Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Diversidade e caracterização genética de comunidades microbianas
endofíticas associadas à cana-de-açúcar**

Rodrigo Mendes

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

Piracicaba

2008

Rodrigo Mendes
Engenheiro Agrônomo

**Diversidade e caracterização genética de comunidades microbianas
endofíticas associadas à cana-de-açúcar**

Orientadora
Prof^a. Dra. ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

Piracicaba
2008

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

Mendes, Rodrigo

Diversidade e caracterização genética de comunidades microbianas endofíticas associadas à cana-de-açúcar / Rodrigo Mendes. - - Piracicaba, 2008.
119 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Bactérias 2. Cana-de-açúcar 3. Fungos 4. Microrganismos endofíticos
5. Organismos geneticamente modificados I. Título

CDD 633.61

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

*DEDICO**À minha esposa Ana Paula.**OFEREÇO**Aos meus pais, Edison e Cidinha, e**irmãos Ana Paula e Lucas.*

Agradecimentos

as **agências de fomento** foram cruciais para o suporte e motivação na realização desta tese de doutorado, a fapesp (proc. no. 03/01436-5) e cnpq (proc. no. 140102/03-5) concederam a bolsa para a realização do doutorado no brasil e a capes (proc. no. 377105-9) concedeu bolsa para realização de doutorado sandwich na holanda | meus **orientadores**, aline ap. pizzirani-kleiner (brasil) e jos m. raaijmakers (holanda), e os professores welington luiz araújo e joão lúcio de azevedo foram cientistas exemplares, concederam-me incondicional apoio para o desenvolvimento do trabalho e foram determinantes para a formação do meu perfil científico | minha esposa **ana paula** e os meus **familiares** ofereceram tudo o que se pode esperar de melhor do amor fraternal e proporcionaram as condições mais favoráveis para que eu encontrasse o equilíbrio de viver e conduzir o trabalho com prazer e tranquilidade | os **colegas de trabalho** júlia kuklinsky sobral, marco kruijt, fernando dini andreote e vanderlei ap. varisi, foram os que mais contribuíram no ensino e compartilhamento do conhecimento; e a joelma marcon, priscilla b. rossetto e josé antônio da silva formaram o time para a coleta de plantas e isolamento dos microrganismos | muitos **colegas e amigos** adquiridos durante o doutorado no brasil e na holanda permitiram o desfrute de momentos inesquecíveis, tanto em atividades profissionais quanto em sociais, e aqui segue uma lista deles: adalgisa torres, ágata giancoli, aldo procópio, aline s. romão, ana paula pallu, anderson ferreira, andré lima, andrea bogas, antonio sérgio ferreira fº, armando dias, betania gonçalves souza, carlos eduardo ceroni, carlos ivan aguilar, carol soares, cláudia gai, cristina maki, danice luvizotto, fernanda sebastianes, fernando barcellos, fernando zambrozio, heloíze milano, irene de bruijn, laura assunção, léia fávaro, leonardo souza, lia wagemakers, luciana cursino, luís jarrin, manuella dourado, marcelo e rose do carmo, maria beatriz c. rodrigues, maria carolina quecine, marise suzuki, mayra martins, michele silva, paulo t. lacava, peter e joana zuurbier, raphael t. carneiro, ramin roohparvar, renata assis, ricardo yara, rodrigo costa, rodrigo stuart, rodrigo taketani, rudi procópio, ioannis stergiopoulos, tais lana, tran thi thu ha, ulisses rocha, uirá c. belmonte, vanessa dos santos e walter maccheroni jr., ainda nesta lista acrescenta-se a **comunidade brasileira da cidade de wageningen** na holanda | os professores e funcionários do **departamento de genética** da esalq ofereceram o melhor nos cursos e na assistência durante minha vida acadêmica | a comunidade internacional do **departamento de fitopatologia** da universidade de wageningen proporcionou discussões científicas de altíssimo nível, além de agradáveis momentos sociais | as **orientadas de mestrado** pela universidade de wageningen, wendy franchimon e elena díaz de liaño spinal, proporcionaram-me a oportunidade de exercer o nobre trabalho da orientação científica | de **Deus** provém a vida e todos os mistérios da natureza

Rodrigo Mendes

“O conjunto das virtudes fundamentais para o pleno desenvolvimento do homem, incluindo prudência, equilíbrio e justiça; deve se manifestar no uso da ciência para a busca da verdade em seu sentido mais amplo.”

Rodrigo Mendes

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Revisão de Literatura.....	16
1.1.1 A cana-de-açúcar e a utilização de plantas geneticamente modificadas	16
1.1.2 Microrganismos endofíticos.....	18
1.1.2.1 Fungos endofíticos	20
1.1.2.2 Bactérias endofíticas.....	23
1.1.3 Técnicas de estudo de microrganismos associados às plantas.....	24
Referências	30
2 DIVERSIDADE DA COMUNIDADE FÚNGICA ASSOCIADA À CANA-DE- AÇÚCAR GENETICAMENTE MODIFICADA E INTERAÇÃO ENTRE <i>Fusarium</i> <i>moniliforme</i>, ENDOFÍTICO E PATOGÊNICO, E O HOSPEDEIRO	43
Resumo	43
Abstract	45
2.1 Introdução	47
2.2 Desenvolvimento	48
2.2.1 Materiais e métodos.....	48
2.2.1.1 Material vegetal, desenho experimental e épocas de isolamento.....	48
2.2.1.2 Isolamento de fungos, condições de cultivo e análise estatística	49
2.2.1.3 Identificação molecular dos fungos isolados de cana-de-açúcar	51
2.2.1.4 Estudo filogenético dos isolados endofíticos com base nas seqüências das regiões ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA.....	53
2.2.1.5 Caracterização genotípica de isolados do gênero <i>Fusarium</i>	53
2.2.1.6 Acesso à diversidade de fungos de maneira independente de cultivo por PCR-DGGE.....	54
2.2.1.7 Histologia de folhas de cana-de-açúcar infectadas por <i>Fusarium moniliforme</i>	55
2.2.1.8 Avaliação da expressão de genes de endo-poligalacturonase de <i>Fusarium</i> <i>moniliforme</i> durante a infecção de cana-de-açúcar	56
2.2.2 Resultados e discussão.....	59

2.2.2.1	Frequência, diversidade e filogenia de fungos isolados de cana-de-açúcar	59
2.2.2.5	Acesso à diversidade total de fungos da rizosfera por PCR-DGGE.....	66
2.2.2.4	Caracterização genotípica de isolados do gênero <i>Fusarium</i>	69
2.2.2.6	Histologia de folhas de cana-de-açúcar infectadas por <i>Fusarium moniliforme</i>	72
2.2.2.7	Avaliação da expressão de genes de endo-poligalacturonase de <i>Fusarium moniliforme</i> durante a infecção de cana-de-açúcar	74
2.3	Conclusão.....	82
	Referências.....	83
3	DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS CULTIVADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E BIOQUÍMICA DE ISOLADOS DO COMPLEXO <i>Burkholderia cepacia</i>	89
	Resumo.....	89
	Abstract.....	91
3.1	Introdução	93
3.2	Desenvolvimento.....	95
3.2.1	Materiais e métodos	95
3.2.1.1	Isolamento de bactérias, meio de cultura e condições de cultivo.....	95
3.2.1.2	Caracterização genotípica de bactérias endofíticas	96
3.2.1.3	Caracterização fenotípica de isolados bacterianos	97
3.2.1.4	Deteção e análise de genes antibióticos e metabólitos	97
3.2.1.5	Mutagenese sítio-dirigida no gene da pirrolnitrina	98
3.2.2	Resultados e discussão	99
3.2.2.1	Frequência, diversidade e identidade de bactérias endofíticas de cana-de-açúcar.	99
3.2.2.2	Caracterização genotípica de isolados endofíticos de <i>Burkholderia</i>	100
3.2.2.3	Caracterização bioquímica de isolados endofíticos de <i>Burkholderia</i>	107
3.2.2.4	Papel da pirrolnitrina na inibição do crescimento de <i>Fusarium moniliforme</i> por <i>Burkholderia</i> endofítica.....	108
3.3	Conclusão.....	110
	Referências.....	112

RESUMO

Diversidade e caracterização genética de comunidades microbianas endofíticas associadas à cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas do Brasil e nos últimos anos está recebendo especial atenção devido ao crescente aumento da área cultivada e produção de etanol para uso como biocombustível. Considerando-se sua importância econômica e a possibilidade do uso de plantas geneticamente modificadas, essa cultura tem se tornado foco de pesquisas relacionadas à produtividade e sustentabilidade. Neste contexto, o estudo de comunidades microbianas associadas à cana-de-açúcar é de fundamental importância, pois além dessas comunidades desempenharem importante papel funcional na interação com a planta, os estudos realizados nas condições tropicais são limitados. Comunidades de fungos e bactérias associadas à cana-de-açúcar geneticamente modificada IMI-1 e sua isolinha convencional SP80-1842 foram sistematicamente isoladas de plantas cultivadas em área experimental em Piracicaba, SP, Brasil. Por meio de isolamento e PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) foi verificado que a transgenia não afeta a diversidade da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar. A diversidade dessas comunidades foi descrita e caracterizada molecularmente. O fungo *Fusarium moniliforme* apresentou alta frequência de isolamento e também foi observado que o gene da endopoligalacturonase, *pgIII*, desempenha um importante papel no tipo de associação, endofítica ou patogênica, do *F. moniliforme* e a planta. O complexo *Burkholderia cepacia* constitui uma importante fração da comunidade de bactérias associada à cana-de-açúcar no Brasil e isolados deste complexo são capazes de inibir o crescimento do patógeno *F. moniliforme*. Análises filogenéticas indicaram que os isolados de bactérias endofíticas de *Burkholderia* são proximamente relacionados com linhagens-tipo do complexo *B. cepacia* isoladas de pacientes de fibrose cística.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Comunidades microbianas; *Fusarium moniliforme*; Complexo *Burkholderia cepacia*

ABSTRACT

Diversity and genetic characterization of endophytic microbial communities associated with sugarcane

In Brazil, the sugarcane is one of the most important cultivated crops. The sugarcane has received increased interest in the last years because of increase of the cultivated area and ethanol production to be used as biofuel. Considering its economical importance and the possibility of the use of the genetically modified plants; this crop has become the aim of current research for productivity and sustainability. In this context, the work on microbial communities associated with sugarcane is remarkable, because both, these communities play important functional role in the interaction with the plant, and studies performed in tropical conditions are limited as well. Fungal and bacterial communities associated with genetically modified sugarcane IMI-1 and its conventional isolate SP80-1842 were systematically isolated from plants cultivated in an experimental area in Piracicaba, SP, Brazil. The fungal communities associated with sugarcane were accessed by means of cultivation approach and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis; the results revealed that these communities are not affected by transgeny. The microbial communities' diversity was characterized and identified by using molecular tools. The fungus *Fusarium moniliforme* showed high frequency in association with the plant and it was observed that the endopolygalacturonase gene, *pgIII*, plays important role in order to determine the sort of association, either endophytic or pathogenic, between *F. moniliforme* and the host. The *Burkholderia cepacia* complex is an integral part of the endophytic bacterial community of sugarcane in Brazil and isolates of this complex are able to control *F. moniliforme* growth. Phylogenetic analyses indicated that the endophytic *Burkholderia* are closely related to clinical isolates of the *B. cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients.

Keywords: Sugarcane; Microbial communities; *Fusarium moniliforme*; *Burkholderia cepacia* complex

1 INTRODUÇÃO

*“There are more things in heaven and earth, Horatio,
Than are dreamt of in your philosophy.”*

(Hamlet, ato I, cena 1 | **Shakespeare**)

O estudo sobre a diversidade e caracterização genotípica de comunidades microbianas endofíticas associadas à cana-de-açúcar apresenta aspectos científicos básicos e aplicados no contexto do cultivo da cana-de-açúcar no Brasil. Primeiramente, este trabalho abrange comunidades de fungos e bactérias associadas de diferentes formas à cultura, sendo que além de endófitos de folha, colmo e raiz, são avaliadas comunidades associadas à rizosfera do hospedeiro. Do ponto de vista da ciência básica são exploradas as questões que envolvem a determinação do comportamento endofítico ou patogênico de fungos e o mecanismo molecular utilizado na inibição de patógenos por bactérias endofíticas. Do ponto de vista aplicado são descritas bactérias endofíticas capazes de controlar o crescimento de patógenos da cultura da cana-de-açúcar, podendo, conseqüentemente, ser usadas como agentes no controle biológico de doenças. Com a utilização de ferramentas moleculares é apresentada uma descrição dos principais gêneros que constituem as comunidades fúngicas e bacterianas cultivadas e associadas ao hospedeiro.

A hipótese inicial do estudo considerou a possibilidade do cultivo de cana-de-açúcar geneticamente modificada para a resistência ao herbicida imazapir afetar a diversidade da comunidade microbiana associada. Ao longo do desenvolvimento do trabalho, com o surgimento dos resultados preliminares o estudo foi conduzido a diferentes aspectos relacionados à interação entre as comunidades microbianas e a cana-de-açúcar. O estudo referente às comunidades fúngicas focou na caracterização molecular do gênero *Fusarium* e na possibilidade de genes da endo-poligalacturonase desempenharem importante papel na determinação do comportamento endofítico ou patogênico de *Fusarium moniliforme*, agente causal de Pokkah boeng em cana-de-açúcar. O estudo referente às comunidades bacterianas focou na caracterização do gênero *Burkholderia* e seu potencial como agente de controle biológico e promoção de crescimento, além de elucidar a relação filogenética entre isolados de cana-de-açúcar e aqueles capazes de infectar pacientes com fibrose cística e levá-los à morte.

Dessa forma, com a finalidade de contextualizar o trabalho e os resultados apresentados nos capítulos subseqüentes, neste capítulo introdutório será apresentada uma revisão de literatura sobre a cana-de-açúcar, microrganismos endofíticos, incluindo fungos e bactérias, e de forma geral, diferentes abordagens moleculares para o estudo de microrganismos associados às plantas.

1.1 Revisão de literatura

1.1.1 A cana-de-açúcar e a utilização de plantas geneticamente modificadas

A cana-de-açúcar é classificada taxonomicamente como pertencendo à classe Liliopsida; família Poaceae; tribo Andropogoneae; e gênero *Saccharum* de acordo com o NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION). O cenário da evolução e domesticação da cana-de-açúcar descrito por Brandes em 1958 é muito semelhante ao correto, o qual foi estabelecido com evidências genéticas moleculares por Grivet et al. em 2004. Estes estudos afirmam que os cultivares nobres (*Saccharum officinarum*) surgiram a partir de *S. robustum* na Nova Guiné e foram espalhados por longas distâncias pelo homem. Assim, ocorreram hibridizações naturais com *S. spontaneum* na Ásia, dando origem aos cultivares Norte da Índia (*S. barberi*) e Chinês (*S. sinense*) (BRANDES, 1958; GRIVET et al., 2004). Uma importante contribuição nesse sentido foi a de Daniels e Roach, que em 1987, (DANIELS; ROACH, 1987) publicaram uma extensiva revisão multidisciplinar que permitiu traçar o início da evolução e a domesticação da cana-de-açúcar. As cultivares modernas são híbridos oriundos de cruzamentos usando *S. officinarum* com elevado nível de ploidia, complexo comportamento meiótico e que podem possuir até 5 a 10% do genoma das espécies parentais doadoras (LU et al., 1994).

Os primeiros relatos da cana-de-açúcar no Brasil datam de 1522 na cidade de São Vicente quando a cultura foi trazida da Ilha da Madeira por Martin Afonso de Souza e, posteriormente, introduzida no Pernambuco por Duarte Coelho Pereira em 1533 (BASTOS, 1987). No período colonial a cultura era destinada exclusivamente à produção de açúcar e a partir de 1970, com o incentivo do governo brasileiro, a agroindústria canavieira explorou a potencialidade e uso da cana-de-açúcar como fonte de energia renovável (SZMRECSÁNYI; MOREIRA, 1991) e atualmente o Brasil é modelo no uso do etanol como biocombustível atraindo o interesse

internacional (CARVALHO, 2002). Atualmente, a cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes no Brasil, com uma produção de mais de 440 milhões de toneladas em uma área de 6 037 341 ha na safra 2005/06 de acordo com o IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Porém, doenças fúngicas como o Carvão (*Ustilago scitaminea*), Ferrugem (*Puccinia melanocephala*), Mancha ocular (*Bipolaris sacchari*), Podridão vermelha (*Fusarium* spp.) e Pokkah boeng (*Fusarium moniliforme*) podem afetar os campos canavieiros causando perdas de produção. Devido à limitada disponibilidade de ferramentas genômicas para *Saccharum* spp. poucos estudos têm sido conduzidos com a finalidade de prover conhecimento molecular para a resistência a patógenos. Mesmo em doenças de grande importância econômica para a cultura, como no caso de *Ustilago scitaminea* e *Bipolaris sacchari*, pouco é conhecido sobre a interação no nível molecular desses pato-sistemas (BORRAS-HIDALGO et al., 2005).

Uma das possibilidades para o aumento da produção de cana-de-açúcar no Brasil e no mundo é a utilização de plantas geneticamente modificadas (PGMs), porém, até o momento no Brasil, seu uso é restrito à pesquisa. Estudos têm sido conduzidos pelo Centro de Tecnologia Canaveira (CTC) em Piracicaba, SP, incluindo o desenvolvimento da variedade IMI-1 resistente ao herbicida imazapir. A resistência ao herbicida foi conferida à essa planta devido a presença de uma construção plasmidial contendo um variante do gene AHAS de trigo (ANDERSON; MATTHIESEN; HEGSTAD, 2004), no qual a serina da posição 653 foi substituída por uma asparagina, e um promotor da ubiquinona de cana-de-açúcar. Os herbicidas derivados de imidazolinonas possuem a capacidade de inibir a enzima acetolactato sintase (ALS), a qual é a primeira enzima na via da biossíntese dos aminoácidos, valina, leucina e isoleucina, (SHANER; ANDERSON; STIDHAM, 1984; TAN et al., 2005). A utilização de PGMs expressando características de interesse tem sido amplamente considerada para o aumento da produtividade agrícola. Neste contexto, alguns países têm cultivado PGMs resistentes ao herbicida glifosato (gene *cp4 epsps*) (PADGETTE et al., 1995; NIDA et al., 1996), resistentes às pragas (gene *cryIAc*) (LEROY et al., 2000), resistentes aos patógenos (gene da lisozima) (LOTTMANN et al., 1999), entre outras características de importância. Entretanto, a liberação do consumo e plantio destas PGMs deve ser o resultado de um intenso trabalho de avaliação dos riscos ao ambiente e dos benefícios que ocorrerão com a utilização desta tecnologia.

Poucos estudos foram realizados para se avaliar o efeito de PGMs sobre a comunidade microbiana associada. Entretanto, pode ser aventada a hipótese de que as plantas transgênicas possam deixar os produtos dos genes nelas introduzidos no solo, afetando a microbiota do mesmo. Neste aspecto, foi observado que plantas de tabaco geneticamente modificadas, expressando β -1,3-glicanase, se mostraram resistentes a *Peronospora tabacina* e *Phytophthora parasitica* var. *nicotiana* (LUSSO; KUC, 1996), mostrando o efeito da transgenia sobre fungos patogênicos. A população fúngica de solo de plantas de algodão, alteradas geneticamente expressando a endotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, apresentou um aumento transiente em sua contagem total em relação à isolinha convencional (DONEGAN et al., 1995). O estudo realizado na comunidade fúngica associada à raiz de milho transgênico, contendo o gene de *Bacillus thuringiensis* para resistência às pragas, revelou que a diversidade de fungos é menor na linha transgênica que na convencional, além do patógeno *Fusarium moniliforme* apresentar maiores índices de infecção na linha transgênica (TATLI; GULLU; OZDEMIR, 2004). Estudos realizados em vários países têm avaliado os efeitos de PGMs sobre a diversidade microbiana (HEUER; SMALLA, 1999; HEUER et al., 2002), mas estudos em países tropicais, onde a diversidade microbiana é maior, ainda são limitados, dificultando conclusões sobre os possíveis efeitos de PGMs sobre estas comunidades em condições tropicais.

De maneira geral, a preocupação maior em relação às PGMs é seu efeito sobre a saúde humana e dos animais, e transferência gênica para outras plantas em detrimento do possível efeito sobre a comunidade microbiana. Se considerarmos que a interação entre a planta e microrganismos epifíticos, endofíticos e da rizosfera deve permanecer em equilíbrio, um aspecto importante na avaliação dos riscos das PGMs ao ambiente é o efeito sobre a comunidade microbiana associada às plantas, pois a expressão desses transgenes ou a demanda de um novo manejo cultural, em decorrência da transgenia, pode estimular ou inibir o desenvolvimento de diferentes espécies microbianas (DUNFIELD; GERMIDA, 2004), alterando dessa forma o equilíbrio microbiológico daquele ambiente.

1.1.2 Microrganismos endofíticos

Um grande número de microrganismos pode viver associado aos vegetais, tanto em sua superfície como em seu interior. Entre eles, estão os que podem ser classificados como

microrganismos epifíticos ou simplesmente epífitos, os quais habitam a superfície dos órgãos e tecidos vegetais e os microrganismos endofíticos ou simplesmente endófitos, os quais habitam o interior das plantas hospedeiras e que se distinguem de outro grupo, os patógenos que são capazes de causar doenças em plantas (MENDES; AZEVEDO, 2007). Praticamente todos os principais grupos de microrganismos convivem com vegetais, mas os fungos e bactérias são os mais comumente encontrados em interações microrganismos-plantas. Estima-se que o número de células microbianas que vivem em contato com vegetais é bastante superior ao número de células que formam o próprio hospedeiro. São várias as razões para que investigações na área de endófitos sejam continuadas e ampliadas, como por exemplo: a) os microrganismos compõem uma das maiores fontes de diversidade genética disponível entre os seres vivos (PROSSER et al., 2007); b) faltam informações nos aspectos ecológicos, genéticos e fisiológicos para elucidar a interação microrganismo-planta; c) vários endófitos apresentam produção de antibióticos e outros metabólitos de interesse farmacológico (ZHANG; SONG; TAN, 2006); d) eles podem ser utilizados como bioindicadores de alterações ecológicas (HELANDER; RANTIO-LEHTIMÄKI, 1990); e) atuam como agentes no controle biológico de pragas e de doenças (WHITE JR; COLE, 1985; BUCHENAUER, 1998)); f) produzem micoherbicidas para controle de ervas daninhas (CERKAUSKAS, 1988); g) podem funcionar como vetores para a expressão de genes em plantas hospedeiras (HAAPALAINEN et al., 1998); e h) vários endófitos são indicadores de deficiências nutricionais de plantas (BLODGETT et al., 2007). A grande maioria dos estudos com endófitos tem sido realizada em plantas de clima temperado, entretanto, recentemente, plantas de clima tropical têm sido pesquisadas quanto à presença, quantidade e qualidade de fungos endofíticos encontrados (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007).

São encontradas na literatura, várias definições para os microrganismos endofíticos. Petrini (1991) estudou principalmente os fungos e definiu endófitos como aqueles microrganismos que habitam o interior das plantas, sem aparentemente causar qualquer efeito negativo aos seus hospedeiros. Uma outra definição mais simplista apresentada mais tarde por Hallmann et al. (1997), define endófitos como todos aqueles microrganismos que podem ser recuperados do interior de plantas saudáveis, após uma cuidadosa desinfecção externa, eliminando desta maneira os microrganismos epifíticos. Uma definição mais recente, proposta por Azevedo e Araújo (2007) é aquela que chama de microrganismos endofíticos todos aqueles que podem ou não crescer em meios de cultura, ou seja, cultivados 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. Porém, esta última definição exclui os que produzem nódulos em raízes, e.g., bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio atmosférico, bem como fungos micorrízicos. Isto não significa que bactérias do tipo *Rhizobium* e fungos micorrízicos não sejam endófitos, mas essa separação é importante, pois os endófitos que não produzem estruturas externas foram até pouco tempo muito menos estudados que os fixadores simbióticos de nitrogênio e fungos micorrízicos. Desta forma, a revisão de Mendes e Azevedo (2007) propôs a redefinição do termo ‘microrganismo endofítico’, considerando a definição anterior, e adicionalmente, dividindo endófitos em dois tipos, sendo: Tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e Tipo II, os que produzem estruturas externas à planta. É importante ressaltar que a classificação em microrganismos endofíticos dos Tipos I e II, microrganismos epifíticos ou patógenos tem uma função meramente didática. É evidente que entre endófitos, epifitos e patógenos existe um gradiente que é intrínseco à Biologia de forma geral. Para penetrar nos seus hospedeiros os endófitos podem viver como epifitos uma parte do tempo; bem como, um microrganismo endofítico, pode se tornar patógeno em uma planta em condições de estresse; e ainda, um epífito, eventualmente pode penetrar em uma planta.

Os microrganismos endofíticos representam uma fonte de diversidade de inestimável valor para ser explorada quanto ao uso aplicado em culturas de importância econômica. Os diversos tipos de interação com o hospedeiro e a relativa fácil obtenção por meio de isolamento em meio de cultura fazem desse grupo de organismos uma promissora fonte de novos produtos biotecnológicos. Adicionalmente, o emprego de técnicas moleculares capazes de acessar a comunidade não cultivada, como por exemplo, a abordagem metagenômica, amplia o espectro de exploração neste nicho biológico. Não obstante, a conservação de microrganismos endofíticos está diretamente relacionada à conservação de espécies vegetais, especialmente aquelas presentes em florestas tropicais (STROBEL; DAISY, 2003), as quais embora sejam imensos reservatórios de endófitos estão diminuindo gradativamente devido à ação antrópica.

1.1.2.1 Fungos endofíticos

O número estimado de espécies de fungos em nosso planeta é de 1,5 milhão, mas o número de espécies descritas até hoje é de aproximadamente 70 mil (HAWKSWORTH;

ROSSMAN, 1997). Esses números refletem o grande potencial de exploração da biodiversidade fúngica conhecida e desconhecida. A existência de fungos endofíticos já foi comprovada em todas as espécies vegetais estudadas até o momento (REDLIN; CARRIS, 1996). Os fungos desempenham um importante papel no ciclo de nutrientes e no desenvolvimento e saúde da planta hospedeira (THORN, 1997; BRIDGE; SPOONER, 2001; MARTIN; CLIQUET; STEWART, 2001). Enquanto alguns fungos são muito bem conhecidos por causarem diversas doenças em plantas e em alguns casos devastar grandes culturas (JAROSZ; DAVELOS, 1995; THORN, 1997), outros são conhecidos como antagonistas de patógenos de plantas ou decompositores de restos de plantas provendo nutrientes para as plantas e estimulando o crescimento vegetal. Alguns fungos podem ainda afetar a comunidade bacteriana, diretamente pela mudança da fisiologia da planta hospedeira ou indiretamente pela mudança dos padrões de exudatos pela raiz (VAN DER HEIJDEN et al., 1998; MARSCHNER; CROWLEY; LIEBEREI, 2001; SODERBERG; OLSSON; BAATH, 2002).

