperatura, pH, etc, para manutenção e perpetuação da espécie. Como consequência disso, pequenas mudanças genéticas vão se acumulando durante o processo evolutivo permitindo a diferenciação e identificação de microrganismos à nível de gêneros e espécies.

Técnicas moleculares são poderosas ferramentas para análise genômica de muitos microrganismos (HSEU et al., 1996; SUNAGAWA; MAGAE, 2005; PARVATHI et al., 2005) e tem sido utilizada para classificar linhagens baseadas em alguma característica que este microrganismo desenvolve ao longo do tempo (BHATTACHARYA; RANADE, 2001; HAHN et al., 2003).

A técnica de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) é uma estratégia alternativa baseada em PCR que apresenta alta sensibilidade para geração de uma classe polimórfica de marcadores moleculares, capazes de detectar diferenças sem necessidade de conhecimento de seqüências de DNA do organismo investigado (WELSH; McCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990). Esta técnica identifica o grau de similaridade entre os genótipos, nos níveis inter e intra-específico, obtendo-se informações de muitos locos. Uma das grandes vantagens da técnica de RAPD é que não se escolhe *a priori* a região a ser amplificada, ao contrário disso, utilizam-se *primers* curtos e de seqüências arbitrárias de bases e

analisam-se os produtos amplificados. Os polimorfismos gerados após a amplificação com estes *primers* são reconhecidos pela presença ou ausência de fragmentos amplificados num genótipo em relação a outro (FUNGARO; VIEIRA, 2001).

O PCR-RAPD, não necessita de isótopos radioativos e nem de grandes quantidades de DNA, permitindo aliar baixo custo, rapidez e simplicidade, na geração de uma quantidade de segmentos de DNA polimórficos, distribuídos por todo o genoma do organismo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Esta técnica, têm sido amplamente utilizada na pesquisa microbiológica com o propósito de identificar o grau de similaridade entre os genótipos, nos níveis inter e intra-específico, correlacionando com a virulência, resistência a antibióticos ou produção enzimática, origem geográfica, fornecendo dados epidemiológicos para aplicação clínica.

A diferenciação inter e intraespecífica de linhagens microbianas tem sido o foco da técnica de RAPD, pois além de ser um método sensível é também prático e barato. Parvathi et al. (2005) diferenciou linhagens de uma bactéria patogênica de ostras denominada *Vibrio vulnificus* em dois grupos distintos geneticamente nas águas da Índia. Outros microrganismos tem sido alvo de investigações por esta técnica como: *Aspergillus fumigatus* (BRANDT et al., 1998), *Hanseniaspora* e *Kloeckera* (CADEZ et al., 2002), *Cândidas albicans* (CIRAK; KALKANCI; KUSTIMUR, 2004).

Em cepas virulentas de *Trichomonas vaginalis* foi observada uma correlação entre o quadro clínico sintomático e a variabilidade genética por RAPD, sendo encontrado um marcador genético de 400pb para possível identificação da infecção. (ROJAS; FRAGA; SARIEGO, 2004).

Outros estudos correlacionaram a virulência de suas cepas à técnica de RAPD, como: amostra clínica de *Aspergillus fumigatus* de pacientes com aspergilose (BERTOUT et al., 2001), bactéria *Fusobacterium nucleatum* ocasionando doença periodontal (GEORGE et al., 1997), *Flavobacterium columnare* causando doença em peixes (THOMAS-JINU; GOODWIN, 2004), todos com alto grau de polimorfismo genético, demonstrando que estas linhagens polimórficas têm um agrupamento diferencial.

Muitos parâmetros podem ser observados ao mesmo tempo utilizando a ferramenta RAPD, como foi demonstrado por Hahn et al. (2003), onde linhagens de *Paracoccidioides brasiliensis* foram analisados em relação a importantes perfis epidemiológicos, sendo discriminado no agrupamento os isolados com características peculiares, levando-se em conta a origem geográfica dos isolados, formas clínica da doença humana e suscetibilidade *in vitro* as drogas anfotericina B e sulfametoxazol-trimetropina.

A utilização de ferramentas moleculares para a seleção de microrganismos é uma prática que facilita não só o processo de aquisição do produto quanto o seu custo final, possibilitando a identificação de linhagens de interesse biotecnológica.

A comparação entre as características genéticas e as propriedades fenotípicas ou biotecnológicas de microrganismos permite uma relação com efeito produtivo nas mais diversas áreas. Vargas et al. (2003) demonstraram não haver correlação entre dados do RAPD e a atividade enzimática proteolítica e quitinolítica de 5 linhagens de *Nomuraea rileyi*. Porém observou-se que algumas linhagens de *Streptococcus thermophilus* isolados de produtos de queijaria apresentaram-se agrupadas no dendrograma de similaridade genética gerado por RAPD, sendo estas

linhagens produtoras de exopolissacarídeo, fermentadores de galactose e urease negativa, respectivamente (MORA et al., 2002).

Hseu e colaboradores (1996) utilizaram duas ferramentas importantes da biologia molecular para diferenciação e caracterização de isolados fúngicos de *Ganoderma lucidum*, sendo estes: seqüenciamento do produto da região ITS do rDNA e marcadores RAPD. A utilização de seqüenciamento dos espaços internos transcritos do gene rDNA identificou espécies de *Ganoderma lucidum* que não puderam ser identificados pelos métodos tradicionais. No entanto, no perfil RAPD obtido pôde-se observar que as linhagens em questão foram diferenciadas entre grupos distintos. Estes métodos aliados permitem obter mais informações a respeito da taxonomia, epidemiologia e genética de microrganismos, sendo sua propagação monitorada com marcadores RAPD, enquanto que o seqüenciamento via ITS ajuda na identificação do patógeno no mundo.

Com o objetivo de detecção de linhagens toxigênicas de *Aspergillus*, Fungaro et al. (2004), utilizaram um total de 29 linhagens de *A. carbonarius*, 16 linhagens de *A. tubingensis* e 29 linhagens de *A. niger*, coletada de grãos de café brasileiros e submetidas a análises RAPD. As três espécies foram agrupadas dentro de três grandes *clusters*. Um fragmento com tamanho de 809pb foi presente em todos os *A. carbonarius* e ausente nas espécies *A. niger* e *A. tubingensis*, obtido com o *primer* OP-X7. Este fragmento foi clonado e seqüenciado, utilizando os pares de *primers* exclusivamente desenhados: OPX7F₈₀₉ e OPX7R₈₀₉. A especificidade dos *primers* foi testada em linhagens de *A. carbonarius*, *A. niger* e *A. tubingensis* coletados em diferentes regiões brasileiras (Paraná, São Paulo e Minas Gerais) e Argentina, outros isolados distantemente relacionados também foram testados, sendo estes: *A. tamari*, *A. ochraceus* e *A. flavus*. Uma banda de amplificação de

809pb foi detectada em todas as linhagens de *A. carbonarius* sendo ausente nos demais isolados, porém estes dados não apresentaram correlação com a produção de ocratoxina A. Para a geração de um par de *primers* que permita detectar linhagens toxigênicas das não toxigênicas, foi realizada uma segunda RAPD utilizando 23 linhagens produtoras de ocratoxina A e 6 linhagens não produtoras de ocratoxina A. As análises RAPD demonstraram não haver correlação entre os genótipos e linhagens produtoras desta micotoxina.

Neste mesmo sentido, Sartori et al. (2005) não só identificou um marcador molecular para *A. niger* como também desenvolveu um PCRm que permite detectar ao mesmo tempo, três espécies fúngicas (*A. carbonarius*, *A. ochraceus* e *A. niger*), potencialmente ocratoxigênicas em amostras de café naturalmente contaminadas. Um total de 44 isolados do “agregado *A. niger*” foram obtidos de grãos de café de diferentes regiões brasileiras, Espanha, Turquia e Argentina. Os resultados RAPD mostraram 2 grandes *clusters*, identificado pelo seqüenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA como *A. niger* (grupo 1) e *A. tubingensis* (grupo 2). Como apenas o *A. niger* produz ocratoxina A, estudos subseqüentes por RAPD, identificou apenas nesta espécie, um fragmento com 372pb, obtido com o primer OPX7₃₇₂. Desenho de primers específicos foram obtidos (OPX7F₃₇₂ e OPX7R₃₇₂) e testados em todas as amostras de *Aspergillus* de diferentes substratos. O ensaio de PCR desenvolvido para identificação de cultura pura de *A. niger* foi bem sucedido, sendo visualizadas bandas de 372pb, apenas nestes isolados puros. O ensaio de PCR multiplex (PCRm) para detecção de *A. carbonarius* (809pb), *A. ochraceus* (260pb) e *A. niger* (372pb), simultaneamente, foi possível, utilizando os pares de primers desenhados: OPX7F₈₀₉ e OPX7R₈₀₉; OCA – V; OCA – R e OPX7F₃₇₂ e OPX7R₃₇₂, respectivamente.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Comparar os 9 isolados de fungos *Botryosphaeriaceus* ao nível enzimático e genético, utilizando o *Botryosphaeria rhodina*, como referência.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a produção de lacases, pectinases e β -1,3-glucanases constitutivas pelos nove isolados fúngicos utilizando glucose como única fonte de carbono.
- Verificar a influência do álcool veratrílico na produção enzimática de lacases, pectinases e β -1,3-glucanases pelos nove isolados, nas condições previamente otimizadas para o *Botryosphaeria rhodina*;
- Confirmar a identificação das espécies de *Lasiodiplodia theobromae* e *Botryosphaeria ribis* coletadas de diferentes procedências, através do seqüenciamento das regiões ITS 1 e 2 e o gene 5.8S (ITS1-5.8Sgene-ITS2) do DNA ribossomal (rDNA);
- Avaliar a diversidade genética dos isolados do gênero *Botryosphaeria* através dos polimorfismos do DNA amplificado ao acaso (RAPD) e variações nas seqüências de nucleotídeos da região ITS1-5.8Sgene-ITS2 do rDNA, correlacionando-as com a produção de enzimas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS

Os microrganismos analisados neste trabalho foram: *Botryosphaeria rhodina*, isolado de cancro de eucalipto conforme descrito por Barbosa et al. (1996) e identificado por Garcia et al. (2004); *Botryosphaeria ribis* (SILVEIRA et al., 1996) isolado de tronco de eucalipto no Estado de São Paulo (Brasil) e *Lasiodiplodia theobromae* (SILVEIRA et al., 1996), isolado da madeira currupixá em Belém no Estado de Pará (Brasil), doados pelo Dr. T. L. Krugner, Dept. de Fitopatologia da ESALQ (USP) de Piracicaba (Brasil). Os outros isolados, na forma anamorfa de *Botryosphaeria* (*Lasiodiplodia theobromae*), foram coletados de frutos (laranja, pinha, graviola, manga), de folha de mangueira e de uma leguminosa (berinjela), no nordeste do Brasil, mais especificamente, no Estado de Pernambuco, os quais foram gentilmente doados pela Dr^a Maria Menezes do Dept. de Fitossanidade da UFRPE de Recife (PE), conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 - Códigos dos microrganismos em seu estágio teleomorfo e anamorfo isolados de diferentes partes e espécies vegetais

Códigos	Isolados de <i>Botryosphaeria</i>	Espécie vegetal	Parte isolada
<i>B. rh.</i>	<i>B. rhodina</i>	<i>Eucaliptus spp</i>	Cancro
<i>B. ribis</i>	<i>B. ribis</i>	<i>Eucaliptus citriodora</i>	Cancro
<i>L.th.Cur.</i>	<i>L. theobromae</i>	<i>Micropholis venulosa</i>	Madeira currupixá
<i>L.th.Ber.</i>	<i>L. theobromae</i>	<i>Solanum melongena</i>	Leguminosa (berinjela)
<i>L.th.Grav.</i>	<i>L. theobromae</i>	<i>Annona muricata</i> L.	Fruto (graviola)
<i>L.th.Lar.</i>	<i>L. theobromae</i>	<i>Citrus sp</i>	Fruto(laranja)
<i>L.th.M.Fo.</i>	<i>L. theobromae</i>	<i>Mangifera indica</i> L.	Folha (de mangueira)
<i>L.th.M.Fru.</i>	<i>L. theobromae</i>	<i>Mangifera indica</i> L.	Fruto (manga)
<i>L.th.Pi.</i>	<i>L. theobromae</i>	<i>Annona squamosa</i> L.	Fruto (pinha)

Estes microrganismos foram mantidos em meio sólido inclinado de BDA (batata-dextrose-ágar) a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, tendo sido repicados trimestralmente. O método de Castellani foi usado para manutenção permanente dos isolados fúngicos (CASTELLANI, 1967).

4.2 PREPARO DO INÓCULO

O inóculo para o cultivo em meio líquido foi iniciado pelo repique dos microrganismos em placas de Petri contendo meio mínimo de sais (VOGEL, 1956), ágar (2% p/v) e glucose 1% (p/v) como fonte de carbono. As placas foram incubadas durante 5 dias à $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Decorrido este tempo, três esferas de 7mm foram removidas do meio sólido e utilizadas como inóculo para cultivo em meio submerso.

4.3 CULTIVO EM MEIO SUBMERSO

Os cultivos foram desenvolvidos em frascos de Erlenmeyers de 125ml, com quatro inserções nas paredes, contendo meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956), glucose 1% (p/v), acrescido ou não de álcool veratrílico (álcool 3,4 dimethoxibenzilíco) na concentração de 30,4mM. O volume total de cada cultivo foi de 25ml, tendo sido incubados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ numa rotação de 180rpm, por 4,5 dias conforme Vasconcelos et al. (2000). Os resultados representam a média e desvio

padrão de 3 repetições do cultivo na presença (c/AV) e na ausência (s/AV) de álcool veratrílico.

4.4 INTERRUPÇÃO DOS CULTIVOS

Os cultivos foram interrompidos através de centrifugação a 9000rpm a 4°C por 20min. Os sobrenadantes foram filtrados em lã de vidro e coletados sob banho de gelo. A biomassa fúngica foi determinada por gravimetria. Também foram determinados os valores de pH dos sobrenadantes dos cultivos (pH final) e também dos frascos-controle (meios sem microrganismo) que correspondiam ao pH inicial. Os filtrados foram mantidos a 4°C, e utilizados nas determinações analíticas.

4.5 DETERMINAÇÕES ENZIMÁTICAS

4.5.1 Determinação da Atividade de Lacase

A atividade de lacase foi determinada utilizando-se dois substratos: 1) ABTS(2,2¹- azino-bis ácido (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (Sigma, USA), pH 3.0 (Tampão Mc'Ilvaine 120 mM) a temperatura 50°C (BARBOSA; DEKKER; St HARDY, 1996); 2) DMP (2,6-dimetoxifeno) (Fluka Chemika AG, Switzerland), pH 6,5 (Tampão Mc'Ilvaine 170mM) a temperatura 45°C (VASCONCELOS et al., 2000). Estes

ensaios foram incubados durante 5min, o volume final da reação foi 1ml. A atividade de lacase foi expressa como o número de μmoles de substrato oxidado por $\text{min}\cdot\text{ml}^{-1}$ de extrato enzimático nas condições descritas.

4.5.2 Determinação da Atividade de Pectinases e β -1,3-Glucanases

As atividades de pectinase e β -1,3-glucanase foram determinadas utilizando-se pectina 1% e laminarina 0,4% como respectivos substratos, a pH 5.0 (Tampão Acetato) a temperatura de 50°C por 20 minutos, para ambas determinações. A reação foi interrompida pela adição de 0,05ml de NaOH 1M, e a atividade enzimática foi expressa como o número de μmol de açúcar reduzido liberado por $\text{min}\cdot\text{ml}^{-1}$, determinado pelo método Somogyi (1945) e Nelson (1944).

