Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Análise da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar e estudo da interação *Trichoderma virens* – planta hospedeira

Aline Silva Romão

Tese apresentada, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2010

Aline Silva Romão
Engenheira Agrônoma

Análise da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar e estudo da interação *Trichoderma virens* – planta hospedeira

Orientador:
Prof. Dr. WELINGTON LUIZ DE ARAÚJO

Tese apresentada, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Romão, Aline Silva
Análise da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar e estudo da interação *Trichoderma virens* - planta hospedeira / Aline Silva Romão. - - Piracicaba, 2010.
268 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Cana-de-açúcar 2. Diversidade 3. Fungos 4. Plantas hospedeiras 5. Plantas transgênicas 6. Quitina 7. Trichoderma I. Título

CDD 633.61
R761a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Ao meu amor Jorge (Seunomi),
pelo seu carinho, paciência, dedicação
e apoio, que tornam momentos
difíceis mais felizes

DEDICO

Aos meus pais, Laura e José Luiz, e à minha irmã, Priscilla,
por acreditarem em mim desde o início, por me apoiarem
em todas a decisões e por dividirem comigo cada
momento especial da minha vida

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

De todas as etapas da redação de uma tese, o item *Agradecimentos* é certamente o mais desafiador, pois, embora não dependa de embasamento científico, experimentação e comprovação estatística, é nele que exercitamos a memória para não nos esquecermos de retribuir em palavras a contribuição particular de cada pessoa ou instituição na realização do trabalho. Assim, meus sinceros agradecimentos:

Ao Dr. Welington Luiz de Araújo, pela orientação, confiança, apoio e amizade, durante a iniciação científica e todo o doutorado;

À Profª Drª Aline A. Pizzirani-Kleiner, pela oportunidade de realização do trabalho no Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo" e também pelos ensinamentos, apoio e amizade;

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pelo exemplo profissional, ensinamentos, presença motivadora e valiosas sugestões durante o exame de qualificação;

Ao Prof. Dr. Nicholas J. Talbot, por me receber em seu laboratório e me orientar durante o estágio de Doutorado realizado na Universidade de Exeter, Exeter, Inglaterra;

Ao Prof. Dr. Christopher R. Thornton, pela co-orientação durante o estágio de Doutorado realizado na Universidade de Exeter, Exeter, Inglaterra;

Aos meus pais, Laura e José Luiz, por todo apoio e amor, fundamentais para que eu pudesse desenvolver e concluir este trabalho;

À minha querida irmã Priscilla, pela companhia em Piracicaba, pelos momentos divertidos, pelo apoio e amizade incondicionais;

Ao meu amor Jorge (Seunomi), pelo carinho, paciência, incentivo e admirável habilidade para embalar e lavar placas de Petri;

À minha família, especialmente minha tia Madalena, minha avó Alvina, meus primos Washington e Neide, e a pequena Stephanie, por acreditarem em mim e se orgulharem da minha formação;

Aos meus bichinhos de estimação, em especial as gatinhas Ayla e Missy, que me fizeram companhia e que, com suas graças e estripulias, conseguiram me fazer sorrir mesmo nos momentos de grande estresse;

À pequena grande amiga Maria Carolina Quecine (µ-cuim), pelo companheirismo e amizade, por me fazer rir com suas quedas frequentes, por ser tão prestativa e por compartilhar momentos difíceis durante toda a graduação e o doutorado;

À amiga Manuella Dourado, pela democratização do espaço para as confraternizações do nosso grupo, respondendo aos pedidos de empréstimo da unidade quatro do Condomínio das Antas sempre com sua peculiar doçura;

Às queridas amigas que fiz durante esses anos no Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo": Ana Paula Pallu, Andréa Bogas, Fernanda L. S. Sebastianes, Léia C. L. Fávaro, Manuella Dourado, Maria Beatriz Calderan, Marise Suzuki, Michele Silva, Priscilla B. Rossetto, Renata Assis e Sônia N. Minami, pela amizade, boas risadas, e apoio, que vão além das paredes do laboratório;

À todos os colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo", que passaram ou ainda fazem parte, com os quais eu convivi nos últimos dez anos: Adalgisa R. Torres, Andréa Guelfi, Ágata C. H. Giancoli, Aldo Procópio, Alessandro Riffel, Anderson Ferreira, André Lima, Antonio Sérgio F. Filho, Armando Dias, Camila, Carlos E. Ceroni (K-du), Carlos I. Aguilar-Vildoso, Carolina Almeida, Cláudia S. Gai, Cristina Almeida, Cristina S. Maki, Cristiane Fasanella, Danice Luvizotto, Denise Balani, Fernanda Bernardes, Fernanda Bueno, Fernando Barcellos, Francisco D. Andreote, Heloíze Milano, Joelma Marcon, José Antonio da Silva (Zezo), Júlia Kuklinsky-Sobral, Laura Assunção, Leonardo Souza, Luciana Ávila, Luciana Cursino, Marcelo Gullo, Maria Clara Pestana, Mayra K. Martins, Paulo T. Lacava, Natalie Andreoli, Rodrigo Mendes, Rodrigo Stuart, Rose, Rudi E. Procópio, Sarina Tsui, Tais G. Lana, Uirá C. F. Belmonte, Vanessa dos Santos, Vivian C. Pietrobon e Walter Maccheroni Jr., pela agradável convivência e amizade, discussões informais, colaboração no dia a dia do laboratório e momentos de descontração nos churrascos e *happy hours*;

Aos amigos de Exeter, Inglaterra: Ana-Lília, Badar, Carlos, Ignacio, Jerome, Magdalena, Rita, Romain, Termizi e Zaira, por me acolherem com carinho quando estava longe de casa e proporcionarem ótimos momentos de descontração;

Aos colegas do Laboratório 301, do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade de Exeter, na Inglaterra, pela ajuda durante o desenvolvimento de experimentos e agradável convivência;

Ao Dr. Ricardo Yara, pelos primeiros ensinamentos em cultura e isolamento de fungos, durante a iniciação científica;

Ao Dr. Fernando D. Andreote, pela amizade e auxílio nas análises dos dados de diversidade;

Aos colegas Anderson Ferreira e Dr^{a}. Priscilla B. Rossetto, pelo auxílio nas análises de microscopia de fluorescência e de varredura, respectivamente;

À Dr^{a}. Léia C. L. Fávaro, pelo auxílio nos experimentos de transformação genética mediada por *A. tumefaciens*, pelas dicas valiosas, e pela leitura da tese;

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), especialmente à Dr^{a}. Sabrina M. Chabregas, pela disponibilização de plantas de cana-de-açúcar e patógenos fúngicos utilizados no presente trabalho;

Aos colegas de trabalho Joelma Marcon, Priscilla B. Rossetto, Rodrigo Mendes e José Antônio da Silva, que fizeram parte do time de coleta em campo das plantas de cana-de-açúcar para realização dos isolamentos de microrganismos;

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA) e ao Prof. Elliot W. Kitajima, por disponibilizarem a estrutura para as análises de microscopia eletrônica de varredura;

À Prof[a]. Dr[a]. Margarida L. R. Aguiar-Perecin e ao Prof. Mateus Mondin, do Laboratório de Citogenética Molecular de Plantas, por permitirem a utilização do microscópio de epifluorescência nas análises do presente trabalho;

À Dr[a]. Mônica T. V. Labate, do laboratório Max Feffer de Genética de Plantas/ESALQ-USP, pelo auxílio na realização dos procedimentos de *Southern blot*;

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate, pela disponibilização das linhagens desarmadas de *Agrobacterium tumefaciens*, por permitir a utilização de equipamentos em seu laboratório e pelas valiosas sugestões durante o exame de qualificação;

Ao Prof. Dr. Luís Eduardo Aranha Camargo, pelas valiosas sugestões durante o exame de qualificação;

Ao Dr. Luiz Humberto Gomes (Beto), do Laboratório de Genética de Leveduras/ESALQ-USP, pela disponibilização de equipamentos, em especial o fotodocumentador;

Às secretárias Cândida Vanderléia de Oliveira e Neusa M. S. Rocha, e aos funcionários Fernando Leopoldino, Valdir Próspero e Carlos R. Macedônio, pelo auxílio sempre que necessário;

Ao CNPq, CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro;

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Genética e do curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da ESALQ/USP;

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que não estão listados aqui.

MUITO OBRIGADA!

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis."

Fernando Sabino

“No fim tudo dá certo, se não deu certo é

porque ainda não chegou ao fim”

Fernando Sabino

SUMÁRIO

RESUMO 15
ABSTRACT 17
1 INTRODUÇÃO 19
1.1 Revisão da literatura 20
1.1.1 Fungos associados às plantas 20
1.1.1.1 Aspectos gerais 20
1.1.1.2 Associações benéficas fungo-planta 21
1.1.1.3 Fungos associados às plantas de cana-de-açúcar 25
1.1.1.4 Efeitos de plantas geneticamente modificadas sobre comunidades fúngicas 29
1.1.2 Fungos do gênero *Trichoderma* 33
1.1.2.1 Biologia e estabelecimento da interação com plantas 33
1.1.2.2 Principais mecanismos de biocontrole de fitopatógenos e efeitos sobre a planta hospedeira 35
1.1.3. Transformação genética de fungos como ferramenta em estudos de interação 40
1.1.3.1 Aspectos básicos das metodologias disponíveis para fungos filamentosos 40
1.1.3.2. Estratégias que utilizam a transformação genética para desvendar aspectos da interação fungo-planta 45
Referências 51
2 EFEITO DA TRANSGÊNESE, ESTÁGIO DE CRESCIMENTO E MANEJO AGRÍCOLA NA ESTRUTURA E DIVERSIDADE DA COMUNIDADE FÚNGICA ASSOCIADA À CANA-DE-AÇÚCAR 81
Resumo 81
Abstract 83
2.1 Introdução 85
2.2 Desenvolvimento 88
2.2.1 Material e métodos 88
2.2.1.1 Material vegetal, área de cultivo e delineamento experimental 88
2.2.1.2 Isolamento de fungos endofíticos e da rizosfera de cana-de-açúcar 88
2.2.1.3 Purificação e estoque de fungos 89
2.2.1.4 Identificação molecular 90
2.2.1.5 Análise estatística 92
2.2.1.6 Análise de diversidade, riqueza e rarefação 92
2.2.1.7 Análise molecular de variância (AMOVA) 93
2.2.2 Resultados 93
2.2.2.1 Isolamento de fungos associados à cana-de-açúcar 93
2.2.2.2 Composição e distribuição da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar 97
2.2.2.2.1 Rarefação, diversidade e riqueza das populações fúngicas 99
2.2.2.2.2 Análise de variância molecular (AMOVA) 101
2.2.3 Discussão 102
Referências 106
3 DIVERSIDADE DE FUNGOS ASSOCIADOS À CANA-DE-AÇÚCAR 113
Resumo 113
Abstract 115
3.1 Introdução 117
3.2 Desenvolvimento 120

3.2.1 Material e métodos.....120
3.2.1.1 Isolados fúngicos 120
3.2.1.2 Extração de DNA, PCR e sequenciamento 120
3.2.1.3 Classificação taxonômica dos isolados fúngicos 122
3.2.1.4 Análise de diversidade, riqueza e rarefação 122
3.2.1.5 Coeficiente de similaridade 123
3.2.1.6 Análise dos componentes principais (PCA) 123
3.2.2 Resultados 124
3.2.2.1 Filogenia e classificação taxonômica com ITS1-5,8S-ITS2 *vs.* 18S.....124
3.2.2.2 Composição da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar 124
3.2.2.2.1 Gêneros mais frequentes 127
3.2.2.2.2 Outros gêneros 138
3.2.2.2.3 Isolados fúngicos não identificados em nível de gênero 139
3.2.2.3 Diversidade, riqueza e rarefação 140
3.2.2.4 Correlação dos gêneros com local de isolamento (raiz *vs.* rizosfera) 149
3.2.3 Discussão 152
Referências.....158
4 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO FUNGO *Trichoderma virens* E ESTUDO DA INTERAÇÃO COM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR 169
Resumo 169
Abstract.....171
4.1 Introdução 173
4.2 Desenvolvimento 175
4.2.1 Material e métodos.....175
4.2.1.1 Isolado fúngico 175
4.2.1.2 Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.....176
4.2.1.2.1 Teste de sensibilidade da linhagem *T.v.*223 à higromicina B 176
4.2.1.2.2 Linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* e vetor de transformação.....176
4.2.1.2.3 Otimização do protocolo de transformação 177
4.2.1.2.4 Transformação genética de *T. virens* por *A. tumefaciens* 177
4.2.1.2.5 Purificação e estoque das colônias fúngicas transformadas 179
4.2.1.2.6 Análise dos transformantes por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) 179
4.2.1.2.7 Análise dos transformantes por *Southern blot* 180
4.2.1.2.7.1 Restrição do DNA genômico, eletroforese e transferência para membrana de náilon.....180
4.2.1.2.7.2 Extração do plasmídio, preparo da sonda e hibridação molecular.....181
4.2.1.2.8 Estabilidade mitótica dos transformantes 182
4.2.1.2.9 Comparação *T. virens* transformante *vs.* linhagem selvagem.....182
4.2.1.3 Interação *T. virens* - planta hospedeira.....183
4.2.1.3.1 Reisolamento de *T. virens* linhagem T20 de plantas de cana-de-açúcar.....183
4.2.1.3.2 Monitoramento da colonização por microscopia óptica de fluorescência (MOF) 184
4.2.1.3.3 Monitoramento da colonização por microscopia eletrônica de varredura (MEV) 184
4.2.1.3.4 Avaliação do efeito do fungo *T. virens* sobre o crescimento de plantas de cana-de-açúcar 185
4.2.1.3.5 Avaliação do efeito de *T. virens* sobre o crescimento de outras plantas.....186

4.2.2 Resultados 187
4.2.2.1 Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* 187
4.2.2.1.1 Teste de sensibilidade da linhagem *T.v.*223 à higromicina B.....187
4.2.2.1.2 Transformação genética de *T. virens* por *Agrobacterium tumefaciens* 187
4.2.2.1.3 Análise dos transformantes 190
4.2.2.1.3.1 Estabilidade mitótica.....190
4.2.2.1.3.2 Análise molecular 190
4.2.2.1.3.3 Comparação *T. virens* transformante *vs.* selvagem 191
4.2.2.2 Interação *T.virens* - planta hospedeira 193
4.2.2.2.1 Reisolamento de *T. virens* linhagem T20 de plantas de cana-de-açúcar.....193
4.2.2.2.2 Monitoramento da colonização por microscopia óptica de fluorescência (MOF) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) 196
4.2.2.2.3 Avaliação do efeito de *T. virens* sobre o crescimento das plantas de cana-de-açúcar 201
4.2.2.2.4 Avaliação do efeito de *T. virens* sobre o crescimento de outras plantas 202
4.2.3 Discussão 203
Referências 210
5 PAPEL DAS ENZIMAS QUITINOLÍTICAS NO CONTROLE BIOLÓGICO EFETUADO POR UMA LINHAGEM ENDOFÍTICA DE *Trichoderma virens*.....221
Resumo 221
Abstract 223
5.1 Introdução 225
5.2. Desenvolvimento 228
5.2.1 Material e métodos 228
5.2.1.1 Isolados fúngicos e condições de cultivo 228
5.2.1.2 Confirmação do comportamento endofítico de *T. virens* 228
5.2.1.2.1 Reisolamento de *T. virens* a partir de diferentes hospedeiros 228
5.2.1.2.2 Imunolocalização de *T. virens* em plantas de arroz.....230
5.2.1.3 Obtenção de mutantes deficientes para produção de quitinases.....230
5.2.1.3.1 Construção dos vetores de transformação 230
5.2.1.3.1.1 Vetores para deleção gênica 230
5.2.1.3.1.2 Vetores de silenciamento gênico via RNAi.....231
5.2.1.3.2 Transformação genética, seleção dos mutantes e confirmação por *Southern blot*.....234
5.2.1.3.3 Análise do silenciamento gênico nos mutantes de *T. virens* por *Northern blot*.....235
5.2.1.3.4 Análise da atividade quitinolítica dos mutantes de *T. virens*.....237
5.2.1.3.5 Análise fenotípica dos mutantes 238
5.2.1.4 Ensaios de controle biológico *in vivo*.....238
5.2.1.5 Análise estatística dos dados.....240
5.2.2 Resultados 240
5.2.2.1 Confirmação do comportamento endofítico de *T. virens* linhagem *T.v.*223 em diferentes hospedeiros 240
5.2.2.2 Geração de mutantes deficientes para produção de quitinases.....242
5.2.2.2.1 Atividade quitinolítica dos mutantes de *T. virens*.....247
5.2.2.2.2 Características fenotípicas dos mutantes de *T. virens*.....248
5.2.2.3 Avaliação da capacidade de *T. virens* linhagem selvagem e mutantes quitinolíticos em realizar controle biológico de fitopatógenos *in vivo* 249

5.2.3 Discussão **252**
Referências **258**
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS **267**

RESUMO

Análise da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar e estudo da interação *Trichoderma virens* – planta hospedeira

Fungos associados às plantas desempenham diversas funções biológicas importantes e constituem imensos reservatórios de novos compostos químicos, atividades biológicas e processos biotecnológicos ainda subexplorados. A diversidade estimada para esses microrganismos é enorme, porém menos de 7 % das espécies é conhecida. Em cana-de-açúcar, uma das principais culturas agrícolas do Brasil, estudos de interação e diversidade são recentes e ainda incipientes, principalmente com relação à comunidade fúngica e sua interação com plantas transgênicas. Uma das espécies presentes na comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar é o fungo *Trichoderma virens,* o qual apresenta grande potencial de exploração como agente de controle biológico, promotor de crescimento vegetal e produtor de enzimas e metabólitos secundários. Nesse sentido, o presente trabalho buscou primeiramente determinar a estrutura e diversidade da comunidade de fungos (endófitos de raiz e rizosfera) associados a duas variedades de cana-de-açúcar, uma convencional (SP80-1842) e outra transgênica (IMI-1, expressando resistência ao herbicida imazapir), e avaliar possíveis efeitos da transgênese, do estágio de crescimento e do manejo agrícola. Além disso, uma linhagem de *T. virens,* isolada como endófito de raiz dessa planta, foi selecionada para estudos de interação fungo-planta e determinação dos mecanismos envolvidos na sua atividade de controle biológico. Na primeira etapa do trabalho, que compreendeu isolamento, caracterização e avaliação de alterações na comunidade fúngica, os resultados obtidos mostraram que a comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar é formada por pelo menos 35 gêneros diferentes, a maioria do filo Ascomicota, sendo que a sua estrutura incluiu um grande número de gêneros pouco frequentes e um pequeno número de gêneros altamente frequentes (*Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Epicoccum*), dos quais alguns apresentam especificidade ao local de isolamento (raiz ou rizosfera). A avaliação de possíveis efeitos sobre a comunidade fúngica mostrou que a idade da planta foi o único fator que influenciou de forma significativa as características dessa comunidade, sendo que os efeitos da transgênese, se existentes, devem ser secundários quando comparados às fontes naturais de variação. Na segunda etapa, a linhagem de *T. virens T.v.***223** foi transformada pelo sistema *Agrobacterium tumefaciens* e o transformante gerado (expressando resistência à higromicina B e a proteína GFP) foi utilizado em ensaios de interação via reisolamento e microscopia. Os resultados revelaram que esse fungo não promoveu alterações fenotípicas visíveis na planta hospedeira, colonizou predominantemente as raízes, onde formou camadas densas de micélio ao seu redor, antes de penetrar o espaço intercelular das primeiras camadas de célula da epiderme do tecido radicular. Por último, mutantes de *T. virens* deficientes para produção de quitinases foram gerados por deleção gênica e silenciamento gênico via RNAi e avaliados quanto à capacidade de controle biológico de diferentes fitopatógenos em ensaios em casa de vegetação. Curiosamente, os resultados mostraram que as enzimas quitinolíticas podem ser essenciais à atividade de controle biológico efetuada por *T. virens,* mas que a importância e a participação dessas enzimas no processo dependem do tipo de planta e de patógeno envolvidos na interação, já que mais de um mecanismo deve contribuir para o controle biológico por *T. virens*, como por exemplo, a indução de resistência da planta.

Palavra-chave: Fungo; Diversidade; Interação; Cana-de-açúcar; Planta transgênica; *Trichoderma virens*; Transformação genética; Quitinases

ABSTRACT

Analysis of sugarcane-associated fungal community and study of the interaction *Trichoderma virens* – host plant

Plant-associated fungi perform several important biological functions and are considered a vast source of novel chemical compounds, biological activities and biotechnological processes, whose potential is underexplored. The estimated diversity for these microorganisms is massive, but less than 7% of the species are already known. Sugarcane, one of the most important crops in Brazil, has only recently been studied regarding interactions and diversity, but these studies are still incipient, mainly concerning fungal community and its interaction with transgenic plants. One of the species found on sugarcane fungal community is the fungus *Trichoderma virens*, whose potential on biological control, growth promotion, and enzymes and secondary metabolites production is huge. Taking this into consideration, the current work aimed to determine the structure and diversity of the fungal community (root endophytes and rhizosphere) associated to two varieties of sugarcane, the conventional (SP80-1842) and the transgenic counterpart (IMI-1, expressing imazapyr herbicide resistance), and assess possible effects from transgenese, growth stage and management. In addition, a strain of *T. virens*, isolated as a sugarcane endophyte, was selected to perform the fungal-plant interaction assays and to determine its biological control mechanisms. The results of the first part of this work, including the isolation, characterization and evaluation of fungal community changes, showed that the sugarcane fungal community is made up by at least 35 different genera, most of them belonging to Ascomycota phylum, and its structure included many genera observed in very low frequencies, and a few genera highly frequent (*Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* and *Epicoccum*), from which some have specificity to the place of isolation (root or rhizosphere). Assessing possible effects upon the fungal community showed that the growth stage was the only factor significantly influencing the community's features, besides, if transgenese effects are present, they may be minor compared to other natural sources of variation. The second part of this work included the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *T. virens* strain *T.v.***223** and utilization of the generated transformant (hygromycin B resistant and GFP-expressing) to perform interaction studies by re-isolation and microscopy. The results revealed that this fungus did not promote any phenotypic change in the host plant, it was found mostly in roots, formed a dense mycelia cover over the roots and was able to penetrate intercellular spaces of root epidermis' first layers. Finally, *T. virens* chitinase-deficient mutants were generated by gene deletion and RNAi gene silencing, and tested for biological control activity against different phytopathogens in greenhouse assays. Curiously, the results showed that chitinolytic activity may be essential to the biocontrol activity of *T. virens*, but its significance and the input of each chitinase depends on the plant and pathogen playing the interaction, since more than one mechanism may account for *T. virens* biological control, for instance, the induction of plant resistance.

Keywords: Fungus; Diversity; Interaction; Sugarcane; Transgenic plant; *Trichoderma virens*; Genetic transformation; Chitinases

1 INTRODUÇÃO

A capacidade de formar associações com fungos e outros microrganismos é uma das estratégias mais bem sucedidas que as plantas adotaram para a adaptação às adversidades do ambiente terrestre. As comunidades fúngicas associadas às plantas, por exemplo, desempenham diversas funções biológicas importantes e impõem fortes efeitos na ecologia, capacidade de adaptação e evolução das plantas. Elas incluem fungos mutualistas, antagonistas, saprófitos ou patógenos, ocupando diferentes nichos, como o solo, a filosfera, a rizosfera e, em associações mais íntimas com a planta, o interior de tecidos vegetais. A diversidade e o potencial de utilização desses microrganismos são enormes, porém ainda muito pouco conhecidos e explorados, principalmente quando se tratam de ambientes tropicais, onde a diversidade esperada é ainda maior. Em cana-de-açúcar, cultura de grande destaque na economia brasileira, iniciativas recentes têm buscado investigar a diversidade das comunidades microbianas associadas, mas ainda muito pouco se conhece, principalmente com relação à diversidade da comunidade fúngica e a interação com plantas transgênicas. Por essa razão, a primeira parte do presente trabalho (Capítulos 2 e 3) buscou avaliar a estrutura e a diversidade da comunidade de fungos (endófitos de raiz e rizosfera) associados a duas variedades de cana-de-açúcar, uma convencional (SP80-1842) e outra transgênica (IMI-1, expressando resistência ao herbicida imazapir), e avaliar possíveis efeitos de fatores como a transgênese, o estágio de crescimento da planta e o manejo agrícola adotado na condução da cultura. Estudos desse tipo são importantes, já que mudanças na diversidade fúngica podem ter implicações na fertilidade do solo, equilíbrio do ecossistema, estabilidade, estabelecimento da planta e rendimento.

Como os resultados da primeira etapa do estudo revelaram que fungos do gênero *Trichoderma* foram um dos mais frequentes na comunidade fúngica de cana-de-açúcar, a segunda parte do trabalho (Capítulos 4 e 5) utilizou uma linhagem de *T. virens*, isolada como endófito de raiz de cana-de-açúcar, para caracterizar a interação com a planta hospedeira e avaliar as características da atividade de controle biológico desse fungo. *Trichoderma* spp. constituem um exemplo claro de fungos com alto potencial para promover os mais diferentes benefícios às plantas, como proteção contra patógenos, promoção de crescimento vegetal, aumento na produtividade e a disponibilização de nutrientes, além de serem potenciais candidatos à produtores de enzimas e metabólitos secundários para aplicação na indústria e na medicina.

No presente Capítulo estão apresentados resultados da literatura e informações pertinentes acerca do tema de estudo, com o objetivo de contextualizar as técnicas utilizadas e os resultados apresentados no trabalho.

1.1 Revisão da literatura

1.1.1 Fungos associados às plantas

1.1.1.1 Aspectos gerais

A definição do número de espécies fúngicas presentes no planeta vem sendo discutida há anos, tendo ganhado considerável destaque na literatura científica a partir do final do século vinte, onde numerosos estudos foram realizados na tentativa de estimar a diversidade fúngica total (DREYFUSS; CHAPELA, 1994; FRÖHLICH; HYDE, 1999; HAWKSWORTH, 1991, 2001, 2004; HYDE, 1996; HYDE; FRÖHLICH; TAYLOR, 1997; PASCOE, 1990; ROSSMAN, 1994). A estimativa mais aceita foi descrita por Hawksworth (1991, 2001), o qual considera a proporção de 5,7 espécies fúngicas para cada espécie vegetal, perfazendo cerca de 1,5 milhões de espécies fúngicas. Entretanto, considerando a alta diversidade associada às regiões tropicais e a presença de fungos endofíticos, outros autores propuseram a proporção de 33 espécies fúngicas para cada espécie vegetal, totalizando cerca de 8,25 milhões de espécies fúngicas (ARNOLD et al., 2000; FRÖHLICH; HYDE, 1999). Cerca de 100.000 espécies fúngicas já foram descritas (HAWKSWORTH, 2004), o que representa menos de 7% da diversidade total estimada, considerando a estimativa de 1,5 milhões de espécies, e menos de 1,2%, considerando a estimativa de 8,25 milhões de espécies. Um grande número dessas espécies fúngicas vive associada aos vegetais, seja na superfície, no interior dos tecidos ou na rizosfera, estabelecendo interações que podem variar do mutualismo ao parasitismo. Aliás, acredita-se que todas as espécies de plantas que vivem em ecossistemas naturais estabelecem algum tipo de associação simbiótica com fungos (RODRIGUEZ et al., 2009).

Nas relações mutualísticas, os fungos podem conferir diversos benefícios à planta, como a tolerância à seca (BACON, 1993; READ; CAMP, 1986), tolerância a metais pesados (READ, 1999), promoção de crescimento (BELESKY et al., 1987; MARKS; CLAY, 1990; VARMA et

al., 1999), resistência à doença (CARROLL, 1986; FREEMAN; RODRIGUEZ, 1993; REDMAN et al., 1999), resistência à herbivoria (LATCH, 1993) e aumento na aquisição de nutrientes (READ, 1999). No comensalismo, a associação favorece o fungo sem, no entanto, gerar qualquer efeito benéfico ou prejudicial à planta hospedeira, enquanto que, nas interações parasíticas a presença do fungo traz prejuízos à planta, os quais variam em extensão desde a redução de taxas de crescimento ou fertilidade até a morte da planta (REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001). Curiosamente, as relações fungo-planta compreendem um gradiente de interações (parasitismo-comensalismo-mutualismo), que depende não somente da adaptação e especificidade a um hospedeiro, mas também do estágio de desenvolvimento das partes envolvidas, da virulência inata do microrganismo, das respostas de defesa da planta e das condições ambientais que permeiam a interação (AZEVEDO et al., 2000; SCHULZ; BOYLE, 2005). A contribuição de alguns fungos para o ciclo de nutrientes, desenvolvimento e saúde da planta ressalta a importância de se conhecer melhor esses microrganismos e explorar suas características benéficas em interações com as plantas.

1.1.1.2 Associações benéficas fungo-planta

A capacidade de formar associações com fungos e outros microrganismos é uma das estratégias mais bem sucedidas que as plantas adotaram para a adaptação às adversidades do ambiente terrestre. Os benefícios das interações com fungos benéficos são muitos e incluem, por exemplo, tolerância a estresses bióticos e abióticos, promoção de crescimento e aumento do sucesso reprodutivo (RODRIGUEZ; REDMAN, 2008). Inclusive, em alguns casos espécies de plantas não são capazes de superar estresses de ambientes naturais na ausência desses simbiontes (REDMAN et al., 2002; RODRIGUEZ; REDMAN, 2008). De fato, as comunidades fúngicas associadas às plantas podem impor fortes efeitos na capacidade de adaptação ao ambiente e evolução das plantas (BRUNDRETT, 2006), e também influenciar a estrutura e diversidade de outros organismos associados, como bactérias, nematóides e insetos (OMACINI et al., 2001).

Fungos que formam simbioses com plantas podem estar presentes na rizosfera, nas superfícies vegetais (epífitos) e no interior dos tecidos (endófitos). A rizosfera é o solo influenciado pelas raízes das plantas e seus exsudados, e abriga a associação simbiótica fungo-planta mais comum na natureza, as micorrizas, presentes em mais de 90% das plantas terrestres

(SELOSSE; TACON, 1998). O termo micorriza é empregado para se referir às associações mutualísticas que ocorrem entre fungos de solo e raízes de plantas, onde a planta se beneficia do fornecimento de água e minerais coletados pelo fungo e, em contrapartida, o fungo recebe carbono derivado da fotossíntese realizada pela planta (SMITH; READ, 1997). Dentre os diferentes tipos, as micorrizas arbusculares (MA) são as mais frequentes (BRUNDRETT, 2009), principalmente em solos relativamente jovens (LAMBERS et al., 2008), e também as mais antigas, já que a primeira constatação foi feita há mais de 400 milhões de anos (BRUNDRETT, 2002). Elas se caracterizam pela formação de uma estrutura fúngica dicotômica, o arbúsculo, no interior das células do córtex radicular, responsável pela troca de nutrientes entre o fungo e a planta (BONFANTE-FASOLO; PEROTTO, 1991). Nessa associação, não existem evidências de especificidade ao hospedeiro e não ocorrem alterações morfológicas macroscópicas nas raízes colonizadas (HARDOIM, 2006). Em alguns solos mais velhos, MAs são parcialmente substituídas por ectomicorrizas e micorrizas ericóides, as quais são consideradas formas mais avançadas e diversas de simbiose micorrízica (BRUNDRETT, 2002), capazes de acessar fósforo e nitrogênio em formas não disponíveis para MAs (BOLAN; ROBSON; BARROW, 1987; YAO et al., 2001). Os fungos micorrízicos podem exercer fortes influências na fisiologia das plantas hospedeiras. Por exemplo, eles produzem efeitos protetores contra estresses bióticos, em parte como resultado da melhoria na nutrição da planta (JEFFRIES, 1987), mas também a partir de interações mais específicas, como a competição por nutrientes da rizosfera e dos tecidos vegetais, limitando assim a colonização de fungos patogênicos (LARSEN; BODKER, 2001; SELOSSE; BAUDOIN; VANDENKOORNHUYSE, 2004), e também a modificação do metabolismo da planta, a partir da indução de respostas de defesa que permitem a formação de micorrizas mas evitam o ataque por patógenos (SELOSSE; BAUDOIN; VANDENKOORNHUYSE, 2004). Além disso, esses fungos também podem proteger as plantas contra estresses abióticos (SMITH; READ, 1997), pela redução da concentração de compostos tóxicos e/ou tamponamento das reações da planta a esses compostos (SCHUTZENDUBEL; POLLE, 2002), e pela prevenção ao estresse hídrico, via aumento da capacidade de absorção de água ou aquisição de mecanismos para tolerância à seca (AUGÉ, 2001).

Além dos fungos micorrízicos, a rizosfera também abriga outros fungos benéficos às plantas, os quais contribuem de diferentes maneiras, em geral sinergísticas, para a proteção, nutrição e desenvolvimento das mesmas. Entretanto, os benefícios desses fungos foram

reconhecidos há muito menos tempo que os das micorrizas, e por isso pouco se conhece sobre a interação desses fungos com as plantas. É sabido, por exemplo, que alguns fungos da rizosfera são capazes de degradar compostos tóxicos, como xenobióticos e moléculas aromáticas, constituindo importantes componentes do sistema que permite a sobrevivência das plantas em solos contaminados (HARVEY et al., 2002). Outros fungos, como *Fusarium oxysporum*, apresentam linhagens não patogênicas que possuem efeito supressivo sobre linhagens patogênicas (FRAVEL; OLIVAIN; ALABOUVETTE, 2003), provavelmente em função da competição por carbono, espaço e sítios de infecção. Aliás, uma grande variedade de espécies fúngicas é capaz de atuar como agente de controle biológico de fitopatógenos, sendo que fungos do gênero *Trichoderma* apresentam grande destaque nessa função (WHIPPS; LUMSDEN, 2001). Inclusive, *Trichoderma* spp. exibem outras formas de contribuir com o desenvolvimento e saúde da planta, pois também são capazes de promover crescimento vegetal, induzir respostas de defesa e atuar como biorremediadores (HARMAN, 2006; HARMAN et al., 2004a).

A presença de fungos no interior dos tecidos vegetais também pode ser benéfica à planta, sendo que associações simbióticas entre fungos endofíticos e plantas têm sido extensivamente descritas na literatura. Diferentes definições já foram propostas para o termo endófito (CARROLL, 1986; HALLMANN et al., 1997; PETRINI, 1991), sendo que uma definição recente considera como microrganismo endofítico todo aquele que pode ou não crescer em meios de cultura, ou seja, cultiváveis ou não, e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Como essa definição exclui rizóbios e micorrizas, uma redefinição desse termo foi sugerida posteriormente, considerando a definição proposta por Azevedo e Araújo (2007), mas, adicionando a separação dos endófitos em dois tipos: Tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e Tipo II, os que produzem estruturas externas à planta (aqui são incluídos rizóbios e micorrizas) (MENDES; AZEVEDO, 2007). A grande diferença entre os fungos endofíticos do Tipo I e as micorrizas (Tipo II) é o fato de que os primeiros residem completamente dentro do tecido vegetal (como raízes, caules e folhas), enquanto que nas micorrizas, os fungos micorrízicos colonizam o interior das raízes e crescem para a rizosfera. Além disso, os fungos endofíticos do Tipo I foram até pouco tempo muito menos estudados que os fungos micorrízicos (Tipo II). Nesse ponto, vale lembrar que a classificação dos microrganismos em endofíticos, epifíticos, patogênicos etc. é meramente didática, já que existe

sempre um gradiente dinâmico (parasitismo-comensalismo-mutualismo) nas interações microrganismo-planta. De maneira geral, dois grupos de fungos endofíticos do Tipo I têm sido reconhecidos, segundo diferenças nas relações evolutivas, taxonomia, planta hospedeira e funções ecológicas, sendo eles: endófitos clavicipitáceos, que compreendem espécies da família Clavicipitaceae e formam simbioses quase que exclusivamente com gramíneas de clima temperado; e endófitos não clavicipitáceos, altamente diversos e capazes de colonizar grande gama de hospedeiros (desde briófitas até angiospermas) (RODRIGUEZ et al., 2009; SCHULZ; BOYLE, 2005; SIEBER, 2007). A elevada diversidade desse segundo grupo levou Rodriguez et al. (2009) a propor a divisão do mesmo em três subgrupos funcionais, baseando-se nas características de história de vida e significância ecológica (para mais detalhes consultar RODRIGUEZ et al., 2009).

Fungos endofíticos do Tipo I têm sido isolados praticamente de todas as espécies de plantas estudadas (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007), onde eles podem estabelecer relações mutualísticas e com isso conferir diferentes benefícios para a performance das plantas, como a tolerância à herbivoria, às altas temperaturas, à salinidade, à patógenos e à seca, além do aumento no acúmulo de biomassa de raízes e parte aérea (ARNOLD et al., 2003; BACON; HILL, 1996; CLAY; HOLAH, 1999; MÁRQUEZ et al., 2007; REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001; REDMAN et al., 2002; SAHAY; VARMA, 1999; WALLER et al., 2005). Durante a evolução das plantas, associações mutualísticas com fungos endofíticos ocorreram e promoveram adaptações relacionadas à capacidade de defesa da planta contra o ataque de insetos, microrganismos e animais herbívoros, por meio da produção de uma variedade de compostos secundários, como alcalóides, terpenóides, esteróides e compostos aromáticos repelentes ou tóxicos a seus inimigos (AZEVEDO et al., 2000; LIU et al., 2001; SIEGEL; BUSH, 1996; SIEGEL et al., 1990). Por exemplo, a planta *Artemisia annua*, conhecida por produzir um composto antifúngico e antimalárico denominado artemisina, o qual a protege do ataque por fungos fitopatogênicos, possui uma comunidade fúngica endofítica (pelo menos 21 fungos) que apresenta atividade antagônica ao crescimento de diferentes fungos fitopatogênicos, indicando que, na verdade, a defesa da planta seria uma conseqüência da presença de determinados fungos endofíticos (LIU et al., 2001). Em outros casos, o controle biológico envolve o contato direto do endófito com o patógeno, como o que acontece em plantas de tomate, onde o patógeno *F. oxysporum* pode ser controlado por linhagens endofíticas da mesma espécie, pela ação de

enzimas líticas do endófito nas células do patógeno (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Curiosamente, fungos entomopatogênicos também podem ser encontrados colonizando diferentes espécies de plantas endofiticamente, como em banana, cacau, café, maçã e milho (CAMATTI-SARTORI et al., 2005; VEGA, 2008), contribuindo para o controle de pragas nessas culturas. Fungos endofíticos também podem contribuir de forma direta ou indireta com o crescimento da planta (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). A forma direta envolve a produção de compostos que facilitam a absorção de nutrientes pela planta (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007) ou a produção de fitormônios (NASSAR; EL-TARABILY; SIVASITHAMPARAM, 2005; SIRRENBERG et al., 2007) e a forma indireta envolve a prevenção das perdas oriundas do ataque por patógenos (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). O fungo *Piriformospora indica*, por exemplo, é conhecido por promover o crescimento de diferentes plantas, como milho, tabaco, salsa, álamo, *A. annua* e *Bacopa monnieri* L., onde ele é capaz de colonizar endofiticamente as raízes (VARMA et al., 1999). A proteção da planta hospedeira pelo endófito contra estresses abióticos pode ser essencial para a sobrevivência da planta em alguns casos. Na interação do fungo *Curvularia protuberata* com a planta *Dichanthelium lanuginosum*, nem a planta nem o fungo toleram temperaturas acima de 40º C quando crescidos isoladamente, entretanto, quando crescidos interagindo simbioticamente, ambos são capazes de tolerar temperaturas próximas à 65º C (MÁRQUEZ et al., 2007; REDMAN et al., 2002). Várias revisões que abordam fungos endofíticos de plantas tropicais e de clima temperado estão disponíveis na literatura, e contêm informações aprofundadas sobre o assunto (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007; AZEVEDO et al., 2000; CARROLL, 1988; PETRINI, 1991; REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001; RODRIGUEZ; REDMAN, 2008; RODRIGUEZ et al., 2009; SAIKKONEN et al., 1998; SCHULZ; BOYLE, 2005; STONE; POLISHOOK; WHITE, 2004). O estudo de microrganismos endofíticos do Tipo I tem merecido cada vez mais destaque, especialmente em ambientes tropicais, já que eles constituem fontes promissoras de efeitos benéficos às plantas, além de serem uma fonte inesgotável de novos metabólitos e/ou processos biotecnológicos (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007).

1.1.1.3 Fungos associados às plantas de cana-de-açúcar

No Brasil, a cultura da cana-de-açúcar tem grande destaque no cenário agrícola e econômico, uma vez que o país é líder mundial na produção dessa cultura, com cerca de 650

milhões de toneladas produzidos numa área de 8,1 milhões de hectares na safra de 2008, envolvendo 1,3 milhões de empregos formais nos setores de cana, etanol e açúcar (IBGE, 2009). Devido à sua importância, novas variedades vêm sendo desenvolvidas, e a utilização de plantas geneticamente modificadas expressando características de interesse tem sido amplamente considerada. Entretanto, até o momento muito pouco foi avaliado sobre a interação entre fungos benéficos e cana-de-açúcar, e pouco se conhece sobre as comunidades fúngicas associadas a essa cultura, principalmente quando se tratam de variedades transgênicas. A maioria dos trabalhos realizados até o momento estudou fungos patogênicos, já que estes podem trazer grandes perdas na produção.

Diversas espécies fúngicas são descritas como patogênicas à cultura da cana-de-açúcar, entre elas *Colletotrichum falcatum*, agente causal da Podridão Vermelha, *Ustilago scitaminea*, agente causal do Carvão, *Leptosphaeria sacchari*, agente causal da Mancha Anelar, *Bipolaris sacchari*, agente causal da Mancha Ocular, *Puccinia melanocephala*, agente causal da Ferrugem, *F. moniliforme*, agente causal da "Podridão de *Fusarium*" e "Pokkah-Boeng" e *Thielaviopsis paradoxa*, agente causal da Podridão Abacaxi. Diferentes aspectos são abordados nos trabalhos que estudam esses patógenos (ASNAGHI et al., 2001; RABOIN et al., 2007; SINGH; SOMAI; PILLAY, 2004). Por exemplo, a estrutura e diversidade genética de diferentes populações do patógeno *U. scitaminea* isoladas de diversas regiões do mundo foi investigada com o uso de marcadores microssatélites e revelou que o patógeno deve ter se originado no continente asiático e então migrado, há mais de 60 anos, para América e África através do fluxo de material contaminado (RABOIN et al., 2007). Em outro trabalho, foram desenvolvidos iniciadores específicos para detecção da presença desse patógeno em plantas de cana-de-açúcar e assim facilitar a avaliação da resistência de variedades (SINGH; SOMAI; PILLAY, 2004). Em estudos moleculares, a presença de determinados genes tem sido correlacionada com a resistência de variedades de cana-de-açúcar a certos patógenos. A variedade R 570, por exemplo, é resistente a uma ampla diversidade de isolados do patógeno *P. melanocephala*, provavelmente pela presença de um único gene ou única região cromossômica, que confere resistência a ferrugem em diferentes regiões geográficas e que, por essa razão, tem grande potencial para utilização em programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar (ASNAGHI et al., 2001). Entretanto, ainda pouco se conhece sobre a interação em nível molecular dos diferentes patossistemas em

cana-de-açúcar, mesmo para doenças de grande importância econômica para a cultura, como no caso de *U. scitaminea* e *B. sacchari* (BORRAS-HIDALGO et al., 2005).

Formas alternativas de controle dos patógenos também têm sido avaliadas, como no trabalho de Viswanatham et al. (2003), os quais analisaram o potencial de diferentes bactérias e linhagens de *T. harzianum*, isolados da rizosfera e endosfera de plantas de cana-de-açúcar, em produzir enzimas quitinilolíticas e suprimir o crescimento do patógeno *C. falcatum*. A presença de fungos fitopatogênicos atacando sementes e plântulas de cana-de-açúcar em viveiros também constitui um problema significativo nessa cultura, já que esses patógenos causam perdas consideráveis (BYTHER; STEINER, 1972; LOVELESS; SMITH, 1956), limitando o sucesso e a rapidez dos programas de melhoramento genético. Por essa razão, alguns trabalhos têm empregado a análise sanitária das sementes (LOVELESS; SMITH, 1956; SANGUINO, 1976; SILVA, 1978; SINHA; SINGH, 1982), na busca de identificar os fungos associados e definir o foco do tratamento químico. Por exemplo, Martins et al. (2009) observaram as espécies *Alternaria alternata*, *Aspergillus* sp., *B. sacchari*, *Bipolaris* sp., *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Epicoccum* sp., *F. verticillioides*, *F. semitectum*, *Leptosphaerulina* sp., *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *Periconia* sp., *Phoma herbarum*, *Rhizopus* sp. e *Trichoderma* sp. associadas às sementes de híbridos de cana-de-açúcar.

A ocorrência natural do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) atacando cigarrinha-das-raízes em canaviais de todo o País é bastante comum e incentiva o uso desse agente de controle biológico em áreas infestadas pela praga. Razões ambientais e econômicas têm reforçado a aplicação de recursos em estudos para uso desse fungo em programa de manejo integrado da cigarrinha (DINARDO-MIRANDA et al., 2004). Alguns trabalhos envolvendo avaliação de isolados, número e doses de aplicação foram conduzidos (ALMEIDA et al., 2002; BATISTA FILHO et al., 2002; GIMENEZ-PECCI et al., 2002) e vários produtores já utilizam o fungo, multiplicado em grãos de arroz, em áreas comerciais para controle da cigarrinha-das-raízes. Aliás, os fungos entomopatogênicos têm importância considerável na cultura da cana-de-açúcar. Por exemplo, o fungo *Gibberella fujikuroi*, encontrado naturalmente em plantações de cana-de-açúcar da Índia, mostrou-se promissor como agente de controle biológico contra o afídio *Ceratovacuna lanigera* Zehntner que ataca plantas de cana-de-açúcar (MEHETRE; MUKHERJEE; KALE, 2008). Além disso, *M. anisopliae* também pode ser usado no controle da broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*), *Verticillium lecanii* pode ser utilizado para o controle de

pulgões (*Aphis* sp.) (ALVES, 1986) e *Beauveria bassiana* tem potencial para controle de *Eoreuma loftini*, *Diatraea saccharalis* e *Tetranychus urticae* (ALMEIDA et al., 2002; ARCAS; DIAZ; LECUONA, 1999; LEGASPI; POPRAWSKI; LEGASPI, 2000).

Poucos estudos têm avaliado a associação das plantas de cana-de-açúcar com fungos endofíticos e da rizosfera. Até o momento, apenas quatro trabalhos disponíveis na literatura avaliaram, parcialmente, a comunidade de fungos filamentosos da rizosfera de cana-de-açúcar (ABDEL-RAHIM; BAGHADADI; ABDALLA, 1983; EL-AMIN; SAADABI, 2007; EL AMIN; ABDALLA, 1980; MENDES, 2008). A presença de fungos do gênero *Rhizopus*, *Mucor*, *Cunninghamella* e *Aspergillus* foi relatada por El Amin e Abdalla (1980). Abdel-Rahim et al. (1983) observaram que os gêneros *Aspergillus* e *Rhizopus* predominam no solo (rizosférico ou não) e que os gêneros *Fusarium* sp., *Curvularia* sp. e fungos de micélio estéril escuro estão presentes em maior frequência na superfície das raízes do que no solo ao redor. Já El-Amin e Saadabi (2007) detectaram a presença de um total de 23 espécies fúngicas, distribuídas em 16 gêneros com seis espécies estéreis, sendo que: *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Curvularia* apresentaram alta frequência; *Mucor*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Trichoderma* e *Verticillium* foram observados em frequência moderada e, *Cunninghamella*, *Chaetomium*, *Botrytis*, *Humicola* e *Paecilomyces* em frequência baixa. Já a comunidade de fungos leveduriformes da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar foi avaliada por Azeredo et al. (1998), a partir de canaviais situados nas proximidades de Campos, no Rio de Janeiro. Nesse trabalho, os autores relatam a predominância de leveduras do filo Basidiomicetos, sendo que os fungos *Cryptococcus laurentii*, *Debaryomyces hansenii* e *Fellomyces horovitziae* prevaleceram na comunidade da rizosfera. A comunidade fúngica endofítica de cana-de-açúcar também é bem pouco conhecida. As micorrizas, endófitos do Tipo II, amplamente reconhecidas por seus efeitos benéficos à planta hospedeira e bastante estudadas em diversas espécies de plantas, parecem ser pouco relevantes para cana-de-açúcar. Vários trabalhos têm mostrado que essa cultura responde muito pouco à formação de micorrizas arbusculares (KELLY et al., 2001, 2005), possivelmente porque a planta apresenta baixa dependência micotrófica (SIQUEIRA; FRANCO, 1988). Entretanto, alguns estudos indicam que essa simbiose pode ser vantajosa em determinadas situações, como no cultivo de plantas de cana-de-açúcar micropropagadas (GULERI et al., 2005) e na presença do patógeno *C. falcatum* (NASIM et al., 2008). Espécies de fungos micorrízicos descritos como associados à cana-de-açúcar incluem: *Glomus clarum* (HARDOIM, 2006;

KELLY et al., 2001; KELLY et al., 2005), *G. fasciculatum* (GULERI et al., 2005; NASIM et al., 2008), *Acaulospora* sp., *Scutellospora heterogama, G. etunicatum, G. occultum* e *Gigaspora margarita* (REIS; PAULA; DÖBEREINER, 1999), *G. mosseae, G. monosporum, G. nigra* e *G. minuta* (NASIM et al., 2008). Fungos endofíticos do Tipo I, aqueles que não produzem estruturas externas à planta, são os menos estudados em cana-de-açúcar, tanto em relação à diversidade como ao potencial no controle biológico e promoção de crescimento. Até o momento, apenas dois trabalhos disponíveis na literatura relatam o estudo desses endófitos em cana-de-açúcar. Um deles estudou a ocorrência de fungos endofíticos em folhas, hastes e raízes e observou a presença dos seguintes fungos: *F. solani, F. moniliforme, Fusarium* sp., *C. geniculata, P. citrinum, P. italicum, Penicillium* sp., *A. niger, Aspergillus* sp., *M. racemosus, Monilia* sp., *Trichophyton rubrum* e *Trichoderma* sp. (VON MUHLEN; SILVA, 2005). O outro trabalho avaliou a população de fungos endofíticos presentes em folhas de cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada (expressando gene de resistência ao herbicida imazapir) através dos métodos dependente e independente de cultivo (STUART, 2006; STUART et al., 2010). Os resultados obtidos pelo método dependente de cultivo mostraram que a comunidade de endófitos possui grande diversidade e foi representada por doze famílias diferentes do filo Ascomicota, que incluíram fungos dos gêneros *Ampelomyces, Aspergillus, Cladosporium, Cochliobolus, Epicoccum, Fusarium, Guignardia, Leptosphaeria, Paecilomyces, Pestalotiopsis, Xylaria* entre outros (STUART, 2006; STUART et al., 2010). Curiosamente, a análise independente de cultivo com base no gene 18S, identificou a presença de outros gêneros, todos pertencentes ao filo Basidiomicota. Os gêneros observados incluíram *Bullera, Coniothyrium, Cryptococcus, Phoma, Pulvinula, Rhodotorula* e *Ustilago* (STUART, 2006). Esses dados mostraram que os métodos dependente e independente de cultivo tiveram diferentes espectros de amostragem, reforçando a importância de se aliar os dois métodos na avaliação da diversidade de populações microbianas.

1.1.1.4 Efeitos de plantas geneticamente modificadas sobre comunidades fúngicas

O cultivo de plantas transgênicas tem se intensificado a cada ano desde o lançamento comercial dessas culturas em 1996. Embora essas plantas carreguem características de interesse, a liberação do cultivo em larga escala exige avaliações dos possíveis riscos à saúde humana e monitoramento dos impactos no meio-ambiente. Neste sentido, um dos aspectos menos

compreendidos quanto ao risco do cultivo de plantas geneticamente modificadas (PGMs) é o possível efeito sobre a biota do solo e as comunidades fúngicas associadas às plantas, principalmente em países de clima tropical, onde a diversidade é maior. Considerando a importância da manutenção do equilíbrio das interações fungo-planta e o fato de que a expressão de transgenes ou a demanda de um novo manejo cultural, em decorrência da transgênese, pode estimular ou inibir o desenvolvimento de diferentes espécies microbianas (DUNFIELD; GERMIDA, 2004) e com isso alterar o equilíbrio microbiológico do ambiente, salienta-se a necessidade da avaliação dos possíveis efeitos sobre as comunidades fúngicas e bacterianas associadas às plantas. Até o momento, os resultados dos estudos têm mostrado que os efeitos de PGMs sobre as comunidades microbianas podem ser positivos, negativos ou neutros (DEVARE; JONES; THIES, 2004; DUNFIELD; GERMIDA, 2001; DUNFIELD; GERMIDA, 2003; LAMARCHE; HAMELIN, 2007; LIU et al., 2008; POWELL et al., 2007; SHEN; CAI; GONG, 2006; STEFANI; BÉRUBÉ, 2006; WATRUD et al., 2006; WU; YE; MIN, 2004), e não existe um consenso quanto a esse aspecto, de forma que análises precisam ser realizadas caso a caso.

A interação entre comunidade fúngica e PGMs pode ser influenciada pelo tipo de transgene introduzido na planta, visto que a expressão deste e de outros genes associados é que deve afetar a comunidade microbiana (DUNFIELD; GERMIDA, 2004). Por exemplo, a super-expressão de uma quitinase de feijão em plantas de tabaco propiciou um aumento na resistência ao patógeno *Rhizoctonia solani* (BROGLIE et al., 1991) e a super-expressão do gene da proteína PR-1a em tabaco aumentou a tolerância dessa planta aos patógenos *Peronospora tabacina* e *Phytophthora parasitica* (ALEXANDER et al., 1993), indicando o efeito específico da transgenia sobre fungos patogênicos (fungos alvo). Entretanto, os efeitos dos compostos antimicrobianos podem se estender também para microrganismos não-alvo, como endófitos e micorrizas, envolvidos em processos importantes, como a proteção e nutrição da planta, decomposição de matéria orgânica e ciclagem de nutrientes. Em tabaco, estudos mostraram que a expressão constitutiva de diferentes proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR) com propriedades antifúngicas não afetou a colonização das raízes pelo fungo micorrízico *G. mosseae* (VIERHEILIG et al., 1995; VIERHEILIG et al., 1993), entretanto, níveis elevados de uma classe II de β-1,3-glicanase de tabaco reduziram o potencial de colonização desse fungo (VIERHEILIG et al., 1995), indicando que as modificações genéticas que plantas transgênicas carregam podem causar efeitos sobre microrganismos não-alvo, mas que isso não pode ser tomado como regra. Em outro trabalho,

foram observadas alterações no desenvolvimento regular dos apressórios de *G. mosseae* em associação com plantas transgênicas de milho (*Bt*176), expressando o gene *Cry1Ab* para produção da toxina *Bt* (TURRINI et al., 2004). Essa mesma variedade de milho (*Bt*176) e seus resíduos utilizados como fertilizantes afetaram a comunidade bacteriana da rizosfera, a respiração no solo e o estabelecimento de associações micorrízicas com fungos do ambiente (CASTALDINI et al., 2005). Curiosamente, um estudo realizado ao longo de dois anos com plantas de milho convencionais (DK-626 e P-3394) e transgênicas (DK-626 Bt), expressando gene para a produção da toxina *Bt*, mostrou que as plantas transgênicas apresentavam menor diversidade de fungos associados às raízes do que as plantas convencionais, contudo, a taxa de infecção pelo patógeno *F. moniliforme* foi maior nas plantas convencionais, indicando a presença de alterações nas relações entre patógeno, hospedeiro e simbionte daquele sistema (TATLI; GULLU; OZDEMIR, 2004). Também, mudanças na abundância relativa de fungos endofíticos de raízes de batata transgênica expressando gene para produção da lisozima T4 (DL11) foram observadas quando comparadas ao cultivar parental (Désirée), por ambos os métodos, dependente e independente de cultivo (GÖTZ et al., 2006).

Alguns trabalhos têm mostrado que os efeitos da transgênese sobre as comunidades microbianas podem ser transitórios, ocorrer em apenas algum estágio de desenvolvimento ou somente na presença de planta viável no solo. Por exemplo, num estudo envolvendo dois anos de cultivo de canola transgênica resistente ao herbicida glifosato e sua isolinha convencional, foram analisadas diferentes amostras da rizosfera de plantas transgênicas e não transgênicas, abrangendo todo o ciclo de desenvolvimento da planta. Os resultados mostraram que houve variação na comunidade microbiana tanto em função do genótipo (variedade transgênica e não transgênica) como do estágio de desenvolvimento, porém os autores verificaram que essa variação foi transiente, visto que só ocorreu na presença de plantas viáveis no campo (DUNFIELD; GERMIDA, 2003). De forma semelhante, Andreote et al. (2008) também observaram efeitos transientes do cultivo de plantas transgênicas de eucalipto sobre comunidades bacterianas da rizosfera e do rizoplano, uma vez que as alterações na diversidade dessas comunidades só foram observadas nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta.

Posteriormente, foi observado que para comunidades de fungos endofíticos os efeitos parecem ser mais persistentes (STUART, 2006; STUART et al., 2010). Os autores avaliaram a comunidade de fungos endofíticos isolados de folhas de cana-de-açúcar convencional e

transgênica (expressando resistência ao herbicida imazapir) e verificaram que as flutuações observadas na composição dos haplótipos fúngicos estavam relacionadas tanto ao cultivar (transgênico ou convencional) quanto à aplicação do herbicida, sendo que, enquanto a aplicação do herbicida estimulou mudanças rápidas e transientes na comunidade de fungos, as plantas transgênicas induziram mudanças mais lentas que foram mantidas ao longo do período avaliado.

A ausência de efeitos significativos de plantas transgênicas sobre comunidades fúngicas é mais comum do que se imagina, uma vez que diversos trabalhos têm descrito esse tipo de resultado (GIRLANDA et al., 2008; GYAMFI et al., 2002; HEUER et al., 2002; MILLING et al., 2004; O'CALLAGHAN et al., 2004; STEFANI; BÉRUBÉ, 2006; WATRUD et al., 2006). Por exemplo, a influência de plantas de morango transgênicas, expressando um gene de quitinase de arroz, sobre o crescimento de outras espécies de plantas e na microbiota do solo (fungos, bactérias e actinomicetoss) foi investigada em casa de vegetação e os resultados mostraram que não foi possível detectar diferenças entre os efeitos das plantas transgênicas e convencionais nos organismos avaliados (ASAO; ARAI; NISHIZAWA, 2003). De forma similar, o cultivo de plantas de milho transgênicas resistentes ao herbicida glifosato e a aplicação do herbicida não afetaram a comunidade de bactérias denitrificantes e de fungos da rizosfera (HART et al., 2009). Inclusive, os efeitos da modificação genética são tão pequenos quando comparados aos de outros fatores, que até mesmo diferenças entre variedades suplantam os efeitos da transgenia (PASONEN et al., 2009; POWELL et al., 2007; WEINERT et al., 2009). Na verdade, as comunidades microbianas associadas às plantas são bastante complexas e podem ser influenciadas por diferentes fatores, como tipo de solo (GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004), espécie vegetal (GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004; GRAYSTON et al., 1998; SMALLA et al., 2001), genótipo da planta (MARSCHNER; SOLAIMAN; RENGEL, 2006), sazonalidade (MOCALI et al., 2003; SMALLA et al., 2001) e estágio de crescimento (DUINEVELD et al., 1998; EL-AMIN; SAADABI, 2007), entre outros.

Muitos trabalhos têm observado que os efeitos da transgênese são mínimos quando comparados com outros fatores de variação, como o cultivar (ANDREOTE et al., 2009a,b; DUNFIELD; GERMIDA, 2001), o preparo do solo (LAMARCHE; HAMELIN, 2007), o local de cultivo (HEUER et al., 2002; LAMARCHE; HAMELIN, 2007), o tipo de solo (RASCHE et al., 2006a; RASCHE et al., 2006b) e o estágio de crescimento da planta (GYAMFI et al., 2002; LIU et al., 2008; RASCHE et al., 2006a,b; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2008). Weinert et al.

(2009), por exemplo, compararam os efeitos de plantas de batata geneticamente modificadas para acúmulo de zeaxantina com os efeitos de diferentes cultivares sobre as comunidades bacterianas e fúngicas da rizosfera e observaram que o uso de diferentes cultivares levou a maiores alterações nas comunidades microbianas avaliadas do que a modificação genética da planta transgênica. Em outro estudo, diferentes variedades de soja, incluindo plantas transgênicas expressando o gene *cp4-epsps*, foram comparadas quanto à capacidade de formar associações com fungos micorrízicos e rizóbios. Os resultados mostraram que a colonização das raízes por fungos micorrízicos e rizóbios diferiu entre as variedades de soja, entretanto, essa variação não pôde ser correlacionada com a modificação genética da variedade transgênica (POWELL et al., 2007). Assim, ainda que a transgênese possa afetar as populações microbianas associadas às plantas, outras fontes de variação devem ser consideradas quando se estuda o impacto das PGMs, de forma que os efeitos da modificação genética possam ser separados dos outros fatores e avaliados adequadamente.

1.1.2 Fungos do gênero *Trichoderma*

1.1.2.1 Biologia e estabelecimento da interação com plantas

O gênero *Trichoderma* (teleomorfo: *Hypocrea*) é composto por fungos de vida livre, habitantes cosmopolitas de solo, mas que também podem colonizar rizosfera, superfície e interior de tecidos vegetais sem levar ao desenvolvimento de doença, sendo por isso recentemente denominados de simbiontes oportunistas avirulentos (HARMAN et al., 2004a). Entretanto, em situações bastante raras, *Trichoderma* spp. podem se comportar como patógenos de plantas, como descrito para maçã, milho e alfafa, além disso, algumas linhagens são capazes de produzir metabólitos altamente fitotóxicos (BAILEY; LUMSDEN, 1998). Esses fungos possuem distribuição ampla, sendo predominantes na micobiota de vários solos de diferentes zonas climáticas (DANIELSON; DAVEY, 1973; KLEIN; EVELEIGH, 1998; ROIGER; JEFFERS; CALDWELL, 1991; WARDLE; PARKINSON; WALLER, 1993), onde eles atuam como decompositores e também como necrotróficos contra decompositores primários de material lenhoso. Eles se destacam pelo rápido crescimento, alta taxa de esporulação, capacidade de utilizar diferentes tipos de substratos e resistência a compostos nocivos (HARMAN et al., 2004a;

KUBICEK et al., 2003). Das 35 espécies de *Trichoderma* já descritas até o momento (GAMS; BISSETT, 1998), algumas possuem importância econômica em função da grande capacidade de produzir enzimas e antibióticos (HARMAN; KUBICEK, 1998; SIVASITHAMPARAM; GHISALBERTI, 1998), pelo grande potencial como agentes de controle biológico (VERMA et al., 2007) e pela habilidade de induzir o crescimento e desenvolvimento vegetal (HARMAN et al., 2004a). Por exemplo, a espécie *T. virens* (antes classificada como *Gliocladium virens*) tem sido descrita como uma das mais versáteis e eficazes no que diz respeito à utilização como agente de controle biológico, pois possui um incrível arsenal de mecanismos e produção de compostos antimicrobianos que permitem a ação contra diferentes patógenos e o controle de várias doenças (HOWELL, 2006).

A interação *Trichoderma*-planta geralmente se dá na região das raízes e pode ocorrer em diferentes níveis. Algumas linhagens são capazes de colonizar apenas regiões específicas das raízes (METCALF; WILSON, 2001), enquanto que outras, denominadas "rizosfera-competentes", colonizam toda a superfície radicular, penetram no espaço intercelular das primeiras camadas da epiderme e permanecem em associação com as raízes por longos períodos (várias semanas ou meses) (HARMAN, 2000; THRANE; TRONSMO; JENSEN, 1997; YEDIDIA; BENHAMOU; CHET, 1999). Existe ainda outra relação, pouco estudada nesse gênero, em que o fungo se estabelece como endófito, ou seja, ele coloniza não só as raízes, mas também outras partes da planta, como descrito para *T. stromaticum,* o qual foi observado colonizando o sistema vascular de cacau (EVANS; HOLMES; THOMAS, 2003) e cotilédones de cacau e feijão (DE SOUZA et al., 2008); e para as espécies *T. harzianum*, *T. hamatum* e *T. asperellum* que colonizam todas as partes da planta de cacau, desde as raízes até às folhas (BAILEY et al., 2008). As linhagens mais eficazes no controle biológico e promoção de crescimento são aquelas capazes de estabelecer interações duradouras com a planta, como as rizosfera-competentes e endofíticas, pois os efeitos benéficos perduram por todo ou grande parte do ciclo de vida da planta (HARMAN, 2000).

De maneira geral, o passo mais crítico para o estabelecimento de uma interação simbiótica *Trichoderma*-planta consiste na colonização radicular e infecção das camadas externas do córtex (HARMAN; SHORESH, 2007). A penetração no tecido radicular frequentemente se limita à primeira ou segunda camada de células e pode ocorrer por infecção direta (YEDIDIA; BENHAMOU; CHET, 1999) ou de forma semelhante ao micoparasitismo, via formação de

estruturas semelhantes ao apressório na superfície das raízes (CHET; HARMAN; BAKER, 1981) e enrolamento nos pêlos radiculares (HARMAN; SHORESH, 2007). A partir desse momento uma zona de interação química é estabelecida onde planta e fungo se comunicam por meio da troca de moléculas bioativas. Metabólitos produzidos pelo fungo induzem o espessamento das paredes celulares vegetais (YEDIDIA; BENHAMOU; CHET, 1999) e a produção de compostos fenólicos, limitando o crescimento do fungo à área de infecção, impedindo que este se torne patogênico à planta (HARMAN; SHORESH, 2007). Entretanto, essa reação pode não acontecer em alguns casos onde *Trichoderma* se estabelece como endófito e coloniza o sistema vascular da planta (HARMAN, 2006). Durante essa interação fungo-planta mais de 300 proteínas da planta têm a expressão alterada, sendo que muitas apresentam aumento na expressão. Nesse grupo incluem-se, especialmente, enzimas do metabolismo de carboidrato e proteínas associadas com resistência a patógeno e estresse. Múltiplas formas de várias proteínas são ativadas, como por exemplo, vários tipos de quitinases, β-glicosidases, peroxidases, proteínas com sítios de ligação e motivos ricos em leucina associados com resistência a doença, sucrose sintetase e metionina sintetase (HARMAN; SHORESH, 2007). Essas mudanças no metabolismo geralmente beneficiam a planta, pois podem envolver, entre outras, a ativação de vias que levam à indução de resistência localizada e/ou sistêmica (SHORESH; YEDIDIA; CHET, 2005; YEDIDIA; BENHAMOU; CHET, 1999; YEDIDIA et al., 2000; YEDIDIA et al., 2003).

1.1.2.2 Principais mecanismos de biocontrole de fitopatógenos e efeitos sobre a planta hospedeira

Os fungos do gênero *Trichoderma* têm sido conhecidos pela capacidade de controlar doenças de plantas por mais de 70 anos (WEINDLING, 1932), e por quase duas décadas eles vêm sendo utilizados em plantios comerciais como protetores e promotores de crescimento vegetal, constituindo quase 50% dos agentes de controle biológico disponíveis no mercado (WHIPPS; LUMSDEN, 2001). O grande potencial que *Trichoderma* apresenta como agente de controle biológico se deve a um complexo conjunto de mecanismos e compostos, os quais incluem micoparasitismo, antibiose, competição por nutrientes e espaço e indução de resistência localizada e/ou sistêmica. Até pouco tempo acreditava-se que o principal mecanismo responsável pela atividade de *Trichoderma* spp. no controle biológico de patógenos era a ação direta sobre

outros fungos, via micoparasitismo e antibiose (CHET; BENHAMOU; HARAN, 1998; HARMAN; KUBICEK, 1998; HOWELL, 1998). Entretanto, estudos recentes têm mostrado a importância de outros mecanismos nessa atividade, entre eles a competição por elicitores de germinação (HOWELL, 2002, 2003), a inibição de enzimas necessárias para infecção (ZIMAND; ELADY; CHET, 1996) e, principalmente, a indução de resistência localizada e sistêmica nas plantas (AHMED; SÁNCHEZ; CANDELA, 2000; DE MEYER et al., 1998; DJONOVIC et al., 2006; DJONOVIC et al., 2007; HANSON; HOWELL, 2004; HARMAN et al., 2004b; HOWELL et al., 2000; KOIKE et al., 2001; VITERBO et al., 2007; YEDIDIA et al., 2003).

Micoparasitismo é a habilidade que *Trichoderma* spp., ou qualquer outro fungo, possui de parasitar patógenos filamentosos, como Oomicetos e Fungos (HARMAN; SHORESH, 2007). Esse processo se inicia quando *Trichoderma* detecta a presença do fungo alvo e cresce em direção a ele (CHET; HARMAN; BAKER, 1981). Esse direcionamento é ativado por sensoriamento remoto do fungo alvo por *Trichoderma* e se deve, pelo menos em parte, à expressão sequencial de enzimas degradadoras de parede celular (CWDEs), como quitinases, glicanases/glicosidases e proteinases (CHET; BENHAMOU; HARAN, 1998). A difusão dessas enzimas promove a liberação de fragmentos de parede celular do fungo alvo, os quais interagem com receptores da parede ou membrana celular de *Trichoderma*, que por sua vez ativam a expressão de CWDEs fungitóxicas (BRUNNER et al., 2003). Essas CWDEs também se difundem e iniciam o ataque ao fungo antes mesmo do contato direto com *Trichoderma* (VITERBO et al., 2002; ZEILINGER et al., 1999). Quando *Trichoderma* alcança o hospedeiro fúngico, ele se prende à hifa do hospedeiro, frequentemente se enrola em torno da mesma e forma apressório na superfície (HARMAN; SHORESH, 2007). A produção de CWDEs fungitóxicas e provavelmente também a produção de antibióticos do tipo *peptaibol* é necessária para o parasitismo do fungo alvo e dissolução das paredes celulares do mesmo (SCHIRMBÖCK et al., 1994). Esse processo envolve a expressão de inúmeros genes, muitos deles relacionados com a produção de metabólitos antimicrobianos. A ação de enzimas líticas, como glicanases (DE LA CRUZ; LLOBELL, 1999; KUBICEK et al., 2001), proteases (KREDICS et al., 2005; POZO et al., 2004) e, principalmente, quitinases (BAEK; HOWELL; KENERLEY, 1999; BRUNNER et al., 2003; DE MARCO; VALADARES-INGLIS; FELIX, 2004; VITERBO et al., 2002; ZEILINGER et al., 1999), têm sido reportada como fundamental no processo de micoparasitismo. Em alguns casos, como para a espécie *T. virens*, curiosamente alguns

antibióticos (como gliotoxina e *peptaibols*) agem sinergisticamente com enzimas líticas para aumentar a destruição das paredes celulares do hospedeiro (DI PIETRO et al., 1993; SCHIRMBÖCK et al., 1994). A importância do processo de micoparasitismo no controle biológico exercido por *Trichoderma* spp. tem sido questionada em função de resultados controversos publicados na literatura e da comprovação dos efeitos diretos desses fungos na planta hospedeira. Por exemplo, estudos mostraram que, ao contrário do que se pensava, a ação de *T. virens* no biocontrole de doenças de plântulas de algodão não envolve micoparasitismo nem produção de antibióticos, uma vez que mutantes deficientes para essas características se apresentaram tão eficazes quanto as linhagens selvagens para essa atividade (HOWELL, 1987; HOWELL; STIPANOVIC, 1995). Além disso, alguns trabalhos que estudaram o papel de enzimas quitinolíticas, fundamentais para o micoparasitismo, deram origem a resultados controversos com relação ao papel no controle biológico exercido por *Trichoderma* spp. (CARSOLIO et al., 1999; LIMÓN et al., 1995; WOO et al., 1999). Além dos mecanismos clássicos, micoparasitismo e antibiose, os fungos do gênero *Trichoderma* também podem afetar fitopatógenos por outros meios, como competição por nutrientes e espaço (CHET, 1987), metabolização de exsudados indutores de germinação (HOWELL, 2002, 2003) e inibição de enzimas do patógeno necessárias para infecção (ZIMAND; ELADY; CHET, 1996), os quais agregam força na capacidade que *Trichoderma* spp. têm de efetuar controle biológico de patógenos.

Além dos efeitos diretos de *Trichoderma* sobre outros fungos, esse gênero também é capaz de produzir efeitos benéficos nas plantas. Esses efeitos são bastante variados e incluem promoção de crescimento e aumento de produtividade (CHANG et al., 1986; HARMAN, 2000; YEDIDIA et al., 2001), estímulo do crescimento do sistema radicular e tolerância à seca (HARMAN, 2000), aumento na absorção de nutrientes e da eficiência na utilização de fertilizantes (HARMAN, 2000; YEDIDIA et al., 2001), aumento das taxas de germinação de sementes (BJÖRKMAN; BLANCHARD; HARMAN, 1998; CHANG et al., 1986) e, principalmente, indução de resistência localizada e/ou sistêmica (HARMAN et al., 2004a; HOWELL, 2006; YEDIDIA; BENHAMOU; CHET, 1999; YEDIDIA et al., 2000; YEDIDIA et al., 2003). De maneira geral, os efeitos de *Trichoderma* na planta são determinados pela interação entre elicitores produzidos pelo fungo com receptores da planta e consequente alteração na fisiologia da mesma, sendo que linhagens altamente capazes de colonizar raízes e estabelecer

interação simbiótica prolongada geralmente produzem efeitos duradouros (HARMAN; SHORESH, 2007).

Nos últimos anos, um grande número de trabalhos estudou a indução de resistência nas plantas por *Trichoderma* e a interpretação dos resultados obtidos levou a comunidade científica da área ao consenso de que esse é um mecanismo comum e importante no controle biológico por *Trichoderma* spp. (HARMAN et al., 2008; HARMAN et al., 2004a; HOWELL, 2006). De fato, a indução de resistência sistêmica por *Trichoderma* spp. já foi descrita para inúmeras plantas, tanto monocotiledôneas como arroz (DJONOVIC et al., 2006) e milho (DJONOVIC et al., 2007; HARMAN et al., 2004b), como dicotiledôneas, como pepino (AHMED; SÁNCHEZ; CANDELA, 2000; KOIKE et al., 2001; YEDIDIA; BENHAMOU; CHET, 1999; YEDIDIA et al., 2000; YEDIDIA et al., 2003), algodão (DJONOVIC et al., 2006; HOWELL et al., 2000), alface (DE MEYER et al., 1998), tomate (DE MEYER et al., 1998), feijão (BIGIRIMANA et al., 1997), tabaco (DE MEYER et al., 1998) e pimentão (DE MEYER et al., 1998). A resistência induzida em plantas é um processo bastante complexo, que tem sido parcialmente elucidado em alguns sistemas modelo. De maneira geral, três vias parecem ter relação com a indução de resistência em plantas (HARMAN et al., 2004a). Em uma delas, denominada resistência sistêmica induzida por rizobactéria (RISR), a colonização de raízes por bactérias não patogênicas leva à indução de resistência sistêmica na planta sem a produção de cascata de proteínas PR e acúmulo de fitoalexinas. Diferentemente, as outras duas vias envolvem a produção direta de proteínas PR, sendo que em uma a produção dessas proteínas é resultado do ataque de microrganismos patogênicos e, na outra, a produção é estimulada por ferimentos ou pela ação de patógenos que induzem formação de necrose (como na herbivoria por insetos), embora ambas as vias também possam ser induzidas por outros mecanismos (HARMAN et al., 2004a).

Geralmente, a via induzida por microrganismos patogênicos envolve como molécula sinalizadora o ácido salicílico (SA) e é denominada de resistência sistêmica adquirida (SAR), enquanto que a via induzida por herbivoria conta com a sinalização pelo ácido jasmônico (JA) e pelo etileno (Et) e é denominada resistência sistêmica induzida (ISR) (HARMAN et al., 2008). Ambas as vias têm como característica a produção de uma cascata de proteínas PR, que incluem quitinases, glicanases, taumatinas e enzimas oxidativas (HARMAN et al., 2004a). Além disso, compostos de baixo peso molecular com propriedades antimicrobianas, como as fitoalexinas, frequentemente também se acumulam. A indução de resistência por *Trichoderma* geralmente

ocorre pela via do JA/Et, mas também pode ocorrer através da via do SA, e até mesmo por ambas, dependendo da linhagem de *Trichoderma* e dos elicitores que ela produz. Por exemplo, a espécie *T. virens* produz um elicitor (Sm1) capaz de induzir resistência sistêmica em algodão (DJONOVIC et al., 2006) e milho (DJONOVIC et al., 2007) por meio da via de sinalização do JA/Et (DJONOVIC et al., 2007). De forma semelhante, no sistema *T. asperellum*-pepino, um dos mais estudados nesse sentido, a presença de *Trichoderma* nas raízes induz resistência sistêmica na planta através da ativação da via de sinalização do JA/Et, e não a via do SA (SHORESH; YEDIDIA; CHET, 2005). Em outro caso, onde uma linhagem de *T. atroviride* foi transformada para introducão de um gene de glicose oxidase (*goxA*) de *A. niger*, houve aumento na eficiência de biocontrole (BRUNNER et al., 2005), provavelmente pela indução de resistência sistêmica por meio da via de sinalização do SA (HARMAN et al., 2008). Este trabalho evidencia o fato de que diferentes linhagens produzem diferentes moléculas, e a mudança dos elicitores pode levar à mudanças no nível e na via de sinalização induzida. Até o momento pelo menos três classes de moléculas produzidas por *Trichoderma* foram identificadas como elicitores de resistência em plantas: proteínas com papel enzimático ou outras funções, homólogos de proteínas codificadas por genes de avirulência (*Avr*) e oligossacarídeos ou outros compostos de baixo peso molecular liberados a partir da ação das enzimas de *Trichoderma* (HARMAN et al., 2004a). Por exemplo, sabe-se que quando *T. virens* interage com algodão, o fungo produz uma série de proteínas que induzem a produção de terpenóides (HANSON; HOWELL, 2004) e também uma pequena proteína do tipo hidrofobina (Sm1) (DJONOVIC et al., 2006; DJONOVIC et al., 2007), compostos estes que fazem parte da indução de resistência na planta. Quando interage com pepino, *T. virens* produz *peptaibols* extremamente potentes na indução de respostas de defesa contra o patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (VITERBO et al., 2007). Também, a espécie *T. harzianum* (linhagem T22) produz um novo tipo de hidrofobina, denominada HYTRA1, a qual está ligada com a indução de respostas de defesa em tomate (RUOCCO et al., 2008).

As mudanças que ocorrem no transcriptoma e proteoma da planta por conta da interação com *Trichoderma* podem trazer como consequência, além da indução de vias de resistência, a promoção de crescimento de raízes e parte aérea (HARMAN; BJÖRJMANN, 1998). De fato, genes relacionados com o aumento na velocidade de crescimento da planta parecem ser regulados positivamente nessa interação (HARMAN et al., 2008). Em milho, o aumento da capacidade

fotossintética e do metabolismo primário de carboidrato suportam o aumento no crescimento (HARMAN; SHORESH, 2007). O aumento da expressão de genes relacionados com a taxa de expansão celular também é comum nas interações *Trichoderma*-planta, como foi visto para *T. hamatum*-tomate (ALFANO et al., 2007) e *Trichoderma* spp.-cacau (BAILEY et al., 2006). Além disso, também tem sido sugerido que *Trichoderma* pode produzir hormônios de crescimento e melhorar a transferência de minerais da rizosfera para a planta (HARMAN et al., 2004a). Curiosamente, em milho a promoção de crescimento por *T. harzianum* T22 é controlada por um componente genético da planta, de forma que algumas variedades respondem negativamente à presença do fungo enquanto outras respondem positivamente (HARMAN; SHORESH, 2007). Segundo Harman et al. (2008), promoção de crescimento e proteção contra doença devem ser resultado da ação de diferentes elicitores de *Trichoderma*, o que significa que uma linhagem que induz resistência na planta pode não promover o crescimento vegetal, e vice-versa. Todos esses efeitos listados na presente revisão mostram que fungos do gênero *Trichoderma* têm grande potencial para otimizar a agricultura, por diferentes mecanismos durante a interação com as plantas. A complexidade dessas interações é tamanha que os mecanismos empregados por *Trichoderma* e as mudanças induzidas nas plantas ainda não são completamente compreendidos, o que ressalta a necessidade de realização de mais estudos nessa área.

1.1.3 Transformação genética de fungos como ferramenta em estudos de interação

1.1.3.1 Aspectos básicos das metodologias disponíveis para fungos filamentosos

O primeiro relato de transformação genética em fungos com o uso de DNA exógeno ocorreu em 1973, a partir da transformação de *Neurospora crassa* e a geração de um mutante deficiente em inositol (inl^+) (MISHRA; SZABO; TATUM, 1973; MISHRA; TATUM, 1973). Entretanto, a comunidade científica da época interpretou os resultados com certo ceticismo. O estabelecimento dessa técnica e o início da genética molecular de fungos se deram mesmo um pouco mais tarde, em 1978, com o desenvolvimento de um sistema de transformação para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BEGGS, 1978; HINNEN; HICK; FINK, 1978). Em seguida surgiram relatos da transformação genética de fungos filamentosos, *N. crassa* (CASE et al., 1979) e *A. nidulans* (BALLANCE; BUXTON; TURNER, 1983; TILBURN et al., 1983;

YELTON; HAMER; TIMBERLAKE, 1984), e desde então diversos sistemas de transformação foram desenvolvidos para fungos filamentosos, viabilizando a aplicação dessa técnica em um grande número de espécies fúngicas e contribuindo para o estudo de aspectos moleculares desses organismos.

O principal obstáculo em qualquer sistema de transformação genética é a parede celular do fungo (OLMEDO-MONFIL; CORTÉS-PENAGOS; HERRERA-ESTRELLA, 2004), sendo que ao longo dos anos diferentes estratégias foram desenvolvidas na busca de vencer essa barreira e permitir a transferência do DNA exógeno para o interior da célula. A maneira mais tradicional envolve a obtenção de células sem parede, os protoplastos, a partir da digestão da parede celular por uma mistura de enzimas líticas, como as β-1,3-glicanases e as quitinases (FINCHAM, 1989). As células iniciais podem ser esporos ou conídios germinados, fragmentos de micélio jovem ou basidiósporos, sendo que a escolha deve ser realizada de acordo com a conveniência em cada caso. Já a escolha da mistura de enzimas líticas é um fator importante e determina a eficiência de transformação (FINCHAM, 1989). Diferentes misturas comerciais de enzimas têm sido utilizadas, como Helicase e Glusulase, compostas por diferentes enzimas de estômago de caracol, Zymolase 100T, composta por enzimas da bactéria *Anthrobacter luteus*, e Novozyme 234, composta por enzimas do fungo *T. viridae* (RUIZ-DÍEZ, 2002). Após a digestão, os protoplastos gerados são estabilizados osmoticamente e imediatamente utilizados para transformação ou congelados a -70º C. No sistema de transformação denominado de protoplasto-PEG, a transferência do DNA exógeno (vetor de transformação) para os protoplastos é feita na presença de íons de cálcio e alta concentração de polietileno glicol (PEG), os quais promovem o agrupamento dos protoplastos e aumentam a permeabilidade da membrana plasmática, durante um período de incubação de cerca de 15-30 minutos (FINCHAM, 1989). Depois desse período de incubação os protoplastos são regenerados em meio de cultivo osmoticamente equilibrado e contendo agente seletivo, para permitir crescimento apenas de células transformadas. Esse sistema foi um dois primeiros a ser usado em fungos filamentosos, e ainda hoje, mesmo após o surgimento de diversos outros métodos, continua sendo amplamente empregado (AMEY et al., 2002; BAEK; KENERLEY, 1998; KERSHAW; TALBOT, 2009; LI et al., 2006; LIMA et al., 2003; SANDHU et al., 2001; ZHANG; YANG; YANG, 2009; ZUCCARO et al., 2009).