Alguns fungos que vivem no interior de vegetais os protegem contra insetos. Os mecanismos podem ser diversos, entre eles a produção de substâncias, como alcalóides com atividade inseticida que repelem insetos e tornam as plantas menos atrativas. Há também casos nos quais fungos entomopatogênicos habitam o interior de plantas e atuam em um controle natural de insetos. Muitos fungos entomopatogênicos foram isolados a partir de plantas tropicais, inclusive no Brasil (AZEVEDO et al., 2000). Também, certos fungos produzem substâncias que retardam o desenvolvimento de insetos. A revisão de Azevedo et al. (2000) apresenta uma série de exemplos em que fungos endofíticos foram descritos como protetores de seus hospedeiros promovendo resistência aos insetos. Existem numerosos relatos de fungos endofíticos que conferem resistência ao hospedeiro contra moléstias de plantas causadas por outros fungos, nematóides e bactérias. A antibiose e a indução de resistência sistêmica são dois dos mecanismos que podem ser desencadeados por endófitos que atuam promovendo maior resistência dos hospedeiros a patógenos. O endófito *Muscodor albus* controlou *in vitro* uma série de patógenos pertencentes aos gêneros *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Geotrichum*, *Monilinia*, *Penicillium* e *Rhizopus* por meio da produção de um composto volátil, o que o torna um atrativo fumegante biológico para o controle de doenças pós-colheita (MERCIER; JIMENEZ, 2004). A revisão de Azevedo e Araújo (2007) apresenta vários exemplos dessa resistência a patógenos vegetais promovidos por fungos endofíticos.

Os fungos endofíticos podem afetar favoravelmente o crescimento de plantas, tanto direta como indiretamente. Uma forma direta de promoção de crescimento vegetal é pela produção de compostos pelos endofíticos que facilitem a entrada e utilização de certos nutrientes que existem no ambiente. Atividades indiretas de microrganismos endofíticos causando melhoria no crescimento de seus hospedeiros é feita, por exemplo, pela proteção contra insetos-pragas ou fitopatógenos. Recentes estudos revelam que microrganismos obtidos de vegetais crescidos em condições de estresse, como alta umidade ou estresse hídrico, podem promover o crescimento vegetal quando inoculados em hortaliças (RODRIGUEZ; REDMAN; KIM, 2007). Os endófitos alteram o crescimento e desenvolvimento vegetal pela produção de reguladores vegetais, etileno ou citoquinonas. Outros casos de interação, em geral simbiótica, entre fungos endofíticos e plantas, têm sido descritos. É também interessante citar que certos produtos de interesse biotecnológico, como antibióticos e outros fármacos ou enzimas, têm sido obtidos a partir de endófitos, o que os tornam excelente material de trabalho do ponto de vista aplicado. Enzimas como amilases, celulasas, proteases, lipases, quitinases e muitas outras têm sido encontradas em fungos endofíticos (STROBEL; DAISY, 2003). Também certos compostos de interesse medicinal foram obtidos de fungos endofíticos, por exemplo, o taxol produzido por *Taxomyces andreanae*, endófito de *Taxus brevifolia*, é atualmente alvo de estudos para sua produção em escala industrial (YUAN et al., 2006). Muitas outras plantas medicinais têm sido pesquisadas nesse sentido fazendo supor que algumas das propriedades dessas plantas provêm de seus microrganismos endofíticos ou pelo menos de um sinergismo entre endófito e hospedeiro.

Nos últimos anos vários metabólitos conhecidos, bem como, novas moléculas, têm sido identificadas em endófitos. Dentre as principais atividades biológicas de interesse estão os metabólitos com efeito antibiótico, antitumoral, antiinflamatório, antioxidante, anticâncer, e inseticida (revisado por FIRAKOVA; STURDIKOVA; MUCKOVA, 2007). Esse fato revela a potencialidade da exploração dos endófitos como fonte inesgotável de metabólitos secundários de interesse aplicado. Diante deste cenário, autores consideram que os endófitos ainda constituem um grupo de microrganismos pobremente estudado e que representa uma fonte abundante de compostos químicos e bioativos com potencial para a aplicação nas áreas agrônômica, médica e industrial (STROBEL; DAISY, 2003).

1.1.2.2 Bactérias endofíticas

A exemplo dos fungos endofíticos, as bactérias endofíticas também são consideradas uma inesgotável fonte para a descoberta de isolados com novas características antimicrobianas e de promoção de crescimento (STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000; LODEWYCKX et al., 2002; STROBEL, 2003; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). Bactérias endofíticas têm mostrado efeitos benéficos na promoção do crescimento vegetal e saúde em diversas culturas, sendo que os principais modos de ação descritos são: fixação de nitrogênio, produção de fitormônios e compostos antifúngicos, ou ainda, indução de resistência sistêmica (LODEWYCKX et al., 2002; SESSITSCH et al., 2002; INIGUEZ; DONG; TRIPLETT, 2004; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; COMPANT et al., 2005; MEHNAZ; LAZAROVITS, 2006; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

As bactérias endofíticas podem colonizar sistematicamente o hospedeiro e viver em associação com o apoplasto, vasos condutores e, ocasionalmente, com o meio intracelular (QUADTHALLMANN; KLOEPPER, 1996; QUADTHALLMANN; HALLMANN; KLOEPPER, 1997). Vivendo em íntima associação com a planta, as bactérias endofíticas podem alterar as condições fisiológicas e morfológicas do hospedeiro, além de atuar sobre as populações de outros microrganismos presentes no interior da planta (ANDREOTE et al., 2006). O endófito de arroz *Pantoea agglomerans* YS19 apresentou atividade de fixação de nitrogênio *in vitro* e produziu quatro diferentes fitormônios, incluindo ácido indol acético, e promoveu o crescimento da planta (FENG; SHEN; SONG, 2006). Recentemente, uma nova *Pantoea* sp. endofítica e fixadora de nitrogênio foi isolada de cana-de-açúcar em Cuba (LOIRET et al., 2004), porém seu papel na promoção do crescimento vegetal ainda não foi estabelecido. As linhagens endofíticas, *Pseudomonas fluorescens* Endo2 e Endo35 induziram proteção sistêmica contra *Macrophomina phaseolina*, agente causal de podridão seca da raiz em *Vigna mungo* (KARTHIKEYAN et al., 2005). Nos últimos anos, isolados endofíticos de espécies de *Burkholderia* estão recebendo maior interesse devido à sua capacidade de fixar nitrogênio e seu potencial de promover crescimento vegetal. Diferentes espécies de *Burkholderia* têm sido isoladas de diversas culturas (TABACCHIONI et al., 2002; BERG; EBERL; HARTMANN, 2005), incluindo cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2002), arroz (DIVAN BALDANI; BALDANI; DÖBEREINER, 2000), uva (COMPANT et al., 2004), cebola (SESSITSCH et al., 2005), milho e café (ESTRADA-DE LOS

SANTOS; BUSTILLOS-CRISTALES; CABALLERO-MELLADO, 2001; ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2002). Uma linhagem de *Burkholderia cepacia*, isolada de aspargo colonizou os espaços intercelulares de raízes de banana e controlou o crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*; e foi observado *in vitro* que esta bactéria colonizou a superfície da hifa do patógeno resultando na deformação do micélio e redução da patogenicidade do fungo (PAN et al., 1997).

O controle biológico promovido por bactérias endofíticas pode ser resultado de vários fatores, incluindo a produção de antibióticos, promoção de crescimento e indução de resistência sistêmica (MADHAIYAN et al., 2004). A produção de antibióticos é considerada um importante fator de antagonismo nas raízes (BUCHENAUER, 1998), e também desempenha um importante papel na supressão de doenças que ocorrem em determinados solos (GARBEVA; VOESENEK; ELSAS, 2004). A presença de bactérias endofíticas do gênero *Pseudomonas* com atividade sobre os patógenos *Achlya klebsiana* e *Pythium spinosum* foi estudada em arroz (ADHIKARI et al., 2001). Um estudo da comunidade bacteriana endofítica de batata revelou a alta incidência de isolados que apresentam antibiose ao fungo patogênico *Rhizoctonia solani* (STURZ; CHRISTIE; MATHESON, 1998). A capacidade de uma bactéria endofítica ativar o sistema de resistência do hospedeiro foi demonstrada em tomate, no qual a aplicação da linhagem *Pseudomonas* sp. PsJN induziu resistência sistêmica e controlou o patógeno *Verticillium dahliae* (SHARMA; NOWAK, 1998; KAVINO et al., 2007).

Considerando todo o potencial a ser explorado em fungos e bactérias endofíticas e o conhecimento relativamente limitado, principalmente, em condições tropicais, o uso de técnicas moleculares é fundamental para acessar e estudar as comunidades microbianas associadas à cana-de-açúcar no Brasil.

1.1.3 Técnicas de estudo de microrganismos associados às plantas

Tradicionalmente o estudo de microrganismos associados às plantas foi baseado em técnicas de isolamento e cultivo em meio de cultura. Nos últimos anos, com o surgimento e desenvolvimento de técnicas moleculares aumentaram as possibilidades de estudo e exploração desse grupo de organismos, além de tornar possível o acesso a microrganismos não cultivados. Deve-se considerar que os microrganismos compõem uma das maiores fontes de diversidade

genética disponível entre os seres vivos, no entanto, esta diversidade ainda encontra-se pouco descrita e explorada (PROSSER et al., 2007).

O isolamento dos endófitos do interior dos tecidos vegetais é feito a partir de plantas sadias para que patógenos não sejam preferencialmente isolados. Para o isolamento, é efetuada uma desinfecção da superfície dos órgãos e tecidos do hospedeiro a fim de se eliminar os microrganismos epifíticos. De forma geral, fragmentos de folhas, caule, flores ou raízes, são superficialmente desinfetados por uma sequência de lavagem utilizando água, etanol, hipoclorito de sódio ou outros agentes de desinfecção. Não existe uma regra geral para o isolamento de endófitos, uma vez que ocorre uma imensa variação nas características das plantas hospedeiras. Plantas com folhas espessas necessitam uma desinfecção superficial mais rigorosa do que uma planta que possui folhas delicadas, nas quais um maior tempo de exposição aos agentes desinfetantes poderia também eliminar os microrganismos endofíticos. Após a desinfecção superficial, fragmentos menores são inoculados em placas de Petri contendo meios de cultura apropriados, por exemplo, meio de Batata Dextrose Agar, Triptona Soja Agar, Sabouraud e outros, aos quais são adicionados um ou mais inibidores bacterianos (no caso de isolamento de fungos) ou fúngicos (no caso de isolamento de bactérias), por exemplo, antibióticos. Após incubação e crescimento, os microrganismos que emergem dos fragmentos são então isolados, purificados e analisados. As etapas de isolamento, purificação e caracterização podem ser detalhadamente encontradas em um manual prático de isolamento (ARAUJO et al., 2005).

Durante várias décadas o cultivo em meio de cultura tem sido usado para acessar a diversidade microbiana, mas um problema é a natureza fastidiosa de muitas espécies. Por exemplo, fungos de ferrugem, fungos micorrízicos arbusculares ou microrganismos de ambientes sujos são difíceis ou impossíveis de serem cultivados em laboratório. Portanto, as várias técnicas de cultivo necessárias para esse tipo de estudo consomem muito tempo e são laboriosas, limitando seu uso para descrever a dinâmica, composição e diversidade de comunidades no ambiente. Com as limitações para a identificação adequada de microrganismos, a análise de genes do rDNA a partir do DNA obtido diretamente de amostras ambientais tem expandido o conhecimento da diversidade microbiana nos últimos anos, sendo esta técnica uma poderosa ferramenta para investigar, com um largo alcance, a diversidade microbiana de amostras ambientais (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995; HEUER; SMALLA, 1997; PACE, 1997).

Um aumento no conhecimento da diversidade e estrutura de comunidades microbianas pode conduzir a um melhor entendimento de seu papel no ecossistema.

Dados moleculares têm sido muito úteis em sistemas agrícolas nos quais patógenos já estão bem caracterizados e, de maneira geral, um dos objetivos é o desenvolvimento de um sistema de detecção rápido e eficiente de uma doença em particular (HENSON; FRENCH, 1993). No caso de fungos, regiões de alta variabilidade do DNA, como por exemplo, as regiões do *internal transcribed spacer 1* e 2 (ITS1 e ITS2) do rDNA têm sido utilizadas como alvo de análises moleculares e têm permitido um refinado discernimento entre patógenos e não-patógenos por meio da técnica de *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) (ERLAND et al., 1994; JOHNSTON; AUST, 1994; GARDES; BRUNS, 1996) ou do uso de *primers* específicos (NAZAR et al., 1991; XUE; GOODWIN; ANNIS, 1992). Várias análises moleculares também têm usado a técnica de *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) (WILLIAMS et al., 1990; CROWHURST et al., 1991) para o mesmo propósito. Sondas construídas a partir de bandas geradas das técnicas de RFLP (KELLY et al., 1994) e RAPD (FANI et al., 1993) possibilitam a detecção e a distinção entre fungos relacionados geneticamente. Embora os métodos citados sejam aplicáveis na discriminação de espécies conhecidas e na comparação de linhagens, ainda são limitados para análises de comunidades fúngicas de amostras ambientais, onde se tem simultaneamente uma grande diversidade de fungos de identidade desconhecida. Dessa forma se faz necessário o uso de uma região alvo do DNA que permita o acesso a toda diversidade do *taxon* e apresente informação filogenética suficientemente relevante, como o gene 18S do rDNA (WOESE, 1987; JORGENSEN; CLUSTER, 1988; WOESE; KANDLER; WHEELIS, 1990; WILMOTTE et al., 1993). Assim, a natureza monofilética de fungos verdadeiros como, Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Zygomycota (BOWMAN; TAYLOR; WHITE, 1992) permite a síntese de *primers* específicos para fungos (WHITE et al., 1990) e o uso da técnica PCR-*denaturing gradient gel electrophoresis* (PCR-DGGE) para acessar a comunidade fúngica (VAN ELSAS et al., 2000) associada à cana-de-açúcar.

A utilização do conjunto gênico ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA de fungos apresenta algumas vantagens, como a presença de regiões altamente conservadas e outras variáveis, o que permite a análise de variação de diferentes níveis taxonômicos por meio do uso de *primers* (LARENA et al., 1999). As regiões ITS evoluem rapidamente e, portanto, são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. Os motivos que tornam

as regiões ITS um bom alvo para a identificação molecular de fungos, são: o *cluster* gênico que codifica para o rDNA aparece repetido centenas de vezes permitindo fácil amplificação; as regiões ITS são relativamente curtas (600 a 800 pb); e as regiões ITS apresentam alta variabilidade para distinguir espécies fúngicas (LEE; TAYLOR, 1992), e ainda, isolados de algumas espécies (KUNINAGA et al., 1997). Conseqüentemente, é grande o número de seqüências ITS de diferentes fungos armazenadas nos bancos de dados de seqüências de nucleotídeos. Isso permite a utilização do *basic local alignment search tool* (BLAST), o qual compara a seqüência amplificada e seqüenciada com as seqüências armazenadas no banco de dados do NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION), resultando na identificação do organismo com o nível de identidade conhecido.

As técnicas baseadas em DNA apresentam muitas facilidades, como por exemplo, a estabilidade dos resultados, os quais podem ser obtidos em qualquer idade ou condições fisiológicas do microrganismo ou mesmo a partir de resíduos orgânicos e requerendo apenas uma pequena quantidade de DNA (LOUWS; RADEMAKER; DE BRUIJN, 1999). Estas técnicas têm sido utilizadas prioritariamente para a análise da variabilidade genética de microrganismos. Neste contexto, as técnicas mais utilizadas para o estudo desta variabilidade são: mapas de restrição; hibridização DNA-DNA ou DNA-RNA; seqüências de subunidades do rRNA; RAPD; RFLP; e *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE).

Embora exista um grande número de técnicas que revelam polimorfismo de DNA, é importante considerar o tipo de organismo em estudo. Baseado na PCR a RAPD (WELSH; MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990) é um tipo de marcador molecular que tem sido extremamente útil para estudos de filogenia e caracterização de indivíduos (LOUWS; RADEMAKER; DE BRUIJN, 1999), estudo da comunidade microbiana de ambientes aquáticos (FRANKLIN; TAYLOR; MILLS, 1999) e de bactérias associadas às plantas (ARAUJO et al., 2001). A técnica foi utilizada para o estudo da diversidade genética de *Rhizobium* sp. associada à leguminosas (DE OLIVEIRA et al., 2000). A RAPD também foi empregada para avaliar a diversidade genética de *Xanthomonas* sp. associada ao maracujá; o estudo revelou que as linhagens foram agrupadas preferencialmente de acordo com os diferentes locais de origem (GONCALVES; ROSATO, 2000). Outra técnica empregada para a caracterização molecular de comunidades bacterianas é a BOX-PCR; nesta técnica é utilizado um *primer* que anela nas regiões dos elementos BOX do genoma (KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995) resultando

em polimorfismo de bandas que permitem o estudo da diversidade de microrganismos ecologicamente importantes (RADEMAKER; LOUWS; DE BRUIJN, 1998).

Uma técnica utilizada para acessar a comunidade microbiana independentemente de cultivo é a PCR-DGGE. Essa técnica separa produtos da PCR de tamanhos similares com base na diferença de composição em um gel com gradiente de desnaturação (MUYZER; DEWAAL; UITTERLINDEN, 1993). A PCR-DGGE é de alta resolução (MYERS et al., 1985; MYERS; MANIATIS; LERMAN, 1987), sendo que um grande número de amostras pode ser rapidamente comparado revelando a dinâmica de comunidades microbianas (MUYZER; SMALLA, 1998). A maioria dos estudos relacionados à diversidade fúngica utilizando PCR-DGGE tem como alvo porções do gene 18S (KOWALCHUK; GERARDS; WOLDENDORP, 1997; SMIT et al., 1999; VAN ELSAS et al., 2000) ou regiões ITS do rDNA (LANDEWEERT et al., 2003). No caso de bactérias a região alvo é a do 16S rDNA, e nessa região são desenhados *primers* universais ou específicos para determinados gêneros, como por exemplo, *Pseudomonas* (WIDMER et al., 1998; GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004; MILLING et al., 2004), *Paenibacillus* (DA SILVA et al., 2003) e *Burkholderia* (SALLES; DE SOUZA; VAN ELSAS, 2002). Esta técnica foi utilizada no estudo da diversidade de comunidades fúngicas em ambientes de decomposição de madeira, baseada na amplificação do gene 18S do rDNA (VAINIO; HANTULA, 2000). A PCR-DGGE tem sido capaz de detectar variações na comunidade microbiana decorrente da presença de fungicidas (THIRUP et al., 2001; SIGLER; TURCO, 2002), fertilizantes orgânicos e inorgânicos (MARSCHNER; KANDELER; MARSCHNER, 2003). Adicionalmente a técnica foi empregada no estudo de ambientes complexos (PENNANEN; PAAVOLAINEN; HANTULA, 2001) e para estudar a comunidade microbiana associada à plantas transgênicas (HEUER; SMALLA, 1999). Permitindo o acesso independente de cultivo às comunidades microbianas, a técnica da PCR-DGGE é uma ferramenta útil para fornecer informações sobre a dinâmica e alteração da composição das comunidades microbianas associadas às plantas.

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foi desenvolvida com o objetivo de estimar o número de cópias de um gene de interesse (HIGUCHI et al., 1993; HEID et al., 1996; DOLKEN; SCHULER; DOLKEN, 1998). O método pode ser desenvolvido por meio de diferentes sistemas para a detecção do número de cópias de DNA durante a PCR. Um dos sistemas é a utilização de uma sonda de oligonucleotídeos marcada duplamente com uma molécula *reporter* (R) na porção 5'P e outra molécula *quencher* (Q) na extremidade 3'OH. Quando em proximidade, a molécula Q

absorve a fluorescência emitida pela molécula R uma vez excitada. Durante a PCR, a sonda se liga à sequência complementar do DNA a ser amplificado, e quando a enzima *Taq* DNA polimerase encontra esta sonda durante a síntese da nova fita de DNA, a atividade exonucleásica 5'→3' remove a molécula repórter que emitirá fluorescência livremente, a qual é captada por um detector. A fluorescência é, então, correlacionada com a quantidade de produto formado em tempo real durante a amplificação, assim a PCR é considerada quantitativa (HIGUCHI et al., 1993). Um sistema mais simples, e também eficiente, é a utilização do reagente fluorescente SYBR[®] Green, o qual apresenta afinidade à fita dupla de DNA. Neste sistema, durante a síntese da fita complementar de DNA pela *Taq* DNA polimerase II na PCR, o reagente se liga à nova fita dupla sintetizada e a fluorescência é detectada em tempo real. Dessa forma, a fluorescência é uma função linear da concentração de DNA na PCR e a detecção da fluorescência no momento da síntese da fita complementar durante a reação permite a quantificação do número de cópias do transcrito inicial (MORRISON; WEIS; WITTWER, 1998). O método qPCR tem sido utilizado para diagnosticar doenças de plantas causadas por fungos e bactérias (SCHAAD; FREDERICK, 2002), quantificar e estudar fungos de importância clínica em amostras do ar e de água (HAUGLAND; BRINKMAN; VESPER, 2002) e fungos fitopatogênicos em folhas de *Quercus robur* L. (HEUSER; ZIMMER, 2002), bem como para a quantificação da expressão de genes bacterianos (VANDECASTEELE et al., 2001) e fúngicos (SEMIGHINI et al., 2002). Além disso, devido ao fato de se poder quantificar o número de cópias de uma molécula de DNA ou RNA, esta técnica tem sido indicada para validar resultados obtidos por microarranjos de DNA, permitindo a quantificação exata da expressão de genes que tiveram a sua expressão alterada pelos parâmetros avaliados.

Referências

- ADHIKARI, T.B.; JOSEPH, C.M.; YANG, G.P.; PHILLIPS, D.A.; NELSON, L.M. Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 916-924, 2001.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial-cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 143-169, 1995.
- ANDERSON, J.A.; MATTHIESEN, L.; HEGSTAD, J. Resistance to an imidazolinone herbicide is conferred by a gene on chromosome 6DL in the wheat line cv. 9804. **Weed Science**, Lawrence, v. 52, p. 83-90, 2004.
- ANDREOTE, F.D.; LACAVA, P.T.; GAI, C.S.; ARAUJO, W.L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D.; AZEVEDO, J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, p. 419-426, 2006.
- ARAUJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P.T. **Manual de isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', 2005. 85 p.
- ARAUJO, W.L.; MACCHERONI JR., W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.
- AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Eds.). **Fungi: multifaceted microbes**. New Delhi: Anamaya Publishers, 2007. chap. 6, p. 189-207.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR., W.; PEREIRA, J.O.; DE ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, p. 40-65, 2000.
- BASTOS, S.A. **Cana-de-açúcar, o verde mar de energia**. São Paulo: Ídcone, 1987. 127 p.
- BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 1673-1685, 2005.
- BLODGETT, J.T.; SWART, W.J.; LOUW, S.V.; WEEKS, W.J. Soil amendments and watering influence the incidence of endophytic fungi in *Amaranthus hybridus* in South Africa. **Agriculture, Ecosystems & Environment Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 35, p. 311-318, 2007.

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. 1115-1121, 2005.

BOWMAN, B.H.; TAYLOR, J.W.; WHITE, T.J. Molecular evolution of the fungi-human pathogens. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 9, p. 893-904, 1992.

BRANDES, E.W. Origin, classification and characteristics. In: ARTSCHWAGER, E.; BRANDES, E.W. (Eds.). **Agriculture Handbook: sugarcane (*Saccharum officinarum* L.)**. [s.l.], 1958. p. 1-35.

BRIDGE, P.; SPOONER, B. Soil fungi: diversity and detection. **Plant and Soil**, The Hague, v. 232, p. 147-154, 2001.

BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection**, Berlin, v. 105, p. 329-348, 1998.

CARVALHO, L.C.C. **Liquid biofuels in Brazil**. São Paulo: UNICA, 2002.

CERKAUSKAS, R.F. Latent colonization by *Colletotrichum* spp.: epidemiological considerations and implications for mycoherbicides. **Canadian Journal of Plant Pathology**, [s.l.], v. 10, p. 297-310, 1988.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKA, E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 4951-4959, 2005.

COMPANT, S.; REITER, B.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; AIT-BARKA, E. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1685-1693, 2004.

CROWHURST, R.N.; HAWTHORNE, B.T.; RIKKERINK, E.H.A.; TEMPLETON, M.D. Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race-1 and race-2 by random amplification of polymorphic DNA. **Current Genetics**, New York, v. 20, p. 391-396, 1991.

DA SILVA, K.R.A.; SALLES, J.F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D. Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 54, p. 213-231, 2003.

DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ D.I. **Sugarcane Improvement through Breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 7-84.

DE OLIVEIRA, I.A.; VASCONCELLOS, M.J.; SELDIN, L.; PAIVA, E.; VARGAS, M.A.; DE SA, N.M.H. Random amplified polymorphic DNA analysis of effective *Rhizobium* sp associated with beans cultivated in Brazilian cerrado soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 31, p. 39-44, 2000.

DIVAN-BALDANI, V.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, p. 485-491, 2000.

DOLKEN, L.; SCHULER, F.; DOLKEN, G. Quantitative detection of t (14;18)-positive cells by real-time quantitative PCR using fluorogenic probes. **Biotechniques**, London, v. 25, p. 1058-1064, 1998.

DONEGAN, K.K.; PALM, C.J.; FIELAND, V.J.; PORTEOUS, L.A.; GANIO, L.M.; SCHALLER, D.L.; BUCAO, L.Q.; SEIDLER, R.J. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil-microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 2, p. 111-124, 1995.

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.

ERLAND, S.; HENRION, B.; MARTIN, F.; GLOVER, L.A.; ALEXANDER, I.J. Identification of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tylospora fibrillosa* donk by RFLP analysis of the PCR-amplified ITS and IGS regions of ribosomal DNA. **New Phytologist**, London, v. 126, p. 525-532, 1994.

ESTRADA-DE-LOS-SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2790-2798, 2001.