4.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

Os açúcares redutores foram determinados segundo Somogyi (1945) e Nelson (1944) e os carboidratos totais, segundo Dubois et al. (1956), ambas as determinações utilizaram a glucose como padrão na concentração de 0,1g% e 0,01g%, respectivamente.

As proteínas foram determinadas pelo método de Bradford (1976), utilizando-se soro de albumina bovina (0,1mg/ml), como padrão.

4.7 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

As células fúngicas foram obtidas conforme os itens 4.2 e 4.3, na ausência de álcool veratrílico. Posteriormente, a biomassa fúngica foi separada do sobrenadante por centrifugação a 9000rpm por 20 minutos.

Os ácidos nucleicos foram extraídos segundo Bogo et al. (1996), com modificações. Os micélios foram submetidos a lavagens com água destilada e coletados por filtração a vácuo, para posterior maceração com nitrogênio líquido e obtenção de um pó fino. Após acondicioná-los em tubos de 2,5ml, adicionou-se 800µl de tampão de extração (Tris HCl 200mM; NaCl 250mM; EDTA 25mM; SDS 1%; água ultrapura). Após a homogeneização, os microtubos foram incubados a 65°C, por 30min. Ao término, 800µl da solução clorofane (fenol:clorofórmio 1:1) foram adicionados aos tubos, com posterior centrifugação por 10min a 12.000rpm.

A fase aquosa resultante de cada isolado foi transferida para novos microtubos e adicionados 800µl de clorofórmio. Após centrifugação a 12.000rpm por 5min, novamente a fase aquosa foi transferida para novos microtubos (aproximadamente 400µl em cada tubo), e 1/10 do volume de NaCl 3M foi acrescentado (aproximadamente 40µl). Em seguida, adicionou-se dois volumes (aproximadamente 1ml) de etanol absoluto resfriado a -20°C. A mistura foi incubada a -20°C por 1 hora, para a precipitação dos ácidos nucleicos. Em seguida, as amostras foram novamente submetidas à centrifugação de 12.000rpm durante 5min, descartando-se os sobrenadantes.

Os sedimentos resultantes foram lavados com álcool etílico 70%, sob centrifugação a 12.000rpm durante 5min, sendo descartados em seguida,

repetindo-se este procedimento por duas vezes. Após o descarte dos sobrenadantes, os microtubos foram mantidos à temperatura ambiente até a completa secagem do DNA.

Os ácidos nucleicos foram ressuspensos em 100µl de água ultrapura e mantidos a 37°C durante 30min, sendo então, congelados e mantidos até o uso à -20°C.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

Utilizou-se amostras de DNA submetidas a 37°C por 18h. Aplicou-se soluções de 4µl de DNA, (2µl de DNA e 2µl de azul de Bromofenol) em gel de agarose 2,0% com tampão TEB 1x, diluído à partir da solução de tampão estoque TEB 10x (Tris-base 890mM, H₃BO₃ 890mM, EDTA 20mM pH 8,0), conforme descrito por Sambrook e Russel (2001). Em seguida aplicou-se 2µl dos marcadores de peso molecular, sendo estes: 2,5µg; 5µg; 10µg; 15µg e 20µg. Os géis foram previamente tratados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV após eletroforese a 80 V, tendo sido então fotografados. Após a quantificação as amostras foram diluídas a fim de ajustar a concentração do DNA para 5ng/µl.

4.9 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES ITS1 – 5.8S - ITS2 DO rDNA

Os fragmentos de DNA ribossomal (rDNA) relacionados à região dos espaços internos transcritos 1 e 2 (ITS1-5.8S-ITS2) foram amplificados por PCR. Para a reação de amplificação os *primers* utilizados foram ITS1 (5' TCC gTA ggT gAA CCT gCg g 3') e ITS4 (5' TCC TCC gCT TAT TgA TAT gC 3') (WHITE et al., 1990). Para a análise das regiões ITS as reações de amplificação foram preparadas em um volume final de 100µl, subdivididos em 4 reações de 25µl cada. Os reagentes contidos na reação de 25µl, foram: 2,5µl de tampão (*Invitrogen Life Technologies*, USA - 200mM Tris-HCl pH 8,4; 500mM KCl; 10x concentrado), 2,0µl de dNTP (*Invitrogen Life Technologies*, USA - 2,5mM), 1,5µl de *primer* ITS1 (*Invitrogen Life Technologies*, USA - 10 pmol/µl), 1,5µl de *primer* ITS4 (*Invitrogen Life Technologies*, USA - 10 pmol/µl), 1,0 µl de MgCl₂ (*Invitrogen Life Technologies*, USA - 50mM), 0,2 µl de *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen Life Technologies*, USA - 5U/µl), 2µl da amostra de DNA (5ng/µl) e 14,3µl de água bidestilada. A mistura da reação foi submetida ao termociclador PTC-100 (MJ Reserch, Inc) previamente programado para 35 ciclos após desnaturação inicial de 4min a 92°C. Cada ciclo de amplificação foi constituído de três etapas: desnaturação (92°C, 40seg.), pareamento (55°C, 1min. e 30seg.) e extensão (72°C, 2min.). Ao final dos 35 ciclos foi realizada uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Após a amplificação, as amostras foram analisadas através de eletroforese de gel de agarose 1,0% em tampão TEB 1x corados com brometo de etídio (1µg/ml), (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A visualização ocorreu sob luz UV após eletroforese, sendo então fotografados em fotodocumentador Digi Doc.

4.10 SEQÜENCIAMENTO DAS REGIÕES ITS1 – 5.8S - ITS2 DO rDNA

Os fragmentos de DNA ribossomal amplificados na PCR foram seqüenciados, segundo o método de Sanger, Nicklen e Coulson (1977), utilizando-se os *primers* ITS1 ou ITS4. As reações de seqüenciamento foram realizadas em volume final de 10µl, contendo 2,0µl do *primer* ITS1 ou ITS4 (*Invitrogen Life Technologies*, USA - 3,0 pM/µl), 4,0µl do *kit DYEnamic ET dye terminator Cycle Sequencing* (Amersham, Pharmacia Biotech.), 2,0µl do produto de amplificação do DNAr (100ng/µl) e 2,0µl de água ultrapura. A reação foi submetida a um termociclador *Mastercycler gradiente* (Eppendorf), previamente programado para 35 ciclos após desnaturação inicial de 1min. a 95°C. Cada ciclo de amplificação foi constituído de três etapas: desnaturação (95°C, 20seg.), pareamento (55°C, 15seg.) e extensão (60°C, 1min.), e por fim, um ciclo de extensão final (60°C, 5min.).

Após a amplificação, foi realizada a lavagem da reação de seqüenciamento. Foram adicionados 65µl de etanol 96% e 2µl de acetato de amônio 7,5M. O material foi mantido à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, centrifugou-se por 45 minutos a 25°C, 4.000rpm. Após o descarte do sobrenadante por inversão da placa, procedeu-se, com a placa invertida sobre papel toalha, um pulso a 300rpm por 5 segundos. Em seguida, colocou-se 140µl de etanol 70%, e centrifugou-se por 10min. a 4.000rpm, 25°C. O sobrenadante foi descartado e a placa foi mantida a 37°C por 15 minutos até a completa secagem. O DNA foi ressuspendido em 10µl de água ultrapura, e em seguida este foi submetido à leitura em seqüenciador do tipo “MegaBACE™ 1000 *Molecular Dynamics*” (Amersham,

Pharmacia Biotech). As condições de injeção e eletroforese foram de 2 Kv/60s e 6 Kv/3h e 50min, respectivamente.

4.11 ANÁLISE DAS SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DAS REGIÕES ITS1 – 5.8S - ITS2

A confirmação das espécies foi feita por meio de comparação com as seqüências previamente depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (2005) com auxílio da ferramenta computacional BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). O critério utilizado para a identificação foi a análise do *score* obtido pelo alinhamento da seqüência com as depositadas no banco de dados e a seqüência que apresentou melhor *match* no alinhamento.

Para a análise filogenética, utilizou-se o pacote computacional *BioEdit* (HALL, 1999) para a realização dos alinhamentos sendo que ajustes manuais foram realizados quando necessários. Os alinhamentos foram convertidos em distâncias genéticas pelo modelo de Kimura dois-parametros e a reconstrução filogenética realizou-se por meio da metodologia de *Neighbor-Joining* (NJ) (SAITOU; NEI, 1987) com auxílio do pacote computacional *Phylogeny Inference Package* (PHYLIP version 3.57; FELSENSTEIN, 1993).

4.12 ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE DNA AMPLIFICADO AO ACASO (RAPD)

Para a análise de RAPD (WILLIAMS et al., 1990) as reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 10µl, contendo 1µl de DNA (5ng/µl), 1µl de tampão (*Invitrogen Life Technologies, USA*), 0,45µl de MgCl₂ (*Invitrogen Life Technologies, USA-50mM*), 1µl de dNTP (*Invitrogen Life Technologies, USA - 0,4mM de cada dNTP*), 1µl de *primer* de seqüência arbitrária (*Operon Technologies, Alameda, CA - 5ng/µl*), sendo estes: OPW2, OPW4, OPW5, OPW12, OPW14, OPX9, OPX13, OPX14, 0,2µl de *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen Life Technologies, USA - 5U/µl*) e 5,35µl de água bidestilada. Foram realizadas reações controle negativas omitindo-se o DNA genômico. A mistura da reação foi submetida ao termociclador PTC-100 (*MJ Reserch, Inc.*) previamente programado para 40 ciclos após desnaturação inicial de 3 min a 92°C. Cada ciclo de amplificação foi constituído de três etapas: desnaturação (92°C, 40seg.), pareamento (40°C, 1min. e 30seg.) e extensão (72°C, 2min.). Para finalizar, 5min. a 72°C, foram utilizados para a extensão final. Após o processo de amplificação, os produtos de RAPD foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 2,0% em tampão TEB 1x, corados com brometo de etídio (1µg/ml), (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A visualização ocorreu sob luz UV após eletroforese, sendo então fotografados em fotodocumentador Digi Doc.

4.13 ANÁLISE DOS DADOS RAPD

Os valores de similaridade genética foram obtidos a partir de dados de RAPD com o auxílio do programa computacional NTSYS.PC (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*, Applied Biostatistics, Setauket, NY) (ROHLF, 1987). Estes dados foram introduzidos na forma de variáveis binárias, ou seja, o número 1 significou a presença de banda e o número 0 a sua ausência. Desta forma, o programa construiu uma matriz de similaridade genética utilizando-se do coeficiente de Jaccard (SNEATH; SOKAL, 1973). O valor do coeficiente de similaridade (F) foi calculado pela fórmula: $F = a/a+b+c$, onde a corresponde ao número de concordâncias positivas e, b e c correspondem ao número de discordâncias. Os dados da matriz de similaridade foram utilizados pelo programa para a construção do dendrograma pelo método UPMGA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetical Averages*).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASES CONSTITUTIVAS E INDUTIVAS PELOS DIFERENTES ISOLADOS DE *Botryosphaeria*

Como descrito anteriormente, o fungo *Botryosphaeria rhodina* (*B. rh*) tem sido citado na literatura como um bom produtor de lacases constitutivas, as quais têm a produção significativamente aumentada na presença de elevadas concentrações de álcool veratrílico (AV) (BARBOSA et al., 1995, 1996; VASCONCELOS et al., 2000; DEKKER; BARBOSA, 2001; CUNHA et al., 2003; GIESE et al., 2004). A produção de lacases constitutivas e induzidas pelo AV, por dois isolados brasileiros de *Botryosphaeria* (Tabela 1): *Botryosphaeria ribis* (*B. ribis* - isolado de *Eucalyptus citriodora* - SP) e *Lasiodiplodia theobromae* (*L.th.Cur.* - isolado de *Micropholis venulosa* - PA) foi descrita pela primeira vez em 2001, tendo sido evidenciado que este álcool facilita a secreção de lacases intracelulares para o meio extracelular (VASCONCELOS et al., 2001).

No presente trabalho, a produção de lacases constitutivas e indutivas dos isolados fúngicos acima referidos foi comparada com outros isolados de *L. theobromae* (Tabela 1).

As atividades de lacases constitutivas do *B. rh.*, determinadas com os substratos ABTS e DMP foram $0,06 \text{ U ml}^{-1}$ e $0,01 \text{ U ml}^{-1}$, respectivamente. O *L.th.Cur.*, apresentou atividade semelhante (ABTS $0,05 \text{ U ml}^{-1}$ e DMP $0,01 \text{ U ml}^{-1}$), assim como o *L. th.Lar.* (isolado de laranja) (ABTS $0,06 \text{ U ml}^{-1}$ e DMP $0,01 \text{ U ml}^{-1}$). A

Figura 8 mostra a comparação da produção de lacase constitutiva pelos isolados de *Botryosphaeria* estudados, numa escala no gráfico em ordem crescente de 0,00 a 0,07 U ml⁻¹.

As atividades de lacases de todos os isolados sobre o substrato DMP foram menores do que quando determinadas com o substrato ABTS, confirmando os resultados descritos na literatura para o fungo *B. rhodina* (VASCONCELOS et al., 2000; DEKKER; BARBOSA, 2001; CUNHA et al., 2003; GIESE et al., 2004). Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas atividades de lacases sobre o substrato DMP para todos os isolados de *Botryosphaeria* estudados.

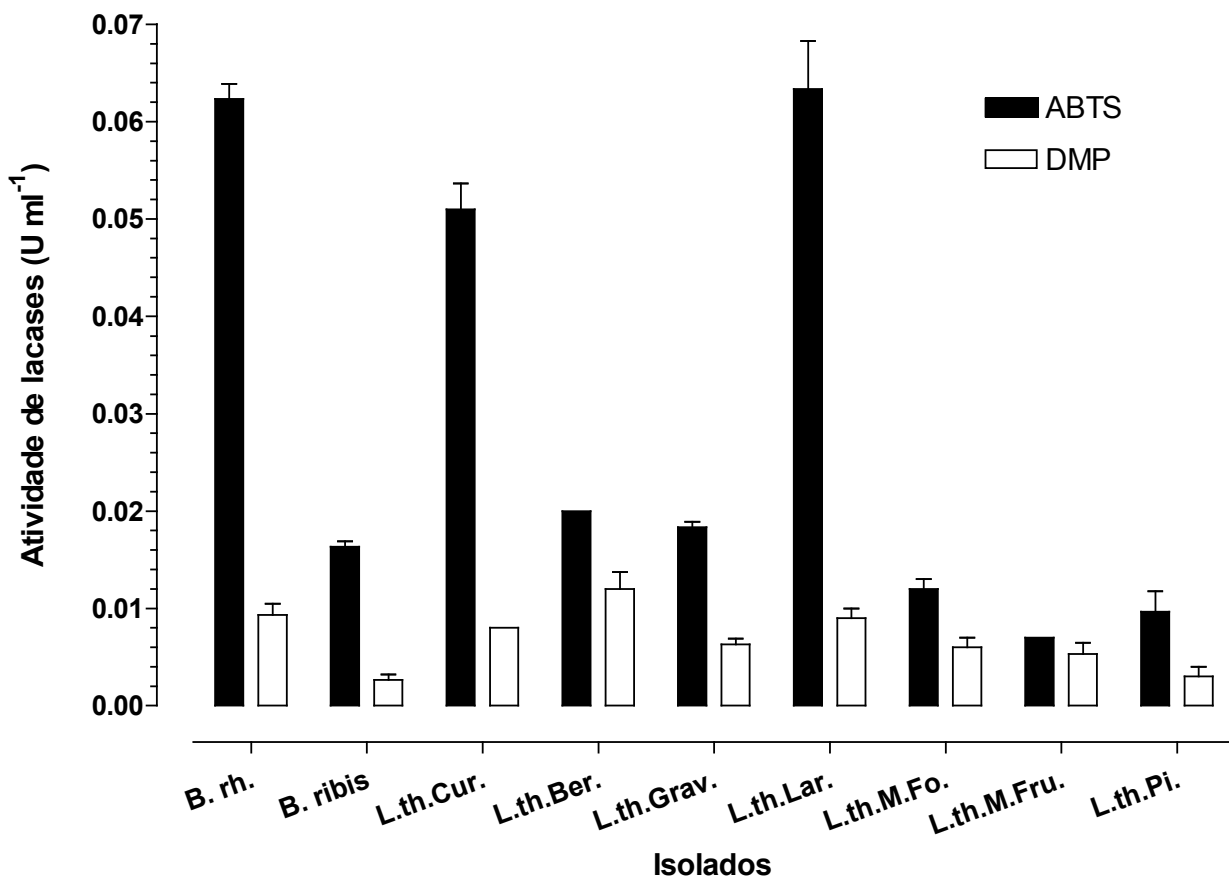


Figura 8 - Perfil comparativo da produção de lacases constitutivas (na ausência de AV) pelos isolados de *Botryosphaeria* nos estágios teleomorfo e anamorfo. Substratos utilizados para a determinação da atividade de lacase: ABTS e DMP, nas condições de ensaio descritas no item (4.5.1).