Alternativamente, um outro sistema de transformação, a eletroporação, substitui o uso de PEG pela indução da permeabilidade reversível das membranas biológicas via exposição a um

campo elétrico de alta amplitude por um período de curta duração, onde o pulso elétrico promove mudanças na membrana que permitem a entrada do vetor de transformação (RUIZ-DÍEZ, 2002). Essa técnica pode utilizar como célula recipiente protoplastos, mas o uso de preparações de conídios com um agente enfraquecedor de parede celular (CHAKRABORTY; PATTERSON; KAPOOR, 1991; OZEKI et al., 1994) e o uso de conídios germinados (SÁNCHEZ; AGUIRRE, 1996) também têm sido descritos na literatura para fungos filamentosos. Muitos trabalhos disponíveis na literatura descrevem o uso da eletroporação para transformação genética de fungos filamentosos, por exemplo, *N. crassa*, *P. urticae*, *L. maculans* e *A. oryzae* (CHAKRABORTY; PATTERSON; KAPOOR, 1991), *A. fumigatus* (KWON-CHUNG et al., 1998), *T. longibrachiatum* (SANCHEZ-TORRES et al., 1994) e *B. bassiana* (JIANG; YING; FENG, 2007).

Em busca de uma maior eficiência de transformação, principalmente em trabalhos de mutagênese insercional onde se busca obter um grande número de mutantes com inserções aleatórias no genoma, um outro sistema de transformação foi proposto, denominado integração mediada por enzima de restrição (REMI). Essa técnica foi desenvolvida originalmente para *S. cerevisiae* (SCHIESTL; PETES, 1991), mas sua aplicação foi estendida para fungos filamentosos (BROWN; HOLDEN, 1998; RIGGLE; KUMAMOTO, 1998). Na REMI, a transformação (via protoplasto-PEG ou eletroporação) é realizada com o uso de um vetor linearizado e na presença da enzima de restrição usada na linearização, de forma que a enzima dê origem a terminais compatíveis (ou incompatíveis) no DNA genômico. Com isso, a integração do vetor ocorre nos sítios correspondentes no genoma do fungo, frequentemente pela regeneração dos sítios de reconhecimento da enzima de restrição usada (KAHMANN; BASSE, 1999). Nesse sistema a eficiência de transformação e a maneira com que o vetor é integrado ao DNA genômico dependem da espécie fúngica em estudo e são influenciados pela conformação do vetor, pela atividade da enzima de restrição e pelo protocolo adotado (MAIER; SCHÄFER, 1999). Por isso, a vantagem original do método, que inclui altas taxas de inserção aleatória e integração de uma única cópia do vetor, nem sempre são observadas (MAIER; SCHÄFER, 1999). Um aspecto interessante desse método é a possibilidade de identificar os genes interrompidos a partir das marcas introduzidas pelo uso da enzima de restrição, entretanto, infelizmente artifícios da técnica fazem com que a presença de mutações sem marcas sejam relativamente comuns, chegando a perfazer até 50% dos mutantes (BÖLKER et al., 1995; KAHMANN; BASSE, 1999;

SWEIGARD et al., 1998). Mesmo assim, a transformação via REMI tem sido utilizada com sucesso para desvendar aspectos moleculares de vários fungos filamentosos (AKAMATSU et al., 1997; CHOI et al., 2008; FANG; DEAN, 2000; KIM et al., 2009; MAIER; SCHÄFER, 1999; TUDZYNSKI; TUDZYNSKI, 1998; WANG et al., 2007).

A obtenção de protoplastos não é difícil, porém é um processo laborioso e exige muitos cuidados, além da limitação para algumas espécies. Várias alternativas já foram criadas visando evitar esse passo nos protocolos de transformação, pelo emprego de diferentes estratégias para suplantar a barreira da parede celular. Por exemplo, o método de transformação por acetato de lítio envolve a exposição de esporos germinando ao vetor de transformação na presença de 0,1 $mol.L^{-1}$ de acetato de lítio, seguida da incubação típica com $CaCl_2$ e PEG. Acredita-se que os cátions de metal alcalino ajudem a passagem do DNA exógeno para o interior das células, mas esse mecanismo ainda não é bem compreendido (FINCHAM, 1989). Um método mais engenhoso de evitar a necessidade do uso de protoplastos é a biolística, lançada em 1987 para plantas (KLEIN et al., 1987; SANFORD et al., 1987) e estendida para outros organismos. Nesse sistema, o vetor de transformação é transferido para células fúngicas com parede celular intacta através da aceleração explosiva (por pressão de hélio e vácuo) de micropartículas (de ouro ou tungstênio) cobertas com DNA (vetor de transformação) contra esporos ou hifas fúngicas. A eficiência de transformação depende de vários fatores, entre eles as características do material biológico, do microprojétil e dos ajustes no acelerador de partículas (HARRIER; MILLAM, 2001). A grande vantagem desse método é a possibilidade de transferir DNA exógeno para qualquer célula, tecido ou órgão capaz de se regenerar, superando as limitações de especificidade de hospedeiro, como ocorre no método mediado pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (KLEIN et al., 1987). A transformação genética por biolística passou a ser bastante utilizada para fungos filamentosos nos casos em que é difícil obter protoplatos e/ou quando se trata de fungos difíceis de serem cultivados, como os biotróficos. Exemplos de aplicação incluem fungos micorrízicos (BILLS; RICHTER; PODILA, 1995; FORBES et al., 1998), *A. nidulans* (FUNGARO et al., 1995; GOMES-BARCELLOS et al., 1998), *T. harzianum* (RIACH; KINGHORN, 1996), *T. reesei* (HAZELL et al., 2000) e *M. anisopliae* (ST. LEGER et al., 1995).

O sistema de transformação genética mediado pela bactéria fitopatogênica *A.tumefaciens* (AMT) não requer a preparação de protoplastos e baseia-se numa característica bem peculiar dessa bactéria, a capacidade de transferir parte do seu DNA (DNA de transferência, T-DNA) para

células eucarióticas. Essa metodologia, bastante empregada na transformação genética de plantas (TZFIRA; CITOVSKY, 2006), foi adaptada para a transformação de fungos, primeiro para a levedura *S. cerevisiae* (BUNDOCK et al., 1995) e depois para fungos filamentosos (DE GROOT et al., 1998). Em infecções naturais das plantas pela bactéria, a *A. tumefaciens* coordena um processo de transferência e incorporação de um segmento de fita simples do seu plasmídio Ti (T-DNA) para o genoma do hospedeiro. Como consequência, as células do hospedeiro passam a sintetizar compostos que a bactéria utiliza como fonte de nutrientes e ocorre o desenvolvimento de tumores (galhas) (MULLINS; KANG, 2001). O plasmídio Ti contém os genes *vir* (que codificam proteínas envolvidas na transferência do T-DNA para a célula hospedeira) e o T-DNA (que contém os oncogenes e é flanqueado por duas sequências curtas de cerca de 25 pares de base, a borda direita e a borda esquerda, essenciais no processo de transferência) (MICHIELSE et al., 2005b). O sistema AMT tira proveito dessas características da bactéria para transferir genes de interesse científico. Basicamente, o plasmídio Ti da bactéria é desarmado, a região do T-DNA é modificada pela substituição dos oncogenes pelos genes de interesse e introduzida num segundo vetor (vetor binário), e este por sua vez é reintroduzido na linhagem de *A. tumefaciens* desarmada, a qual é utilizada no processo de transformação (LACORTE; ROMANO, 1998). Diferentes fatores afetam a eficiência de transformação nesse sistema, entre eles, a natureza do material fúngico inicial (esporos germinados, micélio vegetativo, corpo de frutificação etc.), a linhagem de *Agrobacterium*, a linhagem fúngica e as condições de co-cultivo (principalmente a razão entre células fúngicas e bacterianas e a concentração de acetoseringona) (LACROIX et al., 2006; MICHIELSE et al., 2005b). O ajuste desses parâmetros para cada isolado fúngico é essencial para obtenção de altas frequências de transformação (MICHIELSE et al., 2005b). Esse método de transformação apresenta algumas vantagens em relação às outras opções disponíveis para fungos filamentosos. Em primeiro lugar, a agrotransformação se destaca pela versatilidade de material inicial fúngico que pode ser utilizado nos experimentos, sem a necessidade de preparação de protoplastos. Além disso, essa técnica dá origem a um grande número de mutantes mitoticamente estáveis e predominantemente carregando apenas uma inserção dos transgenes (CASAS-FLORES; ROSALES-SAAVEDRA; HERRERA-ESTRELLA, 2004). Ainda, ela tem enorme potencial para geração de grandes bibliotecas de mutantes por mutagênese insercional, mas também pode ser empregada em mutagênese sítio-dirigida, dependendo das características da sequência introduzida no T-DNA (LACROIX et al., 2006). Essa gama de vantagens tem feito

com que o número de trabalhos que utilizam essa metodologia cresça a cada ano, sendo que hoje mais de uma centena de fungos já foi transformada por essa tecnologia, incluindo membros dos filos Ascomicota, Basidiomicota, Zigomicota, Glomeromicota e também Oomicetos (FÁVARO, 2009; LACROIX et al., 2006; MICHIELSE et al., 2005b).

Como foi apresentado, diversos sistemas de transformação genética estão disponíveis para fungos filamentosos, cada um com suas vantagens e desvantagens. A escolha do método mais apropriado para ser utilizado deve levar em conta as características do estudo, principalmente a espécie fúngica, o objetivo do trabalho e a disponibilidade de informação sobre o organismo na literatura.

1.1.3.2 Estratégias que utilizam a transformação genética para desvendar aspectos da interação fungo-planta

O desenvolvimento dos sistemas de transformação genética, aliado à tecnologia do DNA recombinante, tornou possível a manipulação do genoma dos organismos. Em decorrência disso, hoje é possível desvendar aspectos moleculares da biologia dos organismos, pela correlação de resultados obtidos *in vitro* com as consequências biológicas *in vivo* (RUIZ-DÍEZ, 2002). Além disso, o uso da transformação genética também permitiu revelar características importantes de interações entre fungos e plantas, e melhorar a característica de interesse. Diferentes estratégias podem ser empregadas no estudo da interação fungo-planta via transformação genética, incluindo metodologias para estudar a função gênica (mutagênese insercional aleatória, mutagênese sítio-específica e silenciamento gênico pós-transcricional) e para introdução de sistemas de genes repórter, que permitem o monitoramento do fungo na planta.

A estratégia de mutagenêse insercional aleatória é uma ferramenta poderosa para determinar os mecanismos moleculares da maioria dos processos controlados geneticamente, inclusive aqueles que ocorrem durante a interação entre fungos e plantas (BHADAURIA et al., 2009). Nessa estratégia, o objetivo é gerar um grande número de mutantes com inserções aleatórias do DNA exógeno, preferencialmente únicas, de forma a cobrir todo o genoma do organismo. A integração heteróloga do DNA causa a disrupção de genes nos mutantes gerados, os quais podem ser avaliados para deficiências em processos específicos e com isso fornecer informações sobre o(s) gene(s) envolvido(s) no processo. Nesse caso, a identificação do gene interrompido e envolvido no processo estudado é feita com base na marca deixada pelo DNA

exógeno (MULLINS; KANG, 2001). A principal vantagem da mutagênese insercional aleatória é o fato de que seu uso não é limitado pela disponibilidade de informação genômica do organismo, o que possibilita o estudo da função de genes em fungos cujo genoma ainda não foi sequenciado (BHADAURIA et al., 2009). Por outro lado, essa estratégia também pode ajudar a converter a grande quantidade de informação contida nos genomas sequenciados para informação de significado biológico, isto é, realizar estudos de genômica funcional (MICHIELSE et al., 2005b). De maneira geral, qualquer sistema de transformação genética pode ser empregado em trabalhos de mutagênese insercional aleatória, porém é aconselhável que o sistema seja capaz de gerar, com certa facilidade, um grande número de mutantes com inserções aleatórias e, depois da seleção do mutante com a deficiência de interesse, fornecer artifícios para o isolamento do gene interrompido (MICHIELSE et al., 2005b). Nesse sentido, os métodos que têm se mostrado mais apropriados para essa abordagem são REMI e AMT (BHADAURIA et al., 2009; KAHMANN; BASSE, 1999; MICHIELSE et al., 2005b; MULLINS; KANG, 2001). A estratégia de mutagenêse insercional aleatória tem sido bastante empregada para determinar fatores de patogenicidade, nas interações entre fungos patogênicos e planta hospedeira, e genes regulados pelas relações mutualísticas entre fungos benéficos e plantas. Por exemplo, o sistema AMT foi utilizado para gerar 10.290 mutantes do agente causal da murcha-de-fusário em tomate, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, para seleção de mutantes com patogenicidade perdida ou reduzida. Os autores selecionaram 106 mutantes para patogenicidade e identificaram (via TAIL-PCR; *Thermal Asymmetric Interlaced PCR*) 111 potenciais genes de patogenicidade nesse fungo, dos quais alguns estão relacionados com metabolismo de aminoácidos e lipídios, reconstrução de parede celular e translocação e degradação de proteínas, entre muitos outros (MICHIELSE et al., 2009). Uma descoberta interessante acerca das bases genéticas das interações fungo-planta foi obtida a partir da geração de uma biblioteca de 14.400 mutantes REMI do patógeno *C. magna*, seleção de 176 mutantes não-patogênicos e caracterização dos mesmos. Os resultados revelaram que a disrupção de um único gene é capaz de alterar o estilo de vida do fungo durante a interação com a planta, de patogéno para mutualista ou comensalista, sugerindo que esses genes podem representar aspectos fundamentais e altamente conservados das simbioses fungo-planta (REDMAN; RANSON; RODRIGUEZ, 1999). A existência de genes essenciais para o estabelecimento de relações simbióticas também já foi observada no fungo ectomicorrízico *Hebeloma cylindrosporum* (COMBIER et al., 2004). Nesse caso, 1725 mutantes insercionais

foram gerados pelos sistemas protoplasto-PEG e REMI, e selecionados para incapacidade de formar simbiose com *Pinus pinaster* (COMBIER et al., 2004).

Uma abordagem mais direta, a mutagênese sítio-específica, pode ser adotada para desvendar a função gênica nos casos em que existem genes candidatos para determinada função que se deseja estudar (MULLINS; KANG, 2001). Nessa estratégia, o gene-alvo é inativado (nocaute) por disrupção ou deleção/substituição gênica a partir da recombinação homóloga entre o vetor de transformação e o gene-alvo, e os resultados confirmam ou não a função presumida (BHADAURIA et al., 2009). Basicamente, a recombinação homóloga envolve a troca recíproca de sequências de DNA entre cromossomos que carregam o mesmo loco genético (BHADAURIA et al., 2009). Na disrupção gênica, o fungo é transformado com um cassete de disrupção que contém um gene de seleção flanqueado pelas sequências do gene-alvo. Por transformação genética, esse cassete de disrupção é inserido no genoma do fungo na posição do gene-alvo, via recombinação homóloga (WELD et al., 2006). Na deleção/substituição gênica o gene-alvo é substituído por completo, pois o vetor de transformação contém um gene de marcador seletivo flanqueado por cerca de 1 kb das sequências das bordas direita e esquerda do gene-alvo. Em fungos filamentosos, a eficiência da mutagênese sítio-específica depende do comprimento da sequência homóloga, do nível de homologia, do método de transformação e da posição do gene-alvo no genoma (BIRD; BRADSHAW, 1997; DAVIDSON et al., 2000). Diferentemente da recombinação homóloga na levedura *S. cerevisiae*, onde cerca de 100 pb de sequência homóloga geralmente é suficiente, fungos filamentosos precisam de pelo menos 1 kb de sequência homóloga, e em alguns casos ainda mais (MICHIELSE et al., 2005a; WILSON; IDNURM; HOWLETT, 2002). Assim, embora essa estratégia seja eficaz para nocautear genes-alvo, a frequência desse evento pode ser muito baixa em situações onde a frequência de integração ectópica (recombinação heteróloga) é alta, dificultando a detecção do mutante de interesse e tornando o processo de seleção bastante laborioso (MULLINS; KANG, 2001). A mutagênese sítio-específica pode ser alcançada pelos diferentes sistemas de transformação genética disponíveis, entretanto, algumas comparações têm indicado que AMT e biolística parecem ser mais apropriadas para promover a recombinação homóloga (BUNDOCK et al., 1999; DAVIDSON et al., 2000). Uma série de genes de patogenicidade tem sido identificada em diversos fungos patogênicos por meio de nocaute gênico, por exemplo: genes para proteína MAP quinase em *C. heterotrophus* (LEV et al., 1999), *B. cinerea* (ZHENG et al., 2000), *C. fulvum*

(VAN DEN ACKERVEKEN et al., 1993), *C. gloeosporioides* (HWANG; FLAISHMAN; KOLATTUKUDY, 1995), *F. graminearum* (JENCZMIONKA; SCHÄFER, 2005) e *M. oryzae* (TALBOT; EBBOLE; HAMER, 1993; XU; HAMER, 1996); para carreador do cassete de ligação a ATP (ABC) em *B. cinerea* (SCHOONBEEK; DEL SORBO; DE WAARD, 2001); para a proteína heterotrimérica de ligação a GTP e para adenilato ciclase em *M. oryzae* (CHOI; DEAN, 1997); para regulação da derepressão catabólica em *C. carbonum* (TONUKARI; SCOTT-CRAIG; WALTON, 2000); para gene de cutinase em *M. oryzae* (SKAMNIOTI; GURR, 2007); e para classe V de quitina sintase em *F. oxysporum* (MADRID; DI PIETRO; RONCERO, 2003), entre muitos outros. Diferentemente da interação entre fungos patogênicos e planta hospedeira, cuja literatura está repleta de estudos que identificaram genes envolvidos, até o momento, os aspectos moleculares das interações mutualísticas fungo-planta foram muito pouco avaliados.

Uma estratégia alternativa que permite estudar a função de genes é o silenciamento gênico via RNA de interferência (RNAi). Nesse caso, a expressão do gene é interrompida em níveis pós-transcricionais (*knock-down*) pela eliminação do RNA mensageiro (mRNA) e não do gene, como na mutagênese sítio-dirigida (WELD et al., 2006). Basicamente, a presença de sequências de ácido nucléico exógenas (como RNA virais e transgenes) promovem a geração de moléculas de RNA fita dupla (dsRNA), as quais ativam a degradação do mRNA homólogo, resultando na redução ou total eliminação da expressão do gene. O dsRNA é obtido pela formação de um grampo a partir do transcrito de RNAi, pois este contém uma repetição invertida da sequência-alvo. A geração de dsRNA é essencial nesse processo, porque essas moléculas servem de molde para a ribonuclease Dicer III produzir pequenos RNAs de interferência (siRNAs), os quais são incorporados ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), servindo de guias (sequência-específicos) para a procura e destruição das moléculas de mRNA correspondentes (HANNON, 2002). Essa estratégia de silenciamento gênico via RNAi tem algumas vantagens sobre a mutagênese sítio-dirigida. Primeiro, ela requer trechos de sequências relativamente pequenos, o que é bastante interessante, uma vez que informações sobre sequências ainda se limitam a poucos fungos. Mutantes com genes silenciados podem ser mais fáceis de serem obtidos do que mutantes com genes nocauteados, nos casos em que a frequência de recombinação homóloga é muito baixa (NAKAYASHIKI et al., 2005). Uma vez que essa estratégia funciona em nível transcricional (mRNA), ela não é comprometida pela presença de

núcleos não transformados ou de genes em múltiplas cópias (WELD et al., 2006). Além disso, ela tem potencial para silenciar diversos genes simultaneamente, uma vez que exista certo grau de similaridade entre eles, e isso pode ser vantajoso em casos onde a redundância gênica atrapalharia a detecção do fenótipo de interesse (LIU et al., 2002; MOUYNA et al., 2004; NGUYEN et al., 2008). Finalmente, ela tem grande utilidade nos casos em que o nocaute do gene é letal ao organismo, contornando esse problema pela repressão parcial do gene ou pelo uso de promotores condicionais (GOLDONI et al., 2004). Obviamente, essa estratégia também possui limitações. Uma delas é o fato de que o silenciamento gênico nem sempre elimina completamente a expressão do gene-alvo, sendo que a extensão do silenciamento é altamente variável (NAKAYASHIKI et al., 2005; NGUYEN et al., 2008), fazendo-se necessária uma seleção para os mutantes com maiores níveis de silenciamento (MOUYNA et al., 2004; SPIERING et al., 2005). Outra limitação consiste no fato de que o nível de silenciamento necessário para observar alterações no fenótipo do fungo varia de acordo com o gene-alvo. Além disso, a possibilidade de que ocorra silenciamento simultâneo de mais de um gene pode ser indesejável em alguns casos. Também, pode existir um efeito colateral da inserção do vetor de silenciamento, caso a integração cause a disrupção de algum gene importante (WELD et al., 2006). Finalmente, os mutantes silenciados por RNAi não podem ser complementados, uma vez que o gene propriamente dito não foi alterado, embora algumas alternativas já tenham sido propostas para contornar essa limitação (GONZALEZ-SANTOS et al., 2005; MOUYNA et al., 2004). Essa nova estratégia tem sido usada com sucesso para o silenciamento gênico em fungos filamentosos, como os fitopatógenos *M. oryzae* (KADOTANI et al., 2003; NAKAYASHIKI et al., 2005; NGUYEN et al., 2008), *C. lagenarium* (NAKAYASHIKI et al., 2005) e *Venturia inaequalis* (FITZGERALD; VAN KAN; PLUMMER, 2004), e também o fungo endofítico *Neotypodium uncinatum* (SPIERING et al., 2005), e apresenta grande potencial de utilização em estudos que buscam desvendar aspectos moleculares, como aqueles envolvidos nas interações fungo-planta. Inclusive, vetores de silenciamento têm sido desenvolvidos para agilizar os passos de clonagem necessários, como o pSilent1 (NAKAYASHIKI et al., 2005), o pSilent-Dual1 (NGUYEN et al., 2008) e o sistema comercial Gateway RNAi (Invitrogen).

Numa outra abordagem, a transformação genética pode ser usada para transferir genes repórter para o fungo em estudo, seja para monitoramento da expressão e localização intracelular da proteína de um gene específico (via inserção de cassete contendo fusão do gene-alvo com um

gene repórter) ou monitoramento do fungo como um todo no interior de tecidos vegetais (via inserção de um gene repórter sob controle de um promotor constitutivo). Os chamados genes repórter, sob condições apropriadas, promovem uma mudança na coloração da(s) estrutura(s) do fungo, permitindo a visualização fácil de aspectos que se deseja estudar (MULLINS; KANG, 2001). Os sistemas repórter mais comuns incluem o do GUS (*gusA*, β-D-glicoronidase de *Escherichia coli*), onde as estruturas/células transformadas adquirem cor azul na presença do substrato da enzima (X-glicuronide) (JEFFERSON; KAVANAGH; BEVAN, 1987), e da GFP (*gfp*, gene da proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria*), onde as estruturas/células transformadas emitem fluorescência verde em resposta à exposição à luz ultravioleta ou luz azul (CHALFIE et al., 1994; HASELOFF; DORMAND; BRAND, 1999). Em estudos que envolvem a interação fungo-planta, esses sistemas têm sido bastante utilizados para estimar a biomassa fúngica nos tecidos vegetais (HERD et al., 1997; VAN DEN WYMELENBERG et al., 1997), avaliar a expressão de genes em estágios específicos da interação (FEY; COX, 1997; LIU; KOLATTUKUDY, 1999), analisar a atividade metabólica do fungo *in planta* (HERD et al., 1997; TAN et al., 2001), determinar a localização celular e o transporte dos produtos gênicos durante a infecção fúngica (FEY; COX, 1997; HELBER; REQUENA, 2008; MANNERS, 2000; WEBER et al., 2006) e analisar a dinâmica de crescimento e/ou infecção do fungo nos órgãos do hospedeiro vegetal (ABELLO; KELEMU; GARCÍA, 2008; CHACÓN et al., 2007; CHRISTENSEN et al., 2008; MURRAY; LATCH; SCOTT, 1992; OLIVAIN; ALABOUVETTE, 1999; PLIEGO et al., 2009; SPELLIG; BOTTIN; KAHMANN, 1996; TAN et al., 2001; VAN DEN WYMELENBERG et al., 1997). Por exemplo, a transformação genética do fungo endofítico *Acremonium* sp. para inserção de um cassete contendo o gene *gusA* sob controle de um promotor constitutivo (MURRAY; LATCH; SCOTT, 1992) permitiu avaliar a atividade metabólica do endófito *in planta* e a visualização de hifas, expressando GUS, colonizando os tecidos da planta (HERD et al., 1997). Os autores observaram que: a concentração da atividade metabólica do fungo no tecido da planta diminui com o crescimento da planta; 70% dessa atividade se localiza nas lâminas foliares; existe um gradiente dessa atividade nos sentidos basal-apical e lateral (tecido mais novo-tecido mais velho), e esses gradientes são estabelecidos no início do desenvolvimento foliar (HERD et al., 1997). A partir desses resultados, Herd et al. (1997) sugeriram que a concentração do endófito em cada parte da planta seja regulada de tal forma que existe um limite pré-determinado da atividade do fungo na planta, o qual nunca é

excedido, e também segue um padrão de distribuição no tecido vegetal. Em outro trabalho, o fungo *T. harzianum*, comumente encontrado como saprófita de solos, foi transformado com um vetor contendo o gene *gfp* sob controle de um promotor constitutivo para avaliar a capacidade de colonizar endofiticamente tecidos das raízes de plantas de tomate (CHACÓN et al., 2007). A partir da observação via microscópio confocal, os autores detectaram a presença do fungo no interior das raízes, colonizando os espaços intercelulares do tecido radicular e formando estruturas do tipo papila nas extremidades das hifas (CHACÓN et al., 2007). Usando a estratégia de fusão com gene repórter, Helber e Requena (2008) determinaram a localização dos núcleos do fungo micorrízico *G. intraradices* usando dois genes repórter para proteínas fluorescentes, o *gfp* (fluorescência verde) e o *DsRed* (fluorescência vermelha), em fusão com o gene de localização nuclear *stuA* de *A. nidulans* e sob controle dos promotores *gpd* de *A. nidulans* e *GmPMA1* ou *GmFOX2* de *G. mosseae*, respectivamente. O emprego de sistemas repórter nos estudos de interação fungo-planta tem grande potencial para revelar detalhes da relação simbiótica entre esses organismos e com isso fornecer subsídios para aprimoramento de técnicas de controle de doenças e otimização das relações mutualísticas.

Referências

ABDEL-RAHIM, A. M.; BAGHADADI, A. M.; ABDALLA, M. H. Studies on fungus flora in the rhizosphere of sugarcane plants. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 81, p. 183-186, 1983.

ABELLO, J.; KELEMU, S.; GARCÍA, C. *Agrobacterium*-mediated transformation of the endophytic fungus *Acremonium implicatum* associated with *Brachiaria grasses*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, p. 407-413, 2008.

AHMED, A. S.; SÁNCHEZ, C. P.; CANDELA, M. E. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, p. 817-824, 2000.

AKAMATSU, H.; ITOH, Y.; KODAMA, M.; OTANI, H.; KOHMOTO, K. AAL-toxin-deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. **Phytopathology**, Lancaster, v. 87, p. 967– 972, 1997.

ALEXANDER, D.; GOODMAN, R. M.; GUT-RELLA, M.; GLASCOCK, C.; WEYMANN, K.; FRIEDRICH, L.; MADDOX, D.; AHL-GOY, P.; LUNTZ, T.; WARD, E.; RYALS, J. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 90, p. 7327-7331, 1993.

ALFANO, G.; LEWIS IVEY, M. L.; CAKIR, C.; BOS, J. I. B.; MILLER, S. A.; MADDEN, L. V.; KAMOUN, S.; HOITINK, H. A. J. Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. **Phytopathology**, Lancaster, v. 97, p. 429-437, 2007.

ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A.; SANTOS, A. S.; LEITE, L. G.; ALVES, S. B. Controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Hem.: Cercopidae), em cana cultivada no sistema orgânico. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 8, 2002, Recife. **Resumos...** STAB, 2002. p. 79-83.

ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insectos**. 1.ed. São Paulo: Manole, 1986. 407p.

AMEY, R. C.; ATHEY-POLLARD, A.; BURNS, C.; MILLS, P. R.; BAILEY, A.; FOSTER, G. D. PEG-mediated and *Agrobacterium*-mediated transformation in the mycopathogen *Verticillium fungicola*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 4-11, 2002.

ANDREOTE, F. D.; CARNEIRO, R. T.; SALLES, J. F.; MARCON, J.; LABATE, C. A.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Culture independent assessment of Rhizobiales-related alphaproteobacteria and the diversity of *Methylobacterium* in the rhizosphere and rhizoplane of transgenic *Eucalyptus.* **Microbial Ecology**, New York, v. 57, p. 82-93, 2009a.

ANDREOTE, F. D.; MENDES, R.; DINI-ANDREOTE, F.; ROSSETTO, P. B.; LABATE, C. A.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; VAN ELSAS, J. D.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Transgenic tobacco revealing altered bacterial diversity in the rhizosphere during early development. **Antonie Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 93, p. 415-424, 2008.

ANDREOTE, F. D.; ROSSETTO, P. B.; MENDES, R.; AVILA, L. A.; LABATE, C. A.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Bacterial community in the rhizosphere and rhizoplane of wild type and transgenic eucalyptus. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford,v. 25, p. 1065-1073, 2009b.

ARCAS, J. A.; DIAZ, B. M.; LECUONA, R. E. Bioinsecticidal activity of conidia and dry mycelium preparations of two isolates of *Beauveria bassiana* against the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 67, p. 151-158, 1999.

ARNOLD, A. E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, Oxford, v. 3, p. 267-274, 2000.

ARNOLD, E. A.; MEJIA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen plant–fungal symbiosis damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, p. 15649-15654, 2003.

ASAO, H.; ARAI, S.; NISHIZAWA, Y. Environmental risk evaluation of transgenic strawberry expressing a rice chitinase gene. **Seibutsu-kogaku-kaishi**, Tokyo, v. 81, p. 57-63, 2003.

ASNAGHI, C.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J. C.; ROTT, P. Resistance of sugarcane cultivar R 570 to *Puccinia melanocephala* isolates from different geographic locations. **Plant Disease**, St Paul, v. 85, p. 282-286, 2001.

AUGÉ, R. M. Water relations, drought and VA mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 11, p. 3-42, 2001.

AZEREDO, L. A. I.; GOMES, E. A. T.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. **International Microbiology**, Heidelberg, v. 1, p. 205–208, 1998.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESMHMUKH, S. K. (Ed.). **Fungi:** multifaceted microbes. Boca Raton: CRC Press, 2007. chap. 12, p. 191-209.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR., W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microrganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 3, p. 1-36, 2000.

BACON, C. W. Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte-infected tall fescue. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 44, p. 123-141, 1993.

BACON, C. W.; HILL, N. S. Symptomless grass endophytes: products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptations of grasses. In: REDKIN, S. C.; CARRIS, L. M. (Ed.). **Endophytic fungi in grasses and woody plants**. St Paul: APS Press, 1996. p. 155-178.

BAEK, J.-M.; HOWELL, C. R.; KENERLEY, C. M. The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**, Berlin, v. 35, p. 41-50, 1999.

BAEK, J. M.; KENERLEY, C. M. The arg2 gene of *Trichoderma virens*: cloning and development of a homologous transformation system. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 23, p. 34-44, 1998.

BAILEY, B.; BAE, H.; STREM, M.; ROBERTS, D.; THOMAS, S.; CROZIER, J.; SAMUELS, G.; CHOI, I.-Y.; HOLMES, K. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. **Planta**, Berlin, v. 224, p. 1449-1464, 2006.

BAILEY, B. A.; BAE, H.; STREM, M. D.; CROZIER, J.; THOMAS, S. E.; SAMUELS, G. J.; VINYARD, B. T.; HOLMES, K. A. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 24-35, 2008.

BAILEY, B. A.; LUMSDEN, R. D. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. (Ed.). ***Trichoderma* and *Gliocladium***. London: Taylor & Francis, 1998. chap. 9, p. 185-204.

BALLANCE, D. J.; BUXTON, F. P.; TURNER, G. Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 112, p. 284-289, 1983.

BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; SANTOS, A. S.; MACHADO, L. A.; ALVES, S. B. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* no controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar *Mahanarva fimbriolata* (Hom: Cercopidae). In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 8, 2002, Recife. **Resumos...** STAB, 2002. 73-78.

BEGGS, J. D. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. **Nature**, London, v. 275, p. 104-109, 1978.

BELESKY, D. P.; DEVINE, O. J.; PALLAS, J. E.; STRINGER JR, W. C. Photosynthetic activity of tall fescue as influenced by a fungal endophyte. **Photosynthetica**, Praha, v. 21, p. 82–87, 1987.

BHADAURIA, V.; BANNIZA, S.; WEI, Y.; PENG, Y.-L. Reverse genetics for functional genomics of phytopathogenic fungi and oomycetes. **Comparative and Functional Genomics**, s.l., v. 2009, Article ID 380719, p. 1-11, 2009.

BIGIRIMANA, J.; MEYER, G.; POPPE, J.; HOEFTE, M. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CROP PROTECTION, 49, 1997, Gent. **Resumos…** Mededelingen - Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen Universiteit Gent, 1997, p. 1001-1007.

BILLS, S. N.; RICHTER, D. L.; PODILA, G. K. Genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* by particle bombardment. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, p. 557-561, 1995.

BIRD, D.; BRADSHAW, R. Gene targeting is locus dependent in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v. 255, p. 219-225, 1997.

BJÖRKMAN, T.; BLANCHARD, L. M.; HARMAN, G. E. Growth enhancement of shrunken-2 (sh2) sweet corn by *Trichoderma harzianum* 1295-22: effect of environmental stress. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 123, p. 35-40 1998.

BOLAN, N. S.; ROBSON, A. D.; BARROW, N. J. Effect of vesicular arbuscular mycorrhiza on the availability of iron phosphates to plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 99, p. 401-410, 1987.

BÖLKER, M.; BÖHNERT, H. U.; BRAUN, K. H.; GÖRL, J.; KAHMANN, R. Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). **Molecular & General Genetics**, Berlin, v. 248, p. 547–552, 1995.

BONFANTE-FASOLO, P.; PEROTTO, S. Strategies of mycorrhizal fungi when infecting host plants. **New Phytologist**, London, v. 119, p. 115-120, 1991.

BORRAS-HIDALGO, O.; THOMMA, B. P. H. J.; CARMONA, E.; BORROTO, C. J.; PUJOL, M.; ARENCIBIA, A.; LOPEZ, J. Identification of sugarcane genes induced in disease-resistant somaclones upon inoculation with *Ustilago scitaminea* or *Bipolaris sacchari*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 43, p. 115-1121, 2005.

BROGLIE, K.; I., C.; HOLLIDAY, M.; CRESSMAN, R.; BIDDLE, P.; KNOWLTON, S.; MAUVAIS, C. J.; BROGLIE, R. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. **Science**, Washington, v. 254, p. 1194-1197, 1991.

BROWN, J. S.; HOLDEN, D. W. Insertional mutagenesis of pathogenic fungi. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 390-394, 1998.

BRUNDRETT, M. C. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. **New Phytologist**, London, v. 154, p. 275-304, 2002.

BRUNDRETT, M. C. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 320, p. 37-77, 2009.

BRUNDRETT, M. C. Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. In: SCHULZ, B. J. E.; BOYLE, C. J. C.; SIEBER, T. N. (Ed.). **Microbial root endophytes**. Berlin: Springer-Verlag, 2006. chap. 16, p. 281-293.

BRUNNER, K.; PETERBAUER, C. K.; MACH, R. L.; LORITO, M.; ZEILINGER, S.; KUBICEK, C. P. The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. **Current Genetics**, Berlin, v. 43, p. 289-295, 2003.

BRUNNER, K.; ZEILINGER, S.; CILIENTO, R.; WOO, S. L.; LORITO, M.; KUBICEK, C. P.; MACH, R. L. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 3959-3965, 2005.

BUNDOCK, P.; DEN DULK-RAS, A.; BEIJERSBERGEN, A.; HOOYKAAS, P. J. J. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 14, p. 3206-3214, 1995.

BUNDOCK, P.; MROCZEK, K.; WINKLER, A. A.; STEENSMA, H. Y.; HOOYKAAS, P. J. J. T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* as an efficient tool for gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v. 261, p. 115-121, 1999.

BYTHER, R. S.; STEINER, G. W. Four sugarcane seedling diseases in Hawaii: causal agents, control, and a selective medium for isolation. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 62, p. 120-124, 1972.

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

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, Brooklyn, v. 69, p. 2-9, 1988.

CARROLL, G. C. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N. J.; HEUVEL, J. V. D. (Ed.). **Microbiology of phyllosphere**. London: Cambridge University Press, 1986. p. 205-222.

CARSOLIO, C.; BENHAMOU, N.; HARAN, S.; CORTES, C.; GUTIERREZ, A.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, *ech42*, in mycoparasitism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 929-935, 1999.

CASAS-FLORES, S.; ROSALES-SAAVEDRA, T.; HERRERA-ESTRELLA, A. Three decades of fungal transformation: novel technologies. In: PAULINA, B.; ARGELIA , L. (Ed.). **Recombinant gene expression:** reviews and protocols. New York: Humana Press, 2004. chap. 22, p. 315-325.

CASE, M. E.; SCHWEIZER, M.; KUSHNER, S. R.; GILES, N. H. Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 76, p. 5259-5263, 1979.

CASTALDINI, M.; TURRINI, A.; SBRANA, C.; BENEDETTI, A.; MARCHIONNI, M.; MOCALI, S.; FABIANI, A.; LANDI, S.; SANTOMASSIMO, F.; PIETRANGELI, B.; NUTI, M. P.; MICLAUS, N.; GIOVANNETTI, M. Impact of Bt corn on rhizospheric and on beneficial mycorrhizal symbiosis and soil eubacterial communities iosis in experimental microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 6719-6729, 2005.

CHACÓN, M. R.; RODRÍGUEZ-GALÁN, O.; BENÍTEZ, T.; SOUSA, S.; REY, M.; LLOBELL, A.; DELGADO-JARANA, J. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. **International Microbiology**, Madrid, v. 10, p. 19-27, 2007.

CHAKRABORTY, B. N.; PATTERSON, N. A.; KAPOOR, M. An electroporation-based system for high-efficiency transformation of germinated conidia of filamentous fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 37, p. 858-863, 1991.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, M. M.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, Washington, v. 263, p. 802–805, 1994.

CHANG, Y.-C.; CHANG, Y.-C.; BAKER, R.; KLEIFELD, O.; CHET, I. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. **Plant Disease**, St Paul, v. 70, p. 145-148, 1986.

CHET, I. *Trichoderma* – Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: CHET, I. (Ed.). **Innovative Approaches to Plant Disease Control**. New York: John Wiley & Sons, 1987. p. 137-160.

CHET, I.; BENHAMOU, N.; HARAN, S. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. (Ed.). ***Trichoderma* and *Gliocladium:*** enzymes, biological control and commercial application. London: Taylor & Francis, 1998. chap. 7, p. 153-172.

CHET, I.; HARMAN, G. E.; BAKER, R. *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. **Microbial Ecology**, New York, v. 7, p. 29-38, 1981.

CHOI, W.; DEAN, R. A. The adenylate cyclase gene MAC1 of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 9, p. 1973-1983, 1997.

CHOI, Y. E.; BROWN, J. A.; WILLIAMS, C. B.; CANALES, L. L.; SHIM, W. B. GAC1, a gene encoding a putative GTPase-activating protein, regulates bikaverin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. **Mycologia**, Lancaster, v. 100, p. 701-709, 2008.

CHRISTENSEN, M. J.; BENNETT, R. J.; ANSARI, H. A.; KOGA, H.; JOHNSON, R. D.; BRYAN, G. T.; SIMPSON, W. R.; KOOLAARD, J. P.; NICKLESS, E. M.; VOISEY, C. R. *Epichloe* endophytes grow by intercalary hyphal extension in elongating grass leaves. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 45, p. 84–93, 2008.

CLAY, K.; HOLAH, J. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. **Science**, Washington, v. 285, p. 1742-1745, 1999.

COMBIER, J.-P.; MELAYAH, D.; RAFFIER, C.; PÉPIN, R.; MARMEISSE, R.; GAY, G. Nonmycorrhizal (Myc^{-}) mutants of *Hebeloma cylindrosporum* obtained through insertional mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 17, p. 1029-1038, 2004.

DANIELSON, R. M.; DAVEY, C. B. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 5, p. 486-494, 1973.

DAVIDSON, R. C.; CRUZ, M. C.; SIA, R. A. L.; ALLEN, B.; ALSPAUGH, J. A.; HEITMAN, J. Gene disruption by biolistic transformation in serotype D strains of *Cryptococcus neoformans*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 29, p. 38-48, 2000.

DE GROOT, M. J. A.; BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P. J. J.; BEIJERSBERGEN, A. G. M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. **Nature Biotechnology**, New York, v. 16, p. 839-842, 1998.

DE LA CRUZ, J.; HIDALGO-GALLEGO, A.; LORA, J. M.; BENITEZ, T.; PINTOR-TORO, J. A.; LLOBELL, A. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 206, p. 859-867, 1992.

DE LA CRUZ, J.; LLOBELL, A. Purification and properties of a basic endo-b-1,6-glucanase (BGN16.1) from the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 265, p. 145-151, 1999.

DE MARCO, J. L.; VALADARES-INGLIS, M.; FELIX, C. Purification and characterization of an N-acetylglucosaminidase produced by a *Trichoderma harzianum* strain which controls *Crinipellis perniciosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, p. 70-75, 2004.

DE MEYER, G.; BIGIRIMANA, J.; ELAD, Y.; HÖFTE, M. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, p. 279-286, 1998.

DE SOUZA, J. T.; BAILEY, B. A.; POMELLA, A. W. V.; ERBE, E. F.; MURPHY, C. A.; BAE, H.; HEBBAR, P. K. Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 36-45, 2008.

DEVARE, M. H.; JONES, C. M.; THIES, J. E. Effect of Cry3Bb transgenic corn and tefluthrin on the soil microbial community: Biomass, activity and diversity. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, p. 837-843, 2004.

DI PIETRO, A.; LORITO, M.; HAYES, C. K.; BROADWAY, R. M.; HARMAN, G. E. Endochitinase from *Gliocladium virens*: Isolation, characterization and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. **Phytopathology**, Lancaster, v. 83, p. 308-313, 1993.

DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; FERREIRA, J. M. G.; GARCIA JR., C. A.; COELHO, A. L.; GIL, M. A. Eficiência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) no controle de *Mahanarva fimbriolata* (Stál) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, p. 743-749, 2004.

DJONOVIC, S.; POZO, M. J.; DANGOTT, L. J.; HOWELL, C. R.; KENERLEY, C. M. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 19, p. 838-853, 2006.

DJONOVIC, S.; VARGAS, W. A.; KOLOMIETS, M. V.; HORNDESKI, M.; WIEST, A.; KENERLEY, C. M. A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, p. 875-889, 2007.

DREYFUSS, M. M.; CHAPELA, I. H. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. In: GULLO, V. P. (Ed.). **The discovery of natural products with therapeutic potential**. London: Butterworth-Heinemann, 1994. p. 49–80.

DUINEVELD, M. D.; ROSADO, A. S.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VEEN, J. A. Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of Chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 4950-4957, 1998.

DUNFIELD, K. E.; GERMIDA, J. J. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 38, p. 1-9, 2001.

DUNFIELD, K. E.; GERMIDA, J. J. Seasonal changes in the rizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7310-7318, 2003.

DUNFIELD, K. E.; GERMIDA, J. J. Impact of genetically modified crops on soil- and plant-associated microbial communities. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, p. 806-815, 2004.

EL-AMIN, A.-N.; SAADABI, A. M. A. Contribution to the knowledge of soil fungi in Sudan rhizosphere mycoflora of sugarcane at Kenana sugar Estate. **International Journal of Botany**, Islamabad v. 3, p. 97-102, 2007.

EL AMIN, E.; ABDALLA, M. H. Survey of soil fungi from the Sudan Gezira. **Mycopathologia**, Den Haag v. 71, p. 131-136, 1980.

EVANS, H. C.; HOLMES, K. A.; THOMAS, S. E. Mycobiota of an indigenous *Theobroma* species (*Sterculiaceae*) in Ecuador: assessing its potential for biological control of cocoa diseases. **Mycological Progress**, Berlin, v. 2, p. 149-160, 2003.

FANG, E. G. C.; DEAN, R. A. Site-directed mutagenesis of the *mag*B gene affects growth and development in *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 13, p. 1214-1227, 2000.

FÁVARO, L.C.L. **Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.)**. 2009. 219p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FEY, P.; COX, E. C. Gene trapping with GFP: the isolation of developmental mutants in the slime mold *Polysphondylium*. **Current Biology**, London, v. 7, p. 909–912, 1997.

FINCHAM, J. R. S. Transformation in Fungi. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 53, p. 148-170, 1989.

FITZGERALD, A.; VAN KAN, J. A.; PLUMMER, K. M. Simultaneous silencing of multiple genes in the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*, by expression of RNA with chimeric inverted repeats. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, p. 963-971, 2004.

FORBES, P.; MILLAM, S.; HOOKER, J. E.; HARRIER, L. Transformation of the arbuscular mycorrhiza *Gigaspora rosea* by particle bombardment. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, p. 497-501, 1998.

FRAVEL, D.; OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. **New Phytologist**, London, v. 157, p. 493-502, 2003.

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

FRÖHLICH, J.; HYDE, K. D. Biodiversity of palm fungi in the tropics: Are global fungal diversity estimates realistic? **Biodiversity and Conservation**, London, v. 8, p. 977-1004, 1999.

FUNGARO, M. H.; RECH, E.; MUHLEN, G. S.; VAINSTEIN, M. H.; PASCON, R. C.; QUEIROZ, M. V.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Transformation of *Aspergillus nidulans* by microprojectile bombardment on intact conidia. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 125, p. 193-298, 1995.

GAMS, W.; BISSETT, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (Ed.). ***Trichoderma* and *Gliocladium*:** basic biology, taxonomy and genetics. London: Taylor & Francis, 1998. chap. 1, p. 3-34.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. MICROBIAL DIVERSITY IN SOIL: Selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 243-270, 2004.

GIMENEZ-PECCI, M. D.; BOGO, M. R.; SANTI, L.; DE MORAES, C. K.; CORREA, C. T.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Characterization of mycoviruses and analyses of chitinase secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*. **Current Microbiology**, New York, v. 45, p. 334-339, 2002.

GIRLANDA, M.; BIANCIOTTO, V.; CAPPELLAZZO, G. A.; CASIERI, L.; BERGERO, R.; MARTINO, E.; LUPPI, A. M.; PEROTTO, S. Interactions between engineered tomato plants expressing antifungal enzymes and nontarget fungi in the rhizosphere and phyllosphere. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 288, p. 9-18, 2008.

GOLDONI, M.; AZZALIN, G.; MACINO, G.; COGONI, C. Efficient gene silencing by expression of double stranded RNA in *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, p. 1016-1024, 2004.

GOMES-BARCELLOS, F.; PELEGRINELLI-FUNGARO, M. H.; FURLANETO, M. C.; LEJEUNE, B.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Genetic analysis of *Aspergillus nidulans* unstable transformants obtained by the biolistic process. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 1137-1141, 1998.

GONZALEZ-SANTOS, J. M.; CAO, H.; WANG, A.; KOEHLER, D. R.; MARTIN, B.; NAVAB, R.; HU, J. A complementation method for functional analysis of mammalian genes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 33, p. e94, 2005.

GÖTZ, M.; NIRENBERG, H.; KRAUSE, S.; DRAEGER, H. S.; BUCHNER, A.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 58, p. 404-413, 2006.

GRAYSTON, S. J.; WANG, S.; CAMPBELL, C. D.; EDWARDS, A. C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 369-378, 1998.

GULERI, R.; GUPTA, R. P.; GOSAL, S. K.; PANDHER, M. S.; GOSAL, S. S. *In vitro* and *in situ* mycorrhization of micropropagated sugarcane plants and its effect on yield **Indian Journal of Microbiology**, New Delhi, v. 45, p. 71-73, 2005.

GYAMFI, S.; PFEIFER, U.; STIERSCHNEIDER, M.; SESSITSCH, A. Effects of transgenic glufosinate-tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 41, p. 181-190, 2002.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HANNON, G. J. RNA interference. **Nature**, London, v. 418, p. 244-251, 2002.

HANSON, L. E.; HOWELL, C. R. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 94, p. 171-176, 2004.

HARDOIM, P. R. **Formação de micorriza arbuscular e análise do transcritoma de raízes de cana-de-açúcar colonizadas por *Glomus clarum* na presença de herbicidas.** 2006. 90p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, St Paul, v. 84, p. 377-393, 2000.

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Lancaster, v. 96, p. 190-194, 2006.

HARMAN, G. E.; BJÖRJMANN, T. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. (Ed.). **Trichoderma and Gliocladium**. London: Taylor & Francis 1998. p. 229-265.

HARMAN, G. E.; BJÖRKMAN, T.; ONDIK, K.; SHORESH, M. Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. **Outlooks on Pest Management**, Burnham, v. 19, p. 24-29, 2008.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 43-56, 2004a.

HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. ***Trichoderma* and *Gliocladium*:** enzymes, biological control and commercial applications. London: Taylor & Francis, 1998. 393p.

HARMAN, G. E.; PETZOLDT, R.; COMIS, A.; CHEN, J. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, Lacaster, v. 94, p. 147-153, 2004b.

HARMAN, G. E.; SHORESH, M. The mechanisms and applications of opportunistic plant symbionts. In: VURRO, M.; GRESSEL, J. (Ed.). **Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management**. Amsterdam: Springer, 2007. p. 131-153.

HARRIER, L. A.; MILLAM, S. Biolistic Transformation of arbuscular mycorrhizal fungi - progress and perspectives. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 18, p. 25-33, 2001.

HART, M. M.; POWELL, J. R.; GULDEN, R. H.; DUNFIELD, K. E.; PAULS, K. P.; SWANTON, C. J.; KLIRONOMOS, J. N.; ANTUNES, P. M.; KOCH, A. M.; TREVORS, J. T. Separating the effect of crop from herbicide on soil microbial communities in glyphosate-resistant corn. **Pedobiologia**, Jena, v. 52, p. 253-262, 2009.

HARVEY, P. J.; CAMPANELLA, B. F.; CASTRO, P. M.; HARM, H.; LICHTFOUSE, E.; SCHAFFNER, A. R.; SMRCEK, S.; WERCK-REICHHART, D. Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. **Environmental Science and Pollution Research International**, Berlin, v. 9, p. 29-47, 2002.

HASELOFF, J.; DORMAND, E.-L.; BRAND, A. H. Live imaging with green fluorescent protein. In: PADDOCK, S. (Ed.). **Methods in Molecular Biology:** confocal microscopy methods and protocols. New Jersey: Humana Press, 1999, p. 241-259.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, p. 641-655, 1991.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 1422–1432, 2001.

HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 50, p. 9–18, 2004.

HAZELL, B. W.; TE'O, V. S.; BRADNER, J. R.; BERGQUIST, P. L.; NEVALAINEN, K. M. Rapid transformation of high cellulase producing mutant strains of *Trichoderma reesei* by microprojectile bombardment. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 30, p. 282-286, 2000.

HELBER, N.; REQUENA, N. Expression of the fluorescence markers DsRed and GFP fused to a nuclear localization signal in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **New Phytologist**, London, v. 177, p. 537–548, 2008.

HERD, S.; CHRISTENSEN, M. J.; SAUNDERS, K.; SCOTT, D. B.; SCHMID, J. Quantitative assessment of *in planta* distribution of metabolic activity and gene expression of an endophytic fungus. **Microbiology**, Readin, v. 143, p. 267–275, 1997.

HEUER, H.; KROPPENSTEDT, R. M.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere relative to communities are negligible natural factors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1325-1335, 2002.

HINNEN, A.; HICK, S. J. B.; FINK, G. R. Transformation of yeast chimeric ColE1 plasmid carrying LEU2. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 75, p. 1929-1933, 1978.

HOWELL, C. R. Relevance of mycoparasitism in the biological control of *Rhizoctonia solani* by *Gliocladium virens*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 77, p. 992-994, 1987.

HOWELL, C. R. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Lancaster, v. 92, p. 177-180, 2002.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, St Paul, v. 87, p. 4-10, 2003.

HOWELL, C. R. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. **Phytopathology**, Lancaster, v. 96, p. 178-180, 2006.

HOWELL, C. R. The role of antibiosis in biocontrol. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. (Ed.). ***Trichoderma* and *Gliocladium***. London: Taylor & Francis, 1998. chap. 8, p. 173-184.

HOWELL, C. R.; HANSON, L. E.; STIPANOVIC, R. D.; PUCKHABER, L. S.; WHEELER, M. H. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 90, p. 248-252, 2000.

HOWELL, C. R.; STIPANOVIC, R. D. Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. **Phytopathology**, Lancaster, v. 85, p. 469-472, 1995.

HYDE, K. D. Measuring biodiversity: diversity of microfungi in north Queensland. In: BOYLE, T. J. B; BOONTAWEE, B. (Ed.). **Measuring and monitoring biodiversity in tropical and temperate forests**. Bogor: CIFOR, 1996. p. 271–286.

HYDE, K. D.; FRÖHLICH, J.; TAYLOR, J. E. Diversity of ascomycetes on palms in the tropics. In: HYDE, K.D. (Ed.). **Biodiversity of tropical microfungi**. Hong Kong: Hong Kong University Press, 1997. p. 141–156.

HWANG, C. H.; FLAISHMAN, M. A.; KOLATTUKUDY, P. E. Cloning of a gene expressed during appresorium formation by *Colletotrichum gloeosporiodes* and a marked decrease in virulence by disruption of this gene. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 183-193, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores de produtividade nacional. Disponível em: <http://www.ibge.com.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200910_5.shtm> Acesso em: 26 nov. 2009.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **The EMBO journal**, Oxford, v. 6, p. 3901–3907, 1987.

JEFFRIES, P. Use of mycorrhizae in agriculture. **CRC Critical Rev Biotech**, Boca Raton, v. 5, p. 319-357, 1987.

JENCZMIONKA, N. J.; SCHÄFER, W. The Gpmk1 MAP kinase of *Fusarium graminearum* regulates the induction of specific secreted enzymes. **Current Genetics**, Berlin, v. 47, p. 29-36, 2005.

JIANG, Q.; YING, S. H.; FENG, M. G. Enhanced frequency of *Beauveria bassiana* blastospore transformation by restriction enzyme-mediated integration and electroporation. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 69, p. 512-517, 2007.

KADOTANI, N.; NAKAYASHIKI, H.; TOSA, Y.; MAYAMA, S. RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 16, p. 769-776, 2003.

KAHMANN, R.; BASSE, C. REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) and its impact on the isolation of pathogenicity genes in fungi attacking plants. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, p. 221–229, 1999.

KELLY, R. M.; EDWARDS, D. G.; THOMPSON, J. P.; MAGAREY, R. C. Responses of sugarcane, maize, and soybean to phosphorus and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 52, p. 731-743, 2001.

KELLY, R. M.; EDWARDS, D. G.; THOMPSON, J. P.; MAGAREY, R. C. Growth responses of sugarcane to mycorrhizal spore density and phosphorus rate. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 56, p. 1405-1413, 2005.

KERSHAW, M. J.; TALBOT, N. J. Genome-wide functional analysis reveals that infection-associated fungal autophagy is necessary for rice blast disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 106, p. 15967-15972, 2009.

KIM, J. E.; LEE, H. J.; LEE, J.; KIM, K. W.; YUN, S. H.; SHIM, W. B.; LEE, Y. W. *Gibberella zeae* chitin synthase genes, GzCHS5 and GzCHS7, are required for hyphal growth, perithecia formation, and pathogenicity. **Current Genetics**, Berlin, v. 55, p. 449-459, 2009.

KLEIN, D.; EVELEIGH, D. E. Ecology of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (Ed.). ***Trichoderma and Gliocladium*:** basic biology, taxonomy and genetics. London: Taylor & Francis, 1998. chap. 3, p. 57-74.

KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; WU, R.; SANFORD, J. C. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. **Nature**, London, v. 327, p. 70-73, 1987.

KOIKE, N.; HYAKUMACHI, M.; KAGEYAMA, K.; TSUYUMU, S.; DOKE, N. Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungi: lignification and superoxide generation. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 523-533, 2001.

KREDICS, L.; ZSUZSANNA, A.; SZEKERES, A.; HATVANI, L.; MANCZINGER, L.; CS, V.; ERZSÉBET, N. Extracellular proteases of *Trichoderma* species - a review. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, Budapest v. 52, p. 169-184, 2005.

KUBICEK, C. P.; BISSETT, J.; DRUZHININA, I.; KULLNIG-GRADINGER, C.; SZAKACS, G. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, p. 310-319, 2003.

KUBICEK, C. P.; MACH, R. L.; PETERBAUER, C. K.; LORITO, M. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. **Journal of Plant Pathology**, Padova, v. 83, p. 11-23, 2001.

KWON-CHUNG, K. J.; GOLDMAN, W. E.; KLEIN, B.; SZANISZLO, P. J. Fate of transforming DNA in pathogenic fungi. **Medical Mycology**, Philadelphia, v. 36, p. 38-44, 1998.

LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/EMBRAPA, 1998. p. 93-109.

LACROIX, B.; TZFIRA, T.; VAINSTEIN, A.; CITOVSKY, V. A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. **Trends in Genetics**, v. 22, p. 29-37, 2006.

LAMARCHE, J.; HAMELIN, R. C. No evidence of an impact on the rhizosphere diazotroph community by the expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin by *Bt* white spruce. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 6577-6583, 2007.

LAMBERS, H.; SHAVER, G.; RAVEN, J. A.; SMITH, S. E. N and P acquisition change as soils age. **Trends in Ecology & Evolution**, Cambridge, v. 23, p. 95-103, 2008.

LARSEN, J.; BODKER, L. Interactions between pea root-inhabiting fungi examined using signature fatty acids. **New Phytologist**, London, v. 149, p. 487-493, 2001.

LATCH, G. C. M. Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts: biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 44, p. 143-156, 1993.

LEGASPI, J. C.; POPRAWSKI, T. J.; LEGASPI, B. C. Laboratory and field evaluation of *Beauveria bassiana* against sugarcane stalkborers (Lepidoptera: Pyralidae) in the Lower Rio Grande Valley of Texas. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 93, p. 54-59, 2000.

LEV, S.; SHARON, A.; HADAR, R.; MA, H.; HORWITZ, B. A. A mitogen-activated protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation, appressorium formation and pathogenicity: diverse roles for mitogenactivated protein kinase. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 96, p. 13542–13547, 1999.

LI, G.; LI, R. X.; LIU, Q. Y.; WANG, Q.; CHEN, M.; LI, B. J. A highly efficient polyethylene glycol-mediated transformation method for mushrooms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 256, p. 203-208, 2006.

LIMA, J. O.; DOS SANTOS, J. K.; PEREIRA, J. F.; DE RESENDE, M. L. V.; DE ARAUJO, E. F.; DE QUEIROZ, M. V. Development of a transformation system for *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of witches' broom in cocoa plants. **Current Genetics**, Berlin, v. 42, p. 236-240, 2003.

LIMÓN, M. C.; LORA, J. M.; GARCÍA, I.; CRUZ, J.; LLOBELL, A.; BENÍTEZ, T.; PINTOR-TORO, J. A. Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. **Current Genetics**, Berlin, v. 28, p. 478-483, 1995.

LIU, C. I.; ZOU, W. X.; LU, I.; TAN, R. X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 88, p. 277-282, 2001.

LIU, H.; COTTRELL, T. R.; PIERINI, L. M.; GOLDMAN, W. E.; DOERING, T. L. RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Genetics**, Bethesda, v. 160, p. 463-470, 2002.

LIU, W.; LU, H. H.; WU, W.; WEI, Q. K.; CHEN, Y. X.; THIES, J. E. Transgenic *Bt* rice does not affect enzyme activities and microbial composition in the rhizosphere during crop development. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 475-486, 2008.

LIU, Z.-M.; KOLATTUKUDY, P. E. Early expression of the calmodulin gene, which precedes appressorium formation in *Magnaporthe grisea*, is inhibited by self-inhibitors and requires surface attachment. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 181, p. 3571-3577, 1999.

LOVELESS, A. R.; SMITH, C. E. M. Seedling blight of sugar-cane: a new disease caused by *Helminthosporium sacchari* Butler. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 44, p. 419-424, 1956.

MADRID, M. P.; DI PIETRO, A.; RONCERO, M. I. G. Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 47, p. 257–266, 2003.

MAIER, F. J.; SCHÄFER, W. Mutagenesis via Insertional – or Restriction Enzyme-Mediated – Integration (REMI) as a tool to tag pathogenicity related genes in plant pathogenic fungi. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 380, p. 855-864, 1999.

MANNERS, J. M. CgDN3: an essential pathogenicity gene of *Colletotrichum gloeosporioides* necessary to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 13, p. 929-941, 2000.

MARKS, S.; CLAY, K. Effects of CO_2 enrichment, nutrient addition, and fungal endophyte-infection on the growth of two grasses. **Oecologia**, Berlin, v. 84, p. 207–214, 1990.

MÁRQUEZ, L. M.; REDMAN, R. S.; RODRIGUEZ, R. J.; ROOSSINCK, M. J. A virus in a fungus in a plant-three way symbiosis required for thermal tolerance. **Science**, Washington, v. 315, p. 513-515, 2007.

MARSCHNER, P.; SOLAIMAN, Z.; RENGEL, Z. Rhizosphere properties of Poaceae genotypes under P-limiting conditions. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 283, p. 11-24, 2006.

MARTINS, T. D.; MENTEN, J. O. M.; SANGUINO, A. Fungos associados às sementes (cariopses) de cana-de-açúcar: métodos para detecção, incidência e relação entre incidência fúngica e ambiente de produção das sementes. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, p. 173-178, 2009.

MEHETRE, S.; MUKHERJEE, P.; KALE, S. Natural occurrence of *Gibberella fujikuroi* and its potential for control of the woolly aphid *Ceratovacuna lanigera* (Homoptera: Aphididae) in Indian sugarcane plantations. **Biocontrol Science and Technology**, London, v. 18, p. 215-220, 2008.

MENDES, R. **Diversidade e caracterização genética de comunidades microbianas endofíticas associadas à cana-de-açúcar**. 2008. 119p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. (Org.). **Micologia:** avanços no conhecimento. Recife: UFPE: 2007. p. 129-140.

METCALF, D. A.; WILSON, C. R. T. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. **Plant Pathology**, London, v. 50, p. 249-257, 2001.

MICHIELSE, C.; VAN WIJK, R.; REIJNEN, L.; CORNELISSEN, B.; REP, M. Insight into the molecular requirements for pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* through large-scale insertional mutagenesis. **Genome Biology**, s.l., v. 10, p. R4.1-R4.10, 2009.

MICHIELSE, C. B.; ARENTSHORST, M.; J., R. A. F.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. *Agrobacterium*-mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 9-19, 2005a.

MICHIELSE, C. B.; HOOYKAAS, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A.; RAM, A. F. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Current Genetics**, Berlin, v. 48, p. 1-17, 2005b.

MILLING, A.; SMALLA, K.; MAIDL, F. X.; SCHLOTER, M.; MUNCH, J. C. Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, p. 23-39, 2004.

MISHRA, N. C.; SZABO, G.; TATUM, E. L. Nucleic acid induced genetic changes in *Neurospora*. In: NIU, M. C.; SEGAL, S. J. (Ed.). **The role of RNA in reproduction and development**. Amsterdam: Elsevier/North Holland Publishing Co, 1973. p. 259-268.

MISHRA, N. C.; TATUM, E. L. Non-mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 70, p. 3875-3879, 1973.

MOCALI, S.; BERTELLI, E.; DI CELLO, F.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILIANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S.; SURICO, G.; FANI, R. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, p. 105-114, 2003.

MOUYNA, I.; HENRY, C.; DOERING, T. L.; LATGE, J. P. Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 237, p. 317-324, 2004.

MULLINS, E. D.; KANG, S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 58, p. 2043-2052, 2001.

MURRAY, F. R.; LATCH, G. C. M.; SCOTT, D. B. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium endophyte*. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v. 233, p. 1-9, 1992.

NAKAYASHIKI, H.; HANADA, S.; QUOC, N. B.; KADOTANI, N.; TOSA, Y.; MAYAMA, S. RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 275-283, 2005.

NASIM, G.; ALI, A.; MUNAWAR, A.; BAJWA, R. Seasonal dynamics of am fungi in sugarcane (*Saccharum officinarum* L. cv. spf-213) in relation to red rot (*Colletotrichum falcatum*) disease from Punjab, Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, Islamabad, v. 40, p. 2587-2600, 2008.

NASSAR, A. H.; EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Promotion of plant growth by an auxin-producing isolate of the yeast *Williopsis saturnus* endophytic in maize (*Zea mays* L.) roots. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 42, p. 97-108, 2005.

NGUYEN, Q. B.; KADOTANI, N.; KASAHARA, S.; TOSA, Y.; MAYAMA, S.; NAKAYASHIKI, H. Systematic functional analysis of calcium-signalling proteins in the genome of the rice-blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a high-throughput RNA-silencing system. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 68, p. 1348-1365, 2008.

O'CALLAGHAN, M.; GERARD, E. M.; WAIPARA, N. W.; YOUNG, S. D.; GLARE, T. R.; BARRELL, P. J.; CONNER, A. J. Microbial communities of *Solanum tuberosum* and magainin-producing transgenic lines. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, p. 47-56, 2004.

OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* with a non-pathogenic strain. **New Phytologist**, London, v. 141, p. 497–510, 1999.

OLMEDO-MONFIL, V.; CORTÉS-PENAGOS, C.; HERRERA-ESTRELLA, A. Three decades of fungal transformation: key concepts and applications. In: PAULINA, B.; ARGELIA , L. (Ed.). **Recombinant gene expression:** reviews and protocols. New York: Humana Press, 2004. p. 297–313.

OMACINI, M.; CHANETON, E. J.; GHERSA, C. M.; MÜLLER, C. B. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. **Nature**, London, v. 409, p. 78–81, 2001.

OZEKI, K.; KYOYA, F.; HIZUME, K.; KANDA, A.; HAMACHI, M.; NUNOKAWA, Y. Transformation of intact *Aspergillus niger* by electroporation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 58, p. 2224-2227, 1994.

PASCOE, I. G. History of systematic mycology in Australia. In: SHORT, P. S. (Ed.). **History of systematic botany in Australia**. South Yarra: Australian Systematic Botany Society, 1990, p. 259–264.

PASONEN, H.-L.; LU, J.; NISKANEN, A.-M.; SEPPÄNEN, S.-K.; RYTKÖNEN, A.; RAUNIO, J.; PAPPINEN, A.; KASANEN, R.; TIMONEN, S. Effects of sugar beet chitinase IV on root-associated fungal community of transgenic silver birch in a field trial. **Planta**, Berlin, v. 230, p. 973-983, 2009.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Ed.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991. p. 179-197.

PLIEGO, C.; KANEMATSU, S.; RUANO-ROSA, D.; DE VICENTE, A.; LÓPEZ-HERRERA, C.; CAZORLA, F. M.; RAMOS, C. GFP sheds light on the infection process of avocado roots by *Rosellinia necatrix*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, p. 137-145, 2009.

POWELL, J. R.; GULDEN, R. H.; HART, M. M.; CAMPBELL, R. G.; LEVY-BOOTH, D. J.; DUNFIELD, K. E.; PAULS, K. P.; SWANTON, C. J.; TREVORS, J. T.; KLIRONOMOS, J. N. Mycorrhizal and rhizobial colonization of genetically modified and conventional soybeans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 4365-4367, 2007.

POZO, M. J.; BAEK, J. M.; GARCIA, J. M.; KENERLEY, C. M. Functional analysis of *tvsp*1, a serine protease-encoding gene in the biocontrol agent *Trichoderma virens*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, p. 336-348, 2004.

RABOIN, L.-M.; SELVI, A.; OLIVEIRA, K. M.; PAULET, F.; CALATAYUD, C.; ZAPATER, M.-F.; BROTTIER, P.; LUZARAN, R.; GARSMEUR, O.; CARLIER, J.; D'HONT, A. Evidence for the dispersal of a unique lineage from Asia to America and Africa in the sugarcane fungal pathogen *Ustilago scitaminea*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, p. 64-76, 2007.

RASCHE, F.; HODL, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, M. H.; VAN ELSAS, J. D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, p. 219-235, 2006a.

RASCHE, F.; VELVIS, H.; ZACHOW, C.; BERG, G.; VAN ELSAS, J. D.; SESSITSCH, A. Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 43, p. 555-566, 2006b.

READ, D. J. Mycorrhiza – the state of the art. In: VARMA, A.; HOCK, B. (Ed.). **Mycorrhiza**. Berlin: Springer-Verlag, 1999. p. 3–34.

READ, J. C.; CAMP, B. J. The effect of the fungal endophyte *Acremonium coenophialum* in tall fescue on animal performance, toxicity, and stand maintenance. **Agronomy Journal**, Madison, v. 78, p. 848-850, 1986.

REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis: from mutualism to parasitism, who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist**, London, v. 151, p. 705-716, 2001.

REDMAN, R. S.; FREEMAN, S.; CLIFTON DR; MORREL J; BROWN G; RJ., R. Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of *Colletotrichum magna*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, p. 795–804, 1999.

REDMAN, R. S.; RANSON, J. C.; RODRIGUEZ, R. J. Conversion of the pathogenic fungus *Colletotrichum magna* to a nonpathogenic, endophytic mutualist by gene disruption. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 12, p. 969-975, 1999.

REDMAN, R. S.; SHEEHAN, K. B.; STOUT, R. G.; RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J. M. Thermotolerance conferred to plant host and fungal endophyte during mutualistic symbiosis. **Science**, Washington, v. 298, p. 1581, 2002.

REIS, V. M.; PAULA, M. A.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de micorrizas arbusculares e da bactéria diazotrófica *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1933-1941, 1999.

RIACH, M. B. R.; KINGHORN, J. R. Genetic transformation and vector developments in filamentous fungi. In: BOS, C. J. (Ed.). **Fungal Genetics:** principles and practice. New York: Marcel Dekker Inc., 1996. p. 209-233.

RIGGLE, P. J.; KUMAMOTO, C. A. Genetic analysis in fungi using restriction-enzyme-mediated integration. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 390-394, 1998.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can’t make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, p. 1109-1114, 2008.

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE JR, J. F.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, London, v. 182, p. 314-330, 2009.

ROIGER, D. J.; JEFFERS, S. N.; CALDWELL, R. W. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 23, p. 353-359, 1991.

ROSSMAN, A. Y. A strategy for an all-taxa inventory of fungal biodiversity. In: PENG, C.; CHOU, C. H. (Ed.). **Biodiversity and Terrestrial Ecosystems**. Taipei: Academia Sinica, 1994. p. 169-194.

RUIZ-DÍEZ, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, p. 189-195, 2002.

RUOCCO, M.; LANZUISE, S.; TURRÀ, D.; REVERBERI, M.; TUCCI, M.; DE MASI, L.; VINALE, F.; MARRA, R.; ALOY, V.; WOO, S.; LORITO, M. Protein HYTRA1 secreted by *Trichoderma* plays a key role in induced systemic resistance. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 9, 2008, Torino, Italy. **Resumos...** ICPP, 2008. p. 32.33, S32.259.

SAHAY, N. S.; VARMA, A. *Piriformospora indica*: a new biological hardening tool for micropropagated plants. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 181, p. 297-302, 1999.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal Eendophytes: A Continuum of Interactions with Host Plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 29, p. 319-343, 1998.

SANGUINO, A. **Patologia e controle dos fungos de sementes de cana-de-açúcar e resistência de progênies à *Helminthosporium sacchari***. 1976. 76p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1976.

SANCHEZ-TORRES, P.; GONZALEZ, R.; PEREZ-GONZALEZ, J. A.; GONZALEZ-CANDELAS, L.; RAMON, D. Development of a transformation system for *Trichoderma longibrachiatum* and its use for constructing multicopy transformants for the *Egl1* gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 41, p. 440-446, 1994.

SÁNCHEZ, O.; AGUIRRE, J. Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. **Fungal Genetics Newsletter**, Kansas, v. 43, p. 48-51, 1996.

SANDHU, S. S.; UNKLES, S. E.; RAJAK, R. C.; KINGHORN, J. R. Generation of benomyl resistant *Beauveria bassiana* strains and their infectivity against *Helicoverpa armigera*. **Biocontrol Science and Technology**, London, v. 11, p. 245-250, 2001.

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science and Technology**, London, v. 5, p. 27-37, 1987.

SCHIESTL, R. H.; PETES, T. D. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 88, p. 7585 –7589, 1991.

SCHIRMBÖCK, M.; LORITO, M.; WANG, Y. L.; HAYES, C. K.; ARISAN-ATAC, I.; SCALA, F.; HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 4364-4370, 1994.

SCHOONBEEK, H.; DEL SORBO, G.; DE WAARD, M. A. The ABC transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratol and the fungicide fenpiclonil. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 14, p. 562–571, 2001.

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

SCHUTZENDUBEL, A.; POLLE, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1351-1365, 2002.

SELOSSE, M.-A.; BAUDOIN, E.; VANDENKOORNHUYSE, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 327, p. 639-648, 2004.

SELOSSE, M.-A.; TACON, F. L. The land flora: a phototrophfungus partnership? **Trends in Ecology & Evolution**, Cambridge, v. 13, p. 15-20, 1998.

SHEN, R. F.; CAI, H.; GONG, W. H. Transgenic *Bt* has no apparent effect on enzymatic activities or functional diversity of microbial communities in rhizosphere soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 285, p. 149-159, 2006.

SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of the jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. **Phytopathology**, Lancaster, v. 95, p. 76-84, 2005.

SIEBER, T. N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 21, p. 75-89, 2007.

SIEGEL, M. R.; BUSH, L. P. Defensive chemicals in grass-fungal endophyte associations. **Recent Advances in Phytochemistry**, New York, v. 30, p. 81-118, 1996.

SIEGEL, M. R.; LATCH, G. C. M.; BUSH, L. P.; FANNIN, F. F.; ROWAN, D. D.; TAPPER, B. A.; BACON, C. W.; JOHNSON, M. C. Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 3301-3315, 1990.

SILVA, W. M. **Pré-seleção de "seedlings" de cana-de-açúcar resistentes a *Ustilago scitaminea*, pela inoculação das "sementes"**. 1978. 65p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1978.

SINGH, N.; SOMAI, B. M.; PILLAY, D. Smut disease assessment by PCR and microscopy in inoculated tissue cultured sugarcane cultivars. **Plant Science**, Limerick, v. 167, p. 987-994, 2004.

SINHA, O. K.; SINGH, K. Sugarcane seed decay: prevalence of fungi and collar rot of seedlings caused by *Curvularia* spp. and *Drechslera* spp. **Seed Research**, New Delhi, v. 10, p. 114-119, 1982.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo:** fundamentos e perspectivas. São Paulo: Editora gráfica Nagy Ltda, 1988. 236p.

SIRRENBERG, A.; GÖBEL, C.; GROND, S.; CZEMPINSKI, N.; RATZINGER, A.; KARLOVSKY, P.; SANTOS, P.; FEUSSNER, I.; PAWLOWSKIA, K. *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 131, p. 581-589, 2007.

SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. (Ed.). ***Trichoderma* and *Gliocladium***. London: Taylor & Francis, 1998. chap. 7, p. 139-191.

SKAMNIOTI, P.; GURR, S. J. *Magnaporthe grisea* cutinase2 mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 19, p. 2674–2689, 2007.

SMALLA, K.; WIELAND, G.; BUCHNER, A.; ZOCK, A.; PARZY, J.; KAISER, S.; ROSKOT, N.; HEUER, H.; BERG, G. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4742-4751, 2001.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. New York: Academic Press, 1997. 605p.

SPELLIG, T.; BOTTIN, A.; KAHMANN, R. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v. 252**,** p. 503-509, 1996.

SPIERING, M. J.; MOON, C. D.; WILKINSON, H. H.; SCHARDL, C. L. Gene clusters for insecticidal loline alkaloids in the grass-endophytic fungus *Neotyphodium uncinatum*. **Genetics**, Bethesda, v. 169, p. 1403-1414, 2005.

ST. LEGER, R. J.; SHIMIZU, S.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. J.; ROBERTS, D. W. Cotransformation of *Metarrhizium anisopliae* by electroporation or using the gene gun to produce stable GUS transformants. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 131, p. 289-294, 1995.

STEFANI, F. O. P.; BÉRUBÉ, J. A. Evaluation of foliar fungal endophyte incidence in field-grown transgenic *Bt* white spruce trees **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 84, p. 1573-1580, 2006.

STONE, J. K.; POLISHOOK, J. D.; WHITE, J. R. J. Endophytic fungi. In: MUELLER, G.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. (Ed.). **Biodiversity of fungi:** inventory and monitoring methods. Burlington: Elsevier, 2004. p. 241-270.

STUART, R. M. **Comunidade de fungos endofíticos associada à cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada**. 2006. 66p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

STUART, R. M.; ROMÃO, A. S.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Culturable endophytic filamentous fungi from leaves of transgenic imidazolinone-tolerant sugarcane and its non-transgenic isolines. **Archives of Microbiology**, Berlin, 2010. In press.

SWEIGARD, J. A.; CARROLL, A. M.; FARRALL, L.; CHUMLEY, F. G.; VALENT, B. *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 11, p. 404-412, 1998.

TALBOT, N. J.; EBBOLE, D. J.; HAMER, J. E. Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 5, p. 1575–1590, 1993.

TAN, Y. Y.; SPIERING, M. J.; SCOTT, V.; LANE, G. A.; CHRISTENSEN, M. J.; SCHMID, J. *In planta* regulation of extension of an endophytic fungus and maintenance of high metabolic rates in its mycelium in the absence of apical extension. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 5377–5383, 2001.

TATLI, F.; GULLU, M.; OZDEMIR, F. Determination of fungi species, relationships between ear infection rates and fumonisin quantities in *Bt* maize. **Bulletin OILB**, London, v. 27, p. 161-164, 2004.

THRANE, C.; TRONSMO, A.; JENSEN, D. F. Endo-1,3-β-glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum*: purification and partial characterization, induction of and biological activity against plant pathogenic *Pythium* spp. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, p. 331-344, 1997.

TILBURN, J.; SCAZZOCCHIO, C.; TAYLOR, G. G.; ZABICKY-ZISSMAN, J. H.; LOCKINGTON, R. A.; DAVIES, R. W. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. **Gene**, Amsterdam, v. 26, p. 205-221, 1983.

TONUKARI, N. J.; SCOTT-CRAIG, J. S.; WALTON, J. D. The *Cochliobolus carbonum* SNF1 gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence on maize. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 12, p. 237–247, 2000.

TUDZYNSKI, P.; TUDZYNSKI, B. Genetics of plant pathogenic fungi. In: BEHNKE, H.-D.; ESSER, K.; KADEREIT, J. W.; LÜTTGE, U.; RUNGE, M. (Ed.). **Progress in Botany**. Berlin: Springer, 1998. p. 169-193.

TURRINI, A.; SBRANA, C.; NUTI, M.; PIETRANGELI, B.; GIOVANNETTI, M. Development of a model system to assess the impact of genetically modified corn and aubergine plants on arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, p. 69-75, 2004.

TZFIRA, T.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 17, p. 147-154, 2006.

VAN DEN ACKERVEKEN, G. F. J. M.; VAN KAN, J. A. L.; JOOSTEN, M. H. A. J.; MUISERS, J. M.; VERBAKEL, H. M.; WIT, P. J. G. M. Characterization of two putative pathogenicity genes of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 6, p. 210-215, 1993.

VAN DEN WYMELENBERG, A. J.; CULLEN, D.; SPEAR, R. N.; SCHOENIKE, B.; ANDREWS, J. H. Expression of green fluorescent protein in *Aureobasidium pullulans* and quantification of the fungus on leaf surfaces. **Biotechniques**, Natick, v. 23, p. 686-690, 1997.

VAN OVERBEEK, L.; VAN ELSAS, J. D. Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 64, p. 283-296, 2008.

VARMA, A.; VERMA, S.; SAHAY, N.; BUTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2741-2744, 1999.

VEGA, F. E. Insect pathology and fungal endophytes. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 98, p. 277-279, 2008.

VERMA, M.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y.; VALÉRO, J. R. Antagonistic fungi, *Trichoderma spp*.: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 37, p. 1-20, 2007.

VIERHEILIG, H.; ALT, M.; LANGE, J.; GUT-RELLA, M.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T. Colonization of transgenic tobacco constitutively expressing pathogenesis-related proteins by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 3031-3034, 1995.

VIERHEILIG, H.; ALT, M.; NEUHAUS, J. H.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Colonization of transgenic *Nicotiana sylvestris* plants, expressing different forms of *Nicotiana tabacum* chitinase by the root pathogen *Rhizoctonia solani* and by the mycorrhizal symbiont *Glomus mosseae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 6, p. 261-264, 1993.

VISWANATHAN, R.; SUNDAR, A. R.; PREMKUMARI, S. M. Mycolytic effect of extracellular enzymes of antagonistic microbes to *Colletotrichum falcatum*, red rot pathogen of sugarcane. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 19, p. 953-959, 2003.

VITERBO, A.; MONTERO, M.; RAMOT, O.; FRIESEM, D.; MONTE, E.; LLOBELL, A.; CHET, I. Expression regulation of the endochitinase *chit36* from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). **Current Genetics**, Berlin, v. 42, p. 114-122, 2002.

VITERBO, A. D. A.; WIEST, A.; BROTMAN, Y.; CHET, I.; KENERLEY, C. The 18 mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 8, p. 737-746, 2007.

VON MUHLEN, G.; SILVA, M. E. Ocorrência de fungos endofíticos em cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 27, p. 183-186, 2005.

WALLER, F.; ACHATZ, B.; BALTRUSCHAT, H.; FODOR, J. Z.; BECKER, K.; FISCHER, M.; HEIER, T.; HÃ¼CKELHOVEN, R.; NEUMANN, C.; VON WETTSTEIN, D.; FRANKEN, P.; KOGEL, K.-H. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, p. 13386-13391, 2005.

WANG, Y. C.; GUO, B. H.; MIAO, Z. Q.; TANG, K. X. Transformation of taxol-producing endophytic fungi by restriction enzyme-mediated integration (REMI). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 273, p. 253-259, 2007.

WARDLE, D. A.; PARKINSON, D.; WALLER, J. E. Interspecific competitive interactions between pairs of fungal species in natural substrates. **Oecologia**, Berlin, v. 94, p. 165-172, 1993.

WATRUD, L. S.; MISRA, S.; GEDAMU, L.; SHIROYAMA, T.; MAGGARD, S.; DI GIOVANNI, G. Ecological risk assessment of alfalfa (*Medicago varia* L.) genetically engineered to express a human metallothionein (hMT) gene. **Water Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 176, p. 329-349, 2006.