ESTRADA-DE-LOS-SANTOS, P.; MAVINGUI, P.; COURNOYER, B.; FONTAINE, F.; BALANDREAU, J.; CABALLERO-MELLADO, J. A N₂-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 285-294, 2002.

FANI, R.; DAMIANI, G.; DISERIO, C.; GALLORI, E.; GRIFONI, A.; BAZZICALUPO, M. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for generating specific DNA probes for microorganisms. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 2, p. 243-250, 1993.

FENG, Y.; SHEN, D.; SONG, W. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS 19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, p. 938-945, 2006.

FIRAKOVA, S.; STURDIKOVA, M.; MUCKOVA, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia**, Bratislava, v. 62, p. 251-257, 2007.

FRANKLIN, R.B.; TAYLOR, D. R.; MILLS, A.L. Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 35, p. 225-235, 1999.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.A.; VAN ELSAS, J.D. Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 47, p. 51-64, 2004.

GARBEVA, P.; VOESENEK, K.; ELSAS, J.D. Quantitative detection and diversity of the pyrrolnitrin biosynthetic locus in soil under different treatments. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1453-1463, 2004.

GARDES, M.; BRUNS, T.D. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 74, p. 1572-1583, 1996.

GONCALVES, E.R.; ROSATO, Y.B. Genotypic characterization of xanthomonad strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, p. 811-821, 2000.

GRIVET, L.; DANIELS, C.; GLASZMANN, J.C.; D'HONT, A. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. **Ethnobotany Research and Applications**, [s.l.], v. 2, p. 9-17, 2004.

HAAPALAINEN, M.L.; KOBETS, N.; PIRUZIAN, E.; METZLER, M.C. Integrative vector for stable transformation and expression of a β -1,3-glucanase gene in *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 162, p. 1-7, 1998.

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

HAUGLAND, R.A.; BRINKMAN, N.; VESPER, S.J. Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 50, p. 319-323, 2002.

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

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 6, p. 986-994, 1996.

HELANDER, M.L.; RANTIO-LEHTIMÄKI, A. Effects of watering and simulated acid rain on quantity of phyllosphere fungi of birch leaves. **Microbial Ecology**, New York, v. 19, p. 119-125, 1990.

HENSON, J.M.; FRENCH, R. The polymerase chain-reaction and plant-disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 81-109, 1993.

HEUER, H.; KROPPESTEDT, 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.

HEUER, H.; SMALLA, K. Evaluation of community-level catabolic profiling using BIOLOG GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 30, p. 49-61, 1997.

HEUER, H.; SMALLA, K. Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme-producing transgenic variants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 28, p. 357-371, 1999.

HEUSER, T.; ZIMMER, W. Quantitative analysis of phytopathogenic ascomycota on leaves of pedunculate oaks (*Quercus robur* L.) by real-time PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 209, p. 295-299, 2002.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Bio/Technology**, New York, v. 11, p. 1026-1030, 1993.

INIGUEZ, A.L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E.W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, p. 1078-1085, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores de produtividade nacional. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 12 mar. 2007.

JAROSZ, A.M.; DAVELOS, A.L. Effects of disease in wild plant-populations and the evolution of pathogen aggressiveness. **New Phytologist**, London, v. 129, p. 371-387, 1995.

JOHNSTON, C.G.; AUST, S.D. Detection of phanerochaete-chrysosporium in soil by PCR and restriction enzyme analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 2350-2354, 1994.

JORGENSEN, R.A.; CLUSTER, P.D. Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA - new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 75, p. 1238-1247, 1988.

KARTHIKEYAN, M.; BHASKARAN, R.; RADHIKA, K.; MATHIYAZHAGAN, S.; JAYAKUMAR, V.; SANDOSSKUMAR, R.; VELAZHAHAN, R. Endophytic *Pseudomonas fluorescens* Endo2 and Endo35 induce resistance in black gram (*Vigna mungo* L. Hepper) to the pathogen *Macrophomina phaseolina*. **Journal of Plant Interactions**, Abingdon, v. 1, p. 135-143, 2005.

KAVINO, M.; HARISH, S.; KUMAR, N.; SARAVANAKUMAR, D.; DAMODARAN, T.; SOORIANATHASUNDARAM, K.; SAMIYAPPAN, R. Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top virus. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1087-1098, 2007.

KELLY, A.; ALCALAJIMENEZ, A.R.; BAINBRIDGE, B.W.; HEALE, J.B.; PEREZARTES, E.; JIMENEZDIAZ, R.M. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, p. 1293-1298, 1994.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J.R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 5, p. 408, 1995.

KOWALCHUK, G.A.; GERARDS, S.; WOLDENDORP, J.W. Detection and characterization of fungal infections of *Ammophila arenaria* (marram grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3858-3865, 1997.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

KUNINAGA, S.; NATSUAKI, T.; TAKEUCHI, T.; YOKOSAWA, R. Sequence variation of the rDNA ITS regions within and between anastomosis groups in *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**, New York, v. 32, p. 237-243, 1997.

LANDEWEERT, R.; LEEFLANG, P.; KUYPER, T.W.; HOFFLAND, E.; ROSLING, A.; WERNARS, K.; SMIT, E. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 327-333, 2003.

LARENA, I.; SALAZAR, O.; GONZALEZ, V.; JULIAN, M.C.; RUBIO, V. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 75, p. 187-194, 1999.

LEE, S.B.; TAYLOR, J.W. Phylogeny of 5 Fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 9, p. 636-653, 1992.

LEROY, T.; HENRY, A.M.; ROYER, M.; ALTOSAAR, I.; FRUTOS, R.; DURIS, D.; PHILIPPE, R. Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis cryIAC* gene for resistance to leaf miner. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 19, p. 382-385, 2000.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; DER LELIE, D. Endophytic Bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 21, p. 583-606, 2002.

LOIRET, F.G.; ORTEGA, E.; KLEINER, D.; ORTEGA-RODES, P.; RODES, R.; DONG, Z.A. putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, p. 504-511, 2004.

LOTTMANN, J.; HEUER, H.; SMALLA, K.; BERG, G. Influence of transgenic T4-lysozyme-producing potato plants on potentially beneficial plant-associated bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 365-377, 1999.

LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

LU, Y. H.; D'HONT, A.; WALKER, D.I.T.; RAO, P.S.; FELDMANN, P.; GLASZMANN, J.C. Relationships among ancestral species of sugarcane revealed with RFLP using single copy maize nuclear probes. **Euphytica**, Dordrecht, v. 78, p. 7-18, 1994.

LUSSO, M.; KUC, J. The effect of sense and antisense expression of the PR-N gene for beta-1,3-glucanase on disease resistance of tobacco to fungi and viruses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, p. 267-283, 1996.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SENTHILKUMAR, M.; SESHADRI, S.; CHUNG, H.Y.; YANG, J.C.; SUNDARAM, S.; SA, T.M. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Nankang, v. 45, p. 315-324, 2004.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.E.; LIEBEREI, R. Arbuscular mycorrhizal infection changes the bacterial 16S rDNA community composition in the rhizosphere of maize. **Mycorrhiza**, Berlin, v. 11, p. 297-302, 2001.

MARSCHNER, P.; KANDELER, E.; MARSCHNER, B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 35, p. 453-461, 2003.

MARTIN, F.; CLIQUET, J.B.; STEWART, G. Nitrogen acquisition and assimilation in mycorrhizal symbioses. In: LEA, P.; MOROT-GAUDRY, J.F. (Eds.) **The Assimilation of Nitrogen in Plants**. Paris: Springer, 2001. p. 147-166.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation Effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, New York, v. 51, p. 326-335, 2006.

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

MERCIER, J.; JIMENEZ, J.I. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 31, p. 1-8, 2004.

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**, The Hague, v. 266, p. 23-39, 2004.

MORRISON, T.B.; WEIS, J.J.; WITTWER, C.T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. **Biotechniques**, London, v. 6, p. 954-958, 1998.

MUYZER, G.; DEWAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 73, p. 127-141, 1998.

MYERS, R.M.; FISCHER, S.G.; LERMAN, L.S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel-electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 13, p. 3131-3145, 1985.

MYERS, R.M.; MANIATIS, T.; LERMAN, L.S. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel-electrophoresis. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, p. 501-527, 1987.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 06 nov. 2007.

NAZAR, R.N.; HU, X.; SCHMIDT, J.; CULHAM, D.; ROBB, J. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 39, p. 1-11, 1991.

NIDA, D.L.; KOLACZ, K.H.; BUEHLER, R.E.; DEATON, W.R.; SCHULER, W.R.; ARMSTRONG, T.A.; TAYLOR, M.L.; EBERT, C.C.; ROGAN, G.J.; PADGETTE, S.R. Glyphosate-tolerant cotton: genetic characterization and protein expression. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, p. 1960-1966, 1996.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 242, p. 205-215, 2002.

PACE, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, Washington, v. 276, p. 734-740, 1997.

PADGETTE, S.R.; KOLACZ, K.H.; DELANNAY, X.; RE, D.B.; LAVALLEE, B.J.; TINIUS, C.N.; RHODES, W.K.; OTERO, Y.I.; BARRY, G.F.; EICHHOLTZ, D.A. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. **Crop science**, Madison, v. 35, p. 1451-1461, 1995.

PAN, M.J.; RADEMAN, S.; KUNERT, K.; HASTINGS, J.W. Ultrastructural studies on the colonization of banana tissue and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 by the endophytic bacterium *Burkholderia cepacia*. **Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 145, p. 479-486, 1997.

PENNANEN, T.; PAAVOLAINEN, L.; HANTULA, J. Rapid PCR-based method for the direct analysis of fungal communities in complex environmental samples. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 697-699, 2001.

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

PROSSER, J.I.; BOHANNAN, B.J.M.; CURTIS, T.P.; ELLIS, R.J.; FIRESTONE, M.K.; FRECKLETON, R.P.; GREEN, J.L.; KILLHAM, K.; LENNON, J.J.; OSBORN, A.M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C.J.; YOUNG, J.P. Essay - the role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, p. 384-392, 2007.

QUADTHALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 254-259, 1997.

QUADTHALLMANN, A.; KLOEPPER, J.W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 1144-1154, 1996.

RADEMAKER, J.L.W.; LOUWS, F.J.; DE BRUIJN, F.J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting, In: AKKERMANS, A.D.L.; ELSAS, J.D.; BRUIJN, F.J. (Eds.). **Molecular microbial ecology manual**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 3.4. 3: 1-3.4. 3: 27.

REDLIN, S.C.; CARRIS, L.M. **Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology, and evolution**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1996. 223 p.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R.; KIM, Y.O. Conferring stress tolerance and yield enhancement to crops via symbiosis as a strategy for diminishing regulatory processes. **Entomological Research**, Seoul, v. 37, p. A73, 2007.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, p. 827-837, 2006.

SALLES, J.F.; DE SOUZA, F.A.; VAN ELSAS, J.D. Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1595-1603, 2002.

SCHAAD, N.W.; FREDERICK, R.D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. **Canadian Journal of Plant Pathology**, [s.l.], v. 24, p. 250-258, 2002.

SEMIGHINI, C.P.; MARINS, M.; GOLDMAN, M.H.S.; GOLDMAN, G.H. Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter *atr* genes in *Aspergillus nidulans* by real-time reverse transcription-PCR assay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1351-1357, 2002.

SESSITSCH, A.; COENYE, T.; STURZ, A.V.; VANDAMME, P.; BARKA, E.A.; SALLES, J.F.; VAN ELSAS, J.D.; FAURE, D.; REITER, B.; GLICK, B.R. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1187-1192, 2005.

SESSITSCH, A.; HOWIESON, J.G.; PERRET, X.; ANTOUN, H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Advances in *Rhizobium* research. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 21, p. 323-378, 2002.

SHANER, D.L.; ANDERSON, P.C.; STIDHAM, M.A. Imidazolinones potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 76, p. 545-546, 1984.

SHARMA, V.K.; NOWAK, J. Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by in vitro co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 528-536, 1998.

SIGLER, W.V.; TURCO, R.F. The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 21, p. 107-118, 2002.

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.

SODERBERG, K.H.; OLSSON, P.A.; BAATH, E. Structure and activity of the bacterial community in the rhizosphere of different plant species and the effect of arbuscular mycorrhizal colonisation. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 40, p. 223-231, 2002.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, p. 491-502, 2003.

STROBEL, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, p. 535-544, 2003.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; MATHESON, B.G. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 162-167, 1998.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 19, p. 1-30, 2000.

SZMRECSÁNYI, T.; MOREIRA, E.P. O desenvolvimento da agroindústria canavieira do Brasil desde a Segunda Guerra Mundial. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 5, p. 57-79, 1991.

TABACCHIONI, S.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; CHIARINI, L. *Burkholderia cepacia* complex in the rhizosphere: a minireview. **Annals of Microbiology**, Milano, v. 52, p. 103-117, 2002.

TAN, S.; EVANS, R.R.; DAHMER, M.L.; SINGH, B.K.; SHANER, D.L. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 61, p. 246-257, 2005.

TATLI, F.; GULLU, M.; OZDEMIR, F. Determination of fungi species, relationship between ear infection rates and fumonisin quantities in Bt maize. **IOBC WPRS BULLETIN**, [s.l.], v. 27, p. 161-164, 2004.

THIRUP, L.; JOHNSEN, K.; TORSVIK, V.; SPLIID, N.H.; JACOBSEN, C.S. Effects of fenpropimorph on bacteria and fungi during decomposition of barley roots. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1517-1524, 2001.

THORN, G. The fungi in soil. In: ELSAS, J.D.; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E.M.H. **Modern Soil Microbiology**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 63-127.

VAINIO, E.J.; HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 927-936, 2000.

VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; KLIRONOMOS, J.N.; URSIC, M.; MOUTOGLIS, P.; STREITWOLF-ENGEL, R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I.R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. **Nature**, London, v. 396, p. 69-72, 1998.

VAN ELSAS, J.D.; DUARTE, G.F.; KEIJZER-WOLTERS, A.; SMIT, E. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 43, p. 133-151, 2000.

VANDECASTEELE, S.J.; PEETERMANS, W.E.; MERCKX, R.; VAN ELDERE, J. Quantification of expression of *Staphylococcus epidermidis* housekeeping genes with Taqman quantitative PCR during in vitro growth and under different conditions. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 183, p. 7094-7101, 2001.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WHITE JR., J.F.; COLE, G.T. Endophyte-host associations in forage grasses. III. In vitro inhibition of fungi by *Acremonium coenophialum*. **Mycologia**, New York, v. 77, p. 487-489, 1985.

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. (Eds.). **PCR protocols: A guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322

WIDMER, F.; SEIDLER, R.J.; GILLEMET, P.M.; WATRUD, L.S.; DI GIOVANNI, G.D. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 2545-2553, 1998.

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

WILMOTTE, A.; VANDEPEER, Y.; GORIS, A.; CHAPELLE, S.; DEBAERE, R.; NELISSEN, B.; NEEFS, J.M.; HENNEBERT, G.L.; DEWACHTER, R. Evolutionary relationships among higher fungi inferred from small ribosomal-subunit RNA sequence-analysis. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 16, p. 436-444, 1993.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, p. 221-271, 1987.

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

XUE, B.; GOODWIN, P.H.; ANNIS, S.L. Pathotype identification of *Leptosphaeria maculans* with PCR and oligonucleotide primers from ribosomal internal transcribed spacer sequences. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, p. 179-188, 1992.

YUAN, J.I.; JIAN-NAN, B.I.; BING, Y.A.N.; XU-DONG, Z.H.U. Taxol-producing fungi: a new approach to industrial production of taxol. **Chinese Journal of Biotechnology**, New York, v. 22, p. 1-6, 2006.

ZHANG, H.W.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, London, v. 23, p. 753-771, 2006.

2 DIVERSIDADE DA COMUNIDADE FÚNGICA ASSOCIADA À CANA-DE-AÇÚCAR GENETICAMENTE MODIFICADA E INTERAÇÃO ENTRE *Fusarium moniliforme*, ENDOFÍTICO E PATOGÊNICO, E O HOSPEDEIRO

Resumo

Fungos foram sistematicamente isolados da rizosfera e do interior de folhas e raízes de cana-de-açúcar geneticamente modificada para a resistência ao herbicida imazapir e de sua isolinha convencional cultivadas em campo experimental no Brasil. A transgenia ou trato cultural empregado no cultivo da cana-de-açúcar transgênica não afetaram o número total de fungos recuperados nos diferentes tratamentos avaliados ou a ocorrência de grupos morfológicos. Adicionalmente a comunidade foi acessada de maneira independente de cultivo na rizosfera por PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) e os resultados confirmaram a inexistência de efeitos da transgenia sobre a comunidade de fungos. Isolados representantes dos diferentes grupos morfológicos foram identificados por sequenciamento das regiões ITS do rDNA, o qual revelou a composição desta comunidade associada à cana-de-açúcar. Os principais gêneros encontrados foram: *Alternaria*, *Ampelomyces*, *Aspergillus*, *Cladophialophora*, *Cladosporium*, *Cochliobolus*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Hypochnicium*, *Hypocreales*, *Mariannaea*, *Paraphaeosphaeria*, *Penicillium*, *Saccharicola*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Trichoderma* e *Xylaria*. Considerando a alta frequência de isolamento do gênero *Fusarium* como endófito e a possibilidade da espécie *F. moniliforme* se associar à cana-de-açúcar como um patógeno; isolados desta espécie foram caracterizados geneticamente e a expressão de dois genes da endo-poligalacturonase, *pgI* e *pgIII*, foi avaliada em um isolado endófito e em um isolado patogênico de *F. moniliforme*. Os resultados obtidos sugerem que diferentes níveis de transcrição do gene *pgIII* podem desempenhar importante papel na determinação do comportamento endofítico ou patogênico do fungo na associação com a cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Comunidades fúngicas; *Fusarium moniliforme*; ITS rDNA; DGGE; qPCR

DIVERSITY OF FUNGAL COMMUNITY ASSOCIATED WITH GENETICALLY MODIFIED SUGARCANE AND INTERACTION BETWEEN *Fusarium moniliforme*, ENDOPHYTIC AND PATHOGENIC STRAIN, AND THE HOST

Abstract

Fungi were isolated from the rhizosphere and from inside the roots and leaves of genetically modified sugarcane plants resistant to imazapyr and from its non-transgenic isolate grown in the field in Brazil. Neither transgeny nor crop management affected the total frequency of fungi recovered from different evaluated treatments nor does morphological group occurrence. Moreover, the microbial community was accessed by cultivation independent methodology in the rhizosphere by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis, and the results confirmed the non-effect of sugarcane transgeny upon fungal community. Isolates representing morphological groups were subjected to ITS rDNA regions sequencing, which revealed that the main genera associated with sugarcane are: *Alternaria*, *Ampelomyces*, *Aspergillus*, *Cladophialophora*, *Cladosporium*, *Cochliobolus*, *Cunninghamella*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Hypochnicium*, *Hypocreales*, *Mariannaea*, *Paraphaeosphaeria*, *Penicillium*, *Saccharicola*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Trichoderma* e *Xylaria*. Considering the high incidence of the genus *Fusarium* colonizing endophytically the sugarcane as well as the possibility of *F. moniliforme* to act as a pathogen; several *F. moniliforme* isolates were genetic characterized and two endo-polygalacturonase genes, *pgI* and *pgIII*, were evaluated in a endophytic and in a pathogenic strain of *F. moniliforme*. The obtained results suggest that different *pgIII* transcriptions levels can be related to determine the fungal endophytic or pathogenic behavior in association with sugarcane.

Keywords: Fungal communities; *Fusarium moniliforme*; ITS rDNA; DGGE; qPCR

2.1 Introdução

“O God, I could be bounded in a nutshell, and count myself a king of infinite space - were it not that I have bad dreams.”

(Hamlet, ato II, cena 2 | **Shakespeare**)

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas do Brasil e nos últimos anos está recebendo especial atenção devido ao crescente aumento da área cultivada e produção de etanol para uso como biocombustível. O cultivo de cana-de-açúcar no Brasil é primariamente utilizado para a obtenção de açúcar e álcool, e a produção total influencia o mercado internacional desses produtos. A importância econômica da cultura, aliada à possibilidade da utilização de variedades geneticamente modificadas no Brasil, faz da cana-de-açúcar alvo de discussões sociais e de sustentabilidade. Nesse contexto, o impacto ambiental e o aumento na produção da cana-de-açúcar tornam-se um importante foco na pesquisa tecnológica atual.

Estudos realizados para se avaliar o efeito de plantas geneticamente modificadas sobre a comunidade microbiana associada ainda são limitados nas condições tropicais. Entretanto, pode ser aventada a hipótese de que plantas transgênicas afetam a comunidade microbiana associada, diretamente, por meio do efeito dos produtos dos genes nelas introduzidos, ou indiretamente, por meio da demanda de novas práticas culturais, como o aumento da utilização de um determinado herbicida. Neste aspecto, a contagem total da comunidade fúngica de solo associada às plantas de algodão geneticamente modificadas expressando a endotoxina de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, apresentou um aumento transiente em relação à sua isolinha convencional (DONEGAN et al., 1995). Em outro estudo, foi observado que tabaco geneticamente modificado, expressando β -1,3-glicanase, mostrou-se resistente a *Peronospora tabacina* e *Phytophthora parasitica* var. *nicotiana*. (LUSSO; KUC, 1996), revelando o efeito direto da transgenia sobre fungos patogênicos. Conseqüentemente, a alteração da frequência de determinados grupos de fungos associados à cana-de-açúcar, como por exemplo, patógenos e endófitos, pode levar a um desequilíbrio e favorecer a ocorrência de doenças.

A Pokkah boeng, causada pelo fungo *Fusarium moniliforme*, é uma doença espalhada pelas áreas de cultivo de cana-de-açúcar ao redor do mundo, embora não seja uma das doenças mais importantes nos campos brasileiros, essa doença pode causar significantes quedas de

produção e perdas econômicas nos cultivos comerciais (RAID, 1998). A interação entre patógenos e plantas no ambiente é bem complexa, e o fato de se encontrar um fungo causando infecções sintomáticas e endofíticas em um mesmo campo não é bem entendido (BACON; HINTON, 1996). Dessa forma, considerando que vários fatores podem influenciar essa interação (BACON; HINTON, 1996; YATES; BACON; HINTON, 1997; OREN et al., 2003), a expressão de genes relacionados à patogênese pode desempenhar um importante papel na determinação do tipo de associação. Genes relacionados à patogênese, como poligalacturonases, desempenham importante papel durante o processo de infecção (KAHMANN; BASSE, 2001), assim, no presente estudo, a transcrição dos genes *pgI* (CAPRARI et al., 1993b) e *pgIII* (SELLA et al., 2004) foi avaliada durante o processo de infecção da cana-de-açúcar por *F. moniliforme*.

Neste estudo, fungos foram isolados da rizosfera e do interior de folhas e raízes de cana-de-açúcar cultivadas em campo experimental em Piracicaba, Brasil. O trabalho focou na descrição da diversidade e possível detecção da alteração da comunidade de fungos causada pela transgenia durante o cultivo da cana-de-açúcar por isolamento e PCR-*denaturing gradient gel electrophoresis* (PCR-DGGE). Adicionalmente, a interação entre isolados de *F. moniliforme*, endofítico e patogênico, e a cana-de-açúcar foi estudada por microscopia de luz e análise da expressão de genes relacionados à patogênese por PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Ainda é importante destacar que um estudo considerando os possíveis efeitos da transgenia da cana-de-açúcar sobre a comunidade de fungos endofíticos e a descrição da diversidade da comunidade fúngica associada a essa cultura de importância comercial não havia sido realizada anteriormente.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Materiais e métodos

2.2.1.1 Material vegetal, desenho experimental e épocas de isolamento

Para o isolamento de fungos da rizosfera e endofíticos de folha e raiz, plantas de cana-de-açúcar foram cultivadas na área experimental do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba, SP, Brasil (22° 41' S e 47° 33' O) sob a supervisão do Dr. Eugênio César Ulian. Este

experimento permitiu a comparação da variedade convencional, SP80-1842, e sua isolinha transgênica, IMI-1, em três diferentes estágios durante o desenvolvimento da cana-de-açúcar no campo, dessa forma os isolamentos foram feitos 03 (01/07/2004), 10 (16/02/2005) e 18 (29/09/2005) meses após plantio (map), o qual foi realizado em 02/04/2005. O experimento foi delineado em blocos casualizados em um total de 12 parcelas, considerando 4 réplicas dos seguintes tratamentos: variedade SP80-1842 conduzida com capina para o controle de plantas daninhas (C); variedade IMI-1 conduzida com capina para o controle de plantas daninhas (TC); e variedade IMI-1 conduzida com o herbicida imazapir para o controle de plantas daninhas (TH). O delineamento experimental permitiu o isolamento do efeito da transgenia (comparação variedade convencional *vs.* variedade transgênica) e do trato cultural (comparação capina *vs.* aplicação do herbicida imazapir). Em cada estágio avaliado foram amostradas aleatoriamente três plantas de cada parcela e a representação gráfica da área experimental pode ser observada na Figura 2.1.

2.2.1.2 Isolamento de fungos, condições de cultivo e análise estatística

Os fungos da rizosfera e endofíticos de raiz foram isolados de material coletado a uma profundidade de 5 a 15 cm da base do colmo e endófitos de folha foram isolados ao longo de folhas novas e velhas coletadas de plantas de cana-de-açúcar nos três estágios avaliados. Os segmentos de raiz foram lavados em água corrente para a remoção de partículas de solo aderidas ao sistema radicular. Os fungos da rizosfera foram isolados por meio de agitação de 5 g de solo rizosférico em 50 mL de tampão PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,5 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM [pH 7.4]) por 1 h seguida de semeadura de diluições adequadas em meio batata dextrose agar (BDA, Merk) suplementado com 50 µg mL⁻¹ do antibiótico tetraciclina, para impedir o crescimento de bactérias. Para o isolamento de endófitos de raiz e folha de cana-de-açúcar, segmentos de tecido vegetal lavados foram desinfetados superficialmente, seguindo uma sequência de imersões em etanol 70% por 1 min, hipoclorito de sódio (2% v/v) acrescido de Tween 20 (1 mL L⁻¹) por 2 min, etanol 70% por 30 s, e duas lavagens com água destilada autoclavada. A desinfecção superficial foi verificada pela semeadura, em meio BDA, de alíquotas (100 µL) da água destilada utilizada na última lavagem. Após processados, os tecidos vegetais foram cortados em pequenos fragmentos de aproximadamente 50 mm² de área para folha e 5 mm

Figura 2.1 – Delineamento experimental conduzido na área do Centro de Tecnologia Canaveieira em Piracicaba, SP. Foram consideradas 4 réplicas (blocos) dos 3 tratamentos: C (variedade convencional manejada com capina); TC (isolinha transgênica manejada com capina); e TH (isolinha transgênica manejada com herbicida). A distribuição dos tratamentos, blocos e parcelas na área experimental, bem como as dimensões das parcelas estão indicadas. Plantas foram amostradas sistematicamente nas parcelas considerando bordadura

de comprimento para raiz, e 10 fragmentos vegetais foram transferidos para cada placa de Petri contendo meio BDA suplementado com tetraciclina. As placas foram incubadas a 28°C e acompanhadas periodicamente durante o crescimento dos fungos.