O AV (álcool 3,4-dimetoxibenzílico), vem sendo estudado como indutor da produção de lacases pelo ascomiceto *B. rhodina*, em concentrações mais elevadas do que as citadas para basidiomicetos (BARBOSA et al., 1996). Um aumento significativo da produção de lacases foi detectado quando foram adicionados 40mM de AV ao meio de cultivo, chegando à concentração máxima de 100mM (DEKKER; BARBOSA, 2001). Estudos de otimização da produção de lacases por *Botryosphaeria rhodina*, utilizando-se planejamento fatorial e análise por superfície de resposta, demonstraram que a concentração ótima de AV foi 30,4mM, sob agitação de 180rpm a 28°C durante 4,5 dias. (VASCONCELOS et al., 2000). Desta maneira, a Figura 9 ilustra a produção de lacase indutiva pelos isolados de *Botryosphaeria* avaliados, numa escala no gráfico em ordem crescente de 0,00 a 6,00 U ml⁻¹.

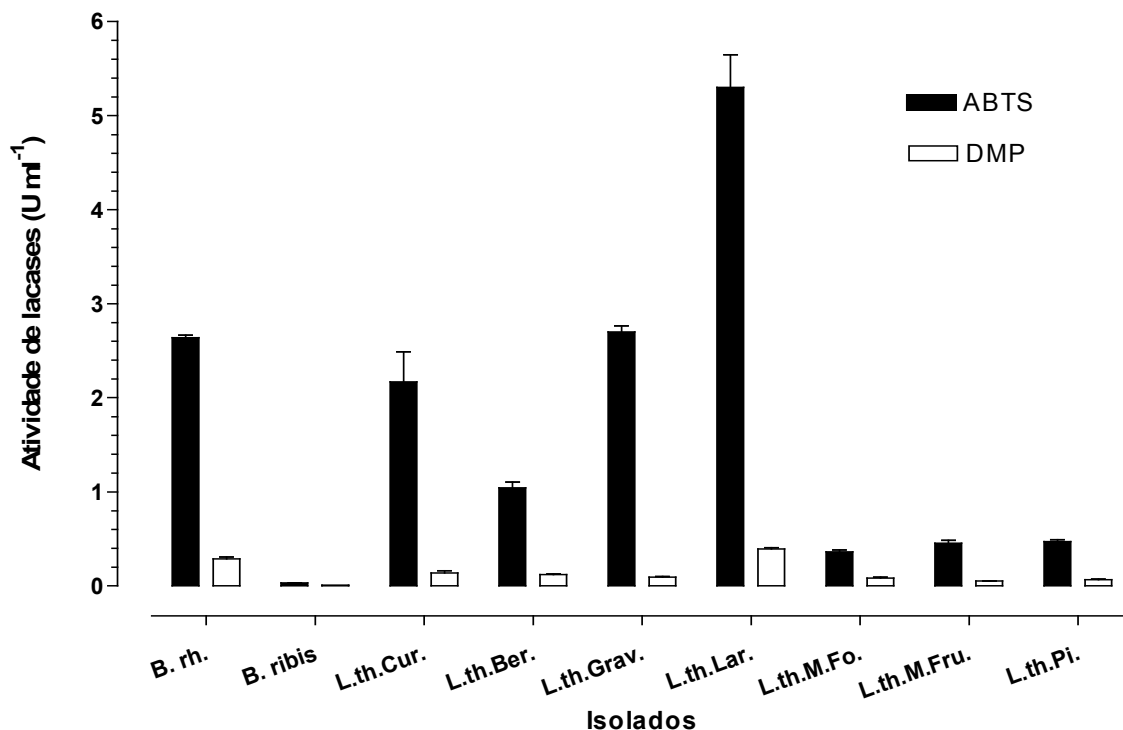


Figura 9 - Perfil comparativo da produção de lacases indutivas (na presença de AV) pelos isolados de *Botryosphaeria* nos estágios teleomorfo e anamorfo. Substratos utilizados para a determinação da atividade de lacase: ABTS e DMP, nas condições de ensaio descritas no item (4.5.1).

O isolado fúngico que mais se destacou como produtor de lacases na presença do AV foi o *L. theobromae* isolado de laranja (*L.th.Lar.* - ABTS 5,30 U ml⁻¹ e DMP 0,39 U ml⁻¹). No caso do fungo *B. rh.*, o valor médio de atividade de lacases indutiva determinada com os substratos ABTS e DMP foi 2,64 U ml⁻¹ e 0,29 U ml⁻¹, respectivamente. Os isolados de *L. theobromae* de manga (folha – *L.th.M.Fo* e fruto – *L.th.M.Fru.*) e de pinha (*L.th.Pi.*), apresentaram os menores valores para atividade de lacases, tanto na presença quanto na ausência de AV, quando comparado aos demais isolados em suas respectivas condições.

As diferenças entre os valores de atividades de lacase dos isolados de *Botryosphaeria* podem ser explicadas pelo fato de serem cepas selvagens, embora pertencentes ao mesmo gênero, são geneticamente diferentes, portanto, potencialmente distintos, apesar de terem sido cultivados sob condições ótimas para a produção de lacases constitutivas e indutivas previamente estabelecidas para o *B. rhodina*, o qual tem sido extensivamente estudado no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da UEL.

Foi possível observar pelos resultados de atividades de lacase que o *B. rh.* e os *L. theobromae* (anamorfo *B. rhodina*) são bioquimicamente distintos do *B. ribis*, visto que as atividades de lacases constitutivas e indutivas por este último, foram muito baixas. Na ausência de AV estas atividades foram 0,02 U ml⁻¹ (ABTS) e 0,002 U ml⁻¹ (DMP) e na presença do álcool veratrílico iguais a 0,03 U ml⁻¹ (ABTS) e 0,01 U ml⁻¹ (DMP). Estes resultados explicam através de parâmetros bioquímicos a diferença entre espécies fúngicas de um mesmo gênero.

5.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PECTINASES PELOS DIFERENTES ISOLADOS DE *BOTRYOSPHAERIA* NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE ÁLCOOL VERATRÍLICO

A parede celular vegetal é composta principalmente por celulose, hemiceluloses e lignina, porém, apresentam outras macromoléculas em sua composição como as pectinas, as quais são polímeros de ácido poligalacturônico. As pectinases constituem o grupo de enzimas capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas da cadeia principal das pectinas e retirar os grupamentos ligados a ela, como metoxilas.

A produção de enzimas pectinolíticas por *B. ribis* foi descrita pela primeira vez em 1960, por McClendon e colaboradores. Posteriormente, apenas dois trabalhos citaram a produção de pectinase pelo gênero *Botryosphaeria*: Dekker et al. (2001) e Cunha et al. (2003). Em 2001, Dekker et al., verificaram que o AV exerce um papel regulador na síntese de lacases, pectinases e xilanases, as quais são enzimas-chave da biodegradação da parede celular lignificada. Os autores constataram que o AV reprime a síntese de xilanase, pectinase, amilase e celulase. Em 2003, Cunha e colaboradores demonstraram que o *Botryosphaeria* sp produziu pectinase constitutivamente, quando cultivado em glucose ou ácido galacturônico como única fonte de carbono, demonstrando que esta enzima não é regulada por glucose e nem reprimida por ácido galacturônico. O ácido galacturônico estimulou a síntese de pectinase e a produção foi ainda maior na presença de pectina. Portanto, este é o primeiro estudo que compara a produção de pectinases constitutivas por isolados do gênero *Botryosphaeria*, assim como o efeito regulador do AV nestas enzimas em uma amostragem maior destes fungos.

A Figura 10 mostra o perfil de produção de pectinases constitutivas pelos isolados de *Botryosphaeria*, quando cultivados em glucose na ausência e na presença de AV.

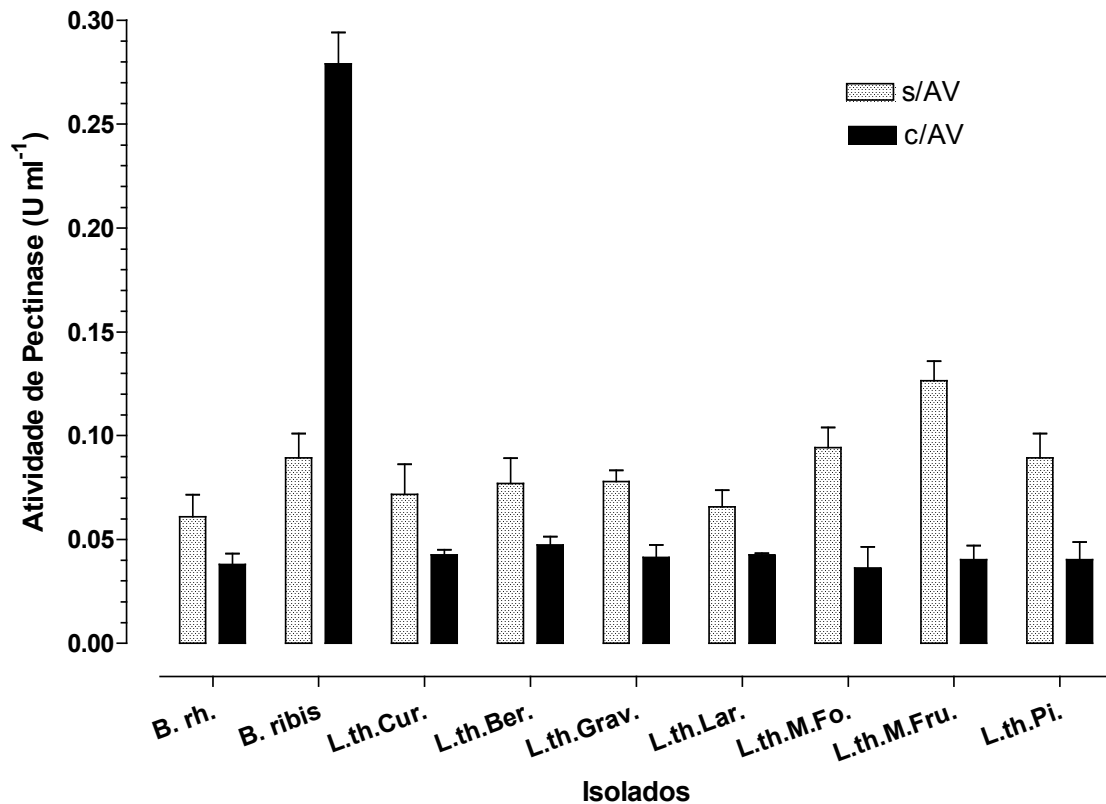


Figura 10 - Perfil comparativo da produção de pectinases pelos isolados de *Botryosphaeria* nos estágios teleomorfo e anamorfo, cultivados na ausência e na presença de AV. Substrato utilizado para a determinação da atividade de pectinase: Pectina 1 %, nas condições de ensaio descritas no item (4.5.2).

Todos os microrganismos avaliados produziram pectinases constitutivamente, não havendo diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre a produção destas hidrolases pelos isolados de *Botryosphaeria* avaliados. Porém, na presença de AV, diferentemente do ocorrido para a produção de lacases, os valores de atividade de pectinase foram menores do que na ausência do álcool (exceção *B.*

ribis). A repressão catabólica da síntese de hidrolases pelo referido álcool aromático confirmou as observações descritas por Dekker et al. (2001). Este mesmo comportamento foi também descrito por Cunha et al. (2003), para o *Botryosphaeria* sp, independentemente da fonte de carbono utilizada, se glucose, ácido galacturônico ou pectina.

Para o *B. ribis*, o AV atuou como indutor da produção de pectinases, visto que a maior atividade ($0,28 \text{ U ml}^{-1}$) foi obtida nos cultivos nos quais este álcool foi adicionado. A indução da produção de pectinases por AV em *B. ribis*, ainda não havia sido descrita na literatura. Portanto, os resultados aqui obtidos confirmam a expressão e regulação genética da produção de pectinases em isolados de *Botryosphaeria*, tanto na forma teleomorfa (*B. rhodina*) como anamorfa (*L. theobromae*) e salienta a diversidade entre espécies, confirmada pelo comportamento bioquímico em *B. ribis*.

5.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE β -1,3-GLUCANASES PELOS DIFERENTES ISOLADOS DE *BOTRYOSPHAERIA* NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE ÁLCOOL VERATRÍLICO

A grande maioria das espécies fúngicas são produtoras constitutivas de β -1,3-glucanases (SANTOS; VILLANUEVA; NOMBELA, 1977; PITSON et al., 1997; SALIGKARIAS, GRAVANIS; EPTON, 2002). A produção destas hidrolases é regulada pelo catabolismo de glucose e, para alguns microrganismos, o excesso de glucose reprime a produção destas enzimas. Esta repressão catabólica foi observada nos cultivos dos fungos *Acremonium persicinum* (PITSON et al., 1991),

Trichoderma harzianum (NORONHA et al., 2000) e *Sclerotium gluconicum* (RAPP, 1989), por exemplo; nos quais as atividades de β -glucanase foram diminuídas ou não-detectadas quando na presença de elevadas concentrações desta fonte de carbono.

A regulação exercida pela glucose envolve a repressão da expressão dos genes que codificam estas enzimas e uma vez consumida a fonte de carbono, ocorre a desrepressão, resultando na síntese das β -1,3-glucanases (NORONHA et al., 2000). Os fungos *B. rhodina* (GIESE et al., 2005) e *S. gluconicum* (RAPP, 1992) constituem exemplos desta regulação no qual ocorre a desrepressão da produção destas glucanases em condições limitadas de glucose. Uma vez que a concentração de glucose fica escassa no meio de cultivo, inicia-se a autólise dos micélios fúngicos e há degradação da β -glucana previamente produzida, devido a atividade de β -glucanases.

De modo geral, a produção de β -1,3-glucanases por fungos está associada aos processos de sobrevivência, degradação de polissacarídeos e patogenicidade (GIESE, BARBOSA, SILVA, 2003).

Giese et al. (2005), relataram pela primeira vez que o *Botryosphaeria rhodina* é um produtor constitutivo de β -1,3-glucanase, comparando-o com uma linhagem de *Trichoderma harzianum*. Ambos os fungos foram cultivados em três diferentes fontes de carbono: glucose, uma β -glucana denominada botriosferana (STELUTI et al., 2004) e material da parede celular de *Botryosphaeria rhodina*. Atividade de β -1,3-glucanase foi detectada nos sobrenadantes dos cultivos com as três fontes de carbono, nas quais houve um aumento crescente da produção, respectivamente, pelos dois microrganismos estudados.