WEBER, I.; ASSMANN, D.; THINES, E.; STEINBERG, G. Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant Infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 18, p. 225-242, 2006.

WEINDLING, R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. **Phytopathology**, Lancaster, v. 22, p. 837-845, 1932.

WEINERT, N.; MEINCKE, R.; GOTTWALD, C.; HEUER, H.; GOMES, N. C. M.; SCHLOTER, M.; BERG, G.; SMALLA, K. Rhizosphere communities of genetically modified zeaxanthin-accumulating potato plants and their parent cultivar differ less than those of different potato cultivars. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 3859-3865, 2009.

WELD, R. J.; PLUMMER, K. M.; CARPENTER, M. A.; RIDGWAY, H. J. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. **Cell Research**, Shanghai, v. 16, p. 31-44, 2006.

WHIPPS, J. M.; LUMSDEN, R. D. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: BUTT, T.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungal Biocontrol Agents:** Progress, Problems and Potential. Wallingford: CABI Publishing, 2001. p. 9-22.

WILSON, L. M.; IDNURM, A.; HOWLETT, B. J. Characterization of a gene (*sp1*) encoding a secreted protein from *Leptosphaeria maculans*, the blackleg pathogen of *Brassica napus*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 3, p. 487-493, 2002.

WOO, S. L.; DONZELLI, B.; SCALA, F.; MACH, R.; HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P.; DEL SORBO, G.; LORITO, M. Disruption of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 12, p. 419-429, 1999.

WU, W. X.; YE, Q. F.; MIN, H. Effect of straws from *Bt*-transgenic rice on selected biological activities in water-flooded soil. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 40, p. 15-22, 2004.

XU, J.; HAMER, J. E. MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Genes & Development**, New York, v. 10, p. 2696–2706, 1996.

YAO, Q.; LI, X.; FENG, G.; CHRISTIE, P. Mobilization of sparingly soluble inorganic phosphates by the external mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 230, p. 279-285, 2001.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 1061-1070, 1999.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, p. 863-873, 2000.

YEDIDIA, I.; SHORESH, M.; KEREM, Z.; BENHAMOU, N.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7343-7353, 2003.

YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A. K.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 235, p. 235-242, 2001.

YELTON, M. M.; HAMER, J. E.; TIMBERLAKE, W. E. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 81, p. 1470-1474, 1984.

ZEILINGER, S.; GALHAUPA, C.; PAYERA, K.; WOOB, S. L.; MACHA, R. L.; FEKETEA, C.; LORITO, M.; KUBICEK, C. P. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 26, p. 131-140, 1999.

ZHANG, J.-Z.; YANG, Q.; YANG, L. Expression of green fluoscrescent protein gene in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Harbin Institute of Technology (New Series)**, Beijing, v. 16, p. 346-349, 2009.

ZHENG, L.; CAMPBELL, M.; MURPHY, J.; LAM, S.; XU, J.-R. The BMP1 gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 13, p. 724-732, 2000.

ZIMAND, G.; ELADY, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. **Phytopathology**, Lancaster, v. 86, p. 1255-1260, 1996.

ZUCCARO, A.; BASIEWICZ, M.; ZURAWSKA, M.; BIEDENKOPF, D.; KOGEL, K. H. Karyotype analysis, genome organization, and stable genetic transformation of the root colonizing fungus *Piriformospora indica*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, p. 543-550, 2009.

2 EFEITO DA TRANSGÊNESE, ESTÁGIO DE CRESCIMENTO E MANEJO AGRÍCOLA NA ESTRUTURA E DIVERSIDADE DA COMUNIDADE FÚNGICA ASSOCIADA À CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo

A preservação das comunidades microbianas benéficas às plantas se tornou uma questão importante à luz dos apelos atuais por sustentabilidade. Neste contexto, a avaliação de possíveis efeitos de plantas de cana-de-açúcar geneticamente modificada sobre a estrutura e diversidade de comunidades fúngicas é de grande importância, já que, alterações nessas comunidades podem resultar no aumento da incidência de fungos patogênicos, ou mudar o padrão de interação fungo-planta. Dessa forma, o presente estudo buscou investigar os efeitos da transgênese, estágio de crescimento e manejo agrícola sobre a estrutura e diversidade das comunidades fúngicas da rizosfera e endofítica de raízes de plantas de cana-de-açúcar. Para tal, duas variedades de cana-de-açúcar, uma convencional (SP80-1842) e outra transgênica (IMI-1, expressando resistência ao herbicida imazapir), tratadas ou não com herbicida imazapir, foram cultivadas durante dois anos (2004 e 2005) e amostras foram coletadas em três estágios de crescimento (3, 10 e 17 meses) para isolamento de fungos da rizosfera e endófitos de raízes. A frequência de fungos endofíticos e da rizosfera foi comparada entre tratamentos, e amostras representativas de cada população foram selecionadas para identificação molecular dos fungos via sequenciamento da região ITS-1, 5,8S e ITS-2 do rDNA, cálculo dos índices de riqueza e diversidade e análise de variância molecular (AMOVA). Todos os resultados obtidos, considerando as diferentes análises empregadas (dados de frequência fúngica, diversidade, riqueza e AMOVA), mostraram que nem o genótipo (plantas convencionais e plantas transgênicas) nem o trato cultural (capina e herbicida) induziram alterações significativas na comunidade fúngica associada às plantas de cana-de-açúcar. Diferentemente, foi observado que o estágio de crescimento das plantas foi o único fator avaliado capaz de gerar uma alteração nas comunidades fúngicas, sendo que, esse efeito só foi significativo para a comunidade endofítica de raiz, e não para os fungos da rizosfera. De maneira geral, a estrutura da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar parece ser formada por um grande número de gêneros pouco frequentes e um pequeno número de gêneros altamente frequentes. Além disso, os dados obtidos no presente trabalho indicam que os efeitos da transgênese, se existentes, devem ser secundários quando comparados às fontes naturais de variação, sendo que, a comunidade fúngica endofítica de raiz mostrou-se muito mais dependente da idade da planta do que da modificação genética presente na variedade transgênica.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Transgênico; Fungos; Endófito; Rizosfera

2 EFFECTS OF TRANSGENESE, GROWTH STAGE AND MANAGEMENT ON THE STRUCTURE AND DIVERSITY OF FUNGAL COMMUNITY ASSOCIATED TO SUGARCANE

Abstract

Preserving plant-beneficial microbial community has turned into an important issue in the nowadays context of pursuing sustainability. Assessing possible effects of genetically modified sugarcane plants upon the structure and diversity of fungal communities is of great importance, since any change in these communities may lead to an increase on fungal pathogens incidence or modify the pattern of interaction between fungus and plant. The present study aimed to assess the effects of transgenese, growth stage and management on the structure and diversity of rhizosphere and root-endophytic fungal communities associated to sugarcane plants. For that, two varieties of sugarcane, the conventional SP80-1842 and its transgenic counterpart IMI-1 (resistant to imazapyr herbicide), managed or not with the imazapyr herbicide, were grown in the course of a 2-year monitoring field (2004 and 2005) and evaluated at three different growth stages (3, 10 and 17 months) by isolating rhizosphere fungi and fungal-root endophytes. The frequency of fungal-root endophytes and rhizosphere fungi was compared among treatments, and a representative portion of each population was selected for molecular identification by sequencing the rDNA region ITS1-5.8S-ITS-2, calculation of richness and diversity indexes and analysis of molecular variance (AMOVA). All the results obtained, considering the different approaches adopted in this study (fungal frequency, richness and diversity indexes and AMOVA), showed that neither the plant genotype (conventional and transgenic) nor the management (hand-weeded or herbicide-sprayed) led to significant changes on fungal communities associated to sugarcane. Differently, it was observed that the plant growth stage was the only factor examined that was able to produce a change in fungal communities, but it was significant just for fungal-root endophytes, and not for the rhizosphere fungi. Overall, it seems likely that the sugarcane fungal community structure is composed of many different genera of low frequency, and a few genera highly frequent. Moreover, the current results indicate that, if transgenese effects are present, they may be minor compared to other natural sources of variation, and the fungal-root endophytic community has shown to be much more dependent of plant growth stage than of the genetic modification in the transgenic variety.

Keywords: Sugarcane; Transgenic; Fungi; Endophyte; Rhizosphere

2.1 Introdução

Fungos e bactérias são importantes componentes do ambiente agrícola, visto que interagem com as plantas, contribuem com o equilíbrio ecológico, decomposição, ciclagem de nutrientes e manutenção do funcionamento do ecossistema (WEINERT et al., 2009). Esses microrganismos podem ser mutualistas, antagonistas, saprófitos ou patógenos, ocupando diferentes nichos, como o solo, a filosfera, a rizosfera e, em associações mais íntimas com a planta, o interior de tecidos vegetais. Essas comunidades microbianas associadas às plantas são bastante complexas e podem ser influenciadas por diferentes fatores, como tipo de solo, espécie vegetal, genótipo da planta, manejo agrícola e estágio de crescimento (DUINEVELD et al., 1998; GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004; GRAYSTON et al., 1998; MARSCHNER; SOLAIMAN; RENGEL, 2006; MARSCHNER et al., 2001; SMALLA et al., 2001). A preservação das comunidades microbianas benéficas às plantas se tornou uma questão importante à luz dos apelos atuais por ecossistemas cada vez mais sustentáveis. Nesse sentido, estudos de diversidade podem ajudar a esclarecer o papel de microrganismos nativos e mudanças biológicas associadas às pertubações ambientais, correlacionando diversidade microbiana, solo, planta e sustentabilidade do ecossistema (ATLAS et al., 1991; TURCO; KENNEDY; JAWSON, 1994).

Embora plantas geneticamente modificadas (PGMs) estejam sendo cultivadas em grande escala há mais de 10 anos, os impactos que elas podem causar no ambiente e na saúde humana ainda não foram completamente esclarecidos. Vários trabalhos já foram realizados com o objetivo de avaliar os potenciais efeitos de PGMs nas comunidades microbianas associadas às plantas (ANDOW; ZWAHLEN, 2006; MOTAVALLI et al., 2004; WIDMER, 2007), entretanto, muito pouco foi avaliado sobre a interação entre microrganismos e plantas de cana-de-açúcar transgênica (MENDES, 2008; ROSSETTO, 2008; STUART, 2006; STUART et al., 2010). No Brasil, a cultura da cana-de-açúcar tem grande destaque no cenário agrícola e econômico, uma vez que o país é líder mundial na produção dessa cultura, com cerca de 650 milhões de toneladas produzidas numa área de 8,1 milhões de hectares na safra de 2008, envolvendo 1,3 milhões de empregos formais nos setores de cana, etanol e açúcar (IBGE, 2009). Devido à sua importância, novas variedades vêm sendo desenvolvidas, por melhoramento clássico e/ou técnicas moleculares modernas, para características como resistência a insetos, resistência a herbicida, maiores teores de açúcares, ausência de florescimento entre outras. Entretanto, a liberação do plantio de cana-de-açúcar transgênica no Brasil ainda depende de estudos de biossegurança e impactos ambientais.

Alterações na dinâmica dos microrganismos que vivem em íntimo contato com a planta (como os endofíticos ou os que habitam a rizosfera) podem resultar tanto em efeitos negativos como positivos no crescimento e vigor da planta e, consequentemente, na sustentabilidade do sistema (DUNFIELD; GERMIDA, 2004). Os fungos, por exemplo, possuem uma série de funções importantes nos ecossistemas terrestres, estando envolvidos em muitos processos essenciais para o funcionamento do ecossistema (ANDERSON; CAMPBELL; PROSSER, 2003). Mais da metade das espécies fúngicas descritas são capazes de estabelecer íntimas relações com outros organismos vivos, em relações parasíticas, comensalísticas ou mutualísticas (BARBIERI; CARVALHO, 2001), sendo que atualmente sabe-se que todas as espécies de plantas são potenciais hospedeiros para diversos fungos (ARNOLD, 2007). Fungos que estabelecem interações com vegetais estão presentes principalmente na rizosfera e no interior dos tecidos vegetais. A rizosfera, solo influenciado pelas raízes, constitui um microambiente rico em exsudados radiculares intensamente colonizado por comunidades microbianas (SORENSEN, 1997), as quais afetam diretamente as plantas, promovendo crescimento, disponibilizando nutrientes ou protegendo de patógenos (ATKINSON; WATSON, 2000; SYLVIA; CHELLEMI, 2001). Fungos endofíticos, por sua vez, colonizam o interior de tecidos vegetais e estabelecem um antagonismo balanceado com a planta, onde ambos se beneficiam da interação (SCHULZ; BOYLE, 2005). Nessa relação, o fungo endofítico recebe nutrição e proteção da planta e em troca melhora as habilidades competitivas da mesma, como a resistência à herbivoria, à patógenos e à estresses abióticos, e também pode promover um maior crescimento vegetal (SAIKKONEN et al., 1998).

Os resultados de estudos que avaliaram o impacto de PGMs sobre comunidades microbianas associadas às plantas têm mostrado que os efeitos gerados podem ser positivos, negativos ou neutros (DEVARE; JONES; THIES, 2004; DUNFIELD; GERMIDA, 2001; DUNFIELD; GERMIDA, 2003; LAMARCHE; HAMELIN, 2007; LIU et al., 2008; POWELL et al., 2007; SHEN; CAI; GONG, 2006; STEFANI; BÉRUBÉ, 2006; WATRUD et al., 2006; WU; YE; MIN, 2004), e podem incluir mudanças na atividade microbiana do solo, devido a diferenças na quantidade e composição dos exsudados liberados pelas raízes; mudanças nas funções microbianas, resultado da transferência horizontal de transgenes de PGMs para microrganismos; alterações nas populações microbianas, em virtude do emprego de práticas específicas para culturas transgênicas, entre outros (MOTAVALLI et al., 2004). Entretanto, são numerosos os

exemplos de trabalhos que avaliaram possíveis efeitos de plantas transgênicas sobre a estrutura de comunidades microbianas e não observaram alterações significativas, sendo que, na verdade, os resultados mostram que os efeitos da transgenia são mínimos quando comparados com outros fatores de variação, como o cultivar (DUNFIELD; GERMIDA, 2001), o tipo de solo (RASCHE et al., 2006a; RASCHE et al., 2006b), o local de cultivo (HEUER et al., 2002; LAMARCHE; HAMELIN, 2007) e o estágio de crescimento da planta (GYAMFI et al., 2002; LIU et al., 2008; RASCHE et al., 2006a; RASCHE et al., 2006b; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2008). Por exemplo, Weinert et al. (2009) compararam os efeitos de plantas de batata geneticamente modificadas para acúmulo de zeaxantina com os efeitos de diferentes cultivares sobre as comunidades bacterianas e fúngicas da rizosfera e observaram que o uso de diferentes cultivares levou a maiores alterações nas comunidades microbianas avaliadas do que a modificação genética da planta transgênica. Além disso, foi verificado que o estágio de crescimento das plantas influenciou os efeitos nas comunidades microbianas. Em outro estudo, diferentes variedades de soja, incluindo plantas transgênicas expressando o gene *cp4-epsps*, foram comparadas quanto à capacidade de formar associações com fungos micorrízicos e rizóbios. Os resultados mostraram que a colonização das raízes por fungos micorrízicos e rizóbios diferiu entre as variedades de soja, entretanto, essa variação não pôde ser correlacionada com a modificação genética (POWELL et al., 2007). Assim, ainda que a transgênese possa afetar as populações microbianas associadas às plantas, outras fontes de variação devem ser consideradas quando se estuda o impacto das PGMs, de forma que os efeitos da modificação genética possam ser separados dos outros fatores e adequadamente avaliados.

Considerando todos esses aspectos, o presente trabalho buscou investigar os efeitos da transgênese, estágio de crescimento e manejo agrícola sobre a estrutura e diversidade das comunidades fúngicas associadas a plantas de cana-de-açúcar. Para tal, duas variedades de cana-de-açúcar, uma convencional (SP80-1842) e outra transgênica (IMI-1, expressando resistência ao herbicida imazapir), tratadas ou não com herbicida imazapir, foram cultivadas durante dois anos (2004 e 2005) e amostras foram coletadas em três estágios de crescimento (3, 10 e 17 meses) para isolamento de fungos da rizosfera e endofíticos de raízes. As frequências fúngicas foram comparadas entre tratamentos, e amostras representativas de cada população foram selecionadas para identificação molecular dos fungos via sequenciamento de segmentos do rDNA, cálculo dos índices de riqueza e diversidade e análise de variância molecular.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Materiais e métodos

2.2.1.1 Material vegetal, área de cultivo e delineamento experimental

As plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) foram cultivadas, em experimentos liberados pela CTNBio, na área experimental do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba, SP, Brasil (22º 41’ S e 47º 33’ O), sob a supervisão do Dr. Eugênio César Ulian. Foram utilizadas uma variedade comercial e uma geneticamente modificada (Tabela 2.1), distribuídas em três tratamentos: (**C**) cana-de-açúcar convencional (SP80-1842) + capina, (**TC**) cana-de-açúcar geneticamente modificada (IMI-1) + capina e (**TH**) cana-de-açúcar geneticamente modificada (IMI-1) + aplicação única do herbicida imazapir 2 meses após plantio. O plantio foi realizado em abril de 2004 e o experimento foi mantido em campo por 2 anos. O delineamento experimental consistiu de blocos casualizados, contendo 4 blocos e 12 parcelas, sendo que cada tratamento foi distribuído em 4 parcelas (repetições) (Figura 2.1). As amostras foram coletadas 3, 10 e 17 meses após o plantio das plantas de cana-de-açúcar, onde cada parcela teve 3 plantas amostradas e submetidas aos procedimentos de isolamento de fungos. Esse delineamento experimental permitiu avaliar o efeito da transgênese (comparação dos tratamentos C *vs.* TC), do manejo cultural (comparação dos tratamentos TC *vs.* TH) e do estágio de crescimento (comparação entre as amostras coletadas com 3, 10 e 17 meses).

2.2.1.2 Isolamento de fungos endofíticos e da rizosfera de cana-de-açúcar

O isolamento de fungos endofíticos de raízes de cana-de-açúcar seguiu o processo de desinfecção superficial, determinado por testes preliminares (ROMÃO et al., 2000), no qual as superfícies da raiz foram primeiramente lavadas em água corrente para remoção de partículas de solo e então submetidas a uma sequência de imersão em etanol 70% por 60 s, hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% (v/v) de cloro ativo por 90 s, etanol 70% por 60 s e duas lavagens em água esterilizada. Após processadas, as raízes foram cortadas em pequenos fragmentos de aproximadamente 5 mm de comprimento, com auxílio de um estilete sobre placa de petri

Tabela 2.1 - Características das plantas de cana-de-açúcar utilizadas no presente trabalho

Variedade	Espécie	Características
SP80-1842	*Saccharum* sp.	Variedade comercial não portadora de transgenes
IMI-1	*Saccharum* sp.	Plantas derivadas da variedade SP80-1842 resistentes ao herbicida imazapir. Carregam uma construção plasmidial que possui um variante do gene AHAS de trigo (alterado na posição 653, com a substituição de uma serina por uma asparagina), um promotor de ubiquinona de cana-de-açúcar e o gene de resistência ao antibiótico ampicilina

esterilizada. Foram transferidos 7 fragmentos vegetais para cada placa de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar, Merk) acrescido do antibiótico tetraciclina (50 $\mu g.mL^{-1}$), para impedir crescimento bacteriano. Para isolamento de fungos da rizosfera, amostras de solo (5 g) da área sob influência das raízes da planta foram adicionadas em 50 mL de tampão PBS (140 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 10 mM de Na_2HPO_4 e 2 mM de KH_2PO_4, pH 7,4) com pérolas de vidro e agitados (150 rpm) por uma hora. Após a obtenção da suspensão, foram feitas diluições em tampão PBS, e alíquotas de 100 µL foram semeadas sobre meio BDA suplementado com o antibiótico tetraciclina (50 $\mu g.mL^{-1}$). Para avaliar a eficiência do processo de desinfecção, 100 µL da água utilizada na última lavagem foram semeadas sobre meio BDA. As placas foram então incubadas a 28º C por 2 a 14 dias e acompanhadas periodicamente para avaliação do crescimento de fungos. Após crescimento fúngico, as colônias foram contadas, agrupadas por características morfológicas e isolados representativos da diversidade fúngica foram coletados, purificados e estocados para análises posteriores. Apenas fungos filamentosos foram considerados nesse trabalho, ou seja, os fungos leveduriformes foram desconsiderados das análises. A frequência de colônias crescidas por fragmento foi calculada para isolamento de fungos endofíticos de raiz e a conversão dos dados de número de colônias para unidades formadoras de colônia por grama de solo da rizosfera ($UFC.g^{-1}$) foi realizada para o isolamento de fungos da rizosfera.

2.2.1.3 Purificação e estoque de fungos

A purificação das colônias estocadas foi realizada por meio de diluição em série e semeadura em meio de cultura BDA. Para isso, com o auxílio de alça metálica esterilizada foram coletados esporos e/ou micélios da colônia e transferidos para tubo de 2 mL contento 1 mL de solução de salina (8,5 g de NaCl em 1 L de água), após, o tubo foi intensamente agitado

utilizando-se agitador (Vortex). Após a agitação, a suspensão foi diluída até 10^{-5} e 10^{-6} e 100 µL dessas diluições foram semeadas em placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram incubadas em estufa a 28º C para o crescimento e obtenção de colônias isoladas. As colônias isoladas foram armazenadas de acordo com o método Castellani (ARAÚJO et al., 2002), no qual os fungos foram crescidos em meio BDA, e então foram coletados discos de meio de cultura com micélios e colocados em frascos de 10 mL contendo água esterilizada. Os frascos foram identificados e armazenados à temperatura ambiente.

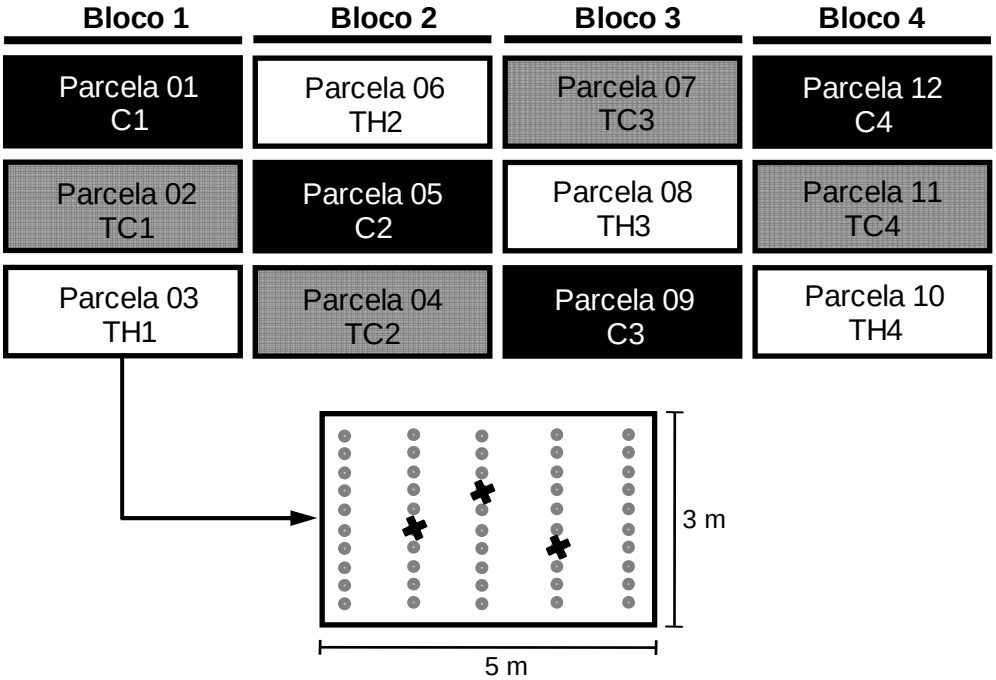


Figura 2.1 - Esquema do delineamento experimental mostrando a distribuição dos tratamentos, blocos e parcelas na área experimental, assim como as dimensões das parcelas. Os tratamentos estão indicados por (C) cana-de-açúcar convencional (SP80-1842) + capina, (TC) cana-de-açúcar geneticamente modificada (IMI-1) + capina e (TH) cana-de-açúcar geneticamente modificada (IMI-1) + aplicação única do herbicida imazapir 2 meses após plantio. O experimento foi montado em blocos inteiramente casualizados, com um total de 12 parcelas, sendo que cada tratamento foi distribuído em 4 parcelas. Cada parcela continha 5 linhas de cana-de-açúcar, com espaçamento de 1 m entrelinhas e 0,3 m entre plantas. A bordadura foi realizada com a variedade convencional SP80-1842 e a área total ocupada pelo experimento foi de 0,08 ha

2.2.1.4 Identificação molecular

O DNA dos isolados fúngicos foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Raeder & Broda (1985) com algumas modificações. Os fungos foram crescidos em 50 mL de BD (caldo de 200 g de batata e 20 g de dextrose em 1 L de água, [pH 6,0]) por cerca de 5 dias a

28º C, a suspensão fúngica foi filtrada e o micélio foi triturado em nitrogênio líquido. Cerca de 200 mg do micélio triturado foi transferido para 1 mL de tampão de extração (1% de SDS, 25 mM de EDTA, 250 mM de NaCl e 200 mM de Tris-HCl, [pH 8,0]), incubado a 65º C por 20 min e centrifugado a 16000X *g* por 10 min a 4º C. O sobrenadante foi transferido para tubo novo contendo 1 vol de fenol, homogeneizado e centrifugado (16000X *g* por 5 min a 4º C). Após, o sobrenadante foi transferido para tubo novo contendo 1 vol de fenol:clorofórmio (1:1 vol/vol), homogeneizado e centrifugado (16000X *g* por 5 min a 4º C). Novamente, o sobrenadante foi transferido para tubo novo contendo 1 vol de clorofórmio:álcool isoamílico (CIA) (24:1 vol/vol) homogeneizado e centrifugado (16000X *g* por 5 min a 4º C). O DNA foi precipitado pela transferência do sobrenadante para tubo novo contendo 0,6 vol de isopropanol, homogeneização, incubação por 5 min à temperatura ambiente e centrifugação a 16000X *g* por 10 min a 4º C. O precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% à 4º C, seco à 37º C e ressuspendido em 50 µL de água ultra-pura (Milli-Q) autoclavada. A integridade do DNA e a quantificação do mesmo foram realizadas por meio da eletroforese em gel de agarose 0,8% a 3 $V.cm^{-1}$ e comparação com marcador (DNA do fago λ, Invitrogen). O DNA foi estocado a -20º C. A região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA dos isolados fúngicos foi amplificada pela técnica de PCR com o uso dos iniciadores ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), os quais anelam em posições específicas do 18S e 28S do rDNA (WHITE et al., 1990). A amplificação foi realizada em termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research) programado para realizar uma desnaturação inicial a 94º C por 5 min, seguido de 24 ciclos de 94º C por 30 s, 55º C por 30 s e 72º C por 30 s, após os ciclos, uma extensão final a 72º C por 7 min. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo Tampão 1X (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl, [pH 8,4]), 3,7 mM de $MgCl_2$, 1 mM de dNTPs, 0,05 $U.\mu L^{-1}$ de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,4 µM de cada iniciador e 5 ng de DNA. O fragmento amplificado foi observado por eletroforese em gel de agarose 1,4% a 3 $V.cm^{-1}$, juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb (Invitrogen). Após a eletroforese o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1 $mg.mL^{-1}$) e fotodocumentado. Ao final, os fragmentos amplificados foram purificados com o kit *GFX PCR* (Amersham Pharmacia Biotech) e sequenciados (Laboratório de Virologia da UMC, Mogi das Cruzes, SP e no Centro de Estudos do Genoma Humano, USP). Para a identificação dos isolados fúngicos, as seqüências foram analisadas comparativamente via BLASTn

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) contra a base de dados do GenBank, que utiliza o método heurístico para encontrar o melhor *score* de alinhamentos locais entre a sequência submetida e o banco de dados. A identificação foi realizada em nível de gênero, a partir da classificação taxonômica de sequências de linhagens bem caracterizadas que apresentaram os valores mais altos de similaridade com as sequências submetidas. As sequências foram depositadas no GenBank e estão disponíveis sob os números de acesso GQ495269 e GU973612-GU973859.

2. 2.1.5 Análise estatística

A análise estatística dos dados de isolamento foi realizada utilizando-se os dados de frequência fúngica (Ff = *número de colônias fúngicas/número de fragmentos de raiz*) para o isolamento de fungos endofíticos de raiz, e os dados de densidade fúngica (Df = *número de unidades formadoras de colônia/grama de solo*) para o isolamento de fungos da rizosfera. A análise de variância foi realizada com o auxílio do programa *SAS - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA*, considerando o delineamento experimental de blocos casualizados em esquema fatorial. Os dados de Ff e Df foram transformados usando a fórmula $\sqrt{x+0,5}$ antes da análise de variância para normalização dos dados.

2.2.1.6 Análise de diversidade, riqueza e rarefação

A diversidade e a riqueza da comunidade fúngica nos três tratamentos (C, TC e TH), considerando as três épocas de isolamento (plantas com 3, 10 e 17 meses), foram quantificadas por meio do cálculo dos índices de Shannon-Wienner (*H'*) e Chao1, respectivamente. Estes índices foram calculados utilizando o programa computacional DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005), que também gerou os dados de rarefação, considerando diferentes níveis de similaridade entre as sequências de nucleotídeos da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA dos fungos avaliados. As matrizes de similaridade utilizadas no programa DOTUR foram geradas com o alinhamento das sequências de cada um dos grupos e posterior cálculo das matrizes aplicando as distâncias de Jukes-Cantor, no programa Phylip DNADist (http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/dnadist-simple.html). O programa DOTUR calculou desta maneira a ocorrência dos diferentes filotipos nos diferentes grupos de sequências. Os níveis

de similaridade para determinar os níveis taxonômicos nas análises foram: 100% (linhagens), 99% (espécies) e 97%-95% (gêneros), embora seja de nosso conhecimento que esses níveis de similaridade podem variar consideravelmente para fungos, dependendo do caso em questão.

2.2.1.7 Análise molecular de variância (AMOVA)

A AMOVA foi realizada para estimar a variação genética entre os diferentes grupos de comunidades fúngicas avaliadas, e com isso determinar o quanto da variação genética pode ser atribuída à diferença entre as variedades de cana (efeito do genótipo), ao manejo cultural (efeito do manejo), às diferentes épocas de coleta (efeito do estágio de crescimento) e à comunidade em questão, se fungos da rizosfera ou endófitos de raiz (efeito da comunidade). A AMOVA divide a variação total em três partes: variação entre grupos, variação entre populações dentro de um grupo e variação dentro das populações. Através do teste de permutação é possível determinar a probabilidade estatística para cada parte da variação. As análises foram realizadas através do programa Arlequin versão 3.1 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005), considerando 16.000 permutações e utilizando as sequências de DNA dos isolados fúngicos como dado de entrada para o programa.

2.2.2 Resultados

2.2.2.1 Isolamento de fungos associados à cana-de-açúcar

O método de isolamento dependente de cultivo foi adotado para avaliar possíveis mudanças na frequência (Ff) (para endófitos de raiz) e densidade (Df) (para fungos da rizosfera) de fungos filamentosos associados à duas variedades de cana-de-açúcar, uma geneticamente modificada expressando o gene de resistência ao herbicida imazapir (IMI-1) e a sua isolinha convencional (SP80-1842), em três tratamentos diferentes (C – variedade SP80-1842 capinada; TC - variedade IMI-1 capinada e TH - variedade IMI-1 conduzida com herbicida), considerando plantas em três estágios de crescimento (3, 10 e 17 meses). Com esse esquema experimental foi possível considerar a influência de diferentes efeitos (genótipo, trato cultural e estágio de crescimento da planta) sobre as comunidades fúngicas associadas à cana-de-açúcar. A

metodologia utilizada permitiu o isolamento de fungos endofíticos de raízes e da rizosfera (Figura 2.2). As raízes de cana-de-açúcar mostraram-se altamente colonizadas por fungos endofíticos, já que a partir de 756 fragmentos de raiz foi possível isolar 781, 659 e 796 fungos, a partir de plantas com 3, 10 e 17 meses, respectivamente. De forma similar, a rizosfera dessas plantas também se apresentou densamente colonizada por fungos, sendo que, a partir das diluições adotadas na metodologia de isolamento, pode-se dizer que em apenas 0,72 mg de solo foram encontrados 328, 590 e 306 fungos cultiváveis, a partir da rizosfera de plantas com 3, 10 e 17 meses, respectivamente. Esses valores correspondem a cerca de 455 mil, 820 mil e 425 mil fungos para cada grama de solo, respectivamente.

A análise de variância (ANOVA) para os fatores de variação tratamento (C, TC e TH) e estágio de crescimento (3, 10 e 17 meses) foi realizada a partir dos dados de frequência e densidade fúngica e os resultados estão listados na Tabela 2.2. Adicionalmente, a Figura 2.3 contém os gráficos com as frequências e densidades fúngicas médias observadas para cada tratamento em cada estágio de crescimento da planta. Os resultados da ANOVA mostraram que, independente da comunidade fúngica avaliada (se endófitos de raiz ou fungos da rizosfera), os tratamentos não induziram mudanças significativas (P>0,05) nas frequências/densidades dos fungos associados às plantas de cana-de-açúcar (Tabela 2.2A,B, Figura 2.3a,c), indicando que

Figura 2.2 – Placas de isolamento de fungos endofíticos a partir de fragmentos de raízes (**a**) e de fungos da rizosfera a partir de diluições da suspensão de solo rizosférico em tampão PBS (**b**), ilustrando a diversidade morfológica dos fungos associados à cana-de-açúcar

Tabela 2.2 - ANOVA para os fatores tratamentos e época de isolamento

A - Fungos Endofíticos de Raiz					
Fator de variação (FV)	**GL**	**SQ**	**QM**	**F**	**P > F**
Blocos	3	0,00979	0,00326	0,82	0,4963 ^{ns}
Tratamentos (T)	2	0,01859	0,00929	2,33	0,1189 ^{ns}
Estágio de crescimento (E)	2	0,03421	0,01710	4,29	0,0256 *
Interação (T x E)	4	0,05113	0,01278	3,21	0,0305 *
Erro	24	0,09572	0,00398		
Coeficiente de variação (CV) = 5,22%					

B - Fungos da Rizosfera					
Fator de variação (FV)	**GL**	**SQ**	**QM**	**F**	**P > F**
Blocos	3	209234	69744	1,44	0,2572 ^{ns}
Tratamentos (T)	2	19263	9631	0,20	0,8216 ^{ns}
Estágio de crescimento (E)	2	178217	89108	1,83	0,1816 ^{ns}
Interação (T x E)	4	147514	36878	0,76	0,5623 ^{ns}
Erro	24	1166459	48602		
Coeficiente de variação (CV) = 33,59%					

^{ns} - indica que não existe diferença significativa entre os valores de F encontrados e os valores da tabela F (PEARSON; HARTLEY, 1966).

* - indica que existe diferença significativa entre os valores de F encontrados e os valores da tabela F (PEARSON; HARTLEY, 1966) ao nível de 5% de probabilidade.

nem o genótipo (planta transgênica ou convencional) nem o manejo cultural (capina ou herbicida) promoveram efeitos significativos sobre a quantidade de fungos das comunidades da rizosfera e endofítica das raízes de cana-de-açúcar. Diferentemente, o estágio de crescimento das plantas influenciou de forma significativa (P=0,0256) a frequência de fungos endofíticos de raiz (Tabela 2.2A), sendo plantas com 17 meses > plantas com 3 meses > plantas com 10 meses (Figura 2.3b). Curiosamente, esse efeito do estágio de crescimento não foi observado para a densidade da comunidade fúngica da rizosfera (P>0,05) (Tabela 2.2B, Figura 2.3d), o que pode sugerir que o contato mais íntimo dos endófitos com a planta faz com que eles sejam mais susceptíveis às mudanças fisiológicas do hospedeiro. Além disso, a ANOVA revelou a presença de interação (P=0,0305) entre os fatores tratamento e estágio de crescimento para a comunidade endofítica de raiz, ou seja, o efeito dos diferentes tratamentos sobre a frequência de fungos endofíticos depende do estágio de crescimento da planta, e vice-versa. Devido ao grande número de isolados fúngicos obtidos nos isolamentos houve a necessidade de se realizar um agrupamento prévio dos fungos de acordo com as características morfológicas (tipo de micélio, coloração, presença de esporos), de modo que amostras representativas da diversidade pudessem ser selecionadas para as análises posteriores.

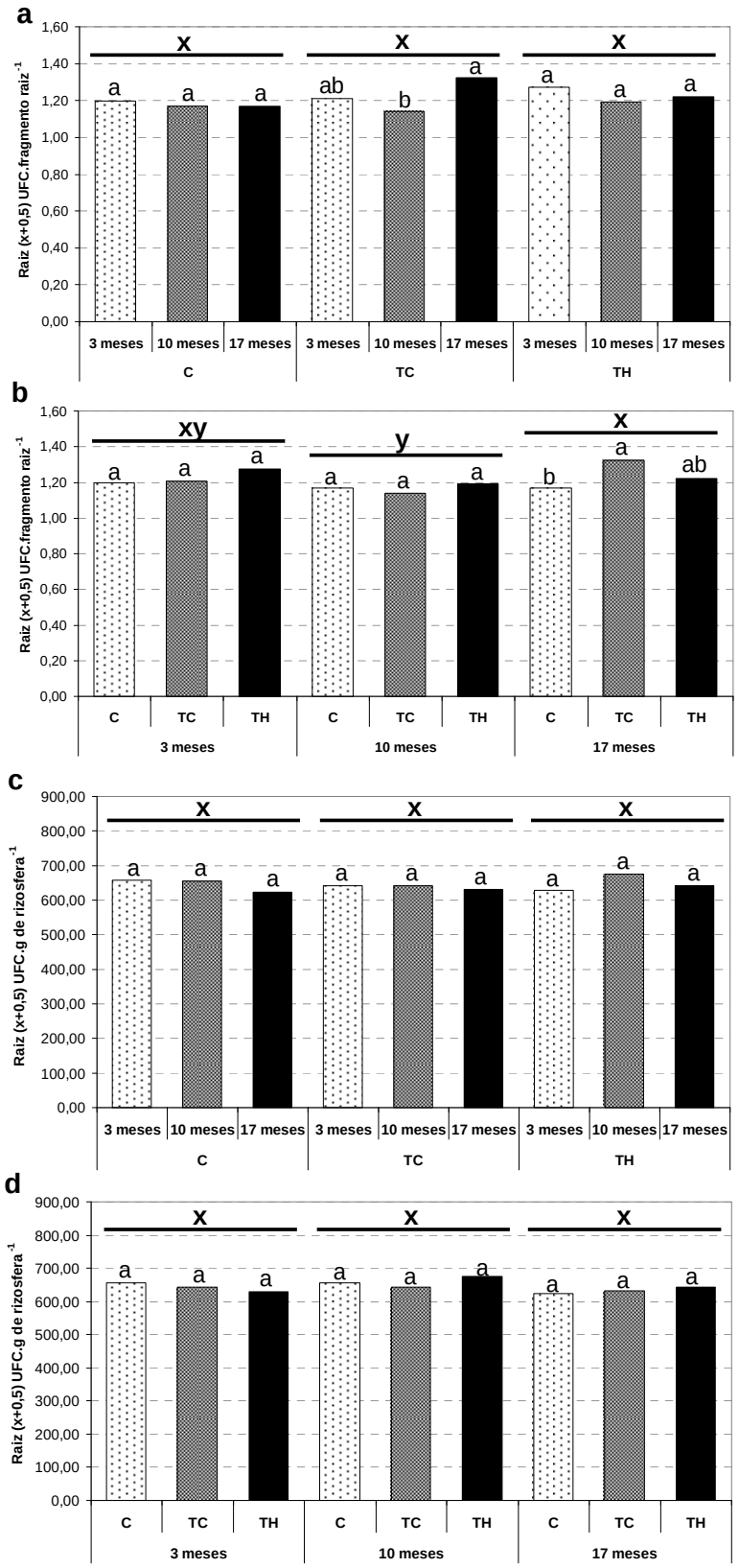


Figura 2.3 – Frequência de isolamento de fungos endofíticos de raiz (**a**,**b**) e densidade de fungos da rizosfera (**c**,**d**). As barras indicam os valores médios encontrados para efeito dentro de cada fator de variação: tratamentos (C- plantas convencionais conduzidas com capina, TC- plantas transgênicas conduzidas com capina e TH- plantas transgênicas conduzidas com herbicida); estágio de crescimento (3, 10 e 17 meses). Letras iguais não representam diferença significativa a 5% de probabilidade no teste de comparação de médias de Tukey

2.2.2.2 Composição e distribuição da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar

A partir da definição dos grupos morfológicos, um total de 249 fungos foi selecionado, abrangendo amostras proporcionais e representativas da diversidade de cada tratamento, para caracterização via identificação molecular por sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, e avaliação dos efeitos do genótipo, do manejo e do estágio de crescimento, por meio da comparação entre índices de diversidade, riqueza e da variação molecular. Neste ponto vale lembrar que a subjetividade intrínseca à seleção de isolados fúngicos a partir do agrupamento por semelhanças morfológicas permite uma visão geral da estrutura dessas populações, mas não suporta inferências sobre pequenas variações, pois estas estão mais sujeitas aos erros de amostragem. A análise da similaridade entre as sequências de nucleotídeos da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA dos isolados fúngicos e as sequências disponíveis no GenBank, via BLASTn, permitiu a identificação taxonômica da maioria dos isolados do presente trabalho em nível de gênero. Os resultados mostraram que nas condições avaliadas a comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar é composta por fungos pertencentes à pelo menos 35 gêneros diferentes e de alguns fungos não identificados, cuja classificação taxonômica não foi possível em nível de gênero (Tabela 2.3). De maneira geral, o filo Ascomicota predominou entre os fungos identificados (96,0%), sendo que os filos Zigomicota/Mucoromicotina e Basidiomicota representaram apenas 2,4% e 1,6% da população avaliada, respectivamente. As classes Eurotiomicetos (43%), Sordariomicetos (38,5%) e Dothideomicetos (7,6%) predominaram dentre os isolados do filo Ascomicota, sendo que os gêneros mais frequentes foram *Penicillium* (33,3%), *Fusarium* (16,9%), *Aspergillus* (7,2%) e *Trichoderma* (4,4%) (Tabela 2.3). O grupo de fungos não identificados incluiu 19 isolados pertencentes ao filo Ascomicota, 3 isolados pertencentes ao filo Zigomicota/Mucoromicotina e um isolado do filo Basidiomicota. Dentre os 19 fungos não identificados pertencentes ao filo Ascomicota: 4 apresentaram similaridades com membros da ordem Xilariales, um apresentou similaridades com membros da ordem Capnodiales, 3 apresentaram similaridades com membros da ordem Hipocreales, 3 apresentaram similaridades com membros da família Herpotrichiellaceae, 2 apresentaram similaridades com membros da família Magnaporthaceae, um apresentou similaridades com membros da família Montagnulaceae e 5 apresentaram similaridades ascomicetos mitospóricos. A distribuição dos

gêneros que compõem a comunidade fúngica de cana-de-açúcar de acordo com os tratamentos encontra-se listada na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Classificação taxonômica dos 249 fungos avaliados em nível de gênero, a partir da maior similaridade encontrada via BLASTn, e distribuição dos mesmos de acordo com local de isolamento (raiz ou rizosfera), idade da planta (3, 10 ou 17 meses) e tratamento (C, TC, TH)

Gênero [1]	**Endófitos de Raiz**										**Fungos da rizosfera**										**Total geral**	**%**
	3 meses			**10 meses**			**17 meses**			**Total**	**3 meses**			**10 meses**			**17 meses**			**Total**		
	C	**TC**	**TH**	**C**	**TC**	**TH**	**C**	**TC**	**TH**		**C**	**TC**	**TH**	**C**	**TC**	**TH**	**C**	**TC**	**TH**			
Acephala	0	0	0	**1**	0	**1**	0	0	0	**2**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	**2**	**0,80**
Acremonium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	**1**	**1**	**0,40**
Alternaria	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	**1**	**0,40**
Aspergillus	0	0	**1**	0	0	0	**3**	**2**	0	**6**	0	0	**2**	**1**	**1**	**1**	**1**	**5**	**1**	**12**	**18**	**7,23**
Bionectria	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	**1**	**2**	0	0	0	0	0	0	**1**	0	**3**	**4**	**1,61**
Chaetomium	0	**1**	0	**1**	0	0	0	0	**1**	**3**	0	0	0	**2**	0	**1**	**1**	0	0	**4**	**7**	**2,81**
Chaetosphaeria	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	**1**	**2**	**0,80**
Cladophialophora	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	**1**	**1**	**0,40**
Cladosporium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	0	**3**	**1**	0	0	0	0	**1**	0	**5**	**5**	**2,01**
Colletotrichum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	**1**	**1**	**0,40**
Cunninghamella	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	**1**	0	**2**	0	0	0	0	0	0	**3**	**3**	**1,20**
Curvularia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	**1**	**1**	**0,40**
Diaporthe	0	0	**1**	0	0	0	**1**	0	0	**2**	0	0	0	0	0	0	0	**2**	0	**2**	**4**	**1,61**
Dokmaia	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	**1**	0	**1**	0	**1**	0	0	**1**	0	0	**3**	**4**	**1,61**
Epicoccum	**3**	**2**	0	0	0	0	**1**	0	**1**	**7**	**1**	0	**1**	0	0	0	0	0	0	**2**	**9**	**3,61**
Exophiala	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	**1**	**1**	**0,40**
Fusarium	**4**	**4**	**8**	**3**	**4**	**4**	**3**	**3**	**1**	**34**	**1**	**2**	**2**	0	0	**1**	0	0	**2**	**8**	**42**	**16,9**
Mariannaea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	**1**	**1**	**0,40**
Microdochium	0	0	0	**1**	**1**	0	0	0	0	**2**	0	0	0	0	0	**1**	0	0	0	**1**	**3**	**1,20**
Myrmecridium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	**1**	**1**	**0,40**
Myrothecium	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	**1**	**0,40**
Nigrospora	0	0	0	0	**2**	0	0	**1**	0	**3**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	**3**	**1,20**
Paecilomyces	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	**1**	**1**	**0,40**
Paraphaeosphaeria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	**1**	**1**	**0,40**
Penicillium	**2**	**5**	**6**	**8**	**2**	**5**	**1**	**5**	**3**	**37**	**3**	**3**	**2**	**11**	**7**	**4**	**6**	**5**	**5**	**46**	**83**	**33,3**
Phoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	0	0	0	0	0	0	**1**	0	0	**1**	**1**	**0,40**
Phomopsis	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	**1**	**0,40**
Pyricularia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	**1**	**0,40**
Resinicium	0	0	0	0	0	0	**1**	**1**	0	**2**	0	0	0	0	0	0	0	**1**	0	**1**	**3**	**1,20**
Saccharicola	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	**1**	**0,40**
Sagenomella	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	**1**	0	0	0	0	0	0	0	0	**1**	**1**	**0,40**
Scolecobasidium	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	0	0	**1**	**1**	**1**	0	0	0	0	**3**	**3**	**1,20**
Thielavia	**2**	0	0	0	0	0	0	0	0	**2**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	**2**	**0,80**
Thozetella	0	0	0	0	**1**	0	0	**1**	0	**2**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	**0**	**2**	**0,80**
Trichoderma	0	**1**	0	0	**1**	0	**2**	**2**	0	**6**	0	**2**	0	0	0	0	**1**	**1**	**1**	**5**	**11**	**4,42**
Não identificado [2]	**1**	**1**	0	0	**1**	0	**2**	0	**2**	**7**	**2**	**1**	0	**2**	**1**	**3**	**4**	**3**	0	**16**	**23**	**9,24**

[1] Nos casos em que ambas as fases sexuais foram encontradas (sexual e assexual), elas foram agrupadas na listagem da tabela e o gênero indicado sempre foi aquele referente à fase assexual;

[2] ***Não identificado*** – agrupamento dos isolados fúngicos cuja classificação taxonômica em nível de gênero não foi possível por falta de similaridade com as sequências disponíveis no banco de dados do GenBank.

2.2.2.2.1 Rarefação, diversidade e riqueza das populações fúngicas

O cálculo da rarefação e dos índices de diversidade (Shannon-Wienner - *H'*) e riqueza (Chao1) das diferentes populações de fungos associadas à cana-de-açúcar foi realizado pelo programa DOTUR, que utilizou as sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 228 isolados (sequências de alta qualidade), agrupadas de acordo com a fonte de variação a ser avaliada (tratamentos ou idade da planta). Os cálculos foram realizados considerando-se quatro níveis de similaridade entres as sequências (100%, 99%, 97% e 95%), em busca de correlação com os níveis taxonômicos (linhagem, espécie e gênero).

As curvas de rarefação foram construídas com o objetivo de verificar se a amostragem populacional adotada no presente trabalho permitiu acessar a diversidade das populações estudadas. De maneira geral, a análise das curvas de rarefação para os diferentes grupos de sequências ("populações") revelou que a amostragem adotada foi suficiente para representar a diversidade das populações fúngicas pelo menos nos níveis de similaridade de 95% e 97%, que podem ser consideradas representativas do nível taxonômico de gêneros (Figura 2.4). Isso porque essas curvas começaram a estabilizar, aproximando-se da assíntota horizontal, indicando que a amostragem adotada está próxima da amostragem adequada. Entretanto, apenas para as populações de fungos de plantas com 10 meses (Figura 2.4b) e fungos isolados de plantas do tratamento TC (Figura 2.4e) a estabilização das curvas de rarefação também pôde ser observada para 99% de similaridade. Com isso, as comparações de diversidade e riqueza entre as populações serão feitas baseadas apenas nas similaridades de 95% e 97%, visando evitar conclusões equivocadas, já que a amostragem adotada foi insuficiente para acessar a diversidade nas similaridades mais altas.

Os valores dos índices de diversidade (Shannon-Wienner) e de riqueza (Chao1) para as diferentes populações de fungos associados à cana-de-açúcar estão listados na Tabela 2.4, de acordo com a similaridade adotada para os cálculos. Os resultados mostraram que o estágio de crescimento das plantas influencia a diversidade e a riqueza da comunidade de fungos associadas à cana-de-açúcar, visto que foi observado que plantas de cana-de-açúcar aos 17 meses apresentaram os maiores índices de diversidade e riqueza, seguidas por plantas com 3 meses e, por último, plantas com 10 meses. A diferença entre os índices foi significativa tanto a 95% quanto para 97% de similaridade entre sequências, mas apenas para a comparação entre plantas

com 17 e 10 meses (Tabela 2.4). Diferentemente, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos (C, TC e TH) quanto aos índices de diversidade e riqueza das populações, embora pareça que existe uma tendência de plantas transgênicas conduzidas com capina (TC) apresentarem um menor índice de diversidade e riqueza.

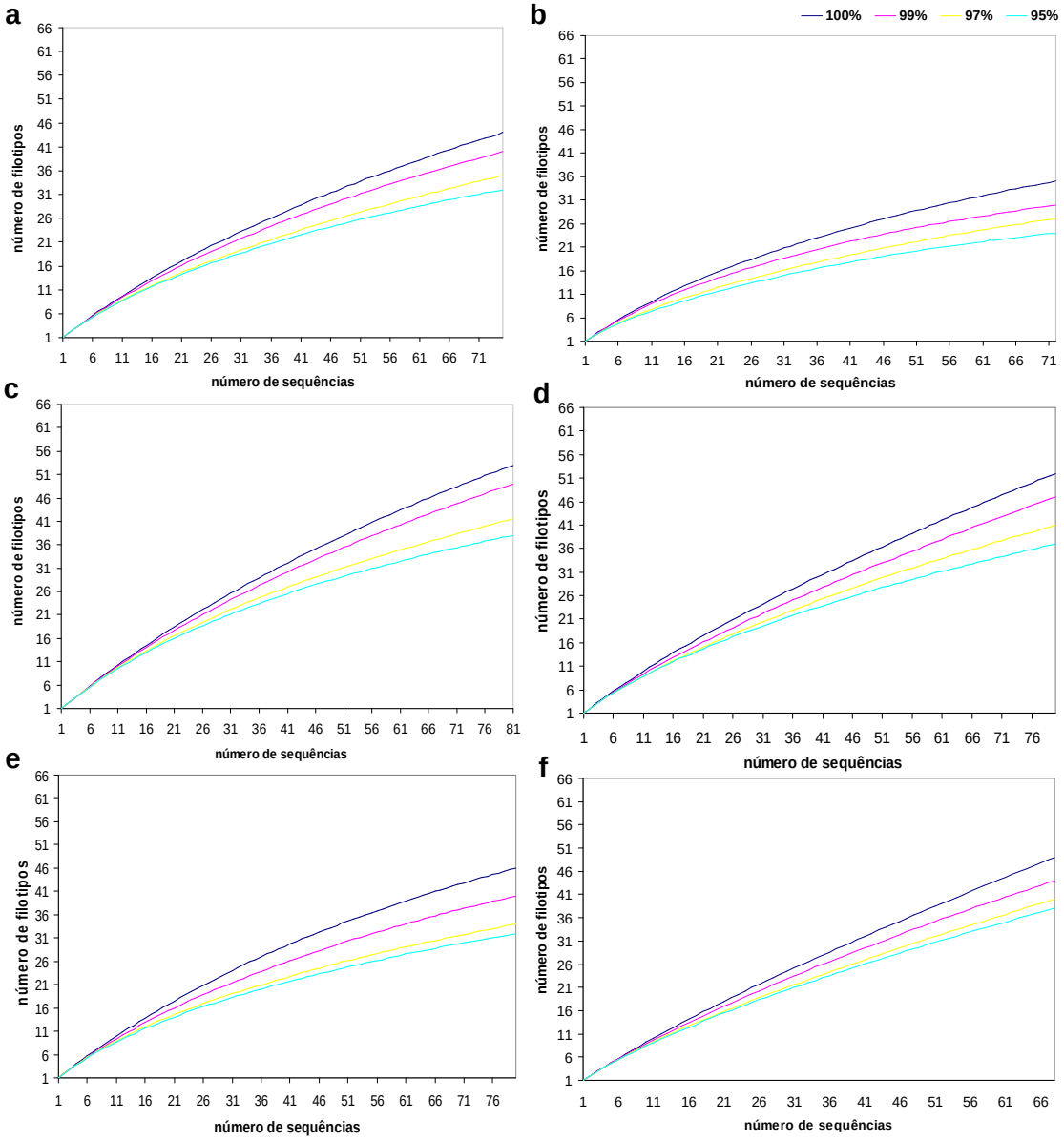


Figura 2.4 - Análise de rarefação mostrando o número esperado de filotipos componentes das diferentes populações fúngicas, para os níveis de 100%, 99%, 97% e 95% de similaridade entre as sequências. População de fungos isolados de plantas em diferentes estágios de crescimento: (**a**) 3 meses, (**b**) 10 meses e (**c**) 17 meses e de diferentes tratamentos: (**d**) C - plantas convencionais conduzidas com capina, (**e**) TC – plantas transgênicas conduzidas com capina e (**f**) TH – plantas transgênicas conduzidas com herbicida. As análises são baseadas em sequências parciais da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA dos isolados fúngicos

Tabela 2.4 - Índices de diversidade (Shannon-Wiener) e riqueza (Chao1) obtidos a partir da análise das sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA dos grupos de isolados fúngicos correspondentes aos diferentes tratamentos

Índices	Grupo de sequências	Similaridade considerada			
		100%	99%	97%	95%
Diversidade [1] (Shannon-Wiener)	3 meses	3,53(±0,22)	3,38(±0,23)	3,17(±0,24)	3,10(±0,23)
	10 meses	3,30(±0,20)	3,11(±0,21)	2,75(±0,28)	2,61(±0,28)
	17 meses	3,82(±0,18)	3,69(±0,19)	3,48(±0,19)	3,39(±0,19)
	C	3,69(±0,21)	3,45(±0,26)	3,28(±0,25)	3,18(±0,24)
	TC	3,64(±0,19)	3,40(±0,21)	3,16(±0,22)	3,09(±0,22)
	TH	3,67(±0,23)	3,51(±0,24)	3,34(±0,25)	3,28(±0,26)
Riqueza [1] (Chao1)	3 meses	84(60-148)	73(53-130)	68(46-130)	47(36-80)
	10 meses	52(41-86)	39(32-62)	37(30-63)	29(25-46)
	17 meses	105(75-176)	107(73-195)	97(56-147)	57(47-94)
	C	189(106-395)	180(97-399)	88(59-166)	69(48-126)
	TC	75(57-122)	68(50-118)	59(42-109)	49(37-86)
	TH	213(113-474)	125(75-248)	133(74-295)	101(61-211)

[1] Valores para intervalo com 95% de confidência são apresentados entre parênteses.
C – plantas convencionais conduzidas com capina; TC – plantas transgênicas conduzidas com capina e TH – plantas transgênicas conduzidas com herbicida.

2.2.2.2.2 Análise de variância molecular (AMOVA)

A partir da AMOVA foi possível determinar, com probabilidades estatísticas definidas, o quanto da variação genética da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar é devida à variedade de cana (efeito do genótipo), ao manejo cultural (efeito do manejo), à época de coleta (efeito do estágio de crescimento) e à comunidade fúngica em questão (se fungos da rizosfera ou endófitos de raiz - efeito da comunidade). Os resultados das análises estão listados na Tabela 2.5. A interpretação dos dados mostrou que o genótipo da planta, o manejo cultural e a comunidade fúngica não impuseram efeitos significativos (P>0,05) na variação genética entre as populações de fungos associadas à plantas de cana-de-açúcar (Tabela 2.5). Entretanto, foi observado que o estágio de crescimento da planta foi responsável por diferenças significativas nas variações genéticas, contribuindo com 3,3% da variação total (P=0,0035) (Tabela 2.5). Esta variação está ligada principalmente à comunidade de fungos endofíticos de raiz (3,21%, P=0,0079), uma vez que os outros grupos não apresentaram variações significativas (P>0,05) (Tabela 2.5). Esses dados indicam que a idade da planta deve influenciar de forma determinante a dinâmica da comunidade fúngica endofítica de raiz, mas não dos fungos da rizosfera.

Tabela 2.5 – Análise de variância molecular (AMOVA) para as diferentes populações de fungos do presente trabalho, de acordo com o efeito avaliado

Efeito	Grupo fúngico	% variação [1]	valor de *P* [2]
Genótipo da planta (C *vs.* TC)	Amostra total	-0,61	0,7019 *n.s.*
	Plantas com 3 meses	0,00	0,6673 *n.s.*
	Plantas com 10 meses	-4,76	1,0000 *n.s.*
	Plantas com 17 meses	-0,71	1,0000 *n.s.*
	Endófitos de raiz	-1,16	0,7972 *n.s.*
	Fungos da rizosfera	-1,68	0,6976 *n.s.*
Manejo cultural (TC *vs.* TH)	Amostra total	2,88	0,3041 *n.s.*
	Plantas com 3 meses	8,65	0,3394 *n.s.*
	Plantas com 10 meses	6,78	0,3301 *n.s.*
	Plantas com 17 meses	1,08	0,6706 *n.s.*
	Endófitos de raiz	0,56	0,2052 *n.s.*
	Fungos da rizosfera	-2,85	1,0000 *n.s.*
Estágio de crescimento da planta (3 meses *vs.* 10 meses *vs.* 17 meses)	Amostra total	3,30	**0,0035**
	Plantas convencionais (C)	3,40	0,1323 *n.s.*
	Plantas transgênicas conduzidas com capina (TC)	7,80	0,1299 *n.s.*
	Plantas transgênicas conduzidas com herbicida (TH)	-0,05	0,5971 *n.s.*
	Endófitos de raiz	3,21	**0,0079**
	Fungos da rizosfera	2,71	0,0731 *n.s.*
Comunidade fúngica (endófitos de raiz *vs.* fungos da rizosfera)	Amostra total	1,76	0,0971 *n.s.*
	Plantas convencionais (C)	-0,04	0,3971 *n.s.*
	Plantas transgênicas conduzidas com capina (TC)	0,60	0,3023 *n.s.*
	Plantas transgênicas conduzidas com herbicida (TH)	0,68	0,2988 *n.s.*
	Plantas com 3 meses	1,24	0,2033 *n.s.*
	Plantas com 10 meses	2,46	0,2943 *n.s.*
	Plantas com 17 meses	1,36	0,2002 *n.s.*

[1] Porcentagem de variação entre os grupos analisados;
[2] *P* – probabilidade de existência de um componente de variação maior que o observado para o valor do índice de fixação;
n.s. – valores não significativos ao nível de 5% de probabilidade.

2.2.3 Discussão

O plantio de plantas geneticamente modificadas ainda é um assunto bastante controverso em função do efeito indireto que elas podem apresentar sobre a composição e funcionalidade do ecossistema (DUNFIELD; GERMIDA, 2004). Nesse cenário, uma preocupação que vem ganhando considerável importância é o possível efeito dos compostos antimicrobianos não apenas em organismos patogênicos, mas também em organismos não alvo, como micorrizas, rizóbios e outros envolvidos na proteção da planta, decomposição, solubilização de fosfato, promoção de crescimento etc. Considerando, então, as contribuições dos microrganismos para as plantas, e também que qualquer efeito que as PGMs induzam sobre essas comunidades pode ter como consequências tanto efeitos negativos como positivos no crescimento e saúde da planta, a

finalidade do presente estudo foi determinar possíveis efeitos do cultivo de cana-de-açúcar geneticamente modificada sobre a comunidade de fungos da rizosfera e endofíticos de raiz, levando em consideração as influências de outros fatores, como o trato cultural (herbicida ou capina) e o estágio de crescimento das plantas (3, 10 ou 17 meses).

As plantas de cana-de-açúcar transgênicas para a resistência ao herbicida imazapir (IMI-1) avaliadas no presente trabalho carregam uma construção plasmidial que possui um variante do gene *AHAS* de trigo e um promotor da ubiquinona da cana-de-açúcar. A presença do plasmídio com o gene de resistência de trigo permite que plantas de cana-de-açúcar sobrevivam na presença do herbicida imazapir. É sabido que o herbicida imazapir inibe a enzima *AHAS*, responsável pela síntese dos aminoácidos essenciais isoleucina, leucina e valina. Essa enzima encontra-se presente em bactérias, fungos e plantas, apresentando sequências de aminoácidos muito similares, fato que sugere a presença de um ancestral comum para ela nos três grupos de organismos (PANG; DUGGLEBY, 1999). A alta similaridade entre as enzimas destes grupos pode permitir a ação do herbicida sobre outros organismos que não somente as plantas daninhas, daí a importância de considerar não só os efeitos da transgenia, mas também do manejo cultural sobre os fungos associados à cana-de-açúcar. Embora alguns trabalhos tenham relatado efeitos de herbicidas derivados de imidazolinonas sobre microrganismos (PERUCCI et al., 2000; SEABY; SCHAIBLE, 2000; STUART, 2006; STUART et al., 2010; WYSS et al., 2004) e outros tenham descrito alterações nas comunidades fúngicas advindas do cultivo de plantas transgênicas (CASTALDINI et al., 2005; GÖTZ et al., 2006; TATLI; GULLU; OZDEMIR, 2004; STUART, 2006; STUART et al., 2010; TURRINI et al., 2004; WEI et al., 2006), os resultados obtidos no presente trabalho (dados de frequência/densidade fúngica, diversidade, riqueza e AMOVA) revelaram que nem o genótipo (plantas convencionais e plantas transgênicas) nem o trato cultural (capina e herbicida) induziram alterações significativas na comunidade fúngica associada às plantas de cana-de-açúcar. Curiosamente, entretanto, Stuart et al. (2010), utilizando o mesmo experimento deste trabalho porém considerando apenas os dois primeiros estágios de desenvolvimento da planta (3 e 10 meses), observou efeitos da aplicação do herbicida imazapir e da utilização da variedade transgênica IMI-1 de cana-de-açúcar sobre a comunidade de fungos endofíticos de folhas. Esses autores relataram que o manejo com herbicida levou a alterações rápidas e transientes na comunidade fúngica avaliada, enquanto que o cultivo da variedade transgênica promoveu mudanças lentas e mais persistentes (STUART et al., 2010). Essa

diferença entre os resultados obtidos neste trabalho e no de Stuart et al. (2010) pode estar ligada ao fato de que as comunidades fúngicas avaliadas foram isoladas de diferentes partes da planta, isto é, de folha no caso do trabalho de Stuart et al. (2010) e de raízes e rizosfera neste trabalho, sugerindo que os efeitos do trato cultural e do genótipo da planta devem ser dependentes do tipo de comunidade fúngica avaliada.

A ausência de efeitos significativos do herbicida e/ou de plantas transgênicas em comunidades fúngicas, observada neste estudo, é corroborada por outros trabalhos, os quais também descrevem este tipo de resultado (GIRLANDA et al., 2008; MILLING et al., 2004; O'CALLAGHAN et al., 2004; STEFANI; BÉRUBÉ, 2006; WATRUD et al., 2006). Por exemplo, num estudo semelhante ao do presente trabalho, os efeitos de plantas de milho transgênicas resistentes ao herbicida glifosato e da aplicação desse herbicida foram avaliados sobre bactérias denitrificantes e fungos da rizosfera, e os resultados mostraram que nenhum dos fatores avaliados (genótipo e herbicida) afetaram essas comunidades microbianas (HART et al., 2009). Inclusive, os efeitos da modificação genética são tão pequenos quando comparados aos de outros fatores, que até mesmo diferenças entre variedades podem ser maiores que aqueles observado entre plantas convencional e geneticamente modificadas (PASONEN et al., 2009; POWELL et al., 2007; WEINERT et al., 2009). O motivo pelo qual muitos trabalhos não detectam efeitos do cultivo de PGMs sobre comunidades microbianas pode estar ligado ao fato de que apenas uma pequena porção dessas comunidades deve ser alterada e, frequentemente, outros fatores como estágio de crescimento e manejo agrícola exercem influências mais significativas sobre toda a comunidade, o que dificulta a percepção de pequenas alterações advindas do efeito da transgenia.

Diferentemente do que aconteceu com a comunidade fúngica sob efeito do genótipo e do manejo cultural, quando foi considerado o efeito do estágio de crescimento das plantas (3, 10 e 17 meses) foi possível verificar alterações significativas, tanto na frequência de fungos isolados do interior das raízes (endofíticos), como nos índices de diversidade e riqueza das populações de fungos endofíticos. Adicionalmente, a AMOVA mostrou claramente que somente o estágio de crescimento das plantas foi determinador de variações genéticas significativas entre as populações fúngicas, especificamente para os fungos endofíticos de raiz. Este efeito do estágio de crescimento das plantas de cana-de-açúcar sobre a comunidade de fungos endofíticos também foi observada no trabalho de Stuart et al. (2010), que avaliou a comunidade de fungos endofíticos de

folhas de plantas de cana-de-açúcar aos 3 e 10 meses, a partir do mesmo experimento utilizado neste trabalho. De fato, o estágio de crescimento das plantas já foi relatado como fator determinante da estrutura de comunidades microbianas em vários estudos, até mesmo superando qualquer efeito advindo de plantas transgênicas (RASCHE et al., 2006b; SESSITSCH et al., 2004; TAN et al., 2009; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2008). O estudo de Mendes (2008), que também foi realizado a partir do experimento utilizado no presente trabalho, avaliou os efeitos do genótipo, manejo cultural e idade da planta sobre comunidades fúngicas da rizosfera com o uso da PCR-DGGE, com o objetivo de acessar os efeitos também sobre fungos não cultiváveis. O dendrograma gerado mostrou que o principal fator que contribuiu para o agrupamento dos perfis foi a idade das plantas, sendo que os tratamentos avaliados não afetaram o perfil de bandas dessas populações, sugerindo que nem o genótipo nem o trato cultural induziram efeitos nos fungos da rizosfera (MENDES, 2008). Entretanto, no presente trabalho o efeito do estágio de crescimento não foi observado na comunidade de fungos da rizosfera para nenhum dos parâmetros avaliados (densidade fúngica, diversidade, riqueza e variância molecular), possivelmente porque os efeitos podem estar ocorrendo especificamente sobre algum(s) fungo(s) não cultivável(s). De maneira geral, fica claro que o efeito da idade da planta sobre comunidades fúngicas é mais evidente do que os outros fatores, contudo, ele parece ser bastante complexo, pois pode depender também de outras fontes de variação, como a sazonalidade, a espécie vegetal estudada e o tipo de comunidade considerada.

De maneira geral, os resultados do presente estudo indicam que a cana-de-açúcar geneticamente modificada expressando gene de resistência ao herbicida imazapir e a condução da cultura com aplicação de herbicida não induziram alterações significativas na diversidade e estrutura das comunidades de fungos da rizosfera e endofíticos de raiz. O único fator de variação avaliado que determinou as características da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar foi o estágio de crescimento das plantas, sendo que, esse efeito só foi significativo para a comunidade endofítica de raiz, e não para os fungos da rizosfera, indicando que a idade da planta deve ser um fator determinante da dinâmica da comunidade de fungos endofíticos de cana-de-açúcar. Entretanto, vale lembrar que parte das variações observadas podem ter ocorrido a partir de fatores não considerados no estudo, já que comunidades microbianas associadas às plantas podem sofrer efeitos de inúmeras fontes de variação, bióticas ou abióticas. Com isso, fica claro que os efeitos da modificação genética, se existentes, na maioria das vezes são menores que

aqueles causados por fontes naturais de variação, e que dificilmente são passíveis de serem detectados.

Referências

ANDERSON, I. C.; CAMPBELL, C. D.; PROSSER, J. I. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. **Environmental Microbiology**, New York, v. 5, p. 36-47, 2003.

ANDOW, D. A.; ZWAHLEN, C. Assessing environmental risks of transgenic plants. **Ecology Letters**, Oxford, v. 9, p. 196-214, 2006.

ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; LACAVA, P. T. **Manual:** isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: CALQ, 2002. 86 p.

ARNOLD, E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 21, p. 51-66, 2007.

ATKINSON, D.; WATSON, C. A. The beneficial rhizosphere: a dynamic entity. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 99-104, 2000.

ATLAS, R. M.; HOROWITZ, A.; KRICHEVSKY, M.; BEJ, A. K. Response of microbial populations to environmental disturbance. **Microbial Ecology**, New York, v. 22, p. 249-256, 1991.

BARBIERI, R.; CARVALHO, I. F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, p. 79-83, 2001.

CASTALDINI, M.; TURRINI, A.; SBRANA, C.; BENEDETTI, A.; MARCHIONNI, M.; MOCALI, S.; FABIANI, A.; LANDI, S.; SANTOMASSIMO, F.; PIETRANGELI, B.; NUTI, M. P.; MICLAUS, N.; GIOVANNETTI, M. Impact of *Bt* corn on rhizospheric and on beneficial mycorrhizal symbiosis and soil eubacterial communities iosis in experimental microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 6719-6729, 2005.

DEVARE, M. H.; JONES, C. M.; THIES, J. E. Effect of Cry3Bb transgenic corn and tefluthrin on the soil microbial community: Biomass, activity and diversity. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, p. 837-843, 2004.

DUINEVELD, M. D.; ROSADO, A. S.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VEEN, J. A. Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 4950-4957, 1998.

DUNFIELD, K. E.; GERMIDA, J. J. Diversity of bacterial communities in the rhizosphere and root interior of field-grown genetically modified *Brassica napus*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 38, p. 1-9, 2001.

DUNFIELD, K. E.; GERMIDA, J. J. Seasonal changes in the rizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7310-7318, 2003.

DUNFIELD, K. E.; GERMIDA, J. J. Impact of genetically modified crops on soil- and plant-associated microbial communities. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, p. 806-815, 2004.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, Auckland, v. 1, p. 47-50, 2005.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Microbial Diversity in Soil: selection microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 243-270, 2004.

GIRLANDA, M.; BIANCIOTTO, V.; CAPPELLAZZO, G. A.; CASIERI, L.; BERGERO, R.; MARTINO, E.; LUPPI, A. M.; PEROTTO, S. Interactions between engineered tomato plants expressing antifungal enzymes and nontarget fungi in the rhizosphere and phyllosphere. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 288, p. 9-18, 2008.

GÖTZ, M.; NIRENBERG, H.; KRAUSE, S.; DRAEGER, H. S.; BUCHNER, A.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 58, p. 404-413, 2006.

GRAYSTON, S. J.; WANG, S.; CAMPBELL, C. D.; EDWARDS, A. C. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 369-378, 1998.

GYAMFI, S.; PFEIFER, U.; STIERSCHNEIDER, M.; SESSITSCH, A. Effects of transgenic glufosinate-tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 41, p. 181-190, 2002.

HART, M. M.; POWELL, J. R.; GULDEN, R. H.; DUNFIELD, K. E.; PAULS, K. P.; SWANTON, C. J.; KLIRONOMOS, J. N.; ANTUNES, P. M.; KOCH, A. M.; TREVORS, J. T. Separating the effect of crop from herbicide on soil microbial communities in glyphosate-resistant corn. **Pedobiologia**, Jena, v. 52, p. 253-262, 2009.

HEUER, H.; KROPPENSTEDT, R. M.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere relative to communities are negligible natural factors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1325-1335, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores de produtividade nacional. Disponível em: <http://www.ibge.com.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200910_5.shtm>. Acesso em: 26 nov. 2009.

LAMARCHE, J.; HAMELIN, R. C. No evidence of an impact on the rhizosphere diazotroph community by the expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin by *Bt* white spruce. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 6577-6583, 2007.

LIU, W.; LU, H. H.; WU, W.; WEI, Q. K.; CHEN, Y. X.; THIES, J. E. Transgenic *Bt* rice does not affect enzyme activities and microbial composition in the rhizosphere during crop development. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 475-486, 2008.

MARSCHNER, P.; SOLAIMAN, Z.; RENGEL, Z. Rhizosphere properties of Poaceae genotypes under P-limiting conditions. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 283, p. 11-24, 2006.

MARSCHNER, P.; YANG, C. H.; LIEBEREI, R.; CROWLEY, D. E. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1437-1445, 2001.

MENDES, R. **Diversidade e caracterização genética de comunidades microbianas endofíticas associadas à cana-de-açúcar**. 2008. 119p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MILLING, A.; SMALLA, K.; MAIDL, F. X.; SCHLOTER, M.; MUNCH, J. C. Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, p. 23-39, 2004.

MOTAVALLI, P. P.; KREMER, R. J.; FANG, M.; MEANS, N. E. Impact of genetically modified crops and their management on soil microbially mediated plant nutrient transformations. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33**,** p. 816-824, 2004.

O'CALLAGHAN, M.; GERARD, E. M.; WAIPARA, N. W.; YOUNG, S. D.; GLARE, T. R.; BARRELL, P. J.; CONNER, A. J. Microbial communities of *Solanum tuberosum* and magainin-producing transgenic lines. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, p. 47-56, 2004.

PANG, S. S.; DUGGLEBY, R. G. Expression, purification, characterization, and reconstitution of the large and small subunits of yeast acetohydroxyacid synthase. **Biochemistry**, Washington, v. 38, p. 5222-5231, 1999.

PASONEN, H.-L.; LU, J.; NISKANEN, A.-M.; SEPPÄNEN, S.-K.; RYTKÖNEN, A.; RAUNIO, J.; PAPPINEN, A.; KASANEN, R.; TIMONEN, S. Effects of sugar beet chitinase IV on root-associated fungal community of transgenic silver birch in a field trial. **Planta**, Berlin, v. 230, p. 973-983, 2009.

PERUCCI, P.; DUMONTET, S.; BUFO, S. A.; MAZZATURA, A.; CASUCCI, C. Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 32, p. 17-23, 2000.

POWELL, J. R.; GULDEN, R. H.; HART, M. M.; CAMPBELL, R. G.; LEVY-BOOTH, D. J.; DUNFIELD, K. E.; PAULS, K. P.; SWANTON, C. J.; TREVORS, J. T.; KLIRONOMOS, J. N. Mycorrhizal and rhizobial colonization of genetically modified and conventional soybeans. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 4365-4367, 2007.

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

RASCHE, F.; HODL, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, M. H.; VAN ELSAS, J. D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, p. 219-235, 2006a.

RASCHE, F.; VELVIS, H.; ZACHOW, C.; BERG, G.; VAN ELSAS, J. D.; SESSITSCH, A. Impact of transgenic potatoes expressing anti-bacterial agents on bacterial endophytes is comparable with the effects of plant genotype, soil type and pathogen infection. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 43, p. 555-566, 2006b.

ROMÃO, A. S.; PROCÓPIO, R. E. L.; MARCON, J.; YARA, R.; AZEVEDO, J. L. Isolamento de Fungos Endofíticos de *Eucalyptus* spp. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 8, 2000, Piracicaba. **Resumos...** SIICUSP, 2000.

ROSSETTO, P. B. **Interação entre cana-de-açúcar e bactérias associadas**. 2008. 148p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal Eendophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 29, p. 319-343, 1998.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

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

SEABY, D. A.; SCHAIBLE, R. C. Preventing *Heterobasidion annosum* from colonizing chemically thinned Sitka spruce steams. **Forestry**, London, v. 73, p. 351-359, 2000.

SESSITSCH, A.; GYAMFI, S.; TSCERKO, D.; GERZABEK, M. H.; KANDELER, E. Activity of microorganisms in the rhizosphere of herbicide treated and untreated transgenic glufosinate-tolerant and wildtype oilseed rape grown in containment. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, p. 105-116, 2004.

SHEN, R. F.; CAI, H.; GONG, W. H. Transgenic *Bt* has no apparent effect on enzymatic activities or functional diversity of microbial communities in rhizosphere soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 285, p. 149-159, 2006.

SMALLA, K.; WIELAND, G.; BUCHNER, A.; ZOCK, A.; PARZY, J.; KAISER, S.; ROSKOT, N.; HEUER, H.; BERG, G. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4742-4751, 2001.

SORENSEN, J. The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms. In: VAN ELSAS, J. D.; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. (Ed.). **Modern soil microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1997, p. 21-45.

STEFANI, F. O. P.; BÉRUBÉ, J. A. Evaluation of foliar fungal endophyte incidence in field-grown transgenic *Bt* white spruce trees **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 84, p. 1573-1580, 2006.

STUART, R. M. **Comunidade de fungos endofíticos associada à cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada**. 2006. 66p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

STUART, R. M.; ROMÃO, A. S.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Culturable endophytic filamentous fungi from leaves of transgenic imidazolinone-tolerant sugarcane and its non-transgenic isolines. **Archives of Microbiology**, Berlin, 2010. In press.

SYLVIA, D. M.; CHELLEMI, D. O. Interactions among rootinhabiting fungi and their implications for biological control of root pathogens. **Advances in Agronomy**, New York, v. 73, p. 1-33, 2001.

TAN, F.; WANG, J.; FENG, Y.; CHI, G.; KONG, H.; QIU, H.; WEI, S. Bt corn plants and their straw have no apparent impact on soil microbial communities. **Plant and Soil**, Dordrecht, DOI 10.1007/s11104-009-0163-2, 2009.

TATLI, F.; GULLU, M.; OZDEMIR, F. Determination of fungi species, relationships between ear infection rates and fumonisin quantities in Bt maize. **Bulletin OILB**, London, v. 27, p. 161-164, 2004.

TURCO, R. P.; KENNEDY, A. C.; JAWSON, M. D. Microbial indicators of soil quality. In: DORAN, J. W.; COLEMAN, D. C.; BEZDICEK, D. F.; STEWART, B. A. (Ed.). **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison: American Society of Agronomy Special Publication, 1994. p. 73-90.

TURRINI, A.; SBRANA, C.; NUTI, M.; PIETRANGELI, B.; GIOVANNETTI, M. Development of a model system to assess the impact of genetically modified corn and aubergine plants on arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, p. 69-75, 2004.

VAN OVERBEEK, L.; VAN ELSAS, J. D. Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 64, p. 283-296, 2008.

WATRUD, L. S.; MISRA, S.; GEDAMU, L.; SHIROYAMA, T.; MAGGARD, S.; DI GIOVANNI, G. Ecological risk assessment of alfalfa (*Medicago varia* L.) genetically engineered to express a human metallothionein (hMT) gene. **Water Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 176, p. 329-349, 2006.

WEI, X. D.; ZOU, H. L.; CHU, L. M.; LIAO, B.; YE, C. M.; LAN, C. Y. Field released transgenic papaya effect on soil microbial communities and enzyme activities. **Journal of Environmental Sciences-China**, Pequim, v. 18, p. 734-740, 2006.

WEINERT, N.; MEINCKE, R.; GOTTWALD, C.; HEUER, H.; GOMES, N. C. M.; SCHLOTER, M.; BERG, G.; SMALLA, K. Rhizosphere communities of genetically modified zeaxanthin-accumulating potato plants and their parent cultivar differ less than those of different potato cultivars. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 3859-3865, 2009.

WHITE, T.; BURNS, 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.

WIDMER, F. Assessing effects of transgenic crops on soil microbial communities. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Berlin, v. 107, p. 207-234, 2007.

WU, W. X.; YE, Q. F.; MIN, H. Effect of straws from *Bt*-transgenic rice on selected biological activities in water-flooded soil. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 40, p. 15-22, 2004.

WYSS, G. S.; CHARUDATTAN, R.; ROSSKOPF, E. N.; C., L. R. Effects of selected pesticides and adjuvants on germination and vegetative growth of *Phomopsis amaranthicola*, a biocontrol agent for *Amaranthus* spp. **Weed Research**, Oxford, v. 44, p. 469-482, 2004.

3 DIVERSIDADE DE FUNGOS ASSOCIADOS À CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo

Fungos associados às plantas desempenham diversas funções biológicas e constituem potenciais reservatórios de compostos químicos com novas propriedades, bem como atividades biológicas e processos biotecnológicos pouco explorados. A diversidade estimada para esses microrganismos é imensa, porém menos de 7 % das espécies é conhecida. Assim, o presente trabalho teve como objetivo acessar a diversidade da comunidade de fungos associados à cana-de-açúcar presente em dois locais diferentes, interior das raízes (endófitos) e rizosfera, e avaliar a possível presença de correlação entre a composição da comunidade fúngica e os locais de isolamento avaliados. Para tal, 249 isolados fúngicos foram identificados a partir do sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, comparação das suas sequências de nucleotídeos com sequências conhecidas disponíveis no GenBank, via BLASTn, e confirmação pelo agrupamento em filogramas. Os índices de diversidade de Shannon-Wienner e de riqueza de Chao1 foram calculados, e a presença de especificidade ao local de isolamento foi verificada a partir do cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard e da análise de componentes principais (PCA). Os resultados mostraram que os 249 fungos avaliados foram representados por pelo menos 35 gêneros diferentes, além de alguns que não puderam ser identificados nesse nível taxonômico. O filo Ascomicota predominou entre os fungos identificados (96,0%), sendo que os filos Zigomicota/Mucoromicotina e Basidiomicota representaram apenas 2,4% e 1,6% da população avaliada, respectivamente. Os gêneros mais frequentes representaram 65,4% da comunidade, e incluíram *Penicillium* (33,3%), *Fusarium* (16,9%), *Aspergillus* (7,2%), *Trichoderma* (4,4%) e *Epicoccum* (3,6%), enquanto que outros gêneros foram observados em frequências baixas (<2,8%), sendo 16 deles representados por apenas um isolado. Esses dados evidenciam a principal característica da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar, em que um grande número de fungos está presente e pode ser isolado, mas que ela é composta por poucos gêneros com muitos representantes (alta frequência) e muitos gêneros com poucos representantes (baixa frequência). As curvas de rarefação mostraram que a amostragem populacional adotada no presente trabalho permitiu acessar a diversidade da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar considerando-se os níveis de similaridade de 95% e 97% entre as sequências de nucleotídeos, sendo que os índices de diversidade e riqueza obtidos para esses níveis de similaridade foram altos ($H'_{(95\%)}$=3,53; $H'_{(97\%)}$=3,64; $Chao1_{(95\%)}$=98; $Chao1_{(97\%)}$=134), indicando que a comunidade de fungos associados às raízes de cana-de-açúcar (endófitos e micobiota da rizosfera) abriga grande diversidade e riqueza de fungos. Além disso, as micobiotas endofítica e da rizosfera apresentaram diferenças na diversidade, composição e frequência de ocorrência de gêneros fúngicos, indicando a existência de especificidade ao local de isolamento (raiz ou rizosfera). Esse é o primeiro trabalho envolvendo a identificação molecular de um grande número de isolados e descrição da diversidade de fungos na cultura da cana-de-açúcar. Além disso, os resultados revelaram que cana-de-açúcar é reservatório de uma grande diversidade fúngica, a qual deve ser extensivamente investigada em busca da compreensão do papel dessas espécies fúngicas durante a interação com a planta e da exploração do potencial biotecnológico como produtores de enzimas e metabólitos secundários.