Adicionalmente, foram obtidos isolados a partir de sintomas da doença Pokkah boeng para serem incluídos na caracterização genética de isolados do gênero *Fusarium*, para isso, tecidos de cana-de-açúcar, apresentando sintomas característicos da doença, foram imersos em solução de etanol 70% por 30 s e lavados em água esterilizada, após, fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo BDA e posteriormente incubados a 28°C.

Para a purificação das colônias, esporos e/ou micélios foram transferidos para tubo de 2 mL contendo 1 mL de solução de salina (NaCl 150 mM) e intensamente agitado em Vortex. Aliquotas de 100 µL das diluições 10^{-5} e 10^{-6} foram semeadas em meio BDA e incubadas a 28°C. As colônias isoladas foram armazenadas de acordo com o método Castellani (CASTELLANI, 1967) no qual os fungos foram crescidos em meio BDA, e então discos de meio de cultura com

micélios foram transferidos para frascos de vidro de 10 mL contendo água esterilizada. Os frascos foram hermeticamente fechados, identificados e armazenados à temperatura ambiente.

A análise estatística dos dados de frequência de isolamento foi feita com o auxílio do programa SAS - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. Para a análise de variância em fatorial foram consideradas as médias das frequências de isolamento. Para os dados de fungos endofíticos, foi calculada a frequência de isolamento pela razão entre o número de unidades formadoras de colônias (UFC) e o número de fragmentos de folha ou raiz; sendo UFC fragmento⁻¹. Para a análise dos dados de fungos da rizosfera, foi calculada a frequência de isolamento pela razão entre o número de UFC e o peso de solo rizosférico utilizado para o isolamento, indicado como UFC g de rizosfera⁻¹.

2.2.1.3 Identificação molecular dos fungos isolados de cana-de-açúcar

A identificação molecular dos fungos associados à cana-de-açúcar foi feita por meio da extração de DNA genômico total dos isolados, amplificação e seqüenciamento das regiões ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA e análise das seqüências em banco de dados. Para a extração do DNA genômico total, os isolados purificados cresceram em 50 mL de BDA líquido (caldo de 200 g de batata e 20 g de dextrose em 1 L de água) por 5 dias a 28°C. A suspensão fúngica foi filtrada e o micélio foi macerado em nitrogênio líquido usando pistilo e cadinho de porcelana. Aproximadamente 200 mg do macerado foi transferido para 1 mL de tampão de extração (SDS 1%, EDTA 25 mM, NaCl 250 mM e Tris-HCl 200 mM [pH 8,0]), incubado por 20 min a 65°C e centrifugado a 15800X g (Centrifuge 5402, Eppendorf) por 10 min a 4°C. O sobrenadante (~800 µl) foi transferido para tubo contendo 1 vol de fenol, homogeneizado e centrifugado por 5 min. O sobrenadante foi transferido para novo tubo contendo 1 vol de fenol:clorofórmio (1:1 vol/vol), homogeneizado e centrifugado. O sobrenadante foi transferido para tubo com 1 vol de clorofórmio, homogeneizado e centrifugado. Para a precipitação do DNA, o sobrenadante foi novamente coletado, transferido para novo tubo e adicionado 0,6 vol de isopropanol, então, o tubo foi homogeneizado e incubado por 5 min à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada por 15 min e o sobrenadante descartado. O precipitado de DNA foi lavado com 500 µl de etanol 80%, centrifugado, o etanol foi descartado e o precipitado seco a 37°C. Finalmente, o DNA foi ressuspendido em 50 µl de água ultra-pura (Milli-Q) autoclavada. O DNA genômico

total foi quantificado por meio de comparação com marcador DNA do fago λ (Invitrogen), em gel de agarose 0,8% a 3 V cm^{-1} , e estocado a -20°C .

Para a amplificação e seqüenciamento das regiões ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA, o DNA dos isolados fúngicos foi amplificado em termociclador Perkin-Elmer GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystem), programado para realizar uma desnaturação inicial por 5 min a 94°C , seguido de 24 ciclos de 30 s a 94°C , 30 s a 55°C e 30 s a 72°C ; após os ciclos, uma extensão final de 7 min a 72°C . O par de *primers* utilizado para a amplificação foi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990), os quais anelam, respectivamente, em posições específicas do 18S e 28S do rDNA. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 μl , contendo tampão 1X (KCl 50mM, Tris-HCl 20 mM [pH 8,4]), MgCl_2 3,7 mM, dNTP 1 mM (de cada), Taq DNA polimerase 0,05 U μl^{-1} (Invitrogen), 0,4 μM de cada *primer* (ITS1 e ITS4) e, aproximadamente, 3 ng de DNA. O produto da PCR 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 (Invitrogen). O gel foi corado em solução de brometo de etídio e fotodocumentado em luz UV. Posteriormente, os produtos da PCR foram purificados com os kits GFX PCR (Amersham Pharmacia Biotech) ou ChargeSwitch[®] PCR Clean-Up (Invitrogen) de acordo com as recomendações dos fabricantes. As amostras purificadas foram enviadas para o seqüenciamento pelo Dr. Ricardo Harakava no Instituto Biológico, São Paulo, SP, ou pela Dra. Siu Mui Tsai no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, SP.

Para a identificação das seqüências, foi feita uma análise comparativa no banco de dados por meio do *basic local alignment search tool* (BLAST) no NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION), o qual utiliza o método heurístico para encontrar o melhor *score* de alinhamentos locais entre a seqüência submetida e o banco de dados. Dessa forma, para a identificação foram consideradas as seqüências de linhagens bem caracterizadas que apresentaram os mais altos valores de identidade com as seqüências submetidas.

2.2.1.4 Estudo filogenético dos isolados endofíticos com base nas seqüências das regiões ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA

A árvore filogenética foi construída com base nas regiões ITS e 5,8S do rDNA obtidas no seqüenciamento (~530 pb). Para o alinhamento das seqüências selecionadas foi utilizado o programa Clustal_X 1.8 (THOMPSON et al., 1997). Em seguida, as seqüências foram editadas para que todas apresentassem o mesmo número de caracteres, essa edição foi realizada no programa BioEdit v5.0.9 copyright (c) 1997-2001, Tom Hall, North Carolina State University. A árvore consenso foi construída pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987) considerando um *bootstrap* com 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1985). As distâncias foram computadas com base no método de substituições de Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980). A análise filogenética foi construída com uso do programa MEGA4 (TAMURA et al., 2007).

2.2.1.5 Caracterização genotípica de isolados do gênero *Fusarium*

Isolados do gênero *Fusarium* foram caracterizados genotipicamente pela técnica de *random amplified polymorphic DNA* (RAPD), na qual regiões do DNA genômico foram amplificadas em termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial por 4 min a 92°C, seguida de 40 ciclos de 1 min 92 °C, 1 min a 37°C e 2 min a 72°C; após os ciclos, uma extensão final de 3 min a 72°C. Para a RAPD foram selecionados *primers* do kit RAPD® 10mer (Operon) (www.operon.com) que geraram polimorfismo nos isolados avaliados, sendo: (1) AX-08 (5'-AGTATGGCGG-3'); (2) AX-18 (5'-GTGTGCAGTG-3'); (3) P-12 (5'-AAGGGCGAGT-3'); (4) X-04 (5'-CCGCTACCGA-3'); (5) X-12 (5'-TCGCCAGCCA-3'); e (6) X-14 (5'-ACAG GTGCTG-3'). A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 30 µl, contendo tampão 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 20mM [pH 8,4]), MgCl₂ 4 mM, dNTP 0,25 mM (de cada), Taq DNA polimerase 0,05 U µl⁻¹ (Invitrogen), 0,4 µM de *primer* e, aproximadamente, 3 ng de DNA. O produto da PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,4% a 3 V cm⁻¹, juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). Após a eletroforese o gel foi corado em solução de brometo de etídio e fotodocumentado em luz UV.

Os perfis de bandas obtidos pela RAPD foram transformados em variáveis binárias, ou seja, o número 1 significou presença de banda e o número 0 ausência de banda. A matriz

resultante, constituída pelos perfis de cada um dos seis *primers* utilizados, foi analisada pelo programa NTSYSpc 2.01e Copyright (c) 1986-1997 (Applied Biostatistics Inc.), no qual foi calculada a matriz de similaridade por meio do coeficiente de Jaccard. O programa utilizou os dados da matriz de similaridade para a construção do dendrograma pelo método UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetical average*) de agrupamento hierárquico. Os valores de *bootstrap* foram calculados por meio do programa Winboot Bootstrapping for Binary Data PHYLIP Copyright © 1986-1991, University of Washington e Joseph Felsenstein. O dendrograma agrupou os isolados do gênero *Fusarium* de acordo com o nível de similaridade genética entre eles.

2.2.1.6 Acesso à diversidade de fungos de maneira independente de cultivo por PCR-DGGE

O acesso à comunidade de fungos independentemente do isolamento e cultivo foi feito pela técnica de PCR-DGGE, na qual amostras de solo rizosférico tiveram o DNA total extraído e regiões do 18S rDNA de fungos amplificadas por PCR para análise em DGGE. Para a obtenção do DNA rizosférico total, 500 mg de solo rizosférico foram utilizados para a extração com o kit UltraClean™ Soil DNA Isolation (MoBio Laboratories, Inc.) de acordo com as recomendações do fabricante. A amplificação da região 18S rDNA de fungos foi realizada diretamente com os *primers* NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') e FR1 (5'-CGAACCATTCAATCGGTAIT-3') (VAINIO; HANTULA, 2000) que resultou em um produto de amplificação de aproximadamente 1650 pb. A amplificação foi conduzida em termociclador programado para uma desnaturação inicial por 8 min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 95°C, 45 s a 47°C e 3 min a 72°C; após os ciclos, uma extensão final de 10 min a 72 °C. O produto da PCR foi verificado, juntamente com marcador de peso molecular 1 kb (Fermentas), em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio e fotodocumentado em luz UV.

A análise em DGGE foi realizada no aparelho PhorU2 System (Ingeny). Foram preparadas as soluções estoque A (acrilamida 6% / uréia formamida 0%) e B (acrilamida [37:1 6% / uréia formamida 80%]) para a constituição de uma solução de alta concentração *H* (11,6 mL de A e 13,4 mL de B), e outra de baixa concentração *L* (17,2 mL de A e 7,8 mL de B). Para a polimerização do gel foram adicionados 150 µL de persulfato de amônio ((NH₄)₂S₂O₈) 10% e 12

μL de TEMED ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$) em cada uma das soluções, *H* e *L*. A mistura em gradiente, das soluções *H* e *L*, resultou em um gel com gradiente variando de 25 a 43% de desnaturação. O gel empilhador preparado para as canaletas foi constituído de 5 mL da solução *S* (acrilamida 8% / uréia formamida 0%) com adição de 25 μL de persulfato de amônio 10% e 7 μL de TEMED. Quinze μL de cada produto da PCR obtido com *primers* NS1 e FR1 foram aplicados no gel juntamente com Loading buffer 6X (azul de bromofenol 0,05%, sacarose 40%, EDTA 0,1 M [pH 8,0] e SDS 0,5%). A corrida foi a 58°C e 180 V por 18 h. Finalmente, o gel foi retirado e corado com SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen).

2.2.1.7 Histologia de folhas de cana-de-açúcar infectadas por *Fusarium moniliforme*

A avaliação da infecção de folhas de cana-de-açúcar pelo isolado endofítico FELS111, obtido a partir de folha de cana-de-açúcar, e a linhagem patogênica PB113 de *F. moniliforme*, cedida gentilmente pelo Dr. Álvaro Sangüino, do Setor de Fitopatologia do CTC, foi feita por observação em microscopia de luz. Segmentos de folha foram desinfetados superficialmente, seguindo uma lavagem seqüencial de etanol por 1 min, hipoclorito de sódio a 2% (vol/vol) de cloro ativo por 2 min, etanol por 1 min e duas lavagens em água esterilizada. Estes segmentos foram colocados em placas de Petri contendo discos de papel de filtro umedecidos com água esterilizada. Sobre o segmento foliar, em placas separadas, foi colocado um *plug* de BDA contendo micélio dos isolados fúngicos. As placas foram incubadas a 28°C por seis dias, até a observação dos sintomas causados pela linhagem patogênica (PB113). As amostras de lâmina foliar foram coletadas e fixadas em solução de glutaraldeído e de formaldeído (KARNOVSKY, 1965), seguida pela desidratação em série alcoólica composta das concentrações crescentes de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100% (vol/vol), permanecendo em cada uma por 10 min, e finalmente a inclusão em resina de hidroxietilmetacrilato (Leica-Historesin) de acordo com as recomendações do fabricante. Os blocos com as amostras foram cortados em seções longitudinais em micrótomo rotativo com aproximadamente 5 μm de espessura. As seções foram coloridas com azul de toluidina 0,05% (vol/vol) em tampão fosfato e ácido cítrico (SAKAI, 1973) e finalmente, foram montadas em lâminas histológicas com resina sintética (Entellan®). As lâminas histológicas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz Zeiss-Jenemed 2, com as imagens capturadas na mesma escala com câmera Samsung SDC-313.

2.2.1.8 Avaliação da expressão de genes de endo-poligalacturonase de *Fusarium moniliforme* durante a infecção de cana-de-açúcar

A avaliação da expressão dos genes da endo-poligalacturonase (PG) nos isolados endofítico e patogênico de *F. moniliforme* foi realizada por qPCR. Para isso, *primers* específicos foram desenhados para dois genes da PG, *pgI* e *pgIII*, e para o gene da β -tubulina (*β -tub*) que foi usado como controle endógeno. Dois experimentos foram conduzidos para a avaliação: no primeiro as linhagens, endofítica FELS111 e patogênica PB113, foram inoculadas separadamente em meio de cultivo líquido na presença ou ausência de extrato de folhas de cana-de-açúcar; e no segundo experimento plântulas axênicas de cana-de-açúcar foram infectadas pelas linhagens de *F. moniliforme* e avaliadas 48, 96 e 144 horas após inoculação (hai). Após a extração do RNA e síntese do cDNA a técnica da qPCR foi utilizada para quantificar o nível de transcrição dos genes nas diferentes condições avaliadas.

O desenho dos *primers* utilizados nos ensaios da qPCR, foi feito com base no alinhamento de seqüências (Clustal_X) dos genes *pgI*, *pgIII* e *β -tub* de *Fusarium* disponíveis no GenBank e utilização do programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Com o objetivo de eliminar a formação de dímeros de *primers* e otimizar a análise no sistema utilizando SYBR[®] Green (Invitrogen), foram considerados os seguintes parâmetros: produto de amplificação de 100 a 250 pb; *primer* com 20 (± 2) nucleotídeos; T_m de 60°C (± 1); conteúdo GC de 50% (± 5); e valor da auto-complementariedade 3' igual a zero. Os *primers* foram desenhados em regiões *exon* dos genes alvo, para a avaliação na condição expressa do gene. As características dos *primers* e seqüências usadas como referência podem ser observadas na Tabela 2.1.

No experimento conduzido em meio líquido, os fungos foram inoculados separadamente em 10 mL de meio YG (C₆H₁₂O₆ 2% e extrato de levedura 0,5%) e incubados por 24 h a 28°C. Posteriormente, o inóculo foi transferido para novo meio YG contendo ou não extrato de folha de cana-de-açúcar, obtido após trituração de 50 g de folha de cana-de-açúcar em 200 mL de água ultra-pura, e filtragem até microfiltro de 0,20 μ m de porosidade. Dessa forma, foram considerados quatro tratamentos com três repetições biológicas, sendo: 1) FELS111 em meio YG; 2) FELS111 em meio YG mais extrato; 3) PB113 em meio YG; e 4) PB113 em meio YG

Tabela 2.1 – Características dos *primers* utilizados para a amplificação e análise em qPCR

Gene	Primer (5' – 3')	Comp. (pb)	Produto (pb)	TM (°C)	GC (%)	Seq. Ref. ^a
<i>β-tub</i>	TCTCTGACACCGTCGTTGAG	20	202	60,02	55	U27303
	AAACGGAGACAGGTGGTGAC	20		60,01	55	
<i>pgI</i>	TTGCTCTCACCAACATCAGC	20	183	59,99	50	L02239
	CAGAGCAGCTACCATCACCA	20		60,01	55	
<i>pgIII</i>	ATAACAGCGACGGTTTCGAC	20	196	60,14	50	AJ699366
	TGAACACCATCGACGACATT	20		59,97	45	

^a Número de acesso no NCBI

mais extrato de folha de cana-de-açúcar. Os fungos nos diferentes tratamentos foram incubados em fotoperíodo de 16 h de luz dia⁻¹ a 28°C por 96 h e coletados para a extração do RNA. No segundo experimento, plântulas axênicas de cana-de-açúcar da variedade SP70-1143 crescidas em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) foram inoculadas separadamente com os isolados FELS111 e PB113 e incubadas em fotoperíodo de 16 h de luz dia⁻¹ a 28°C. As plântulas foram coletadas após 48, 96 e 144 h, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para posterior extração de RNA. Dessa forma, este experimento considerou dois tratamentos (infecção endofítica e patogênica), três momentos durante o desenvolvimento da infecção e três repetições biológicas.

A extração do RNA foi feita a partir do micélio do fungo coletado do cultivo em meio líquido no primeiro experimento e a partir das plântulas infectadas no segundo experimento. Aproximadamente 200 mg de material foi macerado em nitrogênio líquido e utilizado para a extração com 1 mL do reagente TRIzol® (Invitrogen) com uma modificação do protocolo indicado pelo fabricante, no qual foi adicionado 1 vol de solução precipitadora (C₆H₅Na₃O₇.2H₂O 0,8 M e NaCl 1,2 M) ao isopropanol durante a etapa de precipitação do RNA. Ao final, o RNA foi ressuspensionado em 40 µL de água tratada com dietil-piromcarbonato (DEPC) e estocado a -80°C. A integridade e quantificação do RNA extraído foram verificadas em gel desnaturante de agarose 1,2% em tampão FA 10X (MOPS 200 mM, acetato de sódio 50 mM e EDTA 10 mM), contendo formaldeído (0,7%) e brometo de etídio (0,3 µg mL⁻¹ de gel) e comparação com o marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). O gel foi equilibrado por 30 min em tampão FA 1X antes da

corrida e 4 µl da suspensão de RNA mais 1 µl de Loading buffer 5X foram aquecidos a 65°C por 5 min antes de serem aplicados no gel. Após a eletroforese o gel foi fotodocumentado em luz UV. O RNA também foi quantificado e teve sua pureza avaliada em análise por espectrofotômetro, considerando as fórmulas para cálculo da concentração (1) e pureza (2).

$$\text{Concentração } [\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}] = \frac{A_{260} \times 40 \times \text{diluição}}{1000} \quad (1)$$

$$\text{Pureza} = \frac{A_{260}}{A_{280} (\text{amostra}) - A_{280} (\text{branco})} \quad (2)$$

A síntese do cDNA a partir do RNA foi realizada com 4 µg do RNA por meio do kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) utilizando os *primers* Oligo (dT)₁₂₋₁₈, de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de amplificação por qPCR foi conduzida em termociclador iQTM5 (Bio-Rad) programado para uma desnaturação inicial por 3 min a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 s a 95°C e 30 s a 60°C. Na qPCR a especificidade dos *primers* foi avaliada por meio de uma curva de desnaturação com o gradiente desde 72 até 96°C variando 0,5°C a cada 15 s. A reação de amplificação foi realizada separadamente para cada um dos genes em um volume final de 25 µl, contendo 2 µl de cDNA, 10 µM de cada *primer* (Tabela 2.1) e 12,5 µl da solução do kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). Com as finalidades de verificar a diluição adequada para as análises em qPCR e determinar a eficiência da qPCR (*E*), foi estabelecida uma curva padrão de diluição para cada um dos genes avaliados, *pgI*, *pgIII* e *β-tub*. A *E* foi calculada de acordo com a equação (3) (RASMUSSEN, 2001). Para a construção da curva, foram consideradas três repetições de reações da qPCR contendo cDNA sem diluir, e cDNA diluído 10, 100, 1000 e 10000X. Esse experimento permitiu os cálculos do R² da curva e a *E*.

$$E = 10^{-1/\text{slope}} \quad (3)$$

A quantificação da expressão gênica por meio da qPCR foi baseada na expressão de um gene alvo (*pgI* ou *pgIII*) em relação a um gene de referência (*β-tub*). O modelo matemático de Pfaffl (PFAFFL, 2001) calcula a razão (R) da expressão relativa de um gene alvo baseado na eficiência da qPCR (*E*) e no ponto em que a fluorescência ultrapassa satisfatoriamente a fluorescência de fundo (CP) de uma amostra desconhecida vs. um controle, e é expresso em relação a um gene referência, de acordo com a fórmula (4) (PFAFFL, 2001).

$$R = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta CP_{\text{alvo}} (\text{controle} - \text{amostra})}}{(E_{\text{ref.}})^{\Delta CP_{\text{ref.}} (\text{controle} - \text{amostra})}} \quad (4)$$

2.2.2 Resultados e discussão

2.2.2.1 Frequência, diversidade e filogenia de fungos isolados de cana-de-açúcar

Fungos da rizosfera e endofíticos de folha e raiz foram isolados sistematicamente de plantas de cana-de-açúcar geneticamente modificada IMI-1 de sua isolinha convencional SP80-1842. Neste experimento, os possíveis efeitos da transgenia ou trato cultural (uso do herbicida imazapir) foram avaliados, além da dinâmica da comunidade de fungos associados à cana-de-açúcar durante o desenvolvimento da cultura em um período total de 18 meses. Para uma avaliação preliminar dos fungos obtidos foi utilizada uma classificação baseada em características morfológicas das colônias. Dessa forma, foram considerados cinco grupos morfológicos, designados como G1, G2, G3, G4 e G5; isolados representantes dos aspectos morfológicos considerados para a classificação em grupos podem ser observados na Figura 2.2. A descrição de cada um dos grupos morfológicos, bem como os fungos identificados pertencendo a cada um

Figura 2.2 - Aspecto morfológico dos grupos obtidos no isolamento cultivado em meio BDA. Os diferentes grupos foram definidos como segue: G1 (branco), colônias filamentosas de tamanho variado, de aspecto cotonoso, ou radial com bordas definidas, ou rasteiros, ou aspecto de chicote, apresentam coloração branca ou branca suja; G2 (preto), colônias filamentosas de tamanho variado, colônias de crescimento rápido ou lento, de aspecto cotonoso ou rasteiro sem bordas definidas, ou aspecto de chicotes, apresentam coloração preta, variando a cinza; G3 (verde), colônias filamentosas de tamanho pequeno, com bordas irregulares e de coloração variando de amarelo a verde vivo ou verde fosco escuro; G4 (bege), colônias filamentosas de crescimento lento, de aspecto cotonoso e de coloração bege; G5 (rosa), colônias filamentosas de crescimento moderado, com bordas irregulares e de coloração rosa ou roxa

deles são apresentados na Tabela 2.2. Devido ao grande número de isolados obtidos, essa primeira classificação em cinco grupos morfológicos permitiu a comparação dos diferentes tratamentos, porém, deve-se considerar a subjetividade intrínseca a esta metodologia e a possibilidade da variação morfológica de fungos da mesma espécie. Assim, esta análise permitiu uma visão geral da dinâmica da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar, mas não suporta conclusões sobre pequenas variações observadas nos diferentes tratamentos.