Assim sendo neste trabalho, optou-se por comparar a produção de β -1,3-glucanases constitutivas pelos isolados de *Botryosphaeria*, em estudo, bem como o efeito do AV na síntese destas enzimas visto que ainda não tinha sido descrito.

A Figura 11 mostra a produção de β -1,3-glucanases pelos isolados de *Botryosphaeria* após terem sido cultivados em glucose na ausência e na presença de álcool veratrílico.

Todos os isolados de *Botryosphaeria* produziram β -1,3-glucanases constitutivamente após terem sido cultivados em glucose como única fonte de carbono. A linhagem de *B. ribis* destacou-se entre os outros isolados ($1,293 \text{ U ml}^{-1}$), seguido do *L. theobromae* isolado de laranja - *L.th.Lar.* ($0,698 \text{ U ml}^{-1}$), de graviola *L.th.Grav.* ($0,675 \text{ U ml}^{-1}$), de berinjela - *L.th.Ber.* ($0,485 \text{ U ml}^{-1}$), de madeira *Micropholis venulosa* - *L.th.Cur.* ($0,446 \text{ U ml}^{-1}$) e de pinha - *L.th.Pi.* ($0,290 \text{ U ml}^{-1}$). Os outros *L. theobromae* isolados de manga, tanto do fruto (*L.th.M.Fru*) como de folha (*L.th.Fo*), apresentaram menor atividade de β -1,3-glucanase quando comparados com os demais.

A presença de álcool veratrílico no cultivo inibiu a produção de β -1,3-glucanases pela maioria dos isolados de *Botryosphaeria* avaliados (Figura 11), como também foi observado nas atividades de pectinases, com exceção do *B. ribis*. Este resultado ressalta uma vez mais a diferença genética da espécie *B. ribis* quanto à produção desta hidrolase, em relação à forma teleomorfa (*B. rhodina*) e anamorfa de *Botryosphaeria* (*L. theobromae*).

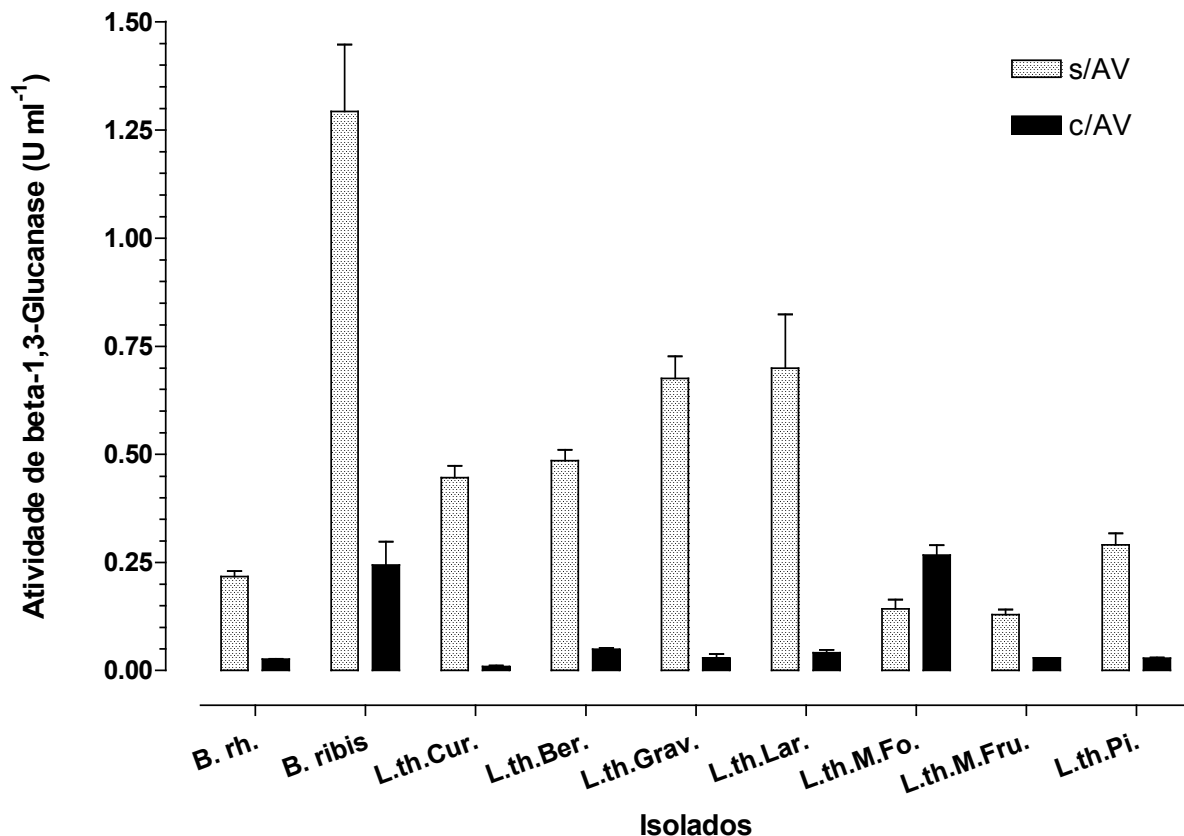


Figura 11 - Perfil comparativo da produção de β -1,3-glucanases pelos isolados de *Botryosphaeria* nos estágios teleomorfo e anamorfo, cultivados na ausência e na presença de AV. Substrato utilizado para a determinação da atividade de β -1,3-glucanases: Laminarina 0,4 %, nas condições de ensaio descritas no item (4.5.2).

5.4 COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS, BIOMASSA FÚNGICA E DA VARIAÇÃO DE pH NOS CULTIVOS DOS ISOLADOS DE *Botryosphaeria*, NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE ÁLCOOL VERATRÍLICO

Todos os isolados *L. theobromae* e *B. rhodina*, que foram crescidos na ausência de AV, produziram mais biomassa fúngica do que nos cultivos desenvolvidos na presença deste álcool. O isolado *B. ribis* foi uma exceção, sendo

que sua produção de biomassa foi igual a 7,4 g l⁻¹ na presença de álcool veratrílico, enquanto que na ausência deste composto foi igual a 4,1 g l⁻¹.

Resultados semelhantes foram obtidos em 2001 por Vasconcelos et al., onde foi comparada a produção de biomassa fúngica pelos fungos *B. rhodina*, *B. ribis* e *L. theobromae* cultivados sob as mesmas condições descritas no presente trabalho. De acordo com os resultados obtidos pelos autores, o *B. rhodina* na presença de AV apresentou uma diminuição na produção de biomassa, como também foi observado no presente trabalho. A produção de biomassa fúngica, proteínas e variação do pH final dos cultivos dos diferentes isolados de *Botryosphaeria* estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Avaliação da produção de biomassa fúngica, proteínas extracelulares e variação de pH nos cultivos dos isolados de *Botryosphaeria* em seus estágios anamorfos e teleomorfos, na ausência (s/AV) e na presença (c/AV) de álcool veratrílico.

Códigos	Biomassa (g l ⁻¹)		Proteínas (mg ml ⁻¹)		pH final	
	s/AV	c/AV	s/AV	c/AV	s/AV	c/AV
<i>B. rh.</i>	4,07 ± 0,46	2,04 ± 0,51	0,01 ± 0,00	0,05 ± 0,00	5,96 ± 0,11	5,13 ± 0,29
<i>B. ribis</i>	4,09 ± 0,44	7,43 ± 0,43	0,02 ± 0,00	0,06 ± 0,00	6,01 ± 0,02	6,24 ± 0,15
<i>L.th.Cur.</i>	4,29 ± 0,26	2,72 ± 0,46	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	6,02 ± 0,06	5,22 ± 0,32
<i>L.th.Ber.</i>	4,34 ± 0,21	3,46 ± 0,45	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	5,75 ± 0,35	4,13 ± 0,37
<i>L.th.Grav.</i>	4,69 ± 0,29	3,68 ± 0,38	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	6,20 ± 0,06	4,93 ± 0,47
<i>L.th.Lar.</i>	4,25 ± 0,09	2,42 ± 0,24	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	6,08 ± 0,10	4,99 ± 0,43
<i>L.th.M.Fo.</i>	3,55 ± 0,29	3,16 ± 0,17	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	4,84 ± 0,10	4,02 ± 0,09
<i>L.th.M.Fru</i>	3,50 ± 0,41	2,35 ± 0,21	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	5,44 ± 0,06	3,93 ± 0,15
<i>L.th.Pi.</i>	3,61 ± 0,09	2,46 ± 0,26	0,05 ± 0,00	0,02 ± 0,00	4,33 ± 0,09	4,40 ± 0,14

(*) pH inicial = 5,80

Vasconcelos et al. (2001) observaram que a produção de biomassa fúngica pelo isolado *L. theobromae* de madeira curripixá (*Micropholis venulosa*) não foi influenciada pela adição de álcool veratrílico ao meio de cultivo, o que não foi observado no presente trabalho, no qual todos os isolados de *L. theobromae* avaliados incluindo o da madeira curripixá - *L.th.Cur.* (*Micropholis venulosa*), apresentaram menor produção de micélios na presença de AV. Vasconcelos et al. (2000) observaram, que concentrações elevadas de AV no meio de cultivo aumentaram a produção de lacases pelo *B. rhodina*, sendo que a produção de biomassa fúngica diminuiu consideravelmente nestas condições, o que também foi observado no presente trabalho. A produção de proteínas extracelulares por todos os isolados de *Botryosphaeria* foi baixa ($\sim 0,05\text{mg/ml}^{-1}$), justificando também as baixas atividades enzimáticas determinadas nos meios de cultivo destes microrganismos.

O pH final na ausência de AV foi maior do que o pH inicial (5,80) do cultivo, com exceção dos cultivos realizados com os isolados *L. theobromae* de manga folha - *L.th.Fo.* (4,84) e pinha - *L.th.Pi.* (4,33). No entanto, na presença de AV, os valores de pH final foram menores quando comparados aos valores de pH inicial dos cultivos. Este comportamento também foi descrito anteriormente por Vasconcelos et al. (2000) quando avaliaram o pH final do cultivo do fungo *B. rhodina* em meio basal, na ausência e na presença de álcool veratrílico.

O pH inicial não parece interferir significativamente na produção de lacases constitutivas pelo *B. rhodina*. Por outro lado, valores de pH inicial entre 5,5 e 6,5 levaram à maior produção de lacase, determinada tanto com o substrato ABTS como DMP, nos cultivos realizados na presença de AV (dados não publicados).

5.5 COMPARAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES E TOTAIS RESIDUAIS NOS CULTIVOS DOS DIFERENTES ISOLADOS DE *Botryosphaeria* NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE ÁLCOOL VERATRÍLICO

De forma geral verificou-se que tanto o *B. rhodina* como também os isolados de *L. theobromae* e o *B. ribis* consumiram mais de 99% da glucose presente, independente da adição de AV aos meios de cultivo. A avaliação dos açúcares redutores e totais residuais, nos meios de cultivo dos diferentes isolados de *Botryosphaeria* avaliados, estão apresentados na Tabela 3.

O *B. rhodina* é produtor de uma β -glucana (DEKKER; BARBOSA, 2001), um exopolissacarídeo que confere viscosidade ao meio de cultivo. Sabe-se ainda que os isolados *L. theobromae* de laranja (*L.th.Lar*), manga (folha – *L.th.M.Fo* e fruto – *L.th.Fru.*) e pinha (*L.th.Pi.*), também são produtores de exopolissacarídeos (dados não publicados). A presença deste exopolissacarídeo foi avaliada pelos valores de açúcar total residual ($> 0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) em relação à quantidade de glucose residual ($< 0,5 \text{ mg ml}^{-1}$). Diferentemente do que foi observado anteriormente para o fungo *B. rhodina* (GIESE et al., 2004), a adição de AV aparentemente não interferiu na produção do exopolissacarídeo pelo microrganismo, uma vez que os valores de açúcar total residual não foram alterados quando comparados com os cultivos realizados na ausência deste composto aromático.

Tabela 3 - Avaliação dos açúcares redutores e totais residuais nos cultivos dos isolados de *Botryosphaeria* em seus estágios anamorfos e teleomorfos, na ausência (s/AV) e na presença (c/AV) de álcool veratrílico.

Códigos	Açúcar Redutor Residual (mg ml ⁻¹)		Açúcar Total Residual (mg ml ⁻¹)	
	s/AV	c/AV	s/AV	c/AV
<i>B. rh.</i>	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,63 ± 0,04	0,68 ± 0,03
<i>B. ribis</i>	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,55 ± 0,05
<i>L.th.Cur.</i>	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,55 ± 0,00	0,62 ± 0,01
<i>L.th.Ber.</i>	0,07 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,76 ± 0,03	0,70 ± 0,01
<i>L.th.Grav.</i>	0,06 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,68 ± 0,02	0,69 ± 0,02
<i>L.th.Lar.</i>	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,76 ± 0,03	0,61 ± 0,03
<i>L.th.M.Fo.</i>	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,59 ± 0,00	0,59 ± 0,01
<i>L.th.M.Fru.</i>	0,06 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,58 ± 0,01	0,61 ± 0,01
<i>L.th.Pi.</i>	0,06 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,54 ± 0,03	0,59 ± 0,02

5.6 ANÁLISE DO SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1-5,8SGENE-ITS2 EM ISOLADOS DE *BOTRYOSPHAERIA*

A análise das seqüências de ITS1/5.8S/ITS2 entre os isolados de *B. rhodina*, *L. theobromae*, e *B. ribis* demonstrou alta similaridade entre as linhagens de *B. rhodina* e *L. theobromae* em comparação com o isolado identificado como *B.ribis* (Figura 12).