Palavras-chave: Diversidade; Fungos; Endófitos; Rizosfera; Cana-de-açúcar; Identificação molecular

3 DIVERSITY OF FUNGI ASSOCIATED TO SUGAR CANE

Abstract

Plant-associated fungi perform several biological functions and are considered a vast source of novel chemical compounds, biological activities and underexplored biotechnological processes. The estimated diversity for these microorganisms is massive, but less than 7% of the species are already known. The current work aimed to assess the diversity of sugarcane fungal community isolated from two different places, the inner tissue of plant roots (endophytes) and the rhizosphere, and further check if there is any correlation between the fungal community features and the place of isolation considered. For that, 249 fungal isolates were identified by ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequencing, using the BLASTn tool to compare their nucleotide sequence to known sequences deposited on GenBank and further confirming with phylogenetic clustering analysis. Then, the indexes of diversity (Shannon-Wienner) and richness (Chao1) were calculated, and place specificity was verified by estimating Jaccard similarity coefficient and performing principal components analysis (PCA). The results showed that the 249 fungal isolates evaluated were represented by at least 35 different genera, besides some non-identified at genus level. The Ascomicota phylum predominated among the identified fungi (96.0%), whereas the Zygomycota/Mucoromycotina and Basidiomycota Phyla represented only 2.4% and 1.6% of the population, respectively. The most frequent genera accounted for 65.4% of the whole community, and included *Penicillium* (33.3%), *Fusarium* (16.9%), *Aspergillus* (7.2%), *Trichoderma* (4.4%) and *Epicoccum* (3.6%), whereas the other genera were found in low frequencies (<2.8%), where 16 of them were represented by only one fungal isolate. These data clearly demonstrate the main feature of the sugarcane fungal community, the fact that a massive amount of fungi is present and can be isolated, but its composition comprises a few genera greatly represented (high frequency) and several genera poorly represented (low frequency). Rarefaction curves showed that samples used in the current work allowed the estimative of sugarcane fungal community diversity considering nucleotide sequence similarities of 95% and 97%, in which high values of the diversity and the richness indexes were obtained ($H'_{(95\%)}$=3.53; $H'_{(97\%)}$=3.64; $Chao1_{(95\%)}$=98; $Chao1_{(97\%)}$=134), indicating that the fungal community associated to sugarcane roots (endophytes and rhizosphere mycoflora) hosts a huge diversity and richness of fungi. In addition, the endophyte and rhizosphere mycoflora had differences related to diversity, composition and genera occurrence, suggesting that place of isolation (root or rhizosphere) specificity is present. To the best of our knowledge, the current work is the first one to perform the molecular identification of a vast number of fungal isolates and to assess sugarcane fungal diversity. Moreover, the results revealed sugarcane as a rich source of fungal diversity, which must be further investigated for unveiling the role of these species during the interaction with plants and also to explore the biotechnological potential as enzymes and secondary metabolites producers.

Keywords: Diversity; Fungi; Endophytes; Rhizosphere; Sugarcane; Molecular identification

3.1 Introdução

O número estimado de espécies fúngicas descritas até o momento é de aproximadamente 100.000, o que representa menos de 7% da diversidade total estimada (HAWKSWORTH, 2004). Cálculos iniciais a respeito do número total de espécies fúngicas consideraram a proporção de 5,7 espécies fúngicas para cada espécie vegetal, perfazendo cerca de 1,5 milhões de espécies fúngicas (HAWKSWORTH, 1991). Entretanto, considerando-se a alta diversidade associada às regiões tropicais e a presença de fungos endofíticos, alguns autores propuseram a proporção de 33 espécies fúngicas para cada espécie vegetal, totalizando cerca de 8,25 milhões de espécies fúngicas (ARNOLD et al., 2000; FRÖHLICH; HYDE, 1999). Um grande número dessas espécies fúngicas vive associada aos vegetais, seja na superfície, no interior dos tecidos ou na rizosfera, estabelecendo interações que podem variar do mutualismo ao parasitismo. Embora muitos fungos sejam conhecidos por causar doenças em plantas, a manifestação de doença é mais uma exceção do que uma regra, ou seja, grande parte das interações naturais entre fungos e plantas não leva ao desenvolvimento de sintomas de doença (AGRIOS, 1997). Aliás, acredita-se que todas as espécies de plantas que vivem em ecossistemas naturais estabelecem algum tipo de associação simbiótica com fungos (RODRIGUEZ et al., 2009).

Fungos que formam simbioses com plantas podem estar presentes na rizosfera, nas superfícies vegetais (epífitos) e no interior dos tecidos (endófitos). A rizosfera, solo influenciado pelas raízes das plantas e seus exsudados, abriga a associação simbiótica fungo-planta mais comum na natureza, as micorrizas, presentes em mais de 90% das plantas terrestres (SELOSSE; TACON, 1998). O termo micorriza é empregado para se referir às associações mutualísticas que ocorrem entre fungos de solo e raízes de plantas, onde a planta se beneficia do fornecimento de água e minerais coletados pelo fungo e, em contrapartida, o fungo recebe carbono derivado da fotossíntese realizada pela planta (SMITH; READ, 1997). Além dos fungos micorrízicos, a rizosfera também abriga outros fungos benéficos às plantas, os quais contribuem de diferentes maneiras, em geral sinergísticas, para a proteção, nutrição e desenvolvimento das mesmas. Entretanto, os benefícios desses fungos foram reconhecidos há muito menos tempo que os das micorrizas, e por isso muito menos se conhece sobre a interação desses fungos com as plantas. É sabido, por exemplo, que alguns fungos da rizosfera são capazes de degradar compostos tóxicos, como xenobióticos e moléculas aromáticas, constituindo importantes componentes do sistema

que permitem a sobrevivência das plantas em solos contaminados (HARVEY et al., 2002). Outros fungos, como *Fusarium oxysporum*, apresentam linhagens não patogênicas que possuem efeito supressivo nas linhagens patogênicas (FRAVEL; OLIVAIN; ALABOUVETTE, 2003). Aliás, uma grande variedade de fungos de solo é capaz de atuar como agente de controle biológico de fitopatógenos, sendo que fungos do gênero *Trichoderma* apresentam grande destaque nessa função (WHIPPS; LUMSDEN, 2001).

A presença de fungos no interior dos tecidos vegetais também pode ser benéfica à planta, sendo que associações simbióticas entre fungos endofíticos e plantas têm sido extensivamente descritas na literatura. Por definição, microrganismos endofíticos são todos aqueles cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar danos ao hospedeiro (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007), e que podem ou não desenvolver estruturas externas à planta, denominados Tipo II e Tipo I, respectivamente (MENDES; AZEVEDO, 2007). A grande diferença entre os fungos endofíticos do Tipo I e as micorrizas (Tipo II) é o fato de que os primeiros residem completamente dentro do tecido vegetal (como raízes, caules e folhas), enquanto que nas micorrizas os fungos micorrízicos colonizam o interior das raízes e crescem para a rizosfera. Fungos endofíticos do Tipo I têm sido isolados praticamente de todas as espécies de plantas estudadas (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007), onde eles podem estabelecer relações mutualísticas e com isso conferir diferentes benefícios para a performance das plantas, como a tolerância à herbivoria, às altas temperaturas, à salinidade, à patógenos e à seca, além do aumento no acúmulo de biomassa de raízes e parte aérea (ARNOLD et al., 2003; BACON; HILL, 1996; CLAY; HOLAH, 1999; MÁRQUEZ et al., 2007; REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001; REDMAN et al., 2002; SAHAY; VARMA, 1999; WALLER et al., 2005). A maioria dos trabalhos com fungos endofíticos do Tipo I foi realizado a partir de plantas de clima temperado, sendo que apenas recentemente os estudos têm focado em endófitos de plantas tropicais. Atualmente, esses endófitos têm ganhado grande destaque, já que eles constituem fontes promissoras de efeitos benéficos às plantas e de novos metabólitos ou processos biotecnológicos (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007).

A cultura da cana-de-açúcar vem ocupando um lugar de destaque na economia brasileira, com uma área plantada superior ao território de muitos países europeus. Atualmente, a cultura ocupa 8,1 milhões de hectares, apresentando um rendimento médio de 80,3 $t.ha^{-1}$ (IBGE, 2009), sendo a sua importância fundamentada na produção açucareira, responsável por grandes

movimentações financeiras relacionadas e exportação, e na produção de álcool combustível devido à grande procura por fontes de energia alternativa aos combustíveis derivados de petróleo. Apesar da relevância dessa cultura para o Brasil, até o momento muito pouco foi avaliado sobre a interação entre fungos benéficos e cana-de-açúcar, e pouco se conhece sobre as comunidades fúngicas associadas a essa cultura e o potencial desses microrganismos no controle biológico e promoção de crescimento da planta. Até o momento, apenas três trabalhos disponíveis na literatura relataram o estudo de fungos filamentosos endofíticos em cana-de-açúcar (STUART, 2006; STUART et al., 2010; VON MUHLEN; SILVA, 2005), e outros quatro fungos filamentosos da rizosfera (ABDEL-RAHIM; BAGHADADI; ABDALLA, 1983; EL-AMIN; SAADABI, 2007; EL AMIN; ABDALLA, 1980; MENDES, 2008). Por exemplo, a população de fungos endofíticos presentes em folhas de cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada (expressando gene de resistência ao herbicida imazapir) foi avaliada por meio de métodos dependente e independente de cultivo (STUART, 2006; STUART et al., 2010). Os resultados obtidos pelo método dependente de cultivo mostraram que a comunidade de endófitos possui grande diversidade e foi representada por 12 famílias do filo Ascomicota, que incluíram fungos dos gêneros *Ampelomyces, Aspergillus, Cladosporium, Cochliobolus, Epicoccum, Fusarium, Guignardia, Leptosphaeria, Paecilomyces, Pestalotiopsis* e *Xylaria* (STUART, 2006; STUART et al., 2010). A análise independente de cultivo, com base no gene 18S, identificou a presença de gêneros relacionados às famílias Ustilaginaceae e Filobasidiaceae, e as ordens Sporidiobolales e Tremellales, todos pertencentes ao filo Basidiomicota (STUART, 2006).

Atualmente, o uso de técnicas moleculares tem facilitado análises nas mais diversas áreas, incluindo a taxonômica. Um dos grupos de genes mais utilizados para estudos taxonômicos e de variabilidade genética em fungos é o que codifica o RNA ribossômico. A maior razão da popularidade do rDNA para análises filogenéticas é que este é um gene de múltiplas cópias, que não codifica proteínas, muito conservado e presente em todos os organismos, servindo como referência para estudos de divergência evolutiva, e que é considerado, muitas vezes, como um gene de locus simples (GUARRO; GENE; STCHIGEL, 1999). O rDNA apresenta-se como um grupo gênico composto pelos genes 18S, 5,8S e 25-28S. Entre estes genes encontram-se as regiões variáveis ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico (FUNGARO, 2000). Comparações das sequências de rDNA 16S e 18S (também chamadas de subunidades menores [SSU]) tem permitido acessar as relações filogenéticas entre a

maioria dos grupos de organismos (WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990). No presente trabalho, a classificação taxonômica e as relações filogenéticas dos fungos associados às plantas de cana-de-açúcar foram determinadas a partir da identificação molecular baseada na análise de sequências de nucleotídeos da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA dos isolados fúngicos, via BLASTn e construção de árvore filogenética. Com isso, foi possível determinar os índices de diversidade e riqueza, além de estimar o número de filotipos fúngicos da comunidade associada à cana-de-açúcar e avaliar a existência de correlações com o local de isolamento.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e métodos

3.2.1.1 Isolados fúngicos

Foram utilizados 249 fungos, sendo 122 fungos endofíticos de raiz e 127 fungos de rizosfera. O delineamento do experimento com cana-de-açúcar e os procedimentos de isolamento e purificação dos fungos já foram descritos anteriormente no item 2.2.1 do Capítulo 2 do presente trabalho.

3.2.1.2 Extração de DNA, PCR e sequenciamento

O DNA dos isolados fúngicos foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Raeder e Broda (1985) com algumas modificações. Os fungos foram crescidos em 50 mL de BD (caldo de 200 g de batata e 20 g de dextrose em 1 L de água, [pH 6,0]) por cerca de 5 dias a 28º C, a suspensão fúngica foi filtrada e o micélio foi triturado em nitrogênio líquido. Cerca de 200 mg do micélio triturado foi transferido para 1 mL de tampão de extração (1% de SDS, 25 mM de EDTA, 250 mM de NaCl e 200 mM de Tris-HCl, [pH 8,0]), incubado a 65º C por 20 min e centrifugado a 16000X *g* por 10 min a 4º C. O sobrenadante foi transferido para tubo novo contendo 1 vol de fenol, homogeneizado e centrifugado (16000X *g* por 5 min a 4º C). Após, o sobrenadante foi transferido para tubo novo contendo 1 vol de fenol:clorofórmio (1:1 vol/vol), homogeneizado e centrifugado (16000X *g* por 5 min a 4º C). Novamente, o sobrenadante foi

transferido para tubo novo contendo 1 vol de clorofórmio:álcool isoamílico (CIA) (24:1 vol/vol) homogeneizado e centrifugado (16000X *g* por 5 min a 4º C). O DNA foi precipitado pela transferência do sobrenadante para tubo novo contendo 0,6 vol de isopropanol, homogeneização, incubação por 5 min à temperatura ambiente e centrifugação a 16000X *g* por 10 min a 4º C. O precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% à 4º C, seco a 37º C e ressuspendido em 50 µL de água ultra-pura (Milli-Q) autoclavada. A integridade do DNA e a quantificação do mesmo foram realizadas por meio da eletroforese em gel de agarose 0,8% a 3 $V.cm^{-1}$ e comparação com marcador (DNA do fago λ, Invitrogen). A região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA foi amplificada pela técnica de PCR com o uso dos iniciadores ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), os quais anelam em posições específicas do 18S e 28S do rDNA (WHITE et al., 1990). A amplificação foi realizada em termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research) programado para realizar uma desnaturação inicial a 94º C por 5 min, seguido de 24 ciclos de 94º C por 30 s, 55º C por 30 s e 72º C por 30 s, após os ciclos, uma extensão final a 72º C por 7 min. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo Tampão 1X (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl, [pH 8,4]), 3,7 mM de $MgCl_2$, 1 mM de dNTPs, 0,05 $U.\mu L^{-1}$ de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 0,4 µM de cada iniciador e 5 ng de DNA. Outra região, de 1,5 Kb presente no 18S rDNA de fungos, foi amplificada utilizando os iniciadores EF3 (5’ TCCTCTAAATGACCAAGTTTG 3’) e EF4 (5’ GGAAGGG[G/A]TGTATTTATTAG 3’) (SMIT et al., 1999). As amplificações foram realizadas em volume final de 50 µL, contendo Tampão 1X (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl, [pH 8,4]), 3,7 mM de $MgCl_2$, 1 mM de dNTP, 2 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 0,1 µM de cada iniciador e aproximadamente 3 ng de DNA. Para a amplificação foi utilizado o termociclador Peltier Thermal Cycler 200 (MJ Research) programado para realizar uma desnaturação inicial a 94º C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 94º C por 1 min, 48º C por 1 min e 72º C por 2 min, e uma extensão final a 72º C por 10 min. Os produtos de amplificação foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,4% a 3 $V.cm^{-1}$, juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb (Invitrogen). Após a eletroforese o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1 $mg.mL^{-1}$) e fotodocumentado. Ao final, os fragmentos amplificados foram purificados com o kit *GFX PCR* (Amersham Pharmacia Biotech) e sequenciados (Laboratório de Virologia da UMC, Mogi das Cruzes, SP e no Centro de Estudos do Genoma Humano, USP).

3.2.1.3 Classificação taxonômica dos isolados fúngicos

A classificação taxonômica foi realizada com base na sequência de nucleotídeos do rDNA dos isolados fúngicos. Inicialmente, as sequências de nucleotídeos foram analisadas comparativamente via BLASTn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) contra a base de dados do GenBank, que utiliza o método heurístico para encontrar o melhor *score* de alinhamentos locais entre a sequência submetida e o banco de dados. Com isso, foram consideradas as classificações equivalentes às das sequências de linhagens bem caracterizadas que apresentaram os valores mais altos de similaridade com as sequências submetidas. Em seguida, a classificação taxonômica foi confirmada pelo agrupamento em filogramas com sequências de gêneros e espécies conhecidas disponíveis no GenBank. As árvores filogenéticas foram construídas com base na sequência de nucleotídeos da região ITS1-5,8S-ITS2 ou 18S do rDNA, obtidas no sequenciamento. Para o alinhamento, edição e construção da árvore foi utilizado o programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007). O agrupamento foi calculado de acordo com o método de *Neighbor-Joining* (NJ) para 1000 réplicas com base nas matrizes de distância genética calculadas pelo modelo de Jukes-Cantor. As sequências de nucleotídeos dos isolados fúngicos do presente trabalho foram depositadas no GenBank e estão disponíveis sob os números de acesso GQ495269 e GU973612-GU973859 (Tabela 3.1).

3.2.1.4 Análise de diversidade, riqueza e rarefação

A diversidade e a riqueza das comunidades fúngicas de endófitos de raiz, da rizosfera e total (endófitos + rizosfera) foram determinadas por meio do cálculo dos índices de Shannon-Wienner (*H'*) e Chao1, respectivamente. Estes índices foram calculados utilizando o programa computacional DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005), que também gerou os dados de rarefação, considerando diferentes níveis de similaridade entre as sequências de nucleotídeos da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA dos fungos avaliados. As matrizes de similaridade utilizadas no programa DOTUR foram geradas com o alinhamento das sequências de cada um dos grupos e posterior cálculo das matrizes aplicando as distâncias de Jukes-Cantor, no programa Phylip DNADist (http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/dnadist-simple.html). O programa DOTUR calculou desta maneira a ocorrência dos diferentes filotipos nos diferentes

grupos de sequências. Os níveis de similaridade considerados para determinar os níveis taxonômicos nas análises foram: 100% (linhagens), 99% (espécies) e 97%-95% (gêneros), embora seja de nosso conhecimento que esses níveis de similaridade podem variar consideravelmente para fungos, dependendo do caso em questão.

3.2.1.5 Coeficiente de similaridade

Para descrever as semelhanças taxonômicas entre as comunidades de fungos endofíticos de raiz e de fungos da rizosfera de cana-de-açúcar, foi realizado o cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard (J), considerando-se a composição de gêneros (e não em nível de espécie) de cada comunidade em questão. O coeficiente foi obtido a partir da fórmula $J = a/(a+b+c)$, onde: a representa o número de gêneros presente em ambas as comunidades; b representa o número de gêneros restritos à comunidade de fungos endofíticos de raiz, e c representa o número de gêneros restritos à comunidade de fungos da rizosfera. Esse coeficiente varia de 0 (nenhum gênero compartilhado) a 1 (todos os gêneros são compartilhados).

3.2.1.6 Análise dos componentes principais (PCA)

A técnica de PCA (*Principal Components Analysis*) foi empregada neste estudo com o intuito de verificar a existência de correlação entre gêneros observados e as comunidades fúngicas em questão (fungos endofíticos de raiz e fungos da rizosfera). A PCA permite identificar padrões num conjunto grande de dados e apresentá-los de tal forma que as diferenças e similaridades ficam mais evidentes. Para tal, essa técnica envolve procedimentos matemáticos que transformam um número de possíveis variáveis correlacionadas em um número reduzido de variáveis não correlacionadas, denominadas componentes principais. Com isso, é possível determinar o quanto da variação total das variáveis pode ser explicado por cada componente principal, além de definir quais variáveis melhor explicam os padrões obtidos. No presente estudo, a PCA foi realizada com auxílio do pacote estatístico *Canoco versão 4.5* (TER BRAAK; ŠMILAUER, 2002), utilizando como dados de entrada a frequência de cada gênero identificado em cada repetição das amostras de fungos endofíticos de raiz e de fungos da rizosfera.

3.2.2 Resultados

3.2.2.1 Filogenia e classificação taxonômica com ITS1-5,8S-ITS2 *vs.* 18S

A precisão da identificação taxonômica de isolados fúngicos utilizando diferentes regiões do rDNA (ITS1-5,8S-ITS2 ou fragmento do 18S) foi comparada por meio da construção de árvore filogenética com 27 sequências de fungos isolados de cana-de-açúcar e sequências similares disponíveis no banco de dados GenBank. A Figura 3.1 representa a árvore filogenética construída para o fragmento do 18S e a Figura 3.2 para a região ITS1-5,8S-ITS2. Os resultados mostraram, claramente, que a classificação obtida pelas árvores geradas com as regiões ITS1-5,8S-ITS2 ou 18S envolve diferentes níveis de precisão. Enquanto que a árvore gerada para sequências do 18S foi capaz de agrupar os isolados no máximo pela ordem a que pertencem, a árvore da região ITS1-5,8S-ITS2 foi capaz de agrupar os isolados até mesmo em nível de espécies. De maneira geral, o agrupamento gerado na árvore do 18S (Figura 3.1) separou os isolados em três grupos: um que compreende a família Trichomaceae, incluindo os isolados 146, 142, 202, 140, 104, 200, 254, 165, 162, 205, 127, 70, 208, 161, 296, 128, 178, 293, 196, 203, 17; um que abrange a ordem Hypocreales, incluindo os isolados 223, 95; e outro que reuniu fungos mitospóricos do filo Ascomicota e a ordem Sordariales, juntamente com os isolados 67, 246, 198 e 39. Note que a partir dos dados dessa árvore não foi possível determinar o genêro de nenhum isolado, e muito menos a espécie. Diferentemente, a árvore para a região ITS1-5,8S-ITS2 foi mais informativa. Nela, houve a separação dos isolados em pelo menos 8 grupos de alta similaridade (Figura 3.2). Seis isolados foram agrupados em nível de espécies (146, 140, 205, 208, 161 e 223), 19 isolados foram agrupados por gênero (39, 165, 200, 104, 203, 162, 196, 142, 127, 178, 254, 202, 17, 246, 70, 128, 296, 293 e 198) e apenas dois isolados não puderam ser identificados em nível de gênero (67 e 95).

3.2.2.2 Composição da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar

A identificação taxonômica dos 249 isolados fúngicos do presente trabalho foi realizada a partir da comparação das suas sequências de nucleotídeos da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA com sequências conhecidas disponíveis no banco de dados GenBank, via BLASTn, seguida da

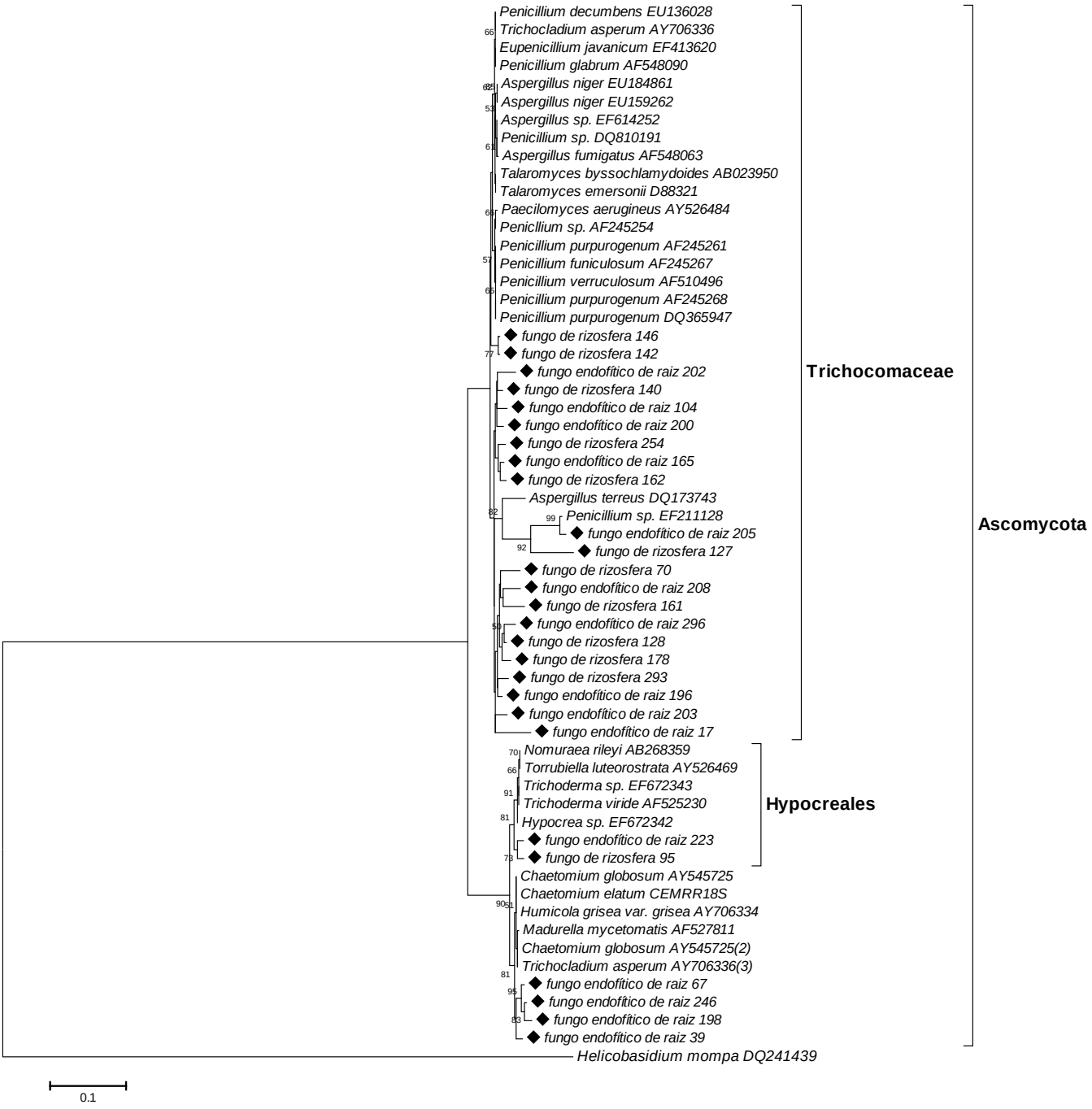


Figura 3.1 Filograma construído pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes e Cantor para as sequências parciais da região 18S do rDNA de 27 fungos isolados de raízes e rizosfera de cana-de-açúcar. Sequências de referência do GenBank foram utilizadas para comparação entre os isolados. As sequências obtidas no presente trabalho estão sinalizadas com o símbolo ♦. Como grupo externo foi utilizado o basidiomiceto *Helicobasidium mompa*. Valores de *bootstrap* (n=1000 replicatas) ≥ 50 estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0,1 substituições por posição

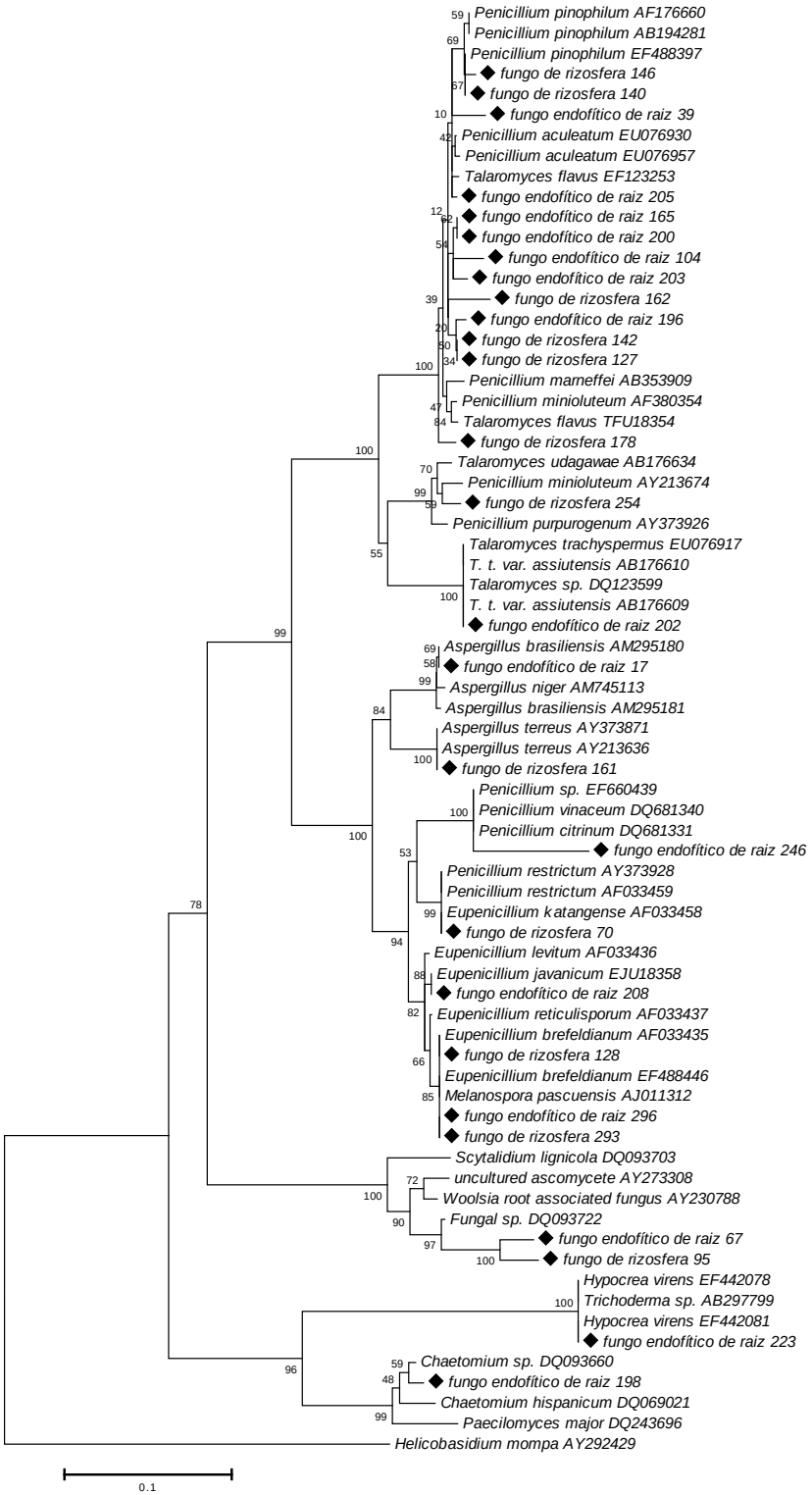


Figura 3.2 - Filograma construído pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes e Cantor para as sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 27 fungos isolados de raízes e rizosfera de cana-de-açúcar. Sequências de referência do GenBank foram utilizadas para comparação entre os isolados. As sequências obtidas no presente trabalho estão sinalizadas com o símbolo ♦. Como grupo externo foi utilizado o basidiomiceto *Helicobasidium mompa.* Valores de *bootstrap* (n=1000 replicatas) ≥ 50 estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0,1 substituições por posição

confirmação pelo agrupamento em filogramas. As afiliações taxonômicas adotadas estão listadas na Tabela 3.1. Os resultados mostraram que nas condições avaliadas esses 249 fungos foram representados por 35 gêneros, além de alguns não identificados. De maneira geral, 65,1% dos isolados foi identificado até o nível de gênero, 25,7% foi identificado até o nível de espécie e 9,2% não puderam ser identificados em nível de gênero, sendo que nesse caso o táxon mais próximo (filo, classe, ordem ou família) foi indicado (Tabela 3.1).

A diversidade morfológica dos fungos associados à cana-de-açúcar compreendeu uma grande variação na coloração do micélio, incluindo as cores branca, bege, amarela, verde, rosa, lilás, marrom, cinza e preta. Além da variedade de cores, os fungos também diferiam no crescimento micelial (cotonoso, submerso, presença de hifas aéreas), na produção de estruturas reprodutivas (presença ou não de esporos), na taxa de crescimento (rápida, média, lenta) e na secreção de substâncias que alteraram a cor do meio de cultura (Figura 3.3). O filo Ascomicota predominou entre os fungos identificados (96,0%), sendo que os filos Zigomicota/Mucoromicotina e Basidiomicota representaram apenas 2,4% e 1,6% da população avaliada, respectivamente. As classes Eurotiomicetos (43%) e Sordariomicetos (38,5%) predominaram dentre os isolados do filo Ascomicota. Os gêneros mais frequentes representaram 65,4% da comunidade, e incluíram *Penicillium* (33,3%), *Fusarium* (16,9%), *Aspergillus* (7,2%), *Trichoderma* (4,4%) e *Epicoccum* (3,6%). Os outros gêneros foram observados em frequências baixas (<2,8%) sendo que 16 deles (*Acremonium, Alternaria, Cladophialophora, Colletotrichum, Curvularia, Exophiala, Mariannaea, Myrmecridium, Myrothecium, Paecilomyces, Paraphaeosphaeria, Phoma, Phomopsis, Pyricularia, Saccharicola* e *Sagenomella*) foram representados por apenas um isolado. Esses dados sugerem que a comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar tenha como característica principal o fato de que ela é composta por poucos gêneros com muitos representantes (alta frequência) e muitos gêneros com poucos representantes (baixa frequência).

3.2.2.2.1 Gêneros mais frequentes

A característica mais evidente da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar é a predominância do gênero *Penicillium* (teleomorfo *Eupenicillium* ou *Talaromyces*). Esse gênero representou 33,3% dos fungos estudados e incluiu tanto isolados endofíticos de raiz como da

Tabela 3.1 - Identificação taxonômica adotada para os 249 isolados fúngicos do presente trabalho a partir do sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, análise via BLASTn e agrupamento em filograma

(continua)

Isolado	Comunidade fúngica [1]	Identificação taxonômica considerada [2]	Filo	Classe	Número de acesso (GenBank)
174	RA	*Acephala* sp.	Ascomicota	Leotiomicetos	GU973728
197	RA	*Acephala* sp.	Ascomicota	Leotiomicetos	GU973749
250	RZ	*Acremonium* sp.	Ascomicota	Mitospórico	GU973794
19	RA	*Alternaria* sp.	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973620
17	RA	*Aspergillus brasiliensis*	Ascomicota	Eurotiomicetoss	GU973618
230	RA	*Aspergillus brasiliensis*	Ascomicota	Eurotiomicetoss	GU973779
234	RA	*Aspergillus brasiliensis*	Ascomicota	Eurotiomicetoss	GU973782
235	RA	*Aspergillus brasiliensis*	Ascomicota	Eurotiomicetoss	GU973783
231	RZ	*Aspergillus brasiliensis*	Ascomicota	Eurotiomicetoss	GU973780
236	RZ	*Aspergillus brasiliensis*	Ascomicota	Eurotiomicetoss	GU973784
76	RZ	*Aspergillus* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973659
219	RZ	*Aspergillus* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973770
279	RA	*Aspergillus* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973817
283	RA	*Aspergillus fumigatus*	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973820
136	RZ	*Aspergillus* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973848
137	RZ	*Aspergillus terreus*	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973699
161	RZ	*Aspergillus terreus*	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973716
215	RZ	*Aspergillus* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973766
220	RZ	*Aspergillus* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973771
255	RZ	*Aspergillus* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973798
299	RZ	*Aspergillus terreus*	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973833
106	RZ	*Aspergillus* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973681
260	RA	*Bionectria ochroleuca*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973802
29	RZ	*Bionectria* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973628
51	RZ	*Bionectria* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973646
301	RZ	*Bionectria* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973834
198	RA	*Chaetomium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973750
122	RA	*Chaetomium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973846
211	RA	*Chaetomium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973854
125	RZ	*Chaetomium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973688
141	RZ	*Chaetomium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973849
144	RZ	*Chaetomium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973850
305	RZ	*Chaetomium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973837

Tabela 3.1 - Identificação taxonômica adotada para os 249 isolados fúngicos do presente trabalho a partir do sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, análise via BLASTn e agrupamento em filograma

(continuação)

Isolado	**Comunidade fúngica [1]**	**Identificação taxonômica considerada [2]**	**Filo**	**Classe**	**Número de acesso (GenBank)**
126.2	RZ	*Chaetosphaeria* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973690
188	RA	*Chaetosphaeria* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973742
222	RZ	*Cladophialophora* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973773
53 [3]	RA	Herpotrichiellaceae	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973648
5 [3]	RZ	Herpotrichiellaceae	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973612
228	RZ	*Cladosporium* sp.	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973778
12	RZ	*Cladosporium* sp.	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973615
13	RZ	*Cladosporium* sp.	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973616
107	RZ	*Cladosporium* sp.	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973683
14	RZ	*Cladosporium* sp.	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973617
22	RZ	*Colletotrichum* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973623
20	RZ	*Cunninghamella* sp.	Zigomicota/Mucoromicotina		GU973621
32	RZ	*Cunninghamella* sp.	Zigomicota/Mucoromicotina		GU973631
50	RZ	*Cunninghamella* sp.	Zigomicota/Mucoromicotina		GU973645
40	RZ	*Curvularia* sp.	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973636
47	RA	*Diaporthe* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973642
251	RA	*Diaporthe* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973796
275	RZ	*Diaporthe* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973815
287	RZ	*Diaporthe* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973825
45	RA	*Dokmaia* sp.	Ascomicota		GU973640
157	RZ	*Dokmaia* sp.	Ascomicota		GU973713
117	RZ	*Dokmaia* sp.	Ascomicota		GU973685
227	RZ	*Dokmaia* sp.	Ascomicota		GU973777
281 [3]	RA	Magnaporthaceae	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973819
285 [3]	RA	Magnaporthaceae	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973823
28	RA	*Epicoccum nigrum*	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973627
36	RA	*Epicoccum nigrum*	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973633
55	RA	*Epicoccum* sp.	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973649
66	RA	*Epicoccum nigrum*	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973653
83	RA	*Epicoccum nigrum*	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973665
238	RA	*Epicoccum nigrum*	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973785
245	RA	*Epicoccum nigrum*	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973791
7	RZ	*Epicoccum nigrum*	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973614

Tabela 3.1 - Identificação taxonômica adotada para os 249 isolados fúngicos do presente trabalho a partir do sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, análise via BLASTn e agrupamento em filograma

(continuação)

Isolado	**Comunidade fúngica [1]**	**Identificação taxonômica considerada [2]**	**Filo**	**Classe**	**Número de acesso (GenBank)**
79	RZ	*Epicoccum nigrum*	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973662
38	RA	*Eupenicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973634
288	RA	*Eupenicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973826
296	RA	*Eupenicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973831
128	RZ	*Eupenicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973692
293	RZ	*Eupenicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973829
208	RA	*Eupenicillium javanicum*	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973760
209	RZ	*Eupenicillium javanicum*	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973761
153	RZ	*Exophiala spinifera*	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973709
221 [3]	RA	Montagnulaceae	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973772
248 [3]	RA	Basidiomicota			GU973793
80	RZ	*Fusarium oxysporum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973663
86	RZ	*Fusarium oxysporum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973667
87	RA	*Fusarium oxysporum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973668
92	RA	*Fusarium oxysporum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973671
93	RA	*Fusarium oxysporum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973672
94	RZ	*Fusarium oxysporum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973673
100	RA	*Fusarium oxysporum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973676
101	RA	*Fusarium oxysporum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973677
105	RA	*Fusarium oxysporum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973681
168	RA	*Fusarium oxysporum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973723
171	RA	*Fusarium oxysporum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973725
172	RA	*Fusarium oxysporum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973726
175	RA	*Fusarium oxysporum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973729
176	RA	*Fusarium oxysporum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973730
177	RA	*Fusarium oxysporum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973731
184	RA	*Fusarium oxysporum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973738
243	RA	*Fusarium oxysporum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973790
225	RZ	*Fusarium oxysporum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973775
240	RZ	*Fusarium oxysporum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973787
4	RA	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973841

Tabela 3.1 - Identificação taxonômica adotada para os 249 isolados fúngicos do presente trabalho a partir do sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, análise via BLASTn e agrupamento em filograma

(continuação)

Isolado	**Comunidade fúngica [1]**	**Identificação taxonômica considerada [2]**	**Filo**	**Classe**	**Número de acesso (GenBank)**
18	RA	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973619
48	RA	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973643
58	RA	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973650
82	RA	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973664
88	RA	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973669
99	RA	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973675
102	RA	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973678
103	RA	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973679
112	RZ	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973684
147	RZ	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973705
169	RA	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973724
182	RA	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973736
190	RA	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973743
204	RA	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973756
233	RA	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973781
241	RA	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973788
242	RA	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973789
268	RA	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973808
308	RA	*Fusarium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973839
126	RA	*Gibberella* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973689
258	RA	*Gibberella* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973800
118	RZ	*Gibberella* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973686
249 [3]	RZ	Hipocreales	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973794
294 [3]	RZ	Hipocreales	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973830
224	RA	*Hypocrea* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973774
65	RA	*Hypocrea virens*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973652
223	RA	*Hypocrea virens*	Ascomicota	Sordariomicetos	GQ495269
43	RZ	N.I. / Hipocreales	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973639
280	RZ	*Mariannaea* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973818
183	RA	*Microdochium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973737
195	RA	*Microdochium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973747
155	RZ	*Microdochium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973711
138 [3]	RZ	Mucoromicotina	Zigomicota/Mucoromicotina		GU973700

Tabela 3.1 - Identificação taxonômica adotada para os 249 isolados fúngicos do presente trabalho a partir do sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, análise via BLASTn e agrupamento em filograma

(continuação)

Isolado	**Comunidade fúngica [1]**	**Identificação taxonômica considerada [2]**	**Filo**	**Classe**	**Número de acesso (GenBank)**
274 [3]	RZ	Mucoromicotina	Zigomicota/Mucoromicotina		GU973814
306	RZ	*Myrmecridium schulzeri*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973838
261	RA	*Myrothecium* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973803
164	RA	*Nigrospora oryzae*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973719
173	RA	*Nigrospora oryzae*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973727
286	RA	*Nigrospora oryzae*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973824
95	RZ	*Paecilomyces* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973674
77	RZ	*Paraphaeosphaeria* sp.	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973660
27	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973626
89	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973670
166	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973721
186	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973740
72	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973657
74	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973843
292	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973858
85	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973666
96	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973844
129	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973847
151	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973851
191	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973744
254	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973797
212	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973763
46	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973641
73	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973658
192	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973745
196	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973748
203	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973755
200	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973752
201	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973753
269	RA	*Penicillium pinophilum*	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973809
298	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973832
30	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973629
127	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973691

Tabela 3.1 - Identificação taxonômica adotada para os 249 isolados fúngicos do presente trabalho a partir do sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, análise via BLASTn e agrupamento em filograma

(continuação)

Isolado	**Comunidade fúngica [1]**	**Identificação taxonômica considerada [2]**	**Filo**	**Classe**	**Número de acesso (GenBank)**
132	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973695
134	RZ	*Penicillium pinophilum*	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973697
135	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973698
140	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973701
142	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973702
146	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973704
152	RZ	*Penicillium pinophilum*	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973708
154	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973710
162	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973717
178	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973732
180	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973734
181	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973735
214	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973765
216	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973767
217	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973768
218	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973769
282	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973820
284	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973822
70	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973656
26	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973625
37	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973842
39	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973635
49	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973644
52	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973647
104	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973680
110	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973845
165	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973720
205	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973757
6	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973613
69	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973655
78	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973661
149	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973851
160	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973853

Tabela 3.1 - Identificação taxonômica adotada para os 249 isolados fúngicos do presente trabalho a partir do sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, análise via BLASTn e agrupamento em filograma

(continuação)

Isolado	**Comunidade fúngica [1]**	**Identificação taxonômica considerada [2]**	**Filo**	**Classe**	**Número de acesso (GenBank)**
246	RA	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973792
270	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973810
277	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973856
291	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973857
302	RZ	*Penicillium* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973859
239	RZ	*Phoma* sp.	Ascomicota	Mitospórico	GU973786
252	RA	*Phomopsis* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973855
31	RZ	*Pyricularia* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973630
271	RA	*Resinicium* sp.	Basidiomicota	Agaricomicetos	GU973811
272	RA	*Resinicium saccharicola*	Basidiomicota	Agaricomicetos	GU973812
290	RZ	*Resinicium* sp.	Basidiomicota	Agaricomicetos	GU973828
210 [3]	RZ	Capnodiales	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973762
163	RA	*Saccharicola bicolor*	Ascomicota	Dothideomicetos	GU973718
61	RZ	*Sagenomella* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973651
21	RZ	*Scolecobasidium* sp.	Ascomicota	Mitospórico	GU973622
130	RZ	*Scolecobasidium* sp.	Ascomicota	Mitospórico	GU973693
131	RZ	*Scolecobasidium* sp.	Ascomicota	Mitospórico	GU973694
67 [3]	RA	Ascomiceto mitospórico	Ascomicota	Mitospórico	GU973654
199 [3]	RA	Ascomiceto mitospórico	Ascomicota	Mitospórico	GU973751
33 [3]	RZ	Ascomiceto mitospórico	Ascomicota	Mitospórico	GU973632
179 [3]	RZ	Ascomiceto mitospórico	Ascomicota	Mitospórico	GU973733
303 [3]	RZ	Ascomiceto mitospórico	Ascomicota	Mitospórico	GU973835
194	RA	*Talaromyces* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973746
167	RA	*Talaromyces trachyspermus*	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973722
185	RA	*Talaromyces* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973739
202	RA	*Talaromyces* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973754
207	RA	*Talaromyces* sp.	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973759
289	RA	*Talaromyces trachyspermus*	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973827
143	RZ	*Talaromyces trachyspermus*	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973703
148	RZ	*Talaromyces trachyspermus*	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973706
159	RZ	*Talaromyces trachyspermus*	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973715
264	RZ	*Talaromyces trachyspermus*	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973804
265	RZ	*Talaromyces trachyspermus*	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973805

Tabela 3.1 - Identificação taxonômica adotada para os 249 isolados fúngicos do presente trabalho a partir do sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, análise via BLASTn e agrupamento em filograma

(conclusão)

Isolado	**Comunidade fúngica [1]**	**Identificação taxonômica considerada [2]**	**Filo**	**Classe**	**Número de acesso (GenBank)**
266	RZ	*Talaromyces trachyspermus*	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973806
267	RZ	*Talaromyces trachyspermus*	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973807
25	RA	*Thielavia* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973624
120	RA	*Thielavia* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973687
187	RA	*Thozetella* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973741
257	RA	*Thozetella* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973799
206	RA	*Trichoderma asperellum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973758
226	RZ	*Trichoderma asperellum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973776
259	RZ	*Trichoderma* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973801
278	RZ	*Trichoderma asperellum*	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973816
41	RZ	*Trichoderma* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973637
42	RZ	*Trichoderma* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973638
309	RA	*Trichoderma* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973840
273	RA	*Trichoderma* sp.	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973813
133 [3]	RZ	Xilariales	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973696
150 [3]	RZ	Xilariales	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973707
158 [3]	RZ	Xilariales	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973714
156 [3]	RZ	Xilariales	Ascomicota	Sordariomicetos	GU973712
213 [3]	RZ	Herpotrichiellaceae	Ascomicota	Eurotiomicetos	GU973764
304 [3]	RZ	Mucoromicotina	Zigomicota/Mucoromicotina		GU973836

[1] Comunidade fúngica a que pertence o isolado: RA – fungo endofítico isolado de raiz de cana-de-açúcar; RZ – fungo isolado da rizosfera de cana-de-açúcar;

[2] Identificação dos isolados fúngicos considerando a similaridade com as sequências de nucleotídeos de fungos disponíveis na base de dados do GenBank, a partir dos resultados gerados pela ferramenta BLASTn e pelo agrupamento nos filogramas (Figura 3.4-3.9);

[3] Isolados fúngicos em que não foi possível determinar a classificação taxonômica em nível de gênero. O nível taxonômico mais próximo (filo, subfilo, classe, subclasse, ordem ou família) determinado está indicado na coluna de identificação taxonômica.

rizosfera. A Figura 3.4 mostra o filograma construído a partir da região ITS1-5,8S-ITS2 dos isolados do gênero *Penicillium* e de linhagens conhecidas disponíveis no GenBank. De maneira geral, os isolados apresentaram similaridade com 17 espécies diferentes (*P. restrictum, E. katangense, P. janthinellum, T. flavus, E. javanicum, P. ochrochloron, E. reticulisporum, E. brefeldianum, E. levitum, P. vinaceum, P. radicum, P. minioluteum, T. udagawae, T. trachyspermus, P. pinophilum, T. indigoticus* e *P. marneffei*), entretanto o agrupamento filogenético obtido não permitiu a classificação segura em espécie para a maioria dos isolados, sendo que, nesses casos, foi adotada a classificação apenas em gênero (*Penicillium* sp., *Talaromyces* sp. ou *Eupenicillium* sp.). Quatorze isolados tiveram sua taxonomia determinada em nível específico, sendo eles: 143, 148, 159, 167, 264, 265, 266, 267 e 289 como *T. trachyspermus*; 134, 152 e 269 como *P. pinophilum* e 208 e 209 como *E. javanicum* (Tabela 3.1, Figura 3.4).

O gênero *Fusarium* (teleomorfo *Gibberella*), segundo mais frequente na comunidade fúngica avaliada, incluiu 16,9% dos isolados, os quais apresentaram alta similaridade com pelo menos cinco espécies diferentes (*F. oxysporum, F. acutatum, F. solani, F. dlaminii* e *G. moniliformis*). O agrupamento em filograma permitiu a classificação de 19 isolados (80, 86, 87, 92, 93, 94, 100, 101, 105, 168, 171, 172, 175, 176, 177, 184, 225, 240, 243) em *F. oxysporum* (Figura 3.5). Os 23 isolados restantes foram classificados apenas em nível de gênero uma vez que não houve agrupamento exclusivo com uma única espécie (Figura 3.5).

O gênero *Aspergillus* foi o terceiro mais frequente na comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar, perfazendo 7,2% dos isolados, os quais apresentaram alta similaridade com 7 espécies diferentes (*A. brasiliensis, A. flavus, A. oryzae, A. versicolor, A. niger, A. terreus* e *A. fumigatus*). A árvore filogenética (Figura 3.6) construída para os fungos desse gênero gerou o agrupamento dos isolados em 5 grupos de alta similaridade, a partir do qual foram definidas as seguintes afiliações taxonômicas: isolados 17, 230, 231, 234, 235 e 236 identificados como *A. brasiliensis;* isolados 137, 161 e 299 identificados como *A. terreus* e isolado 283 identificado como *A. fumigatus.* Outros isolados não apresentaram alta similaridade com nenhuma espécie cuja sequência encontra-se disponível no GenBank (215, 219, 220, 255, 279) ou foram agrupados com mais de uma espécie de *Aspergillus* (76, 106), o que não permitiu a classificação taxonômica em nível de gênero.

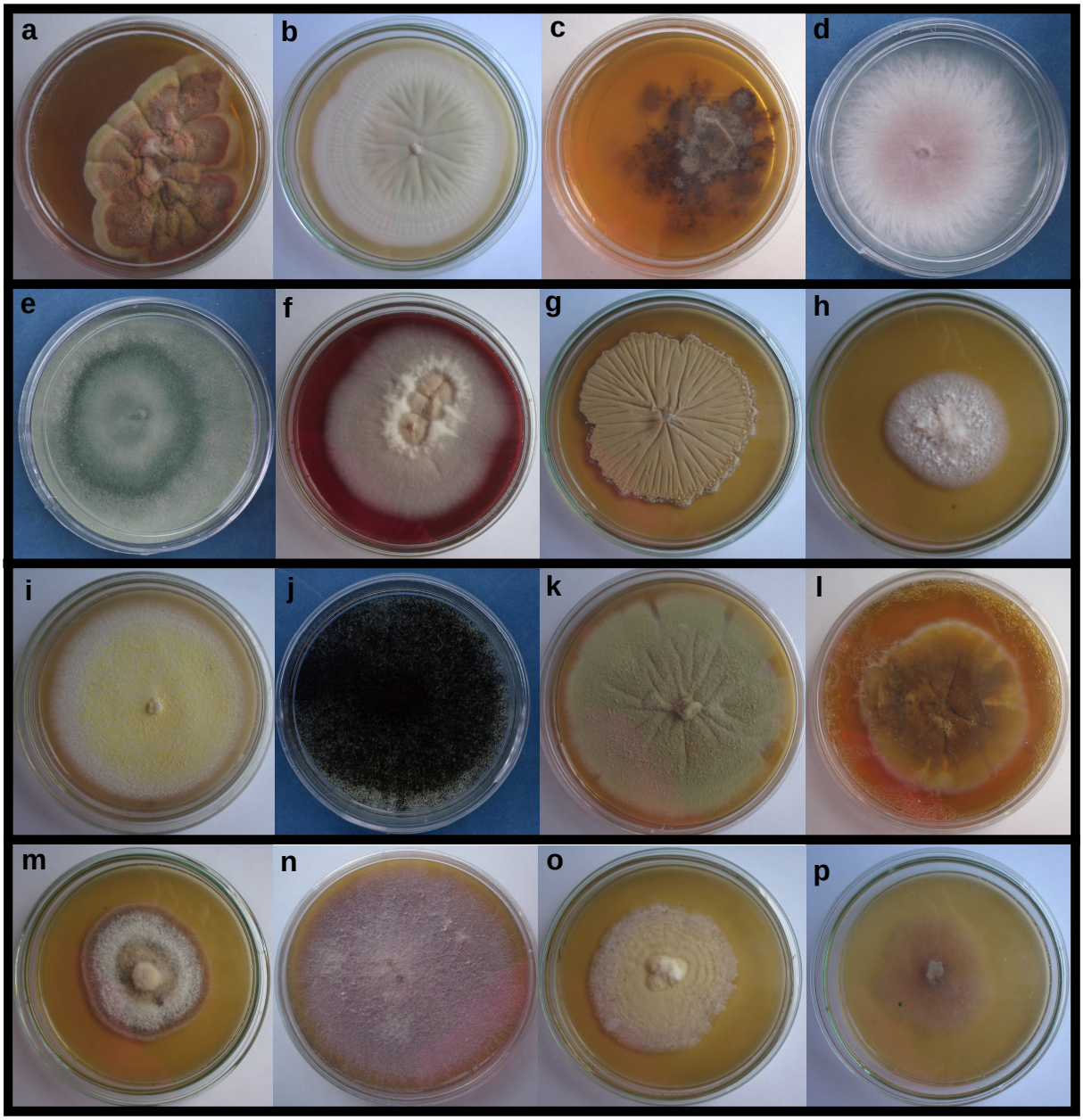


Figura 3.3 - Diversidade morfológica observada na comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar. Colônias fúngicas foram crescidas em meio BDA à 28° C por 5-10 dias. (**a**) *Epicoccum* sp., (**b**) *Penicillium* sp., (**c**) *Chaetomium* sp., (**d**) *Fusarium* sp., (**e**) *Trichoderma virens*, (**f**) Fungo endofítico de raiz *não identificado*, (**g**) *Eupenicillium javanicum*, (**h**) *Acremonium* sp., (**i**) *Talaromyces trachyspermus*, (**j**) *Aspergillus niger*, (**k**) *Penicillium* sp., (**l**) *Epicoccum nigrum*, (**m**) *Mariannaea* sp., (**n**) *Fusarium* sp., (**o**) *Bionectria* sp., (**p**) *Myrmecridium schulzeri*

Os gêneros *Trichoderma* e *Epicoccum* foram bem menos frequentes que *Penicillium* e *Fusarium*, porém, ainda assim bem mais numerosos que os demais gêneros presentes na comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar avaliada no presente trabalho. O gênero *Trichoderma* (teleomorfo *Hypocrea*), quarto mais frequente, foi representado por 11 isolados, correspondendo a 4,4% da comunidade fúngica. O agrupamento em filograma permitiu classificar os isolados 65 e 223 em *H. virens*, os isolados 206, 226 e 278 em *T. asperellum* e os isolados 41, 42, 224, 259, 273 e 309 apenas como *Trichoderma* sp. (Figura 3.7). Já o gênero *Epicoccum*, quinto mais frequente na comunidade fúngica em questão, representou 3,6% dos isolados. A árvore filogenética apresentada na Figura 3.8 contém clado agrupando os isolados desse gênero com linhagens conhecidas de *E. nigrum*, sendo, portanto, essa espécie adotada como classificação taxonômica dos isolados 7, 28, 36, 66, 79, 83, 238 e 245, exceto para o isolado 55, que foi identificado apenas como *Epicoccum* sp.

3.2.2.2.2 Outros gêneros

Além dos cinco gêneros mais frequentes (*Penicillium, Fusarium, Aspergillus, Trichoderma* e *Epicoccum*), a comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar também incluiu outros 28 gêneros do filo Ascomicota, um gênero do filo Basidiomicota e um gênero do filo Zigomicota/Mucoromicotina. Dentre os fungos do filo Ascomicota, a classe Sordariomicetos abrangeu um grande número de isolados (96), os quais tiveram suas relações filogenéticas determinadas no filograma apresentado na Figura 3.9 (excluindo-se os isolados dos gêneros *Trichoderma* e *Fusarium*, já representados anteriormente). Com isso, foi possível verificar que os fungos associados à cana-de-açúcar pertencentes a esta classe incluem uma grande diversidade de gêneros, pois pelo menos 17 puderam ser identificados (*Bionectria, Chaetomium, Chaetosphaeria, Colletotrichum, Diaporthe, Fusarium, Mariannaea, Microdochium, Myrmecridium, Myrothecium, Nigrospora, Paecilomyces, Phomopsis, Pyricularia, Thielavia, Thozetella* e *Trichoderma*). Esses gêneros agruparam-se na árvore filogenética de acordo com as subclasses (Sordariomicetidae, Hipocreomicetidae, Xilariomicetidae e Sordariomicetos incertae sedis). A identificação taxonômica adotada para todos os isolados desta classe encontra-se listada na Tabela 3.1.

Além da classe Sordariomicetos, o filo Ascomicota da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar também foi representado por isolados das classes Dothideomicetos, Eurotiomicetos, Leotiomicetos e fungos mitospóricos. O agrupamento filogenético desses isolados (com exceção de isolados dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, os quais já foram representados anteriormente nas Figuras 3.6 e 3.4, respectivamente) está representado na Figura 3.8. A classe Dothideomicetos incluiu 19 isolados, pertencentes a pelo menos seis gêneros diferentes (*Alternaria, Cladosporium, Curvularia, Epicoccum, Paraphaeosphaeria* e *Saccharicola*). A classe Eurotiomicetos abrangeu 107 isolados, porém 94,4% deles são representantes dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo que o restante dessa classe, 6 isolados, incluiu um isolado do gênero *Cladophialophora* (222), um isolado do gênero *Exophiala* (153), um isolado do gênero *Sagenomella* (61) e três isolados não identificados (5, 53 e 213). A classe Leotiomycetes teve apenas dois representantes, ambos do gênero *Acephala* (174 e 197). A árvore filogenética apresentada na Figura 3.8 também incluiu o agrupamento dos isolados dos filos Basidiomicota e Zigomicota/Mucoromicotina, representados por apenas 4 e 6 isolados, respectivamente. Salvo os isolados fúngicos que não puderam ser identificados, o filo Basidiomicota foi composto por 3 isolados do gênero *Resinicium* (271, 272 e 290) e o filo Zigomicota/Mucoromicotina compreendeu três isolados do gênero *Cunninghamella* (20, 32, 50).

3.2.2.2.3 Isolados fúngicos não identificados em nível de gênero

Além da presença dos gêneros citados acima, a comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar, estudada no presente trabalho, também incluiu 23 isolados fúngicos que não puderam ser identificados em nível de gênero. Diferentemente dos outros isolados, estes não apresentaram alta similaridade com nenhum gênero fúngico descrito disponível no banco de dados GenBank, sendo que a análise por BLASTn retornou *hits* de fungos descritos como “uncultured soil fungus”, “fungal endophyte”, “uncultured fungus”, “Ascomycota sp.”, entre outros. A construção de filogramas com a sequência de nucleotídeo da região ITS1-5,8S-ITS2 desses isolados permitiu a determinação de níveis taxonômicos superiores a gênero (Figuras 3.10 e 3.11, Tabela 3.1). Os resultados mostraram que estes isolados, os quais representaram 9,2% da comunidade fúngica avaliada neste estudo, foram agrupados com representantes do filo Ascomicota (19 isolados) (Figura 3.10), Zigomicota/Mucoromicotina (3 isolados) (Figura 3.11a) e Basidiomicota

(1 isolado) (Figura 3.11b). Com relação aos isolados do filo Ascomicota, nove foram agrupados com representantes da classe Sordariomicetos, sendo que dois deles (281 e 285) foram classificados na classe Magnaporthaceae, três (43, 249 e 294) na ordem Hipocreales e quatro (133, 150, 156 e 158) na ordem Xilariales (Figura 3.10, Tabela 3.1). Dois isolados fúngicos (221 e 210) foram agrupados com representantes da classe Dothideomicetos, e classificados na família Montagnulaceae e na ordem Capnodiales, respectivamente (Figura 3.10, Tabela 3.1). Três isolados fúngicos (5, 53 e 213) foram agrupados com representantes da classe Eurotiomicetos e classificados na família Herpotrichiellaceae (Figura 3.10, Tabela 3.1).

3.2.2.3 Diversidade, riqueza e rarefação

A determinação das curvas de rarefação e dos índices de diversidade (Shannon-Wienner - *H'*) e riqueza (Chao1) foi realizada pelo programa DOTUR, a partir das sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA dos isolados fúngicos, considerando diferentes níveis de similaridade entre as sequências (100, 99, 97 e 95%). De maneira geral, as curvas de rarefação mostraram que a amostragem populacional adotada no presente trabalho permitiu acessar a diversidade da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar considerando os níveis de similaridade de 95% e 97%, os quais podem ser considerados representativos do nível taxonômico de gênero (Figura 3.12). Isso porque essas curvas começaram a estabilizar, aproximando-se da assíntota horizontal, indicando que a amostragem adotada está próxima da amostragem adequada. Entretanto, para níveis maiores de similaridade (99 e 100%), as curvas não apresentaram tendência de estabilização, indicando que a amostragem precisaria ser ampliada para conseguir acessar apropriadamente a diversidade nesses níveis (Figura 3.12). Notavelmente, as curvas de rarefação construídas separadamente para as comunidades de fungos endofíticos de raiz e de fungos da rizosfera (Figura 3.12a) mostraram que o número de filotipos esperado para a comunidade de fungos endofíticos de raiz foi sempre menor do que o número esperado para a comunidade de fungos da rizosfera, independente do nível de similaridade considerada.

Levando-se em consideração os resultados de rarefação e visando evitar interpretações equivocadas, as conclusões acerca da diversidade e riqueza da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar foram baseadas apenas nos valores obtidos para as similaridades de 95% e 97%. Assim, foi possível observar que a comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar possui grande

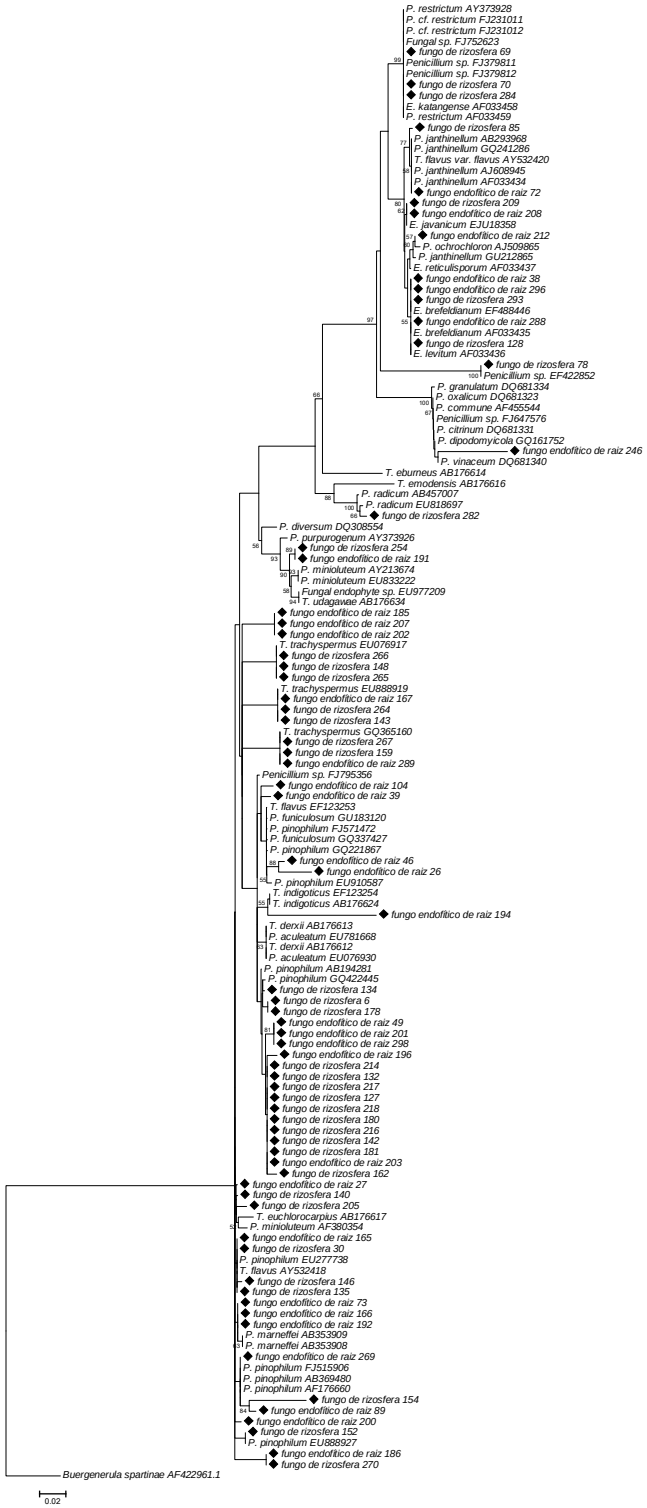


Figura 3.4 – Filograma construído pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes e Cantor para as sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 70 fungos do gênero *Penicillium* (teleomorfo *Eupenicillium* ou *Talaromyces*), isolados de raízes e rizosfera de cana-de-açúcar. Sequências de referência do GenBank foram utilizadas para comparação entre os isolados. As sequências obtidas no presente trabalho estão sinalizadas com o símbolo ♦. Como grupo externo foi utilizado o ascomiceto *Buergenerula spartinae*. Valores de *bootstrap* (n=1000 replicatas) ≥ 50 estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0,02 substituições por posição

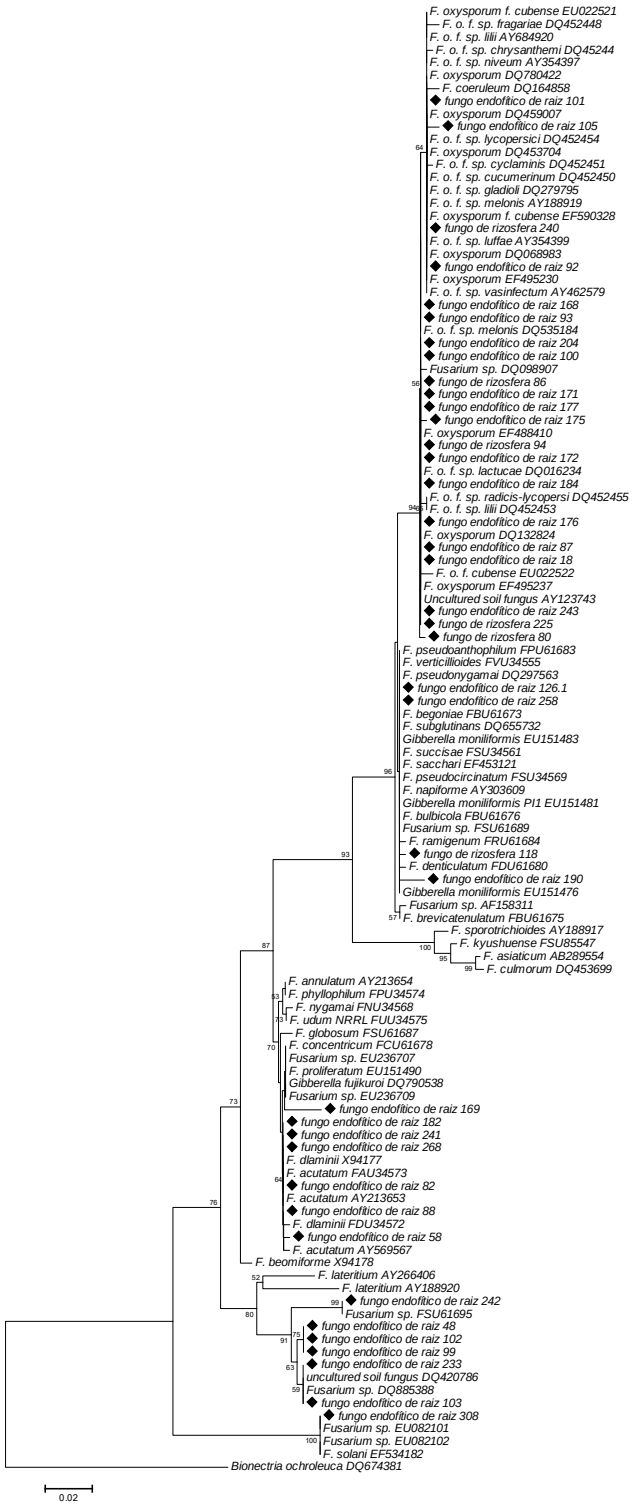


Figura 3.5 - Filograma construído pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes e Cantor para as sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 39 fungos do gênero *Fusarium* (teleomorfo *Gibberella*), isolados de raízes e rizosfera de cana-de-açúcar. Sequências de referência do GenBank foram utilizadas para comparação entre os isolados. As sequências obtidas no presente trabalho estão sinalizadas com o símbolo ♦. Como grupo externo foi utilizado o ascomiceto *Bionectria ochroleuca*. Valores de *bootstrap* (n=1000 replicatas) ≥ 50 estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0,02 substituições por posição

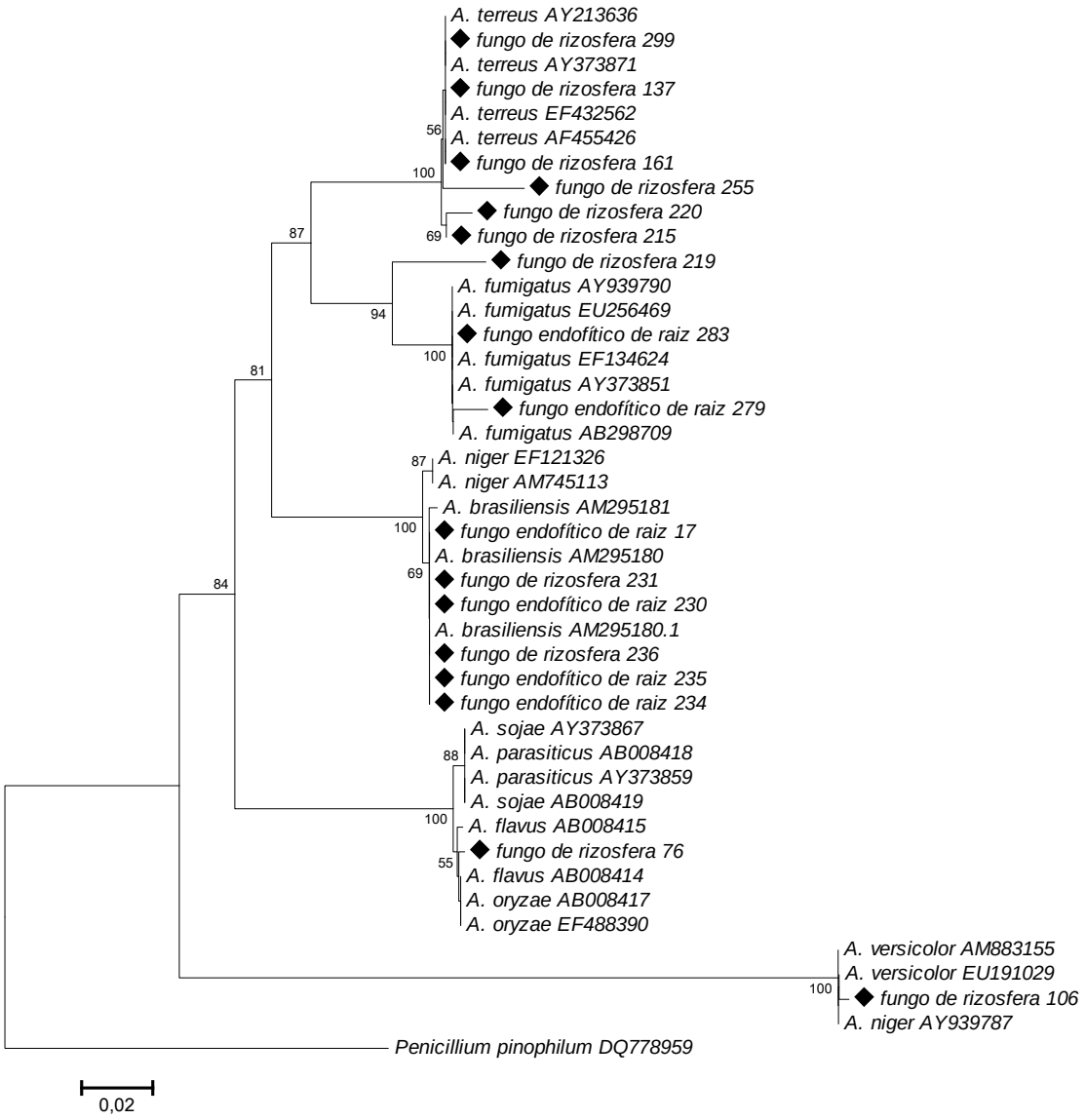


Figura 3.6 - Filograma construído pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes e Cantor para as sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 17 fungos do gênero *Aspergillus*, isolados de raízes e rizosfera de cana-de-açúcar. Sequências de referência do GenBank foram utilizadas para comparação entre os isolados. As sequências obtidas no presente trabalho estão sinalizadas com o símbolo ♦. Como grupo externo foi utilizado o ascomiceto *Penicillium pinophilum.* Valores de *bootstrap* (n=1000 replicatas) ≥ 50 estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0,02 substituições por posição

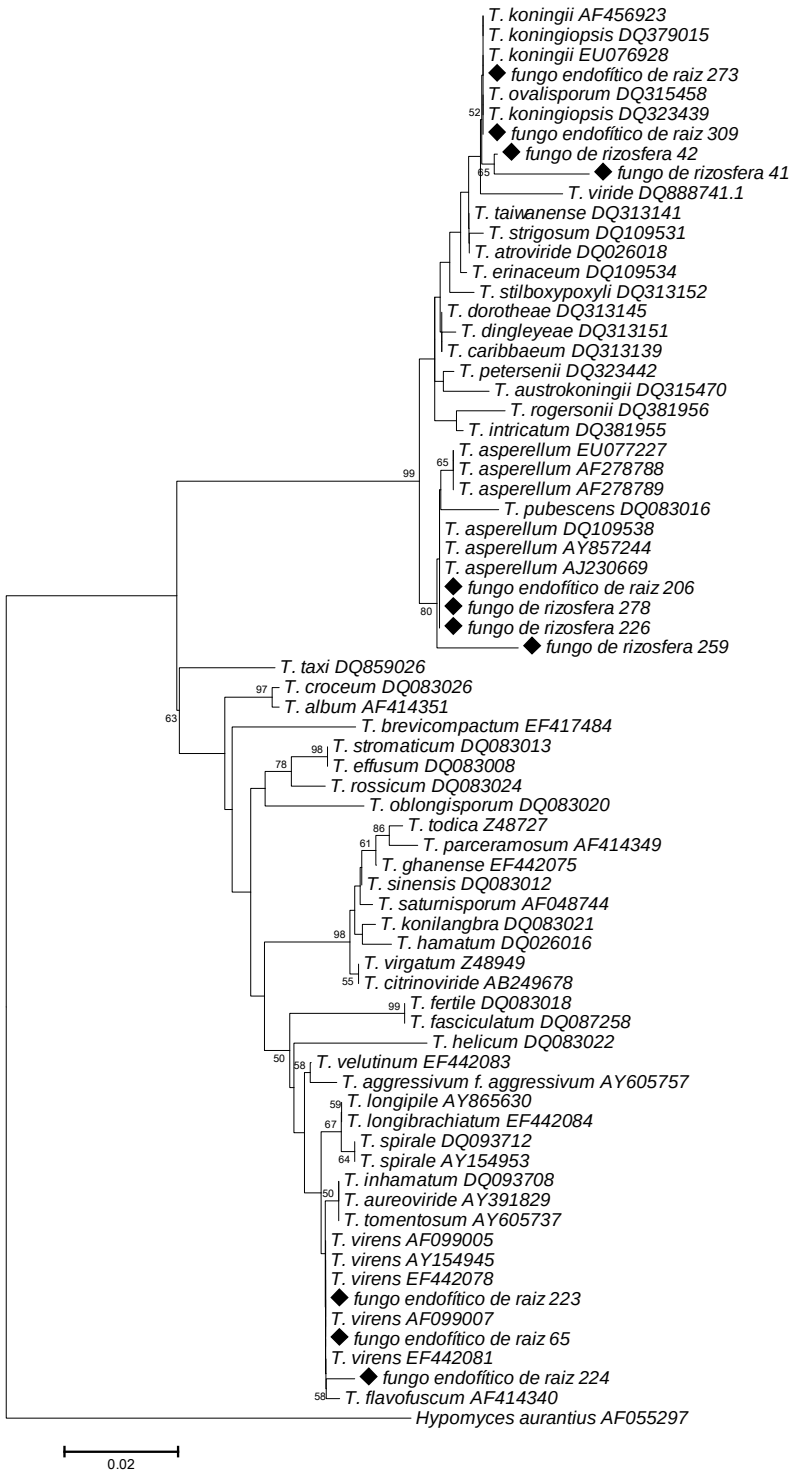


Figura 3.7 - Filograma construído pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes e Cantor para as sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 11 fungos do gênero *Trichoderma* (teleomorfo *Hypocrea*), isolados de raízes e rizosfera de cana-de-açúcar. Sequências de referência do GenBank foram utilizadas para comparação entre os isolados. As sequências obtidas no presente trabalho estão sinalizadas com o símbolo ♦. Como grupo externo foi utilizado o ascomiceto *Hypomyces aurantius.* Valores de *bootstrap* (n=1000 replicatas) ≥ 50 estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0,02 substituições por posição

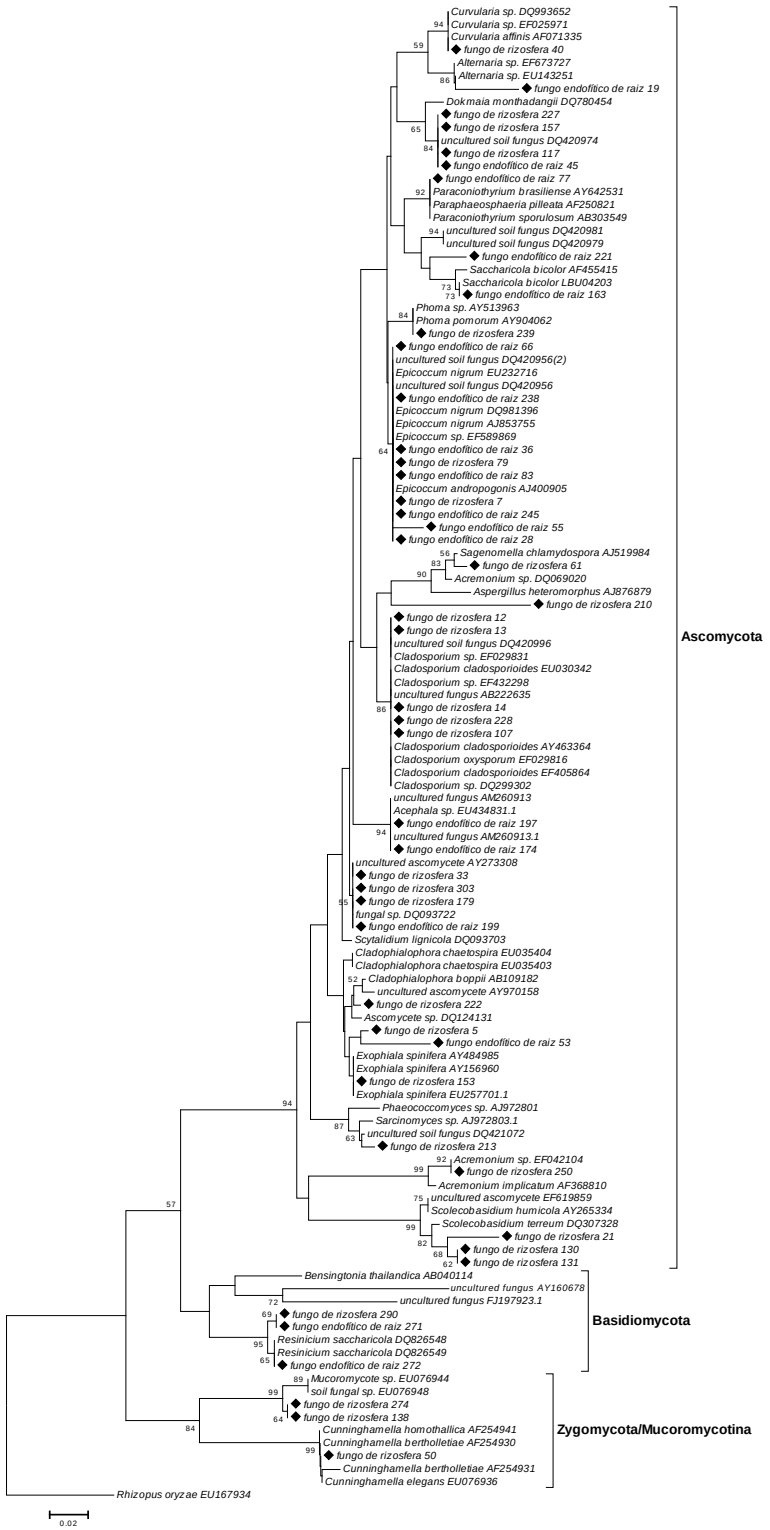


Figura 3.8 - Filograma construído pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes e Cantor para as sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 48 fungos isolados de raízes e rizosfera de cana-de-açúcar. Sequências de referência do GenBank foram utilizadas para comparação entre os isolados. As sequências obtidas no presente trabalho estão sinalizadas com o símbolo ♦. Como grupo externo foi utilizado o zigomiceto *Rhizopus oryzae*. Valores de *bootstrap* (n=1000 replicatas) ≥ 50 estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0,02 substituições por posição