Com base nos dados de frequência de isolamento dos diferentes grupos, não foi observada nenhuma correlação entre grupos morfológicos e os dois tipos de cana-de-açúcar avaliados, ou grupos morfológicos e manejo utilizado. As frequências de isolamento dos grupos nos diferentes

Tabela 2.2 - Descrição das características morfológicas dos grupos obtidos no isolamento e fungos identificados por seqüenciamento das regiões ITS e 5,8S do rDNA

Grupo	Descrição morfológica	Identificação molecular
G1	Branco - colônias filamentosas de tamanho variado; de aspecto cotonoso, ou radial com bordas definidas, ou rasteiros, ou aspecto de chicote; apresentam coloração branca ou branca suja	<i>Cunninghamella bertholletiae</i> , <i>Hypochnicium vellereum</i> , <i>Mariannaea camptospora</i> , <i>Paraphaeosphaeria pilleata</i> , <i>Penicillium pinophilum</i> , <i>Saccharicola bicolor</i> , <i>Schizophyllum commune</i> , <i>Talaromyces flavus</i> , <i>Trichoderma</i> sp., <i>Xylaria</i> sp.
G2	Preto – colônias filamentosas de crescimento rápido ou lento; de aspecto cotonoso, ou rasteiro sem bordas definidas, ou aspecto de chicotes, apresentam coloração preta, variando a cinza	<i>Alternaria arborescens</i> , <i>Ampelomyces</i> sp., <i>Cladophialophora boppii</i> , <i>Cladosporium oxysporum</i> , <i>Cladosporium tenuissimum</i> , <i>Cochliobolus homomorphus</i> , <i>Cochliobolus sativus</i> , <i>Curvularia trifolii</i> , <i>Phoma herbarum</i>
G3	Verde – colônias filamentosas de tamanho pequeno, com bordas irregulares e de coloração variando de amarelo a verde vivo ou verde fosco escuro	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Epicoccum</i> sp., <i>Hypocrea virens</i> , <i>Paraphaeosphaeria pilleata</i> , <i>Penicillium aculeatum</i>
G4	Bege – colônias filamentosas de crescimento lento, de aspecto cotonoso e de coloração bege	<i>Talaromyces flavus</i>
G5	Rosa – colônias filamentosas de crescimento moderado, com bordas irregulares e de coloração rosa ou roxa	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Fusarium subglutinans</i> , <i>Hypocreales</i> sp.

tratamentos considerados podem ser observadas na Figura 2.3. O grupo G1 foi o mais freqüente na folha, raiz e rizosfera de cana-de-açúcar (Figura 2.3). A distribuição dos grupos e a freqüência de isolamento foram similares para endófitos de folha e raiz, porém o padrão foi diferente para a comunidade de fungos isolada na região da rizosfera de cana-de-açúcar (Figura 2.3). Quando são considerados os valores totais de freqüência de isolamento, em todas as partes e épocas avaliadas, os diferentes tratamentos (C, TC e TH) não apresentaram diferença estatística significativa (Tukey 5%) na incidência de fungos, com exceção do tratamento TC aos 18 meses na raiz, o qual apresentou maior incidência quando comparado aos demais tratamentos (Figura 2.4B). Durante o desenvolvimento da cultura, principalmente nos estágios iniciais, a freqüência de fungos na raiz foi maior que nas folhas. Este padrão de distribuição da comunidade ao longo da planta, no qual as partes inferiores da planta hospedam maiores freqüências de endófitos, seguem o mesmo padrão de colonização de bactérias endofíticas isoladas de cana-de-açúcar (MENDES et al., 2007) e em outras culturas como a soja (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004). Os valores totais

A – Fungos endofíticos de folha

B – Fungos endofíticos de raiz

C – Fungos de rizosfera

Figura 2.3 - Frequência de isolamento de fungos endofíticos de folha (A) e raiz (B), e fungos da rizosfera (C) de cana-de-açúcar avaliada em 3 estágios do desenvolvimento da cultura, sob 3 diferentes tratamentos. As barras representam a incidência dos grupos morfológicos G1, G2, G3, G4 e G5 caracterizados na comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar. Em cada tecido ou região avaliada estão indicados os tratamentos: C (variedade convencional capinada); TC (variedade transgênica capinada); ou TH (variedade transgênica manejada com o herbicida imazapir). Os isolamentos de fungos foram realizados com 03, 10 e 18 meses após plantio (map). Os dados representam a média de 36 repetições em 4 blocos casualizados e o desvio padrão é indicado na barras. Os CVs experimental para os isolamentos dos endófitos de folha, raiz e rizosfera, foram respectivamente, 10,5, 10,5 e 159,0

A – Fungos endofíticos de folha

B – Fungos endofíticos de raiz

C – Fungos de rizosfera

Figura 2.4 - Frequência de isolamento total de fungos endofíticos de folha (A) e raiz (B), e fungos da rizosfera (C) de cana-de-açúcar avaliada em 3 estágios do desenvolvimento da cultura, sob 3 diferentes tratamentos. As barras representam a incidência total de fungos isolados a partir dos tratamentos: C (variedade convencional capinada); TC (variedade transgênica capinada); e TH (variedade transgênica manejada com o herbicida imazapir), com 03, 10 ou 18 meses após plantio (map). Letras iguais entre barras dos diferentes tratamentos de um mesmo período (letra sob a barra horizontal) ou entre diferentes períodos de uma mesma região avaliada (letra sobre a barra horizontal) não representam diferença significativa no teste de Tukey 5%

de ocorrência de fungos endofíticos observados não diferiram significativamente, para nenhum dos tratamentos. Esse fato sugere que as plantas possuem uma capacidade de suporte desses microrganismos, assim, mesmo que os grupos microbianos sejam diferentes para os diferentes tratamentos, os valores totais são similares (Figuras 2.3 e 2.4). Estes resultados mostram que, nas condições avaliadas a transgenia não afeta a comunidade de fungos associada à cana-de-açúcar. Esse estudo suporta estudos anteriores realizados em tabaco, no qual a comunidade microbiana é afetada apenas nos estágios iniciais do desenvolvimento da planta, havendo um efeito transiente que é neutralizado em estágios posteriores (ANDREOTE et al., 2007).

Isolados fúngicos foram selecionados com base na classificação morfológica e a identidade foi acessada por meio do seqüenciamento e BLAST das regiões ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA. Considerando os mais altos valores de identidade com linhagens bem caracterizadas do banco de dados GenBank, foram identificadas pelo menos 27 diferentes espécies de fungos associados à cana-de-açúcar apresentados na Tabela 2.2.

Com base na análise de seqüências foi estabelecida a relação filogenética de isolados representantes que tiveram as regiões ITS e 5,8S do rDNA seqüenciadas. A árvore filogenética contendo os diferentes fungos associados à cana-de-açúcar pode ser observada na Figura 2.5. O filo mais abundante identificado associado à cana-de-açúcar foi o Ascomycota, sendo observados fungos pertencentes às classes Dothideomycetes, Eurotiomycetes e Sordariomycetes. Com menor frequência foram identificados fungos dos fillos Basidiomycota e Zygomycota (Figura 2.5). Um importante grupo identificado foi o grupo G5, o qual é composto predominantemente por fungos do gênero *Fusarium*, em especial *F. moniliforme* (Tabela 2.2). A alta frequência de isolamento deste grupo (Figura 2.3) em todas as condições, tecidos e regiões avaliadas, aliada ao fato dessa espécie ser um potencial patógeno na cultura da cana-de-açúcar (RAID, 1998), fez com que este trabalho focasse na caracterização genética desse grupo e no estudo da interação entre *F. moniliforme*, endofítico e patogênico, e a cana-de-açúcar.

Um importante aspecto a ser destacado é que o acesso à diversidade por meio de isolamento está limitado aos fungos cultivados e às condições de isolamento, tais como, meio de cultura e temperatura de incubação. Considera-se que apenas uma pequena fração da diversidade pode ser acessada por esta técnica, assim, para o suporte dos resultados de isolamento torna-se

2.2.2.5 Acesso à diversidade total de fungos da rizosfera por PCR-DGGE

A análise em PCR-DGGE a partir do DNA total isolado de solo rizosférico permitiu o acesso da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar em três estágios durante o desenvolvimento da cultura. Para o estabelecimento da técnica e seleção de isolados para serem utilizados como padrão, o perfil de DGGE de 14 isolados fúngicos foram analisados e 3 deles constituíram o marcador para orientar a corrida em DGGE, sendo: *Mariannaea camptospora*, *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp. (Figura 2.6). Uma das limitações dessa técnica é a ocorrência de mais de uma banda por espécie, isso pode ser devido à formação de heteroduplexes, múltiplas cópias de genes, degenerescência de *primers* ou múltiplos *operons* (NICOLAISEN; RAMSING, 2002; SALLES; DE SOUZA; VAN ELSAS, 2002). Os isolados comparados apresentaram apenas bandas únicas para cada um deles, porém, a despeito da alta sensibilidade do método, alguns gêneros distintos, como *Bipolaris* sp. e *Alternaria* sp., mostraram posições similares de migração das bandas no gel, como previamente reportado em outros estudos da PCR-DGGE (KOWALCHUK; DE SOUZA; VAN VEEN, 2002; SALLES; DE SOUZA; VAN ELSAS, 2002). De fato, a técnica de DGGE tem uma resolução teórica de 1 pb para diferenciar dois *amplicons* (MYERS et al., 1985; MYERS; MANIATIS; LERMAN, 1987), mas o poder de separação está fortemente relacionado ao comprimento e sequência do produto da PCR analisado. Adicionalmente, tem sido observado que sequências com diferentes composições de nucleotídeos nem sempre apresentam mobilidade diferenciada no gel (JACKSON; RODEN; CHURCHILL, 2000). Assim, produtos da PCR obtidos de duas diferentes espécies podem migrar em posições similares mesmo que suas sequências sejam bem diferentes (MUYZER; DEWAAL; UITTERLINDEN, 1993; SEKIGUCHI et al., 2001). Não obstante, a PCR-DGGE foi eficiente em discriminar com alta sensibilidade e confiabilidade, fungos do gênero *Fusarium* presentes em aspargo, sendo que poucas espécies com perfil de migração muito similares foram distinguidas após sequenciamento (YERGEAU et al., 2005). Em outro estudo a PCR-DGGE, tendo como alvo o 18S rDNA, acessou a comunidade de fungos associados às raízes de *Ammophila arenaria* presentes nas dunas de regiões costeiras da Holanda, e pode discriminar com confiabilidade fungos patogênicos da espécie (KOWALCHUK; GERARDS; WOLDENDORP, 1997).

Figura 2.6 - Separação dos produtos de PCR gerados pelos *primers* NS1 e FR1, em gel de DGGE. Os isolados fúngicos indicados nas colunas são: 1) *Phoma herbarum*; 2) *Cochliobolus homomorphus*; 3) *Cladophialophora boppii*; 4) *Phoma herbarum*; 5) *Cladosporium* sp.; 6) *Bipolaris* sp.; 7) *Alternaria* sp.; 8) *Cunninghamella bertholletiae*; 9) *Mariannaea camptospora*; 10) *Penicillium* sp.; 11) *Paraphaeosphaeria pilleata*; 12) *Penicillium pinophilum*; 13) *Cunninghamella bertholletiae*; e 14) *Epicoccum* sp. O gel contém 6% de poliacrilamida e 25-43% de gradiente de desnaturação e a corrida foi conduzida durante 18 h a 180 V e 58°C

A PCR-DGGE revelou complexos perfis de bandas nos diferentes tratamentos e estágios avaliados e o agrupamento dos diferentes perfis é apresentado na Figura 2.7. De acordo com o dendrograma, o principal fator que contribuiu para o agrupamento dos perfis foi o tempo de cultivo das plantas, de maneira que os perfis observados sugerem um aumento e posterior decréscimo da diversidade da comunidade ao longo do período avaliado, sendo que a maior variabilidade foi encontrada no tempo T2, após 10 meses do plantio (Figura 2.7). Esse mesmo padrão foi observado quando se estudou a comunidade fúngica da rizosfera associada ao milho em condições tropicais; neste estudo a comunidade foi acessada com os mesmos *primers* utilizados no estudo de cana-de-açúcar (NS1 e FR1) e após 20, 40 e 90 dias do plantio, sendo que a maior diversidade de bandas foi detectada aos 40 dias (GOMES et al., 2003). Este mesmo estudo revelou que o filo predominante na comunidade de fungos associada à rizosfera de milho foi o Ascomycota (GOMES et al., 2003), o qual, também foi o filo predominante associado à cana-de-açúcar. A análise da dinâmica de comunidades fúngicas também foi estudada em solo arenoso na Holanda; a análise por PCR específico seguida da PCR-DGGE, revelou que os principais filos presentes são, Ascomycota, Basidiomycota e Zygomycota (VAN ELSAS et al., 2000), os mesmos associados à cana-de-açúcar no Brasil. A imensa diversidade de microrganismos presentes no solo associada às plantas é considerado um aspecto crítico na manutenção da saúde e qualidade do solo, visto que eles estão envolvidos em importantes funções no solo, revisado em (GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004). Neste contexto, os dois maiores fatores que afetam diretamente essa diversidade são o solo e a planta

Figura 2.7 - PCR-DGGE de amostra de DNA total isolado a partir de rizosfera de cana-de-açúcar. Foram considerados os tratamentos: planta convencional capinada (C); planta transgênica capinada (TC); e planta transgênica manejada com herbicida imazapir (TH). O experimento foi avaliado com 03 (1), 10 (2) e 18 meses (3) após o plantio. O dendrograma foi calculado pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. A análise foi conduzida no programa GelCompare (BioNumerics, Applied Maths)

(GARBEVA; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004), dessa forma a alteração do metabolismo da planta causada pela inserção de um gene exógeno poderia afetar a comunidade fúngica associada.

De maneira geral, os perfis de bandas obtidos não revelaram diferença entre os tratamentos avaliados, sugerindo que a transgenia ou trato cultural não afetam a comunidade de fungos da rizosfera associada à cana-de-açúcar. Esses resultados confirmam e estendem as observações do estudo realizado em rizosfera de milho, no qual os diferentes cultivares também não apresentaram diferença significativa no perfil de bandas em todos os estágios avaliados (GOMES et al., 2003).

2.2.2.4 Caracterização genotípica de isolados do gênero *Fusarium*

A alta frequência de isolamento do grupo G5, composto predominantemente por *F. moniliforme* e o fato dessa espécie apresentar potencial de causar Pokkah boeng em cana-de-açúcar, fez dessa espécie alvo de comparação entre isolados obtidos endofiticamente e uma linhagem patogênica na cultura. Para tal comparação foram selecionados isolados endofíticos de folha (designados como FELS, *fungus endophytic leaf sugarcane*), isolados epifíticos de folha (FLS, *fungus leaf sugarcane*), isolados obtidos a partir do sintoma de Pokkah boeng (PBS, *pokkah boeng symptom*) e uma linhagem patogênica cedida pelo CTC (designada PB, *pokkah boeng*). A caracterização genotípica dos isolados de *F. moniliforme* de diferentes fontes foi realizada por RAPD e também por sequenciamento das regiões ITS e 5,8S do rDNA.

A taxonomia do gênero *Fusarium* é complexa e sua classificação está baseada em características morfológicas e/ou diferenças em sequências de nucleotídeos (MARASAS; NELSON; TOUSSOUN, 1985; MARASAS et al., 1987; MARASAS et al., 2001). O complexo *Gibberella fujikuroi* é distribuído mundialmente e é composto de pelo menos 30 espécies (LESLIE, 1999); sendo que o *F. moniliforme*, anamorfa *F. fujikuroi*, integra este complexo. Tem sido proposto uma padronização molecular para a terminologia dos *mating type* do complexo baseada na sequência de um único *locus* responsável pelo controle da recombinação (KERENYI et al., 1999). No contexto da complexidade desse grupo de fungos, ainda não está bem entendido o fato de se encontrar plantas sintomáticas e assintomáticas em um mesmo campo de cultivo associadas ao mesmo patógeno. *F. verticillioides* (sin. *Gibberella moniliformis*) infecta plantações de milho e resulta em uma alta variação de sintomas da doença, incluindo plantas assintomáticas (OREN et al., 2003). São vários os fatores que podem afetar a interação e o desenvolvimento da doença entre o fungo patogênico e a planta hospedeira, tais como, condições ambientais, disponibilidade de água (MAGAN; LACEY, 1984; MAGAN et al., 1997) e as características genéticas da planta e do patógeno (BACON; HINTON, 1996; YATES; BACON; HINTON, 1997).

De acordo com o dendrograma obtido pela RAPD, foram observados agrupamentos com diferentes índices de similaridade genética. As diferentes espécies incluídas na análise mostraram clara correlação de similaridade agrupando-se entre si (Figura 2.8). O isolado FELS103 identificado como *F. subglutinans*, foi o mais distante geneticamente compartilhando apenas 7% de similaridade com os demais isolados avaliados, porém é importante destacar que esta espécie

Figura 2.8 - Dendrograma de similaridade obtido por meio de RAPD de fungos do gênero *Fusarium* isolados a partir de cana-de-açúcar. Os *primers* utilizados para obtenção do polimorfismo foram: AX-08, AX-18, P-12, X-04, X-12 e X-14. As origens dos isolados estão indicadas pelas siglas FELS (*fungus endophytic leaf sugarcane*), FLS (*fungus leaf sugarcane*), PBS (*pokkah boeng symptom*) e PB113 (*pokkah boeng*, linhagem patogênica cedida pelo Centro de Tecnologia Canavieira). O dendrograma foi calculado pelo método UPGMA utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard por meio do programa NTSYSpc 2.01e. Os valores de *bootstrap* foram calculados com 1000 replicações usando o programa WinBoot. Valores de *bootstrap* acima de 50% e escala de similaridade estão indicados

também foi descrita como agente causal de Pokkah boeng em cana-de-açúcar (RAID, 1998). Os isolados FELS59 e FLS112 identificados putativamente como *Fusarium* sp. agruparam-se e apresentaram 13% de similaridade com o clado de isolados de *F. moniliforme* (Figura 2.8). Os isolados da espécie *F. moniliforme* agruparam-se compartilhando pelo menos 62% de similaridade, este clado foi constituído por fungos endofíticos (FELS) e epifíticos (FLS) de folha, bem como fungos isolados a partir de sintomas de Pokkah boeng (PBS) e o isolado patogênico (PB113) (Figura 2.8). O isolado epifítico FLS110 e a linhagem patogênica PB113 agruparam-se, apresentando 85% similaridade; esse fato sugere que fungos relacionados geneticamente podem se associar diferentemente ao hospedeiro, por exemplo, estudos realizados em milho mostram que populações de *Fusarium* podem se associar endofiticamente ou patogenicamente às plantas no campo de cultivo (BACON; HINTON, 1996); além disso, essa similaridade pode indicar que o fungo epifítico FLS110 pode ter sido isolado em uma fase que antecede a infecção e aparecimento dos sintomas da doença. O emprego da técnica RAPD para o estudo da

variabilidade de *F. moniliforme* foi realizado anteriormente por Huang et. al. (1997); este estudo revelou que a análise por RAPD e a análise de grupos de compatibilidade vegetativa (VCG) são bem consistentes e sugere o uso da RAPD como uma ferramenta simples e sensível para estudar a diversidade genética da espécie, bem com para discriminar diferentes VCGs da população no campo (HUANG et al., 1997).

Adicionalmente à caracterização por RAPD foi realizado o seqüenciamento das regiões ITS e 5,8S do rDNA dos isolados de *Fusarium* associados à cana-de-açúcar (Figura 2.9). O estudo filogenético com base nas seqüências foi consistente com os resultados da análise por RAPD, i.e., o mesmo padrão de agrupamento foi obtido tanto pela análise de RAPD quanto pela análise das seqüências do rDNA dos isolados (Figuras 2.8 e 2.9).

Com base nas duas abordagens utilizadas para a caracterização genotípica dos isolados de *Fusarium*, foi observado que isolados relacionados geneticamente, como o endófito FELS111 e o patógeno PB113 (Figuras 2.8 e 2.9) apresentam distintos comportamentos em associação com a cana-de-açúcar. Esse resultado sugere que o marcador genético RAPD ou as regiões do rDNA, embora sejam suficientes para caracterizar diferentes isolados, não discriminam o comportamento patogênico ou endofítico de *Fusarium*. Neste contexto, o estudo da interação entre *F. moniliforme*, endofítico e patogênico, e o hospedeiro deve contribuir para o entendimento de fatores que determinam o tipo de associação estabelecida entre o fungo e a planta. Assim, no presente trabalho a infecção de cana-de-açúcar pelos isolados FELS111 e PB113 foi avaliada por microscopia de luz e a expressão de genes relacionados à patogênese foi acessada por qPCR nas duas linhagens.

Figura 2.9 - Relação filogenética entre fungos do gênero *Fusarium* isolados de cana-de-açúcar baseada nas regiões ITS do rDNA (398 pb). As origens dos isolados estão indicadas pelas siglas: FELS (*fungus endophytic leaf sugarcane*); FLS (*fungus leaf sugarcane*); PBS (*pokkah boeng symptom*); e PB113 (*pokkah boeng*, isolado patogênico cedido pelo CTC). A árvore consenso foi construída pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987) considerando um bootstrap com 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1985). Valores de bootstrap maiores que 50% e escala da distância genética estão indicados. As distâncias foram computadas com base no método de substituições de Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980). A análise filogenética foi construída com uso do programa MEGA4 (TAMURA et al., 2007)

2.2.2.6 Histologia de folhas de cana-de-açúcar infectadas por *Fusarium moniliforme*

A observação de folhas de cana-de-açúcar infectadas pelo isolado endofítico FELS111 e patogênico PB113 revelou clara diferença entre os dois tipos de associação. O aspecto das infecções após 6 dias da inoculação pode ser observado na Figura 2.10. A infecção pelo isolado FELS111, foi caracterizada pelo crescimento por toda a superfície foliar, porém não foram observados sintomas da doença e o crescimento micelial apresentou um aspecto cotonoso (Figura 2.10A). Por outro lado, a infecção pelo patógeno PB113 se caracterizou por um crescimento

rasteiro na superfície foliar, provocando sintomas vermelho-escuro levando à formação de áreas nitidamente necrosadas (Figura 2.10B).

No estudo histológico de cortes longitudinais de folhas de cana-de-açúcar infectadas, a diferença na infecção da folha pelo patógeno e pelo endófito foi confirmada (Figura 2.11). A atuação fúngica durante a infecção foi evidenciada pela destruição das células do parênquima clorofiliano do mesofilo, sendo que a infecção pelo patógeno (Figura 2.11C) foi muito mais agressiva que a do endófito (Figura 2.11B). No caso de *F. moniliforme* e milho, plantas infectadas podem apresentar ou não sintomas, sendo que o padrão de colonização da infecção sintomática difere da infecção assintomática pelo fato de apresentar hifas intracelulares enquanto a colonização endofítica apresenta apenas hifas intercelulares (BACON; HINTON, 1996). Nas duas condições avaliadas, os feixes vasculares estão praticamente intactos, porém na infecção pelo isolado patogênico PB113 foi observada maior degradação das células dos elementos crivados do floema. A infecção das folhas pelo *F. moniliforme* pode ter ocorrido principalmente por duas vias; através dos estômatos (fendas estomáticas) ou ativamente por meio da produção de enzimas degradadoras da parede celular. Assim, a degeneração da epiderme, constatada na infecção pelo patógeno PB113 (Figura 2.11C1), é uma evidência de que a entrada do fungo se deu pela ação enzimática e destruição da parede vegetal. A presença de massa micelial no interior do tecido vegetal comprova a maior agressividade do patógeno quando comparado com o endófito (Figura 2.11C2).

Em muitos casos, a hipovirulência de fungos fitopatogênicos tem sido associada à presença de micovirose ou dsRNA não encapsulado (BAKER; GRIFFIN, 1995; BOTTACIN; LEVESQUE; PUNJA, 1994). No caso dos fungos *F. oxysporum* e *F. solani* em associação com soja, foi confirmado que a hipovirulência não está associada à presença de micovírus; sendo que a inoculação de isolados hipovirulentos reduzem a severidade da doença em plântulas de soja cultivadas em solos infestados naturalmente (KILIC; GRIFFIN, 1998). Considerando a possibilidade do padrão de infecção diferenciado do endófito e patógeno de *F. moniliforme* ser determinado por genes relacionados à destruição da parede celular do hospedeiro, dois genes da PG foram avaliados por qPCR durante a infecção de cana-de-açúcar.

Figura 2.10 - Aspecto geral do crescimento micelial do isolado endofítico FELS111 (A) e do isolado patogênico PB113 (B) sobre a superfície foliar da cana-de-açúcar. As placas contêm disco de papel de filtro umedecido com água ultra-pura e foram incubadas por 6 dias a 28°C

2.2.2.7 Avaliação da expressão de genes de endo-poligalacturonase de *Fusarium moniliforme* durante a infecção de cana-de-açúcar

A expressão dos genes da PG, *pgI* (ou *pgA*) (CAPRARI et al., 1993a; CAPRARI et al., 1993b) e *pgIII* (SELLA et al., 2004), foi avaliada em dois experimentos; sendo o primeiro em meio de cultura líquido contendo ou não extrato de folha de cana-de-açúcar e o segundo em plântulas de cana-de-açúcar infectadas *in vitro*. Para o estabelecimento da técnica e avaliação dos *primers* (Tabela 2.1) foi construída uma curva padrão de diluição para se extrair a eficiência da PCR (*E*). Adicionalmente a especificidade dos *primers* foi avaliada por meio da curva de desnaturação em qPCR. A validação dos *primers* foi acessada por meio da tentativa de amplificação por PCR de diferentes espécies fúngicas isoladas de cana-de-açúcar.

Figura 2.11 - Microscopia de luz de lâmina foliar de cana-de-açúcar seis dias após infecção por isolados de *F. moniliforme*. A1- visão geral da lâmina foliar livre da infecção fúngica e A2- detalhe da região do mesofilo; B1- visão geral da lâmina foliar infectado pelo isolado endofítico FELS111 e B2- detalhe da região do mesofilo; e C1- visão geral da lâmina foliar infectada pela linhagem patogênica PB113 e C2- detalhe da região do mesofilo. Na figura C estão indicados: bainha do feixe (Bf); degeneração epidérmica (De); fibras (F); floema (Fl); feixe vascular (Fv); fenda estomática (Fe); metaxilema (Mx); protoxilema (Px); e parênquima clorofiliano (Pc). As escalas das imagens estão indicadas nas figuras

As curvas padrão de amplificação e de desnaturação para cada um dos genes, bem como a E e R^2 estão apresentadas para os genes da β -*tub*, *pgI* e *pgIII*, respectivamente, nas Figuras 2.12, 2.13 e 2.14. Os valores de E e R^2 obtidos por qPCR dos três genes permitiram a análise relativa da expressão gênica com um ótimo grau de confiabilidade. Os valores de CP obtidos foram utilizados para o cálculo da expressão relativa dos genes *pgI* e *pgIII* tendo o gene β -*tub* como referência, de acordo com o modelo matemático de Pfaffl (2001). A especificidade dos *primers* é um importante ponto a ser considerado nas análises em qPCR, assim, de acordo com a curva de desnaturação para os três genes foram observados picos únicos e bem definidos (Figuras 2.12D, 2.13D e 2.14D) garantindo a ausência de produtos inespecíficos. Adicionalmente, 5 µl do produto final da qPCR foram aplicados em gel de agarose 1,2%, de maneira que não foram observadas bandas inespecíficas para os genes analisados (dados não mostrados).

Figura 2.12 - Curva padrão e curva de desnaturação (*melt*) do gene normalizador β -*tub*. A- gráfico de amplificação considerando o cDNA sem diluição até diluição 10^{-4} ; B- curva de diluição padrão apresentando $E=108,5\%$ e $R^2=0,995$; C- curva de desnaturação; e D- gráfico do pico da curva de desnaturação analisada entre 72 e 95°C com um gradiente variando 0,5°C a cada 15 s

Figura 2.13 - Curva padrão e curva de desnaturação (*melt*) do gene *pgI*. A- gráfico de amplificação considerando o cDNA sem diluição até diluição 10^{-4} ; B- curva de diluição padrão apresentando $E=139,1\%$ e $R^2=0,995$; C- curva de desnaturação; e D- gráfico do pico da curva de desnaturação analisada entre 72 e 95°C com um gradiente variando 0,5°C a cada 15 s

Figura 2.14 - Curva padrão e curva de desnaturação (*melt*) do gene *pgIII*. A- gráfico de amplificação considerando o cDNA sem diluição até diluição 10^{-4} ; B- curva de diluição padrão apresentando $E=105,7\%$ e $R^2=0,980$; C- curva de desnaturação; e D- gráfico do pico da curva de desnaturação analisada entre 72 e 95°C com um gradiente variando 0,5°C a cada 15 s

Ainda para validar a especificidade dos *primers* para os genes *pgI*, *pgIII* e *β -tub* utilizados neste estudo foram selecionados diferentes isolados de fungos associados à cana-de-açúcar identificados por meio de seqüenciamento das regiões ITS do rDNA para serem alvo de amplificação. Dessa forma, o DNA de diferentes isolados fúngicos foi submetido à PCR. Essa análise, incluindo *F. moniliforme* como controle positivo, revelou a especificidade dos *primers* desenhados, de forma que apenas a espécie alvo resultou em amplificação positiva e com tamanho do produto da PCR esperado para cada um dos genes. As diferentes espécies incluídas nesta validação, bem como suas respectivas classificações taxonômicas estão apresentadas na Tabela 2.3.