Códigos

	18S ↔ ITS 1					
	5	15	25	35	45	55
<i>B. rh.</i>	CCGAGTT--C	TCGGGCTTCG	GCTCGACTCT	CCCACCCTTT	GTGAACGTAC	CTCTGTTGCT
<i>B. ribis</i>	CCGAGTTGAT	TCGAGCTCCG	GCTCGACTCT	CCCACCCAAT	GTGTACCTAC	CTCTGTTGCT
<i>L. th. Cur.</i>	CCGAGTT--T	TCGAGCTCCG	GCTCGACTCT	CCCACCCTTT	GTGAACGTAC	CTCTGTTGCT
<i>L. th. Ber.</i>	CCGAGTT--T	TCGAGCTCCG	GCTCGACTCT	CCCACCCTTT	GTGAACGTAC	CTCTGTTGCT
<i>L. th. Grav.</i>	CCGAGTT--T	TCGAGCTCCG	GCTCGACTCT	CCCACCCTTT	GTGAACGTAC	CTCTGTTGCT
<i>L. th. Lar.</i>	CCGAGTT--T	TCGAGCTCCG	GCTCGACTCT	CCCACCCTTT	GTGAACGTAC	CTCTGTTGCT
<i>L. th. M. Fo.</i>	CGGAATT--T	TCGAGCTTCG	GCTCGACTCT	CCCACCCTTT	GTGAACGTAC	CTCTGTTGCT
<i>L. th. M. Fru.</i>	CGGAATT--T	TCGAGGTCCG	GCTCGACTCT	CCCACCCTTT	GTGAACGTAC	CTCTGTTGCT
<i>L. th. Pi.</i>	CCGAGTT--T	TCGAGCTCCG	GCTCGACTCT	CCCACCCTTT	GTGAACGTAC	CTCTGTTGCT
	65	75	85	95	105	115
<i>B. rh.</i>	TTGGCGG---	-----	-----	-CTCCGG---	-----	----CCGCCA
<i>B. ribis</i>	TTGGCGGGCC	GCGGTCCTCC	GCACCGGCGC	CCTTCGGGGG	GGGCTGGCCA	GCGCCCGCCA
<i>L. th. Cur.</i>	TTGGCGG---	-----	-----	-CTCCGG---	-----	----CCGCCA
<i>L. th. Ber.</i>	TTGGCGG---	-----	-----	-CTCCGG---	-----	----ACGCCA
<i>L. th. Grav.</i>	TTGGCGG---	-----	-----	-CTCCGG---	-----	----CCGCCA
<i>L. th. Lar.</i>	TTGGCGG---	-----	-----	-CTCCGG---	-----	----CCGCCA
<i>L. th. M. Fo.</i>	TTGGCGGG--	-----	-----	-CTCCGG---	-----	----CCGCCA
<i>L. th. M. Fru.</i>	TTGGCGG---	-----	-----	-CTCCGG---	-----	----CCGCCA
<i>L. th. Pi.</i>	TTGGCGG---	-----	-----	-CTCCGG---	-----	----CCGCCA
	125	135	145	155	165	175
<i>B. rh.</i>	AAGGACCTTC	AAACTCCAGT	CAGTAAACGC	AGACGTCTGA	TAAACAAGTT	AATAAACTAA
<i>B. ribis</i>	GAGGACCATA	AAACTCCAGT	CAGTGAACCT	CGCAGTCTGA	AAAACAAGTT	AATAAACTAA
<i>L. th. Cur.</i>	AAGGACCTTC	AAACTCCAGT	CAGTAAACGC	AGACGTCTGA	TAAACAAGTT	AATAAACTAA
<i>L. th. Ber.</i>	AAGGACCTTC	AAACTCCAGT	CAGTAAACGC	AGACGTCTGA	TAAACAAGTT	AATAAACTAA
<i>L. th. Grav.</i>	AAGGACCTTC	AAACTCCAGT	CAGTAAACGC	AGACGTCTGA	TAAACAAGTT	AATAAACTAA
<i>L. th. Lar.</i>	AAGGACCTTC	AAACTCCAGT	CAGTAAACGC	AGACGTCTGA	TAAACAAGTT	AATAAACTAA
<i>L. th. M. Fo.</i>	AAGGACCTTC	AAACTCCAGT	CAGTAAACGC	AGACGTCTGA	TAAACAAGTT	AATAAACTAA
<i>L. th. M. Fru.</i>	AAGGACCTTC	AAACTCCAGT	CAGTAAACGC	AGACGTCTGA	TAAACAAGTT	AATAAACTAA
<i>L. th. Pi.</i>	AAGGACCTTC	AAACTCCAGT	CAGTAAACGC	AGACGTCTGA	TAAACAAGTT	AATAAACTAA
	185	195	205	215	225	235
<i>B. rh.</i>	AACTTTCAAC	AACGGATCTC	TTGGTTCTGG	CATCGATGAA	GAACGCAGCG	AAATGCGATA
<i>B. ribis</i>	AACTTTCAAC	AACGGATCTC	TTGGTTCTGG	CATCGATGAA	GAACGCAGCG	AAATGCGATA
<i>L. th. Cur.</i>	AACTTTCAAC	AACGGATCTC	TTGGTTCTGG	CATCGATGAA	GAACGCAGCG	AAATGCGATA
<i>L. th. Ber.</i>	AACTTTCAAC	AACGGATCTC	TTGGTTCTGG	CATCGATGAA	GAACGCAGCG	AAATGCGATA
<i>L. th. Grav.</i>	AACTTTCAAC	AACGGATCTC	TTGGTTCTGG	CATCGATGAA	GAACGCAGCG	AAATGCGATA
<i>L. th. Lar.</i>	AACTTTCAAC	AACGGATCTC	TTGGTTCTGG	CATCGATGAA	GAACGCAGCG	AAATGCGATA
<i>L. th. M. Fo.</i>	AACTTTCAAC	AACGGATCTC	TTGGTTCTGG	CATCGATGAA	GAACGCAGCG	AAATGCGATA
<i>L. th. M. Fru.</i>	AACTTTCAAC	AACGGATCTC	TTGGTTCTGG	CATCGATGAA	GAACGCAGCG	AAATGCGATA
<i>L. th. Pi.</i>	AACTTTCAAC	AACGGATCTC	TTGGTTCTGG	CATCGATGAA	GAACGCAGCG	AAATGCGATA
	245	255	265	275	285	295
<i>B. rh.</i>	AGTAATGTGA	ATTGCAGAAT	TCAGTGAATC	ATCGAATCTT	TGAACGCACA	TTGCGCCCCT
<i>B. ribis</i>	AGTAATGTGA	ATTGCAGAAT	TCAGTGAATC	ATCGAATCTT	TGAACGCACA	TTGCGCCCCT
<i>L. th. Cur.</i>	AGTAATGTGA	ATTGCAGAAT	TCAGTGAATC	ATCGAATCTT	TGAACGCACA	TTGCGCCCCT
<i>L. th. Ber.</i>	AGTAATGTGA	ATTGCAGAAT	TCAGTGAATC	ATCGAATCTT	TGAACGCACA	TTGCGCCCCT
<i>L. th. Grav.</i>	AGTAATGTGA	ATTGCAGAAT	TCAGTGAATC	ATCGAATCTT	TGAACGCACA	TTGCGCCCCT
<i>L. th. Lar.</i>	AGTAATGTGA	ATTGCAGAAT	TCAGTGAATC	ATCGAATCTT	TGAACGCACA	TTGCGCCCCT
<i>L. th. M. Fo.</i>	AGTAATGTGA	ATTGCAGAAT	TCAGTGAATC	ATCGAATCTT	TGAACGCACA	TTGCGCCCCT
<i>L. th. M. Fru.</i>	AGTAATGTGA	ATTGCAGAAT	TCAGTGAATC	ATCGAATCTT	TGAACGCACA	TTGCGCCCCT
<i>L. th. Pi.</i>	AGTAATGTGA	ATTGCAGAAT	TCAGTGAATC	ATCGAATCTT	TGAACGCACA	TTGCGCCCCT
	305	315	325	335	345	355
<i>B. rh.</i>	TGGTATTCCG	GGGGGCATGC	CTGTTTCGAGC	GTCATTACAA	CCCTCAAGCT	CTGCTTGGAA
<i>B. ribis</i>	TGGTATTCCG	AGGGGCATGC	CTGTTTCGAGC	GTCATTACAA	CCCTCAAGCT	CTGCTTGGTA
<i>L. th. Cur.</i>	TGGTATTCCG	GGGGGCATGC	CTGTTTCGAGC	GTCATTACAA	CCCTCAAGCT	CTGCTTGGAA
<i>L. th. Ber.</i>	TGGTATTCCG	GGGGGCATGC	CTGTTTCGAGC	GTCATTACAA	CCCTCAAGCT	CTGCTTGGAA
<i>L. th. Grav.</i>	TGGTATTCCG	GGGGGCATGC	CTGTTTCGAGC	GTCATTACAA	CCCTCAAGCT	CTGCTTGGAA
<i>L. th. Lar.</i>	TGGTATTCCG	GGGGGCATGC	CTGTTTCGAGC	GTCATTACAA	CCCTCAAGCT	CTGCTTGGAA
<i>L. th. M. Fo.</i>	TGGTATTCCG	GGGGGCATGC	CTGTTTCGAGC	GTCATTACAA	CCCTCAAGCT	CTGCTTGGAA
<i>L. th. M. Fru.</i>	TGGTATTCCG	GGGGGCATGC	CTGTTTCGAGC	GTCATTACAA	CCCTCAAGCT	CTGCTTGGAA
<i>L. th. Pi.</i>	TGGTATTCCG	GGGGGCATGC	CTGTTTCGAGC	GTCATTACAA	CCCTCAAGCT	CTGCTTGGAA

5.8S ↔ ITS 2

	365	375	385	395	405	415
<i>B. rh.</i>	TTGGGCACCG	TCCTCACTGC	GGACGCGCCT	CAAAGACCTC	GGCGGTGGCT	GTTCAGCCCT
<i>B. ribis</i>	TTGGGCTCCG	TCCTC--CAC	GGACGCGCCT	TAAAGACCTC	GGCGGTGGCG	TCTTG--CCT
<i>L. th. Cur.</i>	TTGGGCACCG	TCCTCACTGC	GGACGCGCCT	CAAAGACCTC	GGCGGTGGCT	GTTCAGCCCT
<i>L. th. Ber.</i>	TTGGGCACCG	TCCTCACTGC	GGACGCGCCT	CAAAGACCTC	GGCGGTGGCT	GTTCAGCCCT
<i>L. th. Grav.</i>	TTGGGCACCG	TCCTCACTGC	GGACGCGCCT	CAAAGACCTC	GGCGGTGGCT	GTTCAGCCCT
<i>L. th. Lar.</i>	TTGGGCACCG	TCCTCACTGC	GGACGCGCCT	CAAAGACCTC	GGCGGTGGCT	GTTCAGCCCT
<i>L. th. M. Fo.</i>	TTGGGCACCG	TCCTCACTGC	GGACGCGCCT	CAAAGACCTC	GGCGGTGGCT	GTTCAGCCCT
<i>L. th. M. Fru.</i>	TTGGGCACCG	TCCTCACTGC	GGACGCGCCT	CAAAGACCTC	GGCGGTGGCT	GTTCAGCCCT
<i>L. th. Pi.</i>	TTGGGCACCG	TCCTCACTGC	GGACGCGCCT	CAAAGACCTC	GGCGGTGGCT	GTTCAGCCCT
					ITS 2 ↔	28S
	425	435	445	455	465	475
<i>B. rh.</i>	CAAGCGTAGT	AGAAATACACC	TCGCTTTGGA	GCGGTTGGCG	TCGCCCGCCG	GACGAACCTT
<i>B. ribis</i>	CAAGCGTAGT	AGAAAACACC	TCGCTTTGGA	GCGCACGGCG	TCGCCCGCCG	GACGAACCTT
<i>L. th. Cur.</i>	CAAGCGTAGT	AGAAATACACC	TCGCTTTGGA	GCGGTTGGCG	TCGCCCGCCG	GACGAACCTT
<i>L. th. Ber.</i>	CAAGCGTAGT	AGAAATACACC	TCGCTTTGGA	GCGGTTGGCG	TCGCCCGCCG	GACGAACCTT
<i>L. th. Grav.</i>	CAAGCGTAGT	AGAAATACACC	TCGCTTTGGA	GCGGTTGGCG	TCGCCCGCCG	GACGAACCTT
<i>L. th. Lar.</i>	CAAGCGTAGT	AGAAATACACC	TCGCTTTGGA	GCGGTTGGCG	TCGCCCGCCG	GACGAACCTT
<i>L. th. M. Fo.</i>	CAAGCGTAGT	AGAAATACACC	TCGCTTTGGA	GCGGTTGGCG	TCGCCCGCCG	GACGAACCTT
<i>L. th. M. Fru.</i>	CAAGCGTAGT	AGAAATACACC	TCGCTTTGGA	GCGGTTGGCG	TCGCCCGCCG	GACGAACCTT
<i>L. th. Pi.</i>	CAAGCGTAGT	AGAAATACACC	TCGCTTTGGA	GCGGTTGGCG	TCGCCCGCCG	GACGAACCTT
	485	495	505			
<i>B. rh.</i>	CTGAACTTTT	CTCAAGGTTG	ACCTCGG			
<i>B. ribis</i>	TGAATTATTT	CTCAAGGTTG	ACCTCGG			
<i>L. th. Cur.</i>	CTGAACTTTT	CTCAAGGTTG	ACCTCGG			
<i>L. th. Ber.</i>	CTGAACTTTT	CTCAAGGTTG	ACCTCGG			
<i>L. th. Grav.</i>	CTGAACTTTT	CTCAAGGTTG	ACCTCGG			
<i>L. th. Lar.</i>	CTGAACTTTT	CTCAAGGTTG	ACCTCGG			
<i>L. th. M. Fo.</i>	CTGAACTTTT	CTCAAGGTTG	ACCTCGG			
<i>L. th. M. Fru.</i>	CTGAACTTTT	CTCAAGGTTG	ACCTCGG			
<i>L. th. Pi.</i>	CTGAACTTTT	CTCAAGGTTG	ACCTCGG			

Figura 12 – Alinhamento das seqüências de DNA dos isolados de *Botryosphaeria*, correspondente ao intervalo compreendido na posição 16 a 177, 336 a 470 respectivamente, da região ITS1-5,8S-ITS2.

Observou-se um índice de variação intra-específica (entre *B. rhodina* e *L. theobromae*) na ordem de 1,2%, sendo as variações concentradas principalmente nas regiões 18S e ITS1. A maioria das alterações (83,33%) foram observadas nos isolados coletados de mangueira e apenas uma substituição em relação aos demais isolados foi observada no isolado de berinjela. As trocas nucleotídicas intra-específicas observadas foram quatro transições sendo uma no fragmento sequenciado do gene 18S e três na região do ITS1 (G/A-5, C/T-18 e 27, T/C-60), duas transversões (C/G-2 e C/A-115, no fragmento do gene 18S e na região ITS1 respectivamente).

A variação inter-específica observada (considerando *B. rhodina* e *L. theobromae* contra *B. ribis*) foi da ordem de 16,63%, apresentando 19 transversões (T/A-38, 39, 128, 161, 435, 455 e 487; A/T-44, 337, 359; 367 e 485; C/A-130, 154; G/T-149 e 411; A/C-151; T/G-410, 582), 16 transições (C/T-10, 94, 150, 414, 481, 486; G/A-14, 311, 379, 483; A/G-121, 145, 415; T/C-378, 412, 456), duas deleções de 2 nucleotídeos nas posições 376 e 415 da região do ITS2. Duas importantes deleções de aproximadamente 24pb e 17pb entre os nucleotídeos 67 e 91 e 98 e 113 respectivamente. Essas deleções foram altamente conservada em todas as linhagens de *B. rodhina* e *L. theobromae* depositadas no *GenBank*, não tendo sido descrita em nenhuma outra espécie do gênero *Botryosphaeria*. Essas deleções podem ser considerada como uma importante característica na discriminação entre *B.rodhina* e as outras espécies do gênero.

A análise filogenética demonstrou o agrupamento de *B. rodhina* e *L.theobromae* num mesmo *cluster*, assim como o posicionamento externo de *B. ribis* (Figura 13). Essa topologia da árvore condiz com a análise filogenética apresentada por Zhou e Stanosz (2001) onde *B. rodhina* e *L. theobromae* foram agrupados no mesmo *cluster*, dentro da seção denominada *Brunnea*.

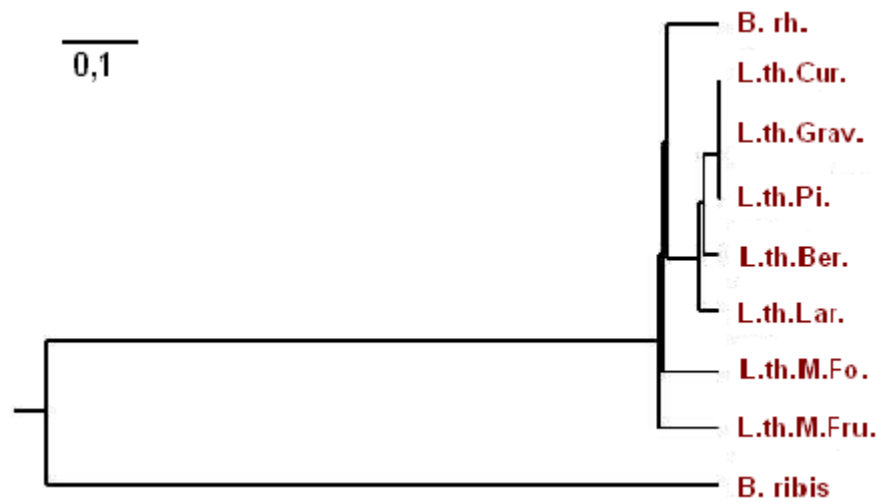


Figura 13 - Dendrograma de similaridade genética dos isolados de *Botryosphaeria* baseado nas seqüências de ITS1-5.8Sgene-ITS2.