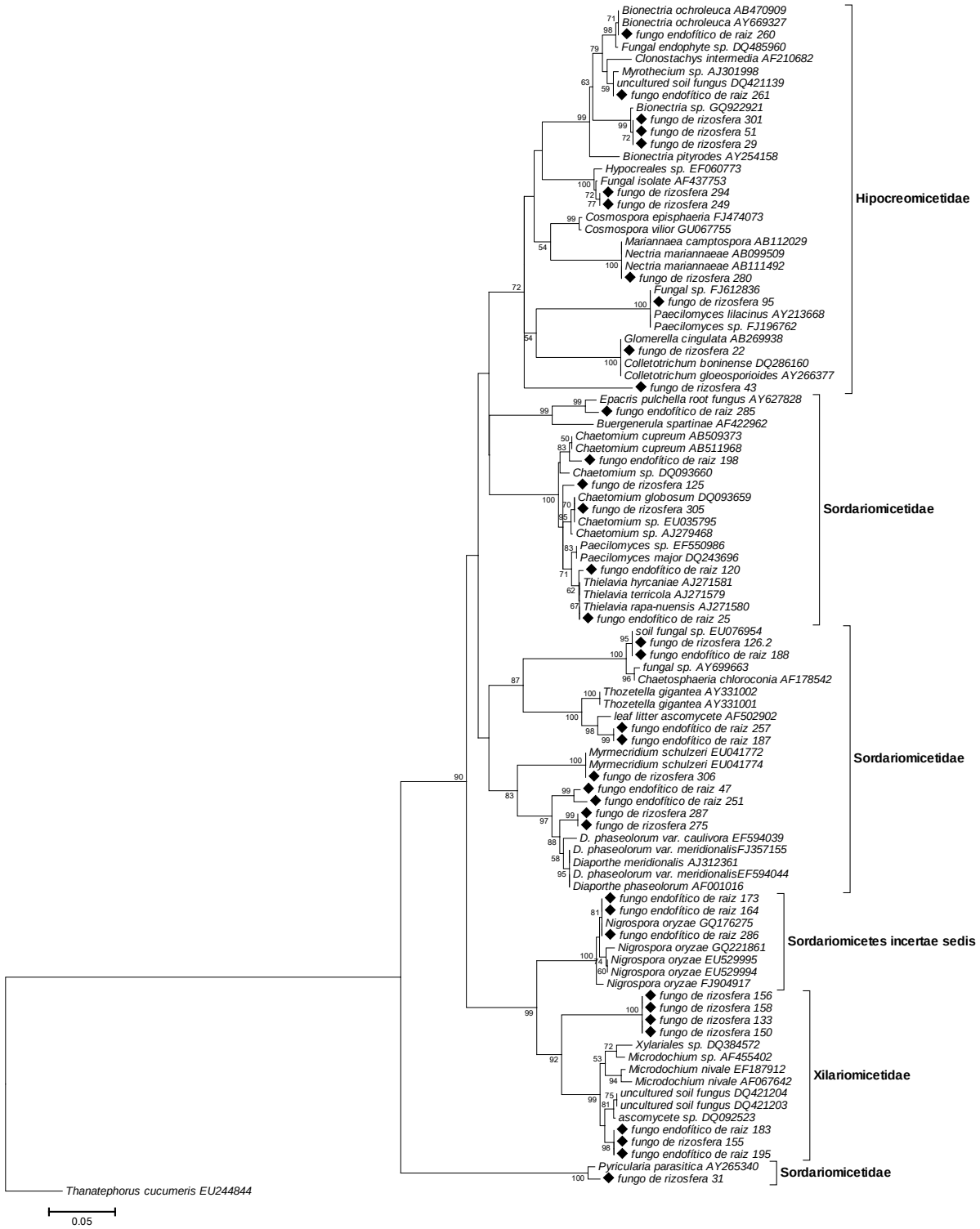


Figura 3.9 - Filograma construído pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes e Cantor para as sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 37 ascomicetos da classe Sordariomicetos, isolados de raízes e rizosfera de cana-de-açúcar. Sequências de referência do GenBank foram utilizadas para comparação entre os isolados. As sequências obtidas no presente trabalho estão sinalizadas com o símbolo ♦. Como grupo externo foi utilizado o basidiomiceto *Thanatephorus cucumeris.* Valores de *bootstrap* (n=1000 replicatas) ≥ 50 estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0,05 substituições por posição

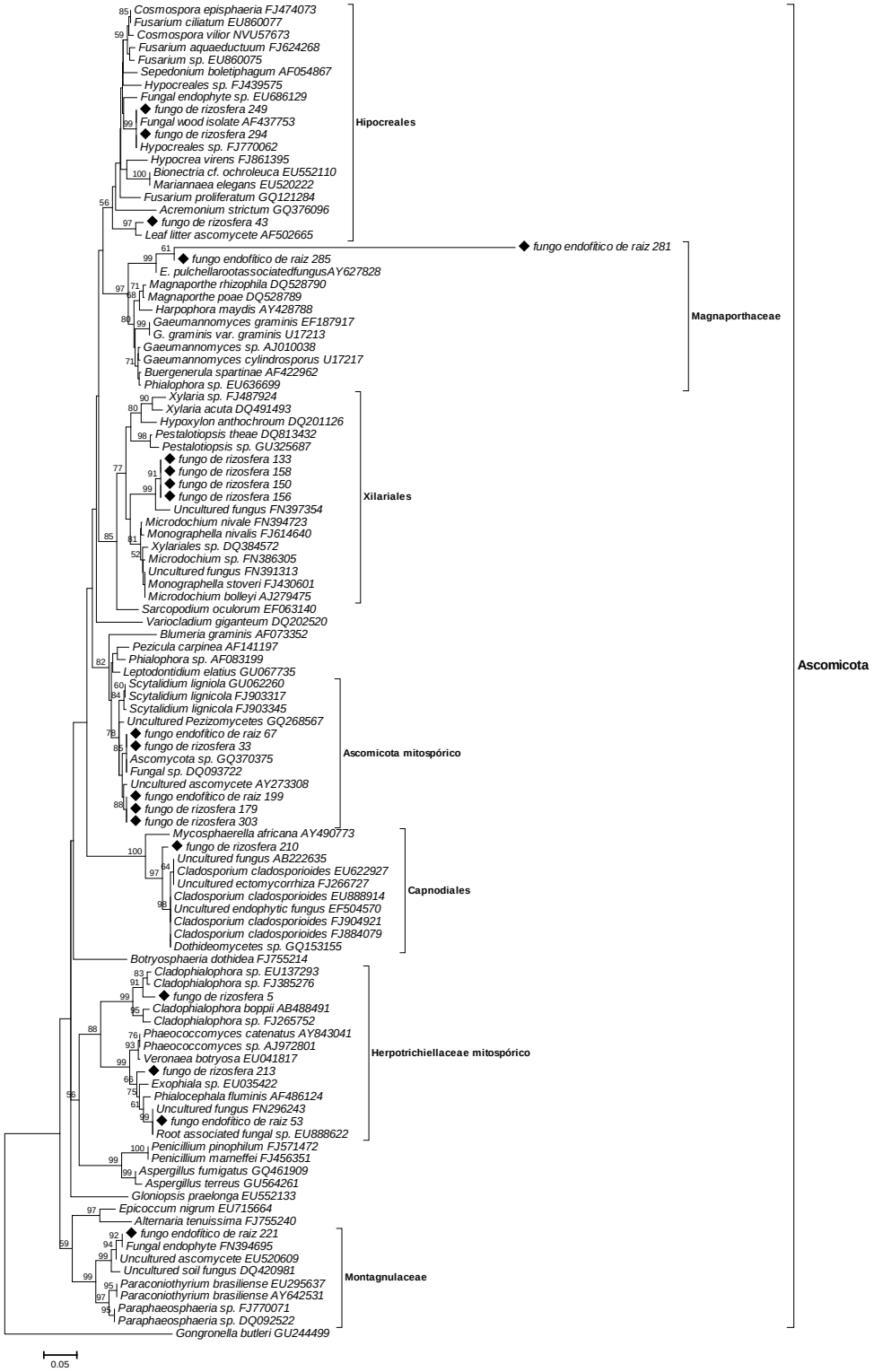
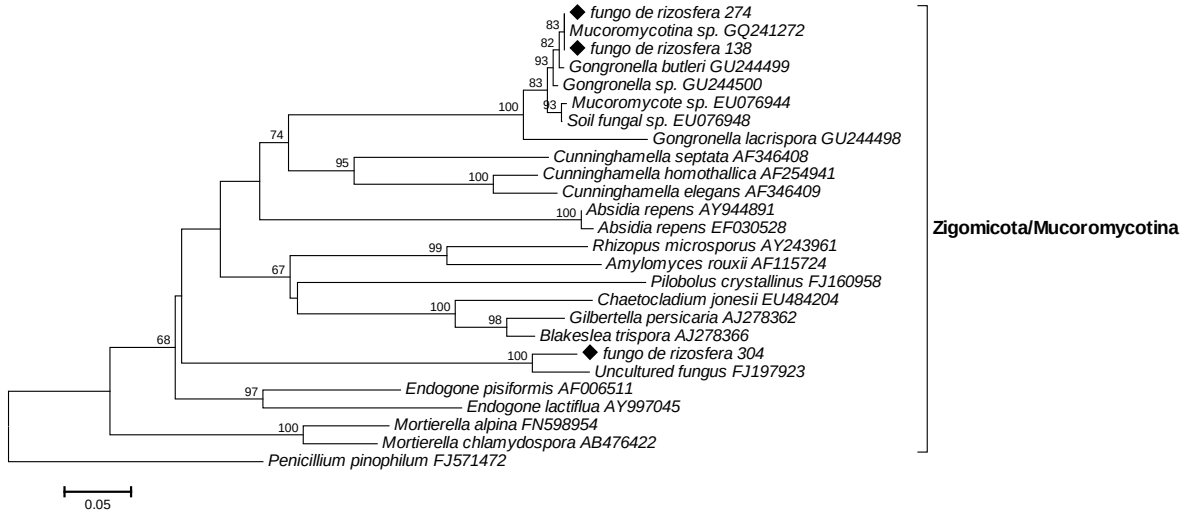


Figura 3.10 - Filograma construído pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes e Cantor para as sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de 19 ascomicetos isolados de raízes e rizosfera de cana-de-açúcar. Sequências de referência do GenBank foram utilizadas para comparação entre os isolados. As sequências obtidas no presente trabalho estão sinalizadas com o símbolo ♦. Como grupo externo foi utilizado zigomiceto *Gongronella bulleri*. Valores de *bootstrap* (n=1000 replicatas) ≥ 50 estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0,05 substituições por posição

a



b

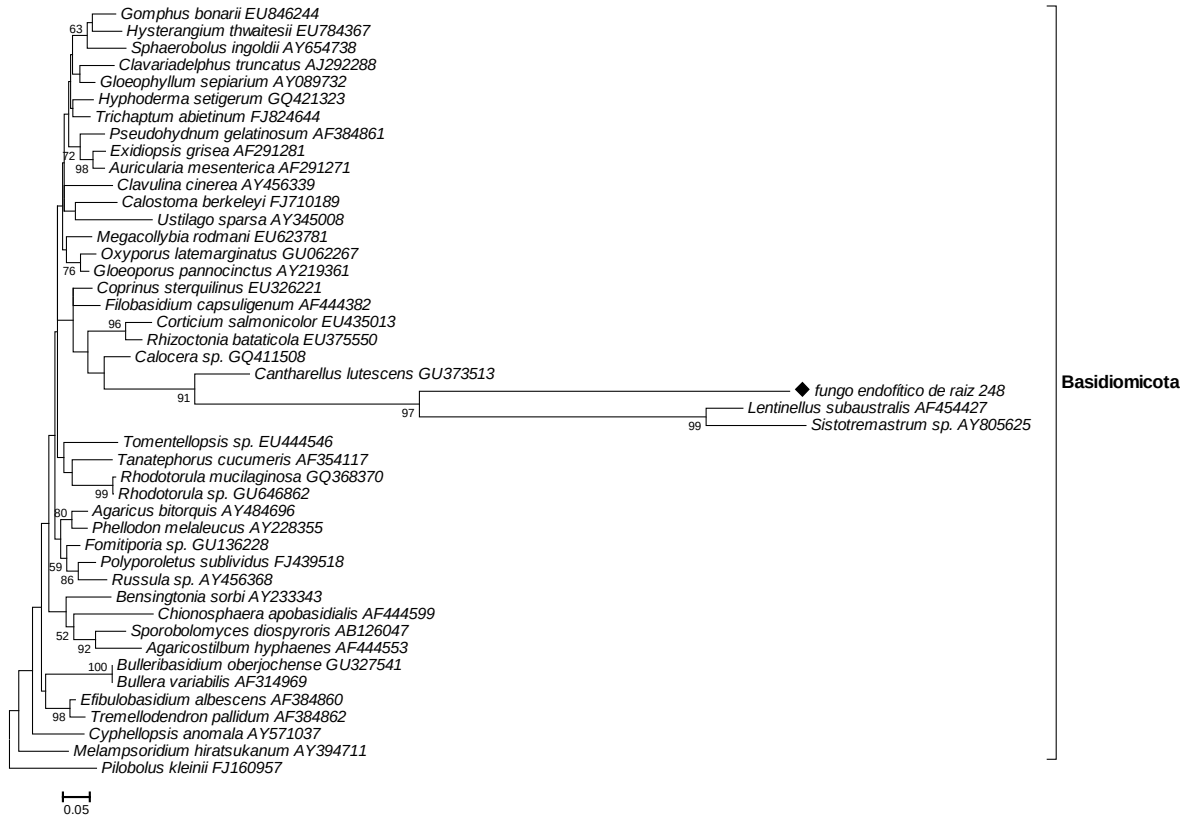


Figura 3.11 - Filogramas construídos pelo método de *Neighbor-joining* com base no modelo de Jukes e Cantor para as sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA de isolados fúngicos da comunidade de fungos associados à cana-de-açúcar. (**a**) Filograma para fungos do filo Zigomicota/Mucoromicotina, onde foi usado como grupo externo o ascomiceto *Penicillium pinophilum*; (**b**) filograma para fungos do filo Basidiomicota, onde foi usado como grupo externo o zigomiceto *Pilobolus kleinii*. Sequências de referência do GenBank foram utilizadas para comparação entre os isolados. As sequências obtidas no presente trabalho estão sinalizadas com o símbolo ♦. Valores de *bootstrap* (n=1000 replicatas) ≥ 50 estão demonstrados nas intersecções dos nós. Barra de escala = 0,05 substituições por posição

Tabela 3.2 - Índices de diversidade (Shannon-Wiener) e riqueza (Chao1) obtidos a partir da análise da variação entre as sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA dos fungos associados à cana-de-açúcar, nas diferentes similaridades consideradas

Comunidade fúngica	**Ni**	**Ng**	**Nn**	**Índice de diversidade [1] (*Shannon-Wiener - H'*)**				**Índice de Riqueza [1] (*Chao1*)**			
				100%	**99%**	**97%**	**95%**	**100%**	**99%**	**97%**	**95%**
Endófitos de raiz	122	22	7	3,69 (± 0,20)	3,50 (± 0,20)	3,16 (± 0,21)	3,12 (± 0,20)	182 (110-358)	98 (69-175)	69 (50-123)	52 (42-85)
Rizosfera	127	29	16	3,94 (± 0,17)	3,77 (± 0,19)	3,51 (± 0,21)	3,45 (± 0,20)	156 (106-268)	147 (97-265)	145 (88-296)	121 (76-244)
Total [2]	249	35	23	4,24 (± 0,14)	4,06 (± 0,14)	3,64 (± 0,17)	3,53 (± 0,17)	253 (178-403)	173 (128-268)	134 (100-210)	98 (80-141)

Ni – número de isolados fúngicos;
Ng – número de gêneros identificados na amostragem adotada (Ni);
Nn – número de isolados fúngicos *não identificados* em nível de gênero;
[1] Valores dos índices estão apresentados para os diferentes níveis de similaridade entre as sequências de nucleotídeos (100%, 99%, 97% e 95%), e os desvios para intervalo com 95% de confidência estão apresentados entre parênteses;
[2] Consiste do agrupamento dos fungos endofíticos de raiz com os fungos da rizosfera, representando a comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar como um todo.

diversidade e riqueza de fungos, uma vez que os índices obtidos ($H'_{(95\%)}$=3,53; $H'_{(97\%)}$=3,64; $Chao1_{(95\%)}$=98; $Chao1_{(97\%)}$=134) são considerados altos para os níveis de similaridade adotados (Tabela 3.2). Além disso, a comparação desses índices entre as populações de fungos isolados do interior de raízes (endófitos) e da rizosfera indicou uma forte tendência de que a rizosfera seja um local de maior diversidade e riqueza fúngica, embora os valores obtidos não tenham sido significativos no intervalo de 95% de confidência (Tabela 3.2).

3.2.2.4 Correlação dos gêneros com local de isolamento (raiz *vs.* rizosfera)

As semelhanças taxonômicas entre os fungos isolados de raiz (endófitos) e da rizosfera foram determinadas pelo cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard (J), considerando os gêneros que ocorrem em cada comunidade. O valor obtido (J=0,343) indicou que essas comunidades devem ter maior número de gêneros de ocorrência restrita do que gêneros em comum. Essa característica das comunidades pode ser melhor visualizada na Figura 3.13, onde a porcentagem dos gêneros e proporção de ocorrência em cada local de isolamento (raiz ou rizosfera) estão representados. O gráfico mostra, por exemplo, que 8 gêneros (*Acephala, Alternaria, Myrothecium, Nigrospora, Phomopsis, Saccharicola, Thielavia* e *Thozetella*) foram observados apenas na comunidade fúngica de endófitos de raiz, enquanto que 15 gêneros (*Acremonium, Cladophialophora, Cladosporium, Colletotrichum, Cunninghamella, Curvularia, Exophiala, Mariannaea, Myrmecridium, Paecilomyces, Paraphaeosphaeria, Phoma, Pyricularia,*

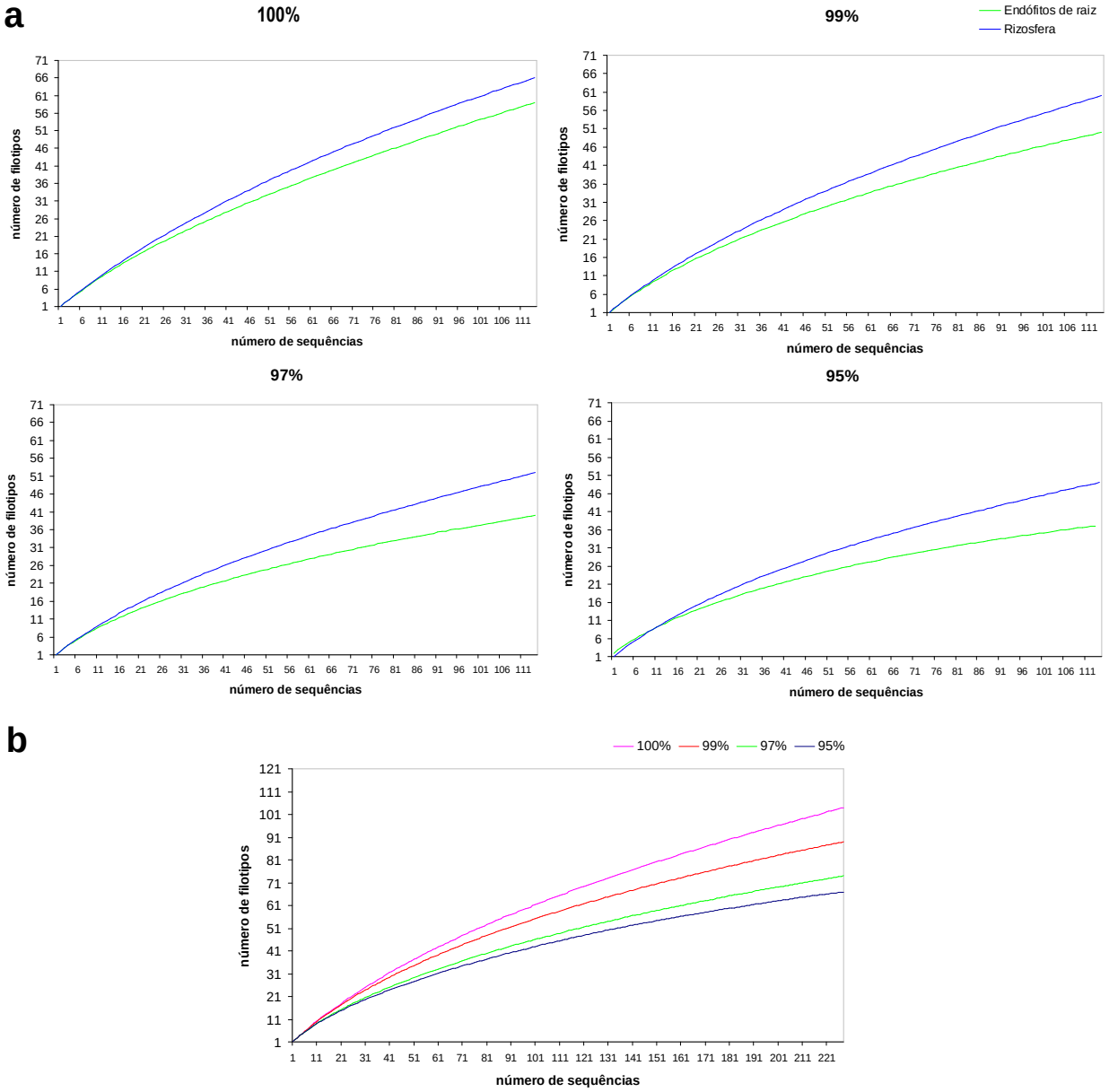


Figura 3.12 - Análise de rarefação mostrando o número esperado de filotipos componentes das populações de fungos associados à cana-de-açúcar, para os diferentes níveis de similaridade entre as sequências de nucleotídeos da região ITS1-5,8S-ITS2 (100%, 99%, 97% e 95%) dos isolados fúngicos. (**a**) Comparação entre número de filotipos esperado para a população de fungos endofíticos de raiz e para a população de fungos da rizosfera. (**b**) Número de filotipos esperado para a comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar como um todo (endófitos de raiz + fungos da rizosfera)

Sagenomella e *Scolecobasidium*) foram observados apenas na rizosfera. Além disso, considerando os gêneros mais frequentes, foi possível observar que alguns deles parecem ser predominantes em apenas um local avaliado (endófito de raiz ou rizosfera). O gênero *Aspergillus*, por exemplo, foi observado em frequência duas vezes maior na rizosfera do que nas raízes e, em contrapartida, 80% dos isolados do gênero *Fusarium* foram isolados como endófitos de raiz (Figura 3.13). A análise dos componentes principais (PCA) confirmou essas tendências citadas anteriormente, pois a posição das amostras em gráfico considerando os dois primeiros componentes principais (Figura 3.14), os quais explicaram 63,2% da variância das amostras, permitiu a definição de dois grupos: grupo 1, abragendo apenas amostras de fungos da rizosfera (RZ); e grupo 2, englobando a maioria das amostras de fungos endofíticos (R). Isso significa que o local de isolamento (raiz ou rizosfera) é fator determinante da variação observada no conjunto de dados, isto é, ele determina a composição da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar, em termos de frequência e ocorrência de gêneros.

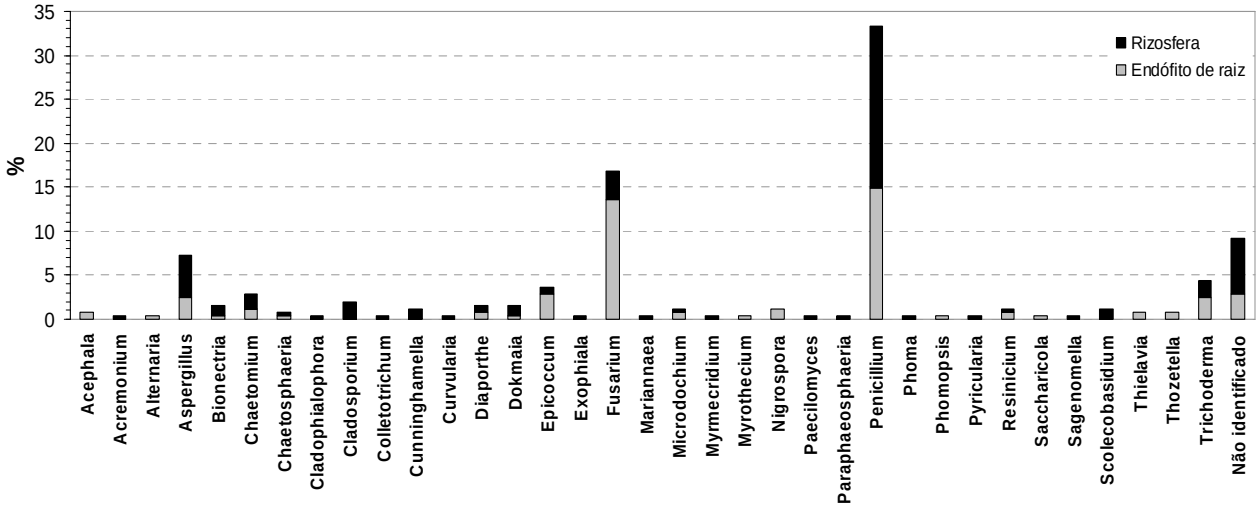


Figura 3.13 – Porcentagem de ocorrência de cada gênero observado na comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar e a proporção relativa de ocorrência de acordo com o local de isolamento (raiz ou rizosfera)

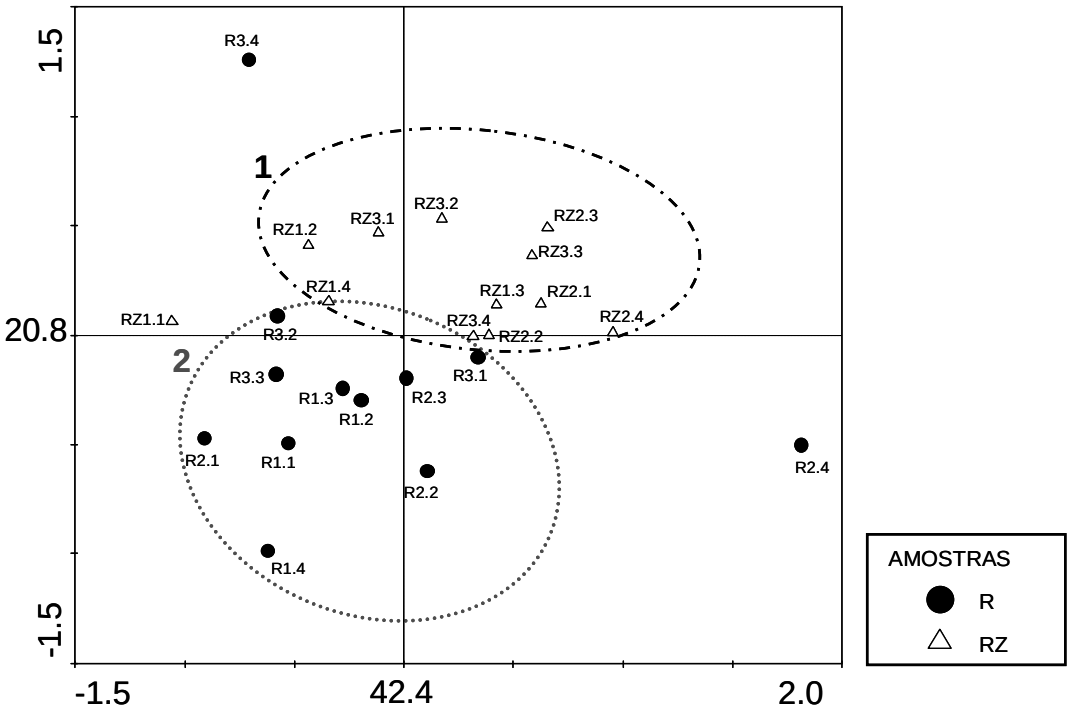


Figura 3.14 – Análise de componentes principais (PCA) a partir da ocorrência dos diferentes gêneros fúngicos na comunidade de fungos endofíticos da raiz (● **R**) e na comunidade de fungos da rizosfera (Δ **RZ**). Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos

3.2.3 Discussão

Fungos associados às plantas são imensos reservatórios de novos compostos químicos, atividades biológicas e processos biotecnológicos, cujo potencial encontra-se precariamente explorado. A diversidade estimada para esses microrganismos é imensa, porém menos de 7 % das espécies fúngicas é conhecida (HAWKSWORTH, 2004). O escasso número de trabalhos a respeito de comunidades fúngicas em ambientes tropicais, aliada ao fato de que a diversidade esperada nesses ambientes é ainda maior, tem estimulado o mapeamento da diversidade fúngica em plantas tropicais nos últimos anos. O presente trabalhou buscou acessar a diversidade da comunidade de fungos associados à cana-de-açúcar presente em dois locais diferentes, interior das raízes (endófitos) e rizosfera, e avaliar a possível presença de correlação entre a composição da comunidade fúngica e os locais de isolamento avaliados.

A identificação taxonômica de 249 isolados fúngicos, obtidos anteriormente em experimento descrito no Capítulo 2 do presente trabalho, foi realizada por métodos moleculares e

análises de bioinformática. Tradicionalmente, a taxonomia de fungos é baseada em características morfológicas e de estruturas reprodutivas (SETTE et al., 2006). Entretanto, esses métodos convencionais de identificação são muito trabalhosos e demorados (WU et al., 2003), além do mais, fungos que não esporulam, ou esporulam muito pouco, geralmente não podem ser identificados. O advento de sistemas de identificação baseados na diversidade de sequências de DNA trouxe um grande avanço no campo da taxonomia. Esses métodos oferecem alta sensibilidade e especificidade, podendo ser utilizados para realização de classificações taxonômicas em diferentes níveis hierárquicos (SETTE et al., 2006). No presente estudo, inicialmente, a precisão da identificação taxonômica de isolados fúngicos utilizando diferentes regiões do rDNA, ITS1-5,8S-ITS2 ou fragmento do 18S, foi comparada através da construção de árvore filogenética para 27 sequências de fungos isolados de cana-de-açúcar e sequências similares disponíveis no banco de dados GenBank. Os resultados mostraram que a utilização da região ITS1-5,8S-ITS2 no agrupamento filogenético permitiu a classificação taxonômica de fungos em níveis inferiores de táxons àqueles obtidos pelo uso da sequência do 18S. De fato, sequências ITS geralmente fornecem resoluções taxonômicas maiores que sequências geradas a partir de regiões codantes (ANDERSON; CAIRNEY, 2004), e têm sido extensivamente utilizadas na identificação taxonômica e filogenia de fungos (ANDERSON; CAMPBELL; PROSSER, 2003; ARNOLD; MAYNARD; GILBERT, 2001; BAAYEN et al., 2002; GUO; HYDE; LIEW, 2000; KERNAGHAN; SIGLER; KHASA, 2003; KLEINA et al., 2004; MORAKOTKARN; KAWASAKI; SEKI, 2007; OKANE; NAKAGIRI; ITO, 2001).

Dessa forma, a classificação taxonômica dos 249 isolados fúngicos foi realizada com base na região ITS1-5,8S-ITS2, e os resultados obtidos permitiram a classificação de 65,1% dos isolados em nível de gênero, 25,7% em nível de espécie e 9,2% somente foram identificados em níveis menos específicos, sendo que alguns deles podem se tratar de gêneros ainda não descritos na literatura. De maneira geral, foi observado que a comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar é composta por pelo menos 35 gêneros diferentes, distribuídos nos filos Ascomicota (96,0%), Zigomicota/Mucoromicotina (2,4%) e Basidiomicota (1,6%). A predominância de ascomicetos na comunidade fúngica isolada de plantas já foi reportada anteriormente (BILLS, 1996; CARROLL, 1988; SRIDHAR; RAVIRAJA, 1995; WANG; GUO; HYDE, 2005; ZIJLSTRA et al., 2005). Isso ocorre principalmente porque esse tipo de análise está limitada aos fungos cultivados e às condições avaliadas, ou seja, provavelmente a metodologia e amostragem

utilizadas foram incapazes de representar adequadamente alguns grupos de fungos presentes na comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar, mas ainda assim o método utilizado fornece valiosas informações acerca da quantidade e composição dos fungos filamentosos cultiváveis associados à cana-de-açúcar. Ao avaliar a comunidade de fungos endofíticos de folhas de cana-de-açúcar transgênica (expressando resistência ao herbicida imazapir) e convencional tanto por métodos dependentes de cultivo como independentes, Stuart (2006) verificou que o método dependente de cultivo foi incapaz de detectar a presença de basidiomicetos, os quais estavam presentes e foram observados por meio da análise independente de cultivo, utilizando iniciadores que amplificam preferencialmente esse grupo para construção de uma biblioteca de metagenômica. Na verdade, basidiomicetos raramente são isolados pelo método do cultivo de fragmentos vegetais em meio de cultura, ou por não serem identificados, já que a maioria dos trabalhos tem focado em fungos que esporulam, ou devido ao tipo de tecido vegetal amostrado (CROZIER et al., 2006). De fato, discrepâncias entre as comunidades fúngicas avaliadas pelos métodos dependente e independente de cultivo têm sido relatadas na literatura (GÖTZ et al., 2006; ZUCCARO; SCHULZ; MITCHELL, 2003).

O filo Ascomicota foi representado por quatro classes (Eurotiomicetos, Sordariomicetos, Dothideomicetos e Leotiomicetos), sendo que as duas primeiras juntas representaram cerca de 80% da comunidade fúngica avaliada. Os gêneros mais frequentes (*Penicillium, Fusarium, Aspergillus, Trichoderma* e *Epicoccum*) compreenderam 65,4% dos isolados e, em contrapartida, 46% dos gêneros observados foram representados por apenas um isolado. Esses dados corroboram resultados obtidos anteriormente acerca de fungos associados às plantas, em que geralmente um grande número de espécies pode ser isolado de um determinado hospedeiro, mas que apenas algumas espécies estão presentes em quantidades significativas (espécies dominantes) (DUNHAM; LARSSON; SPATAFORA, 2007; MACIÁ-VICENTE et al., 2008; PETRINI et al., 1992). O gênero *Epicoccum*, quinto mais frequente na comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar, já foi observado anteriormente como endófito de bananeira (PEREIRA; CARNEIRO-VIEIRA; AZEVEDO, 1999) e macieira (CAMATTI-SARTORI et al., 2005), e também na micobiota da rizosfera de trigo (DAL BELLO; SISTERNA; MONACO, 2003). Já os gêneros *Penicillium, Fusarium, Aspergillus* e *Trichoderma* têm sido extensivamente relatados como endófitos de diversos hospedeiros, em alguns casos, inclusive, como os gêneros mais frequentes. No estudo de Cao, You e Zhou (2002), por exemplo, os fungos endofíticos de raízes de

bananeiras mais frequentemente isolados pertenciam aos gêneros *Aspergillus, Penicillium* e *Fusarium*. Em neem predominaram os gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* (VERMA et al., 2007) e em trigo, *Fusarium* e *Penicillium* (LARRAN et al., 2007). Além disso, esses gêneros também têm sido comumente isolados da rizosfera de outros hospedeiros, como *Picea mariana* (VUJANOVIC et al., 2007), milheto (KUMAR et al., 2005), cevada (ORAZOVA; POLYANSKAYA; ZVYAGINTSEV, 1999) e juta (BASHAR; KHATUN, 1999).

Os gêneros *Penicillium* (teleomorfo *Talaromyces* ou *Eupenicillium*) e *Aspergillus* são ascomicetos da família Trichocomaceae. Muitas espécies dessa família possuem importância na medicina, microbiologia industrial, agricultura, biodeterioração e biotecnologia (SEIFERT; LÉVESQUE, 2004). Em plantas, esses gêneros podem ser encontrados como patógenos, geralmente sem grande importância econômica, e também como endófitos de diferentes hospedeiros (AGUSTA; OHASHI; SHIBUYA, 2006; CAO; YOU; ZHOU, 2002; LARRAN et al., 2007; SANTOS et al., 2003; VERMA et al., 2007). No presente estudo foram observadas pelo menos três espécies diferentes de *Aspergillus* (*A. brasiliensis, A. fumigatus* e *A. terreus*) e de *Penicillium* (*P. pinophilum, E. javanicum* e *T. trachyspermus*). O gênero *Fusarium* (teleomorfo *Gibberella*) é descrito tanto em plantas herbáceas como em lenhosas como importante patógeno causador de grandes perdas econômicas. Em cana-de-açúcar, as espécies *F. verticillioides* (*Gibberella fujikuroi*) e *F. subglutinans* são descritas como agentes causais da *Pokkah-boeng* e podridão de *Fusarium*, podendo ocorrer como patógenos latentes, que sob condições de estresse podem manifestar a doença na planta (TOKESHI; RAGO, 2005). Os fungos desse gênero também têm sido isolados como endofíticos de vários hospedeiros, por exemplo, *F. mangiferae* e *F. sterilihyphosum* em mangueiras (BRITZ et al., 2002), *F. solani* em palmeiras (TAYLOR; HYDE; JONES, 1999), *F.* cf. *avenaceum, F. decemcellulare* e *F. solani* em *Manilkara bidentata* (LODGE; FISHER; SUTTON, 1996) e *F. graminearum* em trigo (LARRAN et al., 2007). Inclusive, algumas linhagens endofíticas da espécie *F. oxysporum* possuem potencial para utilização como agentes de controle biológico, como verificado em pepino contra o patógeno *Pythium ultimum* (BENHAMOU; GARAND; GOULET, 2002). No presente trabalho 42 isolados foram afiliados à esse gênero, sendo que *F. oxysporum* foi a espécie predominate.

O gênero *Trichoderma* (teleomorfo *Hypocrea*) abrange fungos de solo, raízes e folhas, que se destacam pelo rápido crescimento, capacidade de utilizar diferentes tipos de substratos e resistência à compostos nocivos (KUBICEK et al., 2003). Eles possuem distribuição cosmopolita,

sendo predominantes na micobiota de vários solos de diferentes zonas climáticas (DANIELSON; DAVEY, 1973; KLEIN; EVELEIGH, 1998; ROIGER; JEFFERS; CALDWELL, 1991; WARDLE; PARKINSON; WALLER, 1993), mas também têm sido observados como endófitos em cacaueiro (BAILEY et al., 2008; DE SOUZA et al., 2008; EVANS; HOLMES; THOMAS, 2003), neem (VERMA et al., 2007), bananeira (PHOTITA et al., 2001) e figueira (SURYANARAYANAM; VIJAYKRISHNA, 2001). Algumas espécies desse gênero possuem importância econômica em função da grande capacidade de produzir enzimas e antibióticos, potencial como agente de controle biológico e habilidade de induzir crescimento e desenvolvimento vegetal (HARMAN, 2006; HARMAN et al., 2004). No presente estudo, onze isolados foram classificados como *Trichoderma*, e pelo menos duas espécies, *T. virens* e *T. asperellum*, puderam ser identificadas.

A comparação dos dados sobre a comunidade fúngica deste trabalho com a literatura disponível para cana-de-açúcar, mesmo que ainda muito escassa, revelou a presença de gêneros fúngicos cosmopolitas nessa cultura, isto é, gêneros que foram observados neste e em mais algum outro estudo, indicando que a associação deles com plantas de cana-de-açúcar deve ser um fenômeno comum na natureza. Para a micobiota da rizosfera os gêneros cosmopolitas foram *Acremonium, Aspergillus, Cladosporium, Chaetomium, Cunninghamella, Curvularia, Fusarium, Penicillium, Trichoderma* e *Paecilomyces* (ABDEL-RAHIM; BAGHADADI; ABDALLA, 1983; EL-AMIN; SAADABI, 2007; EL-HISSY; ABDEL-HAFEZ; ABDEL-KADER, 1980; EL AMIN; ABDALLA, 1980). Já a micobiota endofítica cosmopolita compreendeu os gêneros *Aspergillus, Epicoccum, Fusarium, Penicillium* e *Trichoderma* (FÁVARO, 2009; STUART, 2006; STUART et al., 2010; VON MUHLEN; SILVA, 2005). Além disso, outros gêneros identificados no presente trabalho já foram descritos anteriormente como endófitos de plantas tropicais, como *Alternaria* em cajueiro (FREIRE; BEZERRA, 2001), *Diaporthe* em *Camellia sinensis* (AGUSTA; OHASHI; SHIBUYA, 2006), *Nigrospora* em bananeira (PHOTITA et al., 2001) e *Cuscuta reflexa* (SURYANARAYANAN; SETHILARASU; MURUUGANANDAM, 2000), *Phomopsis* em cajueiro (FREIRE; BEZERRA, 2001) e bananeira (PHOTITA et al., 2001), e *Thielavia* em *Rhizophora apiculata* e *R. mucronata* (SURYANARAYANAN; KUMARESAN; JOHNSON, 1998).

A impossibilidade de identificar em nível de gênero uma porção (9,2%) da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar avaliada no presente trabalho pode estar associada à falta de

sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 de representantes do gênero disponibilizadas no GenBank, a limitações da técnica utilizada e ao fato de que alguns isolados podem se tratar de espécies que ainda não foram descritas na literatura. Inclusive, dentre os fungos não identificados, três isolados (248, 281 e 304) têm grande potencial como nova espécie, uma vez que nos filogramas construídos eles se distanciaram notavelmente dos outros gêneros fúngicos, e estudos mais detalhados devem ser conduzidos para identificação adequada desses isolados. A descoberta de novas espécies fúngicas a partir da análise de comunidades de fungos associados às plantas é esperada, já que as vasta diversidade plantas vasculares é considerada o maior reservatório de novos fungos (HAWKSWORTH; ROSSMAN, 1997).

A construção das curvas de rarefação mostrou que a amostragem utilizada no presente trabalho, ainda que considerada pequena em meio às proporções esperadas de diversidade fúngica, foi suficiente para acessar a diversidade dos fungos associados à cana-de-açúcar nos níveis de similaridade de 95% e 97%, os quais podem ser considerados representativos do nível taxonômico de gêneros (embora esta seja apenas uma generalização, já que as similaridades variam consideravelmente de acordo com o fungo em questão). Nesse ponto vale lembrar que, embora a amostragem adotada no estudo não tenha sido suficiente para esgotar a diversidade da comunidade avaliada, ela conseguiu determinar os gêneros dominantes e pelo menos uma porção dos gêneros de baixa ocorrência. Segundo Sieber (2002), amostras relativamente pequenas são suficientes para detectar as espécies dominantes de fungos endofíticos de raiz. Os índices de diversidade (Shannon-Wienner) e riqueza (Chao1) obtidos para as similaridades de 95% e 97% foram altos ($H'_{(95\%)}$=3,53; $H'_{(97\%)}$=3,64; $Chao1_{(95\%)}$=98; $Chao1_{(97\%)}$=134), indicando que a comunidade de fungos associados às raízes de cana-de-açúcar (endófitos e micobiota da rizosfera) abriga grande diversidade e riqueza de fungos. Além disso, os dados de rarefação, diversidade e riqueza indicaram que a comunidade de fungos endofíticos de raiz abrange uma menor diversidade de gêneros fúngicos do que a micobiota da rizosfera. O que de certa forma é esperado, considerando a enorme densidade de fungos que colonizam o solo e o efeito rizosférico. A existência do efeito rizosférico foi evidenciada no estudo conduzido por Gomes et al. (2003), onde a comparação entre perfis de DGGE de comunidades fúngicas da rizosfera e de solo cultivado com milho revelou um aumento substancial na abundância relativa de determinadas populações fúngicas na rizosfera. Embora a diversidade de fungos endofíticos tenha sido menor do que da micobiota da rizosfera, o valor obtido (H'=3,12) é equivalente ao

encontrado em estudos com endófitos de outros hospedeiros (CHOI, 2002; MINGUEL; BAYMAN, 2003). Além da diferença na diversidade apresentada pelas comunidades fúngicas de raiz e rizosfera, os dados de coeficiente de similaridade (J=0,343), da frequência e distribuição dos gêneros por local de isolamento e da PCA mostraram que essas comunidades fúngicas também diferem na composição e proporção de ocorrência dos gêneros, ou seja, além dos gêneros em comum, alguns gêneros são restritos ou predominam em determinado local de isolamento (raiz ou rizosfera). Essa especificidade de comunidades fúngicas ao local de isolamento já foi descrita anteriormente em outros hospedeiros (FRÖHLICH; HYDE; PETRINI, 2000; KUMAR; HYDE, 2004; SANTOS et al., 2003), e parece ser relativamente comum para fungos já que cada tecido da planta, solo ou rizosfera possuem diferentes propriedades e constituem diferentes micro-ambientes.

No presente trabalho, 249 fungos pertencentes à comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar, isolados do interior de raízes e da rizosfera, foram identificados. A predominância do filo Ascomicota e dos gêneros *Penicillium, Fusarium, Aspergillus, Trichoderma* e *Epicoccum* foram características evidentes da comunidade avaliada. As micobiotas endofítica e da rizosfera apresentaram diferenças na diversidade, composição e frequência de ocorrência de gêneros fúngicos, indicando a existência de especificidade ao local de isolamento. Esse é o primeiro trabalho envolvendo a identificação molecular de um grande número de isolados e descrição da diversidade de fungos na cultura da cana-de-açúcar. Além disso, a utilização do método dependente de cultivo permitiu a obtenção de uma coleção de linhagens fúngicas, as quais podem ser utilizadas em trabalhos futuros, em busca da compreensão da interação com a planta hospedeira e avaliação do potencial de aplicação dos mesmos na agricultura ou em processos biotecnológicos.

Referências

ABDEL-RAHIM, A. M.; BAGHADADI, A. M.; ABDALLA, M. H. Studies on fungus flora in the rhizosphere of sugarcane plants. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 81, p. 183-186, 1983.

AGRIOS, G. N. Plant diseases caused by fungi. In: AGRIOS, G. N. (Ed.). **Plant Pathology**. London: Academic Press, 1997. p. 245-406.

AGUSTA, A.; OHASHI, K.; SHIBUYA, H. Composition of the endophytic filamentous fungi isolated from the tea plant *Camellia sinensis*. **Journal of Natural Medicine**, Pretoria, v. 60, p. 268-272, 2006.

ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, J. W. G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, New York, v. 6, p. 769-779, 2004.

ANDERSON, I. C.; CAMPBELL, C. D.; PROSSER, J. I. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. **Environmental Microbiology**, New York, v. 5, p. 36-47, 2003.

ARNOLD, A. E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G. S. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 1502-1507, 2001.

ARNOLD, A. E.; MAYNARD, Z.; GILBERT, G. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, Oxford, v. 3, p. 267-274, 2000.

ARNOLD, E. A.; MEJIA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen plant–fungal symbiosis damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, p. 15649-15654, 2003.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESMHMUKH, S. K. (Ed.). **Fungi:** multifaceted microbes. Boca Raton: CRC Press, 2007. chap. 12, p. 191-209.

BAAYEN, R. P.; BINANTS, P. J. M.; VERKLEY, G.; CARROLL, G. C.; VAN DER AA, H. A.; DE WEERDT, M.; VAN BROUWERSHAVEN, I. R.; SCHUTTE, G. C.; MACCHERONI JR, W.; GLIENKE-BLANCO, C.; AZEVEDO, J. L. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitan endophyte of woody plants, *G. mangiferae* (*Phyllosticta capitalensis*). **Phytopathology**, Lancaster, v. 92, p. 464-477, 2002.

BACON, C. W.; HILL, N. S. Symptomless grass endophytes: products of coevolutionary symbioses and their role in the ecological adaptations of grasses. In: REDKIN, S. C.; CARRIS, L. M. (Ed.). **Endophytic fungi in grasses and woody plants**. St Paul: APS Press, 1996. p. 155-178.

BAILEY, B. A.; BAE, H.; STREM, M. D.; CROZIER, J.; THOMAS, S. E.; SAMUELS, G. J.; VINYARD, B. T.; HOLMES, K. A. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 24-35, 2008.

BASHAR, M. A.; KHATUN, M. T. Rhizosphere and rhizoplane mycoflora of jute (*Corchorus capsularis* L.) and their antagonistic potential against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **Bangladesh Journal of Botany**, Dhaka, v. 28, p. 69-77, 1999.

BENHAMOU, N.; GARAND, C.; GOULET, A. Ability of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 4044-4060, 2002.

BILLS, G. F. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. In: REDLIN, S. C.; CARRIS, L. M. (Ed.). **Endophytic fungi in grasses and woody plants:** systematics, ecology and evolution. St Paul: APS Press, 1996. p. 31-65.

BRITZ, H.; STEENKAMP, E. T.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; MARASAS, W. F.; WINGFIELD, M. J. Two new species of *Fusarium* section Liseola associated with mango malformation. **Mycologia**, Lancaster, v. 94, p. 722-730, 2002.

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

CAO, L. X.; YOU, J. L.; ZHOU, S. N. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 18, p. 169-171, 2002.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, Brooklyn, v. 69, p. 2-9, 1988.

CLAY, K.; HOLAH, J. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. **Science**, Washington, v. 285, p. 1742-1745, 1999.

CHOI, Y.W. **Biodiversity of endophytic fungi of *Brucea javanica***. 2002. 210p. Dissertação de Mestrado - The University of Hong Kong, Hong Kong, 2002.

CROZIER, J.; THOMAS, S. E.; AIME, M. C.; EVANS, H. C.; HOLMES, K. A. Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. **Plant Pathology**, London, v. 55, p. 783-791, 2006.

DAL BELLO, G. M.; SISTERNA, M. N.; MONACO, C. I. Antagonistic effect of soil rhizosphere microorganisms on *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of wheat seedling blight. **International Journal of Pest Management**, London, v. 49, p. 313-317, 2003.

DANIELSON, R. M.; DAVEY, C. B. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 5, p. 486-494, 1973.

DE SOUZA, J. T.; BAILEY, B. A.; POMELLA, A. W. V.; ERBE, E. F.; MURPHY, C. A.; BAE, H.; HEBBAR, P. K. Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 36-45, 2008.

DUNHAM, S. M.; LARSSON, K.-H.; SPATAFORA, J. W. Species richness and community composition of mat-forming ectomycorrhizal fungi in old- and second-growth Douglas-fir forests of the HJ Andrews Experimental Forest, Oregon, USA. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 17, p. 633-645, 2007.

EL-AMIN, A.-N.; SAADABI, A. M. A. Contribution to the knowledge of soil fungi in Sudan rhizosphere mycoflora of sugarcane at Kenana sugar Estate. **International Journal of Botany**, Islamabad v. 3, p. 97-102, 2007.

EL-HISSY, F. T.; ABDEL-HAFEZ, S. I.; ABDEL-KADER, M. I. Rhizosphere fungi of five plants in Egypt. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim v. 20, p. 177-184, 1980.

EL AMIN, E.; ABDALLA, M. H. Survey of soil fungi from the Sudan Gezira. **Mycopathologia**, Den Haag v. 71, p. 131-136, 1980.

EVANS, H. C.; HOLMES, K. A.; THOMAS, S. E. Mycobiota of an indigenous *Theobroma* species (*Sterculiaceae*) in Ecuador: assessing its potential for biological control of cocoa diseases. **Mycological Progress**, Berlin, v. 2, p. 149-160, 2003.

FÁVARO, L.C.L. **Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.)**. 2009. 219p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FRAVEL, D.; OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. **New Phytologist**, London, v. 157, p. 493-502, 2003.

FREIRE, C. O.; BEZERRA, J. L. Foliar endophytic fungi of Ceara State (Brazil): A preliminary study. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 27, p. 304-308, 2001.

FRÖHLICH, J.; HYDE, K. D. Biodiversity of palm fungi in the tropics: Are global fungal diversity estimates realistic? **Biodiversity and Conservation**, London, v. 8, p. 977-1004, 1999.

FRÖHLICH, J.; HYDE, K. D.; PETRINI, O. Endophytic fungi associated with palms. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 1202-1212, 2000.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 14, p. 12-16, 2000.

GOMES, N. C. M.; FAGBOLA, O.; COSTA, R.; RUMJANEK, N. G.; BUCHNER, A.; MENDONA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 3758-3766, 2003.

GÖTZ, M.; NIRENBERG, H.; KRAUSE, S.; DRAEGER, H. S.; BUCHNER, A.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 58, p. 404-413, 2006.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A. M. Development in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, p. 454-500, 1999.

GUO, L. D.; HYDE, K. D.; LIEW, E. C. Y. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. **New Phytologist**, London, v. 147, p. 617-630, 2000.

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Lancaster, v. 96, p. 190-194, 2006.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 43-56, 2004.

HARVEY, P. J.; CAMPANELLA, B. F.; CASTRO, P. M.; HARM, H.; LICHTFOUSE, E.; SCHAFFNER, A. R.; SMRCEK, S.; WERCK-REICHHART, D. Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. **Environmental Science and Pollution Research International**, Berlin, v. 9, p. 29-47, 2002.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, p. 641-655, 1991.

HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 50, p. 9–18, 2004.

HAWKSWORTH, D. L.; ROSSMAN, A. Y. Where are all the undescribed fungi? **Phytopathology**, Lancaster, v. 87, p. 888-891, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores de produtividade nacional. Disponível em: <http://www.ibge.com.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200910_5.shtm>. Acesso em: 26 nov. 2009.

KERNAGHAN, G.; SIGLER, L.; KHASA, D. Mycorrhizal and root endophytic fungi of containerized *Picea glauca* seedlings assessed by rDNA sequence analysis. **Microbial Ecology**, New York, v. 45, p. 128-136, 2003.

KLEIN, D.; EVELEIGH, D. E. Ecology of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (Ed.). ***Trichoderma and Gliocladium*:** basic biology, taxonomy and genetics. London: Taylor & Francis, 1998. chap. 3, p. 57-74.

KLEINA, P.; BETTIM-BANDINELLI, J.; BONATTO, S. L.; BENCHIMOL, M.; BOGO, M. R. Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8S rRNA and ITS-2 sequences. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 34, p. 963-970, 2004.

KUBICEK, C. P.; BISSETT, J.; DRUZHININA, I.; KULLNIG-GRADINGER, C.; SZAKACS, G. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, p. 310-319, 2003.

KUMAR, D. S. S.; HYDE, K. D. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 17, p. 69-90, 2004.

KUMAR, S.; SHARMA, S.; SHARMA, B. K.; THAKUR, D. P. Downy mildew of pearl millet-rhizosphere, rhizoplane and phylloplane studies. **Annals of Agricultural and Biological Research**, s.l., v. 10, p. 47-51, 2005.

LARRAN, S.; PERELLÓ, A.; SIMÓN, M. R.; MORENO, V. The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). **World Journal Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 23, p. 565-572, 2007.

LODGE, D. J.; FISHER, P. J.; SUTTON, B. C. Endophytic fungi of *Manikara bidentata* leaves in Puerto Rico. **Mycologia**, Lancaster, v. 88, p. 733-738, 1996.

MACIÁ-VICENTE, J. G.; JANSSON, H.-B.; ABDULLAH, S. K.; DESCALS, E.; SALINAS, J.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Fungal root endophytes from natural vegetation in Mediterranean environments with special reference to *Fusarium* spp. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 64, p. 90-105, 2008.

MÁRQUEZ, L. M.; REDMAN, R. S.; RODRIGUEZ, R. J.; ROOSSINCK, M. J. A virus in a fungus in a plant—three way symbiosis required for thermal tolerance. **Science**, Washington, v. 315, p. 513-515, 2007.

MENDES, R. **Diversidade e caracterização genética de comunidades microbianas endofíticas associadas à cana-de-açúcar**. 2008. 119p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. (Org.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife: UFPE: 2007, p. 129-140.

MINGUEL, A. G.; BAYMAN, P. Communities of endophytic fungi in leaves of tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). **Biotropica**, Washington, v. 33, p. 352-360, 2003.

MORAKOTKARN, D.; KAWASAKI, H.; SEKI, T. Molecular diversity of bamboo-associated fungi isolated from Japan. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 266, p. 10-19, 2007.

OKANE, I.; NAKAGIRI, A.; ITO, T. Identity of *Guignardia* sp. inhabiting ericaceous plants. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 79, p. 101-109, 2001.

ORAZOVA, M. K.; POLYANSKAYA, L. M.; ZVYAGINTSEV, D. G. The structure of the microbial community in the barley root zone **Mikrobiologiya**, Moskva, v. 68, p. 127-133, 1999.

PEREIRA, J. O.; CARNEIRO-VIEIRA, M. L.; AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 15, p. 37-40, 1999.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, New York, v. 1, p. 185-196, 1992.

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

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

REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis: from mutualism to parasitism, who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist**, London, v. 151, p. 705-716, 2001.

REDMAN, R. S.; SHEEHAN, K. B.; STOUT, R. G.; RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J. M. Thermotolerance conferred to plant host and fungal endophyte during mutualistic symbiosis. **Science**, Washington, v. 298, p. 1581, 2002.

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE JR, J. F.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, London, v. 182, p. 314-330, 2009.

ROIGER, D. J.; JEFFERS, S. N.; CALDWELL, R. W. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 23, p. 353-359, 1991.

SAHAY, N. S.; VARMA, A. *Piriformospora indica*: a new biological hardening tool for micropropagated plants. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 181, p. 297-302, 1999.

SANTOS, R. M. G.; RODRIGUES-FO, E.; ROCHA, W. C.; TEIXEIRA, M. F. S. Endophytic fungi from *Melia azedarach*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford v. 19, p. 767-770, 2003.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SEIFERT, K. A.; LÉVESQUE, C. A. Phylogeny and molecular diagnosis of mycotoxigenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 449-471, 2004.

SELOSSE, M.-A.; TACON, F. L. The land flora: a phototrophfungus partnership? **Trends in Ecology & Evolution**, Cambridge, v. 13, p. 15-20, 1998.

SETTE, L. D.; PASSARINI, M. R. Z.; DELARMELINA, C.; SALATI, F.; DUARTE, M. C. T. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 22, p. 1185-1195, 2006.

SIEBER, T. N. Fungal root endophytes. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, U. (Ed.). **Plant Roots:** the hidden half. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 887-917.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B.; VAN ELSAS, J. D.; WERNARS, K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2614-2621, 1999.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. New York: Academic Press, 1997. 605p.

SRIDHAR, K. R.; RAVIRAJA, N. S. Endophytes – a crucial issue. **Current Science**, Bangalore, v. 69, p. 570-571, 1995.

STUART, R. M. **Comunidade de fungos endofíticos associada à cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada**. 2006. 66p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

STUART, R. M.; ROMÃO, A. S.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Culturable endophytic filamentous fungi from leaves of transgenic imidazolinone-tolerant sugarcane and its non-transgenic isolines. **Archives of Microbiology**, Berlin, 2010. In press.

SURYANARAYANAM, T. S.; VIJAYKRISHNA, D. Fungal endophytes of aerial roots of *Ficus benghalensis*. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 8, p. 155-161, 2001.

SURYANARAYANAN, T. S.; KUMARESAN, V.; JOHNSON, J. A. Foliar fungal endophyes from two species of the mangrove *Rhizophora*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 1003-1006, 1998.

SURYANARAYANAN, T. S.; SETHILARASU, G.; MURUUGANANDAM, C. Endophytic fungi from *Cuscuta reflexa* and its host plants. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 4, p. 117-123, 2000.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KITAMI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 246-257.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. *MEGA4*: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TAYLOR, J. E.; HYDE, K. D.; JONES, E. B. G. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. **New Phytologist**, London, v. 142, p. 335-346, 1999.

TER BRAAK, C. J. F.; ŠMILAUER, P. **CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide:** Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Ithaca: Microcomputer Power, 2002. 500p.

VERMA, V. C.; GOND, S. K.; KUMAR, A.; KHARWAR, R. N.; STROBEL, G. The endophytic mycoflora of bark, leaf, and stem tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Varanasi (India). **Microbial Ecology**, New York, v. 54, p. 119-125, 2007.

VON MUHLEN, G.; SILVA, M. E. Ocorrência de fungos endofíticos em cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 27, p. 183-186, 2005.

VUJANOVIC, V.; HAMELIN, R. C.; BERNIER, L.; VUJANOVIC, G.; ST-ARNAUD, M. Fungal diversity, dominance, and community structure in the rhizosphere of clonal *Picea mariana* plants throughout nursery production chronosequences. **Microbial Ecology**, New York, v. 54, p. 672-684, 2007.

WALLER, F.; ACHATZ, B.; BALTRUSCHAT, H.; FODOR, J. Z.; BECKER, K.; FISCHER, M.; HEIER, T.; HÜCKELHOVEN, R.; NEUMANN, C.; VON WETTSTEIN, D.; FRANKEN, P.; KOGEL, K.-H. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, p. 13386-13391, 2005.

WANG, Y.; GUO, L. D.; HYDE, K. D. Taxonomic placement of sterile morphotypes of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in northeast China based on rDNA sequences. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 20, p. 235-260, 2005.

WARDLE, D. A.; PARKINSON, D.; WALLER, J. E. Interspecific competitive interactions between pairs of fungal species in natural substrates. **Oecologia**, Berlin, v. 94, p. 165-172, 1993.

WHIPPS, J. M.; LUMSDEN, R. D. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: BUTT, T.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungal Biocontrol Agents:** progress, problems and potential. Wallingford: CABI Publishing, 2001. p. 9-22.

WHITE, T.; BURNS, 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.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domain Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 87, p. 4576-4579, 1990.

WU, Z.; TSUMURA, T.; BLONQUIST, G.; WANG, X. 18S rRNA gene variation among common airborne fungi and development of specific oligonucleotide probe for the detection of fungal isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 5389-5397, 2003.

ZIJLSTRA, J. D.; VAN'T HOF, P.; BAAR, J.; VERKLEY, G. J. M.; SUMMERBELL, R. C.; PARADI, I.; BRAAKHEKKE, W. G.; BERENDSE, F. Diversity of symbiotic root endophytes of the Helotiales in ericaceous plants and the grass, *Deschampsia flexuosa*. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 53, p. 147-162, 2005.

ZUCCARO, A.; SCHULZ, B.; MITCHELL, J. Molecular detection of ascomycetes associated with *Fucus serratus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 1451-1466, 2003.

4 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO FUNGO *Trichoderma virens* E ESTUDO DA INTERAÇÃO COM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo

O fungo *Trichoderma virens* (teleomorfo *Hypocrea virens*) é considerado um dos agentes de controle biológico mais versátil e eficaz conhecido até o momento. Essa espécie, frequentemente encontrada como saprófita de solo, também pode estabelecer interações simbióticas com plantas, contribuindo com a resistência a doenças e promoção de crescimento. A presença desse fungo como endófito de raiz em cana-de-açúcar abriu a possibilidade da realização de um estudo mais detalhado da interação *T. virens*-cana-de-açúcar. Assim, o presente trabalho teve como objetivos: a) estabelecer um protocolo de transformação pelo sistema *Agrobacterium tumefaciens* para *T. virens*; b) gerar mutantes com resistência à higromicina B e expressando a proteína GFP; c) confirmar o comportamento endofítico de *T. virens* em cana-de-açúcar via reisolamento e estudar a colonização de tecidos radiculares de cana-de-açúcar por microscopia óptica de fluorescência (MOF) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e d) estimar os efeitos desse fungo no crescimento e acúmulo de biomassa de plantas de cana-de-açúcar, arroz e feijão. A agrotransformação de *T. virens* foi realizada com sucesso a partir da determinação das condições mais adequadas, as quais incluíram a utilização de membranas de náilon ou papel de filtro, carga de inóculo 10^7 conídios.mL^{-1}, 36 horas de co-cultivo, 200 ou 400 µM de acetoseringona no meio de co-cultivo e condição *normal* ou com *sobrecamada* no meio de seleção. A eficiência média de transformação obtida com essas condições foi de 11,5 transformantes por 10^7 conídios.mL^{-1}. Os transformantes obtidos apresentaram alta estabilidade mitótica e a inserção do T-DNA no genoma do fungo foi confirmada por PCR e *Southern blot*. O transformante **T20**, cujas características morfológicas, taxa de crescimento e esporulação são muito semelhantes às da linhagem selvagem, foi selecionado para os estudos de interação via reisolamento e microscopia. O reisolamento da linhagem **T20** após 20, 40 e 60 dias da inoculação confirmou que *T. virens* é capaz de colonizar plantas de cana-de-açúcar endofiticamente, e que esse fungo se localiza preferencialmente nas raízes da planta. O monitoramento da colonização a partir da análise da superfície de raízes sob MOF e MEV revelou que *T. virens* coloniza intensamente as superfícies do tecido radicular, sendo que as hifas do fungo formam uma densa camada micelial em torno das raízes. Além disso, a partir de cortes histológicos, também foi observado que *T. virens* é capaz de penetrar o tecido radicular, e localiza-se preferencialmente no espaço intercelular das primeiras camadas da epiderme. A inoculação de *T. virens* em plantas de cana-de-açúcar e feijão não promoveu qualquer alteração no crescimento e acúmulo de biomassa das partes aérea e radicular das plantas, indicando que a colonização dessas plantas por *T. virens* não leva a alterações fenotípicas detectáveis. Em arroz, entretanto, esse fungo parece ter promovido mudanças fisiológicas que levaram a planta a acumular maiores quantidades de água e menor biomassa nas raízes, em relação às plantas controle. Os resultados obtidos neste estudo constituem um passo importante na busca da compreensão do papel dos fungos endofíticos durante a interação com a planta hospedeira, embora, devido à complexidade dessas interações, muitos outros aspectos ainda devam ser investigados.

Palavras-chave: *Trichoderma virens*; Agrotransformação; Interação fungo-planta; Cana-de-açúcar; Reisolamento; Microscopia

4 GENETIC TRANSFORMATION OF THE FUNGUS *Trichoderma virens* AND STUDY OF THE INTERACTION WITH SUGARCANE PLANTS

Abstract

The fungus *Trichoderma virens* (teleomorph *Hypocrea virens*) is considered one of the most versatile and effective biocontrol agents studied to date. This species is commonly found as a soil saprophyte, but it can also interact symbiotically with plants, taking part in plant disease resistance and growth promotion. The finding that this fungus is a sugarcane root endophyte opened the opportunity to study the interaction *T. virens*-sugarcane in detail. Taking this into consideration, the goals of the present work were: a) to set up an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation protocol for *T. virens*; b) to generate hygromycin B resistant and GFP-expressing mutants; c) to assure the endophytic lifestyle of *T. virens* in sugarcane by re-isolation and to study root tissue colonization by epifluorescence microscopy (EM) and scanning electron microscopy (SEM), and d) to evaluate the fungus effects on growth and biomass allocation of sugarcane, rice and bean plants. *Agrobacterium*-mediated transformation was successfully performed by finding the best conditions, which included nylon or filter paper as filters, 10^7 conidia.mL^{-1} as concentration of fungal recipient cells, 36 hours as co-cultivation period, 200 or 400 µM of acetosyringone in co-cultivation plates and selective plates with or without an overlay. The mean efficiency got by using these conditions was 11.5 transformants per 10^7 conidia.mL^{-1}. The mutants generated had high mitotic stability and the T-DNA insertion on fungus genome was checked by PCR and *Southern blot*. The **T20** transformant, whose morphologic features, growth rate and conidiation are very similar to those of the wild type strain, was selected to perform the interaction analysis by re-isolation and microscopy. The re-isolation of the **T20** strain after 20, 40 and 60 days of inoculation confirmed that *T. virens* is able to colonize endophytically sugarcane plants, being localized mostly in root tissues. The microscopy observations (EM and SEM) of entire roots revealed that *T. virens* colonizes surfaces of root tissues, and a dense mycelia cover is formed by the fungus hyphae over the roots. In addition, by sectioning roots, it was also observed that *T. virens* is able to penetrate root tissue and localizes preferentially in intercellular spaces of epidermis' first layers. Inoculation of *T. virens* on sugarcane and bean plants did not promote any change on shoot and root growth or biomass allocation, indicating that the endophytic colonization by *T. virens* does not lead to visible phenotypic changes. In rice, however, this fungus may have led to plant physiological changes that induced the plant to accumulate bigger amounts of water and lesser amounts of biomass on roots, compared to the control plants. The results obtained in the present study represent an important step on the search for uncovering the role of endophytic fungi during the interaction with host plant, altough more aspects have to be investigated in face of the huge complexity of these interactions.

Keywords: *Trichoderma virens*; *Agrobacterium*-mediated transformation; Fungus-plant interaction; Sugarcane; Re-isolation; Microscopy

4.1 Introdução

O gênero *Trichoderma* abrange fungos de solo, raízes e folhas, que se destacam pelo rápido crescimento, capacidade de utilizar diferentes tipos de substratos e resistência a compostos nocivos (KUBICEK et al., 2003). Algumas espécies desse gênero possuem importância econômica em função da grande capacidade de produzir enzimas e antibióticos, pelo potencial uso como agentes de controle biológico (HJELJORD; TRONSMO, 1998; KUBICEK; PENTTILÄ, 1998; SIVASITHAMPARAM; GHISALBERTI, 1998) e pela habilidade de induzir o crescimento e desenvolvimento vegetal (HARMAN et al., 2004a). O fungo *T. virens*, por exemplo, é um saprófita vigoroso que pode ser cultivado nos mais diferentes substratos e mantido na ausência do hospedeiro. Ele tem sido bastante estudado por ser um micoparasita agressivo (HOWELL, 1982; TU, 1980), capaz de parasitar não só hifas, mas também estruturas de resistência de muitos fungos (ALUKO; HERRING, 1970; HOWELL, 1982; TU, 1980). Aliás, o micoparasitismo em *T. virens* tem sido associado com a capacidade de sintetizar quitinases extracelulares (BAEK; HOWELL; KENERLEY, 1999). Além de ser um importante micoparasita, *T. virens* também se destaca pela capacidade de produzir vários antibióticos (HOWELL, 2006). Inclusive, as linhagens de *T. virens* podem ser divididas em dois grupos distintos de acordo com a produção de antibiótico (HOWELL; STIPANOVIC; LUMSDEN, 1993). As linhagens “Q” produzem o antibiótico gliotoxina (WEINDLING, 1941), o qual tem um amplo espectro de atividade contra bactérias, actinomicetos e fungos. As linhagens “P” produzem o antibiótico gliovirina (HOWELL; STIPANOVIC, 1983), cujo espectro de ação se restringe aos Oomicetos. Curiosamente, estudos têm mostrado que a capacidade de *T. virens* em atuar como um agente de controle biológico tem pouca ou nenhuma relação com a produção de antibióticos (HOWELL; STIPANOVIC, 1995). Os mecanismos empregados no controle biológico por *T. virens* têm sido extensivamente estudados em algodão (HOWELL, 1982, 1991, 2002; HOWELL et al., 1997; HOWELL et al., 2000; HOWELL; STIPANOVIC, 1995; HOWELL; STIPANOVIC; LUMSDEN, 1993), sendo que a capacidade desse fungo em atuar como um micoparasita, sintetizar antibióticos, induzir a produção de fitoalexinas e a resistência do hospedeiro tem feito com que ele seja considerado um dos agentes de controle biológico mais versátil e eficaz contra doenças de raízes e plântulas (HOWELL, 2006).

Um fato interessante é que *T. virens* também tem sido isolado como endófito de plantas (ROMÃO; ARAÚJO, 2007; TSAVKELOVA et al., 2005). Considerando que fungos endofíticos colonizam seus hospedeiros assintomaticamente (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007; BOYLE et al., 2001), linhagens endofíticas de *T. virens* são fortes candidatos ao controle biológico de fitopatógenos, por ocuparem o mesmo nicho ecológico destes, o interior das plantas. Além disso, linhagens de *Trichoderma* spp. também têm sido largamente descritas como promotoras de crescimento e desenvolvimento vegetal (HARMAN; BJÖRJMANN, 1998; RUDRESH; SHIVAPRAKASH; PRASAD, 2005; VERMA et al., 2007; WHIPPS; LUMSDEN, 2001), o que aumenta ainda mais as vantagens da aplicação desse fungo na agricultura.

Grande parte dos estudos de Biologia Molecular depende do uso de estratégias de transformação genética. Dentre os sistemas de transformação genética desenvolvidos até o momento para fungos filamentosos pode-se fazer referência àqueles que fazem uso de protoplastos (PEG, eletroporação e REMI), biolística e *Agrobacterium tumefaciens*. A transformação mediada por *A. tumefaciens*, tradicionalmente utilizada para transformar células vegetais (EADY et al., 1996; HERNALSTEENS et al., 1980; ISHIDA et al., 1996), também tem sido empregada em leveduras (BUNDOCK et al., 1995), fungos filamentosos (DE GROOT et al., 1998) e até mesmo em células humanas (KUNIK et al., 2001). Em fungos filamentosos esse método de transformação tem mostrado uma série de vantagens em relação aos anteriormente descritos, principalmente porque consiste de um procedimento simples, de alta eficiência, reproduzível e que permite a identificação dos genes interrompidos (AMEY et al., 2002; BUNDOCK; HOOYKAAS, 1996; CAMPOY et al., 2003; FITZGERALD et al., 2003; MICHIELSE et al., 2005; MULLINS et al., 2001; RODRÍGUES-TOVAR et al., 2005). A maioria dos trabalhos que fizeram uso do sistema *Agrobacterium* para a transformação de fungos observou a inserção do T-DNA em sítios aleatórios e a predominância de inserções únicas no genoma do hospedeiro (COVERT et al., 2001; DE GROOT et al., 1998; MORIOKA et al., 2006). Essa característica torna o método de agrotransformação bastante atraente quando se deseja obter fenótipos mutantes e identificar os genes a estes relacionados. Diferentes espécies de *Trichoderma* já foram transformadas pelo sistema *Agrobacterium*, dentre elas *T. asperellum* (CARDOZA et al., 2006), *T. atroviride* (CARDOZA et al., 2006; ZEILINGER, 2004), *T. hamatum* (CARPENTER et al., 2008), *T. harzianum* (CARDOZA et al., 2006; GAO et al., 2005), *T. longibrachiatum* (CARDOZA et al., 2006) e *T. reesei* (DE GROOT et al., 1998;

ZHONG et al., 2009; ZHONG et al., 2007), entretanto, até o momento esse método não foi descrito para *T. virens.*

Diferentes abordagens podem ser realizadas no estudo da interação entre fungos endofíticos e planta hospedeira. Algumas ferramentas, como a transformação genética e a microscopia, facilitam a realização desses estudos. Por exemplo, o estudo da interação fungo-planta por microscopia tem sido facilitado pela introdução de genes repórteres, como o gene *gfp* da água viva *Aequorea victoria* e outras versões de proteínas autofluorescentes, como a proteína vermelha fluorescente (*Ds*Red) do coral *Discosoma striata* (LORANG et al., 2001; MIKKELSEN et al., 2003). Além da análise por meio de microscopia, outra estratégia empregada nas análises de interações simbióticas entre fungos e plantas é baseada na inoculação e reisolamento do fungo endofítico e na aplicação dos postulados de Koch (REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001; SCHULZ et al., 1998; SCHULZ et al., 1999; SIEBER, 2007).

O presente trabalho buscou avaliar aspectos básicos da interação da linhagem endofítica *T.v.***233** de *T. virens* com plantas de cana-de-açúcar. Para tal, foram obtidos transformantes expressando resistência ao antibiótico higromicina B e expressando o gene da proteína GFP, a partir do estabelecimento do sistema de agrotransformação para *T. virens.* As diferentes abordagens adotadas no estudo revelaram que esse fungo foi capaz de colonizar plantas de cana-de-açúcar endofiticamente, localizando-se preferencialmente nas raízes, e a sua presença como endófito não deu origem a alterações fenotípicas detectáveis na plantas.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e métodos

4.2.1.1 Isolado fúngico

Trichoderma virens linhagem *T.v.***223** trata-se de um endófito de raiz de cana-de-açúcar, isolada anteriormente da variedade SP80-1842, em experimento descrito no Capítulo 2 do presente trabalho. A classificação taxonômica dessa linhagem em *T. virens* (teleomorfo *Hypocrea* virens) foi realizada por métodos moleculares e análise de bioinformática, e encontra-se descrita detalhadamente no Capítulo 3 deste mesmo trabalho. A sequência de nucleotídeos da região

ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA da linhagem em questão, utilizada na identificação taxonômica, foi depositada no banco de dados GenBank sob número de acesso GQ495269. Note que no Capítulo 3 essa linhagem encontra-se denominada como **223**, e no presente Capítulo a linhagem foi renomeada para *T.v.***223**, apenas para fazer referência à classificação taxonômica.

4.2.1.2 Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

4.2.1.2.1 Teste de sensibilidade da linhagem *T.v.*223 à higromicina B

A inibição do crescimento de *T. virens* (linhagem *T.v.***223**) pelo antibiótico higromicina B foi determinada antes dos experimentos de agrotransformação. Para a determinação da CIM (concentração inibitória mínima) a linhagem fúngica foi inoculada em placas de petri contendo meio BDA (Batata Dextrose Ágar, Merck) contendo diferentes concentrações de higromicina B (0; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 $\mu g.mL^{-1}$). Para cada concentração de higromicina B foram avaliadas 3 cultivos. As culturas foram incubadas a 28º C durante sete dias e então o crescimento do fungo foi avaliado e a CIM determinada.

4.2.1.2.2 Linhagem de *Agrobacterium tumefaciens* e vetor de transformação

A. tumefaciens linhagem EHA105 contendo o vetor de transformação de fungos pFAT-gfp (Figura 4.1) foi gentilmente cedida pela Dr[a]. Léia C. de Lima Fávaro (Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil) para a realização dos estudos desse trabalho. O vetor binário de transformação presente na linhagem EHA105 foi cedido à Dr[a]. Léia C. de Lima Fávaro pelo Dr. Kim M. Plummer (CSIRO Plant Industry, Austrália). Esse vetor contém, na região do T-DNA, o gene de resistência a higromicina B (*hph*) de *E. coli*, sob controle do promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) de *Glomerella cingulata*, bem como o gene da proteína verde fluorescente (*gfp*), sob controle do promotor do gene *gpd* de *Aspergillus nidulans* (Figura 4.1) (FITZGERALD et al., 2003).

4.2.1.2.3 Otimização do protocolo de transformação

Para determinar as melhores condições de transformação para o fungo *T. virens*, foi adotado o protocolo descrito por De Groot et al. (1998) para fungos filamentosos e realizados testes para avaliar o melhor tipo de membrana (papel de filtro 8 µm de porosidade, nitrocelulose 0,45 µm de porosidade, náilon 0,45 µm de porosidade e celofane), o melhor meio de seleção [M-100 (STEVENS, 1974) ou BDA (Merck)], a carga de inóculo adequada (10^6 ou 10^7 conídios.mL^{-1}) e o melhor tempo de co-cultivo (24 ou 36 horas). Os testes foram realizados a partir da combinação de todas as possíveis variáveis, sendo que a eficiência de transformação de cada uma foi obtida através do cálculo de média de 20 repetições das diferentes combinações. Todos os testes foram realizados utilizando 200 µM de acetoseringona no meio de indução.

4.2.1.2.4 Transformação genética de *T. virens* por *A. tumefaciens*

A transformação de *T. virens* linhagem *T.v.***223** foi realizada de acordo com o protocolo descrito por De Groot et al. (1998) seguindo as modificações determinadas no item anterior (4.2.1.2.3). *A. tumefaciens* linhagem EHA105, carregando o plasmídio pFAT-gfp, foi

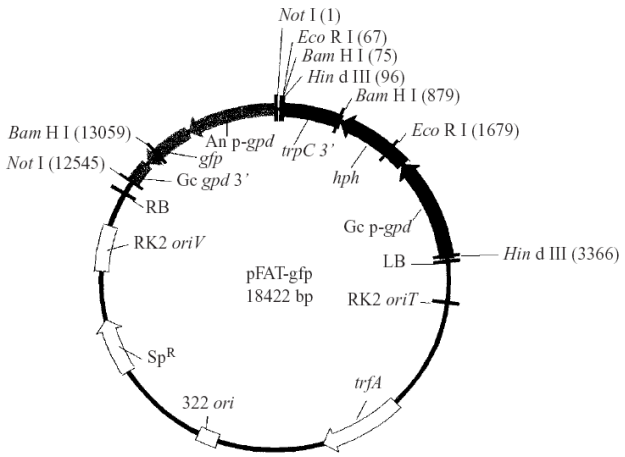


Figura 4.1 - Mapa do vetor de transformação pFAT-gfp, construído por Fitzgerald et al. (2003). (RB) borda direita do T-DNA; (LB) borda esquerda do T-DNA; (*hph*) gene de resistência a higromicina B de *E. coli*; (*trpC* 3') sinal de terminação transcricional do gene *trpC* de *A. nidulans*; (An p-*gdp*) promotor do gene gliceraldeído-3-fosfato de *A. nidulans*; (Gc p-*gpd*) promotor do gene *gpd* de *G. cingulata*; (Gc *gpd* 3') sinal de terminação transcricional do gene *gpd* de *G. cingulata*; (Sp^R) gene de resistência a espectinomicina; (RK2 *oriV*) origem de replicação vegetativa RK2; (RK2 *oriT*) origem de transferência RK2; (322 *ori*) origem de replicação de pBR322; (*trfA*) gene de replicação *trfA* de RK2; (*gfp*) gene da proteína verde fluorescente pGreen Lantern (Life Technologies). Fonte: Fitzgerald et al. (2003)

recuperada do estoque em glicerol, cultivada durante 72 horas a 28º C em meio YEP sólido (WALKERPEACH; VELTEN, 1994) suplementado com espectinomicina (200 $mg.mL^{-1}$) e rifampicina (100 $mg.mL^{-1}$). Uma colônia isolada foi transferida para frasco de vidro contendo 30 mL de meio YEP líquido suplementado com espectinomicina (200 $mg.mL^{-1}$) e rifampicina (100 $mg.mL^{-1}$) e incubada a 28º C por 16 horas sob agitação (180 rpm). Uma suspensão de células da agrobactéria foi diluída para uma densidade óptica (DO_{660}) de 0,15 em meio de indução (10 mM de K_2HPO_4, 10 mM KH_2PO_4, 2,5 mM de NaCl, 2,0 mM de $MgSO_4$, 0,7 mM de $CaCl_2$, 9,0 µM de $FeSO_4$, 4,0 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 0,5% (v/v) de glicerol, 10 mM de glicose e 40 mM de ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico esterilizado por filtração, pH 5,3, e adicionado ao meio de cultura após autoclavagem) na presença ou ausência de acetoseringona (AS) (Fluka), nas concentrações de 200 µM ou 400 µM, em volume final de 20 mL. As células foram incubadas a 28º C sob agitação (180 rpm), por um tempo adicional até que a cultura alcançasse DO_{660} de 0,7. Nas condições utilizadas, o tempo de indução de competência foi de aproximadamente 8 horas. No intervalo de crescimento da cultura bacteriana, conídios da linhagem *T.v.***223** com oito dias de crescimento foram suspensos em água e contados em câmara de Neubauer. A suspensão de conídios foi misturada com 30 mL de meio BD (caldo de 200 g de batata e 20 g de dextrose em 1 L de água, [pH 6,0]) e incubada a 28º C sob agitação (180 rpm) para indução da germinação dos conídios. Após 8 horas, a suspensão de conídios foi centrifugada e ressuspendida em água destilada para ajustar a concentração a 1 x 10^8 $conídios.mL^{-1}$. Em seguida, essa suspensão de conídios foi misturada às suspensões de *Agrobacterium* (DO_{660} = 0,7) de modo a obter a concentração de 1 x 10^7 $conídios.mL^{-1}$ num volume de 20 mL, com e sem AS (200 µM ou 400 µM). Essa mistura foi semeada (200 µL) sobre membrana de papel de filtro (8 µm de porosidade e 90 mm de diâmetro, Quanty®, Germany) ou membrana de náilon (0,45 µm de porosidade, Amersham Hybond N^+), que estavam posicionadas sobre meio de indução sólido (10 mM de K_2HPO_4, 10 mM KH_2PO_4, 2,5 mM de NaCl, 2,0 mM de $MgSO_4$, 0,7 mM de $CaCl_2$, 9,0 µM de $FeSO_4$, 4,0 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 0,5% (v/v) de glicerol, 5,0 mM de glicose, 20g de ágar e 40 mM de ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico esterilizado por filtração, pH 5,3, e adicionado ao meio de cultura após autoclavagem) contendo AS (200 µM ou 400 µM) ou não (placas controle). As culturas foram incubadas a 25º C durante 36 horas. Após esse período, que é denominado tempo de co-cultivo, as membranas foram transferidas para placas contendo meio de cultivo BDA (Merck) suplementado com 200 $µg.mL^{-1}$ de higromicina B

(Invitrogen Life Technologies) e 200 µg.mL^{-1} de cefoxitina sódica (Eurofarma) e incubadas a 28º C por 15 dias. Em metade das placas foram adicionados 5 mL de meio BDA (Merck) sólido suplementado com 200 µg.mL^{-1} de higromicina B e 200 µg.mL^{-1} de cefoxitina sódica sobre a membrana. A cefoxitina sódica é usada para eliminar a bactéria, e a higromicina B para selecionar as colônias fúngicas transformantes. As placas foram avaliadas 5, 10 e 15 dias após a transferência das membranas. As colônias resistentes a higromicina B, visualizadas após 5, 10 e 15 dias, foram contadas e repicadas para placas de Petri contendo meio de cultivo seletivo (BDA suplementado com 200 µg.mL^{-1} de higromicina B) para posterior purificação e armazenamento. Foram realizados dois experimentos de transformação, mantendo as mesmas condições, com o objetivo de avaliar a consistência do protocolo adotado no que diz respeito à repetibilidade e capacidade de obtenção de transformantes.