O sistema SYBR[®] Green para qPCR foi eficiente na avaliação de genes relacionados à patogênese de *Botrytis cinerea* na infecção de *Arabidopsis thaliana* (GIOTI et al., 2006), e apresentou resultados acurados na análise da expressão gênica no sistema *F. moniliforme*-cana-de-açúcar. Os genes *pgI* e *pgIII* avaliados nos experimentos são expressos pelo *F. moniliforme* em todos os estágios da infecção (revisado em KAHMANN; BASSE, 2001), e o gene

Tabela 2.3 - Amplificação por PCR de fungos associados à cana-de-açúcar pelos *primers* utilizados na análise em qPCR

Classe	Espécie	PCR ^a		
		<i>β-tub</i>	<i>pgI</i>	<i>pgIII</i>
Sordariomycetes	<i>Fusarium moniliforme</i>	+	+	+
	<i>Fusarium subglutinans</i>	-	-	-
	<i>Hypocrea virens</i>	-	-	-
	<i>Mariannaea camptospora</i>	-	-	-
Dothideomycetes	<i>Alternaria arborescens</i>	-	-	-
	<i>Ampelomyces</i> sp.	-	-	-
	<i>Bipolaris</i> sp.	-	-	-
	<i>Cladosporium oxysporum</i>	-	-	-
	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	-	-	-
	<i>Cochliobolus sativus</i>	-	-	-
	<i>Curvularia trifolii</i>	-	-	-
	<i>Epicoccum nigrum</i>	-	-	-
	<i>Paraphaeosphaeria pilleata</i>	-	-	-
	<i>Saccharicola bicolor</i>	-	-	-
Eurotiomycetes	<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-
	<i>Aspergillus versicolor</i>	-	-	-
	<i>Penicillium aculeatum</i>	-	-	-
	<i>Penicillium pinophilum</i>	-	-	-
	<i>Talaromyces flavus</i>	-	-	-
Agaricomycetes	<i>Hypochnicium vellereum</i>	-	-	-
	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	-
Zygomycetes	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	-	-	-
Ascomycota (filó)	<i>Phoma herbarum</i>	-	-	-

^a +, amplificação positiva; -, não houve amplificação

constitutivo *β-tub* foi utilizado como gene referência, i.e., controle endógeno para quantificação relativa dos genes da PG. A utilização de um gene de expressão constitutiva como normalizador, tais como, albumina, actinas, tubulinas, 18S rRNA ou 28S rRNA é recomendada para esse tipo de análise (MARTEN et al., 1994).

A parede celular é a principal barreira das plantas contra patógenos. Para vencer essa barreira o patógeno secreta enzimas degradadoras da parede celular, as quais atuam quebrando os polímeros da parede em moléculas que servem como alimento, além de abrir a via de infecção através do tecido da planta (ANNIS; GOODWIN, 1997). As pectinases e cutinases são as primeiras enzimas extracelulares produzidas durante a infecção do hospedeiro, e as do tipo ‘endo’ são consideradas o principal fator de maceração da parede em doenças de podridão (SELLA et

al., 2004). Estudos mostram que a disrupção de genes de endo-pectinases diminuem a virulência ou patogênese tanto de fungos biotróficos quanto de necrotróficos (TEN HAVE et al., 1998; OESER et al., 2002). Com a ação das PGs produzidas pelos fungos ocorre a liberação de fragmentos de oligogalacturonídios da parede celular, os quais desencadeiam uma variedade de respostas de defesa da planta (DE LORENZO; D'OVIDIO; CERVONE, 2001). A planta por sua vez, pode bloquear ou reduzir a atividade das PGs por meio de proteínas inibidoras da PG, as chamadas PGIPs, as quais desencadeiam uma resposta de hipersensibilidade (CERVONE et al., 1989). A primeira PG reportada em *F. moniliforme* foi identificada no isolado F-10 e o gene foi denominado *pgI* (ou *pgA*) e apresentou quatro isoformas de acordo com o padrão de glicosilação (CAPRARI et al., 1993a; CAPRARI et al., 1993b). Uma segunda PG, denominada *pgII*, foi reportada na linhagem 62264 de *F. moniliforme* e apresentou duas isoformas (DARODA et al., 2001). Posteriormente, uma nova PG foi isolada a partir da linhagem *F. moniliforme* PD, a qual escapa da atividade inibitória das PGIPs de soja e feijão, o que não acontece com a *pgI*. Esta PG apresentou quatro isoformas e é codificada pelo gene *pgIII* (SELLA et al., 2004). Tem sido demonstrado que a expressão de PGs ocorre durante todos os estágios de infecção, incluindo contato inicial com o hospedeiro, resposta à defesa da planta, aquisição de nutrientes e fase necrótica (DI PIETRO; RONCERO, 1998; KAHMANN; BASSE, 2001). Um modelo molecular mostrando o comportamento da conformação da PG de *F. moniliforme* foi proposto por André-Leroux et al. (2005). Como a enzima do gene *pgIII* tem capacidade de escapar do reconhecimento de defesa da planta pode-se aventar a hipótese de que ela tenha maior participação na infecção pelo endófito que pelo patógeno, já que a infecção assintomática ocorre na presença do isolado endofítico.

No primeiro experimento, os isolados, endofítico FELS111 e patogênico PB113, foram cultivados separadamente em meio de cultivo líquido contendo ou não extrato de cana-de-açúcar. Os resultados da expressão gênica nessas condições revelaram que ambos os genes avaliados apresentaram maiores níveis de transcrição no isolado endofítico em relação à linhagem patogênica (Figura 2.15). Enquanto o gene *pgI* não foi afetado pela presença do extrato, a transcrição do gene *pgIII* foi aumentada na presença de extrato de cana-de-açúcar no isolado endofítico (Figura 2.15). Esse fato sugere que embora ambos os genes apresentem maiores níveis de transcrição no isolado endofítico, o gene *pgIII* pode desempenhar um papel mais importante na interação endofítica de *F. moniliforme* com a cana-de-açúcar do que o gene *pgI*.

Figura 2.15 - Níveis de transcrição dos genes *pgI* e *pgIII* do isolado endofítico FELS111 em relação à linhagem patogênica PB113. Os fungos foram avaliados após 96 h crescendo na presença ou ausência de extrato de folha de cana-de-açúcar. As barras representam o desvio padrão de três repetições biológicas

No segundo experimento, ambos isolados FELS111 e PB113 foram inoculados em plântulas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro*, e a expressão dos genes *pgI* e *pgIII* foi avaliada em três estágios durante o desenvolvimento da infecção. Durante o tempo de incubação o fungo cresceu e infectou completamente as plântulas. No primeiro estágio, avaliado 48 horas após inoculação (hai), as plantas apresentaram aspecto saudável e o crescimento fúngico se concentrou na interface entre raiz e base do caule. Com 96 hai o fungo alcançou a região foliar e as folhas começaram apresentar amarelamento. No último estágio considerado (144 hai), o tecido da planta estava necrosado. Embora a agressividade da linhagem patogênica tenha se apresentado mais severamente, o endófito FELS111 também conduziu a planta à morte; neste caso, deve ser notado que nas condições avaliadas, considerando plantas axênicas, alta quantidade de inóculo e cultivo *in vitro*, a sensibilidade das plantas foi muito maior, impedindo que a planta sobrevivesse mesmo frente à infecção endofítica. Neste experimento, o isolado endofítico apresentou expressão do gene *pgIII* significativamente maior em todos os estágios avaliados em relação ao patógeno (Figura 2.16), confirmando os resultados obtidos em meio líquido na presença de extrato de folha de cana-de-açúcar (Figura 2.15). Por outro lado, o endófito apresentou um aumento da transcrição do gene *pgI* apenas no estágio tardio de infecção, quando a maior parte dos tecidos vegetais estavam mortos (Figura 2.16). Esse fato evidencia que a expressão do gene *pgIII* desempenha relevante papel na associação endófito-planta, enquanto a participação do gene *pgI* é de menor importância.

Figura 2.16 - Níveis de transcrição dos genes *pgI* e *pgIII* do isolado endofítico FELS111 em relação à linhagem patogênica PB113. As plantas foram infectadas *in vitro* e avaliadas em 3 estágios durante o desenvolvimento da infecção, sendo: 48, 96 e 144 horas após inoculação (hai). As barras representam o desvio padrão de três repetições biológicas

A observação combinada dos dois experimentos indica que o padrão de infecção endofítico do *F. moniliforme* pode ser determinado, pelo menos em parte, por diferentes níveis de expressão do gene *pgIII*. A expressão deste gene parece promover um padrão de infecção menos agressivo na cana-de-açúcar causado pelo isolado FELS111. Como a enzima do *pgIII* é capaz de escapar do mecanismo de defesa da planta (SELLA et al., 2004), o fungo pode colonizar sem causar uma resposta hipersensível na planta, conferindo ao isolado FELS111 a capacidade de infecção mais eficiente em relação ao patógeno PB113. Esse padrão de expressão seria uma vantagem para o endófito, de forma que nos estágios iniciais de colonização o gene *pgIII* seria mais expresso, evitando a resposta de hipersensibilidade, e no estágio avançado, quando o tecido da planta está necrosado, há uma maior participação do gene *pgI* (Figura 2.16). É importante considerar que o processo de infecção e seus diferentes estágios são determinados pela ação conjunta de vários genes, de forma que em muitos casos o fenótipo mutante para esses genes revela que não são essenciais para a patogênese (KAHMANN; BASSE, 2001). No caso da infecção causada pelo patógeno PB113, a qual resulta na rápida necrose do tecido da planta, outros genes devem desempenhar importante papel na infecção, visto que durante a penetração ativa os fitopatógenos secretam um conjunto de enzimas hidrolíticas, incluindo cutinases, celulases, pectinases e proteases (KNOGGE, 1996).

Os resultados apresentados sugerem que os diferentes níveis de transcrição do gene *pgIII* podem determinar o comportamento endofítico ou patogênico de *F. moniliforme* em associação com a cana-de-açúcar.

2.3 Conclusão

A cana-de-açúcar é intensamente colonizada por uma diversa comunidade fúngica cultivada composta por fungos de pelo menos cinco classes taxonômicas: Ascomycetes, Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Agaricomycetes e Zygomycetes, sendo a primeira a mais abundante. Os resultados de isolamento e análise da comunidade fúngica total da rizosfera por PCR-DGGE indicaram que a transgenia ou a aplicação do herbicida imazapir não afetam a comunidade de fungos endofíticos e da rizosfera de cana-de-açúcar. Entre os diversos grupos de fungos associados endofiticamente à cultura, estão os fungos do gênero *Fusarium*, em especial a espécie *F. moniliforme*, descrita como agente causal de Pokkah boeng na cultura da cana-de-açúcar. A caracterização genética aliada aos estudos de infecção e expressão gênica de um isolado endofítico e uma linhagem patogênica de *F. moniliforme* durante a infecção do hospedeiro revelaram que eles apresentam alta similaridade genética, porém distintos padrões de infecção e expressão do gene *pgIII*, sendo que no endófito este gene pode desempenhar importante papel na infecção, conferindo vantagem na colonização da planta. Dessa forma, fica evidenciado que a diferença entre endófitos e patógenos pode não estar relacionada à estrutura genômica, mas sim à regulação da expressão de genes chaves na interação com a planta hospedeira. Porém, um estudo de infecção em condições de campo deve ser investigado.

Referências

- ANDRÉ-LEROUX, G.; TESSIER, D.; BONNIN, E. Action pattern of *Fusarium moniliforme* endopolygalacturonase towards pectin fragments: comprehension and prediction. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics**, Amsterdam, v. 1749, p. 53-64, 2005.
- 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.; ARAUJO, W.L. Transgenic tobacco revealing altered bacterial diversity in the rhizosphere during early plant development. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen. In press.
- ANNIS, S.L.; GOODWIN, P.H. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 103, p. 1-14, 1997.
- BACON, C.W.; HINTON, D.M. Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 74, p. 1195-1202, 1996.
- BAKER, R.; GRIFFIN, G.J. Molecular strategies for biological control of fungal plant pathogens. In: Reuveni, R. (Ed.). **Novel approaches to integrated pest management**. Boca Raton: Lewis Publ., 1995. p. 153-182.
- BOTTACIN, A.M.; LEVESQUE, C.A.; PUNJA, Z.K. Characterization of dsRNA in *Chalara elegans* and effects on growth and virulence. **Phytopathology**, Saint Paul, v.84, p. 303-312, 1994.
- CAPRARI, C.; BERGMANN, C.; MIGHELI, Q.; SALVI, G.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; CERVONE, F.; DE LORENZO, G. *Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 43, p. 453-462, 1993a.
- CAPRARI, C.; RICHTER, A.; BERGMANN, C.; LO CICERO, S.; SALVI, G.; CERVONE, F.; DE LORENZO, G. Cloning and characterization of a gene encoding the endopolygalacturonase of *Fusarium moniliforme*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, p. 497-505, 1993b.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 42, p. 181-184, 1967.
- CERVONE, F.; HAHN, M.G.; DE LORENZO, G.; DARVILL, A.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 90, p. 542-548, 1989.
- DARODA, L.; HAHN, K.; PASHKOULOV, D.; BENVENUTO, E. Molecular characterization and in planta detection of *Fusarium moniliforme* endopolygalacturonase isoforms. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, p. 317-325, 2001.

DE LORENZO, G.; D'OVIDIO, R.; CERVONE, F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPS) in defense against pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 313-335, 2001.

DI PIETRO, A.; RONCERO, M.I.G. Cloning, expression, and role in pathogenicity of *pgl* encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 11, p. 91-98, 1998.

DONEGAN, K.K.; PALM, C.J.; FIELAND, V.J.; PORTEOUS, L.A.; GANIO, L.M.; SCHALLER, D.L.; BUCAO, L.Q.; SEIDLER, R.J. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil-microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 2, p. 111-124, 1995.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Oxford, v. 39, p. 783-791, 1985.

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**, Palo Alto, v. 42, p. 243-270, 2004.

GIOTI, A.; SIMON, A.; LE PÊCHEUR, P.; GIRAUD, C.; PRADIER, J.M.; VIAUD, M.; LEVIS, C. Expression profiling of *Botrytis cinerea* genes identifies three patterns of up-regulation in planta and an FKBP12 protein affecting pathogenicity. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 358, p. 372-386, 2006.

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.

HUANG, R.; GALPERIN, M.; LEVY, Y.; PERL-TREVES, R. Genetic diversity of *Fusarium moniliforme* detected by vegetative compatibility groups and random amplified polymorphic DNA markers. **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, p. 871-881, 1997.

JACKSON, C.R.; RODEN, E.E.; CHURCHILL, P.F. Denaturing gradient gel electrophoresis can fail to separate 16S rDNA fragments with multiple base differences. **Molecular Biology Today**, Wymondham, v. 1, p. 49-51, 2000.

KAHMANN, R.; BASSE, C. Fungal gene expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 4, p. 374-380, 2001.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137, 1965.

KERENYI, Z.; ZELLER, K.; HORNOK, L.; LESLIE, J.F. Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Applied and Environmental Microbiology**, Washinton, v. 65, p. 4071-4076, 1999.

KILIC, O.; GRIFFIN, G.J. Effect of dsRNA-containing and ds-RNA-free hypovirulent isolates of *Fusarium oxysporum* on severity of Fusarium seedling disease of soybean in naturally infested soil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 201, p. 125-135, 1998.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 16, p. 111-120, 1980.

KNOGGE, W. Fungal infection of plants. **The Plant Cell**, Rockville, v. 8, p. 1711-1722, 1996.

KOWALCHUK, G.A.; DE SOUZA, F.A.; VAN VEEN, J.A. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 571-581, 2002.

KOWALCHUK, G.A.; GERARDS, S.; WOLDENDORP, J.W. Detection and characterization of fungal infections of *Ammophila arenaria* (marram grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specifically amplified 18S rDNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3858-3865, 1997.

KUKLINSKY-SOBRA, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

LESLIE, J.F. Genetic status of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **The Plant Pathology Journal**, Seoul, v. 15, p. 259-269, 1999.

LUSSO, M.; KUC, J. The effect of sense and antisense expression of the PR-N gene for beta-1,3-glucanase on disease resistance of tobacco to fungi and viruses. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, p. 267-283, 1996.

MAGAN, N.; LACEY, J. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, [s.l.], v. 82, p. 83-93, 1984.

MAGAN, N.; MARIN, S.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V. The impact of ecological factors on germination, growth, fumonisin production of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* and their interactions with other common maize fungi. **Cereal Research Communications**, Szeged, v. 25, p. 643-645, 1997.

MARASAS, W.F.O.; NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A. *Fusarium dlamini*, a new species from Southern-Africa. **Mycologia**, New York, v. 77, p. 971-975, 1985.

MARASAS, W.F.O.; RABIE, C.J.; LUBBEN, A.; NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; VANWYK, P.S. *Fusarium napiforme*, a new species from millet and sorghum in Southern-Africa. **Mycologia**, New York, v. 79, p. 910-914, 1987.

MARASAS, W.F.O.; RHEEDER, J.P.; LAMPRECHT, S.C.; ZELLER, K.A.; LESLIE, J.F. *Fusarium andiyazi* sp. nov., a new species from sorghum. **Mycologia**, New York, v. 93, p. 1203-1210, 2001.

MARTEN, N.W.; BURKE, E.J.; HAYDEN, J.M.; STRAUS, D.S. Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 8, p. 538-544, 1994.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; ARAUJO, W.L.; RAAIJMAKERS, J.M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73 p. 7259-7267, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 15, p. 473-&, 1962.

MUYZER, G.; DEWAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 695-700, 1993.

MYERS, R.M.; FISCHER, S.G.; LERMAN, L.S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel-electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 13, p. 3131-3145, 1985.

MYERS, R.M.; MANIATIS, T.; LERMAN, L.S. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel-electrophoresis. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, p. 501-527, 1987.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 06 nov. 2007.

NICOLAISEN, M.H.; RAMSING, N.B. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 50, p. 189-203, 2002.

OESER, B.; HEIDRICH, P.M.; MULLER, U.; TUDZYNSKI, P.; TENBERGE, K.B. Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 36, p. 176-186, 2002.

OREN, L.; EZRATI, S.; COHEN, D.; SHARON, A. Early events in the *Fusarium verticillioides* maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 1695-1701, 2003.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

RAID, R.N. **Pokkah boeng disease of sugarcane**. Gainesville: University of Florida, 1998.

RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S.; Witterwer, C; Nakagawara, K. (Eds.). **Rapid cycle real-time PCR: methods and applications**. Heidelberg: Springer Press, 2001. p. 21-43.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue o. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, p. 247-249, 1973.

SALLES, J.F.; DE SOUZA, F.A.; VAN ELSAS, J.D. Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1595-1603, 2002.

SEKIGUCHI, H.; TOMIOKA, N.; NAKAHARA, T.; UCHIYAMA, H. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 23, p. 1205-1208, 2001.

SELLA, L.; CASTIGLIONI, C.; ROBERTI, S.; D'OVIDIO, R.; FAVARON, F. An endopolygalacturonase (PG) of *Fusarium moniliforme* escaping inhibition by plant polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) provides new insights into the PG-PGIP interaction. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 240, p. 117-124, 2004.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 24 p. 1596-1599, 2007.

TEN HAVE, A.; MULDER, W.; VISSER, J.; VAN KAN, J.A.L. The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 11, p. 1009-1016, 1998.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

VAINIO, E.J.; HANTULA, J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 927-936, 2000.

VAN ELSAS, J.D.; DUARTE, G.F.; KEIJZER-WOLTERS, A.; SMIT, E. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 43, p. 133-151, 2000.

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. (Eds.). **PCR protocols: A guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

YATES, I.E.; BACON, C.W.; HINTON, D.M. Effects of endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on corn growth and cellular morphology. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 81, p. 723-728, 1997.

YERGEAU, E.; FILION, M.; VUJANOVIC, V.; ST-ARNAUD, M. A PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to assess *Fusarium* diversity in asparagus. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 60, p. 143-154, 2005.

3 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS CULTIVADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E BIOQUÍMICA DE ISOLADOS DO COMPLEXO *Burkholderia cepacia*

Resumo

Bactérias foram isoladas da rizosfera e do interior de raízes e colmo de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no campo em Piracicaba, Brasil. Bactérias endofíticas foram encontradas em raízes e colmos de cana-de-açúcar, apresentando significativa maior densidade em raízes. Muitas bactérias endofíticas apresentaram produção do fitormônio relacionado ao crescimento de plantas, o ácido indol acético (AIA), e esta característica foi a mais freqüente entre as bactérias isoladas de amostras de colmo. A análise de seqüências 16S rDNA revelou que os isolados bacterianos selecionados da comunidade associada à cana-de-açúcar pertencem aos gêneros *Burkholderia*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Microbacterium*. Isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Burkholderia* foram os predominantes entre os endófitos. Muitos isolados de *Burkholderia* apresentaram produção do metabólito antifúngico pirrolnitrina e todos foram capazes de crescer a 37°C. A análise filogenética das seqüências de 16S rDNA e do gene *recA* revelou que espécies de *Burkholderia* isoladas de cana-de-açúcar são proximamente relacionadas a isolados clínicos do complexo *Burkholderia cepacia* e agruparam-se com linhagens de *B. cenocepacia* (gv. III) isoladas de pacientes com fibrose cística. Estes resultados sugerem que isolados do complexo *B. cepacia* são uma parte integral da comunidade bacteriana endofítica de cana-de-açúcar no Brasil e reforça a hipótese de que plantas podem atuar como um nicho para bactérias patogênicas oportunistas em humanos.

Palavras-chave: Comunidades bacterianas; Complexo *Burkholderia cepacia*; 16S rDNA; *recA*

**DIVERSITY OF CULTIVATED ENDOPHYTIC BACTERIA FROM SUGARCANE:
GENETIC AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF
Burkholderia cepacia COMPLEX ISOLATES**

Abstract

Bacteria were isolated from the rhizosphere and from inside the roots and stems of sugarcane plants grown in the field in Brazil. Endophytic bacteria were found in both the roots and the stems of sugarcane plants, with a significantly higher density in the roots. Many of the cultivated endophytic bacteria were shown to produce the plant growth hormone indoleacetic acid, and this trait was more frequently found among bacteria from the stem. 16S rRNA gene sequence analysis revealed that the selected isolates of the endophytic bacterial community of sugarcane belong to the genera of *Burkholderia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, and *Microbacterium*. Bacterial isolates belonging to the genus *Burkholderia* were the most predominant among the endophytic bacteria. Many of the *Burkholderia* isolates produced the antifungal metabolite pyrrolnitrin, and all were able to grow at 37°C. Phylogenetic analyses of the 16S rRNA gene and *recA* gene sequences indicated that the endophytic *Burkholderia* isolates from sugarcane are closely related to clinical isolates of the *Burkholderia cepacia* complex and clustered with *B. cenocepacia* (gv. III) isolates from cystic fibrosis patients. These results suggest that isolates of the *B. cepacia* complex are an integral part of the endophytic bacterial community of sugarcane in Brazil and reinforce the hypothesis that plant-associated environments may act as a niche for putative opportunistic human pathogenic bacteria.

Keywords: Bacterial communities; *Burkholderia cepacia* complex; 16S rDNA; *recA*

3.1 Introdução

"To be, or not to be, that is the question."

(Hamlet, ato III, cena 1 | **Shakespeare**)

O Brasil é um dos maiores produtores de cana-de-açúcar do mundo e sua capacidade de produção afeta diretamente o mercado de açúcar internacional. O cultivo de cana-de-açúcar no Brasil é primariamente utilizado para a produção de açúcar e álcool. Nos últimos anos a produção vem aumentando e na safra 2005/2006 a produção foi de cerca de 26 milhões de toneladas de açúcar e 16 milhões m³ de álcool. No Brasil, o etanol tem sido usado como fonte alternativa de combustível desde a década de 1980, porém, apenas atualmente, tem chamado a atenção de países ao redor do mundo para o seu uso como biocombustível. A possibilidade de substituir, pelo menos em parte, a gasolina nos veículos, pode contribuir significativamente para a redução da emissão de carbono na atmosfera (GOLDEMBERG, 2006). Diante deste cenário, a sustentabilidade e o aumento na produção da cana-de-açúcar tornam-se um importante foco na pesquisa tecnológica atual.

O crescimento e o desempenho da cana-de-açúcar no campo são afetados negativamente por vários fatores abióticos e bióticos, incluindo um grande espectro de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus. A Pokkah boeng, causada pelo fungo *Fusarium moniliforme*, é uma das doenças espalhadas mundialmente pelas áreas de cultivo de cana-de-açúcar, embora não seja uma das doenças mais importantes nos campos brasileiros, essa doença pode causar significantes quedas de produção e perdas econômicas nos cultivos comerciais (RAID, 1998). O *F. moniliforme* pode ser disseminado horizontalmente por meio de esporos carregados pelos ventos ou por restos vegetais, ou ainda pode se disseminar verticalmente através de colmos utilizados no plantio. Atualmente, as estratégias de controle da doença envolvem principalmente a utilização de variedades resistentes e, alternativamente a aplicação de fungicidas. Porém, a eficácia de ambas as medidas de controle é limitada e, no contexto agrônomo e ambiental atual, existe uma demanda por estratégias ambientalmente menos agressivas para o controle desta e outras doenças, como por exemplo, o uso do controle biológico.

O objetivo geral deste estudo é isolar e caracterizar bactérias benéficas que estão intimamente associadas à cana-de-açúcar e apresentem o potencial de controle de patógenos e

contribuam para a promoção do crescimento vegetal e produção da cana-de-açúcar. Entre os diversos grupos de microrganismos associados às plantas, as bactérias endofíticas são consideradas uma inesgotável fonte para a descoberta de isolados com novas características antimicrobianas e de promoção de crescimento (STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000; LODIEWYCKX et al., 2002; STROBEL, 2003; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). Bactérias endofíticas têm mostrado efeitos benéficos na promoção do crescimento vegetal e saúde em diversas culturas, sendo que os principais modos de ação descritos são: fixação de nitrogênio, produção de fitormônios e compostos antifúngicos, ou ainda, indução de resistência sistêmica (LODEWYCKX et al., 2002; SESSITSCH et al., 2002; INIGUEZ; DONG; TRIPLETT, 2004; KUKLINSKY-SOBRAAL et al., 2004; COMPANT et al., 2005; MEHNAZ; LAZAROVITS, 2006; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). Para a cana-de-açúcar, os estudos em bactérias endofíticas têm focado em *Gluconacetobacter diazotrophicus* e sua capacidade de fixar nitrogênio (DONG et al., 1995; BODDEY et al., 2003) ou inibir *Xanthomonas albilineans*, agente causal da escaldadura das folhas de cana-de-açúcar (BLANCO et al., 2005). Porém, informações sobre características antifúngicas e diferentes mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal, além da fixação de nitrogênio, são limitadas. Adicionalmente, é importante considerar que uma análise abrangente da frequência, diversidade e atividade de comunidades de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar não foi realizada até o momento.