5.7 ANÁLISE DE RAPD DOS 9 ISOLADOS FÚNGICOS E COMPARAÇÃO COM PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Foram observados um total de 91 locos de amplificação com 81,95% de variabilidade genética, utilizando a observação de bandas com frequência alélica acima de 20% e abaixo de 80% como critério para o cálculo de polimorfismo. Dependendo do *primer* utilizado e da linhagem em questão, 3 a 8 bandas foram separadas apresentando tamanho de 400-2000pb. A Figura 14 mostra o perfil obtido com o *primer* OPW2, e o dendrograma de similaridade genética produzido com a utilização de todos os *primers* representado na Figura 15.

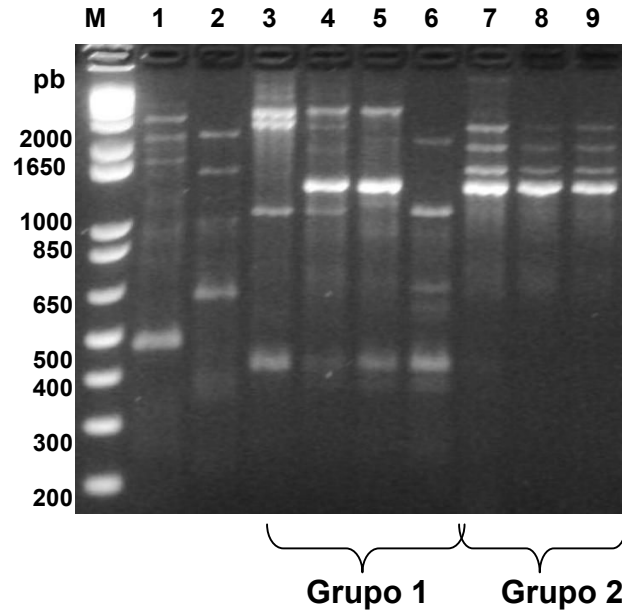


Figura 14 - Amplificação de DNA polimórfico de 9 isolados de *Botryosphaeria* utilizando o primer OP-W2 (Operon). As linhas de 1 a 9 correspondem aos isolados: *B. rh.*, *B. ribis*, *L.th.Cur.*, *L.th.Ber.*, *L.th.Grav.*, *L.th.Lar.*, *L.th.M.Fo.*, *L.th.M.Fru.* e *L.th.Pi.*, respectivamente. 1 KB DNA Ladder-plus (Invitrogen Life Technologies) foi usado como marcador de peso molecular. (M)

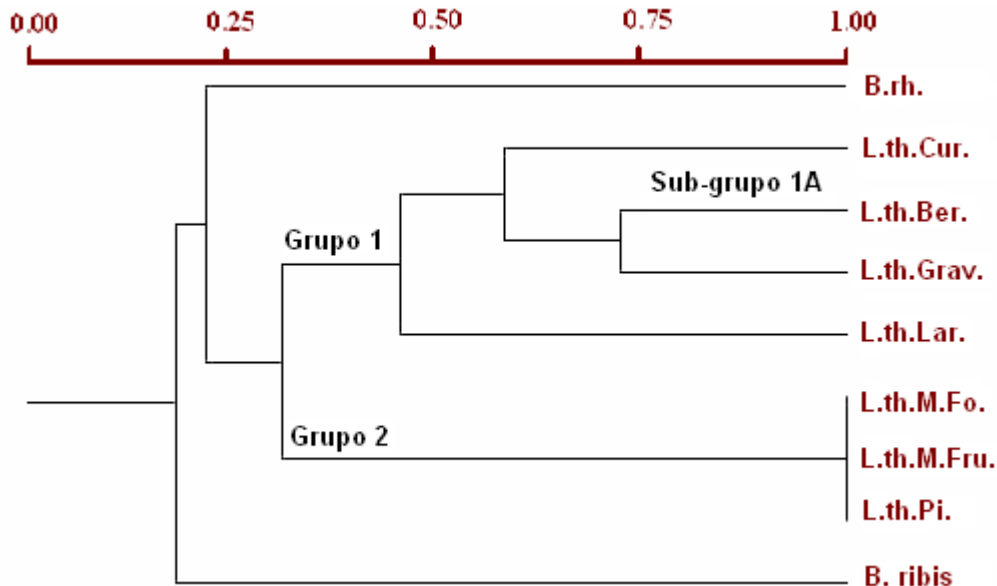


Figura 15 - Similaridade genética entre os 9 isolados de *Botryosphaeria*. O dendrograma UPGMA foi baseado no índice de similaridade de Jaccard (JS).

A linhagem *B.rh.* apresentou-se posicionada externamente ao grupo principal formado por todas as linhagens de *Lasiodiplodia*, apresentando apenas aproximadamente 22% de similaridade genética com esse grupo (Tabela 4). Essa observação pode ser explicada pelo isolamento geográfico desta linhagem, visto que é originária da Oceania, especificamente da região de Perth, oeste da Austrália. O isolamento geográfico, associado às pressões seletivas distintas que estas linhagens vêm sendo submetidas, concomitantemente com as diferentes condições climáticas, explicam as diferenças. Enquanto as linhagens brasileiras foram expostas ao clima tropical, a linhagem australiana tem sobrevivido dentro de condições climáticas típicas do clima mediterrâneo. A comparação dos dados obtidos por RAPD com aqueles oriundos da análise da região ITS demonstra que todas essas linhagens possuem uma base genética comum, apresentando pouca variação em regiões conservadas, em detrimento da alta variabilidade em regiões teoricamente não conservadas no genoma. Isto demonstra que apesar do isolamento geográfico e das pressões seletivas distintas, essa separação ainda não foi suficiente para a ocorrência de um fenômeno de especiação dentro dessas linhagens.

Tabela 4. Matriz de similaridade genética dos isolados fúngicos de *Botryosphaeria* obtido pelo coeficiente de Jaccard.

Código	<i>B. rh.</i>	<i>B. ribis</i>	<i>L. th.Cur.</i>	<i>L. th.Ber.</i>	<i>L.th.Grav.</i>	<i>L.th.Lar.</i>	<i>L.th.M.Fo.</i>	<i>L.th.M.Fru.</i>	<i>L.th.Pi.</i>
<i>B. rh.</i>	1.000								
<i>B. ribis</i>	0.157	1.000							
<i>L.th.Cur.</i>	0.295	0.196	1.000						
<i>L.th.Ber.</i>	0.246	0.173	0.620	1.000					
<i>L.th.Grav.</i>	0.258	0.181	0.542	0.722	1.000				
<i>L.th.Lar.</i>	0.245	0.126	0.377	0.508	0.482	1.000			
<i>L.th.M.Fo.</i>	0.163	0.203	0.292	0.387	0.360	0.206	1.000		
<i>L.th.M.Fru.</i>	0.163	0.203	0.292	0.387	0.360	0.206	1.000	1.000	
<i>L.th.Pi.</i>	0.163	0.203	0.292	0.387	0.360	0.206	1.000	1.000	1.000

Não foi observada nenhuma correlação entre o hospedeiro do qual as linhagens foram isoladas e a similaridade genética dos isolados. Essa observação já tinha sido descrita para o gênero *Botryosphaeria* por Zhou e Stanosz (2001).

Os isolados foram distribuídos dentro de dois grupos principais. O primeiro grupo denominado Grupo-I, inclui os isolados da madeira curupixá, berinjela, graviola e laranja, com alto grau de variabilidade genética, e o outro (denominado Grupo-II) inclui os isolados do fruto e folha de mangueira e de pinha, com perfis eletroforéticos idênticos e portanto 100% de similaridade genética (Figura 15).

Comparando-se a produção enzimática dos 9 isolados com o perfil genético obtido por meio de RAPD (Figura 15), observou-se que linhagens pertencentes ao Grupo-I foram melhores produtoras de lacases constitutivas e indutivas detectadas com o substrato ABTS (Figura 8 e 9, respectivamente). A produção de lacases dentro desse grupo foi significativamente maior do que o outro, porém com perfil variável entre as linhagens. No entanto, dentro deste mesmo grupo, observou-se que a produção de lacase (s/AV) dos isolados de berinjela e graviola foram similares, apresentando-se homogêneas (Figura 8). A similaridade genética desses isolados foi da ordem de 72% (Tabela 4). Estas observações talvez possam indicar a formação de um sub-Grupo-IA, dentro do Grupo-I, constituído pelos isolados de berinjela e graviola. Entretanto, somente novos experimentos poderão comprovar esta hipótese.

O isolado *B.ribis*, posicionou-se externamente ao cluster principal da árvore com similaridade genética da ordem de 15%. Em relação ao perfil de síntese

enzimática, essa linhagem apresentou perfil bastante distinto das outras, demonstrando níveis basais de síntese de lacases constitutivas e indutivas.

O mesmo padrão de correlação entre a produção de lacase e a topologia da árvore, pode ser observado em relação à síntese de β -1,3-glucanases onde os isolados pertencentes ao Grupo-I destacaram-se como boas produtoras da enzima na ausência de AV e os do Grupo-II apresentaram níveis significativamente inferiores de produção nas mesmas condições. Esta correlação pode ser observada através das atividades específicas da lacase indutiva e β -1,3-glucanases.

A linhagem *B.ribis* apresentou perfil de síntese de β -1,3-glucanase na ausência de AV bastante superior ao obtido nas linhagens de *B.rodhina* e *L.theobromae*. A razão para a disparidade de produção tanto de lacases indutivas como de β -1,3-glucanases sem AV, em relação às linhagens de *B. rodhina* e *L. theobromae* ainda não está clara.

Segundo Gil-ad et al. (2001), o revestimento de glucana em *Botrytis cinerea* tem duas funções principais no processo de interação entre o fungo e o hospedeiro: a proteção das hifas contra radicais livres impedindo sua ação direta sobre as células do fungo e, paralelamente, a utilização pelo fungo da camada de glucanas como meio de imobilização das enzimas envolvidas no processo de infecção, aumentando ainda mais seu poder patogênico.

A ação das lacases no processo de infecção do hospedeiro culmina com a liberação de uma grande quantidade de radicais livres (MAYER; STAPLES, 2002), que por sua vez agem na cascata de estímulo à síntese de botriosferana, uma β -D-glucana secretada pelos fungos por *B. rodhina* e *L.theobromae*. Esse exopolissacarídeo (EPS), além da ação hipotética similar à proposta por Gil-ad et al.

(2001), também atua como fonte de carbono para a nutrição do fungo, sendo a hidrólise enzimática mediada pela β -1,3-glucanase (GIESE et al. 2005).

Considerando-se hipoteticamente a ação conjunta das lacases com as β -1,3-glucanases em pelo menos um processo importante do desenvolvimento do fungo, pode-se inferir que a semelhança do perfil da síntese tanto de lacases como de β -1,3-glucanases dentro dos dois grupos diferenciados por RAPD, esteja relacionada com a ação de pressões seletivas semelhantes sobre ambas, o que explicaria a correlação entre os níveis de produção destas enzimas e o agrupamento obtido pelos índices de similaridade genética.

Ao contrário da produção de lacases e β -1,3-glucanases, os dados de pectinases não apresentaram correlação entre produção desta enzima e o perfil obtido de RAPD, (exceção *B. ribis*). Vargas et al. (2003) em seus estudos com a atividade enzimática proteolítica e quitinolítica de 5 linhagens de *Nomuraea rileyi*, também demonstraram que não houve nenhuma correlação nestes microrganismos com a produção de enzimas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- 6.1 Na ausência do AV, observou-se variação no perfil de produção de lacases e β -1,3-glucanases entre os nove isolados fungicos, enquanto que no perfil de produção de pectinases, não foi observada diferença significativa entre os isolados. Três isolados se destacaram como produtores constitutivos de lacases (*B.rh.*, *L.th.Cur.* e *L.th.Lar.*), enquanto que apenas um isolado se destacou como produtor de β -1,3-glucanases (*B.ribis*).
- 6.2 O AV influenciou positivamente a produção de lacases em cinco dos isolados (*B.rh.*, *L.th.Cur.*, *L.th.Ber.*, *L.th.Grav.* e *L.th.Lar.*) e negativamente a produção de pectinases e β -1,3-glucanases, na maioria dos isolados. A linhagem *B.ribis* apresentou aumento significativo na produção de pectinases na presença deste álcool.
- 6.3 A análise das seqüências das regiões ITS1 e 2 e do gene 5.8S do rDNA demonstrou alta conservação entre os isolados *B.rodhina* e seu anamorfo *L.theobromae*, destacando diferenças significativas entre estes e o isolado *B.ribis*.
- 6.4 A análise de RAPD indicou a formação de dois grupos distintos, denominados Grupo-I e Grupo-II. Observou-se uma correlação entre a produção de lacases e β -1,3-glucanases com o agrupamento, onde os isolados pertencentes ao Grupo-I apresentaram maior produção de ambas as enzimas do que aqueles pertencentes ao Grupo-II. Não houve correlação entre a produção de pectinases e a diversidade genética dos isolados. As variações nas seqüências das regiões ITS1 e 2 e do gene 5.8S do rDNA não puderam ser correlacionadas aos diferentes perfis de produção enzimática dos isolados.

REFERÊNCIAS

- ALESSI, F.; DOUTHEAU, A.; ANKER, D.; CONDEMINE, G.; ROBERT-BAUDOY, J. Synthesis of methyl esters of 3-deoxy-D-erythro-2-hexulosonic acid (KDG) analogs, inducers of the expression of pectinase genes in bacteria *Erwinia chrysanthemi*. **Tetrahedron**, Kidlington, v. 52, n. 13, p. 4625-4636, Mar. 1996.
- ALEXANDRE, G.; ZHULIN, I. B. Laccases are widespread in bacteria. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 18, n. 2, p. 41-42, Feb. 2000.
- ALVES, A.; PHILLIPS, A. J. L.; HENRIQUES, I.; CORREIA, A. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of *Botryosphaeria* species. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 245, n. 2, p. 221-229, Apr. 2005.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W., MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, n. 3, p. 403-410, Oct. 1990.
- BARA, M. T. ; LIMA, A. L.; ULHOA, C. J. Purification and characterization of an exo- β -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 219, n. 1, p. 81-85, Feb. 2003.
- BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; KURTBÖKE,I.; HARDY, G.E. *In vivo* decolorization of Poly R-478 as a method for screening ligninolytic microorganisms for use in bioremediation. In: PACIFIC RIM BIOTECHNOLOGY CONFERENCE, 4th, 1995, Melbourne. **Proceedings...** Melbourne, 1995. p. 88-90.
- BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; St HARDY, G. E. S. Veratryl alcohol as inducer of laccase by ascomycete, *Botryosphaeria* sp, when screened on polymeric dye Boly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 93-96, Aug. 1996.
- BARBOSA, A. M.; STELUTI, R. M.; DEKKER, R. F. H.; CARDOSO, M. S.; CORRADI da SILVA, M. L. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 6)-beta-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, Kidlington, v. 338, n. 16, p. 1691-1698, Jul. 2003.
- BLACK, J. G. **Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas**. 4. ed. GUANABARA KOOGAN, 2002. 829p.
- BERTOUT, S.; RENAUD, F.; BARTON, R.; SYMOENS, F.; BURNOD, J.; PIENS, MA.; LEBEAU, B.; VIVIANI, MA.; CHAPUIS, F.; BASTIDE, JM.; GRILLOT, R.; MALLIÉ, M. Genetic polymorphism of *Aspergillus fumigatus* in clinical samples from patients with invasive aspergillosis: investigation using multiple typing methods. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 5, p. 1731-1737, May 2001.
- BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 355-383, Aug. 2000.