4.2.1.2.5 Purificação e estoque das colônias fúngicas transformadas

A purificação das colônias estocadas foi realizada por meio de diluição em série e semeadura em meio de cultura BDA (Merck). Para isso, com o auxílio de alça metálica esterilizada foram coletados conídios e/ou micélio da colônia e transferidos para tubo de 2 mL contento 1 mL de solução de salina autoclavada (8,5 g de NaCl em 1 L de água), e o tubo foi intensamente agitado utilizando-se agitador (Vortex). Após a agitação, a suspensão foi diluída até 10^{-5} e 10^{-6} e 100 µL dessas diluições foram semeadas em placas de Petri contendo meio BDA (Merck). As culturas foram incubadas em estufa a 28º C para o crescimento e obtenção de colônias isoladas. As colônias isoladas foram armazenadas de acordo com o método Castellani (ARAÚJO et al., 2002), no qual os fungos foram crescidos em meio BDA, e então foram coletados discos de meio de cultura com micélios e colocados em frascos de 10 mL contendo água esterilizada. Os frascos foram identificados e armazenados à temperatura ambiente.

4.2.1.2.6 Análise dos transformantes por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

O DNA genômico de 8 transformantes escolhidos ao acaso e da linhagem selvagem *T.v.***223** de *T. virens* foi extraído de acordo com Raeder e Broda (1985) com modificações (descritas em detalhe anteriormente no Capítulo 2 do presente trabalho), e analisado para a

presença do gene *gfp* por PCR. Os iniciadores glGFP5 (5'-GCCGGAATTCATGAGCAAGGGCGAGGAACTGTTC-3') e glGFP3 (5'-GCCGAGCTCAGATCTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'), que amplificam fragmento da sequência do gene da proteína GFP presente no vetor de transformação pFAT-gfp, foram utilizados na reação de PCR. As amplificações foram realizadas em termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94º C por 5 min, seguido de 32 ciclos de 94º C por 30 s, 60º C por 30 s e 72º C por 30 s, após os ciclos, uma extensão final a 72º C por 7 min. Cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 μL, contendo Tampão 1X (50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl, [pH 8,4]), 3,7 mM de $MgCl_2$, 1 mM de dNTP, 0,05 $U.\mu L^{-1}$ de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 0,4 μM de cada iniciador e 3 ng de DNA. O fragmento amplificado (700 pb) foi observado por eletroforese em gel de agarose 1,4% a 3 $V.cm^{-1}$, juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Fermentas). Após a eletroforese o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1 $mg.mL^{-1}$) e fotodocumentado.

4.2.1.2.7 Análise dos transformantes por *Southern blot*

4.2.1.2.7.1 Restrição do DNA genômico, eletroforese e transferência para membrana de náilon

Para a análise por *Southern blot* o DNA genômico de 4 transformantes (**T2, T7, T10** e **T20**) e da linhagem selvagem *T.v.***223** foi submetido à clivagem com a enzima de restrição *Eco*RI (Invitrogen, Life Technologies) a 10 $U.\mu L^{-1}$. A região do T-DNA do vetor pFAT-gfp apresenta dois sítios de reconhecimento para essa endonuclease, ambos localizados no cassete de expressão do gene de resistência a higromicina B (FITZGERALD et al., 2003). Dessa forma, a ausência de sítios de reconhecimento da enzima *Eco*RI no cassete de expressão do gene da proteína verde fluorescente (*gfp*) implica que a utilização desse gene como sonda na análise de *Southern blot* deve dar origem a uma única banda de 15 kb a partir da digestão do DNA do vetor pFAT-gfp e uma ou mais bandas de tamanhos variados, dependendo do local da inserção e do número de cópias inseridas, a partir da digestão do DNA dos transformantes.

A reação de restrição foi feita em um volume total de 250 μL, contendo 15 μg de DNA genômico, 25 μL de tampão React 3 10X e 40 U da enzima *Eco*RI. A reação foi incubada a 37º C durante 12 horas. Para concentrar a amostra digerida, foi feita uma precipitação adicionando 25 μL de acetato de amônio (7,8 M) e 625 μL de álcool absoluto. Após incubação a -20º C por 12 horas, o material foi centrifugado (10.000X *g* por 40 min a 4º C). O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 700 μL de álcool 70%. As amostras foram centrifugadas por mais 10 min (10.000X *g* a 4º C). O sobrenadante foi descartado e o precipitado seco a 37º C. Após a secagem, o DNA hidrolisado foi ressuspendido em 32 μL de TE, e foram adicionados 8 μL de sacarose 40% para preparo da amostra para eletroforese. O DNA hidrolisado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 1% de brometo de etídio (p/v) (1 $mg.mL^{-1}$). Foi utilizado como marcador de peso molecular o DNA Ladder 1 kb (Fermentas). Após a eletroforese, o gel foi fotodocumentado e preparado para a transferência para membrana de náilon, conforme procedimento a seguir: lavagem do gel em solução depurinizante HCl 0,25 M (10 mL de HCl em 490 mL de água ultra pura) por 10 min; lavagem com água destilada; lavagem em 500 mL de solução desnaturante (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) por 30 min; lavagem em água destilada, e duas etapas de neutralização, por 15 min cada, em 250 mL de solução neutralizadora (Tris-HCl 0,5 M; NaCl 1,5 M; EDTA 0,001 M, [pH=7,2]). A transferência do DNA contido no gel para a membrana de náilon (Hybond N^+, Amersham) foi feita por 12 horas num aparato de transferência tradicional, utilizando-se a solução de transferência SSC 20X (NaCl 3 M; citrato de sódio 0,3 M, [pH=7,0]). A membrana foi seca sobre papel de cromatografia por 2 horas em forno a 80º C e armazenada a 4º C.

4.2.1.2.7.2 Extração do plasmídio, preparo da sonda e hibridação molecular

Células de *E. coli* DH5α transformadas com o vetor pFAT-gfp foram inoculadas em meio LB líquido (5 mL) com espectinomicina 200 $\mu g.mL^{-1}$ e incubadas a 37º C sob agitação (200 rpm) por 12 horas. Em seguida, procedeu-se a extração do plasmídio com uso do kit Mobio (*Ultra Clean 6 minute mini plasmid prep kit)* seguindo as orientações do fabricante. O plasmídio de 18,4 kb foi observado por eletroforese em gel de agarose 1,4% a 3 $V.cm^{-1}$.

Para a hibridação foi utilizado como sonda um fragmento de DNA de 700 pb contendo sequência do gene *gfp*. Este fragmento foi amplificado por PCR a partir do plasmídio pFAT-gfp

com uso dos iniciadores glGFP5 (5'-GCCGGAATTCATGAGCAAGGGCGAGGAACTGTTC-3') e glGFP3 (5'-GCCGAGCTCAGATCTCACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'), segundo programa descrito no item 4.2.1.2.6. A marcação da sonda e a hibridação foram realizadas de acordo com o protocolo do kit *Gene Images*^{TM} *AlkPhos Direct*^{TM} *Labelling and Detection System* (GE Healthcare).

4.2.1.2.8 Estabilidade mitótica dos transformantes

Para estimar a estabilidade mitótica do DNA exógeno inserido no genoma de *T. virens*, 20 transformantes (**T2, T3, T4, T5, T7, T10, T12, T15, T16, T19, T20, T22, T33, T36, T39, T49, T56, T59, T71 e T73**) escolhidos ao acaso foram analisados. Colônias monospóricas dos transformantes foram crescidas durante 5 dias a 28º C em meio BDA (Merck) suplementado com 200 $\mu g.mL^{-1}$ de higromicina B. Em seguida, fragmentos de micélio das extremidades das colônias foram repicadas para placas contendo meio BDA sem adição de higromicina B durante cinco gerações sucessivas. Após esse procedimento, fragmentos de micélio provenientes da quinta repicagem em meio não seletivo foram transferidos para placas contendo meio BDA suplementado com higromicina B (200 $\mu g.mL^{-1}$) e incubados a 28º C durante 5 dias. Foi avaliado então o número de transformantes que mantiveram o fenótipo de resistência a higromicina B e também a expressão da proteína verde fluorescente (GFP), a partir da capacidade de crescer em meio com o agente seletivo e da emissão de fluorescência verde sob microscópio óptico de epifluorescência (Zeiss Axiophot-2) (filtro FITC, 459-490 nm), respectivamente.

4.2.1.2.9 Comparação *T. virens* transformante *vs.* linhagem selvagem

O transformante **T20** foi comparado com a linhagem selvagem *T.v.***223** segundo as características morfológicas, taxa de crescimento e esporulação. A morfologia dos isolados foi comparada após 5 dias de crescimento em meio BDA a 28º C, observando coloração e características da massa micelial. Para determinar a taxa de crescimento, discos de micélio de 1 cm de diâmetro foram inoculados em placa de Petri contendo meio BDA e incubadas a 28º C. O diâmetro das colônias foi medido após 24, 48, 72 e 96 horas. A esporulação das linhagens mutante e selvagem foi determinada a partir da contagem do número de conídios de três discos de

micélio (~ 0,5 cm de diâmetro) retirados de culturas com 5 dias de crescimento. Para tal os conídios foram suspensos em 10 mL de água destilada e contados em câmara de Neubauer. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.1.3 Interação *T. virens* - planta hospedeira

4.2.1.3.1 Reisolamento de *T. virens* linhagem T20 de plantas de cana-de-açúcar

O transformante **T20**, expressando constitutivamente o gene GFP e com resistência a higromicina B, foi cultivado em meio BDA (Merck) a 28º C por 7 dias, para obtenção de conídios. Plântulas axênicas de cana-de-açúcar, cultivadas *in vitro* (variedade SP80-1842, gentilmente cedidas pela Dr[a]. Sabrina M. Chabregas, Centro de Tecnologia Canavieira - CTC) foram transferidas para frascos de vidro esterilizados, contendo 20 mL de meio MS líquido (MURASHIGE; SKOOG, 1962) acrescido de conídios do transformante **T20** (10^6 conídios.mL^{-1}). As plântulas foram então incubadas em estufa a 28º C sob fotoperíodo 16 horas luz e 8 horas escuro. Após 48 horas, as plântulas foram transferidas para bandeja plástica (com 28 vasos de 200 mL cada) contendo substrato comercial PlantMax (Eucatex) e transferidas para casa de vegetação para aclimatação. Plântulas de cana-de-açúcar (variedade SP80-1842) não inoculadas com *T. virens* também foram aclimatadas sob as mesmas condições e utilizadas como controle. Após 20, 40 e 60 dias de cultivo em casa de vegetação, plantas de cana-de-açúcar foram amostradas e suas folhas, colmos e raízes submetidos ao processo de desinfecção superficial (sequência de imersão em etanol 70% por 60 s, hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% (v/v) de cloro ativo por 90 s, etanol 70% por 30 s e duas lavagens em água destilada esterilizada). Após processados, os tecidos foram cortados em pequenos fragmentos de aproximadamente 40 mm^2, com auxílio de um estilete sobre placa de petri esterilizada. Foram transferidos 7 fragmentos vegetais para cada placa de Petri contendo meio de cultura BDA (Merck) acrescido do antibiótico tetraciclina (100 μg.mL^{-1}), para impedir crescimento bacteriano. No tratamento contendo o transformante **T20** também foram utilizadas placas onde o agente seletivo higromicina B (200 μg.mL^{-1}) foi adicionado ao meio de cultura, para restringir o crescimento fúngico às colônias do transformante **T20**. As placas de isolamento foram mantidas a 28º C por 2 a 14 dias e acompanhadas periodicamente para avaliação do crescimento de fungos. Após crescimento

fúngico, o número total de colônias fúngicas e o número de colônias de *Trichoderma* foram anotados. Os isolados morfologicamente semelhantes a *T. virens* foram coletados e transferidos para meio de cultura BDA contendo 200 $\mu g.mL^{-1}$ do agente seletivo higromicina B, para confirmação da identidade do isolado. Além disso, esses isolados também foram confirmados como *T. virens* linhagem **T20** a partir da análise da emissão de fluorescência verde sob microscópio óptico de epifluorescência (Zeiss Axiophot-2) usando o filtro FITC (459-490 nm). Os dados de frequência (razão do número colônias fúngicas pelo número de fragmentos do tecido da planta) obtidos com os reisolamentos foram transformados pela fórmula $\sqrt{x+0,5}$ para normalização dos dados, e submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparação de médias de Tukey (5% de significância) com auxílio do programa *SAS - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.* Foram utilizadas cinco repetições (plantas) para cada tratamento e o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado.

4.2.1.3.2 Monitoramento da colonização por microscopia óptica de fluorescência (MOF)

Plântulas axênicas de cana-de-açúcar (variedade SP80-1842, gentilmente cedidas pela Dr[a]. Sabrina M. Chábregas, Centro de Tecnologia Canavieira-CTC) foram inoculadas com conídios do transformante **T20** como descrito no item anterior 4.2.1.3.1 e incubadas em estufa a 28º C sob fotoperíodo 16 horas luz e 8 horas escuro. Após 24, 48, 72 e 168 horas, raízes inteiras e cortes finos (longitudinais e transversais) foram dispostos sobre lâmina de vidro contendo gota de água esterelizada. O material foi coberto com lamínula e observado ao microscópio óptico de epifluorescência (Zeiss Axiophot-2) sob dois filtros, o FITC (459-490 nm) e Rodamina (546 nm), para facilitar a visualização do fungo uma vez que as células vegetais das raízes de cana-de-açúcar apresentam grande autofluorescência. Com auxílio de uma câmera de vídeo e do software ISIS (Meta Systems, Germany) as imagens foram captadas com cada filtro separadamente e em seguida sobrepostas.

4.2.1.3.3 Monitoramento da colonização por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Plântulas axênicas de cana-de-açúcar (variedade SP80-1842, gentilmente cedidas pela Dr[a]. Sabrina M. Chábregas, Centro de Tecnologia Canavieira-CTC) foram inoculadas com

conídios do transformante **T20** como descrito no item anterior 4.2.1.3.1 e incubadas em estufa a 28º C sob fotoperíodo 16 horas luz e 8 horas escuro. Raízes foram coletadas após 12, 24, 48 e 72 horas, e fixadas em solução Karnowsky (glutaraldeído 2,5%; formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M [pH 7,2]; $CaCl_2$ 0,001 M). As amostras foram lavadas três vezes em tampão cacodilato 0,05 M, desidratadas em soluções de concentração crescente de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) e então submetidas à secagem ao ponto crítico (aparelho de secagem CPD 050 – Balzers) e metalização (metalizador MED 010 – Balzers). Além da observação da colonização fúngica nas superfícies de raízes, também foi realizada a visualização em tecidos internos das raízes, através da técnica de criofratura. Nesse caso, após as etapas de fixação em solução Karnowsky e lavagem em tampão cacodilato 0,05 M, raízes inteiras foram tratadas com glicerol 30% por 2 horas, envolvidas em papel (*Ross optical lens tissue*) e congeladas em nitrogênio líquido. As raízes foram então fraturadas com o uso de uma navalha sobre superfície de metal congelada com nitrogênio líquido, e os fragmentos foram recolhidos e submetidos às etapas de desidratação por etanol, secagem ao ponto crítico e metalização. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO-Zeiss), no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica (NAP/MEPA), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade e São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil.

4.2.1.3.4 Avaliação do efeito do fungo *T. virens* sobre o crescimento de plantas de cana-de-açúcar

Para avaliar o efeito da linhagem selvagem *T.v.***223** e do transformante **T20** (utilizado nos experimentos de microscopia e reisolamento) sobre o crescimento de plantas de cana-de-açúcar, plântulas axênicas (variedade SP80-1842) cultivadas *in vitro* (gentilmente cedidas pela Dr^{a}. Sabrina M. Chabregas, Centro de Tecnologia Canavieira-CTC) e apresentando características homogêneas (parte aérea e sistema radicular semelhantes entre as diferentes plântulas) foram transferidas para bandejas com 28 vasos (200 mL cada) contendo o substrato comercial PlantMax (Eucatex) e aclimatadas por uma semana em casa de vegetação. Após esse período, as plantas foram inoculadas com uma suspensão de conídios (*T. virens* linhagem selvagem *T.v.***223** ou transformante **T20**) na concentração de 10^6 conídios.mL^{-1} para inoculação dos isolados fúngicos, e mantidas em casa de vegetação por 2 meses. Plantas não inoculadas foram adotadas como

controle. Para avaliação do acúmulo de massa fresca e seca as plantas coletadas tiveram suas raízes lavadas em água corrente para remover substrato e em seguida foram processadas para separação da parte aérea do sistema radicular. Procedeu-se a pesagem das partes aérea e radicular para obtenção da massa fresca, e então, as plantas foram incubadas em estufa a 65º C por 7 dias, para obtenção da massa seca. Os dados de pesagem foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparação de médias de Tukey (1% de probabilidade), com auxílio do programa *SAS - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.* Foram utilizadas 23 repetições (plantas) para cada tratamento e o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Para confirmar a eficiência do processo de inoculação das linhagens de *T. virens* em cana-de-açúcar e então garantir que os efeitos observados eram resultado da presença desses fungos, algumas plantas foram amostradas e submetidas ao processo de desinfecção superficial (sequência de imersão em etanol 70% por 60 s, hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% (v/v) de cloro ativo por 90 s, etanol 70% por 30 s e duas lavagens em água destilada esterilizada) e plaqueamento de fragmentos vegetais em meio de cultura BDA (Merck), com o objetivo de reisolar as linhagens de *T. virens* inoculadas no solo. O procedimento de reisolamento já foi descrito em detalhe no item anterior 4.2.1.3.1.

4.2.1.3.5 Avaliação do efeito de *T. virens* sobre o crescimento de outras plantas

O efeito da linhagem selvagem de *T. virens* (*T.v.***223**) sobre o crescimento de plantas de arroz e de feijão foi avaliado a partir da inoculação do fungo no solo e avaliação do aspecto fenotípico, massa fresca e massa seca de parte aérea e raízes. Para preparar o inóculo fúngico, frascos cônicos contendo farelo de trigo autoclavado (10 g farelo de trigo: 30 mL água destilada) foram inoculados com cinco discos de micélio (5 mm de diâmetro) retirados da borda de crescimento de colônia fúngica crescida em meio BDA (Merck) por 3 dias, e incubados por 5 dias a 25º C. Após o período de incubação, a mistura foi homogeneizada com espátula metálica. A inoculação do substrato de cultivo das plantas foi realizada pela adição de 8 g do inóculo fúngico para cada 300 g de substrato, seguida da homogeneização completa e cuidadosa dessa mistura. Plantas crescidas em solo não inoculado foram adotadas como controle em todos os experimentos. O experimento com arroz (cultivar CO-39) consistiu do plantio de sementes em vasos contendo a mistura 1:1 de dois substratos comerciais (John Innes n° 2 e Levington F2)

inoculados com a mistura contendo *T. virens*. Dez repetições de cada tratamento foram avaliadas e o experimento seguiu delineamento inteiramente casualizado. O experimento com feijão (cultivar IAC-Alvorada) foi realizado a partir do plantio de sementes em vaso contendo o substrato comercial Basaplant (Base Agro) inoculado com a mistura contendo *T. virens*. Doze repetições de cada tratamento foram avaliadas e o experimento seguiu delineamento inteiramente casualizado. Todas as plantas foram mantidas em casa de vegetação por 30 dias. Para avaliação do acúmulo de massa fresca e seca as plantas coletadas tiveram suas raízes lavadas em água corrente para remover substrato e em seguida foram processadas para separação da parte aérea do sistema radicular. Procedeu-se a pesagem das partes aérea e radicular para obtenção da massa fresca, e então, as plantas foram incubadas em estufa a 65º C por 7 dias, para obtenção da massa seca. Os dados de pesagem foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparação de médias de Tukey (1% de probabilidade), com auxílio do programa *SAS - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.*

4.2.2 Resultados

4.2.2.1 Transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

4.2.2.1.1 Teste de sensibilidade da linhagem *T.v.*223 à higromicina B

A resistência da linhagem selvagem de *T. virens* ao antibiótico higromicina B foi testada em placas de petri contendo meio BDA acrescido de concentrações crescentes do antibiótico (6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 $\mu g.mL^{-1}$). O crescimento foi totalmente inibido em concentrações de pelo menos 100 $\mu g.mL^{-1}$ (concentração inibitória mínima). Assim, foi adotada a concentração de 200 $\mu g.mL^{-1}$ para realizar a seleção das colônias resistentes à higromicina B resultantes dos ensaios de transformação por *Agrobacterium*.

4.2.2.1.2 Transformação genética de *T. virens* por *Agrobacterium tumefaciens*

Visto que ainda não foi descrito um protocolo específico para transformação do fungo *T. virens* por *A. tumefaciens*, o presente trabalho buscou, inicialmente, avaliar as condições de

transformação em busca de maior eficiência na obtenção de transformantes. Foram testados os tipos de membrana (celofane, papel de filtro, nitrocelulose e náilon), a carga de inóculo (10^6 ou 10^7 conídios.mL^{-1}), o meio de seleção (M-100 ou BDA) e o tempo de co-cultivo (24 ou 36 horas). O número de transformantes crescidos no meio seletivo foi contado a cada 5 dias, até completar 30 dias. Os testes realizados (Tabela 4.1) permitiram estabelecer as condições ótimas de transformação genética do fungo *T. virens* via *Agrobacterium*, de forma que os experimentos subsequentes de transformação foram realizados adotando-se o papel de filtro e o náilon como membranas, a carga de inóculo de 10^7 conídios.mL^{-1}, BDA como meio seletivo e 36 horas de co-cultivo. Além disso, foram utilizadas duas condições de seleção (*normal* – sem adição de meio sobre a membrana após a transferência da mesma para meio seletivo; *sobrecamada* – com adição de meio sobre a membrana) e duas concentrações (200 e 400 µM) do indutor de virulência da bactéria, a acetoseringona (AS). O número de transformantes resistentes à higromicina B foi determinado após 4, 7 e 14 dias da transferência das membranas para o meio de seleção. Foram realizados dois experimentos independentes adotando-se as mesmas condições para avaliar a repetibilidade do protocolo estabelecido.

O resultado dos experimentos (Tabela 4.2) mostrou que foi possível obter colônias transformadas a partir de todas as condições adotadas e que, as diferentes condições praticamente não deram origem a diferentes eficiências de transformação. De maneira geral, a média da eficiência de transformação foi de 10 e 13 transformantes por 10^7 conídios.mL^{-1}, para o primeiro e segundo experimento, respectivamente. No segundo experimento houve um aumento da eficiência de transformação, consequência do aumento do número de transformantes obtidos na combinação entre as condições de seleção com sobrecamada e 200 µM de acetoseringona, o que pode ser um indício de que essas condições favorecem uma maior eficiência de transformação. Diferentemente, membranas de náilon ou papel de filtro parecem levar à obtenção de um número semelhante de transformantes. É importante citar que, nos dois experimentos a ausência de acetoseringona durante o cultivo da bactéria e no co-cultivo não levou a formação de colônias transformadas, reforçando a importância da indução dos genes de virulência da bactéria durante o processo de transformação. De maneira geral, os resultados obtidos mostraram que as condições escolhidas para transformação de *T. virens* foram consistentes para a obtenção de transformantes. A Figura 4.2 mostra o aspecto das placas de transformação 4 dias após a transferência da membrana para o meio seletivo.

Tabela 4.1 - Número de transformantes resistentes à higromicina B obtido na transformação via *Agrobacterium* nas diferentes condições testadas

Variável	Condição [1]	Nº transformantes resistentes à higromicina B [2]
Membrana	Celofane	0,00
	Papel de filtro	1,00
	Nitrocelulose	0,00
	Náilon	1,30
Carga de inóculo	10^7 conídios.mL^{-1}	0,70
	10^6 conídios.mL^{-1}	0,25
Meio seletivo	M-100	0,50
	BDA	0,50
Tempo de co-cultivo	24 horas	0,40
	36 horas	0,50

[1] Cada condição foi testada em cada uma das outras condições das outras variáveis;
[2] O número de transformantes representa a média de pelo menos 20 repetições.

Tabela 4.2 - Número de transformantes resistentes à higromicina B obtido na transformação via *Agrobacterium* nas diferentes condições selecionadas, as quais foram avaliadas em dois experimentos independentes

Experimento [1]	Membrana	AS (µM) [2]	Meio seleção [3]	Nº transformantes [4]
1	Náilon	200	normal	13^{bc}
			sobrecamada	8^{c}
		400	normal	9^{c}
			sobrecamada	11^{bc}
	Papel de filtro	200	normal	10^{c}
			sobrecamada	5^{c}
		400	normal	10^{c}
			sobrecamada	13^{bc}
2	Náilon	200	normal	9^{c}
			sobrecamada	26^{a}
		400	normal	8^{c}
			sobrecamada	13^{bc}
	Papel de filtro	200	normal	5^{c}
			sobrecamada	20^{ab}
		400	normal	8^{c}
			sobrecamada	13^{bc}

[1] Dois experimentos independentes foram repetidos em tempos diferentes, porém adotando as mesmas condições;
[2] Concentração de acetoseringona (AS) no meio de indução para cultivo da bactéria e para o co-cultivo;
[3] Condição no meio de seleção: normal – apenas transferência da membrana para meio de seleção; sobrecamada – adição de uma camada de meio BDA contendo o agente seletivo higromicina B (200 µg.mL^{-1}) e o antibiótico cefoxitina sódica (200 µg.mL^{-1}) sobre a membrana;
[4] O número de transformantes indicado representa a média de cinco repetições. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente pelo teste de comparação de médias de Tukey, a 5% de significância.

4.2.2.1.3 Análise dos transformantes

4.2.2.1.3.1 Estabilidade mitótica

A estabilidade mitótica de 20 transformantes resistentes à higromicina B, escolhidos ao acaso, foi avaliada após 5 gerações sucessivas de cultivo em meio não seletivo. Dos transformantes analisados, 70% mantiveram o fenótipo de resistência à higromicina B e emissão de fluorescência verde (observação sob filtro FITC – 459 a 490 nm). Além disso, não foi observada a emissão de setores nas culturas desses transformantes avaliados.

4.2.2.1.3.2 Análise molecular

Oito transformantes (**T2, T4, T7, T9, T10, T15, T20, T22**), resistentes à higromicina B e confirmados como mitoticamente estáveis, foram selecionados ao acaso para confirmação via PCR, da presença do gene *gfp* do plasmídio pFAT-gfp. Com o uso do par de iniciadores glGFP5 e glGFP3 foi possível obter fragmento do tamanho esperado (700 pb) a partir de todos transformantes testados e também do vetor pFAT-gfp, mas não da linhagem selvagem *T.v.***223** (Figura 4.3).

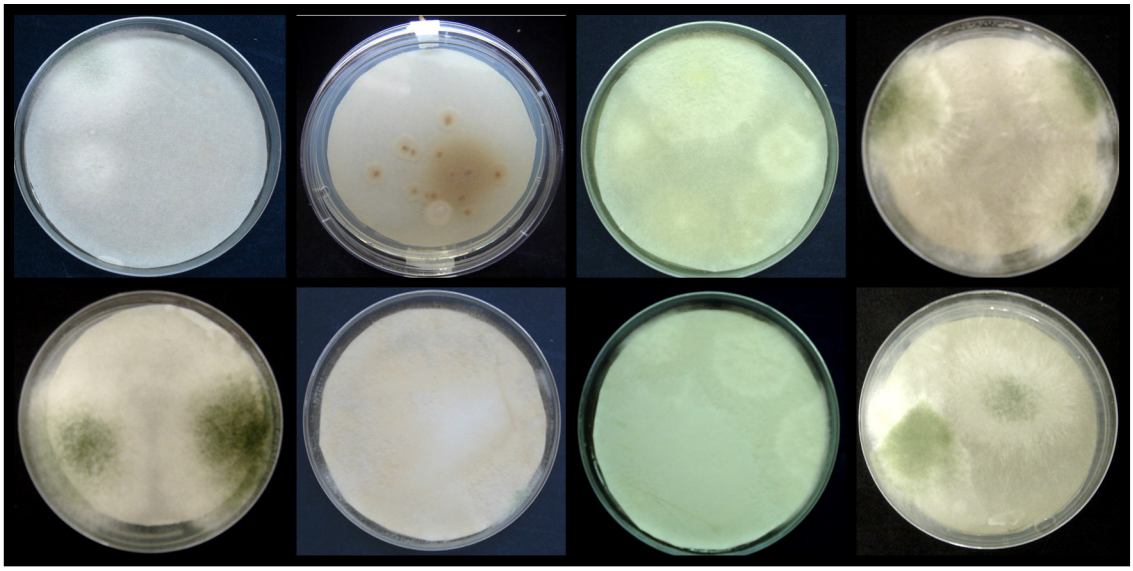


Figura 4.2 – Placas de transformação mostrando o crescimento de colônias de possíveis transformantes de *T. virens*, 4 dias após a transferência para meio seletivo contendo 200 µg.mL^{-1} de higromicina B

Quatro transformantes escolhidos aleatoriamente (**T2, T7, T10 e T20**) foram analisados por *Southern blot* para confirmação da integração do T-DNA no genoma e determinação do número de cópias inseridas, pelo uso de uma sonda contendo sequência do gene *gfp* (700 pb). O resultado obtido confirmou a integração do T-DNA no genoma dos transformantes *T. virens* e revelou que esse evento ocorreu de forma aleatória, pois diferentes pontos de integração foram observados, já que houve a detecção de bandas de diferentes tamanhos entre os transformantes (Figura 4.4). Dois transformantes (**T20** e **T2**) apresentaram uma única integração do T-DNA no seu genoma, enquanto que os demais apresentaram mais de uma cópia do T-DNA integrada no genoma. Como esperado, a linhagem selvagem *T.v.***223** não apresentou fragmentos detectáveis pela sonda do gene *gfp* e o vetor pFAT-gfp apresentou uma banda de ~15 kb.

4.2.2.1.3.3 Comparação *T. virens* transformante *vs.* selvagem

Tendo em vista que o transformante **T20** apresentou apenas uma cópia do inserto e se mostrou mitoticamente estável, esta linhagem foi avaliada quanto à similaridade morfológica e fisiológica com a linhagem selvagem *T.v.***223**. Os resultados mostraram que, após 5 dias de crescimento em meio BDA a 28º C, as características morfológicas dos isolados mostraram-se bastante semelhantes. Ambos apresentaram crescimento ralo, difuso, micélio com aspecto cotonoso e conídios verdes (Figura 4.5). A taxa de crescimento foi muito similar, pois ambos tomaram a placa em apenas 3 dias, crescendo em média cerca de 2,7 cm por dia (Figura 4.6a). Além disso, o transformante **T20** e a linhagem selvagem *T.v.***223** também apresentaram valores semelhantes para a produção de conídios, sendo de 1,31 x 10^7 conídios/cm^2 e 1,71 x 10^7/cm^2, respectivamente (Figura 4.6b).

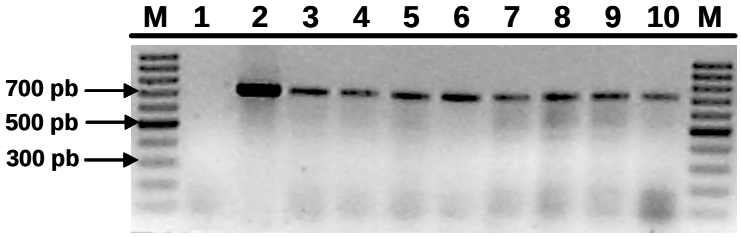


Figura 4.3 - Confirmação dos transformantes por PCR utilizando os iniciadores glGFP5 e glGFP3. Linha **1** representa a ausência de amplificação a partir do DNA da linhagem selvagem *T.v.***223**; linha **2** representa o fragmento de DNA amplificado a partir do vetor pFAT-gfp; linhas **3-10** representam os segmentos de DNA (~700pb) amplificados a partir de oito transformantes escolhidos ao acaso. Linha **M** contém o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Fermentas)

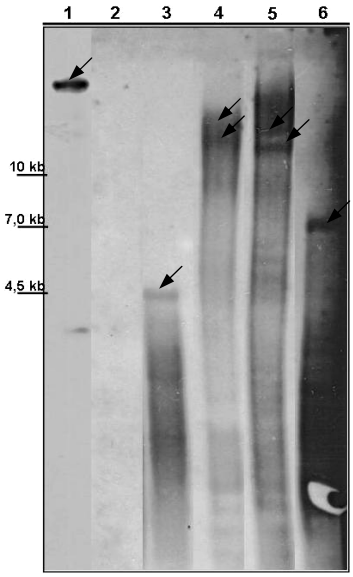


Figura 4.4 - Hibridização de *Southern blot* para quatro transformantes de *T. virens* escolhidos ao acaso. O DNA genômico dos isolados foi digerido com a enzima de restrição *Eco*RI, a qual corta o T-DNA duas vezes e não corta internamente o gene *gfp*, corrido em gel de agarose 0,8%, transferido para membrana de náilon e hibridizado com fragmento de 700 pb (gene *gfp*) marcado com digoxigenina. Linha **1** representa o controle positivo (plasmídio pFAT-gfp); linha 2 representa controle negativo (linhagem selvagem *T.v.***223**); linhas **3-6** representam linhagens transformadas (**T20, T10, T7** e **T2)**. As bandas visualizadas estão indicadas com setas

Figura 4.5 **-** Aspecto morfológico de *T. virens* linhagens transformada **T20** (**a**) e selvagem *T.v.***223 (b**)

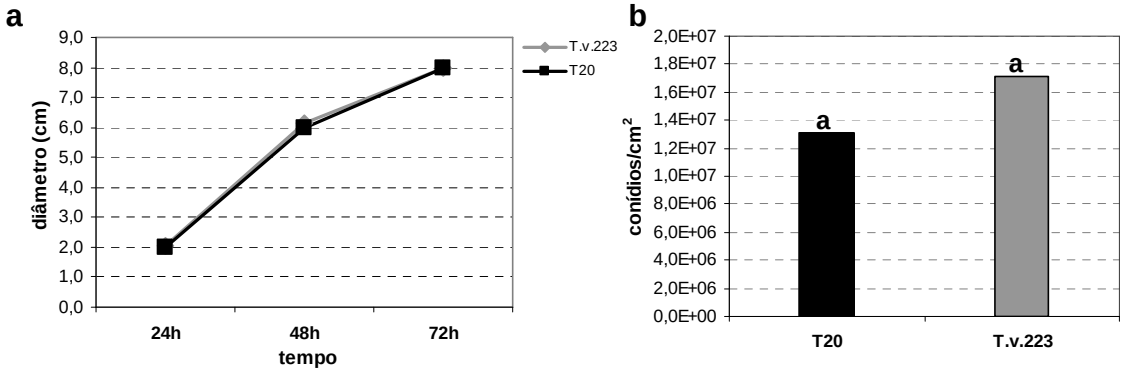


Figura 4.6 **-** Taxa de crescimento (**a**) e esporulação (**b**) de *T. virens* linhagem transformada **T20** e selvagem *T.v.***223**. As letras iguais não representam diferença significativa a 5% de probabilidade no teste de comparação de médias de Tukey

4.2.2.2 Interação *T. virens* - planta hospedeira

4.2.2.2.1 Reisolamento de *T. virens* linhagem T20 de plantas de cana-de-açúcar

A habilidade de *T. virens* colonizar plantas de cana-de-açúcar endofiticamente foi avaliada por meio da inoculação do transformante **T20** e reisolamento do mesmo, após 20, 40 e 60 dias. A presença dos genes de resistência a higromicina B e da proteína GFP no genoma do transformante **T20** permitiu identificá-lo após o reisolamento, por meio do crescimento sobre o meio BDA contendo o antibiótico higromicina B e observação da emissão de fluorescência verde em microscópio de epifluorescência. Nesse experimento, além da frequência de reisolamento do transformante **T20**, também foi avaliada a frequência total de fungos endofíticos, para fornecer uma idéia do efeito da introdução desse transformante sobre a comunidade fúngica endofítica de cana-de-açúcar. Os resultados mostraram que *T. virens* linhagem **T20** é capaz de colonizar raízes e colmo de plantas de cana-de-açúcar endofiticamente, mas raramente coloniza as partes mais superiores da planta, no período tempo avaliado. A colonização de raízes e colmo por **T20** ocorreu em baixas frequências (Figura 4.7b,c) e não levou a mudanças fenotípicas aparentes nas plantas. Além disso, nas condições avaliadas a inoculação do transformante **T20** não afetou significativamente a frequência total de fungos endofíticos nas diferentes partes da planta (Figura 4.7). Embora este fungo seja naturalmente encontrado em cana-de-açúcar, nesse experimento *T. virens* não foi isolado de plantas controle (não inoculadas) em nenhuma situação avaliada (Figura 4.7), sendo somente observado em plantas inoculadas.

A análise estatística (Tabela 4.3) das frequências de reisolamento de fungos a partir de folhas de cana-de-açúcar mostrou que para a variável *"Total fungos endofíticos"* não houve diferença significativa para o fator Linhagens (que consiste da comparação do isolamento de fungos endofíticos a partir de plantas inoculadas com o transformante **T20** e de plantas não inoculadas), porém diferenças significativas (P=0,0418) foram observadas para o fator Isolamento (que consiste da comparação da frequência de isolamento de fungos endofíticos a partir de plantas com diferentes idades: 20, 40 e 60 dias) (Tabela 4.3) , visto que plantas com 40 dias apresentaram maior frequência de fungos endofíticos (Figura 4.7a). Já para a variável *"Total Trichoderma virens"* foi observada diferença significativa tanto para o fator Linhagem (P=0,0415) como para o fator Isolamento (P=0,0198), sendo que a interação entre eles foi

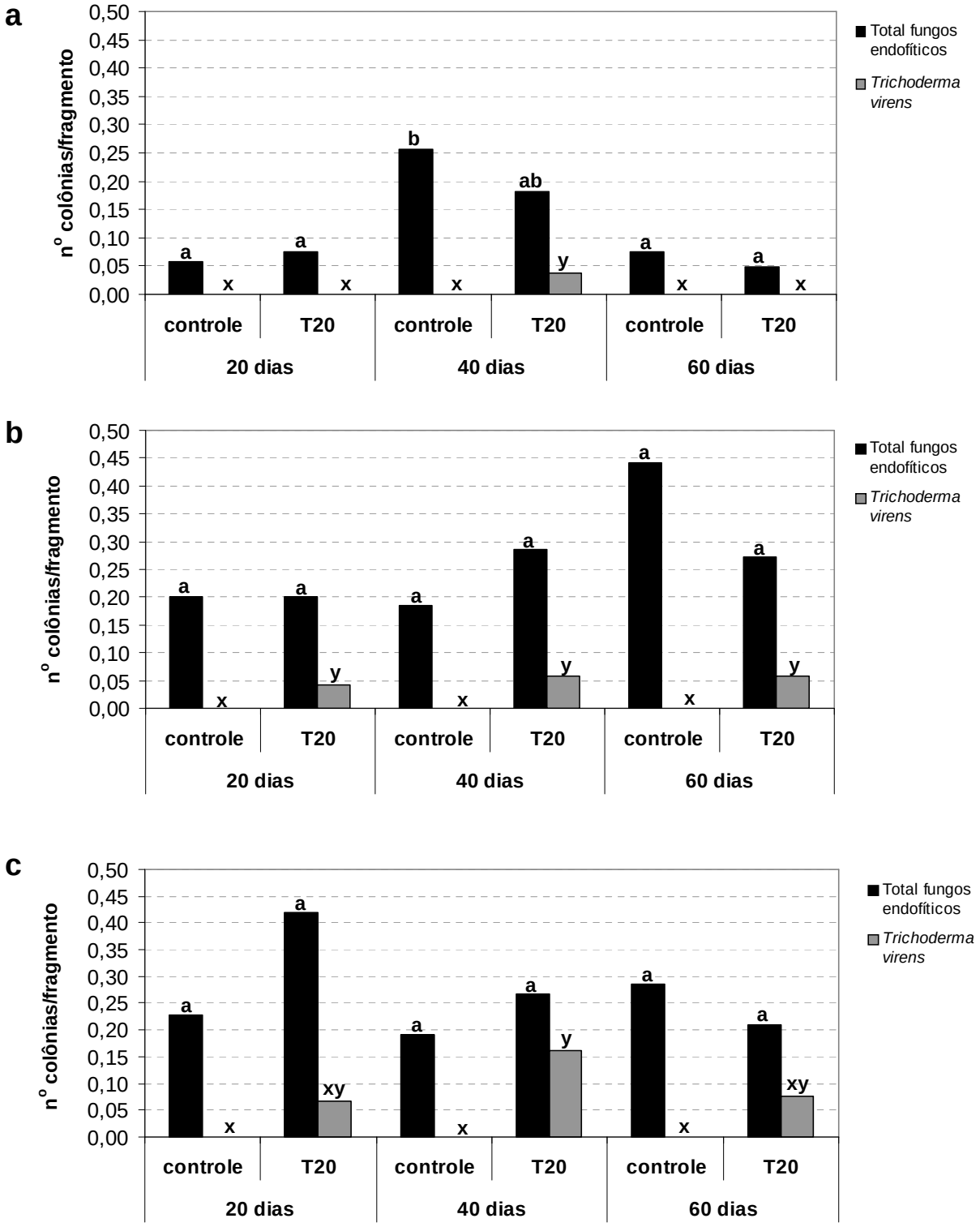


Figura 4.7 - Frequência de isolamento de fungos endofíticos e de reisolamento de *T. virens* linhagem transformada **T20** a partir de folhas (**a**), colmos (**b**) e raízes (**c**) de plantas de cana-de-açúcar com 20, 40 e 60 dias. Médias indicadas por letras iguais não diferem significativamente pelo teste de comparação de médias de Tukey, a 5% de significância

Tabela 4.3 - ANOVA para os fatores linhagem (L) e época de isolamento (I) para duas variáveis, total fungos endofíticos e total *Trichoderma.* Delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. As análises foram feitas separadamente para cada parte da planta (folha, colmo e raiz)

Órgão	FV	Total fungos endofíticos					Total *Trichoderma virens*				
		GL	SQ	QM	F	P-valor	GL	SQ	QM	F	P-valor
FOLHA	Tratamentos (T)	5	0,0605	0,0121	1,60 ns	0,1989	5	0,0028	0,0006	4,64 **	0,0042
	Linhagem (L)	1	0,0018	0,0018	0,24 ns	0,6291	1	0,0006	0,0006	4,64 *	0,0415
	Isolamento (I)	2	0,0550	0,0275	3,63 *	0,0418	2	0,0011	0,0006	4,64 *	0,0198
	Interação (LxI)	2	0,0037		0,24 ns	0,7884	2	0,0011	0,0006	4,64 *	0,0198
	Erro	24	0,1818	0,0076			24	0,0029	0,0001		
COLMO	Tratamentos (T)	5	0,0706	0,0141	1,09 ns	0,3918	5	0,0092	0,0018	1,25 ns	0,3183
	Linhagem (L)	1	0,0011	0,0011	0,09 ns	0,7697	1	0,0088	0,0088	5,97 *	0,0222
	Isolamento (I)	2	0,0438	0,0219	1,69 ns	0,2057	2	0,0002	0,0001	0,07 ns	0,9359
	Interação (LxI)	2	0,0256	0,0128	0,99 ns	0,3869	2	0,0002	0,0001	0,07 ns	0,9359
	Erro	24	0,3110	0,0129			24	0,0355	0,0015		
RAIZ	Tratamentos (T)	5	0,0515	0,0130	1,74 ns	0,1639	5	0,0443	0,0088	4,42 **	0,0054
	Linhagem (L)	1	0,0085	0,0085	1,44 ns	0,2421	1	0,0326	0,0326	16,2 **	0,0005
	Isolamento (I)	2	0,0144	0,0072	1,22 ns	0,3134	2	0,0058	0,0029	1,46 ns	0,2513
	Interação (LxI)	2	0,0285	0,0142	2,41 ns	0,1111	2	0,0058	0,0029	1,46 ns	0,2513
	Erro	24	0,1421	0,0059			24	0,0482	0,0020		

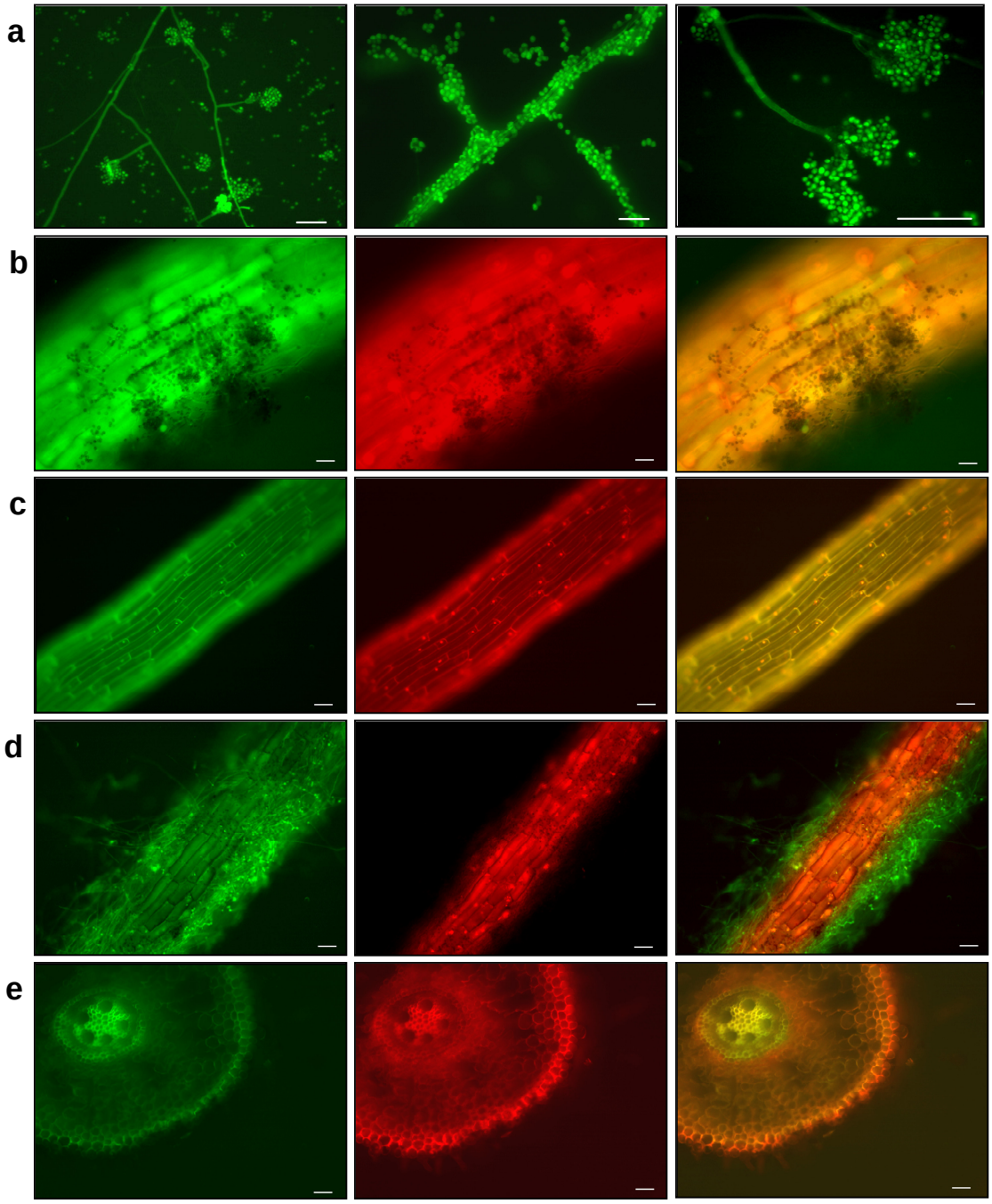
ns - indica que não existe diferença significativa;
*, ** - indicam que existe diferença significativa aos níveis de 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.

significativa (P=0,0198) (Tabela 4.3). Essas diferenças estão ilustradas na Figura 4.7a, onde é possível verificar que somente as plantas inoculadas com o transformante **T20,** cujo reisolamento foi realizado após 40 dias, apresentaram o fungo *T. virens*. As análises dos dados de colmo e raiz geraram interpretações semelhantes. Para ambos os órgãos da planta a variável "*Total de fungos endofíticos"* não diferiu significativamente para os dois fatores avaliados, Linhagem e Isolamento. Já a variável "*Total Trichoderma virens"* apresentou diferenças significativas para o fator Linhagem, com probabilidades de P=0,0222 para colmo (Tabela 4.3) e P=0,0005 para raiz (Tabela 4.3). Isso significa que a frequência de *T. virens* reisolado das plantas inoculadas foi significativamente maior do que nas plantas controle, uma vez que não foi possível isolar *T. virens* das plantas controle (Figura 4.7b,c). Nesse caso, ainda, a frequência de reisolamento de *T. virens* não foi significativamente diferente entre as plantas com diferentes idades (fator Isolamento).

4.2.2.2.2 Monitoramento da colonização por microscopia óptica de fluorescência (MOF) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)

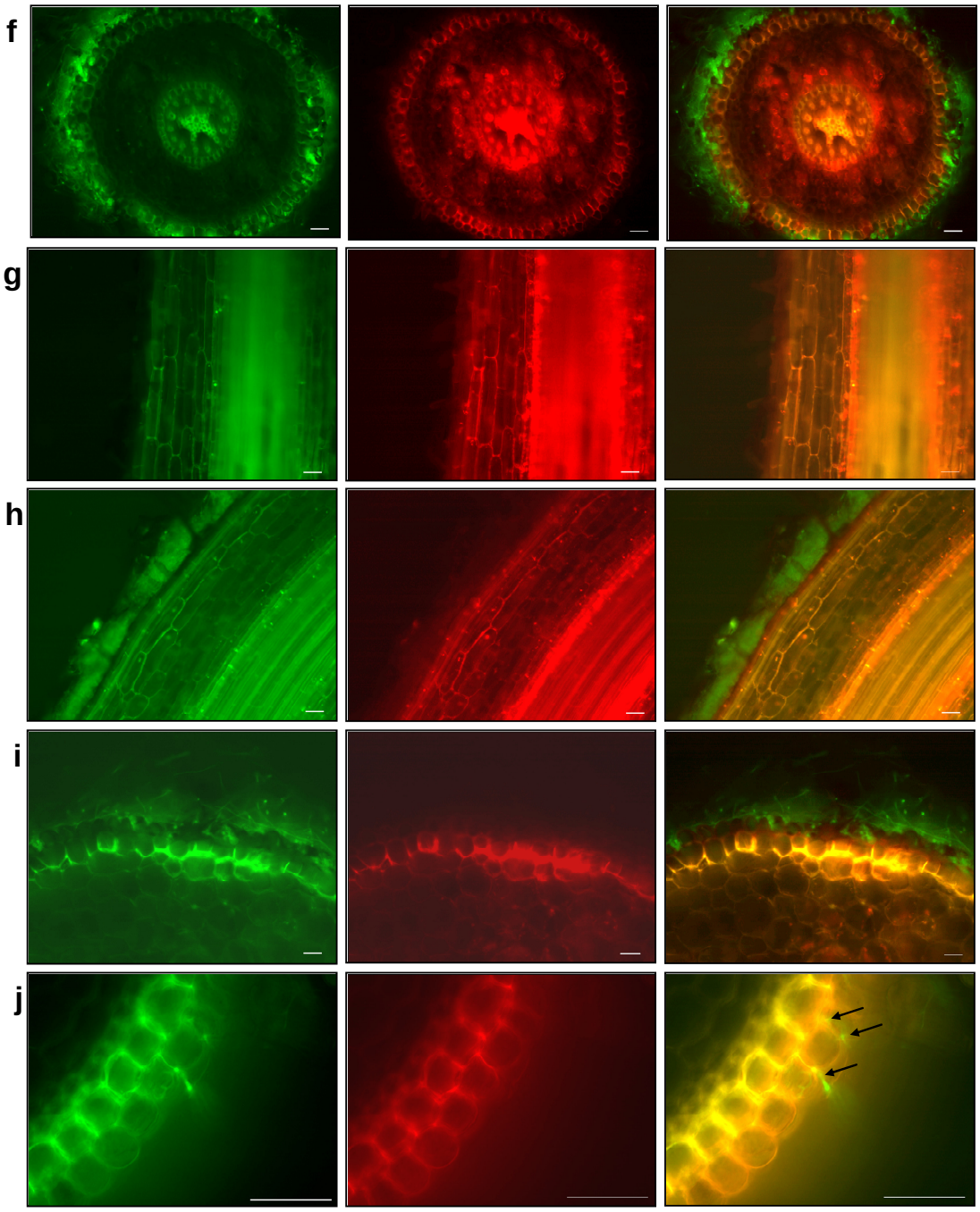
A colonização superficial e interna de tecidos radiculares de plantas de cana-de-açúcar pelo fungo *T. virens* foi investigada por microscopia óptica de fluorescência (MOF) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tal, foi utilizado o transformante **T20**, o qual apresenta morfologia, taxa de crescimento e esporulação muito semelhantes às da linhagem selvagem, e por isso foi selecionado para os estudos de microscopia. Conídios do transformante **T20** foram inoculados no meio de cultivo (MS) de plântulas axênicas de cana-de-açúcar e amostras de raízes foram coletadas em intervalos que variaram de 24 horas até 7 dias. Para MOF, raízes inteiras e cortes finos das secções transversal e longitudinal foram preparados em lâminas de vidro e observados ao microscópio óptico de epifluorescência (Zeiss Axiophot 2). Os tecidos das raízes de cana-de-açúcar apresentam autofluorescência intensa, o que dificultou a identificação do material fúngico. Por essa razão a observação do material foi feita usando dois filtros, FITC (459-490 nm) e Rodamina (546 nm), pois o fungo só emite fluorescência sob filtro FITC, assim é possível distinguir claramente tecido radicular do fúngico em imagens sobrepostas. As hifas e conídios do transformante **T20** emitem uma intensa fluorescência verde (Figura 4.8a), enquanto o micélio da linhagem selvagem *T.v.***223** não exibe essa característica (Figura 4.8b). A observação de raízes de cana-de-açúcar inoculadas com o transformante **T20** permitiu a visualização de uma densa massa micelial envolvendo as raízes (Figura 4.8d,f,h,i). Além de hifas, também foi observada a produção de conídios nas amostras coletadas após 4 dias. Além da intensa colonização da superfície das raízes, em alguns cortes transversais também foi possível observar colonização intercelular nas primeiras camadas do tecido radicular (Figura 4.8f,i,j). O aspecto da raiz de cana-de-açúcar na ausência do fungo *T. virens* também encontra-se ilustrado na Figura 4.8c,e,g.

A análise do tecido radicular de plântulas de cana-de-açúcar infectado pelo fungo *T. virens* sob MEV revelou aspectos interessantes do comportamento do fungo durante a colonização (Figura 4.9). Em primeiro lugar, foi possível observar a germinação dos conídios na superfície do tecido radicular e o alongamento das hifas de forma aderida à cutícula (Figura 4.9e,f). Além disso, as hifas apresentaram um crescimento preferencial em direção às junções celulares (Figura 4.9e,h,i), sendo que não foi possível observar o desenvolvimento de estruturas



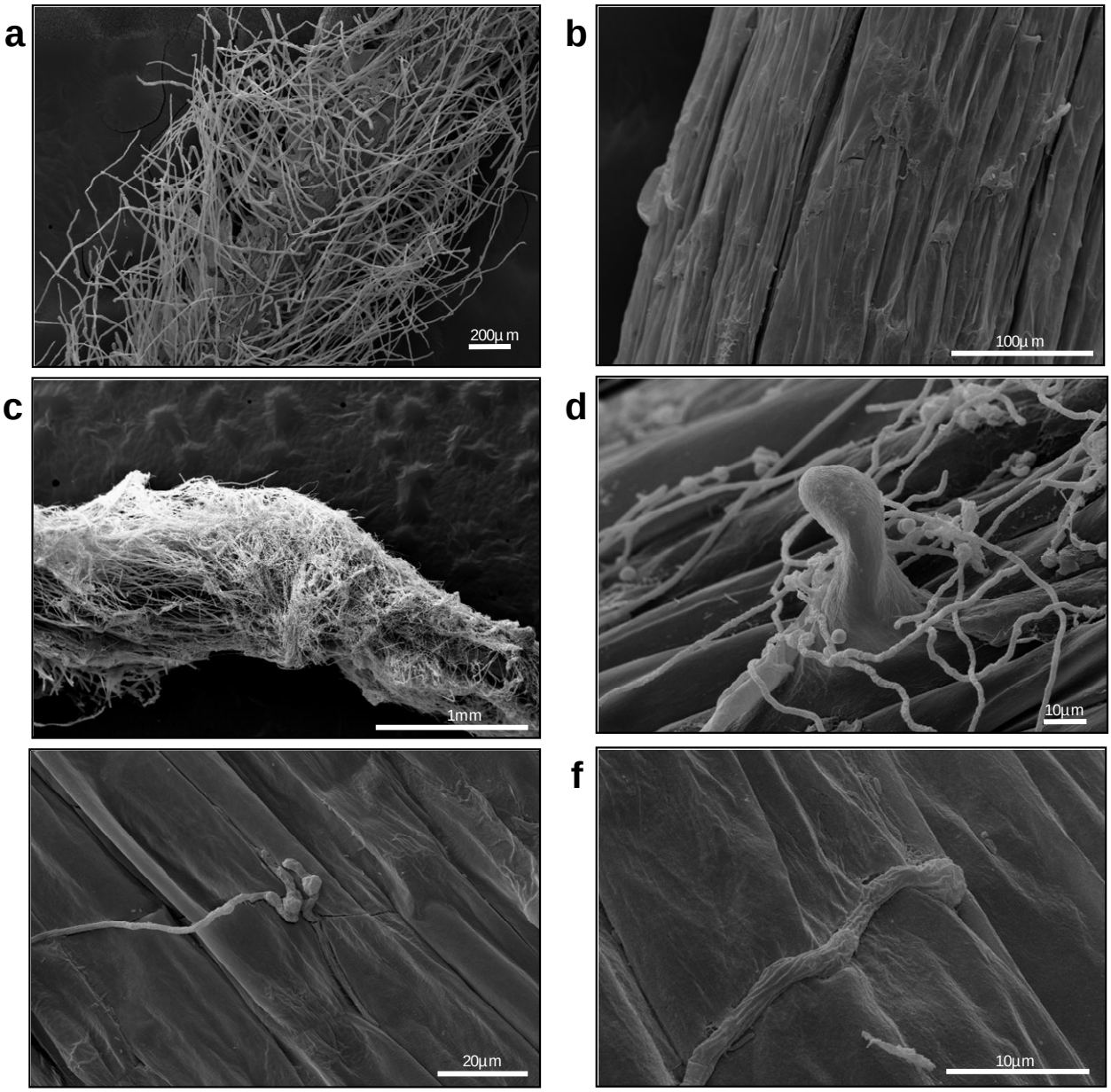
continua

Figura 4.8 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência (MOF) sob filtro FITC (459-490nm), Rodamina (546 nm) e com sobreposição das imagens desses filtros, mostrando a colonização de raízes de cana-de-açúcar (variedade SP80-1842) pelo transformante **T20**. **(a)** Micélio e conídios do fungo *T. virens* linhagem **T20** emitindo fluorescência verde; **(b)** Micélio e conídios do fungo *T. virens* linhagem *T.v.***223** sobre a superfície de raiz de cana-de-açúcar; **(c,d)** Raízes inteiras de cana-de-açúcar na ausência da linhagem **T20 (c)** e na presença **(d)**; **(e,f)** Corte transversal de raiz de cana-de-açúcar na ausência da linhagem **T20 (e)** e colonizadas pelo fungo **(f)**; **(g,h)** Corte longitudinal de raiz de cana-de-açúcar na ausência da linhagem **T20 (g)** e na presença **(h)**; **(i)** Corte transversal de raiz de cana-de-açúcar mostrando a colonização da superfície pelo fungo **T20** e **(j)** Corte transversal de raiz de cana-de-açúcar em maior aumento indicando (veja setas) a possível penetração do fungo nas primeiras camadas de célula da epiderme da raiz. Barra de escala = 50 µm



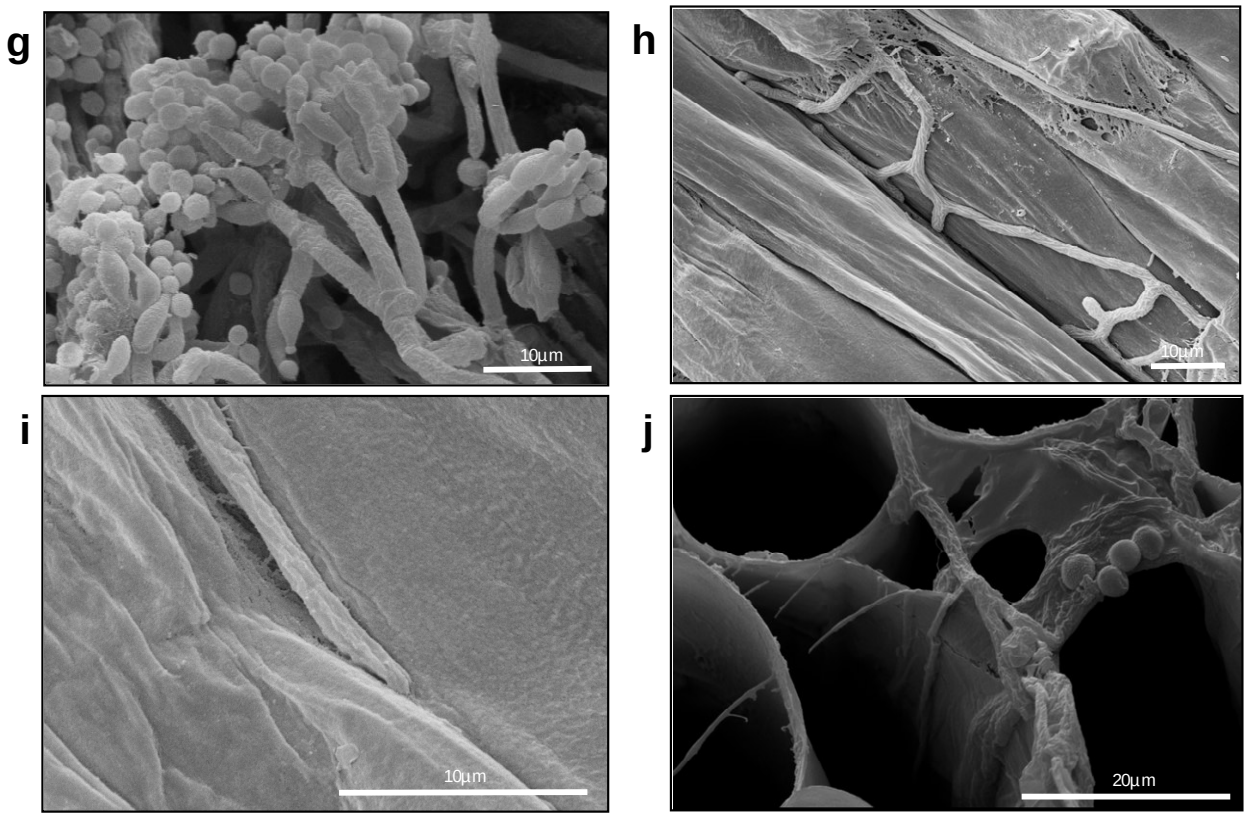
conclusão

Figura 4.8 - Imagens de microscopia óptica de fluorescência (MOF) sob filtro FITC (459-490nm) e Rodamina (546 nm) e com sobreposição das imagens desses filtros, mostrando a colonização de raízes de cana-de-açúcar (variedade SP80-1842) pelo transformante **T20**. **(a)** Micélio e conídios do fungo *T. virens* linhagem **T20** emitindo fluorescência verde; **(b)** Micélio e conídios do fungo *T. virens* linhagem *T.v.***223** sobre a superfície de raiz de cana-de-açúcar; **(c,d)** Raízes inteiras de cana-de-açúcar na ausência da linhagem **T20 (c)** e na presença **(d)**; **(e,f)** Corte transversal de raiz de cana-de-açúcar na ausência da linhagem **T20 (e)** e colonizadas pelo fungo **(f)**; **(g,h)** Corte longitudinal de raiz de cana-de-açúcar na ausência da linhagem **T20 (g)** e na presença **(h)**; **(i)** Corte transversal de raiz de cana-de-açúcar mostrando a colonização da superfície pelo fungo **T20** e **(j)** Corte transversal de raiz de cana-de-açúcar em maior aumento indicando (veja setas) a possível penetração do fungo nas primeiras camadas de célula da epiderme da raiz. Barra de escala = 50 µm



continua

Figura 4.9 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando a colonização do tecido radicular de plântulas de cana-de-açúcar (variedade SP80-1842) pelo fungo *T. virens* linhagem **T20**. (**a,b**) Raiz de cana-de-açúcar não inoculada com fungo *T. virens*, em (**a**) imagem de trecho piloso da raiz e em (**b**) imagem de trecho sem pêlos radiculares; (**c,d**) Colonização da superfície da raiz e pêlos, pelo fungo **T20**; (**e,f**) Germinação do conídio de *T. virens* e crescimento aderido à cutícula do hospedeiro; (**g**) Estrutura de resprodução assexual (conidióforo e conídios) do fungo *T. virens*; (**h,i**) Crescimento micelial em direção às junções celulares e (**j**) Interior de segmento de raiz partido por criofratura mostrando a provável presença de hifas do fungo no espaço intercelular (observe a indicação pela seta). Os valores das barras de escala estão indicados nas figuras



conclusão

Figura 4.9 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando a colonização do tecido radicular de plântulas de cana-de-açúcar (variedade SP80-1842) pelo fungo *T. virens* linhagem **T20**. (**a,b**) Raiz de cana-de-açúcar não inoculada com fungo *T. virens*, em (**a**) imagem de trecho piloso da raiz e em (**b**) imagem de trecho sem pêlos radiculares; (**c,d**) Colonização da superfície da raiz e pêlos, pelo fungo **T20**; (**e,f**) Germinação do conídio de *T. virens* e crescimento aderido à cutícula do hospedeiro; (**g**) Estrutura de resprodução assexual (conidióforo e conídios) do fungo *T. virens*; (**h,i**) Crescimento micelial em direção às junções celulares e (**j**) Interior de segmento de raiz partido por criofratura mostrando a provável presença de hifas do fungo no espaço intercelular (observe a indicação pela seta). Os valores das barras de escala estão indicados nas figuras

semelhantes a apressório, nem alterações na superfície do hospedeiro nos locais em contato com o fungo. Sete dias após a inoculação dos conídios, foi possível observar uma densa colonização da superfície da raiz, ramificação das hifas, formação de conidióforos e produção de conídios (Figura 4.9c,h,g). A observação de amostras de raiz fraturada com o uso de nitrogênio líquido revelou a presença de hifas do fungo no interior do tecido radicular, localizado no espaço intercelular (Figura 4.9j).

4.2.2.2.3 Avaliação do efeito de *T. virens* sobre o crescimento das plantas de cana-de-açúcar

O efeito do fungo *T. virens* linhagem selvagem *T.v.***223** e transformante **T20** no crescimento das plantas de cana-de-açúcar foi avaliado por meio da inoculação dos fungos no solo via solução de conídios e manutenção das plantas por 60 dias em casa de vegetação. Os valores de massa obtidos e o resultado da análise estatística estão listados na Tabela 4.4. Os resultados mostraram que a inoculação dos fungos não levou a nenhum tipo de alteração fenotípica detectável, ou seja, todas as plantas apresentavam-se saudáveis e vigorosas e com crescimento semelhante. De fato, quando os valores de massa fresca e seca foram analisados não foi possível observar diferença significativa, seja para parte aérea, raízes ou total, entre todos os tratamentos (Tabela 4.4). Esses resultados indicam que as linhagens do fungo *T. virens,* tanto selvagem como transformante, não foram capazes de reduzir nem promover o crescimento das plantas de cana-de-açúcar nas condições avaliadas. Além disso, também foi observado que a alteração genética no genoma do transformante **T20** não levou a mudanças aparentes na interação com as plantas de cana-de-açúcar, quando comparado com o comportamento da linhagem selvagem.

Para confirmar que a inoculação dos fungos no solo foi suficiente para promover a colonização endofítica das plantas de cana-de-açúcar e que os efeitos observados ocorreram na presença de *T. virens,* algumas plantas foram amostradas e submetidas ao processo de isolamento de fungos endofíticos, na busca do reisolamento das linhagens de *T. virens*. As frequências médias de fungos endofíticos totais e de *Trichoderma* obtidas com o isolamento estão ilustradas na Figura 4.10. Os dados mostram uma frequência muito baixa de fungos endofíticos nas folhas, e a total ausência de *Trichoderma* nesse órgão, corroborando dados do item anterior de reisolamento (Item 4.2.2.2.1). Nas bainhas das folhas, a densidade de fungos parece ser superior às folhas, entretanto novamente não foi possível isolar *Trichoderma* dessa parte da planta. Diferentemente, as raízes são altamente colonizadas por fungos endofíticos, uma vez que todos os fragmentos de raiz amostrados apresentaram crescimento de pelo menos uma colônia fúngica. Além disso, somente nesse órgão foi possível recuperar as linhagens de *T. virens* a partir de plantas que foram inoculadas. De maneira geral, esses resultados mostram que a inoculação do fungo *T. virens* no solo leva à colonização das plantas de cana-de-açúcar preferencialmente nas raízes, indicando que esse fungo não deve se deslocar para as partes superiores da planta . Ainda,

Tabela 4.4 - Efeito da inoculação das linhagens *T.v.***223** e **T20** no acúmulo de massa fresca e seca nas raízes e parte aérea de plantas de cana-de-açúcar (variedade SP80-1842) cultivadas por 60 dias em casa de vegetação

Tratamento	Massa fresca (g) [1]			Massa seca (g) [1]		
	Raiz	Parte aérea	Total	Raiz	Parte aérea	Total
SP80-1842 (controle)	5,12 [a]	2,90 [a]	8,02 [a]	0,51 [a]	0,83 [a]	1,34 [a]
SP80-1842 + *T.v.*223	4,75 [a]	2,53 [a]	7,27 [a]	0,43 [a]	0,68 [a]	1,12 [a]
SP80-1842 + T20	4,66 [a]	2,66 [a]	7,33 [a]	0,47 [a]	0,69 [a]	1,16 [a]

[1] Os valores indicados representam média de 23 repetições;
Médias pertencentes à mesma coluna e seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente segundo teste de comparação de médias de Tukey, a 1% de significância.

a presença do fungo *T. virens* como endófito de raízes não deu origem a alterações no acúmulo de biomassa das plantas.

4.2.2.2.4 Avaliação do efeito de *T. virens* sobre o crescimento de outras plantas

O efeito do fungo *T. virens* linhagem selvagem *T.v.***223** no crescimento de outras plantas hospedeiras, o arroz e o feijão, foi avaliado por meio da inoculação dos fungos no solo e manutenção das plantas por 30 dias em casa de vegetação. O aspecto fenotípico das plantas e os valores de massa fresca e seca foram determinados, e então comparados entre plantas inoculadas e plantas controle. A aparência fenotípica das plantas nos dois tratamentos foi muito semelhante, isto é, as plantas inoculadas com o fungo *T. virens* não apresentaram nenhum tipo de alteração fenotípica detectável visualmente (ausência de sintomas de doença, coloração normal,

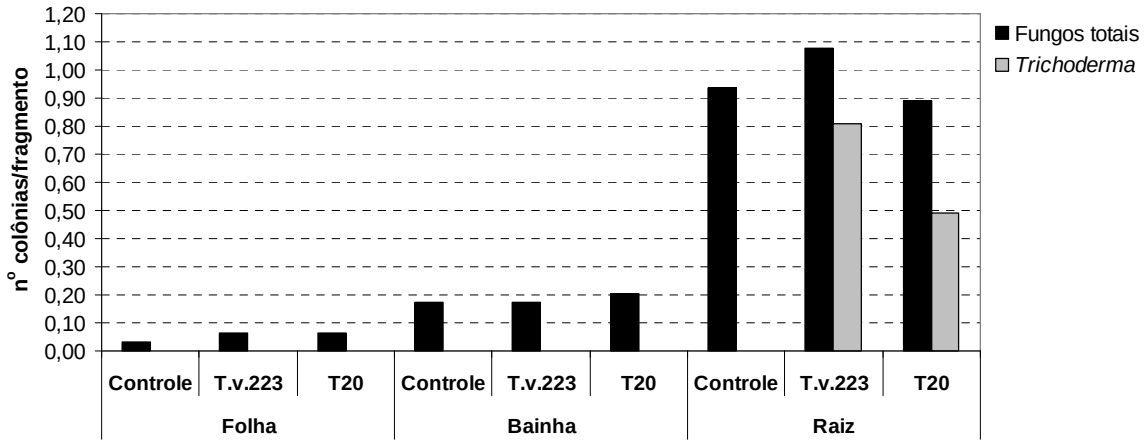


Figura 4.10 - Média da frequência de isolamento de fungos endofíticos totais e *Trichoderma*, a partir de folhas, bainhas e raízes de plantas de cana-de-açúcar, 60 dias após a inoculação dos fungos *T.v.***223** e **T20** no solo

Tabela 4.5 - Efeito da inoculação da linhagem *T.v.***223** no acúmulo de massa fresca e seca nas raízes e parte aérea de plantas de arroz e feijão, cultivadas por 30 dias em casa de vegetação

Planta	**Tratamento**	**Massa fresca (g)** [1]			**Massa seca (g)** [1]		
		Raiz	**Parte aérea**	**Total**	**Raiz**	**Parte aérea**	**Total**
Arroz	Controle	0,30 [a]	0,68 [b]	0,99 [b]	0,03 [a]	0,18 [a]	0,22 [a]
	*T.v.***223**	0,36 [a]	1,05 [a]	1,41 [a]	0,02 [b]	0,16 [a]	0,18 [a]
Feijão	Controle	6,95 [a]	14,7 [a]	21,7 [a]	0,33 [a]	1,39 [a]	1,73 [a]
	*T.v.***223**	7,16 [a]	15,0 [a]	22,2 [a]	0,39 [a]	1,39 [a]	1,78 [a]

[1] Os valores indicados representam média de 10 repetições para o experimento com arroz, e 12 repetições para o experimento com feijão;
Médias de cada planta pertencentes à mesma coluna e seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente segundo teste de comparação de médias de Tukey à 1% de significância.

crescimento regular) e apresentavam-se saudáveis e vigorosas. Para plantas de arroz, os dados de massa fresca e seca mostraram um comportamento bastante peculiar das plantas inoculadas. Elas apresentaram maior acúmulo de massa fresca em relação às plantas controle, sendo que a diferença foi significativa apenas para parte aérea e massa total, mas não para raízes (Tabela 4.5). Entretanto, em contrapartida, essas plantas apresentaram menor acúmulo de massa seca quando comparadas com as plantas controle, principalmente para raízes, onde a redução da biomassa foi significativa (Tabela 4.5). Diferentemente, as plantas de feijão inoculadas com *T. virens* apresentaram um leve aumento tanto no acúmulo de massa fresca como de massa seca, em relação às plantas controle, entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa, indicando que esse fungo não promoveu efeitos significativos sobre o crescimento e acúmulo de biomassa das plantas de feijão nas condições avaliadas (Tabela 4.5).

4.2.3 Discussão

A coleção de fungos endofíticos de cana-de-açúcar obtida no presente trabalho (Capítulos 2 e 3) conta com um grande número de gêneros e espécies fúngicas com potencial para exploração na agricultura e biotecnologia. A escolha do fungo *T. virens* para os estudos deste Capítulo levou em consideração trabalhos anteriores que descrevem esta espécie como um micoparasita agressivo, capaz de sintetizar antibióticos, induzir a produção de fitoalexinas e a resistência do hospedeiro (HOWELL, 2006) e, em alguns casos, também de promover o crescimento vegetal (RUDRESH; SHIVAPRAKASH; PRASAD, 2005). O desenvolvimento de um sistema de transformação confiável para interrupção gênica em *T. virens* é um pré-requisito para melhorar a compreensão da sua genética e biologia molecular, fornecendo conhecimento

para o melhoramento do potencial desse fungo como agente de controle biológico. Devido à ausência de relatos na literatura de transformação do fungo *T. virens* via *A. tumefaciens*, o primeiro passo do presente trabalho foi a realização de experimentos para determinar as melhores condições de transformação. Michielse et al. (2005) descreveram diferentes fatores como determinantes da eficiência de agrotransformação, entre eles, a linhagem de *Agrobacterium*, o material fúngico inicial, a concentração de acetoseringona, as condições de co-cultivo e o tipo de membrana. Por exemplo, diferentes membranas, tais como nitrocelulose, náilon (Hybond), celofane e papel de filtro, têm sido usadas na etapa de co-cultivo de diversos protocolos, entretanto, membranas de nitrocelulose e Hybond C têm proporcionado menores eficiências de transformação (MICHIELSE et al., 2005; VIJN; GOVERS, 2003) do que o papel de filtro e a Hybond N^+ (ZEILINGER, 2004). Curiosamente, na literatura somente são encontrados protocolos para transformação de espécies do gênero *Trichoderma* que utilizam nitrocelulose e celofane (CARDOZA et al., 2006; DE GROOT et al., 1998; ZEILINGER, 2004; ZHONG et al., 2007), entretanto, esses dois tipos de membrana apresentaram-se totalmente inadequados para transformação da linhagem de *T. virens* do presente trabalho. A alteração no tempo de co-cultivo também tem revelado variação na eficiência de transformação. Para a maioria das espécies fúngicas o co-cultivo por 48 horas tem resultado em uma maior eficiência de transformação (LEAL et al., 2004; MULLINS et al., 2001; RHO; KANG; LEE, 2001). Entretanto, em alguns casos a extensão desse tempo pode resultar em um maior número de transformantes (COMBIER et al., 2003). Outro fator a ser observado no co-cultivo é a razão bactéria:fungo, pois essa proporção determina a eficiência da interação entre os organismos. Geralmente, o aumento de células fúngicas leva ao aumento no número de transformantes (REIS et al., 2004; ROGERS et al., 2004; ROLLAND et al., 2003; ZEILINGER, 2004; ZWIERS; WAARD, 2001), contundo, essa relação não parecer ser diretamente proporcional (COVERT et al., 2001; REIS et al., 2004). Os resultados do presente estudo confirmam os dados da literatura, pois o uso de uma maior concentração de conídios levou a formação de um maior número de transformantes.

Após a determinação das melhores condições para agrotransformação do fungo *T. virens*, considerando o que foi testado, dois experimentos independentes foram realizados com o intuito de verificar a consistência do protocolo adotado e obtenção de uma coleção de transformantes. Os resultados confirmaram a coerência do protocolo adotado, sendo que foi possível obter transformantes a partir de todas as condições empregadas (membrana de náilon ou papel de filtro;

200 ou 400 µM de acetoseringona; e condição de seleção *normal* ou *sobrecamada*), com média de transformantes por 10^7 conídios.mL^{-1} igual a 10 e 13, para o primeiro e segundo experimento, respectivamente. A utilização da condição de seleção *sobrecamada* foi empregada anteriormente por Zeilinger (2004) na transformação de *T. atroviride*, com o objetivo de diminuir a taxa de crescimento dos transformantes e assim conseguir recuperar um maior número deles. No presente trabalho esse método também se mostrou mais adequado, pois a alta taxa de crescimento de *T. virens* limita a eficiência de recuperação dos transformantes. Segundo De Groot et al. (1998), a indução dos genes *vir*, pela presença de acetoseringona durante o co-cultivo, é um fator necessário para a transformação de fungos por *Agrobacterium.* De fato, no presente trabalho quando o crescimento da bactéria no meio de indução e o co-cultivo do fungo com a bactéria foram realizados na ausência de acetoseringona, não foi possível obter colônias transformadas. A importância do uso da acetoseringona na agrotransformação já foi reportada em vários outros estudos (COMBIER et al., 2003; GORFER et al., 2007; MATA et al., 2007; RHO; KANG; LEE, 2001; ZEILINGER, 2004; ZHONG et al., 2007).

Uma amostra de vinte transformantes, obtidos nos ensaios de agrotransformação, foi avaliada quanto à estabilidade mitótica e os resultados mostraram que 70% deles mantiveram o fenótipo resistência a higromicina B e expressão da proteína GFP. De fato, altas taxas de estabilidade mitótica têm sido descritas para diferentes espécies fúngicas transformadas com gene *gfp* pelo sistema *Agrobacterium* (FITZGERALD et al., 2003; GORFER et al., 2007; MARTINO et al., 2007). A inserção do T-DNA no genoma dos transformantes foi confirmada por PCR e *Southern blot*. Todos os transformantes avaliados apresentaram a inserção do T-DNA, sendo que em dois deles houve a inserção de mais de uma cópia do DNA exógeno. Segundo Michielse et al. (2005), diferentes parâmetros determinam o número de cópias do T-DNA inseridas no genoma do fungo. No estudo de Mikosch et al. (2001), por exemplo, o uso de conídios germinados levou a maior formação de transformantes contendo múltiplas cópias do T-DNA do que a utilização de micélio, onde houve a predominância de transformantes com uma única cópia.