Neste estudo, bactérias foram isoladas da rizosfera e do interior de raízes e colmos de cana-de-açúcar crescidas em campo experimental em Piracicaba, Brasil. O trabalho focou na busca de bactérias endofíticas cultivadas e na caracterização de metabólitos relevantes. A diversidade e identidade putativa das bactérias endofíticas foram determinadas por marcador molecular e análise de seqüências dos genes 16S rDNA e *recA* (CHAN; STEAD; COUTTS, 2003). A atividade antimicrobiana contra *F. moniliforme* e metabólitos específicos produzidos por bactérias endofíticas foram determinados em bioensaios, análise de PCR e cromatografia, (*thin-layer chromatography* [TLC]) e *reversed-phase high performance liquid chromatography* [RP-HPLC]).

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Materiais e métodos

3.2.1.1 Isolamento de bactérias, meio de cultura e condições de cultivo

As bactérias utilizadas neste estudo foram isoladas a partir de plantas de cana-de-açúcar (cv. SP80-1842) cultivadas por 3 meses em campo experimental localizado em Piracicaba, SP, Brasil (22° 41' S e 47° 33' O). As bactérias da rizosfera e endofíticas de raiz foram isoladas de segmentos coletados a uma profundidade de 5 a 15 cm da base do colmo. Os segmentos de raiz foram lavados em água corrente para a remoção de partículas de solo aderidas ao sistema radicular. As bactérias da rizosfera foram isoladas por meio de agitação vigorosa de 5 g de segmento de raiz em 100 mL de tampão PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,5 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM [pH 7.4]) por 1 h seguida de semeadura de diluições adequadas em meio *tryptic soy broth* (TSB; Oxoid, Hampshire, England) suplementado com 50 mg mL⁻¹ de fungicida benlate (DuPont, Brasil) e incubação a 28°C. Para o isolamento de endófitos de raiz, segmentos de raiz lavados foram desinfetados superficialmente, seguindo uma lavagem seqüencial de etanol 70% por 1 min, hipoclorito de sódio (2%, vol/vol) por 3 min, etanol 70% por 30 s, e duas lavagens com água destilada autoclavada. A desinfecção superficial foi verificada pela semeadura de alíquotas (100 µL) da água destilada utilizada na última lavagem em placas contendo TSB. Os segmentos de raiz superficialmente desinfetados foram macerados em cadinho e pistilo usando 2 mL de tampão PBS e alíquotas de 100 µL foram semeadas em meio TSB suplementado com 50 mg mL⁻¹ do fungicida benlate. Posteriormente, as placas foram incubadas a 28°C e o número de colônias foi contado depois de 10 dias. Bactérias endofíticas de colmo foram isoladas a partir de segmentos de colmo amostrados entre 15 e 30 cm da base do colmo. Segmentos de 7 cm foram lavados e a epiderme foi assepticamente removida. Posteriormente, 3 mL de PBS foram adicionados na secção transversal superior do segmento de colmo colocado em tubo de 50 mL e o extrato da planta foi coletado usando centrifugação a 3000 X g por 10 min (LACAVA et al., 2004). Alíquotas de 100 µL foram semeadas em TSB suplementado com benlate. As placas foram incubadas a 28°C e colônias foram contadas após 10 dias. Todos isolados bacterianos foram armazenados a -80°C em 40% (vol/vol) de glicerol.

3.2.1.2 Caracterização genotípica de bactérias endofíticas

A diversidade genotípica das bactérias isoladas foi determinada com a análise por BOX-PCR com o *primer* BOX-1AR (KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995) de acordo com o protocolo descrito em detalhes por Rademaker et al. (1998). As amplificações foram conduzidas em termociclador MJ Research PTC-200. Aliquotas de 6 µL do produto de PCR foram carregadas em gel de agarose 1,5% de 25 cm em tampão TBE 1X (90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA [pH 8.0]) e corrida a 40 V por 16 h. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV. A análise da imagem foi realizada com o programa GelCompar II (Applied Math, Belgium).

Os isolados bacterianos foram enviados para a Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul) para o sequenciamento completo do 16S rDNA de acordo com as especificações da companhia. O sequenciamento do gene para a recombinase RecA (*recA*, 1000 pb) foi feito pela BaseClear (Leiden, Holanda) com os *primers* BCR1 e BCR2 (MAHENTHIRALINGAM et al., 2000a). As seqüências obtidas foram examinadas e editadas com o programa BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999). A busca por seqüências similares conhecidas foi feita por meio do Basic Local Alignment Tool (BLAST) no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu>). As seqüências foram alinhadas com o programa CLUSTAL_X versão 1.8 (THOMPSON et al., 1997). As análises filogenéticas e de evolução molecular foram conduzidas com o programa MEGA versão 3.1 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004). As árvores filogenéticas consenso considerando Neighbor-Joining, foram obtidas como o modelo de substituição de 2-parâmetros de Kimura (KIMURA, 1980) e teste de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985). As análises conduzidas com os genes 16S rDNA e *recA* foram focadas primariamente nas comparações e melhores *hits* com seqüências de linhagens bem caracterizadas (linhagens tipo) do painel experimental do complexo *Burkholderia cepacia* (MAHENTHIRALINGAM et al., 2000b; COENYE et al., 2003)

3.2.1.3 Caracterização fenotípica de isolados bacterianos

A atividade dos isolados bacterianos contra o crescimento da hifa de *F. moniliforme* linhagem CBS 218.76 foi realizada em meio batata dextrose agar 1/5 (pH 7,0) (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) de acordo com os métodos descritos anteriormente (DE SOUZA; WELLER; RAAIJMAKERS, 2003). A produção de ácido indol acético (AIA) foi determinada usando o método qualitativo de Bric, Bostock e Silverstone (1991) modificado. Seis isolados foram inoculados em meio *tryptic soy broth* (TSA; Difco, Le Pont de Claix, France) 1/10 suplementado com 5 mM de L-triptofano (Sigma, Steinheim, Alemanha) e coberto com uma membrana de nitrocelulose (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra). Depois de uma incubação a 25°C por 24 h, a membrana foi removida da placa e tratada com reagente de Salkowski (2% [wt/vol] de FeCl₃ 0,5 M em ácido perclórico 35%) por 15 min à temperatura ambiente. As bactérias produtoras de AIA foram identificadas pela presença de um halo vermelho na membrana na posição da colônia bacteriana.

A atividade de proteases foi avaliada em meio ágar contendo (por litro) 15 g de leite desnatado em pó, 4 g base de ágar sangue e 0,5 g de extrato de levedura (Oxoid, Hampshire, Inglaterra). As placas inoculadas foram incubadas a 27°C por 24 h e a atividade extracelular de proteases foi detectada pela presença de um halo ao redor da colônia bacteriana.

3.2.1.4 Detecção e análise de genes antibióticos e metabólitos

A detecção de genes envolvidos na biossíntese de pirrolnitrina, 2,4-diacetilfloroglucinol, fenazinas e pioluteorina foi feita por PCR como descrito por De Souza e Raaijmakers (2003). Especial atenção foi dada ao gene *prnD*, o qual está envolvido na catálise da oxidação do grupo amino da aminopirrolnitrina para nitro formando a pirrolnitrina (revisado em DE SOUZA; RAAIJMAKERS, 2003). O gene *prnD* de 1092 pb (LEE; ANG; ZHAO, 2006) foi parcialmente (666 pb) seqüenciado pela BaseClear (Leiden, Holanda) com os *primers* PRND1 and PRND2 (DE SOUZA; RAAIJMAKERS, 2003). A detecção de pirrolnitrina por TLC foi realizada de acordo com o método descrito por (DE SOUZA; RAAIJMAKERS, 2003). A pirrolnitrina pura foi usada como referência nas análises e foi gentilmente cedida pelo Dr. M. A. de Waard do Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Wageningen, Holanda. Para a detecção dos

antibióticos 2,4-diacetilfloroglucinol, fenazinas e pioluteorina foi utilizado o sistema de RP-HPLC ligado a um espectrofotômetro seguindo protocolos descritos anteriormente (BONSALL; WELLER; THOMASHOW, 1997).

Para determinar a atividade de metabólitos presentes em extratos de cultura dos isolados bacterianos, uma suspensão de esporos (10^6 esporos mL^{-1}) de *Cladosporium cucumerinum* em meio líquido batata dextrose (Difco, Le Pont de Claix, França) foi espalhada sobre placas de TLC, as quais foram incubadas a 25°C por 5 dias.

3.2.1.5 Mutagênese sítio-dirigida no gene da pirrolnitrina

Para entender o papel da pirrolnitrina na inibição do crescimento fúngico, um mutante, apresentando deficiência na produção de pirrolnitrina, foi obtido a partir do isolado ESS4 por mutagênese sítio-dirigida do gene *prnD*. Um fragmento de 396 pb do gene *prnD* do isolado ESS4 foi amplificado com os *primers* PRNhF (5'-TTTTTAAGCTTTGCACTTCGCGTTCGAGAC-3') e PRNxR (5'-TTTTTCTAGACGAGATGAGCATGTGCATG-3'), os quais contém, respectivamente, sítios de restrição para HindIII e XbaI (sublinhado). Estes *primers* foram desenhados com base no alinhamento das seguintes seqüências do GenBank: AF161183, AF161186, CP000150, CP000125, CP000441, PFU74493 e CP000076. Posteriormente à digestão com HindIII e XbaI, o fragmento de 396 pb foi clonado em plasmídio pMP5285 (KUIPER et al., 2001) e transferido, por recombinação triparental, para um isolado espontâneo resistente a rifampicina derivado do isolado ESS4. Os mutantes putativos *prnD* foram selecionados em meio *Pseudomonas* Agar F (Difco, Le Pont de Claix, França) contendo $200\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de rifampicina e $1200\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina. A disrupção do gene *prnD* no isolado ESS4 foi confirmada pela amplificação por PCR com os *primers* PRND2 (DE SOUZA; RAAIJMAKERS, 2003) e P5285R (5'-CCAGATAGCCCAGTAGCTG-3'); o *primer* PRND2 tem como alvo uma seqüência específica no gene *prnD*, enquanto o *primer* P5285R anela à região flanqueadora do plasmídio co-integrado no gene *prnD*, dessa forma, o produto de PCR de 600 pb foi verificado pela presença do sítio de restrição para a HindIII. A deficiência na produção da pirrolnitrina foi determinada por análise em TLC de extratos de cultura dos mutantes *prnD*.

3.2.2 Resultados e discussão

3.2.2.1 Frequência, diversidade e identidade de bactérias endofíticas de cana-de-açúcar

A densidade populacional de bactérias cultivadas na rizosfera de cana-de-açúcar foi de aproximadamente 20 vezes maior que a densidade de bactérias endofíticas nas raízes (Tabela 3.1). No colmo, a densidade de bactérias foi várias ordens de magnitude menor que em raízes e rizosfera de cana-de-açúcar (Tabela 3.1). Este padrão de distribuição da comunidade ao longo da planta, no qual as partes inferiores da planta hospedam maiores frequências de endófitos, confirma e estende resultados reportados anteriormente para milho (FISHER; PETRINI; SCOTT, 1992), ervilha (ELVIRA-RECUENCO; VAN VUURDE, 2000) e soja (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004). A diversidade genotípica foi acessada por meio de BOX-PCR, o qual foi realizado em um total de 154 isolados aleatoriamente selecionados. Baseado em um valor de similaridade de *cut-off* de 70% (MCSPADDEN GARDENER et al., 2000; MAVRODI et al., 2001), 24 grupos distintos genotipicamente foram definidos entre os endófitos de colmo, 23 grupos entre endófitos de raiz e 25 grupos entre isolados de rizosfera (Tabela 3.1). O ensaio de paridade de cultivo em meio de cultura revelou que 20, 39 e 25% de isolados bacterianos selecionados, respectivamente, do colmo, raiz e rizosfera, inibiram significativamente o crescimento de *F. moniliforme*, agente causal de Pokkah boeng em cana-de-açúcar (Tabela 3.1).

Baseado nos grupos determinados pelo marcador BOX-PCR e atividade biológica contra *F. moniliforme*, 18 isolados endofíticos bacterianos, sendo 11 isolados da raiz e 7 do colmo, foram selecionados para o sequenciamento do gene 16S rDNA. A análise das seqüências de 16S rDNA revelou que a maioria (13 de 18) dos isolados endofíticos pertence ao gênero *Burkholderia*, sendo que os outros 5 isolados foram classificados como *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Microbacterium* (Tabela 3.2). Estudos anteriores têm mostrado que isolados pertencentes a estes gêneros bacterianos promovem crescimento em diferentes culturas e são capazes de controlar doenças específicas em plantas. Por exemplo, o endófito de arroz *Pantoea agglomerans* YS19 apresentou atividade de fixação de nitrogênio *in vitro* e produziu quatro diferentes fitormônios, incluindo AIA, e promoveu o crescimento da planta (FENG; SHEN; SONG, 2006). Recentemente, uma nova *Pantoea* sp. endofítica e fixadora de nitrogênio foi isolada de cana-de-

Tabela 3.1 - Frequência, diversidade e atividade de bactérias isoladas da rizosfera, raízes e colmos de cana-de-açúcar cultivadas no campo no Brasil

Fonte do isolado	Densidade média (CFU g ⁻¹ [peso fresco] ± SE ^a)	No. De isolados selecionados aleatoriamente	No. de grupos BOX-PCR	No. (%) de isolados apresentando:	
				Inibição do crescimento de <i>F. moniliforme</i>	Produção AIA
Colmo	(2,87 ± 1,33) X 10 ²	49	24	10 (20)	36 (74)
Raiz	(3,27 ± 2,01) X 10 ⁶	44	232	17 (39)	20 (46)
Rizosfera	(7,90 ± 2,43) X 10 ⁷	61	25	15 (25)	8 (13)

^a Valores médios de 18 repetições

açúcar em Cuba (LOIRET et al., 2004), porém seu papel na promoção do crescimento vegetal ainda não foi estabelecido. As linhagens endofíticas, *Pseudomonas fluorescens* Endo2 e Endo35 induziram proteção sistêmica contra *Macrophomina phaseolina*, agente causal de podridão seca da raiz em *Vigna mungo* (KARTHIKEYAN et al., 2005). Nos últimos anos, isolados endofíticos de espécies de *Burkholderia* estão recebendo maior interesse devido à sua capacidade de fixar nitrogênio e seu potencial de promover crescimento vegetal. Diferentes espécies de *Burkholderia* têm sido isoladas de diversas culturas (TABACCHIONI et al., 2002; BERG; EBERL; HARTMANN, 2005), incluindo cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2002), arroz (DIVAN BALDANI; BALDANI; DÖBEREINER, 2000), uva (COMPANT et al., 2004), cebola (SESSITSCH et al., 2005), milho e café (ESTRADA-DE LOS SANTOS; BUSTILLOS-CRISTALES; CABALLERO-MELLADO, 2001; ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2002).

3.2.2.2 Caracterização genotípica de isolados endofíticos de *Burkholderia*

A alta frequência de espécies de *Burkholderia* entre os endófitos de cana-de-açúcar e sua forte atividade inibitória contra *F. moniliforme* (Tabela 3.3) faz com que estes isolados sejam potenciais candidatos ao controle biológico da doença Pokkah boeng. Estudos anteriores têm mostrado que linhagens pertencentes ao gênero *Burkholderia* são efetivas agentes no biocontrole (BEVIVINO et al., 2000) e constituem o ingrediente ativo e vários produtos de biocontrole disponíveis comercialmente, incluindo Deny (Helena Chemicals, Memphis, TN, USA) e

Tabela 3.2 - Características genéticas de isolados bacterianos endofíticos isolados de cana-de-açúcar ^a

Isolado	Tecido planta	16S rDNA				gene <i>recA</i>			
		No. acesso	Hit no NCBI	Gv. % Id.	Linh. Ref.	No. acesso Hit no NCBI	Hit no NCBI	Gv. % Id.	Linh. Ref.
ESS21	Caule	EF602568	<i>Microbacterium testaceum</i>	99	SE017				
ESR94	Raiz	EF602564	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99	ATCC13525				
ESS10	Caule	EF602554	<i>Pantoea stewartii</i>	99	LMG2715				
ESS12	Caule	EF602555	<i>Pantoea ananatis</i>	99	LMG20106				
ESS29	Caule	EF602556	<i>Pantoea ananatis</i>	99	LMG20106				
ESS2	Caule	EF602551	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III	100 AU1054	EF602569	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III	100 CEP511
ESS9	Caule	EF602553	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III	100 AU1054	EF602573	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III	100 CEP511
ESR100	Raiz	EF602566	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III	100 HI2424	EF602581	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III	99 HI2424
ESR99	Raiz	EF602565	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III	100 HI2424	EF602571	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III	99 HI2424
ESR60	Raiz	EF602557	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III	99 HI2424	EF602574	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III	99 CEP511
ESR108	Raiz	EF602567	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III	99 LGM12615	EF602572	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III	99 MRL10
ESS4	Caule	EF602552	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III	99 LGM12615	EF602576	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III	98 MRL10
ESR90	Raiz	EF602562	<i>Burkholderia cepacia</i>	I	99 ATCC25416	EF602580	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III	98 MRL10
ESR85	Raiz	EF602560	<i>Burkholderia cepacia</i>	I	99 ATCC25416	EF602579	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III	98 MRL10
ESR92	Raiz	EF602563	<i>Burkholderia cepacia</i>	I	99 ATCC25416	EF602570	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III	98 MRL10
ESR63	Raiz	EF602558	<i>Burkholderia cepacia</i>	I	99 ATCC25416	EF602578	<i>Burkholderia cepacia</i>	I	98 ATCC17759
ESR73	Raiz	EF602559	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III	99 LGM12615	EF602577	<i>Burkholderia cepacia</i>	K	99 R9929
ESR87	Raiz	EF602561	<i>Burkholderia cepacia</i>	I	99 ATCC25416	EF602575	<i>Burkholderia cepacia</i>	-	97 J503

^a Os isolados representam 18 grupos genotípicos com base na análise de BOX-PCR

Tabela 3.3 - Características fenotípicas dos isolados bacterianos endofíticos de cana-de-açúcar^a

Linhagem	Antagonismo a <i>F. moniliforme</i> ^a	AIA	Protease	Pirrolnitrina		Crescimento a 37°C
				PCR	TLC	
ESS21	-	+ ^b	+	-	-	+
ESR94	++	+	+	+	+	-
ESS10	+	+	-	-	-	+
ESS12	+	+	-	-	-	+
ESS29	+	+	-	-	-	+
ESS2	+++	+	+	-	-	+
ESS9	+++	+	+	-	-	+
ESR100	++	- ^b	+	-	-	+
ESR99	+++	+	+	-	-	+
ESR60	+++	+	+	-	-	+
ESR108	+++	-	+	+	+	+
ESS4	+++	+	+	+	+	+
ESR90	+++	-	+	+	+	+
ESR85	+++	-	+	+	+	+
ESR92	+++	-	+	+	+	+
ESR63	+++	-	+	+	+	+
ESR73	++	-	+	+	+	+
ESR87	+++	+	+	+	+	+

^a -, sem inibição; +, zona de inibição 1-3 mm; ++, zona de inibição 4-8 mm; +++, zona de inibição 9-13 mm

^b +, positivo; -, negativo

Intercept (Soil Technologies Corp., Fairfield, IA, USA). Porém, muitas linhagens de espécies pertencentes ao conhecido ‘complexo *Burkholderia cepacia*’ (Bcc) podem agir como patógenos oportunistas em humanos, especialmente em pacientes com fibrose cística e indivíduos imuno comprometidos (GOVAN; DERETIC, 1996). Linhagens pertencentes ao Bcc são resistentes a um amplo espectro de antibióticos terapêuticos, e apesar do uso de medidas de controle mais severas, o número de infecções em hospitais causadas por linhagens do Bcc não têm diminuído (COENYE; VANDAMME, 2003; SAIMAN; SIEGEL, 2004). O Bcc consiste de pelo menos 9 espécies genômicas distintas (descritas anteriormente como genomovares de I a IX) (MAHENTHIRALINGAM et al., 2000b; COENYE et al., 2003), e todos estes genomovares (gv.) contém linhagens que são capazes de infectar humanos ou colonizar plantas (BALDWIN et al., 2007). Dessa forma, uma identificação acurada dos isolados de *Burkholderia* obtidos da cana-de-

açúcar é um ponto crucial para avançar no desenvolvimento destes isolados como agentes no biocontrole de Pokkah boeng e outras doenças de cana-de-açúcar.

Durante os últimos anos, vários marcadores moleculares têm sido testados para caracterizar espécies de *Burkholderia* de origem ambiental e clínica (LIPUMA et al., 1999; FIORE et al., 2001; SALLES; DE SOUZA; VAN ELSAS, 2002; BEVIVINO et al., 2005; CAMPANA et al., 2005). Na maioria destes estudos, incluindo o recente estudo *multilocus sequence typing* (MLST) (BALDWIN et al., 2005; DALMASTRI et al., 2007), os genes 16S rDNA e *recA* revelaram-se bons marcadores para caracterizar e discriminar isolados de *Burkholderia* (BALANDREAU et al., 2001; CHAN; STEAD; COUTTS, 2003; PAYNE et al., 2005; RAMETTE; LIPUMA; TIEDJE, 2005; VANLAERE et al., 2005). No presente trabalho, o seqüenciamento e análises filogenéticas foram realizadas em ambos os genes, 16S rDNA (~1500 pb) e *recA* (~1000 pb) para 13 isolados endofíticos de *Burkholderia* (Tabela 3.2; Figuras 3.1 e 3.2). Com base na análise do BLAST para as seqüências dos genes 16S rDNA e *recA*, os isolados ESS2, ESS9, ESR100, ESR99 e ESR60 são proximamente relacionados (valores de identidade variando de 99 a 100%) a linhagens tipo de *B. cenocepacia* (gv. III), incluindo linhagens isoladas de pacientes com fibrose cística e linhagens completamente seqüenciadas (Tabela 3.2). *B. cenocepacia* (gv. III) bem como *B. multivorans* (gv. II) e *B. dolosa* (gv. VI) contêm principalmente linhagens provenientes de fontes clínicas (BALDWIN et al., 2007). A linhagem *B. cenocepacia* AU1054 foi isolada a partir de sangue de um paciente com fibrose cística e com o emprego de vários métodos genotípicos, foi caracterizada como representante da linha clonal *B. cenocepacia* PHDC (CHEN et al., 2001).

Com base na análise do gene 16S rDNA, os isolados endófitos de cana-de-açúcar ESS2 e ESS9 apresentaram identidade de 100% à linhagem AU1054 (Tabela 3.2; Figura 3.1). Confirmando a análise do gene 16S rDNA, a análise do gene *recA* mostrou que os isolados ESS2 e ESS9 são idênticos (identidade 100%) a *B. cenocepacia* CEP511 (Tabela 3.2; Figura 3.2), a qual é uma linhagem tipo obtida de paciente com fibrose cística (Sidney, Austrália) e é representante de uma linhagem epidêmica espalhada entre vários pacientes (MAHENTHIRALINGAM et al., 1996). Da mesma forma, com base na análise do 16S rDNA e, em parte, na análise do gene *recA* (Tabela 3.2; Figuras 3.1 e 3.2), os endófitos ESR100, ESR99 e ESR60 foram proximamente (identidade de 99 a 100%) relacionados à *B. cenocepacia* linhagem HI2424. A linhagem *B. cenocepacia* HI2424 foi inicialmente obtida de um campo de cebola, mas

posteriormente também foi caracterizada como sendo representante da linha clonal *B. cenocepacia* PHDC, a qual causa extensiva infecção em pacientes com fibrose cística (LIPUMA et al., 2002). Com base na análise das seqüências do gene *recA*, os isolados ESR108, ESS4, ESR92, ESR85 e ESR90 agruparam-se e são mais filogeneticamente relacionados à linhagem MRL-10, a qual é uma linhagem do ambiente caracterizada por MLST (BALDWIN et al., 2005) como *B. cenocepacia* (gv. IIIE) (Tabela 3.2; Figura 3.2). Considerando a filogenia do gene *recA*, o isolado ESR87 foi o menos relacionado a uma linhagem do complexo *B. cepacia*, revelando 97% de identidade com a linhagem J503 (Tabela 3.2) e somente 96% de identidade com *B. cenocepacia* CEP511 (Figura 3.2). Baseado na análise filogenética do 16S rDNA, os isolados endofíticos de *Burkholderia* obtidos neste estudo agruparam-se distantemente de *B. sacchari* (AF263278) e *B. tropicalis* (AJ420332), dois isolados obtidos, respectivamente, de solo cultivado com cana-de-açúcar e colmo de cana-de-açúcar no Brasil (Figura 3.1). Adicionalmente, com base na análise filogenética de seqüências do gene *recA*, os isolados endofíticos de *Burkholderia* obtidos neste estudo agruparam-se distantemente de *B. sacchari* (AJ550303), isolada de solo cultivado com cana-de-açúcar no Brasil (Figura 3.2).

A presença de isolados *B. cenocepacia* III-like em comunidades de bactérias endofíticas de cana-de-açúcar suporta e estende as conclusões de estudos anteriores (BALANDREAU et al., 2001; DALMASTRI et al., 2005; PIRONE et al., 2005), nos quais *B. cenocepacia* (gv. III) e a linha IIIB ocorrem no ambiente natural que pode servir como um nicho para bactérias patogênicas oportunistas em humanos. Ensaio adicionais *in vitro* mostraram que todos os 13 isolados endofíticos de *Burkholderia* de cana-de-açúcar foram capazes de crescerem a 37°C (Tabela 3.2). Porém, deve ser destacado que uma completa análise MLST deve ser realizada, bem como estudos de infectologia para se afirmar categoricamente a identidade dos endófitos de cana-de-açúcar com linhagens tipo de origem clínica do complexo *B. cepacia*. Não obstante, as análises filogenéticas dos genes 16S rDNA e *recA* sugerem que linhagens de *Burkholderia* endofíticas isoladas de cana-de-açúcar são muito relacionadas geneticamente à linhagens tipo do complexo *B. cepacia*. É importante ressaltar, que a maioria dos estudos sobre a ocorrência de linhagens do Bcc em ambientes naturais tem focado em rizosfera de milho (DALMASTRI et al., 2005; PIRONE et al., 2005; PAYNE et al., 2006; DALMASTRI et al., 2007). Os resultados deste estudo indicam pela primeira vez que isolados relacionados ao Bcc é parte integral da comunidade endofítica bacteriana da cana-de-açúcar.