- BHATTACHARYA, E.; RANADE, S. A. Molecular distinction amongst varieties of Mulberry using RAPD and DAMD profiles. **BMC Plant Biology**, London, v. 1, n. 3, p. 1-8, Dec. 2001.
- BOGO, M. R.; QUEIROZ, M. V.; GIMÉNEZ, D. M.; AZEVEDO, J. L.; SCHRANK, A. Double-Stranded RNA and Isomeric Viral Particles Isolated from the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, n. 12, p. 1468-1472, 1996.
- BOTELLA, C.; ORY, I. de.; WEBB, C.; CANTERO, D.; BLANDINO, A. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 26, n. 2-3, p. 100-106, Nov. 2005.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G.. Oxidative enzymes from the lignin-degrading fungus *Pleurotus sajor-caju*. In: LEWIS, N. G.; PAICE, M. G. (Coord.). **Plant cell wall polymers**. Washington, DC: Americal Chemical Society, 1989. p. 473-481.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p.248-254, May 1976.
- BRANDT, M.; PADHYE, A.; MAYER, L.; HOLLOWAY, B. P. Utility of random amplified polymorphic DNA PCR and taqMan automated detection in molecular identification of *Aspergillus fumigattus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 7, p. 2057-2062, Jul. 1998.
- BROOKS, F. E.; FERRIN, D. M. Branch dieback of Southern California chaparral vegetation caused by *Botryosphaeria dothidea*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, n. 1, p. 78-83, Jan. 1994.
- BROWN, I. E.; MALLEEN, M. H.; CHARNOCK, S. J.; DAVIES, G. J.; BLACK, G. W. Pectate lyase 10A from *Pseudomonas cellulose* is a modular enzyme containing a family 2a carbohydrate-binding module. **Biochemical Journal**, London, v. 355, pt. 1, p. 155-165, Apr. 2001.
- BUSTO, M. D.; GARCÍA-TRAMONTÍ, K. E.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M. Preparation and properties of an immobilized pectinlyase for the treatment of fruit juices. **Bioresource Technology**, Amsterdam, 2005. Article in press.
- CADEZ, N.; RASPOR, P.; DE COCK, A. W.; BOEKHOUT, T.; SMITH, M. T. Molecular identification and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 1, n. 4, p.279-289, Jan. 2002.
- CARDOSO, J. E.; MAIA, C. B.; PESSOA, M. N. G. Ocorrência de *Pestalotiopsis psidii* e *Lasiodiplodia theobromae* causando podridão no caule da goiabeira no Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 3, p. 320, maio/jun. 2002.
- CARNEIRO, L.; SA, I. D.; GOMES, F. D.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C. Cold sterilization and clarification of pineapple juice by tangential microfiltration. **Desalination**, Amsterdam, n. 1-3, v. 148, p. 92-98, Sep. 2002.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in sterile distilled water; further research. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 70, p. 181-184.

CHAMBERLAIN, J. S.; GIBBS, R. A.; RANIER, J. E.; NGUYEN, P. N.; CASKEY, C. T. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 11141-11156, 1988.

CHAMCHONG, H.; NOOMHORM, A. Effect of pH and enzymatic treatment on microfiltration and ultrafiltration of tangerine juice. **Journal of Food Process Engineering**, Malden, v. 14, p. 21-34, 1991.

CHUNG, N. H.; LEE, I. S.; SONG, H. S.; BANG, W. G. Mechanisms used by white-rot fungus to degrade lignin and toxic chemicals. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 10, n. 6, p. 737-752, Dec. 2000.

CIRAK, M. Y.; KALKANCI, A.; KUSTIMUR, S. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 8, p. 1027-1032, dez. 2003.

CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. **Micron**, Kidlington, v. 35, n. 1-2, p. 93-96, 2004.

CROUS, P. W.; PALM, M. E. Reassessment of the anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum*. **Sydowia**, Horn, v. 51, n. 2, p. 167-175, Dec. 1999.

CUNHA, M. A. A.; BARBOSA, A. M.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of constitutive and inducible laccases by *Botryosphaeria* sp. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 43, n. 5, p. 385-392, Sep. 2003.

CYBERCOLLOIDS. Disponível em:

<<http://www.cybercolloids.net/library/pectinscience/structure.php>> . Acesso em: 8 dez. 2005.

De JONG, E.; FIELD, J. M.; De BONT, J. A. M. Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Berlin, v. 13, p. 153-188, Mar. 1994.

DEKKER, R. F. H.; VASCONCELOS, A. F. D.; BARBOSA, A. M.; GIESE, E. C.; PACCOLA-MEIRELLES, L. A new role for veratryl alcohol: regulation of synthesis of lignocellulose-degrading enzymes in the ligninolytic ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp.; influence of carbon source. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 23, n. 24, p. 1987-1993, Dec. 2001.

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 28, n. 1, p. 81-88, Jan. 2001.

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; SARGENT, K. The effect of lignin-related compounds on the growth and production of laccases by the ascomycete, *Botryosphaeria* sp. **Enzymes and Microbial Technology**, New York, v. 30, n. 3, p. 374-380, Mar. 2002.

DEL REY, F.; GARCIA-ACHA, I.; NOMBELA, C. The regulation of beta-glucanase synthesis in fungi and yeast. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 110, p. 83-89, 1979.

DENMAN, S.; CROUS, P. W.; TAYLOR, J. E.; KANG, J. C.; PASCOE, I.; WINGFIELD, M. J. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. **Studies in Mycology**, Utrecht, n. 45, p. 129-140, May 2000.

DONZELLI, B. G. G.; SIEBERT, K. J.; HARMAN, G. E. Response surface modeling of factors influencing the production of chitinolytic and beta-1,3-glucanolytic enzymes in *Trichoderma atroviride* strains P1. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, n. 1, p. 82-92, Jun. 2005.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, n. 7, p. 907-931, Dec. 2002.

EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K. E. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 1151-1158, 1996.

ENCINAS, O.; DANIEL, G. Depletion of non-structural compounds during attack of pine and birch wood by the blue stain fungus *Lasiodiplodia theobromae*. **Journal of Tropical Forest Products**, Kuala Lumpur, v. 5, n. 2, p. 184-196, Dec. 1999.

ENCINAS, O.; DANIEL, G. Wood cell wall biodegradation by blue stain fungus *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Material und Organismen**, Berlin, v. 29, n. 4, p. 255-272, 1995.

FAKOUSSA, R. M.; HOFRICHTER, M. Biotechnology and microbiology of coal degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 52, n. 1, p. 25-40, Jul. 1999.

FELSENSTEIN, J. **PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.57c**. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington. Seattle, 1993.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 871-879, 2005.

FREEMAN, S.; RODRIGUEZ, R. J. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic endophytic mutualist. **Science**, New York, v. 260, n. 5104, p. 75-78, Apr. 1993.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, ano 3, n. 14, p. 12-16, maio/jun. 2000.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares. In: SERAFINI, I.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Agropecuária, 2001.

FUNGARO, M. H. P.; VISSOTO, P. C.; SARTORI, D.; VILAS-BOAS, L. A.; FURLANETTO, M. C.; TANIWAKI, M. H. A molecular method for detection of *Aspergillus carbonarius* in coffee beans. **Current Microbiology**, v. 49, p. 123-127, 2004.

GARCIA, J. E.; VILAS-BOAS, L. A.; DEKKER, R. F. H.; FUNGARO, M. H. P.; BARBOSA, A. M. Molecular identification of a species of *Botryosphaeria* sp.; *Botryosphaeria rhodina*. **GeneBank**, 2004. No prelo. Accession Number: AY612337.

GEORGE, K. S.; REYNOLDS, M. A.; FALKLER, W. A. Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting and clonal analysis of oral *Fusobacterium nucleatum* isolates. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 12, n. 4, p. 219-226, Aug. 1997.

GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, JM. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation Journal**, Philadelphia v. 3, n. 1, p. 1-25, 1999.

GIANFREDA, L.; RAO, M. A. Potencial of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 35, n. 4, p. 339-354, Sep. 2004.

GIARDINA, P.; PALMIERI, G.; SCALONI, A.; FONTANELLA, B.; FARACO, V.; CENNAMO, G.; SANNIA, G. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical Journal**, London, v. 341, pt. 3, p. 655-663, Aug. 1999.

GIESE, E. C., BARBOSA, A. M., SILVA, M. L. C. da. Glucanases fúngicas: produção e aplicações das β -1,3 e β -1,6 glucanases. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, ano 6, n. 30, p. 97-104, jan./jun. 2003.

GIESE, E. C.; COVIZZI, L. G.; BORSATO, D.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, M. L. C. da; BARBOSA, A. M. Botryosphaeran, a new substrate for the production of β -1,3-glucanases by *Botryosphaeria rhodina* and *Trichoderma harzianum* Rifai. **Process Biochemistry**, Kidlington, v. 40, n. 12, p. 3783-3788, Dec. 2005.

GIESE, E.C.; COVIZZI, L.G.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M., 2004. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n.4, p. 463-470, 2004.

GENOMENET. Disponível em:

<http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?rn+R03919>. Acesso em: 8 dez. 2005.

GIL-AD, N. L.; BAR-NUN, N.; MAYER, A. M. The possible function of the glucan sheath of *Botrytis cinerea*: effects on the distribution of enzyme activities. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 199, p. 109-113, May 2001.

GIRARD, B.; FUKUMOTO, L. R. Apple juice clarification using microfiltration and ultrafiltration polymeric membranes. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, London, v. 32, n. 5, p. 290-298, 1999.

GOLD, M. H.; ALIC, M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochete chrysosporium*. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 57, p. 605-622, 1993.

GOODWIN, D. C.; AUST, S. D.; GROVER, T. A. Evidence for veratryl alcohol as a redox mediator in lignin peroxidase-catalysed oxidation. **Biochemistry**, Washington, v. 34, p. 5060-5065, 1995.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 3, p. 454-500, Jul. 1999.

GUMMADI, S. N.; KUMAR, D. S. Microbial pectic transeliminases. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 27, n. 7, p. 451-458, Apr. 2005.

HADJ-TAIEB, N.; AYADI, M.; TRIGUI, S.; BOUABDALLAH, F.; GARGOURI, A. Hyperproduction of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CT1) of *Penicillium occitanis*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 30, n. 5, p. 662-666, May 2002.

HAHN, R. C.; MACEDO, A. M.; FONTES, C. J. F.; BATISTA, R. D.; SANTOS, N. L.; HAMDAN, J. S. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 7, p. 2849-2854, Jul. 2003.

HALL, T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxon, v. 41, p. 95-98, 1999.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. L.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, New York, v. 6, p. 986-994, Oct. 1996.

HENRY, T.; IWEN, P. C.; HINRICHS, S. H. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 4, p. 1510-1515, Apr. 2000.

HERBERT, C.; JACQUET, C.; BOREL, C.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T.; DUMAS, B. A cis-acting sequence homologous to the yeast filamentation and invasion response element regulates expression of a pectinase gene from the bean pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, n. 32, p. 29125-29131, Aug. 2002.

HOONDAL, G. S.; TIWARI, R. P.; TIWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q. K. Microbial alkaline pectinases and their applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 59, p. 409-418, 2000.

HSEU, R. S.; WANG, H. H.; WANG, H. F.; MONCALVO, J. M. Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 2, p. 1354-1363, Apr. 1996.

HUANG, H. P.; CAI, R. X.; KORENAGA, T.; ZHANG, X. X.; YANG, Y.; DU, Y. M.; ZENG, Y. E. Micelle enhanced spectrofluorimetric determination of L-ascorbic acid based on laccase-linked coupling reaction using flow-injection stopped-flow technique. **Analytical Science Monographs**, London, v. 13, Suppl. S, p.67-70, 1997.

HULLO, M. F.; MOSZER, I., DANCHIN, A.; MARTIN-VERSTRAETE, I. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 18, p. 5426-5430, Sep. 2001.

HUMBERT-GOFFARD, A.; SAUCIER, C.; MOINE-LEDOUX, V.; CANALLAUBÈRES, R. M.; DUBOURDIEU, D.; GLORIES, Y. An assay for glucanase activity in wine. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 34, n. 6, p. 537-543, May 2004.

ISHIBASHI, K.; MIURA, N. N.; ADACHI, Y.; TAMURA, H.; TANAKA, S.; OHNO, N. The solubilization and biological activities of *Aspergillus* β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 42, n. 2, p. 155-166, Oct. 2004.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, Kidlington, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, Sep. 2005.

JAYUS; JUMADI, O.; McDOUGALL, B. M.; SEVIOUR, R. J. Synthesis of extracellular (1 \rightarrow 3)- and (1 \rightarrow 6)- beta-glucanase activities in carbon limiting chemostat culture by the fungus *Acremonium* sp. IMI 383068. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 36, n. 5-6, p. 680-686, Apr. 2005.

JONSSON, L.; SJÖSTRÖM, K.; HÄGGSTRÖM, I.; NYMAN, P. O. Characterization of a laccase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor* and structural features of basidiomycete laccases. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1251, n. 2, p. 210-215, Sep. 1995.

JORDAN, J. A. Real time detection os PCR products and microbiology. **Trends Guide**, v. 12, p. 61-66, 2000.

KANTELINEN, A.; HATAKKA; A.; VIIKARI, L. Production of lignin peroxidase and laccase by *Phlebia radiata*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 31, p. 234-239, 1989.

KASHYAP, D. R.; SONI, S. K.; TEWARI, R. Enhanced production of pectinase by *Bacillus* sp. DT7 using solid state fermentation. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 88, n. 3, p. 251-254, Jul. 2003.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 77, n. 3, p. 215-227, May 2001.

KIM, K. W.; PARK, E. W.; KIM, Y. H.; AHN, K. K.; KIM, P. G.; KIM, K. S. Latency- and defense-related ultrastructural characteristics of apple fruit tissues infected with *Botryosphaeria dothidea*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, n. 2, p. 165-172, Feb. 2001.

KUCERA, B.; LEUBNER-METZGER, G.; WELLMANN, E. Distinct ultraviolet-signaling pathways in bean leaves DNA damage is associated with β -1,3-glucanase gene induction, but not with flavonoid formation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 133, n. 4, p. 1445-1452, Dec. 2003.

LACKI, K.; DUVNJAK, Z. Transformation of 3,5-dimethoxy-4-hydroxy cinnamic acid and its derivatives using enzyme from white-rot fungus *Trametes versicolor*: enzyme characteristics and its application. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, West Sussex, v. 65, n. 3, p. 211-220, Mar. 1996.

LEE, W. C.; YUSOF, S.; HAMID, N. S. A.; BAHARIN, B. S. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). **Journal of Food Engineering**, Kidlington, v. 73, n. 1, p. 55-63, Mar. 2006.

LEITE, O. D.; FATIBELLO-FILHO, O.; BARBOSA, A. M. Determination of catecholamines in pharmaceutical formulations using a biosensor modified with a crude extract of fungi laccase (*Pleurotus ostreatus*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 1-7, Mar./Apr. 2003a.