A geração de transformantes de *T. virens*, carregando os genes de resistência a higromicina B e da proteína GFP, facilitou o estudo da interação *T. virens*-cana-de-açúcar, nunca antes estudada. Em primeiro lugar, a capacidade do fungo *T. virens* de colonizar tecidos de cana-de-açúcar endofiticamente foi confirmada por reisolamento da linhagem transformada **T20**, usando como ferramenta para confirmação da identidade do fungo reisolado a resistência ao

antibiótico higromicina B e a expressão da proteína GFP. Essa estratégia, baseada na inoculação e reisolamento do fungo endofítico aplicando os postulados de Koch, tem sido amplamente empregada em estudos que avaliam a capacidade de estabelecimento de uma interação endofítica com a planta hospedeira (REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001; SCHULZ et al., 1998; SCHULZ et al., 1999; SIEBER, 2007). Os dados de reisolamento mostraram que *T. virens* é capaz de colonizar plantas de cana-de-açúcar endofiticamente, e que essa colonização se dá preferencialmente nas raízes dessas plantas, indicando que esse fungo geralmente não se desloca para as partes mais superiores da planta. Esses resultados corroboram observações anteriores, onde foi relatado que espécies do gênero *Trichoderma* não foram isoladas como endófitos de folhas de cana-de-açúcar (STUART, 2006; STUART et al., 2010), mas foram isoladas em frequências significativas a partir de tecidos das raízes dessas plantas (Capítulo 2 e 3 do presente trabalho). A colonização preferencial de raízes também tem sido relatada em outras espécies de *Trichoderma* (HARMAN et al., 2004a; LO et al., 1998) e diferentes graus de preferência de fungos endofíticos por algum tecido tem sido relacionado à adaptação a condições particulares presentes em cada órgão vegetal (AKELLO et al., 2007; KUMAR; HYDE, 2004; SCHULZ; BOYLE, 2005). De maneira geral, a colonização das plantas de cana-de-açúcar pela linhagem **T20** ocorreu em baixas frequências, não levou a alterações fenotípicas visíveis nem algum sintoma de doença, e não afetou a frequência total de fungos endofíticos. Dados da literatura têm mostrado que a taxa de colonização endofítica pode ser influenciada pelo tipo de inóculo utilizado e pelo substrato de crescimento das plantas (BAILEY et al., 2008; USUKI et al., 2002), de forma que as baixas frequências encontradas podem ter resultado das condições em que a interação foi avaliada. Entretanto, assim como no Capítulo 2, a variação na frequência fúngica em função da idade da planta também foi observada, corroborando o fato de que o estágio de crescimento da planta impõe efeitos significativos na comunidade fúngica associada a ela. De forma interessante, o reisolamento de *T. virens* mostrou que o transformante **T20** manteve os genes introduzidos pela agrotransformação mesmo após a passagem pela planta no estudo *in vivo*, confirmando a estabilidade genética dessa linhagem. Essa constatação é importante, uma vez que a estabilidade de genes introduzidos observada em condições de laboratório pode ser bastante diferente da estabilidade *in planta* (LESLIE; DICKMAN, 1991) e a ocorrência de modificações genéticas em linhagens transformadas após a passagem pela planta hospedeira tem sido observada em alguns fungos (DICKMAN; PARTRIDGE, 1989; KELLER; BERGSTROM;

YODER, 1991; LESLIE; DICKMAN, 1991; MIKKELSEN et al., 2001; TOOLEY; LEUNG; LEONG, 1992).

O estudo do comportamento de *T. virens* durante a interação com plantas de cana-de-açúcar também foi realizado por microscopia, MOF e MEV, onde a colonização superficial e interna dos tecidos radiculares foi monitorada ao longo do tempo. As análises foram realizadas usando o transformante **T20**, cujas características morfológicas, taxa de crescimento e esporulação são muito semelhantes às da linhagem selvagem e que, além disso, apresenta a vantagem de conter em seu genoma o gene *gfp*. De maneira geral, os resultados mostraram que esse fungo coloniza intensamente as superfícies da raiz do hospedeiro, formando uma densa massa micelial em torno desse órgão. Além disso, a análise de cortes transversais também revelou que *T. virens* é capaz de penetrar o tecido hospedeiro e colonizar o espaço intercelular das primeiras camadas da epiderme radicular. Dados da literatura mostram que algumas linhagens de *Trichoderma* são capazes de colonizar apenas pontos específicos das raízes (METCALF; WILSON, 2001), mas que, linhagens rizosfera-competentes colonizam toda a superfície da raiz por várias semanas (THRANE; TRONSMO; JENSEN, 1997) ou meses (HARMAN, 2000). Geralmente, a penetração no tecido radicular por *Trichoderma* spp. se limita às primeiras camadas de células (METCALF; WILSON, 2001; YEDIDIA; BENHAMOU; CHET, 1999; YEDIDIA et al., 2000), em função da ativação de respostas de defesa da planta, e não leva ao estabelecimento de doença (HARMAN et al., 2004a). O início do estabelecimento de uma interação endofítica pode ocorrer pela entrada do fungo por meio da formação de estruturas especializadas como os apressórios, como já observado para *Discula umbrinella* na superfície de folhas (VIRET; SCHEIDEGGER; PETRINI, 1993) e *Piriformospora indica* na superfície de raízes (VARMA et al., 1999). Entretanto, no presente trabalho não foi observada a formação de apressório ou outras estruturas especializadas, indicando que *T. virens* penetra nas raízes da planta hospedeira por outros mecanismos. Fungos endofíticos também podem entrar na planta hospedeira através de aberturas naturais como estômatos ou por entre as células da epiderme através da cutícula via ação de enzimas líticas, como já descrito para o fungo *Beauveria bassiana* (WAGNER; LEWIS, 2000). No presente estudo, a análise de MEV não detectou a formação de estruturas especializadas na superfície das raízes, porém revelou crescimento micelial direcionado às junções celulares, o que pode ser um indício de que *T. virens* deve penetrar o

tecido radicular das plantas de cana-de-açúcar através do crescimento entre as células e penetração via ação de enzimas líticas na cutícula.

Além de serem largamente reconhecidas como ótimos agentes de controle biológico, as espécies do gênero *Trichoderma* também se destacam por outros efeitos diretos nas plantas (HARMAN et al., 2004a). Esses efeitos incluem promoção de crescimento e aumento na produtividade (HARMAN, 2000; YEDIDIA et al., 2001), aumento no crescimento de raízes e tolerância à seca (HARMAN, 2000), indução de resistência sistêmica (HARMAN et al., 2004b; YEDIDIA; BENHAMOU; CHET, 1999; YEDIDIA et al., 2000; YEDIDIA et al., 2003), aumento da absorção de nutrientes e efeito de fertilizantes (HARMAN, 2000; YEDIDIA et al., 2001) e aumento na germinação (BJÖRKMAN; BLANCHARD; HARMAN, 1998). Nesse contexto, os efeitos do fungo *T. virens* na planta hospedeira tem sido amplamente estudados em algodão (HOWELL, 2006), mas até o momento nenhum estudo foi realizado buscando investigar a interação desse fungo com cana-de-açúcar. Assim, o presente trabalho avaliou os efeitos de *T. virens* sobre o crescimento e acúmulo de biomassa das raízes e parte aérea de plantas de cana-de-açúcar. Os resultados mostraram que a presença de *T. virens* nas raízes das plantas não alterou as características fenotípicas das mesmas, de forma que o crescimento e o acúmulo de biomassa das plantas controle não diferiram das plantas inoculadas com *T. virens.* Efeitos positivos no rendimento e desenvolvimento da planta geralmente são mais evidentes quando ela está sob condições de estresse, como a presença de patógenos e/ou pragas (HARMAN et al., 2004a). Essas análises também permitiram avaliar se a alteração genética ocorrida no genoma do transformante **T20** levou a alguma mudança na interação fungo-planta. De forma interessante, a comparação dos dados obtidos pela linhagem selvagem *T.v.***223** com os dados do transformante **T20**, mostrou que essas duas linhagens apresentaram efeitos semelhantes sobre as plantas de cana-de-açúcar, indicando que o transformante **T20** manteve o padrão de interação com a planta hospedeira. Nem sempre linhagens com alterações genéticas mantêm o padrão de interação com a planta. No trabalho de Fávaro (2009), por exemplo, a agrotransformação do fungo *Epicoccum nigrum* linhagem P16 para inserção do T-DNA contendo os genes de resistência a higromicina B e *gfp* levou a uma redução significativa do acúmulo de biomassa vegetal quando o mutante (linhagem P16-35gfp) foi inoculado em plantas de cana-de-açúcar cultivadas em casa de vegetação. Em outro estudo, mutações num único gene (*nox*A) do fungo endofítico *Epichloë*

festucae levaram a mudanças no seu estilo de vida durante a interação com *Lolium perenne*, que passou de mutualista para parasítico (TANAKA et al., 2006).

O efeito do fungo *T. virens* linhagem *T.v.***223** sobre outras plantas hospedeiras também foi avaliado. Em feijão, esse fungo não promoveu efeitos significativos sobre o crescimento e acúmulo de biomassa das plantas, porém, esse fungo promoveu um resultado interessante em plantas de arroz, visto que estas apresentaram maior acúmulo de biomassa de parte aérea e total, porém, após a secagem do material, os valores de massa seca obtidos para essas plantas foram menores do que das plantas não inoculadas, sendo que essa redução de biomassa foi estatisticamente significativa para as raízes. Considerando que as plantas inoculadas e controle foram conduzidas sob mesmo manejo de rega, ambiente e tipo de solo, pode ser sugerido que a inoculação de *T. virens* levou as plantas de arroz à alterações fisiológicas que resultaram em acúmulo de água e menor biomassa nas raízes, quando comparadas com as plantas controle. Diferentes fatores podem ter relação com esse evento. Por exemplo, a redução no acúmulo de massa seca em diferentes espécies de plantas já foi relatada para o fungo *T. virens*, em função da produção do composto fitotóxico viridiol (JONES; LANINI; HANCOCK, 1988). Além disso, a colonização das raízes por fungos do gênero *Trichoderma* tem sido associada com grandes mudanças na maquinaria metabólica da planta hospedeira (HARMAN et al., 2004a) e a interação de plantas com fungos mutualistas (endófitos e micorrizas) parece influenciar consideravelmente o balanço hídrico da planta (ARNOLD; ENGELBRECHT, 2007; AUGÉ, 2001). Ou seja, pode ser que essa linhagem de *T. virens* tenha levado a um aumento na capacidade das plantas de arroz em adquirir água, o que pode ser interessante, pois poderia resultar no aumento da tolerância ao estresse hídrico. Tolerância a seca têm sido relatada com frequência como resultado da interação entre fungos mutualistas e planta hospedeira (BACON, 1993; READ; CAMP, 1986; REDMAN; DUNIGAN; RODRIGUEZ, 2001). Por exemplo, Redman, Dunigan e Rodriguez (2001) verificaram que algumas espécies de *Colletotrichum* foram capazes conferir tolerância à seca em plantas de tomate e pimentão, uma vez que plantas colonizadas pelo fungo apresentaram menor porcentagem de mortalidade após passagem por estresse hídrico.

O presente estudo descreve pela primeira vez a transformação de *T. virens* pelo sistema *Agrobacterium.* O uso dessa estratégia facilitou os estudos de reisolamento e colonização, por meio da utilização de uma linhagem de *T. virens* transformada, expressando os genes de resistência à higromicina B e *gfp*. Os resultados obtidos no presente trabalho forneceram

informações básicas sobre a interação *T. virens*-cana-de-açúcar, ou seja, foi observado que esse fungo coloniza cana-de-açúcar endofiticamente, localiza-se preferencialmente no espaço intercelular das primeiras camadas de célula do tecido radicular e não gera alterações detectáveis no fenótipo das plantas de cana-de-açúcar. Essas informações contribuem para a compreensão do possível papel de fungos endofíticos durante interação com a planta hospedeira. Além disso, o estabelecimento do sistema de agrotransformação para *T. virens* abre a possibilidade do uso dessa ferramenta para estudos de mutagênese com vistas à identificação de genes importantes, como aqueles relacionados com controle biológico.

Referências

AKELLO, J.; DUBOIS, T.; GOLD, C. S.; COYNE, D.; NAKAVUMA, J.; PAPARU, P. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 96, p. 34-42, 2007.

ALUKO, M. O.; HERRING, T. F. The mechanisms associated with the antagonistic relationship between *Corticium solani* and *Gliocladium virens*. **Transactions of the Brittish Mycological Society**, London, v. 55, p. 173-179, 1970.

AMEY, R. C.; ATHEY-POLLARD, A.; BURNS, C.; MILLS, P. R.; BAILEY, A.; FOSTER, G. D. PEG-mediated and *Agrobacterium*-mediated transformation in the mycopathogen *Verticillium fungicola*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 4-11, 2002.

ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; SOBRAL, J. K.; LACAVA, P. T. **Manual:** isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: CALQ, 2002. 86 p.

ARNOLD, A. E.; ENGELBRECHT, B. M. J. Fungal endophytes double minimum leaf conductance in seedlings of a tropical tree. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 23, p. 369–372, 2007.

AUGÉ, R. M. Water relations, drought and VA mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 11, p. 3-42, 2001.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESMHMUKH, S. K. (Ed.). **Fungi:** multifaceted microbes. Boca Raton: CRC Press, 2007. chap. 12, p. 191-209.

BACON, C. W. Abiotic stress tolerances (moisture, nutrients) and photosynthesis in endophyte-infected tall fescue. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 44, p. 123–141.

BAEK, J.-M.; HOWELL, C. R.; KENERLEY, C. M. The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**, Berlin, v. 35, p. 41-50, 1999.

BAILEY, B. A.; BAE, H.; STREM, M. D.; CROZIER, J.; THOMAS, S. E.; SAMUELS, G. J.; VINYARD, B. T.; HOLMES, K. A. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 24-35, 2008.

BJÖRKMAN, T.; BLANCHARD, L. M.; HARMAN, G. E. Growth enhancement of shrunken-2 (sh2) sweet corn by *Trichoderma harzianum* 1295-22: effect of environmental stress. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 123, p. 35-40, 1998.

BOYLE, C.; GOTZ, M.; DAMMANN-TUGEND, U.; SCHULZ, B. Endophyte-host interactions III: Local vs. systemic colonization. **Symbiosis**, Rehovot, v. 31, p. 259-281, 2001.

BUNDOCK, P.; DEN DULK-RAS, A.; BEIJERSBERGEN, A.; HOOYKAAS, P. J. J. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 14, p. 3206-3214, 1995.

BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P. J. J. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 93, p. 15272-15275, 1996.

CAMPOY, S.; PEREZ, F.; MARTIN, J. F.; GUTIERREZ, S.; LIRAS, P. Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. **Current Genetics**, Berlin, v. 43, p. 447-452, 2003.

CARDOZA, R. E.; VIZCAINO, J. A.; HERMOSA, M. R.; MONTE, E.; GUTIÉRREZ, S. A comparison of the phenotypic and genetic stability of recombinant *Trichoderma* spp. generated by protoplast- and *Agrobacterium*-mediated transformation. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 44, p. 383-395, 2006.

CARPENTER, M. A.; RIDGWAY, H. F.; STRINGER, A. M.; HAY, A. J.; STEWART, A. Characterisation of a *Trichoderma hamatum* monooxygenase gene involved in antagonistic activity against fungal plant pathogens. **Current Genetics**, Berlin, v. 53, p. 193-205, 2008.

COMBIER, J. P.; MELAYAH, D.; RAFFIER, C.; GAY, G.; MARMEISSE, R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 220, p. 141-148, 2003.

COVERT, S. F.; KAPOOR, P.; LEE, M.; BRILEY, A.; NAIRN, C. J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 259-264, 2001.

DE GROOT, M. J. A.; BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P. J. J.; BEIJERSBERGEN, A. G. M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. **Nature Biotechnology**, New York, v. 16, p. 839-842, 1998.

DICKMAN, M. B.; PARTRIDGE, J. E. Use of molecular markers for monitoring fungi involved in stalk rot in corn. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 77, p. 535-539, 1989.

EADY, C. C.; LISTER, C. E.; SUO, Y.; SCHAPER, D. Transient expression of uidA constructs in in vitro onion (*Allium cepa* L.) cultures following particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated DNA delivery. **Plant Cell Reports**, New York, v. 15, p. 958-962, 1996.

FÁVARO, L.C.L. **Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.)**. 2009. 219p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FITZGERALD, A. M.; MUDGE, A. M.; GLEAVE, A. P.; PLUMMER, K. M. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 107, p. 803-810, 2003.

GAO, X. X.; YANG, Q.; GUO, Z. K.; SONG, J. Z. Factors influencing *Agrobaterium tumefaciens*-mediated transformation in *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, Readin, v. 32, p. 74-78, 2005.

GORFER, M.; KLAUBAUF, S.; BANDIAN, D.; STRAUSS, J. *Cadophora finlandia* and *Phialocephala fortinii*: *Agrobacterium*-mediated transformation and functional GFP expression. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, p. 850-855, 2007.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, St Paul, v. 84, p. 377-393, 2000.

HARMAN, G. E.; BJÖRJMANN, T. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. (Ed.). ***Trichoderma and Gliocladium*:** enzymes, biological control and commercial applications. London: Taylor & Francis 1998. chap. 11, p. 229-265.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 43-56, 2004a.

HARMAN, G. E.; PETZOLDT, R.; COMIS, A.; CHEN, J. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, Lacaster, v. 94, p. 147-153, 2004b.

HERNALSTEENS, J.; VAN VLIET, F.; BEUSKELEER, M. D.; DEPICKER, A.; ENGLER, G.; LEMMERS, M.; HOLSTERS, M.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. The *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA in plants. **Nature**, London, v. 287, p. 654-656, 1980.

HJELJORD, L.; TRONSMO, A. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. (Ed.). ***Trichoderma* and *Gliocladium*:** enzymes, biological control and commercial applications. London: Taylor & Francis, 1998. chap. 6, p. 131-151.

HOWELL, C. R. Effect of *Gliocladium virens* on *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, and damping-off of cotton seedlings. **Phytopathology**, Lancaster, v. 72, p. 496-498, 1982.

HOWELL, C. R. Biological control of *Pythium* damping-off of cotton with seed-coating preparations of *Gliocladium virens*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 81, p. 738-741, 1991.

HOWELL, C. R. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Lancaster, v. 92, p. 177-180, 2002.

HOWELL, C. R. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. **Phytopathology**, Lancaster, v. 96, p. 178-180, 2006.

HOWELL, C. R.; DEFFAY, J. E.; GARBER, R. H.; BATSON, W. E. Field control of cotton seedling diseases with *Trichoderma virens* in combination with fungicide seed treatments. **Journal of Cotton Sciences**, Cordova, v. 1, p. 15-20, 1997.

HOWELL, C. R.; HANSON, L. E.; STIPANOVIC, R. D.; PUCKHABER, L. S.; WHEELER, M. H. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 90, p. 248-252, 2000.

HOWELL, C. R.; STIPANOVIC, R. D. Gliovirin, a new antibiotic for *Gliocladium virens*, and its role in the biological control of *Phytium ultimum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 321-324, 1983.

HOWELL, C. R.; STIPANOVIC, R. D. Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. **Phytopathology**, Lancaster, v. 85, p. 469-472, 1995.

HOWELL, C. R.; STIPANOVIC, R. D.; LUMSDEN, R. D. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. **Biocontrol Sciences and Technology**, London, v. 3, p. 435-441, 1993.

ISHIDA, Y.; SAITO, H.; OHTA, S.; HIEI, Y.; KOMARI, T.; KUMASHIRO, T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature Biotechnology**, New York, v. 14, p. 745-750, 1996.

JONES, R. W.; LANINI, W. T.; HANCOCK, J. G. Plant growth response to the phytotoxin viridiol produced by the fungus *Gliocladium virens*. **Weed Science**, Ithaca, v. 36, p. 683-687, 1988.

KELLER, N. P.; BERGSTROM, G. C.; YODER, O. C. Mitotic stability of transforming DNA is determined by its chromosomal configuration in the fungus *Cochliobolus heterostrophus*. **Current Genetics**, Berlin, v. 19, p. 227-233, 1991.

KUBICEK, C. P.; BISSETT, J.; DRUZHININA, I.; KULLNIG-GRADINGER, C.; SZAKACS, G. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, p. 310-319, 2003.

KUBICEK, C. P.; PENTTILÄ, M. E. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. (Ed.). ***Trichoderma* and *Gliocladium*:** enzymes, biological control and commercial applications. London: Taylor & Francis, 1998. chap. 3, p. 49-71.

KUMAR, D. S. S.; HYDE, K. D. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 17, p. 69-90, 2004.

KUNIK, T.; TZFIRA, T.; KAPULNIK, Y.; GAFNI, Y.; DINGWALL, C.; CITOVSKY, V. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 98, p. 1871-1876, 2001.

LEAL, C. V.; MONTES, B. A.; MESA, A. C.; RUA, A. L.; CORREDOR, M.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, Philadelphia, v. 42, p. 391-395, 2004.

LESLIE, J. F.; DICKMAN, M. B. Fate of DNA encoding hygromycin resistance after meiosis in transformed strains of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 1423-1429, 1991.

LO, C.-T.; NELSON, E. B.; HAYES, C. K.; HARMAN, G. E. Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. **Phytopathology**, Lancaster, v. 88, p. 129-136, 1998.

LORANG, J. M.; TUORI, R. P.; MARTINEZ, J. P.; SAWYER, T. L.; REDMAN, R. S.; ROLLINS, J. A.; WOLPERT, T. J.; JOHNSON, K. B.; RODRIGUEZ, R. J.; DICKMAN, M. B.; CIUFFETTI, L. M. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 1987-1994, 2001.

MARTINO, E.; MURAT, C.; VALLINO, M.; BENA, A.; PEROTTO, S.; SPANU, P. Imaging mycorrhizal fungal transformants that express eGFP during ericoid endosymbiosis. **Current Genetics**, Berlin, v. 52, p. 65-75, 2007.

MATA, M. M.; TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T.; SARTORI, D.; OLIVEIRA, A. L. M.; FURLANETO, M. C.; FUNGARO, M. H. P. *Agrobacterium*-mediated insertional mutagenesis of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, p. 148-151, 2007.

METCALF, D. A.; WILSON, C. R. T. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. **Plant Pathology**, London, v. 50, p. 249-257, 2001.

MICHIELSE, C. B.; HOOYKAAS, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A.; RAM, A. F. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Current Genetics**, Berlin, v. 48, p. 1-17, 2005.

MIKKELSEN, L.; ROULUND, N.; LÜBECK, M.; FUNCK JENSEN, D. The perennial ryegrass endophyte *Neotyphodium lolii* genetically transformed with the green fluorescent protein gene (*gfp*) and visualization in the host plant. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 644-650, 2001.

MIKKELSEN, L.; SARROCCO, S.; LÜBECK, M.; JENSEN, D. F. Expression of the red fluorescent protein DsRed-Express in filamentous ascomycete fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 223, p. 135-139, 2003.

MIKOSCH, T. S.; LAVRIJSSEN, B.; SONNENBERG, A. S.; VAN GRIENSVEN, L. J. Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. **Current Genetics**, Berlin, v. 39, p. 35-39, 2001.

MORIOKA, L. R.; FURLANETO, M. C.; BOGAS, A. C.; POMPERMAYER, O. S.; DUARTE, R. T.; CARNEIRO, M. L.; WATANABE, M. A. E.; FUNGARO, M. H. P. Efficient genetic transformation system for the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. **Current Microbiology**, New York, v. 52, p. 469-472, 2006.

MULLINS, E. D.; CHEN, X.; ROMAINE, C. P.; RAINA, R.; GEISER, D. M.; KAMG, S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. **Phytopathology**, Lancaster, v. 91, p. 173-180, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 15, p. 473-497, 1962.

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

REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis: from mutualism to parasitism, who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist**, London, v. 151, p. 705-716, 2001.

READ, J. C.; CAMP, B. J. The effect of the fungal endophyte *Acremonium coenophialum* in tall fescue on animal performance, toxicity, and stand maintenance. **Agronomy Journal**, Madison, v. 78, p. 848–850, 1986.

REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis: from mutualism to parasitism, who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist**, London, v. 151, p. 705–716, 2001.

REIS, M. C.; FUNGARO, M. H. P.; DUARTE, R. T. D.; FURLANETO, L.; FURLANETO, M. C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, p. 197-202, 2004.

RHO, H. S.; KANG, S.; LEE, H. Y. *Agrobacterium tumefaciens* mediated-transformation of the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecules and Cells**, London, v. 12, p. 407-411, 2001.

RODRÍGUES-TOVAR, A. V.; RUIZ-MEDRANO, R.; HERRERA-MARTÍNEZ, A.; BARRERA-FIGUEROA, B. E.; HIDALGO-LARA, M. E.; REYES-MÁRQUEZ, B. E.; CABRERA-PONCE, J. L.; VALDÉZ, M.; XOCONOSTLE-CÁZARES, B. Stable genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 63, p. 45-54, 2005.

ROGERS, C. W.; CHALLEN, M. P.; GREEN, J. R.; WHIPPS, J. M. Use of REMI and *Agrobacterium*-mediated transformation to identify pathogenicity mutants of the biocontrol fungus, *Coniothyrium minitans*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 241, p. 207-214, 2004.

ROLLAND, S.; JOBIE, C.; FEVRE, M.; BRUEL, C. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Botrytis cinerea*, simple purification of monokaryotic transformants and rapid conidia-based identification of the transfer-DNA host genomic DNA flanking sequences. **Current Genetics**, Berlin, v. 44, p. 164-171, 2003.

ROMÃO, A. S.; ARAÚJO, W. L. Efeito do cultivo de cana-de-açúcar geneticamente modificada sobre a comunidade fúngica associada. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. (Org.). **Micologia:** avanços no conhecimento. Recife: UFPE, 2007. p. 150-159.

RUDRESH, D. L.; SHIVAPRAKASH, M. K.; PRASAD, R. D. Effect of combined application of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 28, p. 139-146, 2005.

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

SCHULZ, B.; GUSKE, S.; DAMMANN, U.; BOYLE, C. Endophyte-host interactions II - defining symbiosis of the endophyte-host interaction. **Symbiosis**, Rehovot, v. 25, p. 213-227, 1998.

SCHULZ, B.; ROMMERT, A. K.; DAMMANN, U.; AUST, H. J.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? **Mycological Research**, Cambridge, v. 10, p. 1275-1283, 1999.

SIEBER, T. N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 21, p. 75-89, 2007.

SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. (Ed.). ***Trichoderma* and *Gliocladium***: basic biology, taxonomy and genetics. London: Taylor & Francis, 1998. chap. 7, p. 139-191.

STEVENS, R. B. **Mycology Guidebook.** Seatle: University of Washington Press, 1974. 703p.

STUART, R. M. **Comunidade de fungos endofíticos associada à cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada**. 2006. 66p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

STUART, R. M.; ROMÃO, A. S.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Culturable endophytic filamentous fungi from leaves of transgenic imidazolinone-tolerant sugarcane and its non-transgenic isolines. **Archives of Microbiology**, Berlin, 2010. In press.

TANAKA, A.; CHRISTENSEN, M. J.; TAKEMOTO, D.; PARK, P.; SCOTT, B. Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic interaction. **Plant Cell**, Baltimore, v. 18, p. 1052-1066, 2006.

THRANE, C.; TRONSMO, A.; JENSEN, D. F. Endo-1,3-β-glucanase and cellulase from *Trichoderma harzianum*: purification and partial characterization, induction of and biological activity against plant pathogenic *Pythium* spp. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, p. 331-344, 1997.

TOOLEY, P. W.; LEUNG, H.; LEONG, S. A. Meiotic and mitotic stability of transforming DNA in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Current Genetics**, Berlin, v. 21, p. 55-60, 1992.

TSAVKELOVA, E. A.; ALEKSANDROVA, A. V.; CHERDYNTSERA, T. A.; KOLOMEITSEVA, G. L.; NETRUSOV, A. I. Fungi associated with the Vietnamian tropical orchids. **Mikologiya I Fitopatologiya**, Saint Petersburg, v. 39, p. 46-52, 2005.

TU, J. C. *Gliocladium virens*, a destructive mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum* **Phytopathology**, Lancaster, v. 70, p. 670-674, 1980.

USUKI, F.; NARISAWA, K.; YONEZAWA, M.; KAKISHIMA, M.; HASHIBA, T. An efficient inoculation method for colonization of chinese cabbage seedlings by the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospira*. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 68, p. 326-332, 2002.

VARMA, A.; VERMA, S.; SAHAY, N.; BUTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2741-2744, 1999.

VERMA, M.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y.; VALÉRO, J. R. Antagonistic fungi, *Trichoderma spp*.: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 37, p. 1-20, 2007.

VIJN, I.; GOVERS, F. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 4, p. 459-467, 2003.

VIRET, O.; SCHEIDEGGER, C.; PETRINI, O. Infection of beech leaves (*Fagus sylvatica*) by the endophyte *Discula umbrinella* (teleomorph: *Apiognomoni aerrabunda*): low temperature scanning electron microscopy studies. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 71, p. 1520-1527, 1993.

WAGNER, B. L.; LEWIS, L. C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3468-3473, 2000.

WALKERPEACH, C. R.; VELTEN, J. *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. In: GELVIN, S. B.; SCHILPEROORT, R. A. (Ed.). **Plant molecular biology manual**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994, p. 1-19.

WEINDLING, R. Experimental consideration of the mold toxins of *Gliocladium* and *Trichoderma*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 31, p. 991-1003, 1941.

WHIPPS, J. M.; LUMSDEN, R. D. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. In: BUTT, T.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (Ed.). **Fungal Biocontrol Agents:** progress, problems and potential. Wallingford: CABI Publishing, 2001. p. 9-22.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 1061-1070, 1999.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 38, p. 863-873, 2000.

YEDIDIA, I.; SHORESH, M.; KEREM, Z.; BENHAMOU, N.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7343-7353, 2003.

YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A. K.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 235, p. 235-242, 2001.

ZEILINGER, S. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. **Current Genetics**, Berlin, v. 45, p. 54-60, 2004.

ZHONG, Y. H.; WANG, T. H.; WANG, X. L.; ZHANG, G. T.; YU, H. N. Identification and characterization of a novel gene, TrCCD1, and its possible function in hyphal growth and conidiospore development of *Trichoderma reesei*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 46, p. 255-263, 2009.

ZHONG, Y. H.; WANG, X. L.; WANG, T. H.; JIANG, Q. *Agrobacterium*-mediated transformation (AMT) of *Trichoderma reesei* as an efficient tool for random insertional mutagenesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 73, p. 1348-1354, 2007.

ZWIERS, L. H.; WAARD, M. A. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Current Genetics**, Berlin, v. 39, p. 388-390, 2001.

5 PAPEL DAS ENZIMAS QUITINOLÍTICAS NO CONTROLE BIOLÓGICO EFETUADO POR UMA LINHAGEM ENDOFÍTICA DE *Trichoderma virens*

Resumo

Por um longo tempo o micoparasitismo foi considerado o principal mecanismo de controle biológico empregado por fungos do gênero *Trichoderma*, e as enzimas quitinolíticas eram tidas como componentes essenciais desse processo. Entretanto, a publicação de resultados contraditórios na literatura acerca do papel das quitinases e a descoberta de novos mecanismos de biocontrole, têm feito com que o papel dessas enzimas na atividade de controle biológico por *Trichoderma* ainda não seja totalmente compreendido. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo determinar até que ponto as enzimas quitinolíticas desempenham papel fundamental na atividade de controle biológico pelo fungo *T. virens*. Para tal, uma linhagem endofítica (*T.v.***223**), isolada de raiz de cana-de-açúcar (Capítulo 2), foi confirmada como endófito de cana-de-açúcar e de três outros hospedeiros (arroz, feijão e alface) por reisolamento e imunolocalização, e depois, utilizada para geração de mutantes deficientes para produção de quitinases. Duas estratégias diferentes foram empregadas para obtenção dos mutantes: mutagênese sítio-dirigida por deleção gênica, para gerar mutantes simples e duplo dos genes de exoquitinase *Tv-nag1* e *Tv-nag2*, e silenciamento gênico via RNAi, para gerar mutantes silenciados para os genes de endoquitinase *Tv-ech1*, *Tv-ech2* e *Tv-ech3*. Os mutantes foram confirmados por *Southern blot*, *Northern blot*, checados para atividade quitinolítica por ensaios em gel contendo substratos fluorescentes específicos de quitina (MU, MU2 e MU3) e comparados com a linhagem selvagem *T.v.***223** quanto às características fenotípicas. Cinco mutantes (ΔHex10, ΔChi2.53, ΔHex.ΔChi2.1, S.pNO.8, S.pOf.28) foram então selecionados para realizar os testes de controle biológico *in vivo*, onde a capacidade de proteger a planta contra o ataque por patógenos foi comparada à da linhagem selvagem. Quatro fungos fitopatogênicos foram utilizados: *Ceratocystis paradoxa*, em cana-de-açúcar; *Sclerotinia* spp., em alface; *Rhizoctonia solani* em feijão e *Magnaporthe oryzae* em arroz. Os resultados obtidos nesses experimentos foram bem particulares, pois mostraram que as enzimas quitinolíticas podem ser essenciais à atividade de controle biológico efetuada por *T. virens*, mas que a importância e a participação dessas enzimas no processo dependem do tipo de planta e de patógeno envolvidos na interação. Isto é, em plantas de cana-de-açúcar os mutantes deficientes para atividade de endoquitinases apresentaram capacidade reduzida em controlar o patógeno *C. paradoxa*, contudo, em plantas de alface os mutantes deficientes para produção de exoquitinases foram os menos eficientes no controle de *Sclerotinia* spp. Já em plantas de feijão, nenhum dos mutantes exibiu qualquer alteração na performance de biocontrole de *R. solani*. Além disso, a capacidade de *T. virens* inoculado no solo em proteger plantas de arroz contra um patógeno foliar confirmou a idéia de que a produção de quitinases não seja o único mecanismo empregado por esse fungo durante a atividade de controle biológico, mas sim, que pelo menos em alguns casos, também a indução da resistência das plantas. Ou seja, é bem provável que *T. virens* empregue diferentes mecanismos de controle biológico dependendo do patógeno fúngico e/ou da espécie vegetal envolvidos na tripla interação.

Palavras-chave: *Trichoderma virens*; Controle biológico; Quitinases; Respostas de defesa; Fitopatógenos

5 ROLE OF CHITINOLYTIC ENZYMES IN THE BIOLOGICAL CONTROL ACHIEVED BY AN ENDOPHYTIC STRAIN OF *Trichoderma virens*

Abstract

For a long time mycoparasitism was considered the main mechanism of biological control by *Trichoderma* species, and the chitinolytic enzymes were considered critical in this process. However, conflicting results published in literature along with the discovery of new mechanisms of biocontrol, has made difficult to fully understand the role of these enzymes in the biological control activity of *Trichoderma.* The present work addressed the question to what extent chitinolytic enzymes are important in the process of biological control by *T. virens.* For that, an endophytic strain (*T.v.***223**), previously isolated from sugar cane root (Chapter 2), was assured as an endophyte of sugarcane and three other hosts (rice, bean and lettuce) by re-isolation and immuno-localization assays, and following that, it was used to generate chitinase-deficient mutants. Two different strategies were employed to generate the mutants: targeted mutagenesis by gene deletion, used to obtain single and double knock-outs of *Tv-nag1* and *Tv-nag2* exo-chitinase genes, and RNAi mediated silencing, used to obtain knocked-down mutants for the three endochitinase genes *Tv-ech1*, *Tv-ech2* and *Tv-ech3*. The mutants were checked by *Southern blot*, *Northern blot*, chitinolytic activity by in-gel assays using chitin-specific fluorescent substrates (MU, MU2 and MU3) and phenotypically compared to the wild type strain *T.v.***223**. Five mutants (ΔHex10, ΔChi2.53, ΔHex.ΔChi2.1, S.pNO.8, S.pOf.28) were selected to perform *in vivo* biological control tests, in which their abilities to protect plants from pathogen attack were compared to that of the wild type. Four different phytopathogens were used: *Ceratocystis paradoxa* infecting sugarcane; *Sclerotinia* spp. infecting lettuce; *Rhizoctonia solani* infecting bean and *Magnaporthe oryzae* infecting rice. Curiously, the results showed that chitinolytic activity may be essential to the biocontrol activity of *T. virens*, but its significance and the input of each chitinase depends on the plant and pathogen playing the interaction. That is, in sugarcane plants the mutants lacking endochitinase activity had reduced capacity to control the pathogen *C. paradoxa*, conversely, in lettuce plants the exo-chitinase-lacking mutants presented the reduced competence to control *Sclerotinia* spp., whereas in bean plants none of the mutants exhibited reduced biocontrol abilities against *R. solani.* In addition, the soil inoculated *T. virens* ability to protect rice plants from a foliar disease supported the idea that chitinase production is not the only mechanism this fungus employ during the biological control process, but at least in some cases, also the induction of plant resistance. Therefore, it seems likely that *T. virens* make use of different mechanisms of biological control depending on the fungal pathogen and/or the plant species playing the three-way interaction.

Keywords: *Trichoderma virens*; Biological control; Chitinases; Defense responses; Phytopathogen

5.1 Introdução

De maneira geral, fungos do gênero *Trichoderma* são considerados simbiontes avirulentos e oportunistas, uma vez que esse grupo é capaz tanto de viver livremente como saprófita no solo, como de estabelecer relações simbióticas com as plantas (HARMAN et al., 2004a). Linhagens mutualistas geralmente colonizam células do córtex radicular e estabelecem uma zona de interação química com a planta (HARMAN; SHORESH, 2007). Nessa simbiose, *Trichoderma* ganha acesso aos nutrientes da planta, os quais permitem que ele se prolifere e, em contrapartida, a planta aumenta seu crescimento e acúmulo de biomassa de parte aérea e raiz, aumenta a absorção de micronutrientes e ganha proteção contra o ataque de patógenos (HARMAN, 2000; HARMAN et al., 2004a; YEDIDIA; BENHAMOU; CHET, 1999; YEDIDIA et al., 2001). Essa zona de interação química *Trichoderma* – planta é muito importante, pois determina os efeitos do fungo na planta e as consequências da simbiose para ambos (HARMAN; SHORESH, 2007).

O fungo *Trichoderma virens* (teleomorfo *Hypocrea virens*) é considerado um dos agentes de controle biológico mais versátil e eficaz que se tem estudado até o momento (HOWELL, 2006). Por um bom tempo a capacidade que esse fungo tem de controlar doenças de plantas foi atribuída principalmente aos efeitos diretos em outros fungos, especialmente pela habilidade de atuar como um micoparasita e de produzir antibióticos (DI PIETRO et al., 1993; HOWELL, 1982; HOWELL; PUCKHABER, 2005; TU, 1980; WILHITE; LUMSDEN; STRANEY, 1994). Inclusive, o micoparasitismo tem sido bastante estudado nessa espécie e tradicionalmente as enzimas quitinolíticas têm sido consideradas essenciais nesse processo, já que o substrato delas, a quitina, é o componente mais abundante da parede celular da maioria dos fungos (PEBERDY, 1990). Lorito (1998a) propôs a separação das quitinases em três categorias, a partir do mecanismo empregado para quebrar as moléculas e dos produtos liberados. As endoquitinases (EC 3.2.1.14), comumente denominadas de quitinases, são aquelas que quebram molécula de quitina e quitoligômeros aleatoriamente, e liberam como produto da clivagem uma mistura de moléculas de baixo peso molecular de diferentes tamanhos, sendo que a diacetilquitobiose $(GlcNAc)_2$ é o produto mais comum. A quitobiosidase (*quitina-1,4-β-quitobiosidase*) é uma exoquitinase que catalisa a quebra progressiva da quitina e dos quitoligômeros a partir do terminal não reduzido da molécula, e libera apenas um tipo de produto, a $(GlcNAc)_2$. A última categoria inclui outro tipo de exoquitinase, a *β-N-acetilhexosaminidase* (EC 3.2.1.52), a qual

cliva quitina e quitoligômeros progressivamente a partir do terminal não reduzido e libera somente monômeros de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) (LORITO, 1998a). Diversas endo- e exoquitinases de *Trichoderma* spp. têm sido purificadas e caracterizadas (DE LA CRUZ et al., 1992; DI PIETRO et al., 1993; EL-KATATNY et al., 2001; HARAN et al., 1995; HARMAN et al., 1993; KIM et al., 2002; LORITO et al., 1994; ULHOA; PEBERDY, 1991; ULHOA; PEBERDY, 1992), e alguns genes já foram clonados (CARSOLIO et al., 1994; DRABORG et al., 1995; GARCÍA et al., 1994; HAYES et al., 1994; KIM et al., 2002; LIMÓN et al., 1995; PETERBAUER et al., 1996; VITERBO et al., 2001; VITERBO et al., 2002).

Alguns resultados da literatura acerca do papel das enzimas quitinolíticas no controle biológico por *Trichoderma* são contraditórios, fazendo com que o papel dessas enzimas ainda não seja totalmente compreendido. Isto é, muitos trabalhos descrevem o envolvimento de quitinases na atividade de controle biológico (BRUNNER et al., 2003; CARSOLIO et al., 1999; DE MARCO; VALADARES-INGLIS; FELIX, 2004; DI PIETRO et al., 1993; LIMÓN; PINTOR-TORO; BENITEZ, 1999; LU et al., 2004; PETERBAUER et al., 1996; SCHIRMBÖCK et al., 1994), entretanto, alguns estudos associam a eficiência de biocontrole por *Trichoderma* à outros mecanismos e não ao micoparasitismo (CARON, 1993; HOWELL, 1987; ROBERTS; LUMSDEN, 1990; ZIMAND; ELAD; CHET, 1991). Em *T. virens*, sete genes de quitinases já foram descritos (BAEK; HOWELL; KENERLEY, 1999; DI PIETRO et al., 1993; KIM et al., 2002), porém, até o momento o papel na atividade de controle biológico do fungo só foi avaliado para um gene (*cht42=ech42=T.v.-ech1*). Este gene, que codifica uma endoquitinase, foi superexpresso e inativado por disrupção, e os resultados mostraram aumento e redução na eficiência de biocontrole contra o fitopatógeno *Rhizoctonia solani*, respectivamente (BAEK; HOWELL; KENERLEY, 1999). Curiosamente, a inativação desse gene em *T. harzianum* linhagem P1 levou à redução da capacidade de controlar o patógeno *Botrytis cinerea*, mas aumentou a eficiência de biocontrole contra *R. solani* (WOO et al., 1999). Além disso, plantas transgênicas expressando o gene de endoquitinase *cht*42 de *T. virens* ou *ech*42 de *T. harzianum* mostraram-se mais resistentes ao ataque por diferentes fitopatógenos (BOLAR et al., 2000; EMANI et al., 2003; LORITO et al., 1998b).

Recentemente, muitos outros mecanismos têm sido considerados importantes na proteção das plantas contra patógenos por *Trichoderma*, incluindo, por exemplo, a competição por elicitores de germinação (HOWELL, 2002, 2003), a inibição de enzimas necessárias para

infecção (ZIMAND; ELADY; CHET, 1996) e, principalmente, a indução de respostas de defesa localizada ou sistêmica da planta (AHMED; SÁNCHEZ; CANDELA, 2000; DE MEYER et al., 1998; DJONOVIC et al., 2006; DJONOVIC et al., 2007; HANSON; HOWELL, 2004; HARMAN et al., 2004b; HOWELL et al., 2000; KOIKE et al., 2001; VITERBO et al., 2007; YEDIDIA et al., 2003). Durante a interação *Trichoderma* – planta, o fungo libera uma gama de compostos químicos bioativos, os quais desencadeiam uma série de reações no metabolismo da planta, geralmente incluindo a expressão de proteínas e/ou o acúmulo de fitoalexinas, envolvidas nos mecanismos de resistência da planta (HARMAN; SHORESH, 2007). Por exemplo, o fungo *T. virens* produz uma série de proteínas e peptídeos que induzem a produção de fitoalexinas do tipo terpenóide, as quais contribuem com a resistência contra patógenos em plantas de algodão (HANSON; HOWELL, 2004). *T. virens* também secreta um tipo de hidrofobina, denominada Sm1, cuja presença foi descrita como essencial para indução da resistência sistêmica em plantas de algodão e milho (DJONOVIC et al., 2006; DJONOVIC et al., 2007). Além disso, um tipo específico de peptídeo produzido por *T. virens*, os *peptaibols* de 18 mer, são poderosos elicitores de respostas de defesa em plantas de pepino desafiadas pelo patógeno foliar *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (VITERBO et al., 2007).

O conflito entre alguns resultados da literatura e a descoberta de novos mecanismos de proteção das plantas contra fitopatógenos faz com que o papel das enzimas quitinolíticas no biocontrole por *Trichoderma* ainda não seja completamente esclarecido. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo principal determinar até que ponto as enzimas quitinolíticas desempenham papel fundamental na atividade de controle biológico pelo fungo *T. virens*. Para tal, uma linhagem endofítica de *T. virens*, isolada de raiz de cana-de-açúcar (Capítulo 2), foi utilizada para geração de mutantes deficientes para produção de quitinases. Dois genes de exoquitinases (*Tv-nag1* and *Tv-nag2*) foram inativados por deleção gênica e três genes de endoquitinases foram silenciados simultaneamente por RNAi (*Tv-ech1*, *Tv-ech2*, *Tv-ech3*). Os mutantes defectivos na produção de quitinases foram comparados à linhagem selvagem quanto à habilidade de controlar diferentes patógenos em experimentos *in vivo*, e a importância das quitinases foi determinada.

5.2 Desenvolvimento

5.2.1 Materiais e métodos

5.2.1.1 Isolados fúngicos e condições de cultivo

A linhagem endofítica de *Trichoderma virens T.v.***223** (acesso GenBank GQ495269) e sua isolinha **T20** (expressando gene GFP e resistência ao antibiótico higromicina B) foram obtidos nos experimentos anteriores do presente trabalho, a partir do isolamento de fungos de raízes de cana-de-açúcar (Capítulo 2) e transformação genética mediada por *A. tumefaciens* (Capítulo 4). O patógeno *Ceratocystis paradoxa* foi gentilmente cedido pelo Centro de Tecnologia Canavieira – CTC, e os patógenos *Sclerotinia* spp. e *Magnaporthe oryzae* (linhagem **Guy-11**) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Nicholas J. Talbot (Universidade de Exeter, Inglaterra). O patógeno *Rhizoctonia solani* foi obtido da coleção de culturas do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo" (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo). O fungo *M. oryzae* foi cultivado em meio completo (MC) (PONTECORVO et al., 1953) e todos os outros fungos foram cultivados em BDA (Batata Dextrose Ágar, Difco). Para crescimento, os fungos foram cultivados em estufa a 25º C sob regime de 16 horas luz e 8 horas escuro.

5.2.1.2 Confirmação do comportamento endofítico de *T. virens*

5.2.1.2.1 Reisolamento de *T. virens* a partir de diferentes hospedeiros

Ensaios de reisolamento foram realizados para avaliar a capacidade de *T. virens* em colonizar endofiticamente diferentes órgãos de plantas de cana-de-açúcar, arroz, alface e feijão. Para preparar o inóculo fúngico, frascos cônicos contendo farelo de trigo autoclavado (10 g farelo de trigo: 30 mL água destilada) foram inoculados com cinco discos de micélio (5 mm de diâmetro) retirados da borda de crescimento de colônias do mutante **T20** crescidas em meio BDA (Difco) por 3 dias, e incubados por 5 dias a 25º C. Após o período de incubação, a mistura foi homogeneizada com espátula metálica. A inoculação do substrato de cultivo das plantas foi

realizada pela adição de 8 g do inóculo fúngico para cada 300 g de substrato, seguida da homogeneização completa e cuidadosa dessa mistura. Plantas crescidas em solo não inoculado foram adotadas como controle em todos os experimentos. O ensaio com cana-de-açúcar consistiu do plantio de plântulas axênicas micropropagadas (variedade SP80-1842) no substrato comercial Basaplant (Base Agro). Sementes de feijão (variedade IAC-Alvorada) e de alface (variedade Americana) foram plantadas no substrato Basaplant (Base Agro), e sementes de arroz (cultivar CO-39) foram plantadas numa mistura 1:1 de dois substratos comerciais (John Innes n° 2 e Levington F2). As plantas foram mantidas em casa de vegetação e amostradas após determinados períodos, sendo eles: 20 d, 40 d e 60 d para plantas de cana-de-açúcar; 5 d, 8 d, 10 d, 12 d, 15 d, 30 d, 45 d e 60 d para plantas de arroz; e 15 d e 30 d para plantas de alface e feijão. Para realizar o reisolamento de *T. virens* linhagem **T20**, cinco plantas de cada hospedeiro foram coletadas nos tempos mencionados acima, e seus órgãos (folhas, caule, raízes) foram submetidos ao processo de desinfecção superficial (sequência de imersão em etanol 70% por 60 s, hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3% (v/v) de cloro ativo por 90 s, etanol 70% por 30 s e duas lavagens em água destilada esterilizada). Após processados, os tecidos foram cortados em pequenos fragmentos de aproximadamente 40 mm^2, com auxílio de um estilete sobre placa de petri esterilizada. Foram transferidos 7 fragmentos vegetais para cada placa de Petri contendo meio de cultura BDA (Difco) acrescido do antibiótico tetraciclina (100 μg.mL^{-1}), para impedir crescimento bacteriano. No tratamento contendo o transformante **T20** também foram utilizadas placas onde o agente seletivo higromicina B (200 μg.mL^{-1}) foi adicionado ao meio de cultura, para restringir o crescimento fúngico às colônias da linhagem transformada **T20**. As placas de isolamento foram incubadas a 28º C por 2 a 14 dias e acompanhadas periodicamente para avaliação do crescimento de fungos. Após crescimento fúngico, o número total de colônias de *Trichoderma* foi anotado. Os isolados morfologicamente semelhantes a *T. virens* foram coletados e transferidos para meio de cultura BDA contendo 200 μg.mL^{-1} do agente seletivo higromicina B, para confirmação da identidade do isolado. Além disso, esses isolados também foram confirmados como *T. virens* linhagem **T20** a partir da análise da emissão de fluorescência verde sob microscópio óptico de epifluorescência (Zeiss Axiophot-2) usando o filtro FITC (459-490 nm).

5.2.1.2.2 Imunolocalização de *T. virens* em plantas de arroz

Para determinar a distribuição espacial do fungo *T. virens* linhagem **T20** no caule de plantas de arroz (cultivar CO-39), as sementes foram plantadas em substrato inoculado com *T. virens* (como descrito no item anterior 5.2.1.2.1) e os caules das plantas foram coletados após 30 dias de incubação em casa de vegetação para realizar o processo de imunolocalização utilizando o anticorpo monoclonal MF2, o qual é específico para *Trichoderma* (THORNTON et al., 2002). Plantas cultivadas em substrato não inoculado com *T. virens* foram utilizadas como controle. Para imunolocalização, o caule da planta de arroz foi seccionado em fatias de aproximadamente 1 mm, com o uso de uma lâmina. As secções foram distribuídas sequencialmente (da base para o topo do caule) em membrana PVDF (membrana de transferência Immobilon-P, Millipore), a qual estava disposta sobre papel de filtro embebido em PBS (0,8% NaCl; 0,02% KCl; 0,115% Na_2HPO_4; 0,02% KH_2PO_4 [pH 7.2]). Após 8 horas de transferência, a membrana foi submetida aos procedimentos necessários para detecção com o anticorpo monoclonal MF2 de acordo com o protocolo descrito por Thornton et al. (2002). A presença de *Trichoderma* foi determinada a partir do surgimento de um sinal de cor roxa no lugar onde as secções estavam dispostas. As secções que não contém *Trichoderma* não dão origem ao sinal de cor roxa. Para checar se o sinal detectado correspondia à *T. virens* **T20**, após a transferência para membrana PVDF, as secções foram dispostas em placas de Petri contendo meio BDA (Difco) acrescido do antibiótico higromicina B (200 $\mu g.ml^{-1}$) e incubados a 25º C por até 15 dias. Além disso, as colônias crescidas em meio BDA com higromicina B foram analisadas para emissão de fluorescência verde sob microscópio óptico de epifluorescência (Zeiss Axiophot-2) usando o filtro FITC (459-490 nm).

5.2.1.3 Obtenção de mutantes deficientes para produção de quitinases

5.2.1.3.1 Construção dos vetores de transformação

5.2.1.3.1.1 Vetores para deleção gênica

A estratégia de mutagênese sítio-específica por deleção gênica foi empregada para obter mutantes simples e duplo para dois genes de exoquitinases, *Tv-nag1* e *Tv-nag2*, descritos

anteriormente em *T. virens* por Kim et al. (2002). Os vetores de transformação foram construídos de acordo com o método *split-marker* (CATLETT et al., 2003), o qual facilita a obtenção das construções, pois elimina etapas de clonagem via emprego de PCR de fusão. Nesse método, cada transformação utiliza duas construções, cada uma contendo uma sequência (~ 1 kb) da região flanqueadora do gene-alvo e cerca de dois terços do cassete do marcador seletivo. Essas construções são obtidas por PCR de fusão, a partir de duas etapas de PCR. A recombinação homóloga entre as regiões do marcador seletivo que se sobrepõem e entre as regiões flanqueadoras da construção e as regiões correspondentes no genoma resultam na deleção do gene alvo e substituição pelo cassete do marcador seletivo. Os passos da construção dos vetores estão ilustrados na Figura 5.1 e as sequências dos iniciadores utilizados estão listadas na Tabela 5.1. Três mutantes foram obtidos por essa estratégia: dois mutantes simples com resistência à higromicina B (ΔHex10 – o qual contém a deleção do gene *Tv-nag2* e ΔChi2.53, o qual contém a deleção do gene *Tv-nag1*) e um mutante duplo com resistência à higromicina B e à sulfoniluréia (ΔHex.ΔChi2.1, o qual contém a deleção de ambos os genes *Tv-nag2* e *Tv-nag1*).

5.2.1.3.1.2 Vetores de silenciamento gênico via RNAi

A estratégia de silenciamento gênico via RNAi foi empregada para silenciar simultaneamente a expressão de três genes de endoquitinases, *Tv-ech1, Tv-ech2, Tv-ech3,* descritos anteriormente para *T. virens* por Kim et al. (2002). Dois vetores de silenciamento foram construídos, pSilent1-endochi e pSilent1-ToxA, usando como base o vetor pSilent1 desenvolvido por Nakayashiki et al. (2005) para ascomicetos. O vetor pSilent-1 (6,9 kb) carrega um cassete para resistência a higromicina B e uma unidade transcricional para expressão de um grampo de RNA com um espaçador constituído por um íntron do gene de cutinase de *M.* oryzae (NAKAYASHIKI et al., 2005) (Figura 5.2a). A construção dos vetores de silenciamento incluiu a inserção de um fragmento de 500 pb do gene de endoquitinase *Tv-ech2* em direções opostas (senso e anti-senso) no vetor pSilent1. Essa região de 500 pb do gene *Tv-ech2* apresenta mais de 90% de similaridade com regiões dos genes *Tv-ech1* e *Tv-ech3* e foi amplificada a partir do DNA genômico de *T. virens* linhagem *T.v.***223** com o uso de dois pares de iniciadores: 1F.endochi.XhoI + 2R.endochi.HindIII e 3F.endochi.KpnI + 4R.endochi.SphI (Tabela 5.1). Os fragmentos obtidos (senso=1F2R, anti-senso=3F4R) foram eluídos do gel (*Wizard® SV Gel and PCR Clean-up*

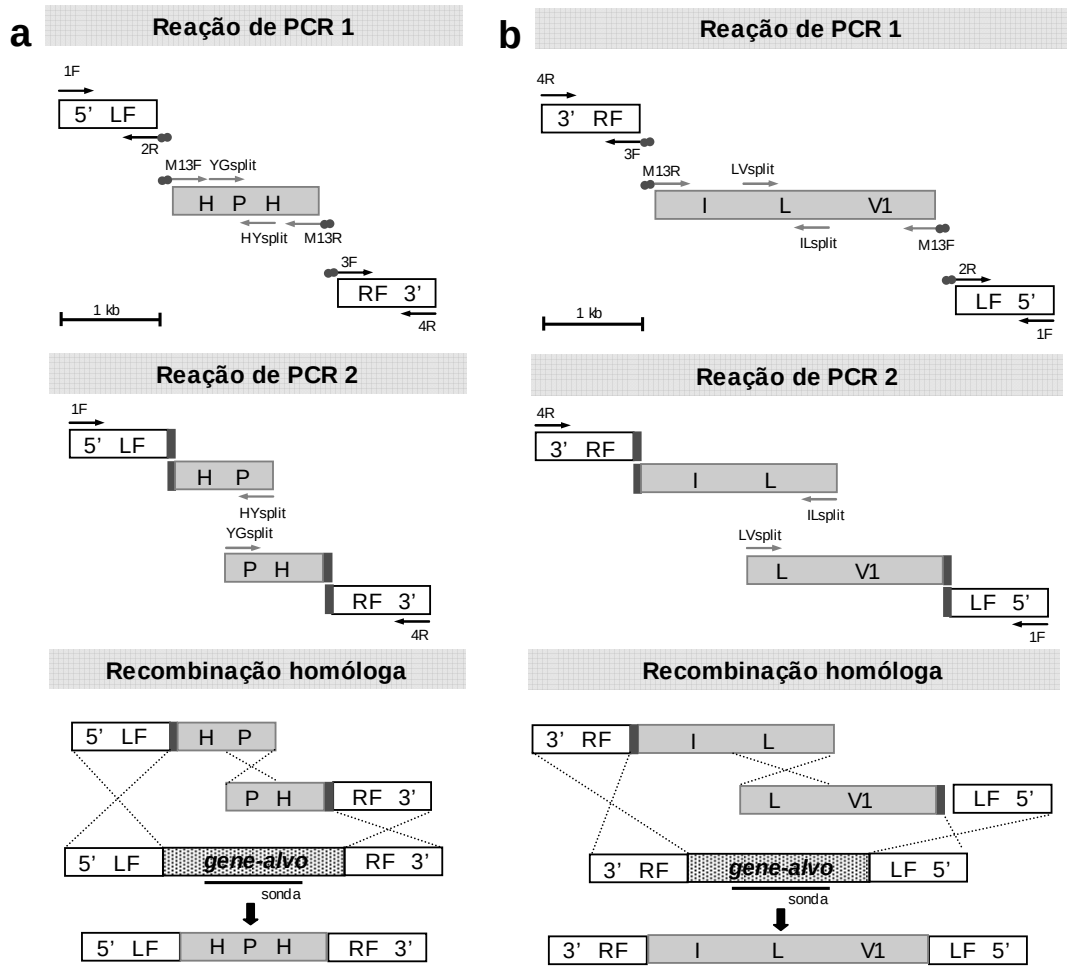


Figura 5.1 – Mutagênese sítio-específica dos genes de exoquitinase *Tv-nag1* e *Tv-nag2* por deleção gênica, com uso da estratégia *split-marker*. Os passos para construção dos vetores de transformação e a recombinação homóloga esperada estão representados em (**a**) para os mutantes simples, e em (**b**) para o mutante duplo. Em (**a**) os pares de iniciadores 1F+2R e 3F+4R foram utilizados para amplificar fragmento de 1 kb das regiões que flanqueiam o gene-alvo. Os iniciadores 2R e 3F são híbridos, pois contém nucleotídeos complementares aos iniciadores M13F e M13R na extremidade 5', respectivamente. Nesse passo, foram utilizados os iniciadores Chito2_50.1+Chito2_m13F e Chito2_m13R+Chito2_30.1 para o gene *Tv-nag1*, e HEX1_Fw+HEX1.M13F_Rev e HEX2.M13R_Fw+ HEX2_Rev para o gene *Tv-nag2*. Ainda no passo 1, os pares de iniciadores M13F+HYsplit e M13R+YGsplit foram usados para amplificar os fragmentos "HP" e "PH" do cassete de resistência à higromicina (gene *hph*), respectivamente. No passo 2, duas reações independentes de PCR foram realizadas para promover a fusão dos fragmentos das bordas do gene-alvo com os fragmentos do cassete do marcador seletivo, ou seja, os pares de iniciadores 1F+HYsplit e YGsplit+4R foram utilizados para fusão da borda 5'com o fragmento "HP" e da borda 3' com o fragmento "PH", respectivamente. Os mesmos passos foram realizados para geração do mutante duplo (**b**), a diferença é que, nesse caso, ao invés de transformar a linhagem selvagem *T.v.***223**, utilizou-se um mutante simples (com deleção para *Tv-nag2*) previamente obtido, e o marcador seletivo foi o cassete para resistência à sulfoniluréia (gene *ilv1*). Os pares de iniciadores utilizados no primeiro passo foram Chito2_m13R+Chito2_30.1 e Chito2_50.1+Chito2_m13F, para amplificação das regiões de 1 kb flaqueadoras do gene-alvo, e os pares ILsplit+M13R e M13F+LVsplit, para amplificação dos fragmentos "IL" e "LV1" do cassete do marcador seletivo, respectivamente. No segundo passo, foram empregados os pares de iniciadores Chito2_30.1+ILsplit e LVsplit+Chito2_50.1, para promover a fusão da borda 3' do gene-alvo com o fragmento "IL" e da borda 5'com o fragmento "LV1", respectivamente. As sequências dos iniciadores utilizados estão listadas na Tabela 5.1

Tabela 5.1 – Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados no presente trabalho

Iniciador	Sequência 5'-3'	Gene-alvo	Referência
HEX1_Fw	CCGGTTGCTGCCGAAACCTTCAAT	*Tv-nag2*	Este estudo
HEX1.M13F_Rev	GTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGGTTGCCGGTTGAGGAGTGTTTCGG	*Tv-nag2*	Este estudo
HEX2.M13R_Fw	TCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCCGATTACGCAGCTGTGGTGTAGT	*Tv-nag2*	Este estudo
HEX2_Rev	GGCCGAAATGATGACCCTTTGCGG	*Tv-nag2*	Este estudo
Chito2_50.1	GCTTCGACTGCTACTGTACTCCGT	*Tv-nag1*	Este estudo
Chito2_m13F	GTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGGCTGAAAGCCAATGCGGCAATCGC	*Tv-nag1*	Este estudo
Chito2_m13R	TCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCGCTGTTCACCTAAGGGGAGAGTC	*Tv-nag1*	Este estudo
Chito2_30.1	AACAGCATACACTGGGAAGACTCG	*Tv-nag1*	Este estudo
HY split	GGATGCCTCCGCTCGAAGTA	*hph*	Kershaw e Talbot (2009)
YG split	CGTTGCAAGACCTGCCTGAA	*hph*	Kershaw e Talbot (2009)
IL split	TCTGGTTGTATTCTCAGGAC	*ilv*	Kershaw (não publicado)
LV split	CATACCAAGCATGTGCAGTG	*ilv*	Kershaw (não publicado)
M13 F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	-	Carlson e Messing (1984)
M13 R	AGCGGATAACAATTTCACACAGGA	-	Carlson e Messing (1984)
1F.endochi.XhoI	CGCCAAATCTAGTCTCGAGCT	*Tv-ech2*	Este estudo
2R.endochi.HindIII	AAGCTTACCCCTCCCCGATGCCATTAT	*Tv-ech2*	Este estudo
3F.endochi.KpnI	GGTACCCGCCAAATCTAGTCTCGAGCT	*Tv-ech2*	Este estudo
4R.endochi.SphI	GCATGCACCCCTCCCCGATGCCATTAT	*Tv-ech2*	Este estudo
1F.SpeI.ToxA	ACTAGTCATGGAGGAGTTCTGTACGCGC	*ToxA*	Este estudo
2R.fusion.ToxA	AGCAGCTCGAGACTAGATTTGGCGGACCTATATTCATTCAATGTCAGC	*ToxA*	Este estudo
3F.fusion.ToxA	GCTGACATTGAATGAATATAGGTCCGCCAAATCTAGTCTCGAGCTGCT	*Tv-ech2*	Este estudo
Hex probe F	ACCAGACGGTCCAAGTTACCTACA	*Tv-nag2*	Este estudo
Hex probe R	TGTTTGCCTTATACTCGTCGCCTC	*Tv-nag2*	Este estudo
Chito2 probe F	CGTGCTCTTCATTGACCAGGCTGT	*Tv-nag1*	Este estudo
Chito2 probe R	GCTCGGAGTCGTTGACGTTGAGCT	*Tv-nag1*	Este estudo
Hyg probe 2F	AAGCCTGAACTCACCGCGACGTCT	*hph*	Este estudo
Hyg probe 3R	TGCTGGGGCGTCGGTTTCCACTAT	*hph*	Este estudo
Endochi probe1F	TGAGCTTCCTCGGCAAATCCGTGG	*Tv-ech1*	Este estudo
Endochi probe1R	AGCAGAATCCGTGTTGAAGGGAGT	*Tv-ech1*	Este estudo
Endochi probe2F	GGGAGACGGCTATCGTTCAGTTGC	*Tv-ech2*	Este estudo
Endochi probe2R	CGAAGATGCCATTCTCCCACGACC	*Tv-ech2*	Este estudo
Endochi probe3F	GCTCCTTTGCGTCGTTTTGGCCGT	*Tv-ech3*	Este estudo
Endochi probe3R	GTGTCGCCACGGTCAGAAGGTAGT	*Tv-ech3*	Este estudo

System, Promega) e clonados no plasmídio pGEM-T (Promega). O DNA plasmidial de colônias bacterianas contendo os insertos 1F2R ou 3F4R foram digeridos com o par de enzimas de restrição *Xho*I +*Hind*III ou *Kpn*I + *Sph*I, respectivamente. Os fragmentos obtidos (~ 500 pb) carregavam os sítios de restrição necessários para clonagem no vetor pSilent-1, nas orientações senso e anti-senso. Assim, para construir o vetor pSilent1-endochi (7,9 kb), o fragmento 1F2R foi clonado no sítio *Xho*I do vetor pSilent-1, ao lado do promotor *trp*C, e o fragmento 3F4R foi inserido no sítio *Sph*I, ao lado do íntron do gene de cutinase (Figura 5.2b). Já para construir o

vetor pSilent1-ToxA (7,0 kb), o fragmento 3F4R foi clonado no sítio *Sph*I do vetor pSilent-1, e o promotor *trp*C (1,6 kb) foi substituído por um fragmento contendo a fusão do promotor ToxA com 1F2R no sítio *Spe*I (Figura 5.2c). Esse fragmento de fusão (ToxA + 1F2R) foi gerado a partir de duas etapas de PCR: primeiro o promotor bacteriano ToxA e o fragmento 1F2R foram amplificados separadamente com o uso dos iniciadores 1F.SpeI.ToxA + 2R.fusion.ToxA e 3F.fusion.ToxA + 2R.endochi.HindIII, respectivamente; depois, uma segunda reação de PCR foi realizada utilizando os produtos da primeira etapa como molde para amplificação pelos iniciadores 1F.SpeI.ToxA + 2R.endochi.HindIII e produção de um fragmento contendo o promotor ToxA seguido do fragmento 1F2R. Esse fragmento foi eluído do gel (*Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System*, Promega), clonado no plasmídio pGEM-T (Promega), excisado e clonado no vetor pSilent-1 contendo o fragmento 3F4R.

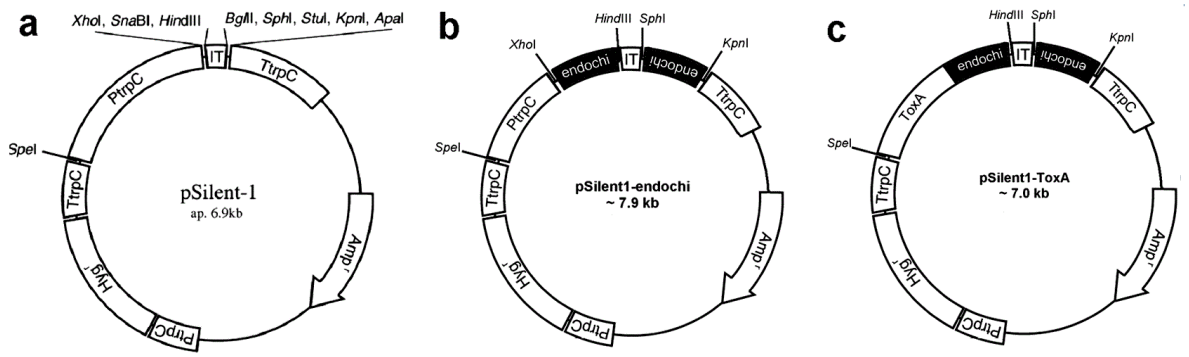


Figura 5.2 – Mapa dos vetores de silenciamento pSilent-1 (NAKAYASHIKI et al., 2005) (**a**), pSilent1-endochi (**b**) e pSilent1-ToxA (**c**). O vetor pSilent1-endochi (**a**) foi construído utilizando como base o vetor pSilent-1, a partir de duas etapas de clonagem assimétrica para inserção de um fragmento de 500 pb amplificado do gene *Tv-ech2*. O vetor pSilent1-ToxA (**b**), também construído utilizando pSilent-1 como base, consistiu da substituição do promotor *trpC* por um fragmento de fusão contendo o promotor ToxA ligado ao segmento de 500 pb do gene *Tv-ech2* na orientação senso, e a inserção do fragmento de 500 pb do gene *Tv-ech2* na orientação anti-senso no sítio *Sph*I. Amp^r, gene de resistência a ampicilina; Hyg^r, gene de resistência a higromicina B; *endochi*, fragmento de 500 pb amplificado a partir do gene *Tv-ech2*; IT, íntron 2 do gene de cutinase (CUT) de *M. oryzae*; PtrpC, promotor *trpC* de *Aspergillus nidulans*; TtrpC, terminador *trpC* de *A. nidulans*

5.2.1.3.2 Transformação genética, seleção dos mutantes e confirmação por *Southern blot*

A transformação genética de *T. virens* linhagem *T.v.***223** foi realizada pelo sistema protoplasto-PEG de acordo com protocolo descrito anteriormente por Baek e Kerneley (1998). Na transformação para geração dos duplos mutantes, os protoplastos foram incubados em BDCM

0,8 M sucrose [1,7 $g.l^{-1}$ de YNB (*yeast nitrogen base*) sem aminoácidos (Difco); 2 $g.l^{-1}$ de asparagina; 1 $g.l^{-1}$ de NH_4NO_3; 10 $g.l^{-1}$ de glicose; pH=6,0 com Na_2HPO_4] e crescidos por 24 horas a 25º C no escuro. Depois, as placas receberam uma sobrecamada de 15 mL de BDCM contendo 300 $\mu g.ml^{-1}$ do marcador seletivo sulfoniluréia (*Chlorimuron ethyl*, Chem Service) e foram mantidas a 25º C no escuro para permitir o crescimento de colônias transformadas. Nas transformações para obtenção de mutantes simples e mutantes silenciados por RNAi, os protoplastos foram incubados em BDA (Difco) 0,8 M sucrose, crescidos por 24 horas a 25º C no escuro, e cobertos com uma sobrecamada de 15 mL de BDA (Difco) contendo 900 $\mu g.ml^{-1}$ do marcador seletivo higromicina B. Colônias crescidas nas placas de transformação foram coletadas, transferidas para nova placa contendo meio seletivo e incubadas a 25º C sob regime de 16 horas luz e 8 horas escuro, para estimular a esporulação. Colônias isoladas foram obtidas de cada possível transformante e crescidas em 50 mL de BD (Difco) por cerca de 5 dias a 25º C, para obter massa micelial para extração de DNA. A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Raeder e Broda (1985) com modificações (descritas em detalhe anteriormente no Capítulo 2 do presente trabalho). A deleção gênica nos mutantes foi confirmada por *Southern blot* a partir do uso de uma sonda de 1 kb, a qual consistia de um fragmento amplificado da região interna do cassete do gene-alvo. Já a inserção dos vetores de silenciamento (pSilent1-endochi e pSilent1-ToxA) no genoma de *T. virens T.v.***223** foi confirmada por *Southern blot* com o uso de uma sonda de 1 kb amplificada a partir do cassete do marcador seletivo higromicina B. A sequência dos iniciadores utilizados para amplificação das sondas encontra-se listada na Tabela 5.1. Procedimentos padrões foram adotados para realizar as etapas da análise por *Southern blot* (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As sondas foram marcadas radioativamente pelo método do iniciador aleatório (FEINBERG; VOGELSTEIN, 1983) com o kit comercial *Ready-to-Go DNA Labelling Beads* (-dCTP) (GE Healthcare).

5.2.1.3.3 Análise do silenciamento gênico nos mutantes de *T. virens* por *Northern blot*

Para avaliar os níveis de silenciamento obtidos para cada um dos três genes de endoquitinase (*Tv-ech1, Tv-ech2, Tv-ech3*), seis transformantes (S.pOf21, S.pOf28, S.pOf36, S.pOf39, S.pOf8, S.pOf15) apresentando a inserção do vetor pSilent1-ToxA e seis transformantes (S.pNO8, S.pNO9, S.pNO3, S.pNO5, S.pNO31 e S.pNO13) apresentando a inserção do vetor

pSilent1-endochi, tiveram o nível de expressão de seus transcritos de endoquitinases comparado com os níveis observados para a linhagem selvagem *T.v.***223** por Northen blot. Para tal, os fungos foram crescidos em 50 mL de BD (Difco) por 6 dias a 25º C sob agitação constante (120 rpm) e depois transferidos para meio mínimo (MM) (PONTECORVO et al., 1953) contendo 10 $g.L^{-1}$ de quitina (Sigma) ao invés de glicose, onde foram mantidos sob agitação (120 rpm) a 25º C por 24 horas. O micélio fúngico foi então coletado, triturado com nitrogênio líquido e submetido às etapas de extração de RNA pelo protocolo LiCl-RNA. Brevemente, no primeiro dia o triturado foi transferido para tubo contendo volumes iguais do tampão de extração (0,1 M LiCl; 0,1 M Tris Base; pH=8,0 com HCl e depois acrescentar 10 mM de EDTA e 1% SDS) e de fenol, misturado por inversão por cerca de 1 min e então foi adicionado 0,5 vol de clorofórmio:álcool isoamílico (CIA) (24:1 vol/vol). O tubo foi invertido por cerca de 30 s para promover a mistura das substâncias e centrifugado por 30 min (16000X *g*, 4º C). O sobrenadante foi transferido para tubo novo contendo 1 vol de LiCl 4 M, e incubado a 4º C por 12 horas. No segundo dia, os tubos foram centrifugados por 20 min (16000X *g*, 4º C), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70%. O precipitado foi ressuspendido em 400 µL de água DEPC e volumes equivalentes de fenol e CIA foram adicionados. Após agitação no vortex por 30 s, o tubo foi centrifugado por 10 min (16000X *g*, 4º C) e o sobrenadante coletado e transferido para tubo novo contendo 2 vol de etanol 100% e 0,1 vol de NaAc 3M (pH 5,2). As amostras foram precipitadas por 12 horas a -20º C. No terceiro dia, as amostras foram centrifugadas por 20 min (16000X *g*, 4º C), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70%. Depois de seco, o precipitado foi ressuspendido em água DEPC e a integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2% com formaldeído. Procedimentos padrões foram adotados para realizar as etapas da análise por *Northern blot* (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Três sondas diferentes foram utilizadas para detecção dos transcritos, cada uma correspondendo a uma região de 1 kb do cassete de cada gene de endoquitinase (*Tv-ech1, Tv-ech2, Tv-ech3*). As sequências dos iniciadores utilizados para amplificação das sondas podem ser observadas na Tabela 5.1. As sondas foram marcadas radioativamente pelo método do iniciador aleatório (FEINBERG; VOGELSTEIN, 1983) com o kit comercial *Ready-to-Go DNA Labelling Beads* (-dCTP) (GE Healthcare).

5.2.1.3.4 Análise da atividade quitinolítica dos mutantes de *T. virens*

A atividade quitinolítica da linhagem selvagem *T.v.***223** e de 7 mutantes deficientes para produção de quitinases (ΔHex10, ΔChi2.53, ΔHex.ΔChi2.1, S.pNO8, S.pNO13, S.pOf28, S.pOf36) foi avaliada em ensaios em gel. Para obter as quitinases extracelulares, cinco discos de micélio (5 mm de diâmetro) foram retirados de colônias fúngicas com 3 dias de crescimento e inoculados em frascos cônicos contendo uma mistura de farelo de trigo e quitina (5 g de farelo de trigo; 15 mL de água destilada; 1 % quitina; autoclavado a 121º C por 15 min), e então incubados a 25º C por 4 dias. Depois do período de incubação, 25 mL de água destilada (autoclavada) foram adicionados em cada frasco e misturados em agitador magnético por 1 hora à temperatura ambiente. Um mililitro de extrato protéico foi coletado de cada amostra e estocado a -20º C. Amostras controle consistiram de mistura de farelo de trigo e quitina não inoculada com *T. virens*, sendo os tratamentos compostos por três repetições. Cerca de 20 µg de proteína de cada amostra foi preparada para eletroforese pela diluição (1:4) em tampão Laemmli (62,5 mM de Tris-HCl, pH 6,8; 2,35% de SDS; 100 mM de DTT; 10% glicerol; 1 mM de EDTA; 0,001% de azul de bromofenol) sem 2-mercaptoetanol. As proteínas foram separadas pela técnica de SDS-PAGE (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida de Sulfato Dodecil Sódio), juntamente com um marcador molecular comercial (*prestained SDS-PAGE standards, broad range*, Biorad). A corrida do gel foi realizada a 165 V por 1 hora e 30 min à temperatura ambiente. Após a eletroforese, as proteínas foram renaturadas pela lavagem do gel em 50 mL de tampão de renaturação (40 mM de Tris-HCl, [pH 9,0]; 2 mM de EDTA; 1% caseína) por 15 min, sob leve agitação. Esse procedimento foi repetido três vezes. Em seguida, o gel foi lavado duas vezes em tampão de acetato de sódio 100 mM (pH 4,8), por 15 min cada vez. Outro gel, de 0,5 mm de espessura, foi preparado (1% de agarose em tampão de acetato de sódio) contendo 0,03% (vol/vol) do substrato da enzima contendo o grupo 4-metilumbelliferona. Esse gel, por sua vez, foi disposto sobre o gel de SDS-PAGE contendo as proteínas e incubado à temperatura ambiente por até 24 horas. O resultado da hidrólise do substrato 4-metilumbelliferona de moléculas de mono-GlcNAc e oligossacarídeos dá origem a um sinal fluorescente sob luz ultravioleta, indicando a presença de atividade enzimática por quitinases. Os seguintes substratos foram utilizados: MU (4-methylumbelliferyl-*N*-acetyl-*β*-D-glucosaminide), MU2 (4-methylumbelliferyl-*β*-D-*N,N'*-diacetylchitobiose) e MU3 (4-methylumbelliferyl-*β*-D-*N,N',N''*triacetylchitotriose) (Sigma).

5.2.1.3.5 Análise fenotípica dos mutantes

Com o intuito de verificar se as alterações genéticas deram origem a algum tipo de alteração fenotípica, cinco mutantes deficientes para produção de quitinases (ΔHex.10, ΔChi2.53, ΔHex.ΔChi2.1, S.pNO.8 e S.pOf.28) foram selecionados para terem suas características fenotípicas comparadas com as características da linhagem selvagem *T.v.***223**. Assim, as colônias fúngicas foram avaliadas quanto à morfologia, taxa de crescimento, produção de conídios e taxa de esporulação. Para tal, discos de micélio (2 mm de diâmetro) foram retirados de colônias com 3 dias de crescimento e inoculados no centro de placas de Petri contendo meio BDA (Difco). As placas foram incubadas a 25º C sob regime de 16 horas luz e 8 horas escuro e avaliadas a cada 12 horas, até atingir 48 horas. A taxa de esporulação foi determinada pela contagem do número de conídios (em câmara de Neubauer) obtidos a partir da suspensão em água dos conídios de 3 discos de micélio (5 mm de diâmentro) retirados de colônias com 5 dias de crescimento. Foram realizados dois experimentos independentes, onde cada tratamento foi representado por três repetições.

5.2.1.4 Ensaios de controle biológico *in vivo*

Cinco mutantes deficientes para produção de quitinases (ΔHex.10, ΔChi2.53, ΔHex.ΔChi2.1, S.pNO.8, S.pOf.28) foram comparados com a linhagem selvagem *T.v.***223** quanto à capacidade de controlar diferentes fitopatógenos fúngicos em experimentos *in vivo* conduzidos em casa de vegetação. Quatro patógenos foram utilizados infectando diferentes hospedeiros: *M. oryzae* (agente causal do brusone em arroz) em plantas de arroz; *C. paradoxa* (agente causal da podridão abacaxi em cana-de-açúcar) em plantas de cana-de-açúcar, *Sclerotina* spp. (patógeno de solo responsável pelo tombamento de plântulas) em plantas de alface e *R. solani* (patógeno de solo responsável pelo tombamento de plântulas e podridão de raízes) em plantas de feijão. O inóculo fúngico foi preparado de acordo com o que foi descrito anteriormente para reisolamento (item 5.2.1.2.1). A proporção de 8 g de inóculo fúngico para cada 300 g de solo foi adotada em todos os ensaios. No ensaio com plantas de arroz, sementes do cultivar CO-39 foram plantadas numa mistura 1:1 de dois substratos comerciais (John Innes nº 2 e Levington F2) inoculado com *T. virens*. Após 15 dias, plântulas no estágio de três folhas foram infectadas por esporos de *M.*

oryzae, seguindo protocolo descrito por Talbot et al. (1993). O surgimento de sintomas de brusone foi avaliado 5 dias após a infecção, sendo que, para cada folha de todas as plantas, as lesões foram contadas e classificadas de acordo com uma escala de severidade (Figura 5.3). Cada tratamento consistiu de seis repetições (vasos) contendo 5 plantas de arroz cada. No ensaio com plantas de cana-de-açúcar, toletes da variedade SP80-1842, contendo uma gema cada, foram plantados no substrato Basaplant (Base Agro) inoculado com *T. virens* e também com o patógeno *C. paradoxa*, nas mesmas proporções. A porcentagem de germinação foi avaliada semanalmente, até completar 6 semanas. Cada tratamento incluiu 12 repetições e o experimento inteiro foi repetido duas vezes. No experimento com plantas de alface, sementes da variedade americana foram plantadas em placas de Petri quadradas (120 x 120 mm) contendo 200 g de turfa [1 L de Turfa (Shamrock): 400 mL água destilada; autoclavado a 121º C por 15 min] inoculada com *T. virens* e também com o patógeno *Sclerotinia* spp, nas mesmas proporções. O experimento incluiu três repetições (placas com 25 sementes de alface) para cada tratamento. A porcentagem de germinação foi determinada 10 dias após a semeadura. No experimento com plantas de feijão, sementes do cultivar IAC-Alvorada foram plantadas no substrato comercial Basaplant (Base Agro) inoculado com *T. virens* e também com o patógeno *R. solani*. A porcentagem de germinação e o número de plântulas doentes foi avaliado após 20 d do plantio. Cada tratamento incluiu seis repetições (vaso com cinco sementes), e o experimento foi repetido duas vezes.