Figura 3.1 - Árvore filogenética baseada nas seqüências de 16S rDNA de isolados bacterianos endofíticos de cana-de-açúcar considerando Neighbor-Joining. As origens dos isolados estão indicadas pelas siglas: ESS (*endophyte sugarcane stem*) e ESR (*endophyte sugarcane root*). As seqüências obtidas dos bancos de dados e números de acesso são dados entre parênteses. A caixa cinza contém linhagens (tipo) pertencentes ao complexo *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) incluindo os isolados endofíticos de cana-de-açúcar. Os números romanos mostrados em frente ao nome das espécies/linhagens se referem ao número do genomovar do Bcc. Os isolados de cana-de-açúcar que produzem pirrolnitrina estão indicados com um asterisco (*). Para a construção foi utilizado o modelo de substituição de Kimura 2-parâmetros e os nós estão suportados por 1000 replicações de *bootstrap*. Valores de *bootstrap* acima de 50% e a escala da distância genética estão indicados

Figura 3.2 - Árvore filogenética baseada nas seqüências do gene *recA* dos isolados bacterianos endofíticos de cana-de-açúcar considerando Neighbor-Joining. As origens dos isolados estão indicadas pelas siglas: ESS (*endophyte sugarcane stem*) e ESR (*endophyte sugarcane root*). As seqüências obtidas dos bancos de dados e números de acesso são dados entre parênteses. A caixa cinza contém linhagens (tipo) pertencentes ao complexo *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) incluindo os isolados endofíticos de cana-de-açúcar. Os números romanos mostrados em frente ao nome das espécies/linhagens se referem ao número do genomovar do Bcc. Os isolados de cana-de-açúcar que produzem pirrolnitrina estão indicados com um asterisco (*). Para a construção foi utilizado o modelo de substituição de Kimura 2-parâmetros e os nós estão suportados por 1000 replicações de *bootstrap*. Valores de *bootstrap* acima de 50% e a escala da distância genética estão indicados

3.2.2.3 Caracterização bioquímica de isolados endofíticos de *Burkholderia*

Entre os 154 isolados selecionados da rizosfera, raiz e colmo de cana-de-açúcar, grande parte apresentou produção do fitormônio AIA (Tabela 3.1). A maioria dos isolados produtores de AIA foram encontrados entre os endófitos de colmo, seguidos pelos endófitos de raiz e isolados da rizosfera (Tabela 3.1). Para os 13 isolados endofíticos de *Burkholderia*, a produção de AIA foi detectada em 6 isolados, sendo 5 deles proximamente relacionados à *B. cenocepacia* (gv. III) (Tabela 3.2; Figuras 3.1 e 3.2). A observação de que a produção de AIA é mais prevalente entre os isolados endófitos que entre os isolados de rizosfera de cana-de-açúcar é consistente com os resultados de estudos anteriores realizados em soja (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004). Embora o efeito e a função do AIA produzido pelas bactéria endofíticas de cana-de-açúcar ainda precisam ser investigados, esta característica foi considerada um dos principais mecanismos envolvidos na promoção do crescimento do milho pelas bactérias rizosféricas *Gluconacetobacter azotocaptans* DS1, *Pseudomonas putida* CQ179 e *Azospirillum lipoferum* N7 em condições de casa-de-vegetação (MEHNAZ; LAZAROVITS, 2006). Muitos estudos têm reportado que comunidades microbianas endofíticas têm origem do solo e da rizosfera (LAMB; TONKYN; KLUEPFEL, 1996; ELVIRA-RECUENCO; VAN VUURDE, 2000). A observação de que a frequência de bactérias produtoras de AIA é maior no interior do colmo que na rizosfera de cana-de-açúcar sugere que as plantas selecionam para bactérias com esta característica ou que bactérias produtoras de AIA contêm outras características as quais as permitem alcançarem e se estabelecerem efetivamente no interior dos tecidos da planta.

Para identificar metabólitos envolvidos na inibição do crescimento de *F. moniliforme*, as bactérias foram submetidas a vários testes, incluindo ensaios enzimáticos, detecção de genes antibióticos por PCR e cromatografia (TLC e RP-HPLC). Todas as bactérias endofíticas sequenciadas, exceto os três isolados do gênero *Pantoea*, produziram proteases extracelulares (Tabela 3.2). Nenhuma das bactérias endofíticas apresentaram produção de ácido cianídrico, que é um composto volátil encontrado em diversas espécies de *Pseudomonas* antagônicas (VOISARD et al., 1989; RAMETTE; MOENNE-LOCCOZ; DEFAGO, 2003), e todos os isolados foram negativos para quitinase e produção de biosurfactantes (dados não mostrados). A detecção baseada em PCR revelou que nenhum dos 18 isolados endofíticos continha genes específicos envolvidos na biossíntese dos antibióticos 2,4-diacetilfloroglucinol, fenazinas e pioluteorina; a

falta da produção destes três antibióticos foi confirmada por análise em RP-HPLC do extrato de cultura dos 18 isolados (dados não mostrados). A detecção por PCR do *prnD*, um dos quatro genes envolvidos na biossíntese de pirrolnitrina (LEE; ANG; ZHAO, 2006), e a análise por TLC revelaram que a linhagem *Pseudomonas fluorescens* ESR94 e oito isolados endofíticos de *Burkholderia* produziram o antibiótico pirrolnitrina. (Tabela 3.3; Figura 3A). Baseado nas seqüências dos genes 16S rDNA e *recA*, os isolados endofíticos de *Burkholderia* produtores de pirrolnitrina, agruparam-se (Figuras 3.1 e 3.2), sugerindo que os genes *prn* podem ser usados como um marcador molecular adicional para distinguir entre linhagens e espécies dentro do Bcc.

Os resultados do estudo feito por Seo e Tsuchiya (2004) mostraram que em uma coleção de linhagens de Bcc, 74% foram PCR-positivas na detecção de *prnC*, e a maioria das linhagens positivas para o gene *prnC* pertenciam ao *B. cepacia* (gv. I), o qual compreendia isolados de fontes clínicas e ambientais. Com base em seus resultados, Seo e Tsuchiya (2004) sugeriram que a análise por *restriction fragment lenght polymorphism* do gene *prnC* poderia ser usada como um marcador para distinguir espécies de *Burkholderia*. Porém, baseado em análises *in silico* de genomas do Bcc completamente seqüenciados incluídos na filogenia dos genes 16S rDNA e *recA* deste estudo (Figuras 3.1 e 3.2), as linhagens tipo *B. cenocepacia* HI2424 e AU1054 isoladas, respectivamente, de cebola e sangue de paciente com fibrose cística, não contém genes do *cluster* da pirrolnitrina. Adicionalmente, as linhagens *B. ambifaria* AMMD, isolada de plantas de ervilha saudáveis, e *B. cenocepacia* PC184, isolada de pacientes com fibrose cística, contem os genes para a biossíntese da pirrolnitrina. Esta aparente falta de correlação entre a origem de isolados de *Burkholderia* e a presença dos genes *prn*, sugerem que esta característica é provavelmente de pouco valor para ser usada como um marcador adicional para distinguir entre isolados clínicos e ambientais de *Burkholderia*.

3.2.2.4 Papel da pirrolnitrina na inibição do crescimento de *Fusarium moniliforme* por *Burkholderia* endofítica

A pirrolnitrina [3-cloro-4-(2'-nitro-3'-clorofenil)pirrol] é um metabólito antifúngico com atividade contra uma gama de fungos patogênicos de plantas ou do homem (HILL et al., 1994; LIGON et al., 2000). A pirrolnitrina foi originalmente descrita para *Burkholderia pyrrocinia* (ARIMA et al., 1964) e mais tarde para *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Myxococcus* e *Serratia*

(HAMMER et al., 1997). A pirrolnitrina desempenha um papel chave na atividade antifúngica de linhagens específicas de *Pseudomonas* (LIGON et al., 2000; RAAIJMAKERS; VLAMI; DE SOUZA, 2002) e tem sido postulado que esse antibiótico desempenha um importante papel na supressão natural de alguns solos contra a podridão da raiz causada por *Rhizoctonia solani* (GARBEVA; VOESENEK; ELSAS, 2004). Para entender-se a importância relativa da produção da pirrolnitrina pelos isolados endofíticos de *Burkholderia* na inibição do crescimento de *F. moniliforme*, foi realizada a mutagênese sítio-dirigida no gene *prnD* do isolado ESS4. A sequência parcial do gene *prnD* do isolado ESS4 obtida neste estudo (número de acesso EF602550) foi de 94% com a linhagem tipo *B. cepacia* AMMD (CP000441). A mutagênese sítio-dirigida resultou em 6 (de 15) mutantes putativos. A disrupção do gene *prnD* nestes mutantes foi confirmada em análise por PCR, e a perda da produção de pirrolnitrina foi confirmada por TLC (Figura 3.3B). Ensaaios com *F. moniliforme*, mostraram que o mutante *prnD* foi sensivelmente menos efetivo na inibição do crescimento do fungo que sua linhagem parental (Figura 3.3C), sugerindo que a maior atividade contra *F. moniliforme* está relacionada a outros metabólitos ainda desconhecidos. Espécies de *Burkholderia* são bem conhecidas por sua produção de diversos metabólitos antifúngicos, incluindo ácido fenilacético, ácido hidrocínâmico, ácido 4-hidroxifenilacético e metil ester 4-hidroxifenilacetato (KANG et al., 1998; MAO et al., 2006). O papel destes compostos, desde que presentes nos isolados endofíticos, no controle de doenças fúngicas ou na colonização endofítica da cana-de-açúcar permanece para ser investigado.

Figura 3.3 - Análise em TLC da produção de pirrolnitrina por bactérias endofíticas de cana-de-açúcar e inibição do crescimento de *Fusarium moniliforme* pela *Burkholderia* sp. linhagem ESS4 e seu mutante *prnD*. (A) A pirrolnitrina é detectada em extrato de cultura das linhagens de bactérias endofíticas ESS4, ESR63 e ESR90 de cana-de-açúcar por meio da reação com o reagente de Ehrlich espalhado sobre a placa de TLC. A pirrolnitrina pura (PRN; R_f é 0,48) foi incluída como controle e está indicada por uma seta. Uma suspensão do fungo *Cladosporium cucumerinum* foi espalhada sobre placas de TLC e as zonas brancas indicam as áreas onde o crescimento fúngico foi inibido. (B) Análise em TLC de extrato de cultura da linhagem selvagem ESS4 (wt) e seu mutante *prnD* (mut); a pirrolnitrina foi detectada no tipo selvagem mas não no mutante. (C) Ensaio de cultivo pareado com *Burkholderia* linhagem ESS4 (wt), seu mutante *prnD* (mut) e o fungo *Fusarium moniliforme* (inoculado no centro)

3.3 Conclusão

A comunidade bacteriana endofítica associada à cana-de-açúcar é constituída de múltiplos gêneros com potencial para a promoção do crescimento vegetal e controle de doenças. Com base na análise filogenética dos genes 16S rDNA e *recA* a maioria das bactérias endofíticas selecionadas isoladas da cana-de-açúcar pertencem ao gênero *Burkholderia* e são proximamente relacionados a isolados clínicos do complexo *Burkholderia cepacia* (Bcc). Estes resultados exemplificam e apóiam as conclusões de Parke e Gurian-Sherman (2001) que a identificação e classificação acuradas dos isolados de *Burkholderia* antagonistas e ambientais são essenciais antes da aplicação em sementes ou em plantas no campo para o controle de doenças ou promoção

de crescimento vegetal. A relativa alta frequência de diferentes espécies do Bcc associadas à cana-de-açúcar reforça a hipótese de Berg, Eberl e Hartmann (2005) que ambientes associados às plantas podem atuar como um reservatório para bactérias patogênicas oportunistas em humanos. Para afirmar categoricamente a identidade dos isolados endofíticos de *Burkholderia* com linhagens tipo de isolados clínicos do Bcc, uma análise MLST deve ser considerada, seguida por estudos de infecção e epidemiológicos.

Referências

- ARIMA, K.; IMANAKA, H.; KOUSAKA, M.; FUKUDA, A.; TAMURA, G. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 28, p. 575-576, 1964.
- BALANDREAU, J.; VIALARD, V.; COURNOYER, B.; COENYE, T.; LAESENS, S.; VANDAMME, P. *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 982-985, 2001.
- BALDWIN, A.; MAHENTHIRALINGAM, E.; DREVINEK, P.; VANDAMME, P.; GOVAN, J.R.; WAINE, D.J.; LIPUMA, J.J.; CHIARINI, L.; DALMASTRI, C.; HENRY, D.A.; SPEERT, D.P.; HONEYBOURNE, D.; MAIDEN, M.C.J.; DOWSON, C.G. Environmental *Burkholderia cepacia* complex isolates in human infections. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 13, p. 458-461, 2007.
- BALDWIN, A.; MAHENTHIRALINGAM, E.; THICKETT, K. M.; HONEYBOURNE, D.; MAIDEN, M.C.J.; GOVAN, J.R.; SPEERT, D.P.; LIPUMA, J.J.; VANDAMME, P.; DOWSON, C.G. Multilocus sequence typing scheme that provides both species and strain differentiation for the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, p. 4665-4673, 2005.
- BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 1673-1685, 2005.
- BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L. Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 31, p. 225-231, 2000.
- BEVIVINO, A.; PEGGION, V.; CHIARINI, L.; TABACCHIONI, S.; CANTALE, C.; DALMASTRI, C. Effect of *Fusarium verticillioides* on maize-root-associated *Burkholderia cenocepacia* populations. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, p. 974-983, 2005.
- BLANCO, Y.; PIÑÓN, D.; LEGAZ, M.E.; VICENTE, C. Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 99, p. 366-371, 2005.
- BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, The Hague, v. 252, p. 139-149, 2003.
- BONSALL, R.F.; WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S. Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. in vitro and in the rhizosphere of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 951-955, 1997.

BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid In Situ Assay for Indoleacetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 535-538, 1991.

CAMPANA, S.; TACCETTI, G.; RAVENNI, N.; FAVARI, F.; CARIANI, L.; SCIACCA, A.; SAVOIA, D.; COLLURA, A.; FISCARELLI, E.; DE INTINIS, G.; BUSETTI, M.; CIPOLLONI, A.; D'APRILE, A.; PROVENZANO, E.; COLLEBRUSCO, I.; FRONTINI, P.; STASSI, G.; TRANCASSINI, M.; TOVAGLIARI, D.; LAVITOLA, A.; DOHERTY, C.J.; COENYE, T.; GOVAN, J.R.W.; VANDAMME, P. Transmission of *Burkholderia cepacia* complex: evidence for new epidemic clones infecting cystic fibrosis patients in Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, p. 5136-5142, 2005.

CHAN, C.H.; STEAD, D.E.; COUTTS, R.H.A. Development of a species-specific *recA*-based PCR test for *Burkholderia fungorum*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 224, p. 133-138, 2003.

CHEN, J.S.; WITZMANN, K.A.; SPILKER, T.; FINK, R.J.; LIPUMA, J.J. Endemicity and inter-city spread of *Burkholderia cepacia* genomovar III in cystic fibrosis. **The Journal of Pediatrics**, Saint Louis, v. 139, p. 643-649, 2001.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 719-729, 2003.

COENYE, T.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J.J.; GOVAN, J.R.W.; MAHENTHIRALINGAM, E. Updated version of the *Burkholderia cepacia* complex experimental strain panel. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 2797-2798, 2003.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKA, E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 4951-4959, 2005.

COMPANT, S.; REITER, B.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; AIT BARKA, E. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1685-1693, 2004.

DALMASTRI, C.; BALDWIN, A.; TABACCHIONI, S.; BEVIVINO, A.; MAHENTHIRALINGAM, E.; CHIARINI, L.; DOWSON, C. Investigating *Burkholderia cepacia* complex populations recovered from Italian maize rhizosphere by multilocus sequence typing. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 1632-1639, 2007.

DALMASTRI, C.; PIRONE, L.; TABACCHIONI, S.; BEVIVINO, A.; CHIARINI, L. Efficacy of species-specific *recA* PCR tests in the identification of *Burkholderia cepacia* complex environmental isolates. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 246, p. 39-45, 2005.

DE SOUZA, J.T.; RAAIJMAKERS, J.M. Polymorphisms within the *prnD* and *pltC* genes from pyrrolnitrin and pyoluteorin-producing *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 43, p. 21-34, 2003.

DE SOUZA, J.T.; WELLER, D. M.; RAAIJMAKERS, J.M. Frequency, diversity, and activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in Dutch take-all decline soils. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 93, p. 54-63, 2003.

DIVAN BALDANI, V.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, p. 485-491, 2000.

DONG, Z.; HEYDRICH, M.; BERNARD, K.; MCCULLY, M.E. Further evidence that the N₂-fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1843-1846, 1995.

ELVIRA-RECUENCO, M.; VAN VUURDE, J.W.L. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, p. 1036-1041, 2000.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 2790-2798, 2001.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; MAVINGUI, P.; COURNOYER, B.; FONTAINE, F.; BALANDREAU, J.; CABALLERO-MELLADO, J. A N₂-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 285-294, 2002.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Oxford, v. 39, p. 783-791, 1985.

FENG, Y.; SHEN, D.; SONG, W. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS 19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, p. 938-945, 2006.

FIORE, A.; LAEVENS, S.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; VANDAMME, P.; CHIARINI, L. *Burkholderia cepacia* complex: distribution of genomovars among isolates from the maize rhizosphere in Italy. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 3, p. 137-143, 2001.

FISHER, P.J.; PETRINI, O.; SCOTT, H.M.L. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, London, v. 122, p. 299-305, 1992.

GARBEVA, P.; VOESENEK, K.; ELSAS, J.D. Quantitative detection and diversity of the pyrroline biosynthetic locus in soil under different treatments. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1453-1463, 2004.

GOLDEMBERG, J. The ethanol program in Brazil. **Environmental Research Letters**, Bristol, v. 1328, p. 014008, 2006.

GOVAN, J.R.; DERETIC, V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 60, p. 539-574, 1996.

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

HAMMER, P.E.; HILL, D.S.; LAM, S.T.; VAN PEE, K.H.; LIGON, J.M. Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 2147-2154, 1997.

HILL, D.S.; STEIN, J.I.; TORKEWITZ, N.R.; MORSE, A.M.; HOWELL, C.R.; PACHLATKO, J.P.; BECKER, J.O.; LIGON, J.M. Cloning of genes involved in the synthesis of pyrrolnitrin from *Pseudomonas fluorescens* and role of pyrrolnitrin synthesis in biological control of plant disease. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 78-85, 1994.

INIGUEZ, A.L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E.W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, p. 1078-1085, 2004.

KANG, Y.; CARLSON, R.; THARPE, W.; SCHELL, M.A. Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 3939-3947, 1998.

KARTHIKEYAN, M.; BHASKARAN, R.; RADHIKA, K.; MATHIYAZHAGAN, S.; JAYAKUMAR, V.; SANDOSSKUMAR, R.; VELAZHAHAN, R. Endophytic *Pseudomonas fluorescens* Endo2 and Endo35 induce resistance in black gram (*Vigna mungo* L. Hepper) to the pathogen *Macrophomina phaseolina*. **Journal of Plant Interactions**, Abingdon, v. 1, p. 135-143, 2005.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 16, p. 111-120, 1980.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J.R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 5, p. 408, 1995.

KUIPER, I.; BLOEMBERG, G.V.; NOREEN, S.; THOMAS-OATES, J.E.; LUGTENBERG, B. J.J. Increased uptake of putrescine in the rhizosphere inhibits competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* strain WCS 365. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, p. 1096-1104, 2001.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, London, v. 5, p. 150-163, 2004.

LACAVA, P.T.; ARAUJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J.L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, p. 55-59, 2004.

LAMB, T.G.; TONKYN, D.W.; KLUEPFEL, D.A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 1112-1120, 1996.

LEE, J.K.; ANG, E.L.; ZHAO, H. Probing the substrate specificity of aminopyrrolnitrin oxygenase (*prnD*) by mutational analysis. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 188, p. 6179-6183, 2006.

LIGON, J.M.; HILL, D.S.; HAMMER, P.E.; TORKEWITZ, N.R.; HANS-JOACHIM, D.H.; VAN PÉE, K. H. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 56, p. 688-695, 2000.

LIPUMA, J.J.; DULANEY, B.J.; MCMENAMIN, J.D.; WHITBY, P.W.; STULL, T.L.; COENYE, T.; VANDAMME, P. Development of rRNA-based PCR assays for identification of *Burkholderia cepacia* complex isolates recovered from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 3167-3170, 1999.

LIPUMA, J.J.; SPILKER, T.; COENYE, T.; GONZALEZ, C.F. An epidemic *Burkholderia cepacia* complex strain identified in soil. **The Lancet**, London, v. 359, p. 2002-2003, 2002.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 21, p. 583-606, 2002.

LOIRET, F.G.; ORTEGA, E.; KLEINER, D.; ORTEGA-RODES, P.; RODES, R.; DONG, Z. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, p. 504-511, 2004.

MAHENTHIRALINGAM, E.; BISCHOF, J.; BYRNE, S.K.; RADOMSKI, C.; DAVIES, J.E.; AV-GAY, Y.; VANDAMME, P. DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 3165-3173, 2000a.

MAHENTHIRALINGAM, E.; CAMPBELL, M.E.; HENRY, D.A.; SPEERT, D.P. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* infection in patients with cystic fibrosis: analysis by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 2914-2920, 1996.

MAHENTHIRALINGAM, E.; COENYE, T.; CHUNG, J.W.; SPEERT, D.P.; GOVAN, J.R.W.; TAYLOR, P.; VANDAMME, P. Diagnostically and experimentally useful panel of strains from the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 910-913, 2000b.

MAO, S.; LEE, S.J.; HWANGBO, H.; KIM, Y.W.; PARK, K.H.; CHA, G.S.; PARK, R.D.; KIM, K.Y. Isolation and characterization of antifungal substances from *Burkholderia* sp. culture broth. **Current Microbiology**, New York, v. 53, p. 358-364, 2006.

MAVRODI, O.V.; GARDENER, B.B.M.; MAVRODI, D.V.; BONSALE, R.F.; WELLER, D.M.; THOMASHOW, L.S. Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, p. 35-43, 2001.

MCSPADDEN GARDENER, B.B.; SCHROEDER, K.L.; KALLOGER, S.E.; RAAIJMAKERS, J.M.; THOMASHOW, L.S.; WELLER, D.M. Genotypic and phenotypic diversity of *phlD*-containing *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 1939-1946, 2000.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, New York, v. 51, p. 326-335, 2006.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 242, p. 205-215, 2002.

PARKE, J.L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 225-258, 2001.

PAYNE, G.W.; RAMETTE, A.; ROSE, H.L.; WEIGHTMAN, A.J.; JONES, T.H.; TIEDJE, J.M.; MAHENTHIRALINGAM E. Application of a *recA* gene-based identification approach to the maize rhizosphere reveals novel diversity in *Burkholderia* species. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 259, p. 126-132, 2006.

PAYNE, G.W.; VANDAMME, P.; MORGAN, S.H.; LIPUMA, J.J.; COENYE, T.; WEIGHTMAN, A.J.; JONES, T.H.; MAHENTHIRALINGAM, E. Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 3917-3927, 2005.

PIRONE, L.; CHIARINI, L.; DALMASTRI, C.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S. Detection of cultured and uncultured *Burkholderia cepacia* complex bacteria naturally occurring in the maize rhizosphere. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 1734-1742, 2005.

RAAIJMAKERS, J.M.; VLAMI, M.; DE SOUZA, J.T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 81, p. 537-547, 2002.

RADEMAKER, J.L.W.; LOUWS, F.J.; DE BRUIJN, F.J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting, In: AKKERMANS, A.D.L.; ELSAS, J.D.; BRUIJN, F.J. (Eds.). **Molecular microbial ecology manual**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 3.4. 3: 1–3.4. 3: 27.

RAID, R.N. **Pokkah Boeng Disease of Sugarcane**. Gainesville: University of Florida, 1998.

RAMETTE, A.; LIPUMA, J.J.; TIEDJE, J.M. Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1193-1201, 2005.

RAMETTE, A.; MOENNE-LOCCOZ, Y.; DEFAGO, G. Prevalence of fluorescent pseudomonads producing antifungal phloroglucinols and/or hydrogen cyanide in soils naturally suppressive or conducive to tobacco black root rot. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 44, p. 35-43, 2003.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, p. 827-837, 2006.

SAIMAN, L.; SIEGEL, J. Infection control in cystic fibrosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 17, p. 57-71, 2004.

SALLES, J.F.; DE SOUZA, F.A.; VAN ELSAS, J.D. Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1595-1603, 2002.

SEO, S.T.; TSUCHIYA, K. PCR-based identification and characterization of *Burkholderia cepacia* complex bacteria from clinical and environmental sources. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, p. 413-419, 2004.

SESSITSCH, A.; COENYE, T.; STURZ, A.V.; VANDAMME, P.; BARKA, E.A.; SALLES, J.F.; VAN ELSAS, J.D.; FAURE, D.; REITER, B.; GLICK, B.R. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 1187-1192, 2005.

SESSITSCH, A.; HOWIESON, J.G.; PERRET, X.; ANTOUN, H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Advances in rhizobium research. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 21, p. 323-378, 2002.

STROBEL, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, p. 535-544, 2003.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 19, p. 1-30, 2000.

TABACCHIONI, S.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; CHIARINI, L. *Burkholderia cepacia* complex in the rhizosphere: a minireview. **Annals of Microbiology**, Milano, v. 52, p. 103-117, 2002.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAC, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

VANLAERE, E.; COENYE, T.; SAMYN, E.; VAN DEN PLAS, C.; GOVAN, J.; DE BAETS, F.; DE BOECK, K.; KNOOP, C.; VANDAMME, P. A novel strategy for the isolation and identification of environmental *Burkholderia cepacia* complex bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 249, p. 303-307, 2005.

VOISARD, C.; KEEL, C.; HAAS, D.; DEFAGO, G. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 8, p. 351-358, 1989.