LEITE, O. D.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C.; BARBOSA, A. M. Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccase-peroxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines. **Talanta**, Amsterdam, v. 59, n. 5, p. 889-896, Apr. 2003b.

LEONOWICZ, A.; CHO, N. S.; LUTEREK, J.; WILKOLAZKA, A.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; MATUSZEWSKA, A.; HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D.; ROGALSKI, J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 41, n.3-4, p. 185-227, 2001.

LI, H. Y.; CAO, R. B.; MU, Y. T. *In vitro* inhibition of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia theobromae*, and chemical control of gummosis disease of Japanese apricot and peach-trees in Zhejiang Province, China. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 187-191, May 1995.

MAGNANI, M.; FERNANDES, T.; PRETE, C. E. C.; HOMECHIM, M.; ONO, E. Y. S.; VILAS-BOAS, L. A.; SARTORI, D.; FURLANETO, M. C.; FUNGARO, M. H. P. Molecular identification of *Aspergillus spp.* isolated from coffee beans. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 1, p. 45-49, Jan./Feb. 2005.

MASILAMINI, S.; MUTHUMARY, J. Development of conidiomata in *Botryodiplodia theobromae*. **Mycological Research**, Kidlington, v.100, pt. 11, p. 1383-1387, Nov. 1996.

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C. Laccase, new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551-565, Jul. 2002.

McCLENDON, J. H.; SOMERS, G. F.; HEUBERGER, J. W. The occurrence of a variety of enzymes hydrolysing cell wall polysaccharides in apples rotted by *Botryosphaeria ribis*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 50, n. 4, p. 258-261, 1960.

MESSERSCHMIDT, A. **Multi-Copper oxidases**. Singapore: World Scientific, 1997.

MINUSSI, R. C.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. Potential applications of laccase in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, Kidlington, v. 13, n. 6, p. 205-216, 2002.

MORA, D.; FORTINA, M. G.; PARINI, C.; RICCI, G.; GATTI, M.; GIRAFFA, G.; MANACHINI, P. L. Genetic diversity and technological properties of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, n. 2, p. 278-287, 2002.

MULLIS, K; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, [New York], v. 55, p. 335, 1987.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Nucleotide. Disponível em: < www.ncbi.nih.gov >. Acesso em: 8 de outubro de 2005

NELSON, N. A Photometric adaptation the Somogyi method for determination of glucose. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 153, p. 376-380, 1944.

NOMENCLATURE Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>> acesso em 08 dez. 2005.

NORONHA, E. F.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P.; ULHOA, C. J. Regulation of 36-kDa β -1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 188, n. 1, p.19-22, Jul. 2000.

NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J.; Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 183, n. 1, p. 119-123, Feb. 2000.

OGUNDANA, S. K. Life cycle of *Botryodiplodia theobromae*, a soft rot pathogen of yam. **Phytopathologische-Zeitschrift**, Berlin, v. 106, n. 3, p. 204-213, 1983.

OLIVEIRA, A. M. F.; LELIS, A. T. de; LEPAGE, E. S.; LOPEZ, G. A. C.; OLIVEIRA, L. C. S. de; CAÑEDO, M. D.; MILANO, S. Agentes destruidores da madeira. In: LEPAGE, E. S. **Manual de preservação de madeiras**. São Paulo: 1986. p. 99-275.

OLSSON, L.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; HANSEN, K. P.; PALMQVIST, E. A. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 33, n. 5, p. 612-619, Oct. 2003.

PARVATHI, A.; KUMAR, H. S.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Study of the occurrence of *Vibrio vulnificus* in oysters in India by polymerase chain reaction (PCR) and heterogeneity among *V. vulnificus* by randomly amplified polymorphic DNA PCR and *gyrB* sequence analysis. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, n. 7, p. 995-1002, Jul. 2005.

PATIL, S. R.; DAYANAND, A. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology**, Amsterdam, 2005. Article in press.

PERRY, C. R.; SMITH, M.; BRITNELL, C. H.; WOOD, D. A.; THURSTON, C. F. Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 139, pt. 6, p.1209-1218, Jun. 1993.

PITSON, S.; SEVIOUR, R. J.; MCDOUGALL, B. M. Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role beta-glucan degradation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 21, n. 3, p. 182-190, Aug. 1997.

PITSON, S.; SEVIOUR, R. J.; BOTT, J.; STASINOPOULOS, S. J. Production and regulation of β -glucanases in *Acremonium* and *Cephalosporium* isolates. **Mycological Research**, Kidlington, v. 95, pt. 3, p. 352-356, Mar. 1991.

PUCHART, V.; KATAPODIS, P.; BIELY, P.; KREMNIČKÝ, L.; CHRISTAKOPOULOS, P.; VRSANSKÁ, M.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; BHAT, M. Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 24, n. 5-6, p. 355-361, Apr./May 1999.

RAMOS, L. J.; DAVENPORT, T. L.; MCMILLAN, R. T.; LARA, R. P. The resistance of mango (*Mangifera indica*) cultivars to tip dieback disease in Florida. **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 5, p. 509-514, May 1997.

RAPP, P. 1,3-beta-glucanase, 1,6-beta-glucanase and beta-glucosidase activities of *Sclerotium glaucum*: synthesis and properties. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 135, pt. 11, p. 2847-2858, Nov. 1989.

RAPP, P. Formation, separation and characterization of three β -1,3-glucanases from *Sclerotium glaucum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1117, n. 1, p. 7-14, Jul. 1992.

RAYACHHETRY, M. B.; ELLIOTT, M. L.. Evaluation of fungus-chemical compatibility for melaleuca (*Melaleuca quinquenervia*) control. **Weed Technology**, Lawrence, v. 11, n. 1, p. 64-69, Jan./Mar. 1997.

REESE, E. T.; MANDELS, M. Beta-D-1,3 glucanases in fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 5, n. 2, p. 173-185, 1959.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc: Microcomputer programs for numerical taxonomy and multivariate analysis. **American Statistician**, Alexandria, v. 41, p. 330, 1987.

ROJAS, L.; FRAGA, J.; SARRIEGO, I.; Genetic variability between *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation with clinical presentation. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 4, n. 1, p. 53-58, Mar. 2004.

RONCERO, M. I. G.; di PETRO, A.; RUIZ-ROLDÁN, M. C.; HUERTAS-GONZÁLEZ, M. D.; GARCIA-MACEIRA, F. I.; MÉGLEEZ, E.; JIMÉNEZ, A.; CARACUEL, Z.; SANCHO-ZAPATERO, R.; HERA, C.; GÓMEZ-GÓMEZ, E.; RUIZ-RUBIO, M.; GONZALEZ-VERDEJO, C. I.; PÁEZ, M. J. Papel de enzimas líticas de la pared celular en la patogenicidad de *Fusarium oxysporum*. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, v. 17, n. 1, p. S47-S53, 2000.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Amperometric biosensors for phenolic compounds determination in the environmental interest samples. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 77-86, Jan./Feb. 2001.

ROUX, J.; WINGFIELD, M.J. Survey and virulence of fungi occurring on diseased *Acacia Mearnsii* in South Africa. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 327-336, Dec. 1997.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**, Paris, v. 4, n. 4, p. 406-425, Jul. 1987.

SALIGKARIAS, I. D.; GRAVANIS, F. T.; EPTON, H. A. S. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: II. A study on mode of action. **Biological Control**, San Diego, v. 25, n. 2, p.151-161, Oct. 2002.

SALOHEIMO, M.; NIKUPAAVOLA, M. L.; KNOWLES, J. K. C. Isolation and structural analysis of the laccase gene from the lignin-degrading fungus *Phlebia-radiata*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 137, pt. 7, p. 1537-1544, Jul. 1991.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning. A laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANCHEZ, M. E.; VENEGAS, J.; ROMERO, M. A.; PHILLIPS, A. J. L.; TRAPERO, A. *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 12, p. 1515-1521, Dec. 2003.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, T.; VILLANUEVA, J. R.; NOMBELA, N. Production and catabolite repression of *Penicillium-italicum* beta-glucanases. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 129, n. 1, p. 52-58, Jan. 1977.

SARTORI, D. **Marcadores moleculares para detecção de espécies de *Aspergillus* produtoras de ocratoxina a em grãos de café**. 2005. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

SCHEEL, T.; HÖFER, M.; LUDWIG, S.; HOLKER, U. Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese and aromatic compounds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 54, n. 5, p. 686-691, Nov. 2000.

SHEVCHIK, V. E.; CONDEMINE, G.; ROBERT-BAUDOY, J.; HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. The exopolygalacturonate lyase PelW and the oligogalacturonate liase Ogl, two cytoplasmic enzymes of pectin catabolism in *Erwinia chrysanthemi* 3937. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, n. 13, p. 3912-3919, Jul. 1999.

SHOBHA, M. S.; KUMAR, A. B. V.; THARANATHAN, R. N.; KOKA, R.; GAONKAR, A. K. Modification of guar galactomannan with aid of *Aspergillus niger* pectinase. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, p. 1-7, 2005. Article in press.

SILVA, E. G.; BORGES, M. F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R. H.; SCHWAN, R. F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 5, n. 9, p. 859-865, Jun. 2005a.

SILVA, R.; GOMES, E. Ligninases. In: SAID, S; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. cap. 19, 2004).

SILVA, M. L. C. da; IZELI, N. L.; MARTINEZ, P. F.; SILVA, I. R.; CONSTANTINO, C. J. L.; CARDOSO, M. S.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; da SILVA, G. V. J. Purification and structural characterisation of (1 → 3; 1 → 6)-β-D-glucans (botryosphaerans) from *Botryosphaeria rhodina* grown on sucrose and fructose as carbon sources: a comparative study. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 61, n. 1, p. 10-17, Jul. 2005b.

SILVEIRA, R. L. V. A.; HIGASHI, E. N.; SGARBI, F.; MUNIZ, M. R. A. Principais doenças na cultura do *Eucalyptus*. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 93, p. 26-30, mar. 2001. Encarte Técnico.

SILVEIRA, R. L. V. A.; KRUGNER, T.L.; SILVEIRA, R. I.; GONÇALVES, A. N. Efeito de boro na suscetibilidade de *Eucalyptus citriodora* a *Botryosphaeria ribis* e *Lasiodiplodia theobromaiae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 2, n. 4, p. 482-485, 1996.

SIRIPUTTHAIWAN, P.; JAUNEAU, A.; HERBERT, C.; GARCIN, D.; DUMAS, B. Functional analysis of CLPT1, a Rab/GTPase required for protein secretion and pathogenesis in the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 118, n. 2, p. 323-329, Jan. 2005.

SKOUBOE, P.; FRISVAD, J. C.; TAYLOR, J. W.; LAURITSEN, D.; BOYSEN, M.; ROSSEN, L. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. **Mycological Research**, Kidlington, v. 103, n. 7, p. 873-881, Jul. 1999.

SLIPPERS, B.; BURGESS, T.; WINGFIELD, B. D.; CROUS, P. W.; COUTINHO, T. A. WINGFIELD, M. J. Development of simple sequence repeat markers for

Botryosphaeria spp. with *Fusicoccum* anamorphs. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 4, n. 4, p. 675-677, Dec. 2004.

SMITH, H.; WINGFIELD, M. J.; PETRINI, O. *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus nitens* in South Africa. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 89, n. 1-3, p. 189-195, Dec. 1996.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: W. H. Freeman, 1973.

SOMOGYI, M. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 160, n. 1, p. 61-68, 1945.

SPAGNUOLO, M.; CRECCHIO, C.; PIZZIGALLO, M. D. R.; RUGGIERO, P. Synergistic effects of cellulolytic and pectinolytic enzymes in degrading sugar beet pulp. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 60, n. 3, p. 215-222, Jun. 1997.

STELUTI, R. M.; GIESE, E. C.; PIGGATO, M. M.; SUMIYA, A. F. G.; COVIZZI, L. G.; JOB, A. E.; CARDOSO, M. S.; SILVA, M. D. da; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Comparison of *Botryosphaera* production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 44, n. 6, p. 480-486, 2004.

SUGUIMOTO, H. H.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H. Veratryl alcohol stimulates fruiting body formation in the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 194, n. 2, p. 235-238, Jan. 2001.

SUNAGAWA, M.; MAGAE, Y. Isolation of gene differentially expressed during the fruit body development of *Pleurotus ostreatus* by differential display of RAPD. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 246, n. 2, p. 279-284, May 2005.

SWART, L.; CROUS, P. W.; PETRINI, O.; TAYLOR, J. E. Fungal endophytes of Proteaceae, with particular emphasis on *Botryosphaeria proteae*. **Mycoscience**, Tokyo, v. 41, p. 123-127, 2000.

TAXONOMY and nomenclature. Disponível em:
<<http://www.doctorfungus.org/thefungi/nomenclature.htm>>. Acesso em: 10 out. 2005.

THOMAS-JINU, S.; GOODWIN, A. E. Morphological and genetic characteristics of *Flavobacterium columnare* isolates: correlations with virulence in fish. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 29-35, Jan. 2004.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, Reading, v. 140, pt. 1, p. 19-26, Jan. 1994.

VALDERRAMA, B.; OLIVER, P.; MEDRANO-SOTO, A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 84, n. 4, p. 289-299, 2003.

VARGAS, L. R. B.; ROSSATO, M.; RIBEIRO, R. T. D.; BARROS, N. M. de. Characterization of *Nomuraea rileyi* strains using polymorphic DNA, virulence and enzyme activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 46, n. 1, p. 13-18, Jan. 2003.

VASCONCELOS, A. D. F.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SCARMINIO, I. S.; REZENDE, M. I. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. **Process Biochemistry**, Kidlington, v. 35, n. 10, p. 1131-1138, Jul. 2000.

VASCONCELOS, A. D. F.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; PACCOLA-MEIRELLES, L. Comparison of the laccases, molecular marker proteins, and induction of pycnidia by three species of botryosphaeriaceous fungi. **Mycoscience**, Tokyo, v. 42, p. 543-548, 2001.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). **Microbial Genetics Bulletin**, Columbus, v. 13, p. 42-43, 1956.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, Dec. 1990.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, New York, v. 22, n. 1-2, p. 161-187, Dec. 2003.

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

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J. RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic-markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, Nov. 1990.

WRÓBEL-KWIATKOWSKA, M.; LORENC-KUKULA, K.; STARZYCKI, M.; OSZMIANSKI, J.; KEPCZYNSKA, E.; SZOPA, J. Expression of beta-1,3-glucanase in flax cause increased resistance to fungi. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 65, p. 245-256, Nov. 2004.

YAROLOV, A. I.; SKOROBOGATKO, O. V.; VARTANOV, S. S.; VARFOLOMEYEV, S. D. Laccase: properties, catalytic mechanism, and applicability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 49, n. 3, p. 257-280, Dec. 1994.

YUAN, Z. Q.; MOHAMMED, C. Pathogenicity of fungi associated with stem cankers of eucalypts in Tasmania, Australia. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, n. 11, p. 1063-1069, Nov. 1999.

ZAMORANI, A.; SPETTOLI, P.; LANTE, A.; CRAPISI, A.; PASINI, G. Immobilized laccase and tyrosinase: an approach for wine stabilization. **Italian Journal of Food Science**, Pinerolo, v. 4, p. 409-414, 1993.

ZHOU, S.; STANOSZ, G. R. Primers for amplication of mt SSU rDNA, and a phylogenetic study of *Botryosphaeria* and associated anamorphic fungi. **Mycological Research**, Kidlington, v. 105, n. 9, p. 1033-1044, Sept. 2001.

ARTIGO

Production of laccase, pectinase and β -1,3-glucanase by *Botryosphaeria* species and their genetic relationship based upon RAPD and ITS sequences*

*Este artigo será enviado para publicação na revista JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY