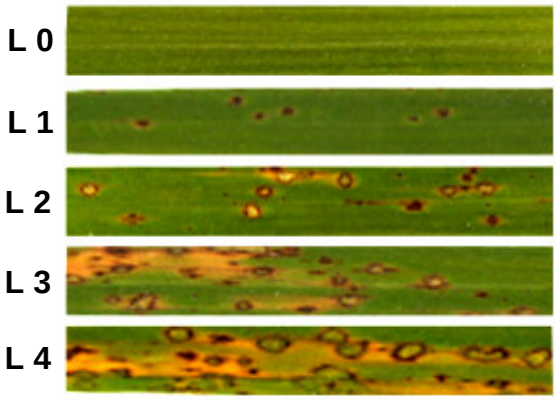


Figura 5.3 – Escala visual de severidade dos sintomas de brusone em folhas de arroz (cultivar CO-39), modificada de Valent, Farrall e Chumley (1991), como consequência da infecção pelo patógeno *M. oryzae* (linhagem **Guy-11**). Os segmentos foliares ilustram os tipos de lesão considerados na escala de severidade. Tipo **L 0**: nenhum sintoma visível de infecção fúngica; tipo **L 1**: lesões de coloração marrom-escuro de tamanho muito pequeno; tipo **L 2**: lesões pequenas apresentando borda marrom e centro amarelado; tipo **L 3**: lesões de tamanho mediano, apresentando borda marrom, centro amarelado e regiões amareladas no seu entorno; tipo **L 4**: lesões de tamanho grande, apresentando borda marrom, centro amarelado e amplas áreas amareladas no seu entorno, sendo que em alguns casos também podem ser observadas áreas necróticas

Todos os ensaios de controle biológico incluíram tratamento controle, o qual consistiu de plantas crescidas em solo não inoculado com qualquer fungo.

5.2.1.5 Análise estatística dos dados

A análise estatística dos resultados dos experimentos do presente capítulo foi realizada utilizando os procedimentos dos modelos lineares gerais (*glm*) do pacote estatístico SAS (*Statistical Analysis Systems - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA*). As comparações entre médias foram realizadas pelo comando *means* desse pacote estatístico. As frequências fúngicas obtidas nos reisolamentos foram transformadas pela fórmula $\sqrt{x+0.5}$ antes de rodar a análise estatística, visando a normalização dos dados, sendo que tanto o órgão da planta como a época de isolamento foram considerados fontes de variação. Nos ensaios de controle biológico com plantas de alface e feijão a porcentagem de germinação foi transformada pela fórmula $arcsen\sqrt{x}$ antes da análise estatística, visando a normalização dos dados.

5.2.2 Resultados

5.2.2.1 Confirmação do comportamento endofítico de *T. virens* linhagem *T.v.*223 em diferentes hospedeiros

A capacidade de *T. virens* linhagem *T.v.***223** em colonizar endofiticamente tecidos de plantas de cana-de-açúcar, arroz, alface e feijão foi avaliada pela reintrodução do transformante **T20** (expressando resistência a higromicina B e a proteína GFP) nas plantas, seguida de reisolamento e imunolocalização (apenas para plantas de arroz). Os resultados obtidos mostraram que essa linhagem é capaz de colonizar diferentes tecidos das plantas endofiticamente, com variações na frequência e localização entre os diferentes hospedeiros considerados. Em cana-de-açúcar, a análise estatística mostrou que, com exceção do reisolamento de raízes aos 40 dias, todos os outros tratamentos apresentaram frequências de reisolamento de *T. virens* semelhantes (Figura 5.4a). Além disso, foi possível observar que esse fungo coloniza de forma persistente e em frequências baixas colmo e raízes da planta, mas praticamente não se desloca para colonizar tecidos foliares (Figura 5.4a). Em arroz, os resultados de reisolamento mostraram que *T. virens*

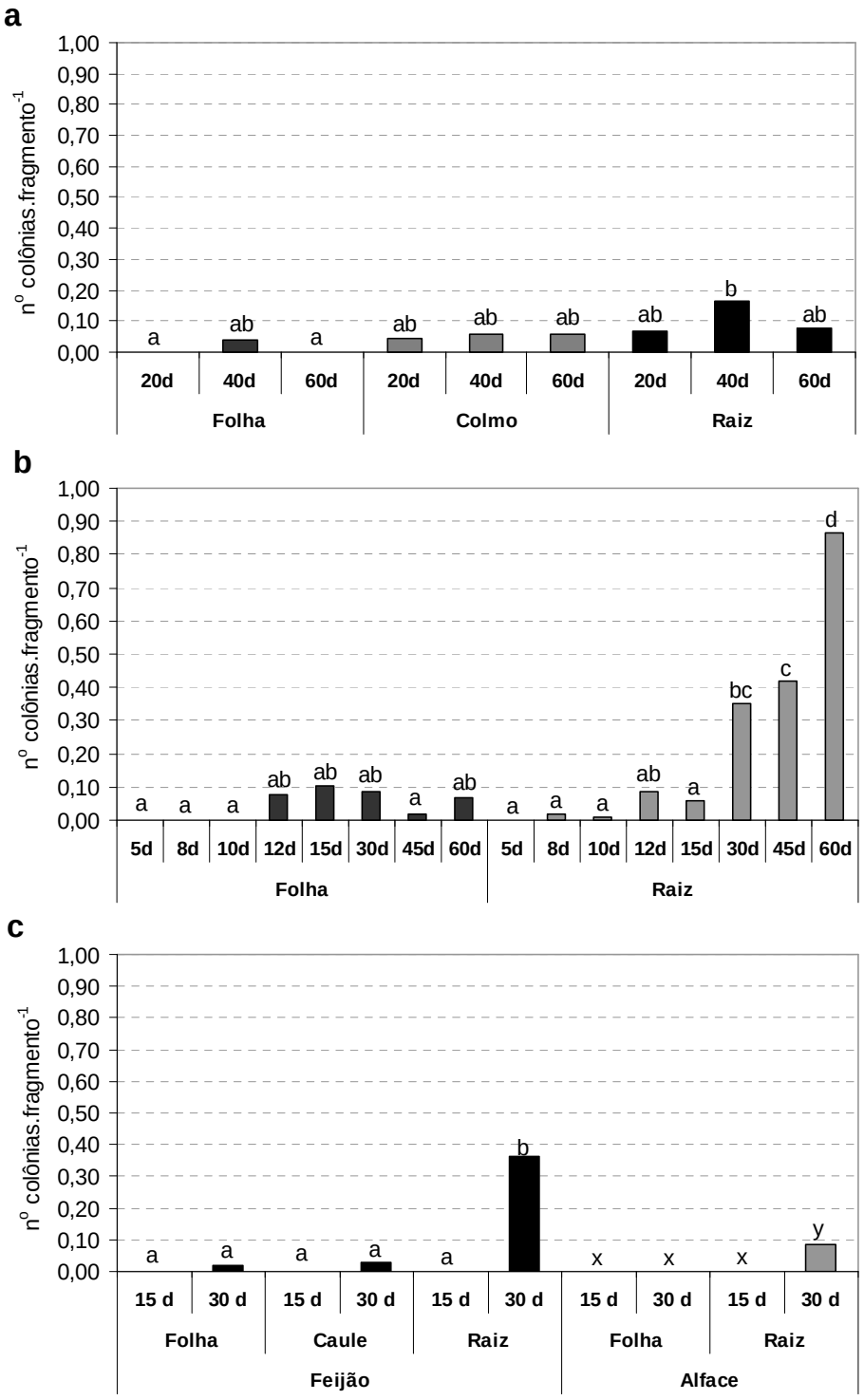


Figura 5.4 – Frequências de reisolamento de *T. virens* linhagem transformada **T20** a partir de diferentes tecidos de plantas de cana-de-açúcar (**a**), arroz (**b**), feijão e alface (**c**). As plantas foram cultivadas em solo inoculado com *T. virens* linhagem **T20** e amostradas após determinados períodos para realização do processo de reisolamento. As barras representam média de cinco repetições. Letras apresentadas sobre as barras indicam o resultado do teste t para de comparação de médias. Barras indicadas por letras iguais não diferem significativamente a 95% de significância

pode ser detectado em folhas a partir do 12º dia, sendo que a frequência de colonização observada foi relativamente baixa, persistente e não aumentou de forma significativa até o 60º dia (Figura 5.4b). Diferentemente, nas raízes *T. virens* foi observado a partir do 8º dia, sendo que a frequência de colonização aumentou significativamente até o 60º dia (Figura 5.4b). A maior frequência de colonização foi observada nas raízes com 60 dias, onde praticamente 90% dos fragmentos amostrados apresentaram crescimento de *T. virens.* Além de determinar a presença de *T. virens* por reisolamento, esse fungo também foi detectado no caule de plantas de arroz por imunolocalização. Nesse caso, o emprego do anticorpo monoclonal MF2, específico para *Trichoderma,* permitiu a localização espacial do fungo ao longo do caule de planta de arroz com 30 dias (Figura 5.5a). Nenhum sinal de *Trichoderma* foi observado por imunolocalização a partir de plantas não inoculadas (Figura 5.5b). Em alface, os resultados de reisolamento mostraram que *T. virens* foi capaz de colonizar apenas tecidos radiculares de plantas com 30 dias, em frequências baixas (Figura 5.4c). De forma semelhante, esse fungo só foi reisolado de plantas de feijão aos 30 dias, principalmente a partir de tecidos radiculares, embora também tenha sido detectado, em baixíssimas frequências, em tecidos de folhas e caule (Figura 5.4c). É pertinente mencionar que em todos os experimentos realizados *T. virens* **T20** não foi observado colonizando plantas não inoculadas (controle), e plantas inoculadas apresentavam-se saudáveis sem qualquer sintoma de doença. De maneira geral, os dados obtidos nesses experimentos indicam que *T. virens* seja um endófito de raízes tanto de plantas monocotiledôneas como de dicotiledôneas. Entretanto, é provável que essa linhagem de *T. virens* esteja mais adaptada a colonizar tecidos de monocotiledôneas, já que nas plantas avaliadas dessa classe esse fungo foi observado em maiores frequências e também em outros órgãos além da raiz.

5.2.2.2 Geração de mutantes deficientes para produção de quitinases

A transformação genética de *T. virens* linhagem *T.v.***223** com construções específicas (Figura 5.1a) para deleção gênica permitiu a geração de mutantes simples para os genes de exoquitinase (*Tv-nag1* e *Tv-nag2*), pela substituição do gene-alvo pelo cassete de 1,4 kb do marcador seletivo (resistência ao antibiótico higromicina B). Mutantes resistentes à higromicina B foram analisados por *Southern blot* para confirmação da deleção gênica (Figura 5.6a,b), e um mutante estável de cada gene de exoquitinase (ΔChi2.53 e ΔHex10, carregando deleção para

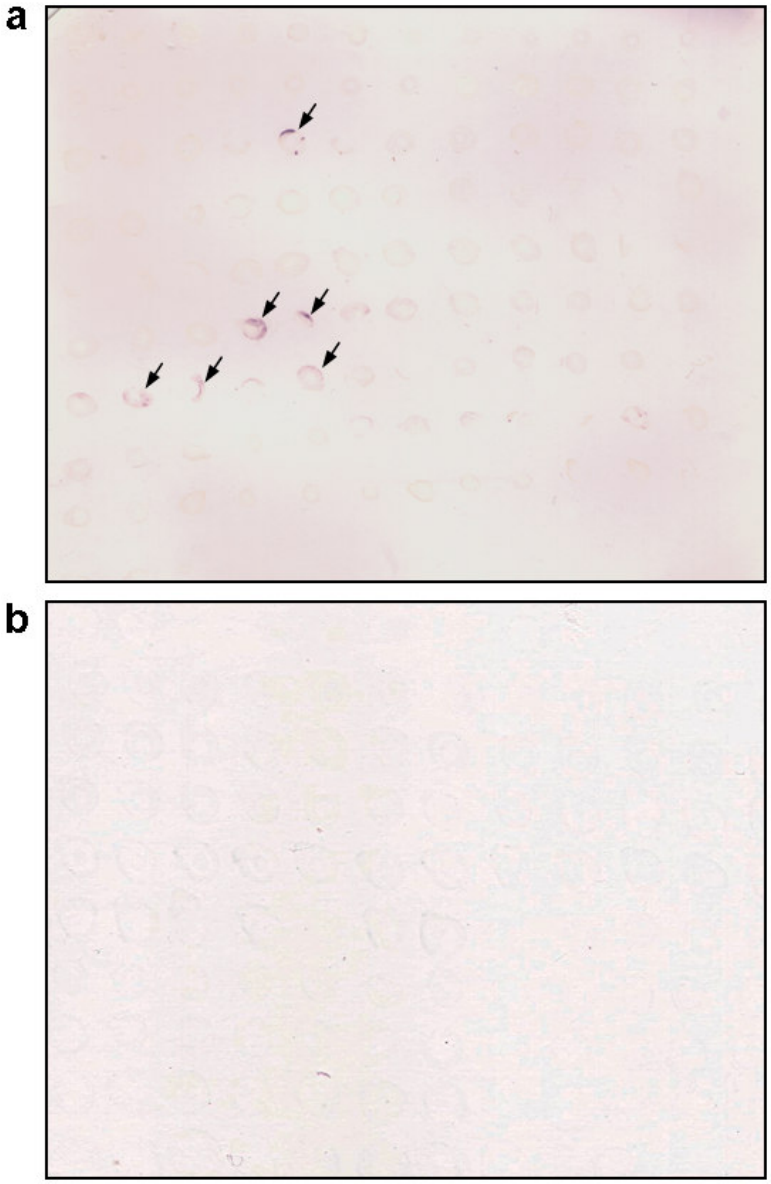


Figura 5.5 – Imunolocalização de *T. virens* com o uso do anticorpo monoclonal MF2, específico para *Trichoderma* (THORNTON et al., 2002). *T. virens* linhagem **T20** foi localizada espacialmente no caule de plantas de arroz com 30 dias a partir da distribuição sequencial (da base para o topo) das secções de caule em membrana PVDF, transferência de proteínas para a membrana, ligação ao anticorpo MF2 e detecção com substrato específico. A presença do anticorpo foi verificada pelo surgimento de sinal de cor roxa no lugar onde as secções que continham *Trichoderma* estavam dispostas (observe as setas indicando exemplos da detecção). Em (**a**) está apresentada a membrana obtida a partir da transferência de secções de caule de plantas de arroz inoculadas com *T. virens*, e em (**b**) a membrana obtida para as secções de caule de plantas de arroz não inoculadas

Tv- nag1 e *Tv-nag2*, respectivamente) foi selecionado para as análises posteriores. O mutante ΔHex10 foi utilizado para geração do mutante duplo (ΔHex.ΔChi2.1), onde o gene *Tv-nag1* foi substituído pelo cassete de 2,8 kb do marcador seletivo (resistência à sulfoniluréia) (Figura 5.6c). Outra estratégia, o silenciamento gênico por RNAi, foi utilizada para facilitar a geração de mutantes deficientes para produção de endoquitinases, já que é descrito que *T. virens* carrega pelo menos três genes de endoquitinases (*Tv-ech1, Tv-ech2* e *Tv-ech3*) (KIM et al., 2002). Dois vetores de silenciamento foram construídos, pSilent1-endochi e pSilent1-ToxA, a partir do vetor pSilent-1 (NAKAYASHIKI et al., 2005), e diferindo no promotor que eles carregam (Figura 5.2b,c). A transformação genética de *T. virens* linhagem *T.v.***223** com esses vetores deu origem a mutantes resistentes à higromicina B. A confirmação da inserção e a determinação do número de cópias do vetor foi realizada por *Southern blot* (Figura 5.6d,e). Para verificar a eficiência da ação dos vetores de silenciamento, o nível de expressão dos três genes de endoquitinases (*Tv-ech1, Tv-ech2* e *Tv-ech3*) foi analisado por *Northern blot*, e os níveis de expressão obtidos para a linhagem selvagem *T.v.***223** foram comparados com os níveis observados em outros doze mutantes (Figura 5.7). Os dados obtidos mostraram que a inserção dos vetores de silenciamento no genoma de *T. virens* deu origem a diferentes resultados na expressão gênica dos genes de endoquitinase (Figura 5.7). Basicamente, seis diferentes comportamentos foram observados: 1) redução do nível dos transcritos de mRNA para os três genes de endoquitinase; 2) aumento no nível de expressão dos três genes de endoquitinase; 3) redução do nível dos transcritos de dois genes e manutenção do nível dos transcritos de um gene; 4) redução do nível dos transcritos de mRNA de dois genes e aumento dos níveis de um gene; 5) redução do nível dos transcritos de mRNA de um gene, aumento da expressão de outro gene e manutenção da expressão do terceiro gene; 6) eliminação total da expressão de um gene, aumento na expressão de outro gene e manutenção da expressão do terceiro gene. Curiosamente, apenas dois mutantes (S.pOf28 e S.pOf39) apresentaram silenciamento completo de um gene de endoquitinase (*Tv-ech1*), sendo que todos os outros mutantes analisados apresentaram níveis variados de redução da expressão de um ou mais genes (Figura 5.7). Apenas 17% dos mutantes avaliados apresentaram redução da expressão dos três genes de endoquitinase simultaneamente, enquanto que 50% e 25% dos mutantes apresentaram redução do nível de expressão de dois e de um gene, respectivamente. Além disso, 50% dos mutantes avaliados tiveram redução na expressão do gene *Tv-ech1*, 58% apresentou redução na expressão do gene *Tv-ech2*, e 66% mostrou redução da expressão do gene *Tv-ech3*. A

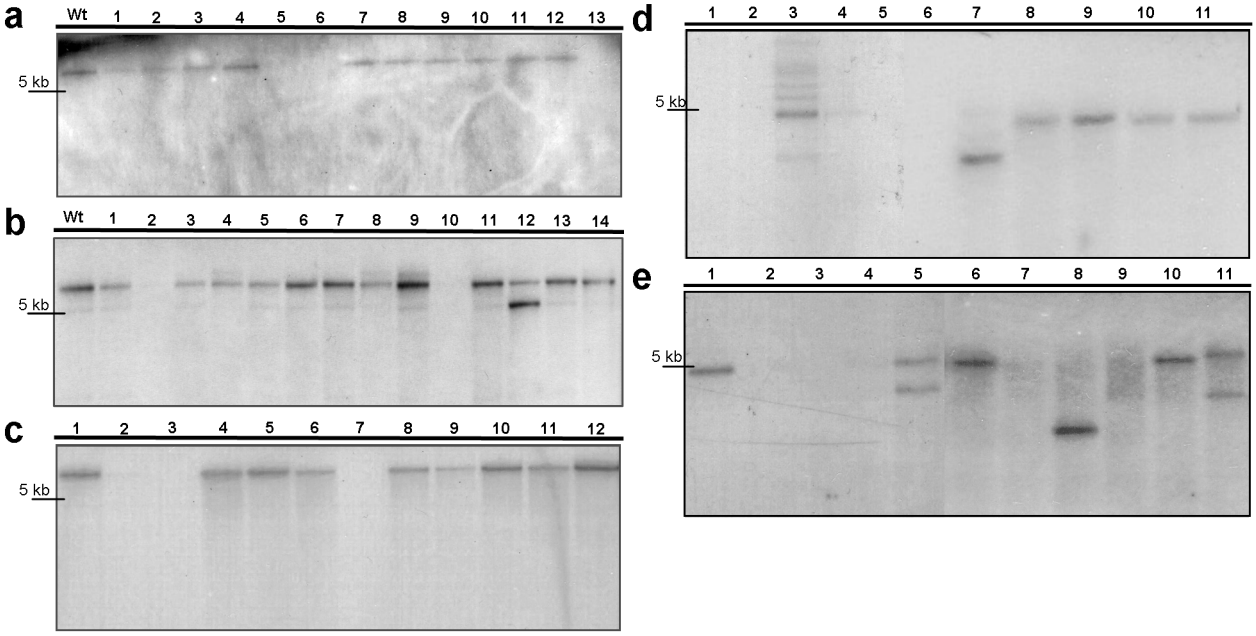


Figura 5.6 – Análise de *Southern blot* para os mutantes obtidos por deleção gênica (**a**, **b** e **c**) e por silenciamento gênico via RNAi (**d** e **e**). O DNA genômico dos fungos foi digerido com enzima de restrição, corrido em gel de agarose 0,8%, transferido para membrana de náilon e hibridizado com sonda de 1 kb marcada radioativamente. Em (**a**) análise dos mutantes simples para *Tv-nag1*: linha **Wt** contém DNA da linhagem selvagem *T.v.***223**; linhas **2-13** contém DNA de possíveis mutantes simples, sendo eles ΔChi2.8, ΔChi2.11, ΔChi2.12, ΔChi2.20, ΔChi2.53, ΔChi2.26, ΔChi2.40, ΔChi2.42, ΔChi2.44, ΔChi2.46, ΔChi2.2, ΔChi2.3, ΔChi2.5, ΔChi2.55, respectivamente. Em (**b**) análise dos mutantes simples para *Tv-nag2*: linha **Wt** contém DNA da linhagem selvagem *T.v.***223**; linhas **2-14** contém DNA de possíveis mutantes simples, sendo eles ΔHex1, ΔHex2, ΔHex3, ΔHex4, ΔHex5, ΔHex6, ΔHex7, ΔHex8, ΔHex9, ΔHex10, ΔHex11, ΔHex12, ΔHex13 e ΔHex14, respectivamente. Em (**c**) análise dos mutantes duplos (deleção dos genes *Tv-nag1* e *Tv-nag2*): linha **1** contém DNA do mutante simples ΔHex10 (controle positivo); linha **2** contém DNA do mutante simples ΔChi2.53 (controle negativo); linhas **3**–**12** contém DNA de possíveis mutantes duplos, sendo eles, ΔHex.ΔChi2.1, ΔHex.ΔChi2.2, ΔHex.ΔChi2.3, ΔHex.ΔChi2.4, ΔHex.ΔChi2.5, ΔHex.ΔChi2.7, ΔChi1ΔChi2.1, ΔChi1ΔChi2.2, ΔChi1ΔChi2.3 e ΔChi1ΔChi2.4, respectivamente. Em (**d**) possíveis mutantes para o vetor de silenciamento pSilent1-endochi: linha **1** contém DNA da linhagem selvagem *T.v.***223**; linha **2-11** contém DNA de possíveis mutantes, sendo eles, S.pNO6, S.pNO8, S.pNO15, S.pNO23, S.pNO28, S.pNO3, S.pNO5, S.pNO9, S.pNO13, S.pNO31. Em (**e**) possíveis mutantes para o vetor de silenciamento pSilent1-ToxA: linha **1** contém DNA do possível mutante S.pOf28; linha **2** contém DNA da linhagem selvagem *T.v.***223**; linha **3-11** contém DNA de outros possíveis mutantes, sendo eles, S.pOf31, S.pOf32, S.pOf39, S.pOf21, S.pOf32, S.pOf36, S.pOf40, S.pOf15 e S.pOf8. Em (**a**), (**b**) e (**c**), a ausência de banda confirma a deleção gênica, pois a sonda utilizada consiste de um fragmento de 1 kb da sequência interna do gene-alvo. Em (**d)** e (**e)**, a presença de banda confirma a inserção do vetor de silenciamento, já que a sonda consiste de fragmento de 1 kb da sequência do cassete do marcador seletivo higromicina B

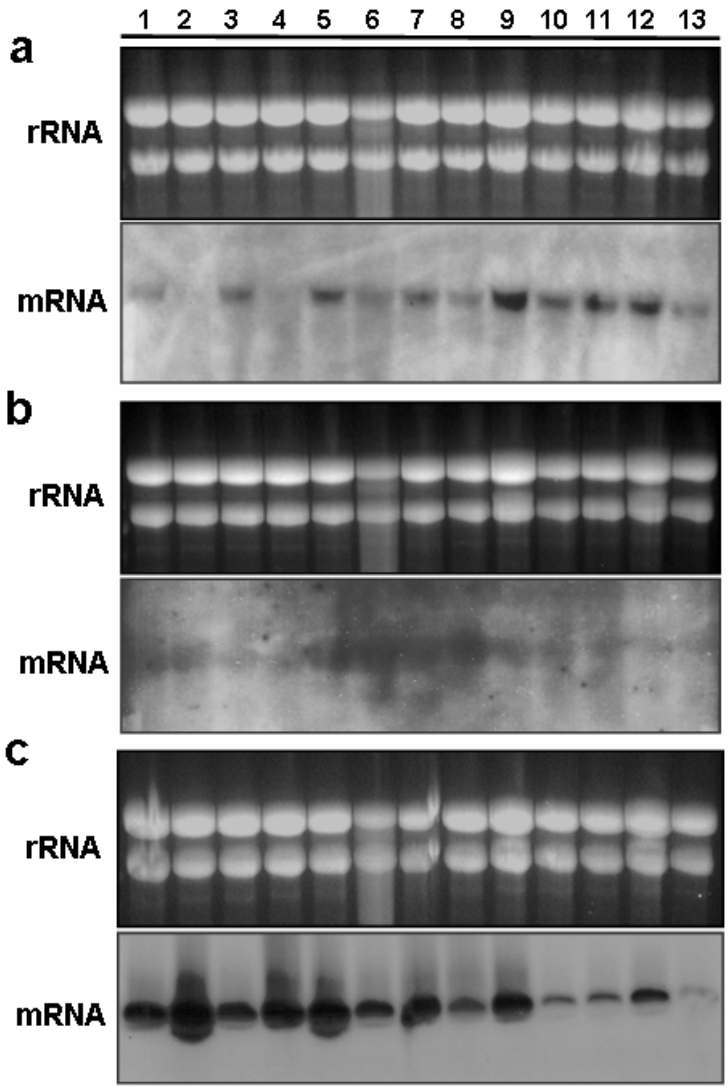


Figura 5.7 – Análise de *Northern blot* mostrando o efeito da inserção dos vetores de silenciamento (pSilent1-endochi e pSilent1-ToxA) na expressão dos três genes de endoquitinase (*Tv-ech1*, *Tv-ech2* e *Tv-ech3*) nos mutantes de *T. virens*. (**a**) Detecção dos transcritos de mRNA do gene *Tv-ech1*, (**b**) detecção dos transcritos de mRNA do gene *Tv-ech2*, e (**c**) detecção dos transcritos de mRNA do gene *Tv-ech3*. Em (**a**): linha **1** contém RNA do mutante S.pOf21; linha **2**, S.pOf28; linha **3**, S.pOf36; linha **4**, S.pOf39; linha **5**, S.pOf8; linha **6**, S.pOf15; linha **7**, linhagem selvagem *T.v.***223**; linha **8**, S.pNO8; linha **9**, S.pNO9; linha **10**, S.pNO3; linha **11**, S.pNO5; linha **12**, S.pNO31; linha **13**, S.pNO13. Em (**b**) e (**c**): linha **1** contém RNA da linhagem selvagem *T.v.***223**; linha **2**, S.pOf28; linha **3**, S.pOf36; linha **4**, S.pOf39; linha **5**, S.pOf8; linha **6**, S.pOf15; linha **7**, S.pOf21; linha **8**, S.pNO8; linha **9**, S.pNO9; linha **10**, S.pNO3; linha **11**, S.pNO5; linha **12**, S.pNO31 e linha **13**, S.pNO13. Os mutantes que carregam o vetor de silenciamento pSilent1-endochi estão indicados pelo prefixo S.pNO, e os mutantes que carregam o vetor pSilent1-ToxA estão indicados pelo prefixo S.pOf. Nessa análise, 20 µg do RNA total dos fungos foi separado em gel de agarose com formaldeído, transferido para membrana de náilon e hibridizado com sonda de 1 kb marcada radioativamente. A fotodocumentação da corrida do gel de agarose permitiu avaliar a intensidade da banda dos rRNAs e com isso assegurar que as diferentes amostras tinham quantidades similares de RNA

substituição do promotor *trpC* (do vetor pSilent-1) pelo promotor bacteriano ToxA no vetor pSilent1-ToxA não deu origem a melhores eficiências de silenciamento (Figura 5.7).

5.2.2.2.1 Atividade quitinolítica dos mutantes de *T. virens*

A atividade quitinolítica de sete mutantes (ΔHex10, ΔChi2.53, ΔHex.ΔChi2.1, S.pNO8, S.pNO13, S.pOf28 e S.pOf36) e da linhagem selvagem *T.v.***223** foi examinada com o uso de substratos fluorescentes específicos. A atividade de *β-N-acetilhexosaminidases*, quitobiosidases e endoquitinases foi determinada a partir da quebra dos substratos MU, MU2 e MU3, respectivamente. A atividade detectada no gel contendo o substrato MU mostrou, claramente, a presença de uma banda de aproximadamente 120 kDa para a linhagem selvagem *T.v.***223**, e a ausência dessa banda nos mutantes ΔHex10 (mutante simples para *Tv-nag2*) e ΔHex.ΔChi2.1 (mutante duplo para *Tv-nag1* e *Tv-nag2*) (Figura 5.8). Todos os outros mutantes, inclusive ΔChi2.53 (mutante simples para *Tv-nag1*), apresentaram a banda de 120 kDa (Figura 5.8). Considerando que apenas as *β-N-acetilhexosaminidases* são capazes de quebrar o substrato MU (LORITO, 1998a), os resultados obtidos indicam que o gene *Tv-nag2* sozinho é responsável pela atividade de *β-N-acetilhexosaminidase* em *T. virens*. A atividade detectada no gel contendo o substrato MU2 mostrou a presença de uma banda de cerca de 56 kDa para a linhagem selvagem *T.v.***223** e para o mutante simples ΔHex10, enquanto que os mutante simples ΔChi2.53 e duplo ΔHex.ΔChi2.1 apresentaram essa banda em intensidade bastante fraca (Figura 5.8). Os mutantes para silenciamento gênico (S.pNO8, S.pNO13, S.pOf28 e S.pOf36) também apresentaram essa banda em intensidade fraquíssima, o que pode ser explicado pelo fato de que, embora o substrato MU2 seja indicado para detectar a atividade de quitobiosidades, pois essas enzimas só são capazes de quebrar esse tipo de substrato (LORITO, 1998a), as endoquitinases também podem quebrar MU2, e em *T. virens* elas possuem tamanhos próximos a 56 kDa. A atividade detectada no gel contendo o substrato MU3 mostrou que, curiosamente, apenas dois dos mutantes para silenciamento avaliados (S.pNO8 e S.pOf28) apresentaram redução na atividade por endoquitinases (Figura 5.8). Já os mutantes para exoquitinases (ΔHex10, ΔChi2.53 e ΔHex.ΔChi2.1) não apresentaram alteração na atividade detectada com o substrato MU3 (Figura 5.8). De maneira geral, esses resultados de atividade enzimática mostraram que as estratégias de mutagênese sítio-específica por deleção gênica e de silenciamento gênico via RNAi foram

realizadas com sucesso e permitiram a geração de mutantes deficientes para produção de quitinases.

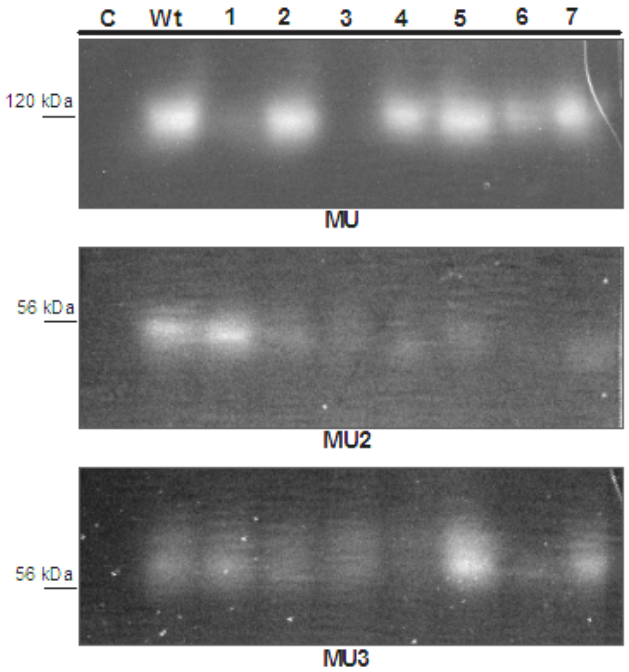


Figura 5.8 – Detecção da atividade quitinolítica de *T. virens* linhagem selvagem *T.v.***223** e de sete mutantes. A atividade quitinolítica foi detectada após a separação de proteínas extracelulares por SDS-PAGE, renaturação e incubação com uma réplica gel contendo substrato fluorescente específico. A atividade de *β-N-acetilhexosaminidases*, quitobiosidases e endoquitinases foi detectada pela quebra dos substratos 4-methylumbelliferyl-*N*-acetyl-*β*-D-glucosaminide (MU), 4-methylumbelliferyl-*β*-D-*N,N'*-diacetylchitobiose (MU2) e 4-methylumbelliferyl-*β*-D-*N,N',N''*triacetylchitotriose (MU3), respectivamente. As atividades foram visualizadas no gel por sinais fluorescentes sob luz ultravioleta. **C** – amostra controle (sem fungo); **Wt** – *T. virens* linhagem selvagem *T.v.***223**; linha **1 -** ΔHex10; linha **2** - ΔChi2.53; linha **3** - ΔHex.ΔChi2.1; linha **4** - S.pNO8; linha **5** - S.pNO13; linha **6** - S.pOf28 e linha **7** - S.pOf36. Um marcador molecular comercial (*prestained SDS-PAGE standards, broad range*, Biorad) foi utilizado nas corridas para estimar tamanhos moleculares das proteínas

5.2.2.2.2 Características fenotípicas dos mutantes de *T. virens*

A partir dos resultados de *Southern blot*, *Northern blot* e dos ensaios bioquímicos para avaliar a atividade quitinolítica, cinco mutantes deficientes para produção de quitinase (ΔHex.10, ΔChi2.53, ΔHex.ΔChi2.1, S.pNO.8, S.pOf.28) foram selecionados para realizar os testes de controle biológico *in vivo*. Entretanto, antes de realizar esses testes, os mutantes tiveram suas características fenotípicas comparadas com as da linhagem selvagem *T.v.***223**, com o intuito de assegurar que os resultados dos testes de biocontrole não seriam influenciados por efeitos

Tabela 5.2 – Taxa de crescimento e de esporulação de *T. virens* linhagem selvagem *T.v.***223** e mutantes deficientes para produção de quitinases

Linhagem	**Diâmetro (cm)** [1]				**Taxa de esporulação (conídios/cm^2)** [2]
	12 h	**24 h**	**36 h**	**48 h**	
*T.v.***223**	1,87	4,03	5,52	6,57	8,29 x 10^7
ΔHex10	1,82	4,03	5,53	6,67	6,73 x 10^7
ΔChi2.53	1,82	4,03	5,50	6,60	8,65 x 10^7
ΔHex.ΔChi2.1	2,03	4,13	5,58	6,63	7,39 x 10^7
S.pNO8	1,75	4,00	5,53	6,73	8,64 x 10^7
S.pOf28	1,85	4,03	5,50	6,60	6,52 x 10^7

[1] Taxa de crescimento é dada pela média do diâmetro (cm) das colônias determinadas em eixos perpendiculares; Cada coluna apresenta valores médios obtidos a partir de três repetições em dois experimentos independentes.
[2] A ANOVA ($P < 0,05$) realizada para esses dados mostrou que nem as taxas de crescimento nem as taxas de esporulação tiveram valores significativamente diferentes entre as diferentes linhagens de *T. virens.*

pleiotrópicos da modificação genética. Os resultados obtidos mostraram que nenhum dos mutantes avaliados apresentou alterações significativas em características fenotípicas quando comparados com a linhagem selvagem. Isto é, todos os mutantes apresentaram morfologia de colônia, taxa de crescimento, coloração do micélio e conídios e taxa de esporulação similares às da linhagem selvagem (Tabela 5.2).

5.2.2.3 Avaliação da capacidade de *T. virens* linhagem selvagem e mutantes quitinolíticos em realizar controle biológico de fitopatógenos *in vivo*

T. virens linhagem selvagem *T.v.***223** e cinco mutantes deficientes para produção de quitinases (ΔHex.10, ΔChi2.53, ΔHex.ΔChi2.1, S.pNO.8, S.pOf.28) foram testados contra diferentes patógenos em ensaios de casa de vegetação para avaliar se a deficiência que os mutantes carregam promove alguma alteração na capacidade de efetuar controle biológico contra patógenos fúngicos. Quatro patógenos foram utilizados: *C. paradoxa*, em cana-de-açúcar; *Sclerotinia* spp., em alface; *R. solani* em feijão e *M. oryzae* em arroz. Em cana-de-açúcar, os ensaios de controle biológico mostraram que o plantio de toletes em solo infestado pelo patógeno *C. paradoxa* levou à redução e ao atraso na germinação das gemas. O acompanhamento semanal das taxas de germinação dos diferentes tratamentos permitiu avaliar os efeitos da deficiência na produção de quitinases dos mutantes de *T. virens.* Na segunda semana após o plantio dos toletes, quando as gemas iniciaram o processo de germinação, foi possível observar uma redução significativa na taxa de germinação de toletes dos tratamentos onde o patógeno foi desafiado pelos mutantes ΔHex.ΔChi2.1, S.pNO.8 e S.pOf.28, sugerindo uma redução na capacidade dessas

linhagens em proteger a planta da infecção pelo patógeno (Figura 5.9). Entretanto, esse efeito só persistiu ao longo das semanas nos tratamentos com os mutantes para endoquitinases (S.pNO.8 e S.pOf.28), onde até mesmo na sexta semana as taxas de germinação foram significativamente inferiores às taxas do tratamento com a linhagem selvagem (Figura 5.9). No ensaio de biocontrole com o patógeno *Sclerotinia* spp. em alface, os tratamentos inoculados com o patógeno e sem *T. virens* tiveram total inibição da germinação de sementes, e os tratamentos inoculados com ambos, patógeno e agente de controle biológico, apresentaram níveis variados de taxa de germinação (Tabela 5.3). Curiosamente, diferente do que foi observado no ensaio com cana-de- açúcar, nesse caso os mutantes para endoquitinases tiveram performances semelhantes à linhagem selvagem, entretanto, os mutantes deficientes para exoquitinases (ΔHex.10, ΔChi2.53 e ΔHex.ΔChi2.1) apresentaram capacidades significativamente inferiores de controlar o patógeno (Tabela 5.3). Inesperadamente, os resultados do ensaio de controle biológico em plantas de feijão infectadas pelo patógeno *R. solani* mostraram que nenhum dos mutantes teve sua capacidade de proteger a planta contra o patógeno reduzida, ou seja, todas as linhagens de *T. virens*, incluindo a selvagem *T.v.***223** e os cinco mutantes quitinolíticos (ΔHex.10, ΔChi2.53, ΔHex.ΔChi2.1, S.pNO.8, S.pOf.28), foram capazes de proteger as sementes de feijão do ataque por *R. solani* em níveis semelhantes (Figura 5.10). O último teste realizado teve como objetivo avaliar se *T. virens* inoculado no solo é capaz de induzir algum tipo de resposta de defesa em plantas de arroz, pelo uso do patógeno foliar *M. oryzae*. Os resultados obtidos mostraram que plântulas de arroz cultivadas em solo não inoculado com *T. virens* apresentavam maior número de lesões foliares (sintomas de brusone) de todos os tipos (de acordo com a escala descrita na Figura 5.3) e, também, os maiores índices de severidade (Tabela 5.4). Todas as linhagens de *T. virens* testadas (selvagem e mutantes) foram capazes de induzir certos níveis de respostas de defesa nas plântulas de arroz, promovendo a redução do número de lesões do tipo L1 e L2 e praticamente eliminando as lesões mais severas, tipo L3 e L4 (Tabela 5.4). Os tratamentos inoculados com a linhagem selvagem *T.v.***223** e com os mutantes tiveram índices de severidade muito semelhantes, exceto o mutante para endoquitinase S.pNO.8, o qual foi capaz de reduzir a severidade da doença em níveis significativamente superiores à linhagem selvagem (Tabela 5.4). Não se sabe a origem desse efeito, porém podemos especular que seja resultado de efeito pleiotrópico da inserção aleatória do vetor de silenciamento no genoma do mutante.

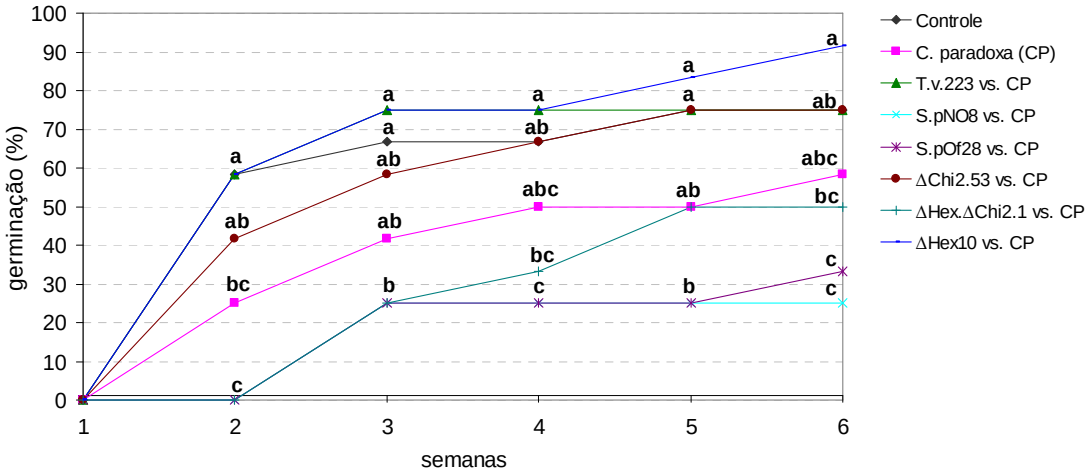


Figura 5.9 – Porcentagem de germinação observada nos diferentes tratamentos do ensaio de controle biológico em cana-de-açúcar. *T. virens* linhagem selvagem *T.v.***223** e cinco mutantes deficientes para produção de quitinases foram inoculados no solo infestado pelo patógeno *C. paradoxa*, e a porcentagem de germinação dos toletes foi avaliada semanalmente, até completar a sexta semana. Controle – toletes de cana-de-açúcar plantados em solo não inoculado com qualquer fungo; CP – toletes de cana-de-açúcar plantados em solo infestado pelo patógeno *C. paradoxa*. Os outros tratamentos consistem do plantio de toletes de cana-de-açúcar em solo inoculado com o patógeno *C. paradoxa* e uma linhagem de *T. virens*. As letras indicadas sobre os pontos representam o resultado do teste t para comparação entre as médias das porcentagens de germinação. Pontos da mesma semana indicados por mesma letra(s) não são estatisticamente diferentes a 95% de significância

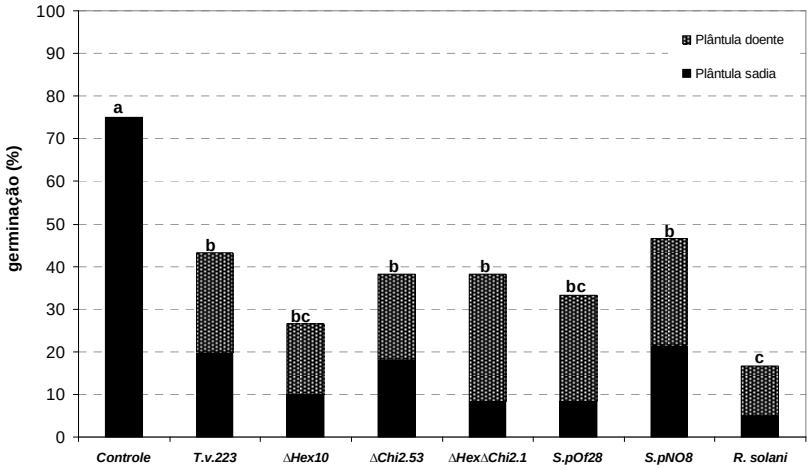


Figura 5.10 - Porcentagem de germinação e estado das plântulas de feijão, observados nos diferentes tratamentos do ensaio de controle biológico. Sementes de feijão foram plantadas em solo infestado pelo patógeno *R. solani* e inoculado com alguma linhagem de *T. virens* (linhagem selvagem *T.v.***223** ou mutantes deficientes para produção de quitinases). A porcentagem de germinação das sementes e o estado das plântulas (sadias ou doentes) foram avaliados 20 dias após o plantio. Controle – sementes de feijão plantadas em solo não inoculado com qualquer fungo; *R. solani* – sementes de feijão plantadas em solo inoculado com *R. solani*. Os outros tratamentos consistem do plantio de sementes de feijão em solo inoculado com *R. solani* e alguma linhagem de *T. virens*, simultaneamente. Os valores de porcentagem de germinação e do estado das plântulas são a média de seis repetições e dois experimentos independentes. Letras indicadas sobre as barras indicam o resultado do teste estatístico de comparação de médias, teste t. Barras indicadas por mesma letra(s) não diferem estatisticamente a 95% de significância

Tabela 5.3 – Porcentagem de germinação de sementes de alface e análise estatística dos dados obtidos no ensaio de controle biológico onde *T. virens* linhagem selvagem *T.v.***223** e mutantes quitinolíticos foram testados contra o patógeno *Sclerotinia* spp.

Tratamento	**Porcentagem de germinação [1] (%)**	**Comparação contra *T.v.*223 [2]**		
		Diferença entre médias	**Limite de confidência simultâneo 95%**	
Controle (não inoculado com fungo)	73,3	-0,17183	-0,36648	0,02281
*T.v.***223** *vs. Slerotinia* spp.	86,7	-	-	-
S.pNO8 *vs. Slerotinia* spp.	78,7	-0,10857	-0,30321	0,08608
S.pOf28 *vs. Slerotinia* spp.	73,3	-0,16760	-0,36225	0,02705
ΔHex10 *vs. Slerotinia* spp.	68,0	-0,22973	-0,42438	-0,03509 *
ΔHex.ΔChi2.1 *vs. Slerotinia* spp.	66,7	-0,24293	-0,43758	-0,04829 *
ΔChi2.53 *vs. Slerotinia* spp.	61,3	-0,29930	-0,49395	-0,10465 *
Sclerotinia spp.	0,0	-1,20087	-1,39551	-1,00622 *

[1] As porcentagens de germinação são os valores médios de três repetições;
[2] Comparações significativas em nível de 5% de probabilidade estão indicadas com *, de acordo com teste de comparação de médias de Dunnett.

Tabela 5.4 – Quantidade de lesões, classificadas por tipos, e índice de severidade para plantas de arroz inoculadas com *T. virens* linhagem selvagem ou mutantes, 5 dias após a infecção por esporos do patógeno *M. oryzae*

Tratamento	**L1**	**L2**	**L3**	**L4**	**Índice de severidade [1]**
M. grisea (controle)	146^{a}	155^{a}	94^{a}	24^{a}	$83{,}0^{a}$
*T.v.***223** *vs. M. grisea*	93^{b}	108^{b}	23^{b}	2^{b}	$38{,}4^{b}$
ΔChi2.53 *vs. M. grisea*	85^{b}	99^{bc}	18^{bc}	2^{b}	$34{,}7^{bc}$
ΔHex.ΔChi2.1 *vs. M. grisea*	108^{ab}	73^{bc}	10^{bc}	1^{b}	$28{,}7^{bc}$
S.pOf28 *vs. M. grisea*	114^{ab}	75^{bc}	6^{bc}	0^{b}	$28{,}3^{bc}$
ΔHex10 *vs. M. grisea*	89^{b}	81^{bc}	7^{bc}	0^{b}	$27{,}3^{bc}$
S.pNO8 *vs. M. grisea*	107^{ab}	61^{c}	3^{c}	0^{b}	$23{,}8^{c}$

L1, L2, L3 e L4 referem-se aos tipos de lesão definidas na escala apresentada na Figura 5.3. Os valores relatados são a média de seis repetições, para cada tipo de lesão;
[1] O *índice de severidade* foi calculado com o uso da fórmula: $[(L1x1)+(L2x2)+(L3x3)+(L4x4)]/10$, onde L1, L2, L3 e L4 são os valores médios encontrados para cada tipo de lesão em cada tratamento;
Os valores apresentados em cada coluna seguidos de mesma letra sobrescrita não diferem estatisticamente de acordo com o teste de comparação de médias de Tukey (P<0,05).

5.2.3 Discussão

Os fungos do gênero *Trichoderma* frequentemente são encontrados como habitantes cosmopolitas de solo, mas eles também têm sido observados estabelecendo relações mutualísticas com plantas (HARMAN et al., 2004a). A linhagem de *T. virens T.v.***223**, utilizada no presente estudo, foi isolada como endófito de raiz de plantas de cana-de-açúcar (Capítulo 2) e a interação com esse hospedeiro foi avaliada via microscopia, inoculação e reisolamento (Capítulo 4). No presente Capítulo, o primeiro passo foi verificar se essa linhagem *T.v.***223** é capaz de colonizar outros hospedeiros como endófito. Resultados de reisolamento e imunolocalização mostraram

que, de fato, essa linhagem de *T. virens* é capaz de colonizar endofiticamente tanto seu hospedeiro original, a cana-de-açúcar, como outros hospedeiros (arroz, alface e feijão), embora em frequência e localização variadas. De maneira geral, essa linhagem foi observada predominantemente colonizando tecidos radiculares, e parece persistir nesse órgão por pelo menos 60 dias. A colonização preferencial de raízes é esperada, pois comportamento semelhante tem sido relatado para outras espécies de *Trichoderma* (HARMAN et al., 2004b; LO et al., 1998). O comportamento endofítico de *Trichoderma* é considerado uma grande vantagem, pois linhagens desse tipo geralmente são capazes de prover benefícios às plantas por períodos bastante extensos. Entretanto, o potencial da aplicação de linhagens endofíticas de *Trichoderma* em sistemas de controle biológico tem sido vislumbrado apenas recentemente (EVANS; HOLMES; THOMAS, 2003).

A habilidade de fungos do gênero *Trichoderma* em atuar como agentes de controle biológico contra uma ampla variedade de fungos fitopatogênicos atacando diferentes hospedeiros já é conhecida há bastante tempo (HARMAN et al., 2004a), entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos nessa atividade e a importância da atividade quitinolítica ainda não são bem compreendidos. O sistema quitinolítico da espécie *T. harzianum* é o mais estudado e mais conhecido, embora alguns genes do sistema quitinolítico de *T. virens* tenham sido descritos recentemente (KIM et al., 2002) e um gene de endoquitinase (*cht42=Tv-ech1*) tenha sido estudado (BAEK; HOWELL; KENERLEY, 1999; DI PIETRO et al., 1993). A liberação recente do genoma de *T. virens* linhagem Gv29-8 na internet (http://www.jgi.doe.gov) abriu a possibilidade da realização de uma série de estudos de identificação da função gênica, a partir da obtenção de mutantes. O papel de alguns genes de endoquitinases (*ech42* e *chit 33*) e de uma N-acetilglicosaminidase (*nag1*) no micoparasitimo exercido por *Trichoderma* spp. já foi investigado anteriormente (BAEK; HOWELL; KENERLEY, 1999; BRUNNER et al., 2003; CARSOLIO et al., 1999; CORTES et al., 1998; DE LAS MERCEDES et al., 2001; DE MARCO; VALADARES-INGLIS; FELIX, 2004; WOO et al., 1999), entretanto, alguns desses estudos possuem resultados contraditórios. O presente trabalho investigou o papel de diferentes endo- e exoquitinases na atividade de controle biológico do fungo *T. virens*, a partir da geração de mutantes deficientes para produção de quitinases e avaliação de suas capacidades como agentes de controle biológico. O emprego de duas estratégias, mutagênese sítio-específica por deleção gênica e silenciamento gênico por RNAi, permitiu a geração de mutantes simples e duplo para os

genes exoquitinase *Tv-nag1* e *Tv-nag2*, e a geração e mutantes silenciados para três genes de endoquitinase (*Tv-ech1, Tv-ech2* e *Tv-ech3*), respectivamente. A modificação genética nos mutantes foi confirmada por *Southern blot*. Para avaliar a eficiência do silenciamento gênico, doze mutantes transformados com os vetores de silenciamento tiveram o nível de seus transcritos de mRNA dos três genes de endoquitinase determinados por *Northern blot*, e os resultados mostraram uma variação no nível de silenciamento desses genes nos diferentes mutantes, variando de total eliminação da expressão até a inexistência de qualquer alteração na expressão gênica. Esse tipo de comportamento é esperado em mutantes silenciados por RNAi, e tem sido relatado com frequência em trabalhos que utilizam essa técnica (NAKAYASHIKI et al., 2005; NGUYEN et al., 2008). O silenciamento simultâneo dos três genes de endoquitinase foi observado em 17% dos mutantes avaliados, enquanto que a maioria deles (50%) apresentou silenciamento em apenas dois dos genes. A ocorrência de silenciamento simultâneo já foi descrita anteriormente (LIU et al., 2002; MOUYNA et al., 2004; NGUYEN et al., 2008) e parece estar relacionada, até certo ponto, com o nível de similaridade entre as sequências dos outros genes e do gene-alvo. Independentemente das limitações envolvidas, a técnica de silenciamento gênico mediada por RNA tem grande potencial como ferramenta em estudos de função de múltiplos genes.

O uso de substratos específicos de quitina tem sido relatado na literatura como uma boa ferramenta para detectar atividade quitinolítica de proteínas extracelulares (CHERNIN et al., 1998; DENG et al., 2007; HARAN et al., 1995). Neste estudo, a linhagem selvagem *T.v.***223** e sete mutantes foram analisados para atividade quitinolítica a partir da utilização de substratos fluorescentes (MU, MU2 ou MU3) em ensaios de atividade em gel. Os resultados permitiram estimar o tamanho das proteínas envolvidas na atividade quitinolítica e confirmaram a perda de algum tipo de atividade nos mutantes, como consequência da modificação genética. Cinco mutantes (ΔHex.10, ΔChi2.53, ΔHex.ΔChi2.1, S.pNO.8 e S.pOf.28), apresentando redução significativa ou total eliminação de alguma atividade quitinolítica, tiveram suas características fenotípicas comparadas com as da linhagem selvagem *T.v.***223**. Os resultados demonstraram que as modificações genéticas carregadas pelos mutantes não promoveram alterações significativas nas características fenotípicas, o que é importante, pois exclui a influência desses fatores no desempenho dessas linhagens durante os testes de controle biológico. Esses mutantes foram então utilizados nos ensaios de controle biológico *in vivo*, onde eles foram testados contra diferentes

fungos fitopatogênicos atacando diferentes hospedeiros. Os resultados obtidos nesses experimentos foram bem particulares, pois mostraram que as enzimas quitinolíticas podem ser essenciais à atividade de controle biológico efetuada por *T. virens,* mas que a importância e a participação dessas enzimas no processo dependem do tipo de planta e de patógeno envolvidos na interação, já que mais de um mecanismo deve contribuir para o biocontrole por *T. virens.* Isto é, em plantas de cana-de-açúcar infectadas pelo patógeno *C. paradoxa* os mutantes deficientes para atividade de endoquitinases apresentaram capacidade reduzida em controlar o patógeno, por outro lado, em plantas de alface infectadas pelo patógeno *Sclerotinia* spp. os mutantes deficientes para produção de exoquitinases foram menos eficientes no controle da doença. Além disso, em plantas de feijão infectadas pelo patógeno *R. solani* nenhum dos mutantes exibiu qualquer alteração na performance de biocontrole do patógeno. Diferentes eficiências de controle biológico por *Trichoderma* têm sido relatadas quando se tratam de hospedeiros e/ou patógenos distintos. Por exemplo, um mutante de *T. harzianum* P1 carregando disrupção do gene *ech42* apresentou a mesma eficiência de biocontrole contra o patógeno *Pythium ultimum,* menor eficiência contra *B. cinerea* e melhor desempenho contra *R. solani,* em plantas de feijão (WOO et al., 1999), porém, em outro estudo, nenhuma alteração na eficiência de controle biológico foi observada quando uma linhagem de *T. harzianum* carregando disrupção do gene *ech42* foi testada contra os patógenos *R. solani* e *S. rolfsii* infectando plantas de algodão (CARSOLIO et al., 1999). A contradição nesses resultados envolvendo a importância do gene de endoquitinase *ech42* (*cht42=Tv-ech1*) deve estar relacionada com o fato de que diferentes interações foram consideradas nas comparações. Outro exemplo da influência dos organismos envolvidos na interação pode ser observado no estudo de Mukherjee et al. (2004), onde mutantes nulos para a subunidade alfa da proteína G (TgaA) apresentaram capacidade reduzida de controlar o patógeno *S. rolfsii*, mas mantiveram a mesma eficiência que a linhagem selvagem quando foram testados contra *R. solani*. Esses dados sugerem que o resultado das interações *Trichoderma*-patógeno-planta seja fortemente condicionado pelos organismos envolvidos na relação e pelas condições ambientais adotadas nos experimentos. Além disso, é pertinente lembrar que quitinases podem interagir de forma sinergística com outras enzimas e outros compostos não enzimáticos (BOLAR et al., 2001; HARMAN, 2006; LORITO, 1998a), dificultando ainda mais a identificação de seus papéis.

Considerando os novos conceitos que julgam a indução de resistência da planta como um mecanismo importante empregado por *Trichoderma* para proteger plantas do ataque de patógenos (HARMAN et al., 2004a), o presente trabalho também avaliou se *T. virens* linhagem *T.v.***223** seria capaz de induzir respostas de defesa na planta que levasse ao desenvolvimento de algum tipo de resistência ao ataque por patógenos. A partir da inoculação de *T.v.***223** no solo e infecção da parte aérea de plântulas de arroz com o patógeno *M. oryzae*, foi possível observar que *T. virens*, mesmo espacialmente distante do local de infecção pelo patógeno, foi capaz de reduzir o desenvolvimento da doença nas plantas, indicando que esse fungo foi capaz de desencadear respostas de defesa na planta que aumentaram a resistência das mesmas ao patógeno. Resultados parecidos já foram relatados anteriormente em pepino, onde *T. asperellum* colonizando raízes foi capaz de proteger as folhas da planta contra o ataque do patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (*Psl*) (YEDIDIA et al., 2003). O fato de que *T. virens* *T.v.***223** foi capaz de proteger plantas de arroz contra um patógeno foliar sustenta a idéia de que a produção de quitinases não seja o único mecanismo empregado por esse fungo durante a atividade de controle biológico, mas sim, que pelo menos em alguns casos, também a indução da resistência das plantas. Inclusive, diversos trabalhos têm descrito a produção de compostos químicos bioativos por *T. virens*, envolvidos nas respostas de resistência sistêmica ou localizada nas plantas (DJONOVIC et al., 2006; DJONOVIC et al., 2007; HANSON; HOWELL, 2004; VITERBO et al., 2007). Além disso, uma vez que fragmentos de quitina já foram descritos como potentes elicitores de uma variedade de respostas de defesa de plantas (BARBER; BERTRAM; RIDE, 1989; KAKU et al., 1997; KUCHITSU et al., 1995; ROBY; GADELLE; TOPPAN, 1987; TAKAI et al., 2001), o presente estudo também avaliou a capacidade dos mutantes deficientes para produção de quitinases em proteger plantas de arroz contra o patógeno *M. oryzae*, com o intuito de determinar se algum dos genes de quitinase estudados tinham alguma relação com a promoção de respostas de defesa na planta. Os resultados obtidos mostraram que nenhum dos mutantes apresentou redução na capacidade de proteger a planta, sugerindo que, pelo menos em plantas de arroz infectadas por *M. oryzae*, nenhum desses genes de quitinase *Tv-nag1*, *Tv-nag2*, *Tv-ech1*, *Tv-ech2* e *Tv-ech3* estão envolvidos na ativação de respostas de defesa da planta. Curiosamente, em alguns casos a indução de respostas de defesa tem sido descrita como mecanismo principal de biocontrole por *Trichoderma*, ao invés dos mecanismos clássicos de micoparasitismo e antibiose (HANSON; HOWELL, 2004; YEDIDIA et al., 2003). Inclusive, semelhante com o que foi

observado neste estudo para plantas de feijão infectadas com o patógeno *R. solani*, na interação algodão-*T. virens*, uma das mais bem estudadas, a ação de quitinases e a antibiose não são consideradas essenciais na atividade de controle biológico por *T. virens* (HOWELL, 2006). Recentemente, vários trabalhos têm buscado compreender os mecanismos moleculares e identificar elicitores envolvidos na resistência induzida por *Trichoderma* (DJONOVIC et al., 2006; DJONOVIC et al., 2007; RUOCCO et al., 2007; SHORESH et al., 2006; SHORESH; YEDIDIA; CHET, 2005; VITERBO et al., 2005; YEDIDIA et al., 2003). Por exemplo, no controle biológico de doenças de plântulas de algodão por *T. virens*, os mecanismos identificados até o momento incluem a indução de produção de fitoalexinas pela planta, a metabolização de elicitores da germinação do patógeno e a indução da expressão de genes de defesa (DJONOVIC et al., 2006; HOWELL, 2002; HOWELL et al., 2000).

No presente trabalho, a avaliação da capacidade de uma linhagem endofítica de *T. virens* e de seus mutantes deficientes para produção de quitinases em efetuar o controle biológico de diferentes patógenos permitiu verificar que as enzimas quitinolíticas podem ter papel fundamental na atividade de biocontrole dessa espécie, porém, a relevância da ação dessas enzimas depende dos organismos envolvidos na interação, já que outros mecanismos, como a indução de respostas de defesa, também podem contribuir com a atividade de controle biológico desse fungo. Ou seja, é bem provável que *T. virens* linhagem *T.v.***223** empregue diferentes mecanismos de controle biológico dependendo do patógeno fúngico e/ou da espécie vegetal envolvidos na interação, sendo que, quando esses mecanismos incluem a ação de enzimas quitinolíticas, cada enzima pode ter pesos diferentes no processo. Dessa forma, pode ser sugerido que o processo de controle biológico efetuado por *T. virens* seja coordenado por uma interação tripla, que envolve o agente de biocontrole, o patógeno fúngico e a planta hospedeira. Este é o primeiro trabalho com a espécie *T. virens* que relata um estudo mais amplo sobre o papel das enzimas quitinolíticas na atividade de controle biológico, abrindo novas perspectivas sobre os mecanismos empregados por essa espécie durante o processo de controle biológico de patógenos. Além disso, esse trabalho também demonstrou o potencial de utilização do vetor de silenciamento pSilent-1 em *T. virens*, o que constitui uma ferramenta alternativa para estudar função gênica nessa espécie.

Referências

AHMED, A. S.; SÁNCHEZ, C. P.; CANDELA, M. E. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 106, p. 817-824, 2000.

BAEK, J.-M.; HOWELL, C. R.; KENERLEY, C. M. The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**, Berlin, v. 35, p. 41-50, 1999.

BAEK, J. M.; KENERLEY, C. M. The *arg2* gene of *Trichoderma virens*: cloning and development of a homologous transformation system. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 23, p. 34-44, 1998.

BARBER, M. S.; BERTRAM, R. E.; RIDE, J. P. Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 34, p. 3-12, 1989.

BOLAR, J. P.; NORELLI, J. L.; HARMAN, G. E.; BROWN, S. K.; ALDWINCKLE, H. S. Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. **Transgenic Research**, Amsterdam, v. 10, p. 533-543, 2001.

BOLAR, J. P.; NORELLI, J. L.; WONG, K. W.; HAYES, C. K.; HARMAN, G. E.; ALDWINCKLE, H. S. Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. **Phytopathology**, Lancaster, v. 90, p. 72-77, 2000.

BRUNNER, K.; PETERBAUER, C. K.; MACH, R. L.; LORITO, M.; ZEILINGER, S.; KUBICEK, C. P. The *Nag1* N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. **Current Genetics**, Berlin, v. 43, p. 289-295, 2003.

CARLSON, J.; MESSING, J. Efficiency in cloning and sequencing using the single-stranded bacteriophage M13. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 1, p. 253-264, 1984.

CARON, J. **Isolement et caractérisation de divers isolats de *Trichoderma* comme agent de lutte biologique contre la moisissure grise (*Botrytis cinerea)* dans la production de la fraise**. 1993. 121p. Dissertação de Mestrado – Université Laval, Québec. 1993.

CARSOLIO, C.; BENHAMOU, N.; HARAN, S.; CORTES, C.; GUTIERREZ, A.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, *ech42*, in mycoparasitism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 929-935, 1999.

CARSOLIO, C.; GUTIÉRREZ, A.; JIMÉNEZ, B.; VAN MONTAGU, M.; HERRERA-ESTRELLA, A. Characterization of *ech-42*, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, p. 10903-10907, 1994.

CATLETT, N. L.; LEE, B.; YODER, O. C.; TURGEON, B. G. Split-marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. **Fungal Genetics Newsletter**, Kansas, v. 50, p. 9-11, 2003.

CHERNIN, L. S.; WINSON, M. K.; THOMPSON, J. M.; HARAN, S.; BYCROFT, B. W.; CHET, I.; WILLIAMS, P.; STEWART, G. S. A. B. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 180, p. 4435-4441, 1998.

CORTES, C.; GUTIERREZ, A.; OLMEDO, V.; INBAR, J.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by a diffusible factor. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v. 260, p. 218-225, 1998.

DE LA CRUZ, J.; HIDALGO-GALLEGO, A.; LORA, J. M.; BENITEZ, T.; PINTOR-TORO, J. A.; LLOBELL, A. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 206, p. 859-867, 1992.

DE LAS MERCEDES, D. M.; LIMON, M. C.; MEJIAS, R.; MACH, R. L.; BENITEZ, T.; PINTOR-TORO, J. A.; KUBICEK, C. P. Regulation of chitinase 33 (*chit33*) gene expression in *Trichoderma harzianum*. **Current Genetics**, Berlin, v. 38, p. 335-342, 2001.

DE MARCO, J. L.; VALADARES-INGLIS, M.; FELIX, C. Purification and characterization of an N-acetylglucosaminidase produced by a *Trichoderma harzianum* strain which controls *Crinipellis perniciosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, p. 70-75, 2004.

DE MEYER, G.; BIGIRIMANA, J.; ELAD, Y.; HÖFTE, M. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, p. 279-286, 1998.

DENG, S.; LORITO, M.; PENTTILÄ, M.; HARMAN, G. E. Overexpression of an endochitinase gene (*ThEn-42*) in *Trichoderma atroviride* for increased production of antifungal enzymes and enhanced antagonist action against pathogenic fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 142, p. 81-94, 2007.

DI PIETRO, A.; LORITO, M.; HAYES, C. K.; BROADWAY, R. M.; HARMAN, G. E. Endochitinase from *Gliocladium virens*: isolation, characterization and synergistic antifungal activity in combination with gliotoxin. **Phytopathology**, Lancaster, v. 83, p. 308-313, 1993.

DJONOVIC, S.; POZO, M. J.; DANGOTT, L. J.; HOWELL, C. R.; KENERLEY, C. M. *Sm1*, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 19, p. 838-853, 2006.

DJONOVIC, S.; VARGAS, W. A.; KOLOMIETS, M. V.; HORNDESKI, M.; WIEST, A.; KENERLEY, C. M. A proteinaceous elicitor *Sm1* from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, p. 875-889, 2007.

DRABORG, H.; KAUPPINEN, S.; DALBØGE, H.; CHRISTGAU, S. Molecular cloning and expression in *S. cerevisiae* of two exochitinases from *Trichoderma harzianum*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, New York v. 36, p. 781–791, 1995.

EL-KATATNY, M. H.; GUDELJ, M.; ROBRA, K. H.; ELNAGHY, M. A.; GÜBITZ, G. M. Characterization of a chitinase and an endo-ß-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, p. 137-143, 2001.

EMANI, C.; GARCIA, J. M.; LOPATA-FINCH, E.; POZO, M. J.; URIBE, P.; KIM, D. J.; SUNILKUMAR, G.; COOK, D. R.; KENERLEY, C. M.; RATHORE, K. S. Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. **Plant Biotechnology Journal**, London, v. 1, p. 321-336, 2003.

EVANS, H. C.; HOLMES, K. A.; THOMAS, S. E. Mycobiota of an indigenous *Theobroma* species (*Sterculiaceae*) in Ecuador: assessing its potential for biological control of cocoa diseases. **Mycological Progress**, Berlin, v. 2, p. 149-160, 2003.

FEINBERG, A. P.; VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 132, p. 6-13, 1983.

GARCÍA, I.; LORA, J. M.; CRUZ, J.; BENÍTEZ, T.; LLOBELL, A.; PINTOR-TORO, J. A. Cloning and characterization of a chitinase (CHIT42) cDNA from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. **Current Genetics**, Berlin, v. 27, p. 83-89, 1994.

HANSON, L. E.; HOWELL, C. R. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 94, p. 171-176, 2004.

HARAN, S.; SCHICKLER, H.; OPPENHEIM, A.; CHET, I. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum* **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, p. 441-446, 1995.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, St Paul, v. 84, p. 377-393, 2000.

HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Lancaster, v. 96, p. 190-194, 2006.

HARMAN, G. E.; HAYES, C. K.; LORITO, M.; BROADWAY, R. M.; DI PIETRO, A.; PETERBAUER, C.; TRONSMO, A. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. **Phytopathology**, Lancaster, v. 83, p. 313-318, 1993.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 43-56, 2004a.

HARMAN, G. E.; PETZOLDT, R.; COMIS, A.; CHEN, J. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, Lacaster, v. 94, p. 147-153, 2004b.

HARMAN, G. E.; SHORESH, M. The mechanisms and applications of opportunistic plant symbionts. In: VURRO, M.; GRESSEL, J. (Ed.). **Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management**. Amsterdam: Springer, 2007. p. 131-153.

HAYES, C. K.; KLEMSDAL, S.; LORITO, M.; DI PIETRO, A.; PETERBAUER, C.; NAKAS, J. P.; TRONSMO, A.; HARMAN, G. E. Isolation and sequence of an endochitinase-encoding gene from a cDNA library of *Trichoderm harzianum*. **Gene**, Amsterdam, v. 138, p. 143-148, 1994.

HOWELL, C. R. Effect of *Gliocladium virens* on *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, and damping-off of cotton seedlings. **Phytopathology**, Lancaster, v. 72, p. 496-498, 1982.

HOWELL, C. R. Relevance of mycoparasitism in the biological control of *Rhizoctonia solani* by *Gliocladium virens*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 77, p. 992-994, 1987.

HOWELL, C. R. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, Lancaster, v. 92, p. 177-180, 2002.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, St Paul, v. 87, p. 4-10, 2003.

HOWELL, C. R. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. **Phytopathology**, Lancaster, v. 96, p. 178-180, 2006.

HOWELL, C. R.; HANSON, L. E.; STIPANOVIC, R. D.; PUCKHABER, L. S.; WHEELER, M. H. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 90, p. 248-252, 2000.

HOWELL, C. R.; PUCKHABER, L. S. A study of the characteristics of "P" and "Q" strains of *Trichoderma virens* to account for differences in biological control efficacy against cotton seedling diseases. **Biological Control**, Orlando, v. 33, p. 217-222, 2005.

KAKU, H.; SHIBUYA, N.; XU, P.; ARYAN, A. P.; FINCHER, G. B. N-acetylchitooligosaccharide elicit expression of a single (1-3)-β-glucanase gene in suspension-cultured cells from barley (*Hordeum vulgare*). **Phisiologia Plantarum**, Kobenhavn, v. 100, p. 111-118, 1997.

KERSHAW, M. J.; TALBOT, N. J. Genome-wide functional analysis reveals that infection-associated fungal autophagy is necessary for rice blast disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 106, p. 15967-15972, 2009.

KIM, D. J.; BAEK, J. M.; URIBE, P.; KENERLEY, C. M.; COOK, D. R. Cloning and characterization of multiple glycosyl hydrolase genes from *Trichoderma virens*. **Current Genetics**, Berlin, v. 40, p. 374-384, 2002.

KOIKE, N.; HYAKUMACHI, M.; KAGEYAMA, K.; TSUYUMU, S.; DOKE, N. Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungi: lignification and superoxide generation. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 523-533, 2001.

KUCHITSU, K.; KOSAKA, H.; SHIGA, T.; SHIBUYA, N. EPR evidence for generation of hydroxyl radical triggered by N-acetylchitooligosaccharide elicitor and a protein phosphatase inhibitor in suspension-cultured rice cells. **Protoplasma**, Leipzig, v. 188, p. 138-142, 1995.

LIMÓN, M. C.; LORA, J. M.; GARCÍA, I.; CRUZ, J.; LLOBELL, A.; BENÍTEZ, T.; PINTOR-TORO, J. A. Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. **Current Genetics**, Berlin, v. 28, p. 478-483, 1995.

LIMÓN, M. C.; PINTOR-TORO, J. A.; BENITEZ, T. Increased antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformants that overexpress a 33-kDa chitinase. **Phytopathology**, Lancaster, v. 89, p. 254-261, 1999.

LIU, H.; COTTRELL, T. R.; PIERINI, L. M.; GOLDMAN, W. E.; DOERING, T. L. RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Genetics**, Bethesda, v. 160, p. 463-470, 2002.

LO, C.-T.; NELSON, E. B.; HAYES, C. K.; HARMAN, G. E. Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. **Phytopathology**, v. 88, p. 129-136, 1998.

LORITO, M. Chitinolytic enzymes ands their genes. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. (Ed.). ***Trichoderma* and *Gliocladium:*** enzymes, biological control and commercial application. London: Taylor and Francis, 1998a. chap. 4, p. 73–99.

LORITO, M.; HAYES, C. K.; DI PIETRO, A.; WOO, S. L.; HARMAN, G. E. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3-β-glucosidase and an N-acetyl-β-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 84, p. 398-405, 1994.

LORITO, M.; WOO, S. L.; FERNANDEZ, I. G.; COLUCCI, G.; HARMAN, G. E.; PINTOR-TORO, J. A.; FILIPPONE, E.; MUCCIFORA, S.; LAWRENCE, C. B.; ZOINA, A.; TUZUN, S.; SCALA, F. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 7860-7865, 1998b.

LU, Z.; TOMBOLINI, R.; WOO, S.; ZEILINGER, S.; LORITO, M.; JANSSON, J. K. *In vivo* study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 3073-3081, 2004.

MOUYNA, I.; HENRY, C.; DOERING, T. L.; LATGE, J. Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, p. 317-324, 2004.

MUKHERJEE, P.; LATHA, J.; HADAR, R.; HORWITZ, B. A. Role of two G-protein alpha subunits, TgaA and TgaB, in the antagonism of plant pathology by *Trichoderma virens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 542-549, 2004.

NAKAYASHIKI, H.; HANADA, S.; QUOC, N. B.; KADOTANI, N.; TOSA, Y.; MAYAMA, S. RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 42, p. 275-283, 2005.

NGUYEN, Q. B.; KADOTANI, N.; KASAHARA, S.; TOSA, Y.; MAYAMA, S.; NAKAYASHIKI, H. Systematic functional analysis of calcium-signalling proteins in the genome of the rice-blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a high-throughput RNA-silencing system. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 68, p. 1348-1365, 2008.

PEBERDY, J. F. Fungal cell walls – a review. In: KUHN, P. J.; TRINCI, A. P. J.; JUNG, M. J.; GOOSEY, M. W. (Ed.). **Biochemistry of cell walls and membranes in fungi**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p. 5-30.

PETERBAUER, C. K.; LORITO, M.; HAYES, C. K.; HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. Molecular cloning and expression of the *nag1* gene (N-acetyl-β-D-glucosaminidase-encoding gene) from *Trichoderma harzianum* P1. **Current Genetics**, Berlin, v. 30, p. 325-331, 1996.

PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; MCDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, New York, v. 5, p. 141–238, 1953.

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

ROBERTS, D. P.; LUMSDEN, R. D. Effect of extracellular metabolites from *Gliocladium virens* on germination of sporangia and mycelial growth of *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 80, p. 461-465, 1990.

ROBY, D.; GADELLE, A.; TOPPAN, A. Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 143, p. 885-892, 1987.

RUOCCO, M.; LANZUISE, S.; WOO, S. L.; LORITO, M. The novel hydrophobin HYTRA1 from *Trichoderma harzianum* T22 plays a role in *Trichoderma*-plant interactions. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, 13, 2007, Sorrento, Italy. **Resumos…** MPMI, 2007. p. 394.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning:** a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. 1659 p.

SCHIRMBÖCK, M.; LORITO, M.; WANG, Y. L.; HAYES, C. K.; ARISAN-ATAC, I.; SCALA, F.; HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 4364-4370, 1994.

SHORESH, M.; GAL-ON, A.; LEIBMAN, D.; CHET, I. Characterization of a mitogen-activated protein kinase gene from cucumber required for *Trichoderma*-conferred plant resistance. **Plant Physiology**, Rockville, v. 142, p. 1169-1179, 2006.

SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of the jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. **Phytopathology**, Lancaster, v. 95, p. 76-84, 2005.

TAKAI, R.; HASEGAWA, K.; KAKU, H.; SHIBUYA, N.; MINAMI, E. Isolation and analysis of expression mechanisms of a rice gene, *EL5*, which shows structural similarity to ATL family from *Arabidopsis*, in response to N-acetylchitooligosaccharide elicitor. **Plant Science**, Limerick, v. 160, p. 577-583, 2001.

TALBOT, N. J.; EBBOLE, D. J.; HAMER, J. E. Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 5, p. 1575–1590, 1993.

THORNTON, C. R.; PITT, D.; WAKLEY, G. E.; TALBOT, N. J. Production of a monoclonal antibody specific to the genus *Trichoderma* and closely related fungi, and its use to detect *Trichoderma* spp. in naturally infested composts. **Microbiology**, Reading, v. 148, p. 1263–1279, 2002.

TU, J. C. *Gliocladium virens*, a destructive mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum* **Phytopathology**, Lancaster, v. 70, p. 670-674, 1980.

ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Purification and characterization of an extracellular chitobiase from *Trichoderma harzianum*. **Current Microbiology**, London, v. 23, p. 285-289, 1991.

ULHOA, C. J.; PEBERDY, J. F. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 14**,** p. 236-240, 1992.

VALENT. B.; FARRALL, L.; CHUMLEY, F. G. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence through a series of backcrosses. **Genetics**, Bethesda, v. 127, p. 87-101, 1991.

VITERBO, A.; HARAN, S.; FRIESEM, D.; RAMOT, O.; CHET, I. Antifungal activity of a novel endochitinase gene (*chit36*) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 200, p. 169-174, 2001.

VITERBO, A.; HAREL, M.; HORWITZ, B. A.; CHET, I.; MUKHERJEE, P. K. *Trichoderma* mitogen-activated protein kinase signaling is involved in induction of plant systemic resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 6241-6246, 2005.

VITERBO, A.; MONTERO, M.; RAMOT, O.; FRIESEM, D.; MONTE, E.; LLOBELL, A.; CHET, I. Expression regulation of the endochitinase *chit36* from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203). **Current Genetics**, Berlin, v. 42, p. 114-122, 2002.

VITERBO, A. D. A.; WIEST, A.; BROTMAN, Y.; CHET, I.; KENERLEY, C. The 18 mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 8, p. 737-746, 2007.

WILHITE, S. E.; LUMSDEN, R. D.; STRANEY, D. C. Mutational analysis of gliotoxin production by the biocontrol fungus *Gliocladium virens* in relation to suppression of *Pythium* damping-off. **Phytopathology**, Lancaster, v. 84, p. 816-821, 1994.

WOO, S. L.; DONZELLI, B.; SCALA, F.; MACH, R.; HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P.; DEL SORBO, G.; LORITO, M. Disruption of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma harzianum* P1. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 12, p. 419-429, 1999.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 1061-1070, 1999.

YEDIDIA, I.; SHORESH, M.; KEREM, Z.; BENHAMOU, N.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 7343-7353, 2003.

YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A. K.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 235, p. 235-242, 2001.

ZIMAND, G.; ELAD, Y.; CHET, I. Biological control of *Botrytis cinerea* by *Trichoderma* spp. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 19, p. 252-253, 1991.

ZIMAND, G.; ELADY, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. **Phytopathology**, Lancaster, v. 86, p. 1255-1260, 1996.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Comunidades fúngicas são encontradas em associação com todas as espécies vegetais conhecidas, seja colonizando a superfície externa, o interior dos tecidos ou a rizosfera, onde estabelecem interações que variam do mutualismo ao parasitismo. Considerando as diversas atividades dos fungos associados às plantas é possível perceber que mudanças na diversidade fúngica poderão ter importantes implicações para a fertilidade do solo, equilíbrio do ecossistema, estabilidade, estabelecimento da planta e rendimento. Logo, estudos de diversidade e interação fungo-planta podem ajudar a esclarecer o papel de microrganismos nativos e mudanças biológicas associadas às pertubações ambientais, correlacionando diversidade microbiana, solo, planta e sustentabilidade do ecossistema. O presente trabalho buscou avaliar esses aspectos para uma cultura de grande importância agrícola e econômica para o Brasil, a cana-de-açúcar. A realização do estudo foi dividida em duas etapas: a primeira (Capítulos 2 e 3) incluiu a avaliação da estrutura e diversidade da comunidade de fungos presentes no interior das raízes e na rizosfera de duas variedades de plantas de cana-de-açúcar, uma convencional (SP80-1842) e outra transgênica (IMI-1), sob influência de diferentes fatores, como os estágios de desenvolvimento da planta e o trato cultural utilizado na condução da cultura; a segunda etapa (Capítulos 4 e 5) envolveu o estudo detalhado da interação fungo-planta a partir da escolha de um grupo fúngico (*Trichoderma*) frequentemente isolado de raízes de cana.

Os dados obtidos na primeira etapa do trabalho revelaram que a transgênese e o trato cultural não induziram alterações significativas na diversidade e estrutura das comunidades fúngicas, mas que, diferentemente, a idade das plantas determinou características da comunidade fúngica endofítica de raízes. Esses resultados sugerem que os efeitos da modificação genética em plantas transgênicas devem ser menores quando comparados às fontes naturais de variação, como a idade e o órgão da planta. A identificação taxonômica de 249 isolados pertencentes à comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar revelou a predominância do filo Ascomicota e dos gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Epicoccum*, indicando que a estrutura da comunidade fúngica inclui um grande número de gêneros pouco frequentes e um pequeno número de gêneros altamente frequentes. Além disso, foi observado que as comunidades fúngicas endofítica e da rizosfera apresentaram diferenças na diversidade, composição e

frequência de ocorrência de gêneros fúngicos, sugerindo a existência de especificidade ao local de isolamento.

Dentre os pelo menos 35 gêneros presentes na comunidade fúngica de cana-de-açúcar, *Trichoderma* foi o quarto mais frequente e não apresentou especificidade ao local de isolamento (raízes ou rizosfera), indicando provável importância desse gênero para plantas de cana-de-açúcar, sendo, portanto, considerado promissor para estudos mais detalhados. Por essa razão, um isolado de *T. virens* foi selecionado para realização dos estudos de interação com a planta. Em primeiro lugar, foram analisados aspectos básicos da interação fungo-planta, como o padrão de colonização fúngica e os efeitos da infecção das plantas pelo fungo. Depois, numa abordagem mais específica, o estudo avaliou um possível papel de *T. virens* durante a associação com a planta, ou seja, o potencial desse endófito como agente de controle biológico contra patógenos fúngicos e a identificação de alguns mecanismos moleculares envolvidos nessa atividade. Os dados obtidos confirmaram que *T. virens* coloniza plantas de cana-de-açúcar endofiticamente, sendo que se localiza preferencialmente no espaço intercelular das primeiras camadas de célula do tecido radicular e a sua presença nos tecidos da planta não gera alterações detectáveis no fenótipo do hospedeiro. Além disso, foi observado que *T. virens* é capaz de controlar diferentes patógenos fúngicos, não só em cana-de-açúcar, mas também em alface, feijão e arroz, onde esse fungo também se comporta como endofítico. Os mecanismos moleculares envolvidos na atividade de controle biológico desse fungo incluem pelo menos a ação de quitinases extracelulares (endo- e exoquitinases) e a indução de resistência da planta. Entretanto, diferentes mecanismos parecem ser empregados dependendo da tripla interação em questão (agente de controle biológico-planta-patógeno). Esse é o primeiro trabalho envolvendo a identificação molecular de um grande número de isolados e descrição da diversidade de fungos para a cultura da cana-de-açúcar. Além disso, a avaliação da interação *T.virens*-cana-de-açúcar mostrou a importância de se estudar o papel dos fungos durante a interação com a planta, abrindo novas perspectivas de exploração de relações mutualísticas para otimização da agricultura.